

# THESE

présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Spécialité : microbiologie et biocatalyse industrielle

Par Céline LEROY

## Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques

Soutenue le 2 février 2006 à l'Ifremer de Nantes devant le jury composé de :

M Lejeune P.	Professeur INSA, Lyon I	Rapporteur
M Frère J.	Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
M Combes D.	Professeur, INSA Toulouse	Directeur de thèse
M Schmitz P.	Professeur, INSA Toulouse	Président
Mme Compère C.	Chercheur Ifremer, Brest	Examineur
Mme Graber M.	Maître de conférence, Université La Rochelle	Examineur
Mme Delbarre-Ladrat C.	Chercheur Ifremer, Nantes	Invité
M Ghillebaert F.	Chercheur Mexel S.A.	Invité

**Ecole Doctorale** – SEVAB (Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries).  
**Laboratoires** – Biotechnologie et Molécules Marines de l'Ifremer de Nantes en collaboration avec le laboratoire Interfaces et Capteurs de l'Ifremer de Brest et le laboratoire Biotechnologie-Bioprocédés de l'INSA de Toulouse



Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques.

Thèse de doctorat, spécialité microbiologie et biocatalyse industrielle.

Soutenue à l'Ifremer de Nantes le 2 février 2006, 206 pages.

Numéro d'ordre : 823

---

**RESUME :**

L'adhésion de salissures marines sur les structures immergées en eau de mer cause de sévères dégâts et problèmes économiques par une accélération de la dégradation des matériaux et une diminution des performances industrielles. Nous avons choisi de tester le potentiel antisalissure de préparations enzymatiques commerciales de type hydrolases (protéases, glycosidases et lipases) sur les premières étapes d'adhésion des salissures marines : le biofilm bactérien. Un test d'évaluation de propriétés antisalissures concernant l'adhésion d'une bactérie marine du genre *Pseudoalteromonas sp.* D41 en microplaque et en eau de mer naturelle stérile a été mis au point. Ce test est adapté au criblage d'activités de prévention ou de nettoyage d'un biofilm marin et permet de tester la toxicité des préparations enzymatiques sur les cellules non adhérees. Les taux d'inhibition exprimés en fonction du logarithme de la concentration en enzyme consiste en une courbe sigmoïde de type dose-réponse. Des hydrolases testées, les protéases dont la subtilisine sont les plus efficaces. Un mélange d'activités enzymatiques amylases, lipases et protéases a montré une forte synergie d'activité pour inhiber l'adhésion de *Pseudoalteromonas sp.* D41 en microplaque. L'étude de la composition de substances polymériques produites par *Pseudoalteromonas sp.* D41 en fermenteur et au sein d'un biofilm a permis de mieux comprendre la nature des molécules organiques cibles impliquées dans l'inhibition de l'adhésion.

---

**MOTS CLES :**

Biofilm marin, *Pseudoalteromonas sp.*, criblage, microplaque, DAPI, EPS, hydrolases, antisalissure, adhésion, salissure marine.

---

**JURY**

M Lejeune P.	Professeur INSA, Lyon I	Rapporteur
M Frère J.	Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
<b>M Combes D.</b>	Professeur, INSA Toulouse	Directeur de thèse
M Schmitz P.	Professeur, INSA Toulouse	Président
Mme Compère C.	Chercheur Ifremer, Brest	Examineur
Mme Graber M.	Maître de conférence, Université La Rochelle	Examineur
Mme Delbarre-Ladrat C.	Chercheur Ifremer, Nantes	Invité
M Ghillebaert F.	Chercheur Mexel S.A.	Invité

**Ecole Doctorale** – SEVAB (Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries).

**Laboratoires** – Biotechnologie et Molécules Marines de l'Ifremer de Nantes en collaboration avec le laboratoire Interfaces et Capteurs de l'Ifremer de Brest et le laboratoire Biotechnologie-Bioprocédés de l'INSA de Toulouse.

**NAME:** LEROY

**First name:** Céline

Antifouling approach by enzymatic processes.

Ph. D, microbiology and industrial biocatalysis.

Defended at Ifremer Nantes on february 2<sup>nd</sup> 2006, 206 pages.

---

**SUMMARY :**

Fouling on marine underwater surfaces causes critical and economic problems such as important material biodamages and industrial performances reduction. We chose to test antifouling potential of enzymatic commercial preparations like hydrolases (proteases, glycosidases and lipases) in order to inhibit the first fouling adhesion step: bacterial biofilm formation. An evaluation test of antifouling properties onto marine bacterial adhesion was designed using a mono-incubation of *Pseudoalteromonas sp.* D41 in microtiter plate and in sterile natural sea water. This test was adapted to screen agents for bacterial adhesion removal or inhibition activities and allowed to test enzymatic preparations toxicity on non adhered bacteria. Inhibition rates according to logarithm of enzymatic preparation concentration exhibits a sigmoid shape like dose-response curves. Among hydrolases, proteases like subtilisin are the most efficient enzymes. The efficiency of amylase, lipase and protease activity mixture was evaluated and showed a high synergistic inhibition on *Pseudoalteromonas sp.* D41 adhesion in microtiter plate. Studies on polymeric extracellular substances from *Pseudoalteromonas sp.* D41 in fermentation and in biofilm will be helpful in the understanding of the organic molecules nature involved in the adhesion inhibition.

---

**KEY WORDS :**

Marine biofilm, *Pseudoalteromonas sp.*, screening, microtiter plate, DAPI, EPS, hydrolases, antifouling, adhesion, fouling.

---

**JURY**

M Lejeune P.	Professeur INSA, Lyon I	Rapporteur
M Frère J.	Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
M Combes D.	Professeur, INSA Toulouse	Directeur de thèse
M Schmitz P.	Professeur, INSA Toulouse	Président
Mme Compère C.	Chercheur Ifremer, Brest	Examineur
Mme Graber M.	Maître de conférence, Université La Rochelle	Examineur
Mme Delbarre-Ladrat C.	Chercheur Ifremer, Nantes	Invité
M Ghillebaert F.	Chercheur Mexel S.A.	Invité

**Doctorate school** – SEVAB (Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries).

**Laboratories** – Biotechnologie et Molécules Marines de l’Ifremer de Nantes en collaboration avec le laboratoire Interfaces et Capteurs de l’Ifremer de Brest et le laboratoire Biotechnologie-Bioprocédés de l’INSA de Toulouse.

## Remerciements

Cette thèse a été financée par la société Mexel S.A. Je tiens donc à remercier Antoine. Vanlaer pour m'avoir confié ce travail et François Ghillebaert pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences scientifiques et techniques ainsi que de son soutien amical.

J'exprime ma gratitude aux professeurs Jacques Frère et Philippe Lejeune qui ont eu la lourde tâche d'être rapporteurs de ma thèse, à Marianne Graber pour avoir accepté de juger ce travail et au professeur Philippe Schmitz pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens également à remercier le professeur Didier Combes d'avoir accepté de diriger cette thèse. Je le remercie pour la grande liberté qu'il m'a laissée afin de mener ce travail de recherche.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance et mon amitié à Chantal Compère, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour son soutien tout au long de ces trois années, pour sa rigueur scientifique et ses précieux conseils.

Je remercie tout particulièrement Christine Delbarre-Ladrat pour sa disponibilité, sa patience, sa gentillesse et sa clairvoyance scientifique.

Je remercie également Jean Guezennec pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, ainsi que toute l'équipe Biotechnologie et Molécules Marines, Xavier, Anthony et Claire pour leur bonne humeur. Un grand merci à Corinne, Jacqueline, Sylvia, Joëlle et Gérard pour leur aide et leurs conseils avisés.

Mon amitié va également à l'équipe Interface et Capteur de l'Ifremer de Brest, Florence, Emmanuel, Florent, Laurent et aussi Nicolas et Bertrand pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier Stéphanie Mahévas, Marie-Joëlle Rochet et Mireille Cardinal pour leur précieuse aide en études statistiques ; Gaël Bougaran et Raymond Kaas pour les bons plans d'expériences ainsi que Ewa Lukomska et Jean-Paul Cadoret pour leur conseils en microscopie à épifluorescence.

Je n'oublierai pas la pause thé d'après déjeuner, les bavardages et la bonne humeur de tous et toutes. Je remercie donc Justine, Fabienne, Peggy, Claire, Alex, Sandrine, Nolwenn, Sylvain et tous les « non permanent » de l'Ifremer...

Enfin, un grand merci à mes amis, surtout à Manu, sans qui cette expérience ne me serait pas arrivée. Merci à mon chéri Alexandre pour sa patience et son soutien. Et je remercie ma famille, tout particulièrement mes parents.

# Liste des communications

## Communication orale :

Mise au point d'un modèle d'adhésion bactérienne et de formation d'un biofilm marin.  
*Céline Leroy, Christine Delbarre-Ladrat, François Ghillebaert, Chantal Compère, Didier Combes.*  
Graine d'adhésion 2004, 23-25 Juin 2004, Lyon, France.

## Posters :

Nouvelle méthode d'évaluation de l'efficacité de molécules inhibitrices de l'adhésion.  
*Céline Leroy, Chantal Compère, Christine Delbarre-Ladrat, François Ghillebaert, Didier Combes.*  
1<sup>ères</sup> journées thématiques du réseau national biofilm, 27 et 28 octobre 2005, Lorient, France.

Adhésion et substances polymériques extracellulaires d'une nouvelle espèce bactérienne marine.  
*Céline Leroy, Chantal Compère, Christine Delbarre-Ladrat, François Ghillebaert, Didier Combes.*  
1<sup>ères</sup> journées thématiques du réseau national biofilm, 27 et 28 octobre 2005, Lorient, France.

A biofilm-forming marine bacterium producing proteins as extracellular polymeric substances.  
*Céline Leroy, Christine Delbarre-Ladrat, François Ghillebaert, Chantal Compère, Didier Combes.*  
BioMicroWorld-2005, 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 15-18 mars 2005, Badajoz, Espagne.

Nouvelle approche de lutte contre l'adhésion des salissures marines  
*Céline Leroy, Christine Delbarre-Ladrat, François Ghillebaert, Chantal Compère, Didier Combes.*  
Doctoriales des Pays de la Loire, 19- 24 septembre 2004 , La Roche sur Yon, France.  
Récompensé par le prix du meilleur poster.

A Marine biofilm formation model in multiwell plate.  
*Céline Leroy, Christine Delbarre-Ladrat, François Ghillebaert, Chantal Compère, Didier Combes.*  
Alternative and Conventional Anti-Fouling Strategies, 13-15 septembre 2004, Mulheim, Allemagne.

First steps of biofilm formation on stainless steel immersed in seawater: theoretical modelling and experimental study.  
*P. Bertrand, C. Compère, D. Costa, C. Giessner-Prettre, F. Mazeas, P. Marcus, C. Poleunis, C. Leroy, C.-M. Pradier, M.G. Walls.*  
Biofilm 2003, 1-6 novembre 2003, Victoria, British Columbia, Canada.

## Publication:

A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye : a new method to screen antifouling agents.  
*Leroy C., Delbarre-Ladrat C., Ghillebaert F., Compère C. et Combes D.*  
Letters in applied microbiology.  
Article soumis le 30 novembre 2005.

## Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

AFM: microscopie à force atomique

ARN: acide ribonucléique

AI: auto-inducteur

AHL: N-acyl homosérine lactone

APS: persulfate d'ammonium

AS: activité spécifique

BCA: acide bicinchoninique

SAB: albumine de sérum bovin

Cfu: unité formant colonie

CTC: chlorure de 5-cyano-2,3-ditolyt tétrazolium

CV: crystal violet

DAPI: 4'6-diamidino-2-phenylindole

EC: enzyme commission

EPS: substances polymériques extracellulaires

FTIR: spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

INT DYE: chlorure de 2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tétrazolium

MA: marine agar

MATS: tests d'adhésion microbienne aux solvants

MB: marine broth

MHDP: méta-hydroxydiphényle

PEG: polyéthylène glycol

QS: quorum sensing

SDS-PAGE: électrophorèse en gel polyacrylamide avec sulfate de sodium dodécyle

TBT: tributylétain

Temed: tétraméthyléthylènediamine

TNO: organisation néerlandaise pour la recherche scientifique appliquée

UA: unités d'absorbance

UV: ultra violet

XPS: spectroscopie de photoélectrons induite par rayons X





<b>Table des illustrations – Figures .....</b>	<b>15</b>
<b>Table des illustrations –Tableaux .....</b>	<b>19</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 – Etude bibliographique .....</b>	<b>25</b>
1. Biofilm.....	27
1.1. Mécanisme de formation .....	27
1.1.1. Film primaire.....	28
1.1.2. Transport.....	29
1.1.3. Adsorption réversible et irréversible .....	30
1.1.4. Matrice extracellulaire.....	31
1.1.5. Macrocolonies.....	35
1.1.6. Dispersion .....	36
1.2. Problèmes liés aux biofilms.....	36
1.2.1. Biofilms associés à des bactéries pathogènes .....	36
1.2.2. Biofilms marins.....	37
1.3. Moyens de lutte .....	39
1.3.1. Peintures antisalissures .....	39
1.3.2. Conditionnement de surface .....	43
1.3.3. Traitements des circuits de refroidissement.....	44
1.3.4. Traitements enzymatiques .....	45
1.4. Tests <i>in vitro</i> .....	52
2. Enzymes.....	55
2.1. Hydrolases.....	55
2.1.1. Protéases.....	55
2.1.2. Glycosidases.....	58
2.1.3. Estérases et Lipases.....	59
2.2. Mélanges enzymatiques commerciaux.....	60
2.2.1. Applications .....	60
2.2.2. Production.....	61
<b>Chapitre 2 – Matériels et méthodes .....</b>	<b>63</b>
1. Produits à potentiel antisalissures .....	65
1.1. Enzymes.....	65
1.1.1. Préparations enzymatiques commerciales .....	65

---

1.1.2. Activités spécifiques.....	67
1.2. Produits industriels .....	70
2. Microbiologie .....	71
2.1. Souches bactériennes.....	71
2.2. Conditions de culture .....	71
2.3. Formation du biofilm en microplaque.....	72
2.3.1. Suspension bactérienne .....	72
2.3.2. Biofilm en microplaque .....	73
2.3.3. Optimisation de la solubilisation de la fluorescence DAPI .....	73
2.3.4. Quantification des bactéries marquées au DAPI.....	74
2.3.5. Fluorescence des bactéries en suspension en microplaque.....	75
2.3.6. Autofluorescence du biofilm .....	75
2.3.7. Statistiques : reproductibilité de la formation du biofilm.....	75
3. Traitements du biofilm .....	77
3.1. Plan de microplaque .....	77
3.2. Protocole de prévention .....	79
3.3. Protocole de lavage.....	79
3.4. Protocole de conditionnement .....	79
3.5. Témoins enzymatiques chauffés.....	79
3.6. Toxicité des enzymes.....	80
3.7. Statistiques : reproductibilité des taux d'inhibitions .....	80
3.8. Marquage des cellules vivantes .....	80
3.9. Enzymes en mélange.....	81
3.9.1. Plans d'expérience.....	81
3.9.2. Traitement du biofilm par le mélange sélectionné .....	82
3.9.3. Dénombrements.....	83
3.9.4. Biofilm sur verre.....	83
4. Caractérisation des EPS.....	85
4.1. EPS issus de fermentation.....	85
4.1.1. Culture en fermenteur .....	85
4.1.2. Extraction.....	85
4.1.3. Dosages colorimétriques .....	85
4.1.4. Caractérisation des résidus glycosidiques.....	87
4.1.5. Teneur en matière inorganique .....	88
4.1.6. Gels d'électrophorèse .....	88

4.1.7. Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	89
4.2. EPS du biofilm .....	89
<b>Chapitre 3 – Biofilm marin en microplaque .....</b>	<b>91</b>
1. Essais et optimisation.....	93
1.1. Quantification par fluorimétrie.....	94
1.1.1. Solubilisation du DAPI dans l'éthanol.....	94
1.1.2. Limite de détection .....	95
1.2. Cinétique d'adhésion .....	97
1.3. Croissance du biofilm.....	98
1.4. Autofluorescence du biofilm.....	99
1.5. Reproductibilité du biofilm .....	99
1.6. Conclusion .....	100
2. Application de détergents industriels.....	101
2.1. Effet de détergents industriels .....	101
2.2. Reproductibilité des taux d'inhibition.....	104
2.3. Conclusion .....	105
<b>Chapitre 4 – Potentiel antisalissure des enzymes .....</b>	<b>107</b>
1. Caractérisation des activités enzymatiques .....	109
1.1. Activité protéase .....	110
1.2. Activité glycosidase.....	112
1.3. Activités estérase et lipase.....	113
1.4. Conclusion .....	114
2. Criblage des enzymes .....	115
2.1. Protéases .....	115
2.2. Glycosidases .....	118
2.3. Lipases et estérases .....	125
2.4. Reproductibilité des taux d'inhibition.....	127
2.5. Toxicité des enzymes.....	128
2.6. Discussion.....	129
2.6.1. Efficacité des enzymes et nature des molécules organiques ciblées .....	130
2.6.2. Efficacité des enzymes et adsorption.....	131
2.6.3. Subtilisine .....	132
2.6.4. Comparaison avec des études précédentes.....	132

3. Rôle des additifs.....	135
3.1. Préparations commerciales et enzymes pures .....	135
3.2. Témoins enzymatiques chauffés.....	138
3.3. Conclusion .....	141
4. Augmentation du biofilm .....	143
4.1. Marquage des cellules vivantes .....	143
4.2. Exemple : protéase Amano .....	146
4.2.1. Autofluorescence et affinité DAPI.....	146
4.2.2. Dénombrement .....	147
4.2.3. Stabilité enzymatique .....	148
4.2.4. Substrat nutritif.....	149
4.2.5. Observations en microscopie.....	150
4.3. Discussion.....	150
5. Mélange d'enzymes.....	153
5.1. Etude des interactions d'enzymes en mélange .....	153
5.1.1. Plan d'expérience.....	153
5.1.2. Cinétiques enzymatiques des interactions d'ordre 2 .....	158
5.1.3. Discussion .....	160
5.2. Mélange sélectionné.....	162
5.2.1. Gain d'activité inhibitrice.....	162
5.2.2. Inhibition sur polystyrène et sur verre .....	165
5.2.3. Conclusion .....	166
6. Conclusion .....	169
<b>Chapitre 5 – Substances polymériques extracellulaires ..</b>	<b>171</b>
1. EPS issues de la fermentation de D41 .....	173
1.1. Composition biochimique .....	173
1.2. Glycoprotéines .....	174
1.3. FTIR.....	175
1.4. Discussion.....	177
2. EPS au sein de biofilm.....	179
3. Discussion.....	181
<b>Perspectives : conditionnement de surface .....</b>	<b>183</b>
<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>185</b>

**Bibliographie.....189**



# Table des illustrations – Figures

Figure 1 – Représentation schématique de la formation des biofilms (d'après Characklis, 1990) .	28
Figure 2 – Exemple de représentation d'une unité répétitive d'exopolysaccharide .....	32
Figure 3 – Structure chimique des monomères d'alginate issu de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
Figure 4 – Unité répétitive d'un exopolysaccharide extrait d'une bactérie marine. ....	34
Figure 5 – Représentation schématique des séquences de formation des salissures marines (d'après Wahl, 1989). ....	37
Figure 6 – Triade catalytique de la subtilisine.....	56
Figure 7 – Mécanisme d'action des protéases à sérine (X=O) et à cystéine (X=S).....	57
Figure 8 – Représentation schématique d'un clivage enzymatique d'un hétéropolysaccharide.....	58
Figure 9 – Représentation schématique de l'hydrolyse d'un polysaccharide. ....	68
Figure 10 – Représentation schématique du protocole de formation du biofilm en microplaque	72
Figure 11 – Corrélation entre la concentration en cfu.ml <sup>-1</sup> et l'absorbance à 600 nm pour D41...	72
Figure 12 – Plan de microplaque en vue de tester l'effet des enzymes et des produits Mexel®....	78
Figure 13 – Fluorescence mesurée en fonction du temps d'incubation de l'éthanol dans les puits marqués au DAPI à partir d'un biofilm développé 3h (■) et 24h (□) en microplaque.....	94
Figure 14 – Images de microscopie à épifluorescence de bactéries <i>Pseudoalteromonas sp.</i> D41 adhérées sur une surface de verre et marquées au DAPI.....	95
Figure 15 – Corrélation entre la mesure de la fluorescence du DAPI et le nombre de bactéries marquées au DAPI.....	95
Figure 16 – Cinétique de la formation du biofilm en microplaque.....	97
Figure 17 – Nombre de bactéries totales adhérentes et non adhérentes par puits au cours du temps.	98
Figure 18 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en mg.l <sup>-1</sup> pour les 3 produits industriels testés (alkylamines en solution) 336 10 5 (ligne 1), 336 HO (ligne 2) et 336 02 5 (ligne 3) selon les 3 protocoles d'essais. ....	101
Figure 19 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en mg.l <sup>-1</sup> pour les 3 produits testés l'alkylglucoside AG6202 (ligne 1), l'alkylamine en émulsion 432/0 (ligne 2) et l'hypochlorite de sodium (ligne 3) selon les 3 protocoles d'essais .....	102
Figure 20 – Cinétique enzymatique mesurant l'apparition du produit en UA <sub>450nm</sub> par unité de temps (minutes) en présence de Savinase.....	110
Figure 21 – Vitesses initiales ou UP des trois séries de la réaction enzymatique de la Savinase en présence d'azocaséine en fonction de la concentration en enzyme (µl.ml <sup>-1</sup> ) .....	112
Figure 22 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UP.ml <sup>-1</sup> ) dans le puits pour les 4 protéases testées selon les 3 protocoles d'essais .....	116
Figure 23 – Logarithme du pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction du logarithme de la concentration (UP.ml <sup>-1</sup> ) dans le puits en Savinase .....	117
Figure 24 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UP.ml <sup>-1</sup> ) dans le puits en Savinase selon les 3 protocoles d'essais.....	117
Figure 25 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en UP.ml <sup>-1</sup> dans le puits de la subtilisine selon les 3 protocoles d'essais.....	118
Figure 26 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UX.ml <sup>-1</sup> ) par puits des 5 xylanases testées selon les 3 protocoles d'essais.....	119
Figure 27 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UPe.ml <sup>-1</sup> ) dans le puits des deux pectinases testées selon les 3 protocoles d'essais .....	120
Figure 28 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UC.ml <sup>-1</sup> ) par puits des 5 cellulases testées selon les 3 protocoles d'essais .....	121
Figure 29 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UA.ml <sup>-1</sup> ) des 3 amylases testées selon les 3 protocoles d'essais .....	122

Figure 30 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UG.ml <sup>-1</sup> ) par puits des 5 glucanases testées selon les 3 protocoles d’essais.....	123
Figure 31 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UL.ml <sup>-1</sup> ) par puits des 3 lipases testées selon les 3 protocoles d’essais.....	125
Figure 32 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UE.ml <sup>-1</sup> ) par puits des 3 estérases testées selon les 3 protocoles d’essais.....	126
Figure 33 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en UA.ml <sup>-1</sup> pour les 2 amylases EC 3.2.1.1 selon les 3 protocoles d’essais.....	136
Figure 34 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en UG.ml <sup>-1</sup> pour 4 glucanases EC 3.2.1.6 selon les 3 protocoles d’essais.....	137
Figure 35 – Comparaison des pourcentages d’inhibition du biofilm en microplaque entre les témoins chauffés (▲) et les enzymes (□) pour α-amylase (ligne 1) et Panlyve AG (ligne 2).....	138
Figure 36 – Comparaison des pourcentages d’inhibition du biofilm en microplaque entre les témoins chauffés (▲) et les enzymes (□) pour la subtilisine (ligne 1), papaine (ligne 2), Lipolase (ligne 3) et Glucanex (ligne 4).....	139
Figure 37 – Comparaison des cinétiques enzymatiques des témoins chauffés (▲) et des enzymes (□) pour la subtilisine (1A), la papaine (1B), la Lipolase (2A), Glucanex (2B), α-amylase (3A) et Panlyve AG (3B).....	140
Figure 38 – Comparaison des pourcentages d’inhibition en microplaque du biofilm total marqué au DAPI (□) et du biofilm vivant marqué au CTC (▲) en présence de la papaine (ligne 1), Savinase (ligne 2) et protéase Amano (ligne 3).....	144
Figure 39 – Comparaison des pourcentages d’inhibition en microplaque du biofilm total marqué au DAPI (□) et du biofilm vivant marqué au CTC (▲) en présence de Finizyme (ligne 1), Glucanex (ligne 2) et Panlyve AG (ligne 3).....	145
Figure 40 – Fluorescence mesurée par puits du biofilm en présence de la protéase Amano à 1 UP.ml <sup>-1</sup> (■) ou non (▨) selon le protocole de prévention 24h en microplaque, marquées ou non au DAPI avant solubilisation dans l’éthanol.....	146
Figure 41 – Fluorescence mesurée par puits de la protéase Amano (■) ou de l’eau de mer (▨) incubées selon le protocole de prévention 24h en microplaque en présence ou non de la D41, marquées au DAPI avant solubilisation dans l’éthanol.....	147
Figure 42 – Nombre moyen de cellules totales (■) et de cfu (▨) adhérentes par cm <sup>2</sup> de surface d’un puits de microplaque. La protéase Amano (1 UP.ml <sup>-1</sup> ) est incubée 1h avant les bactéries, incubées ensuite 24h.....	148
Figure 43 – Mesure de l’activité de la protéase Amano (1 UP.ml <sup>-1</sup> ) avec l’azocaséine.....	149
Figure 44 – Croissance de la D41 en MB(■), en eau de mer naturelle filtrée + Protéase Amano (1 UP.ml <sup>-1</sup> ) (□) et en eau de mer naturelle filtrée seule (▲), en tubes de verre (Volume final 10 ml) à 20°C.....	149
Figure 45 – Images de microscopie à épifluorescence de bactéries <i>Pseudoalteromonas sp.</i> D41 incubées 24h en eau de mer (A) en présence de la protéase Amano (1UP.ml <sup>-1</sup> ) ajoutée 1 heure avant la D41 (B), sur une surface de verre et marquées au DAPI avant observation microscopique.....	150
Figure 46 – Diagramme de Pareto montrant en noir les effets d’inhibition (■) et en blanc les effets d’augmentation (□) de la fluorescence pour chaque enzyme et pour les mélanges d’enzymes 2 à 2.....	154
Figure 47 – Etude des interactions d’ordre 2 : pourcentage d’inhibition mesuré en fonction de la nature de l’enzyme déposée seule ou en mélange de 2.....	155
Figure 48 – Etude des interactions d’ordre supérieur à 2 : pourcentage d’inhibition mesuré en fonction de la nature des enzymes déposée en mélange (de 3, 4 ou 5).....	156
Figure 49 – Etude des interactions d’ordre 2 : activités mesurées par activité enzymatique au sein du mélange de 2 enzymes.....	159



Figure 50 – Comparaison des pourcentages d’inhibition du biofilm en microplaque en présence des enzymes en mélange (▲) et des enzymes seules (□) subtilisine (ligne 1), papaïne (ligne 2), α-amylase (ligne 3) et Lipolase (ligne 4) selon les 3 protocoles d’essais.....	163
Figure 51 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en présence du mélange enzymatique en fonction de la concentration en mg.l <sup>-1</sup> de la subtilisine selon les 2 protocoles d’essais.....	164
Figure 52 – Dénombrement des cellules adhérees sur la surface après traitement préventif avec le mélange d’enzymes d’un biofilm développé 3h.....	165
Figure 53 – Gels d’électrophorèse (8%) en conditions dénaturantes et en présence de SDS des 3 fractions d’EPS, issues de la fermentation de <i>Pseudoalteromonas sp.</i> D41.....	175
Figure 54 – Spectre FTIR des fractions EPS issues de la fermentation de <i>Pseudoalteromonas sp.</i> D41.....	176
Figure 55 – Images en microscopie à épifluorescence de D41 et D01 adhérees 24h sur une surface de verre et marquées au calcofluor (A), au DAPI (B) et à la fluorescamine (C). ....	179
Figure 56 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en mg.l <sup>-1</sup> pour 3 produits testés subtilisine (A), 432/0 (B) et hypochlorite de sodium (C) selon un protocole de conditionnement de surface en microplaque (■) et celui de prévention d’un biofilm de 3h (○). ....	183



# Table des illustrations –Tableaux

Tableau 1 – Composition des EPS d’après Flemming et Wingender, 2001.....	31
Tableau 2 – Enzymes dont l’utilisation est brevetée dans des compositions de lavages et/ou contre la formation de biofilms.....	49
Tableau 3 – Caractéristiques des préparations enzymatiques commerciales testées sur le biofilm en microplaque. ....	65
Tableau 4 – Nature du substrat utilisé en fonction de l’activité enzymatique à caractériser.....	68
Tableau 5 – Concentrations initiales des enzymes dans le mélange enzymatique deux à deux.....	70
Tableau 6 – Densité des produits Mexel® testés en g.ml <sup>-1</sup> .....	70
Tableau 7 – Concentration en mg.ml <sup>-1</sup> des solutions enzymatiques initiales solubilisées en eau de mer stérile avant d’être déposées en microplaque.....	77
Tableau 8 – Concentrations initiales (en solution) et finales (dans le puits et en présence des suspensions bactériennes) en mg.ml <sup>-1</sup> ou µl.ml <sup>-1</sup> des solutions enzymatiques du mélange.....	82
Tableau 9 – Valeurs de p obtenues par analyse de variance avec comme facteurs les colonnes ou les rangées et comme variables les 84 valeurs de fluorescence mesurées au sein de chaque microplaque par temps d’incubation. ....	99
Tableau 10 – Valeurs des IC50 en mg.l <sup>-1</sup> calculées à partir des paramètres des équations des courbes logistiques ajustées aux points expérimentaux (p à 95% sauf pour *). ....	103
Tableau 11 – Significativité de l’effet colonne ou de l’effet concentration par microplaque, par produit et par protocole. ....	104
Tableau 12 – Vitesses initiales en UA <sub>450nm</sub> .min <sup>-1</sup> ou UP correspondant aux pentes des droites figurant sur la Figure 20. ....	111
Tableau 13 – Activités spécifiques (AS) des préparations industrielles protéases. ....	112
Tableau 14 – Activités spécifiques (AS) des préparations industrielles glycosidases. ....	113
Tableau 15 – Activités spécifiques (AS) des préparations industrielles lipases. ....	114
Tableau 16 – Concentrations C50 d’enzyme en UP.ml <sup>-1</sup> de milieu réactionnel dans le puits pour obtenir une inhibition du biofilm de 50%.....	117
Tableau 17– Concentrations C50 donnant une inhibition du biofilm de 50%.....	124
Tableau 18 – Concentrations C50 donnant une inhibition du biofilm de 50%.....	126
Tableau 19 – Exemple de valeurs de p, répertoriées en fonction du pourcentage d’inhibition moyen, de l’écart type et de la concentration testée par protocole pour le traitement avec Savinase et Pulpzyme.....	127
Tableau 20 – Comparaison des CmONT et CmOEM exprimées en mg.l <sup>-1</sup> et en U.ml <sup>-1</sup> .....	129
Tableau 21 – Niveau +1 de concentration finale en U.ml <sup>-1</sup> et en mg.ml <sup>-1</sup> d’enzyme déposée dans le puits de la microplaque après le dépôt des bactéries.....	154
Tableau 22 – Résumé des variations des vitesses initiales des enzymes en mélanges 2 à 2.....	160
Tableau 23 – IC50 des enzymes au sein du mélange et C50 des enzymes seules.....	164
Tableau 24 – Pourcentages d’inhibition et réductions logarithmiques calculés à partir des dénombrements de biofilms traités avec le mélange enzymatique. ....	166
Tableau 25 – Composition globale en pourcentage massique des fractions EPS issues de la fermentation de <i>Pseudoalteromonas sp.</i> D41.....	174



# Introduction

Lorsqu'une surface est immergée en eau de mer, elle est très rapidement colonisée par des macroorganismes marins, végétaux ou animaux, tels que les algues ou coquillages (balanes, moules...). Ce phénomène s'appelle le « biofouling » qui signifie biosalissures en anglais. L'adhésion de salissures marines concerne toute structure immergée en mer : navires, pipelines, tours et circuits de refroidissement, structures portuaires, capteurs marins, systèmes d'aquaculture... Les dommages engendrés sont nombreux et divers : détérioration des matériaux (risque de corrosion accru), diminution des échanges thermiques dans les circuits de refroidissement, dérive des systèmes de mesures immergés, augmentation de la consommation en carburant des navires, c'est-à-dire une diminution des performances industrielles en général et également du temps de vie des matériaux. Afin de lutter contre ce problème des procédures de nettoyages ou de prévention qui augmentent considérablement les coûts d'exploitation sont mises en place.

Le mécanisme d'adhésion des salissures marines est décrit d'un point de vue cinétique comme une succession d'événements (Wahl, 1989), chaque phase n'étant pas nécessairement indispensable à l'autre. Dans un premier temps, sur une surface immergée a lieu l'adsorption, en quelques minutes, de composés organiques (essentiellement des fragments protéiques et osidiques) ainsi que des composés minéraux (sels) (Baier, 1972 ; Loeb et Neihof, 1975 ; Taylor *et al.*, 1997 ; Compère *et al.*, 2001) formant ainsi le film primaire. Puis des bactéries et microalgues marines viennent coloniser cette surface, se développer et croître pour former un biofilm marin. Enfin, les macroorganismes peuvent adhérer sur la surface colonisée ou non, la présence de biofilm influençant l'adhésion de macroorganismes marins (Qian *et al.*, 2003). Le biofilm consiste en une communauté de bactéries et, en milieu marin, il comprend également des microalgues. Nous parlerons de biofilm au sens large du terme c'est-à-dire uniquement bactérien. Sa formation se déroule en plusieurs étapes séquentielles dans le temps : en quelques minutes des composés organiques et inorganiques sont adsorbés sur la surface et les bactéries vont s'immobiliser de manière réversible puis irréversibles sur ce substrat nutritif. Elles vont alors produire des substances polymériques extracellulaires (EPS, majoritairement composées de protéines et de polysaccharides) leur permettant de former une matrice extracellulaire contribuant au maintien des communautés bactériennes adhérentes (Allison, 2003). Enfin, le biofilm croît et se développe, les cellules se multiplient, communiquent entre elles via des molécules signal et changent de métabolisme afin de consolider le biofilm et de coloniser la surface (Davies *et al.*, 1998). En quelques jours voire quelques mois le biofilm est formé.

Dans le but de contrôler le biofilm et les salissures marines en général, des techniques physiques ou chimiques sont utilisées. Les techniques physiques peuvent être préventives (filtration de l'eau, traitement par les UV) ou curatives (grattage en continu des surfaces, chocs thermiques). De nombreux procédés chimiques préventifs ou curatifs utilisent des produits biocides comme des métaux (cuivre, argent), des produits oxydants (chlore, brome, ozone) ou des produits non oxydants de synthèse (bactéricides, fongicides, algicides issus de l'agriculture). L'application de ces procédés chimiques se fait soit par traitement du milieu d'immersion des surfaces (injection de produits biocides dans les circuits de

refroidissements) soit par traitement des surfaces elles mêmes (peintures antisalissures). La législation envers l'utilisation de produits biocides est de plus en plus restrictive, la directive européenne dite biocides (98/8/CE) régleme leur mise sur le marché et les peintures toxiques doivent être récupérées lors des carénages. Les peintures antisalissures développées depuis les années 1960 à base de sels d'étain se sont révélées hautement toxiques pour la faune et la flore maritimes (Alzieu, 1996 et 1998). L'organisation maritime internationale en a donc interdit l'utilisation pour les petits navires (de longueur inférieure à 25 m) depuis 2003 et elle sera complètement prohibée sur tous types de navire dès 2008 via la directive 99/51/CEE. Les peintures utilisées aujourd'hui sont principalement à base de composés cuivrés et/ou de composés chimiques de synthèse mais également à base de polymères de type silicone. Les peintures à base de silicone sont coûteuses et plus ou moins efficaces, celles à base de cuivre sont efficaces mais, bien que moins toxiques que les sels d'étain, le cuivre reste un métal lourd qui persiste à long terme dans l'environnement. Certains pays comme le Canada et la Suède limitent son utilisation dans les peintures.

Pour toutes ces raisons, de nouvelles stratégies pour lutter contre l'adhésion des salissures marines se développent aujourd'hui. Dans le but de développer des produits antisalissures moins toxiques pour l'environnement, il est important de chercher des techniques agissant sur les mécanismes précoces de l'adhésion, afin d'empêcher les salissures d'adhérer plutôt que de les éliminer. Parmi les nouvelles voies de recherche, il existe la voie enzymatique qui vise à fragiliser les premières étapes de l'adhésion des salissures marines. Nous avons choisi d'étudier l'effet de préparations enzymatiques commerciales sur le biofilm.

Les enzymes sont des protéines, catalyseurs de réactions de transformation qui se produisent dans les organismes vivants. Il existe plusieurs familles d'enzymes selon leur activité. Nous avons choisi de tester des hydrolases comme les protéases, glycosidases et lipases permettant respectivement l'hydrolyse des protéines, des sucres et des lipides. En prévention comme en lavage, leur utilisation permettrait d'hydrolyser les composés organiques comme le film primaire ou les EPS présents dans la matrice extracellulaire et ainsi de perturber la formation et le développement du biofilm.

Nous avons choisi de nous tourner vers l'utilisation d'enzymes commerciales qui présentent l'intérêt d'être déjà caractérisées et produites en grande quantité. Ce sont des enzymes généralement utilisées dans divers procédés industriels (alimentaire, textile, papetier) et dans certains produits de grande consommation (lessives).

A ce jour, bien que la présence de protéines, de polysaccharides et de lipides ait été démontrée, à la fois sous forme de film primaire sur la surface (Baier, 1972 ; Loeb et Neihof, 1975 ; Taylor *et al.*, 1997 ; Compère *et al.*, 2001) mais aussi dans la matrice extracellulaire des biofilms (Allison, 2003), aucun des composés organiques n'a encore été totalement identifié concernant les biofilm marins.

Le choix des protéases s'est donc porté sur des enzymes à large spectre de substrat.

Les glycosidases étant spécifiques de la nature du sucre, de sa configuration D ou L, de sa forme cyclique, de l'anométrie de la liaison ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), des carbones impliqués dans cette liaison mais aussi de la position et de la nature des substituants ainsi que de la conformation

de la molécule, une gamme de différentes activités glycosidases a donc été sélectionnée en fonction des sucres et des liaisons rencontrés le plus souvent dans la nature.

Enfin, trois lipases seront également testées.

En vue d'une application en circuit de refroidissement, le potentiel antisalissure des enzymes sera testé en solution. La problématique reste que l'utilisation d'enzymes sans la caractérisation des substrats implique de sélectionner un nombre important d'enzymes commerciales présentant des activités différentes et une large spécificité de substrat. Afin d'évaluer leur potentiel antisalissure en solution, un test sur un biofilm marin modèle formé de manière reproductible et approprié au criblage d'un nombre important de molécules à différentes concentrations sera mis au point. Nous utiliserons pour cela une bactérie marine pionnière de l'adhésion issue d'un biofilm marin naturel de 24 heures et sélectionnée pour ses fortes capacités d'adhésion (Pradier *et al.*, 2005).

Dans un premier temps, le test d'évaluation du potentiel antisalissure des enzymes sera mis au point.

Dans une seconde étape, afin de comparer l'effet des enzymes entre elles, nous allons caractériser les activités spécifiques de chaque préparation commerciale, dans les conditions les plus proches du milieu marin.

Puis, nous verrons lesquelles sont les plus efficaces, essaierons d'optimiser un mélange d'enzymes et de regarder leur interaction sur la formation du biofilm.

Enfin, une étude sur les molécules excrétées (EPS) par notre bactérie modèle permettra également une meilleure compréhension des mécanismes impliqués.





# Chapitre 1 – Etude bibliographique

---



# 1. Biofilm

Un biofilm est constitué de différents microorganismes (vivants et morts) adhérents sur des surfaces immergées et englués dans une matrice protectrice composée essentiellement de protéines, de polysaccharides et de sels.

L'étude de la microbiologie a conduit à l'observation de populations microbiennes adhérentes sur des surfaces immergées plutôt qu'en suspension. Claude Zobell en 1943 observe que des bactéries aquatiques sont plus nombreuses sur la surface solide contenant l'échantillon qu'en suspension. C'est dans les années 70 que de larges progrès ont été réalisés concernant ce mode d'association des microorganismes: Corpe (1970a) décrit notamment l'attachement de bactéries marines sur des surfaces, il étudie les exopolysaccharides impliqués dans la matrice, décrit le rôle des appendices cellulaires et celui de la nature de la surface sur lequel le biofilm est adhérent (Corpe, 1970b). Fletcher a observé l'influence des conditionnements de surfaces par des protéines sur la formation des biofilms (Fletcher, 1976) ainsi que l'influence de la température, du temps d'immersion et de la quantité de bactéries initialement déposée (Fletcher, 1977). C'est véritablement dans les 20 dernières années que de nombreuses recherches ont été menées sur ce mode de croissance bactérienne liée à un grand nombre d'infections et de mécanismes de résistance aux traitements antibiotiques.

Nous verrons dans un premier temps les mécanismes de formation et de développement des biofilms. Nous verrons ensuite les problèmes qu'ils causent ainsi que les différents moyens de lutte développés contre la formation de ces biofilms et notamment les voies enzymatiques déjà explorées contre certains biofilms.

## 1.1. Mécanisme de formation

La formation des biofilms est largement décrite dans la littérature mais de nombreux points restent encore à éclaircir (Dalton et March, 1998 ; Pratt et Kolter, 1999 ; Filloux et Vallet, 2003 ; Lejeune, 2003 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Elle dépend de nombreux paramètres environnementaux. L'étude de ce phénomène est complexe et relève de l'interdisciplinarité : microbiologie, génétique, physico-chimie de surface... L'approche par la génétique et la biologie moléculaire a permis un grand progrès dans la compréhension des mécanismes de formation et de développement des biofilms. Cette approche consiste à cribler des souches mutantes selon leur potentiel à former des biofilms. Après caractérisation des gènes mutés, on peut identifier des molécules mais surtout des voies d'activations moléculaires impliquées dans la formation et le développement des biofilms, notamment concernant la communication des bactéries entre elles au sein du biofilm. L'ensemble de ces signaux est regroupé sous le terme de « quorum sensing » (QS). Le QS représente le mécanisme qui permet aux bactéries de percevoir la densité de population bactérienne et de coordonner une réponse à cette information via la régulation de certains gènes (Fuqua *et al.*, 1994). Des études montrent également que des gènes seraient activés à la suite du contact entre une bactérie et la surface montrant un état physiologiquement

différent entre une bactérie en suspension et une bactérie adhérente (Davies *et al.*, 1993 ; Lejeune, 2003).

Les biofilms sont présents sur toutes les interfaces et leur étude est commune à différents domaines d'applications (santé, écologie marine, agroalimentaire, industries du traitement des eaux, du papier...). Selon le domaine étudié, les modèles de formation de biofilm *in vitro* diffèrent de par la nature de la bactérie, ainsi que de celle de la surface et du milieu. Le biofilm le plus étudié aujourd'hui est certainement celui de *Pseudomonas aeruginosa*, responsable des infections nosocomiales rencontrées dans le milieu hospitalier, mais aussi ceux de *Staphylococcus aureus* et *S. epidermis*, bactéries à Gram positif, également pathogènes. Les recherches menées sur les biofilms dentaires concernent des bactéries du genre *Streptococcus* et généralement d'espèce *mutans* et celles menées sur le biofilm marin concernent des microorganismes du genre *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* ou *Vibrio*.

Malgré une importante disparité dans les modèles de biofilms étudiés, nous allons tenter d'expliquer de manière générale comment se forme un biofilm en citant en exemple des résultats de publications pertinents, mais non exhaustifs.

La formation des biofilms se schématise en plusieurs étapes séquentielles qui sont représentées sur la Figure 1 ci-dessous.

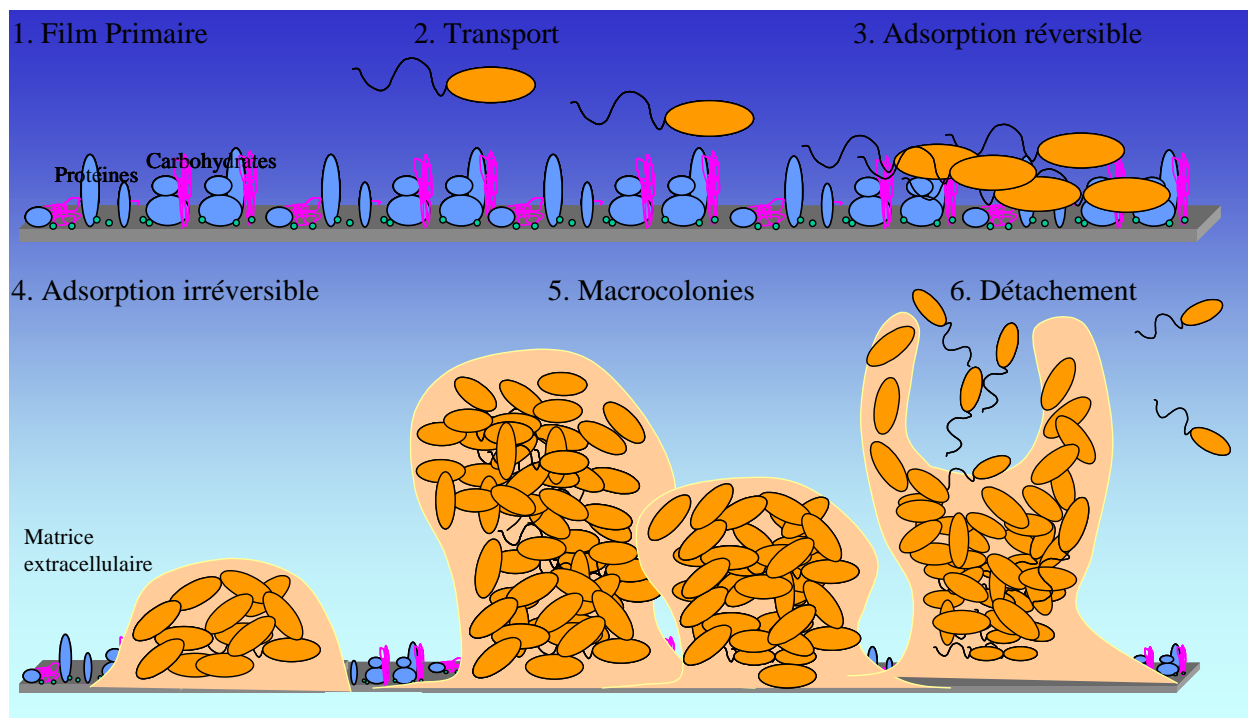


Figure 1 – Représentation schématique de la formation des biofilms (d'après Characklis, 1990).

### 1.1.1. Film primaire

La première étape de formation du biofilm constitue la formation de ce que l'on appelle le film primaire ou film conditionnant. Sa présence ainsi que sa composition générale a été montrée à plusieurs reprises via des études physico-chimiques de surface, notamment par des études de spectres infrarouge. Il est composé de protéines ou de fragments protéiques

(Baier, 1972) ainsi que de sucres, lipides, substances humiques (Loeb et Neihof, 1975 ; Taylor *et al.*, 1997), et également de matière minérale comme des sels (Compère *et al.*, 2001). Concernant les molécules organiques, il pourrait s'agir de fragments ou de molécules entières, mais aucune n'a encore été entièrement identifiée. Leur composition dépendrait à la fois de la surface et du milieu environnant (salinité, pH, température).

Le film primaire été étudié après immersion de surfaces en eau de mer pour les biofilms marins (Baier, 1972 ; Compère *et al.*, 2001), mais aussi pour les biofilms dentaires où l'adsorption de molécules contenues dans la salive favorise l'adhésion bactérienne (van der Mei *et al.*, 1990 ; Bradshaw, 1997).

Le rôle du film primaire n'est pas clairement élucidé, il modifie les propriétés physicochimiques de surface et peut donc influencer l'adhésion bactérienne. L'adsorption de certaines protéines comme l'albumine de sérum bovin (SAB) influence l'adhésion de microorganismes marins (Fletcher *et al.*, 1976 ; Rubio, 2002). Il pourrait également servir de substrat aux microorganismes, en effet quand la concentration en matière organique dissoute est faible, les nutriments adsorbés sur la surface sont concentrés et plus accessibles pour les bactéries. En fait, l'attachement séquentiel des différents éléments colonisant la surface peut être argumenté par le simple fait qu'il reflète leur disponibilité, c'est-à-dire, leur abondance et leur adaptabilité dans le milieu (Wahl, 1989). En effet, les molécules organiques en eau de mer sont omniprésentes, et l'adsorption de molécules organiques aux interfaces est un phénomène connu et quasi instantané (Baier, 1984).

### 1.1.2. Transport

La deuxième étape correspond au transport des microorganismes à proximité de la surface. Le transport des bactéries dépend de la nature du milieu dans lequel les bactéries évoluent (viscosité, force ionique) ainsi que du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, mouvement brownien, sédimentation). Le déplacement de la bactérie s'effectue via des appendices qui l'aident à se déplacer dans un milieu (pili, flagelles). Chez *Pseudomonas aeruginosa* la présence de gènes codant pour la formation du pili (O'Toole et Kolter, 1998) ainsi que pour la mobilité de la flagelle (Vallet *et al.*, 2001) est indispensable à la formation du biofilm. Chez *Escherichia coli*, la présence de flagelles est importante pour le mouvement de la bactérie le long de la surface et celle de pili pour les interactions initiales avec la surface (Pratt et Kolter, 1998). Les bactéries pourraient ainsi sonder la surface grâce à leurs appendices cellulaires. Une étude du génome de *Pseudomonas aeruginosa* au sein du biofilm a montré que l'expression des gènes codant pour les sous-unités structurales du pili est diminuée lorsque les cellules sont en biofilm, démontrant ainsi que le rôle essentiel de ces appendices se limite aux premières étapes de l'adhésion (Whiteley *et al.*, 2001).

Il faut cependant savoir que les bactéries utilisent différentes approches pour former les biofilms. Certaines bactéries formant des biofilms ne possèdent pas de flagelle comme *Staphylococcus aureus* et *S. epidermis*.

### 1.1.3. Adsorption réversible et irréversible

Les troisième et quatrième étapes de la formation du biofilm consiste en une adsorption réversible suivie d'une adsorption irréversible. La distinction entre les deux phases vient du fait que les cellules s'adsorbent sur la surface pour un certain temps et ensuite certaines peuvent se détacher sous l'influence de facteurs physiques, chimiques ou biologiques, l'adsorption réversible faisant appel à des forces de liaisons plus faibles que celles concernant l'adsorption irréversible (Characklis, 1990). Il est cependant difficile au regard des études bibliographiques de distinguer les 2 phases concernant les mécanismes à l'origine de l'adsorption. L'adsorption est liée à de nombreux facteurs dépendant des trois principaux acteurs, la surface, le milieu et la bactérie.

Les propriétés physicochimiques de surface de la bactérie ont un rôle prépondérant. Selon la théorie DLVO, tirée du nom de ses fondateurs Derjagan, Landau, Verwey et Overbeek, les forces électrostatiques et les forces de van der Waals doivent être prises en compte (van Loosdrecht *et al.*, 1990). Cependant, cette théorie suppose que la bactérie se comporte comme une particule colloïdale avec des propriétés de surface uniformes. Selon l'approche thermodynamique, les énergies de surface, du film primaire, des bactéries et du milieu sont prises en considération (Taylor *et al.*, 1997). L'adhésion bactérienne est vue comme un état d'équilibre, en négligeant les interactions électrostatiques (Bos *et al.*, 1999). La formation de biofilm dépend également de la rugosité du support (Coquet *et al.*, 2002), de son hydrophobicité (Bos *et al.*, 2000 ; Otto *et al.*, 1999) ainsi que de ces propriétés acido-basiques.

D'autre part, les bactéries possèdent une paroi dont la structure et la composition diffèrent entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Des lipopolysaccharides composent la membrane externe de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif, comme chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ils peuvent présenter des chaînes d'acide gras plus ou moins longues induisant une hydrophobicité de surface variable. Il a été montré que l'attachement des bactéries dépendait de leur hydrophobicité de surface (Makin et Beveridge, 1996). Des études menées sur différentes bactéries à Gram positif impliquées dans des biofilms ont montré que l'affinité de billes de polystyrène pour ces différents biofilms était corrélée avec les compositions électron accepteur des énergies de surface des différents biofilms testés (Briandet, 2001). Pradier et ses collaborateurs (2005) ont récemment montré le rôle de la composition chimique de surface des bactéries dans l'adhésion, et en particulier celui des protéines.

La phase d'adsorption peut commencer par une reconnaissance moléculaire. On parle alors d'interactions de type récepteur-ligand. Ces interactions sont surtout décrites pour l'adhésion des bactéries avec des cellules et des cellules entre elles. Elles induisent une spécificité d'adhésion. Les molécules impliquées dans ce phénomène sont regroupées sous le terme d'adhésines, apparu en 1978 et décrit par Costerton *et al.* (Costerton *et al.*, 1978 et 1981). L'adhésine est un récepteur membranaire de type protéique ou saccharidique qui reconnaît spécifiquement des structures protéo-saccharidiques comme les pili et la fibronectine (Konkel *et al.*, 1997). La plus commune des adhésines chez *Escherichia coli* est la

fimbriae de type 1 (van Houdt et Michiels, 2005). Ces interactions ont surtout été étudiées dans le cadre des interactions entre les bactéries et les tissus vivants mais pourraient s'étendre aux phénomènes d'adhésion des bactéries sur des surfaces inertes (Courtney *et al.*, 1997 ; Pratt et Kolter, 1998). Ainsi, chez une espèce non mobile d'*Escherichia coli*, il a été montré qu'une adhésine curli jouait un rôle dans les premières phases de colonisation de surfaces (Vidal *et al.*, 1998 ; Pringent-Combaret *et al.*, 2000). Concernant les molécules impliquées dans les biofilms de *Staphylococcus epidermis*, un exopolysaccharide a été caractérisé. Il s'agit d'un D-glucosaminoglycane linéaire lié en  $\beta$ -1,6 (Mack *et al.*, 1996). Ce serait une adhésine intercellulaire impliquée dans la formation des biofilms.

#### 1.1.4. Matrice extracellulaire

L'adsorption irréversible est liée à la production de substances polymériques extracellulaires (EPS). L'attachement d'un certain nombre de bactéries à la surface induit une cascade de changements physiologiques qui mène à l'excrétion d'exopolymères (Allison et Sutherland, 1987). Durant cette phase, le biofilm croît et se développe en micro-colonies.

La matrice est composée essentiellement d'eau (97%) et de substances polymériques extracellulaires (EPS) majoritairement constituées de polysaccharides, mais aussi de protéines, lipides, acides nucléiques et substances humiques (Wingender *et al.*, 1999). La proportion des EPS peut varier de 50 à 90% de la matière organique totale du biofilm (Christensen et Characklis, 1990). Le Tableau 1 ci-dessous représente des données concernant la composition des EPS issues de différents systèmes naturels et techniques (Flemming et Wingender, 2001).

Tableau 1 – Composition des EPS d'après Flemming et Wingender, 2001.

Composé	Quantité présente dans les EPS
Polysaccharides	40-95%
Protéines	< 1-60%
Acides nucléiques	< 1-10%
Lipides	< 1-40%

La matrice présente différentes fonctions, elle est notamment responsable de l'architecture du biofilm. C'est un milieu visqueux qui permet la protection et la stabilité mécanique du biofilm. Elle facilite l'arrangement des cellules au sein du biofilm et la communication intercellulaire, notamment en concentrant des molécules signal nécessaires au développement du biofilm (Allison, 2003). Elle assure au biofilm une structure qui ne semble pas figée et présente différents microenvironnements (Sutherland, 2001).

La composition de la matrice est aujourd'hui mieux connue, cependant, la nature exacte des constituants de cette matrice ne l'est pas. La nature des EPS dépend largement des différentes méthodes expérimentales utilisées pour les isoler. En effet, à ce jour, pour la déterminer il est nécessaire de purifier et d'extraire les EPS issues de biofilms. Ce processus

expérimental est complexe. C'est pourquoi la plupart des EPS caractérisées l'ont été à partir de monocultures de bactéries planctoniques et peu à partir de biofilms véritablement. Il est connu aujourd'hui que selon la nature des microorganismes constituant le biofilm et les conditions environnementales (pH, salinité, température), la composition de la matrice change, d'un point de vue biochimique et physico-chimique. De plus, les conditions de culture de bactéries en laboratoire, notamment en milieu nutritif riche, sont très différentes de celle d'un biofilm naturel. Cependant, il n'est pas certain que physiologiquement une même bactérie planctonique excrète un polymère de nature différente de celui excrété au sein d'un biofilm (Sutherland, 1999). Il est donc important, pour le choix des enzymes à cribler, de prendre en compte, avec précaution, l'ensemble de ces études.

### 1.1.4.1. Exopolysaccharides

Les composés de la matrice extracellulaire les plus étudiés sont les exopolysaccharides. Le fait que des bactéries produisent des exopolysaccharides est connu et étudié depuis longtemps. On distingue les polysaccharides capsulaires et les exopolysaccharides. La distinction entre les deux est due au fait qu'après une culture liquide de bactéries, les cellules étant récoltées par centrifugation, on peut observer les exopolysaccharides dans le surnageant et les polysaccharides capsulaires dans le culot cellulaire. L'acide colanique est un exopolysaccharide capsulaire impliqué dans l'architecture des biofilms d'*Escherichia coli* permettant la formation d'un biofilm volumineux (Pringent-Combaret *et al.*, 2000). Cependant, la majorité des EPS impliquées dans les biofilms et décrits dans la littérature sont extracellulaires.

Chimiquement parlant, les exopolysaccharides sont très hétérogènes et de haute masse molaire. Ils sont constitués de différents oses, pouvant posséder des fonctions organiques comme la fonction alcool, amine ou acide, ou des substituants inorganiques (sulfate, phosphate). Les oses sont liés entre eux par différentes liaisons possibles selon le carbone impliqué dans la liaison ainsi que l'anomérie  $\alpha$  ou  $\beta$  de celle-ci (Figure 2). Ils peuvent présenter des unités répétitives plus ou moins longues, des ramifications de chaînes mais ce peut être également des monopolysaccharides, constitués d'un seul type de monosaccharide.

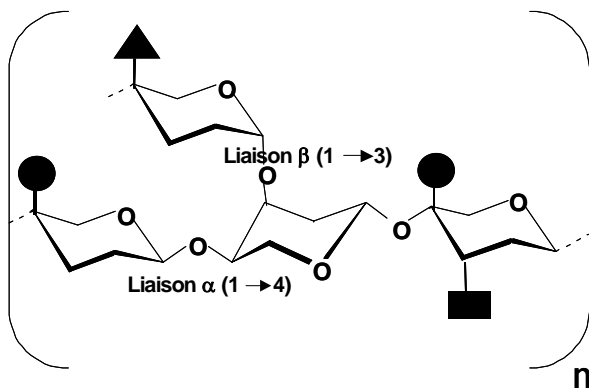


Figure 2 – Exemple de représentation d'une unité répétitive d'exopolysaccharide avec des substituants (●, ■, ▲) et une ramification liée en  $\beta$ -1,3.



Les principaux sucres composant les exopolysaccharides bactériens sont les suivants (Kenne et Lindberg, 1983) :

- pentose : D-ribose
- hexoses : D-glucose, D-galactose et D-mannose
- 6-déoxyhexose : L-rhamnose
- acides uroniques : acide glucuronique et acide galacturonique
- hexosamines : D-galactosamine et D-glucosamine

Le polysaccharide le plus connu et le plus répandu dans la nature est la cellulose. C'est un homopolymère de D-glucoses liés en  $\beta$ -1,4. Chez les bactéries, elle est exclusivement extracellulaire.

La plus connue des EPS issue d'une souche formant des biofilms est l'alginate. Il a été caractérisé à partir de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette molécule est connue pour être également sécrétée par certaines algues brunes. C'est un copolymère linéaire, non branché et de haute masse molaire, d'acides uroniques tels que le D-mannuronate (M) et L-gulonate (G) liés entre eux par des liaisons  $\beta$ -1,4 (Figure 3) (Evans et Linker, 1973). Ils peuvent être organisés en une succession de blocs d'homopolymères, (MMM) ou (GGG), ou bien en blocs d'hétéropolymères (MGMG). Les alginates bactériens sont souvent O-acétylés sur le résidu  $\beta$ -D-mannuronate (Schürks *et al.*, 2002).

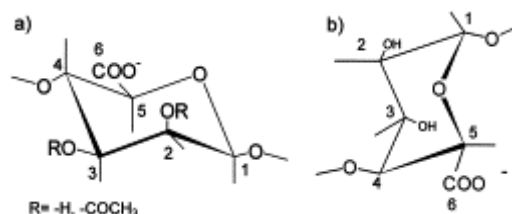


Figure 3 – Structure chimique des monomères d'alginate issu de *Pseudomonas aeruginosa* : a) D-mannuronate, b) L-gulonate. Les groupes hydroxyles en position 2- et 3- de l'unité mannuronate peuvent être partiellement acétylés (R=H ou COCH<sub>3</sub>) (Evans et Linker, 1973).

Bien que l'alginate soit l'EPS la plus connue et la plus étudiée des biofilms, il n'est pas représentatif des EPS issues de biofilm en général. En effet, il est composé d'oses acides alors que la plupart des EPS sont composées majoritairement d'oses neutres.

Les polysaccharides de biofilms dentaires de différents microorganismes du genre *Streptococcus* sont bien caractérisés. Il s'agit d'homopolymères de glucanes de type dextrans ou d'homopolymères de fructanes de type levane. Les dextrans sont constitués de résidus D-glucose liés en  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,6, les levanes des résidus D-fructoses liés en  $\beta$ -2,6 (Birkhed *et al.*, 1979).

Les bactéries marines sont connues pour produire des hétéropolysaccharides variés et de haute masse molaire. Des études sont réalisées sur les exopolysaccharides produits par les bactéries marines en général car ils présentent un fort potentiel en tant qu'agent chélateur, gélifiant, émulsifiant ou encore en thérapeutique humaine (Collic-Jouault *et al.*, 2004). Leur structure est caractérisée et leur composition varie selon la souche productrice ; ils peuvent être plus ou moins sulfatés, aminés et acétylés et peuvent posséder une quantité importante

d'oses acides. Un exemple d'exopolysaccharide issu de bactéries marines d'écosystèmes hydrothermaux profonds est représenté dans la Figure 4 (Rougeaux *et al.*, 1999).

→3)-β-D-GlcpNAc-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-β-D-GlcpA-(1→4)-α-D-GalpNAc(1→

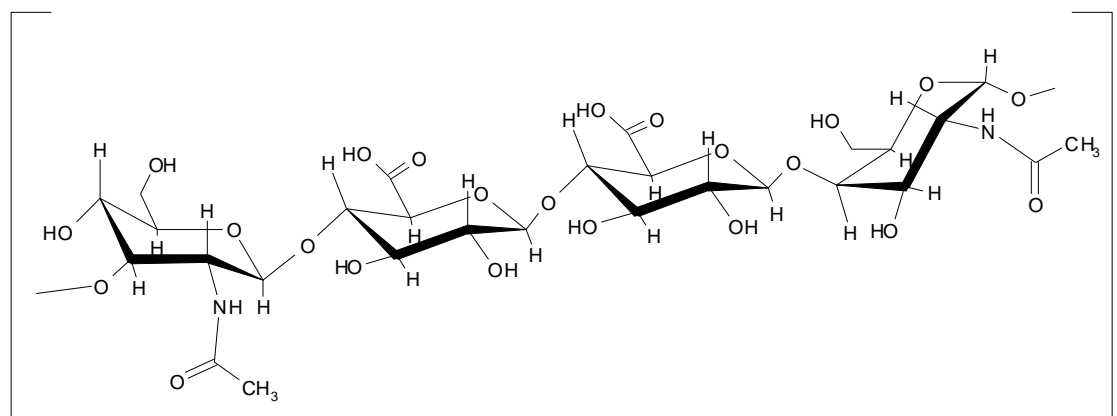


Figure 4 – Unité répétitive d'un exopolysaccharide extrait d'une bactérie marine issue d'écosystèmes hydrothermaux profonds (Rougeaux *et al.*, 1999).

Concernant les exopolysaccharides issus de bactéries marines impliquées dans des biofilms, leur caractérisation est partielle. *Vibrio alginolyticus* produit notamment un exopolysaccharide composé de glucose, aminoarabinose, aminoribose et de xylose dans les proportions 2 : 1 : 9 : 1 (Muralidharan et Jayachandran, 2003). Des exopolysaccharides, issus de 8 souches extraites de biofilms marins en Corée, sont composés de glucose et de galactose majoritairement ainsi que de mannose, ribose et xylose (Kwon *et al.*, 2002). Christensen *et al.* (1985a) extrait 2 exopolysaccharides issus d'une culture d'une bactérie marine du genre *Pseudomonas* connue pour sa capacité à former des biofilms. Le premier est composé de glucose, galactose, acide glucuronique et acide galacturonique dans les proportions 1 : 0.81 : 0.42 : 0.32. Le second contient un taux équimolaire de N-acétylglucosamine, d'acide 2-keto-3-déoxyoctulosonique et d'un 6-déoxyhexose non identifié.

### 1.1.4.2. Protéines

Bien que leur présence soit démontrée, peu de données sont publiées concernant la nature des protéines au sein de la matrice de polymères. Jahn *et al.* en 1999 décrivent une accumulation de protéines au sein de la matrice extracellulaire d'un biofilm de *Pseudomonas putida*. Une analyse en AFM (microscopie à force atomique) couplée à une étude du comportement d'adhésion de *Azospirillum brasilense* sur une surface en polystyrène suggère l'implication d'EPS de nature protéique (van der Aa et Dufrêne, 2002). De même, une étude en spectroscopie ATR-FTIR montre la présence de protéines et de polysaccharides au sein d'un biofilm de *Streptococcus pneumonia* (Donlan *et al.*, 2004). Des protéines issues des EPS de biofilms dentaires ont été caractérisées comme des enzymes impliquées dans la synthèse des exopolysaccharides (Welin *et al.*, 2004). Flemming décrit chez les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* une masse de protéines représentant plus de 30% de la masse des EPS ; ces protéines seraient de faible masse molaire (5 à 150 kDa) et à forte activité protéase (Flemming et Wingender, 2001).

### 1.1.4.3. Lipides

Bien que leur présence soit démontrée, peu d'études sont réalisées sur les lipides issus de la matrice. Les lipides regroupent les acides gras et leur forme estérifiée (phospholipides, glycérides, glycolipides, sulfolipides). Les lipides les plus connus chez les bactéries sont les lipopolysaccharides (LPS) ou endotoxines, constituant la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il s'agit d'un noyau glycérol lié à un acide gras via une liaison ester et à un polysaccharide via une liaison phosphate ester. La composition de surface des LPS des bactéries interfère notamment dans le phénomène d'adsorption.

La présence de rhamnolipides a été démontrée chez certains biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Davey *et al.*, 2003). Ils joueraient un rôle dans le maintien de la structure tridimensionnelle du biofilm. Des homosérines lactones, aux chaînes d'acides gras plus ou moins longues, sont également présentes chez les biofilms de bactéries à Gram négatif (McLean *et al.*, 1997 ; Fuqua et Greenberg, 2002) et sont impliquées dans la formation de macrocolonies.

### 1.1.5. Macrocolonies

La cinquième étape correspond à la croissance du biofilm qui colonise ainsi la surface et forme des macrocolonies. Les bactéries expriment un certain nombre de gènes impliqués dans le phénomène appelé « quorum sensing » (QS). C'est à partir d'une certaine densité de population que les gènes commencent à s'activer (Daniels *et al.*, 2004). Ils permettent une communication concertée de toute une population bactérienne. Le QS est en fait responsable de la différenciation des cellules au sein du biofilm (Davies *et al.*, 1998). Il permet aux cellules de s'adapter aux différents facteurs environnementaux (Kjelleberg et Molin, 2002). Un des mécanismes les plus connus concerne les bactéries à Gram négatif, de biofilms naturels ou pathogènes, qui communiquent entre elles via des molécules signal aussi appelées auto-inducteurs (AI) : les N-acyl homosérine lactone (AHL) (McLean *et al.*, 1997 ; Fuqua et Greenberg, 2002). Ces molécules diffèrent entre elles par la longueur et les substitutions de leurs chaînes d'acides gras. Elles sont excrétées par les bactéries et, à partir d'une concentration seuil, déclenchent une cascade d'activation de gènes. Chez *Pseudomonas aeruginosa* il a été montré que les AHL contrôlaient l'expression des gènes de virulence (Chugani *et al.*, 2001) et chez *Vibrio fischeri* (bactérie marine) celle des gènes de bioluminescence (Sitnikov *et al.*, 1995). D'autre part, il a été montré chez une algue marine *Delisea pulchra* dépourvue de biofilm que les molécules impliquées dans ce phénomène de protection étaient des analogues structuraux des AHL nommés furanones qui interfèrent dans le fonctionnement du QS (Manefield *et al.*, 1999). Les AHL pourraient donc servir de cible dans la lutte contre les biofilms associés à des bactéries pathogènes de *Pseudomonas aeruginosa*. Il existe d'autres systèmes de QS comme celui médié par des peptides chez les bactéries à Gram positif (Dunny et Winans, 1999) ou encore le système dit auto-inducteur 2 (AI2) décrit à la fois chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Bassler, 1999).

D'autre part, les biofilms matures sont très étudiés d'un point de vue architectural. La Figure 1 représente un biofilm en forme de champignon. Cette forme de biofilm a été

observée en premier par l'équipe de Costerton en 1991 après une étude en trois dimensions de biofilms de *Pseudomonas* en microscopie confocale à balayage laser (Lawrence *et al.*, 1991). Il y est décrit un biofilm dont la base est constituée d'attachement très dense de cellules et qui devient de plus en plus diffus dans les régions extérieures. Cette observation n'est pas commune à tous les biofilms, une forme de biofilm opposée est observée concernant des biofilms de *Vibrio*. Une équipe danoise a montré que chez *Pseudomonas aeruginosa*, les biofilms en forme de champignon sont composés à la base de bactéries non mobiles et dans la partie supérieure de bactéries mobiles, montrant ainsi une différenciation des populations bactériennes au sein des biofilms (Klausen *et al.*, 2003).

De plus les bactéries au sein du biofilm mature peuvent s'échanger du matériel génétique via la formation de pili conjugatifs, mis en évidence chez *Escherichia coli*, où la présence de protéines filamenteuses constituant ces pili conjugatifs serait indispensable au développement d'un biofilm hautement organisé et mature (Reisner *et al.*, 2003).

### 1.1.6. Dispersion

Enfin, la dernière étape de la formation du biofilm décrit que certaines bactéries peuvent se détacher par endroit. L'équipe de Costerton a étudié le profil protéomique de différents stades de développement de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Sauer *et al.*, 2002). Certaines cellules présentent un phénotype proche des cellules planctoniques, permettant de décrire l'évolution d'un biofilm comme comprenant une phase de dispersion.

## 1.2. Problèmes liés aux biofilms

La formation de biofilms survient dans une très large gamme de situations puisqu'ils se concentrent sur toute interface, solide/liquide, air/solide et air/liquide. Nous ne nous intéresserons qu'aux biofilms aux interfaces solide/liquide, c'est-à-dire dès que nous sommes en présence d'une surface (inorganique ou organique) et d'un milieu liquide (eau, sang, lait...). Ces biofilms concernent différents domaines :

- la santé
- l'industrie (industrie du papier, industrie du traitement des eaux usées, industries agroalimentaires, industrie du textile...)
- les équipements en eaux naturelles (navires, pipelines, structures portuaires, installations d'aquaculture, capteurs marins, circuits de refroidissement...)

### 1.2.1. Biofilms associés à des bactéries pathogènes

Les biofilms peuvent être responsables de nombreuses infections (Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Fux *et al.*, 2005). Ils sont notamment responsables des maladies nosocomiales, c'est-à-dire des infections contractées au cours d'un séjour hospitalier. Elles s'effectuent soit par contamination directe avec les matériaux médicaux (cathéters, valves cardiaques, pacemakers, prothèses, dialyses péritonéales), soit par transmission entre patients ou

personnel hospitalier ou encore elles peuvent être liées à une contamination de l'environnement hospitalier. Les microorganismes associés à ces infections sont le plus souvent *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia Coli*. Les infections sont diverses : infections urinaires, respiratoires et vasculaires, bactériémie et septicémie. Leur fréquence en France est estimée à 7% des patients hospitalisés. Les statistiques des autres pays varient de 5 à 12%. Cependant, ce sont les patients les plus fragiles qui sont le plus exposés, les patients « bien portants » présentant un risque faible de 1% à 3%. En France, la mortalité par infections nosocomiales serait comprise entre 10 000 et 20 000 décès par an. Ces infections sont d'autant plus difficiles à combattre que les bactéries associées en biofilm sont résistantes aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte (Fux *et al.*, 2005).

Les biofilms sont responsables des plaques dentaires et caries générées principalement par des bactéries du genre *Streptococcus* (Farge, 1998) ainsi que des maladies parodontales (Boschin *et al.*, 2004).

Dans le secteur alimentaire et notamment laitier et fromager, la présence de biofilms, sur les parois des équipements ou encore les membranes de filtrations, peuvent entraîner des problèmes de qualité sanitaire des aliments. Ils peuvent en effet servir de niche à des espèces pathogènes comme la *Listeria monocytogenes* (Wong, 1998) et causer alors de sévères problèmes de santé publique (Cerf, 2002).

Les biofilms de réseau d'eau chaude sanitaire ou de circuits de refroidissement peuvent également abriter des espèces pathogènes telles que la *Legionella pneumophila* responsables des légionelloses (Levi, 2001).

## 1.2.2. Biofilms marins

### 1.2.2.1. Biofilm et salissures marines

Les salissures marines sont constituées à la fois de procaryotes (bactéries marines), d'eucaryotes unicellulaires (protozoaires, levures, diatomées) et d'eucaryotes pluricellulaires, végétaux comme les macroalgues ou animaux comme les invertébrés marins. Les plus connues et les plus étudiées des salissures marines sont les vers marins (annélides), les mollusques (moules), les arthropodes (crustacés comme les balanes), les bryozoaires, cnidaires et les chétognathes (acsidies). Wahl en 1989 propose un modèle de formation des salissures marines représenté sur la Figure 5 ci-dessous.

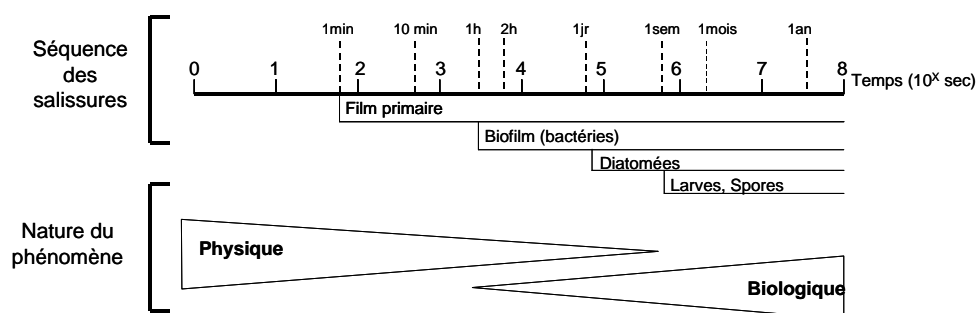


Figure 5 – Représentation schématique des séquences de formation des salissures marines (d'après Wahl, 1989).

Ce déroulement chronologique est admis d'un point de vue cinétique mais chaque étape n'est pas nécessairement indispensable à l'autre. Dans un premier temps on observe l'adsorption quasi instantanée de molécules organiques et inorganiques (Baier, 1972 ; Loeb et Neihof, 1975 ; Taylor *et al.*, 1997 ; Compère *et al.*, 2001), puis le biofilm se forme et enfin les macroorganismes marins adhèrent. La nature des phénomènes impliqués évolue progressivement d'un processus physique vers un processus biologique. Plusieurs observations ont montré que le biofilm bactérien influence l'adhésion des macroorganismes marins en l'inhibant ou en le favorisant (Holmström *et al.*, 1992 ; Wieczorek et Todd, 1998 ; Qian *et al.*, 2003). C'est notamment Zobell et Allen qui en 1935 décrivent le biofilm comme une couche collante prenant au piège les larves.

### 1.2.2.2. Conséquences

Les salissures marines apparaissent sur toutes les structures ou équipements marins et posent un problème majeur pour l'industrie et les activités de la mer en général (navires, pipelines, circuits et tour de refroidissement, structures portuaires, capteurs marins, systèmes d'aquaculture).

La présence de salissures sur les échangeurs de chaleur conduit à :

- diminuer l'efficacité du transfert, la présence du biofilm isole la surface de la phase liquide et retarde le transfert de chaleur.
- augmenter la consommation en énergie, les forces de frictions sont augmentées par la présence des salissures qui altèrent la rugosité de la surface et ainsi diminuent la vitesse d'écoulement.
- augmenter les coûts de maintenance par la mise en place de procédures de nettoyages.
- augmenter le risque de corrosion.

Les problèmes de salissures marines en circuits de refroidissement influencent donc le rendement des installations ainsi que leur pérennité. Il a été montré à la fin des années 1980 que le coût total dû aux salissures des échangeurs de chaleur pour les pays industrialisés comme les Etats-Unis ou le Royaume-Uni s'élève à 0,25% du produit national brut (PNB) (Garrett-Price *et al.*, 1985 ; Pritchard, 1987). Pour la Nouvelle Zélande, ce coût est estimé à 0,15% du PNB (Steinhagen *et al.*, 1993).

Les salissures induisent également une augmentation de rugosité des coques de navires et donc de la résistance de friction lors de son déplacement dans l'eau. Cela conduit à une diminution de la vitesse des bateaux et à une augmentation de la consommation en carburant. Par exemple, un biofilm de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur entraîne une augmentation de 5 à 15% de la résistance de friction (Characklis, 1990). Un biofilm d'un millimètre d'épaisseur entraîne une diminution de la vitesse du navire de 15% (Callow, 1986). L'augmentation de la consommation en carburant entraîne une augmentation des coûts et c'est également un important facteur de pollution via l'émission de composés nocifs (Corbett et Fischbank, 1997). De plus, l'application de peintures antisalissures marines, leur renouvellement ainsi que leur récupération lors des carénages augmentent les coûts d'entretien des navires.

Les salissures représentent un facteur important de corrosion et de dégradation des matériaux passivables, on parle alors de biocorrosion ou de biodétérioration. La biocorrosion serait attribuée à un effet de catalyse de la réaction cathodique ou anodique provoquée par les biofilms, notamment par des enzymes, modifiant la cinétique des réactions électrochimiques à l'interface biofilm-métal (Beech et Sunner, 2004). La biocorrosion est encore peu expliquée, différents modèles semblent en être à l'origine montrant la complexité du phénomène. De plus, la présence de bactéries anaérobies dites sulfurogènes diminue la résistance de la couche passive. La présence d'un biofilm bactérien induit un gradient d'oxygène permettant parfois l'établissement d'une zone en anaérobiose, propice au développement des bactéries sulfato-réductrices. La biocorrosion est le plus souvent localisée et elle peut se développer très rapidement (jusqu'à 1 cm par an). Son coût est estimé à 10% des coûts totaux de lutte contre la corrosion des matériaux en général soit environ à 5 milliards d'euros pour la France (Corrodys).

D'autre part, la présence de salissures sur les coques des navires peut être à l'origine d'introduction de nouvelles espèces au sein d'environnements marins où elles n'étaient pas présentes naturellement (Reise *et al.*, 1999). Les salissures sont notamment un vecteur important de dispersion d'espèces exotiques (Gollasch, 1999).

De plus, la présence de salissures marines induit une dérive des mesures réalisées par des capteurs océanographiques immergés, comme les détecteurs optiques, caméras sous marines, capteurs de mesures de pH, de température, de substances toxiques...

### 1.3. Moyens de lutte

La prévention des infections nosocomiales passe par la mise en place de procédures réglementaires et de règles d'hygiène hospitalière strictes, notamment pour la désinfection et la stérilisation des matériaux médicaux. Nous ne développerons pas plus ce point.

Concernant le contrôle des biofilms dans les circuits de refroidissement des différentes industries, des procédures de nettoyage sont mises en place. Il existe des techniques physiques et chimiques permettant de réduire l'effet des salissures marines. Il s'agit notamment d'injecter des doses constantes et régulières de produits désinfectants directement dans le milieu de circulation d'eau. Ce système nécessite de contrôler le taux de produit chimique rejeté afin de diminuer leur impact sur l'environnement.

Enfin, en vue de contrôler les salissures marines présentes sur les coques des navires, on utilise différentes peintures antisalissures.

Nous décrivons donc les substances actives contenues dans les peintures antisalissures, les produits désinfectants utilisés ainsi que les voies de recherche développées dans ce domaine. Enfin, nous nous attarderons plus spécialement sur les traitements enzymatiques.

#### 1.3.1. Peintures antisalissures

La plupart des peintures antisalissures contiennent un produit biocide qui se définit comme toute substance active ou préparation destinée à détruire, repousser ou rendre inoffensif les

organismes nuisibles par une action chimique ou biologique (directive européenne 98/8/CE). On nomme substance active la substance exerçant une activité globale ou spécifique sur ou contre les organismes nuisibles. Celles contenues dans les peintures antisalissures sont des composés organométalliques (à base d'étain ou de cuivre) ou des composés organiques (fongicides, algicides, bactéricides) qui préviennent l'adhésion des salissures marines par leur activité toxique.

Le principe des peintures antisalissures repose sur la libération contrôlée de la substance active à l'interface entre la surface et l'eau de mer. L'efficacité de la peinture est maintenue tant que la concentration en substance active relarguée en surface est efficace et régulière. Elle est ajustée pour une durée de vie d'au moins deux ans. C'est le cas des peintures érodables, où la substance active insérée au sein d'une matrice soluble/insoluble (exemple : colophane) est progressivement solubilisée sous l'action des frottements de l'eau.

Les peintures auto-polissantes, développées à partir de copolymères de méthacrylate de tributylétain (TBT) possèdent un taux de lixiviation constant. Le TBT greffé sur le liant acrylique est libéré lentement par hydrolyse dans l'eau. L'efficacité de ces peintures est importante et leur durée de vie est augmentée jusqu'à 5 ans.

Les peintures dites « fouling-release coating », sont composées de polymères de silicone (polydiméthylsiloxane) ou de polymères de fluor (fluoropolyuréthanes) (Brady, 2001). Ils confèrent à la surface des propriétés ultra-lissantes, avec de faibles forces de frictions et de faibles énergies de surface. Ce sont ces propriétés physiques qui empêchent les salissures d'adhérer. L'avantage de ces peintures serait leur non-toxicité. Cependant leur efficacité dépend de la vitesse du bateau et les peintures à base de silicone restent encore assez chères. Ces peintures ont une durée de vie de deux ans (Brady, 2001).

Les différentes substances actives comme les composés organométalliques sont décrites dans le paragraphe qui suit. Nous étudierons ensuite les alternatives à leur utilisation en décrivant les composés organiques de synthèse utilisés aujourd'hui dans les peintures antisalissures ainsi que les composés organiques naturels et les conditionnements de surfaces actuellement en cour de recherche. L'utilisation de méthodes électrochimiques ou mécaniques (ultrasons, application de champs magnétiques, radiations ultraviolet, revêtements électroconducteurs...) est également une voie alternative à l'utilisation de produits toxiques mais ces méthodes ne seront pas détaillées dans cette étude.

### 1.3.1.1. Composés organométalliques

Les plus anciens systèmes, remontant à 2000 ans avant J.C, utilisaient le cuivre ou le plomb sous forme de revêtements formulés avec de la cire, du goudron ou du colophane (Omae, 2003 ; Yebra *et al.*, 2004). On retrouve ensuite des traces d'utilisation de composés sulfurés ou d'arsenic. Au début du 19<sup>ième</sup> siècle, on trouve des peintures industrielles à base de colophane, de sulfate de cuivre et de détergent. Au début du 20<sup>ième</sup> siècle sont développées des peintures à base d'oxyde de cuivre ou de composés tels que les organomercuriels, organoarsenics, organohalogénés et organosulfurés. Le plomb, le mercure et l'arsenic sont rapidement interdits d'utilisation dans certains pays du fait de leur persistance à long terme



dans l'environnement (Bennett, 1996). C'est à partir des années 1960 que les peintures antisalissures à base d'organostanniques sont largement commercialisées et se développent à travers le monde. Les oxydes de cuivre et les composés organostanniques sont les composés organométalliques les plus utilisés, jusque dans les années 1990.

Au début des années 1980 en France des ostréiculteurs, de la Baie d'Arcachon, ont observé de graves problèmes de fixation des naissains, de développement des huîtres et de malformation des coquilles. Il a été montré que la mort des coquillages était directement liée à l'utilisation de composés organostanniques (O-Sn) dans les peintures antisalissures (Alzieu, 1996 et 1998). Un décret est apparu en 1982 interdisant en France leur utilisation dans les peintures pour les bateaux de moins de 25 m (n°82-782). D'autres pays en interdisent ensuite l'utilisation comme l'Angleterre en 1987, les Etats-Unis en 1989 et le Japon en 1990. Il faut attendre 1999 pour que le tributylétain (TBT) soit interdit sur les navires de moins de 25 m en Europe (n°99/677/CEE) et 2003 dans le monde. En effet, l'organisation maritime internationale en a interdit l'utilisation pour les petits navires depuis 2003 et elle sera complètement prohibée dès 2008 via la directive 99/51/CEE. Cependant, certains pensent que l'interdiction totale du TBT dans les peintures était prématurée sachant que les concentrations relarguées étaient mieux contrôlées, notamment grâce au développement des peintures auto-polissantes (Evans *et al.*, 2000).

Afin de remplacer les composés organométalliques, certaines peintures contiennent aujourd'hui des composés organiques.

### 1.3.1.2. Composés organiques de synthèse

Les composés organiques ont été utilisés comme substance active dans les peintures antisalissures après l'interdiction d'utilisation de produits à base de TBT. Ils sont issus pour la plupart de l'agriculture (fongicides, herbicides, bactéricides). Les plus couramment rencontrés sont l'Irgarol 1051, Diuron, Dichlofluanide, Chlorothalonil, Zinc pyrithione, TCMTB, TCMS pyridine, Ziram, Thiram, Zined, Kathon5287 et Maned (Omae, 2003). Ces composés possèdent des temps de demi-vie faibles par rapport à ceux des métaux, de l'ordre de quelques heures (18 h pour le dichlofluanide) à quelques jours (100 jours pour l'Irgarol 1051). Cependant, malgré leur rapide dégradation dans l'environnement, de fortes concentrations en Kathon5287 ont pu être observées notamment au large de l'Espagne (Martinez *et al.*, 2001) et en Irgarol au sud de l'Angleterre (Gough *et al.*, 1994). Peu d'études sont réalisées sur leur toxicité sur les organismes marins, n'ayant pas encore suffisamment de recul par rapport à leur durée d'utilisation dans l'environnement. Cependant, ils pourraient potentiellement causer des dommages environnementaux (Voulvoulis *et al.*, 1999, Evans *et al.*, 2000). Il a déjà été montré que l'Irgarol 1051 présentait un risque pour l'écosystème (Scarlett *et al.*, 1999 ; van Wezel et van Vlaardingen, 2004), ainsi que les pyrithiones de Zinc (Turley *et al.*, 2000).

### 1.3.1.3. Composés organiques naturels

Une des voies de recherche en matière de peinture antisalissure consiste à étudier la potentialité d'utilisation de molécules naturelles. En effet certains organismes marins vivants ne présentent pas de salissures à leur surface (algues, éponges, coraux, dauphins) et seraient susceptibles de produire des molécules antisalissures. D'une manière générale, les molécules naturelles au potentiel antisalissure peuvent être des toxines, tensioactifs ou encore des inhibiteurs de métamorphose (Rittshof, 2000). L'acide zostérique, extrait d'une algue marine *Zostera marina* présente des propriétés antisalissures, il s'agit d'un sulfoxyester d'acide coumarique (Shin *et al.*, 2001). Des recherches ont également été menées sur le potentiel antisalissure d'extraits d'algues issues du littoral breton (Hellio *et al.*, 2001 et 2002) et d'extraits d'éponges issues du littoral méditerranéen (Tsoukatou *et al.*, 2002). Des cératinamides, dérivés de dibromotyrosine, issus d'une éponge marine *Pseudoceratina purpurea*, présentent une inhibition sur l'adhésion de larves de *Balanus amphitrite* (Tsukamoto *et al.*, 1996). Des extraits d'échinodermes présentent une inhibition sur l'adhésion de larve et de bactéries marines (Bryan *et al.*, 1996). Baum et ses collaborateurs travaillent sur l'épiderme du dauphin, dépourvu de salissures. Ils ont montré la présence d'un ensemble de molécules au potentiel antisalissure regroupées sous le nom de zygomel (Baum *et al.*, 2001 et 2002).

Certaines études sont menées sur les biofilms bactériens présents sur certaines algues ou invertébrés et inhibant l'adhésion d'eucaryotes marins (Armstrong *et al.*, 2000a). Des substances, notamment produites chez *Pseudoalteromonas tunicata* (bactérie marine), permettent d'inhiber l'adhésion de larves d'invertébrés comme *Hydroïdes elegans* et *Balanus amphitrite* et de spores d'algues comme *Ulva lactuca* et *Polysiphonia sp.* (Holmström *et al.*, 2002). Ainsi, des bactéries colonisatrices de ces macroorganismes marins permettraient de réguler les salissures de ses hôtes. L'utilisation directe de ces microorganismes pourrait être intéressante afin de lutter contre les salissures. L'incorporation de ces microorganismes dans un hydrogel pourrait permettre de protéger certaines surfaces (Holmström *et al.*, 2000). On peut également incorporer des extraits de microorganismes marins colonisateurs directement dans une peinture antisalissure (Armstrong *et al.*, 2000b). L'utilisation d'un biofilm dit « positif » en vue d'inhiber le développement d'une autre espèce non désirée est déjà utilisé en agroalimentaire, notamment pour contrôler le développement de microorganismes sur les fromages, poissons fumés... Par exemple, la croissance de la souche pathogène *Listeria monocytogenes* est particulièrement sensible à la nature des bactéries environnantes (Chasseignaux *et al.*, 2002). Son adhésion peut être limitée par la présence de biofilms de *Staphylococcus sciuri* (Leriche et Carpentier, 2000).

Des études sont également menées sur le potentiel antisalissure de molécules issues d'organismes non marins. Par exemple, le peptide de plante cycloviolacin O2 présente des effets inhibiteurs sur l'adhésion des larves de balanes (Göransson *et al.*, 2004). En effet, du fait du développement des biotechnologies en général et de la valorisation des recherches publiques, certaines molécules naturelles une fois extraites et caractérisées vont être testées pour différentes applications dans le domaine de la santé (antibiotiques, antifongiques,

anticancéreux, antiviraux, anti-inflammatoires...), dans le domaine de l'agriculture (insecticides) ou encore dans le domaine de l'environnement (antisalissures).

Les composés naturels sont supposés biodégradables mais à ce jour, peu de travaux ont été réalisés sur ce sujet. Ces composés peuvent également se révéler toxiques et mettront un certain temps avant d'arriver sur le marché. En effet, il sera nécessaire de pouvoir produire ces molécules à échelle industrielle et pour un coût abordable. D'autre part, leur incorporation dans des peintures ou leur greffage sur une surface sans modifier l'activité de la molécule devra être mise au point. Enfin, ils devront être intégrés à la directive biocide.

### 1.3.2. Conditionnement de surface

Différentes études portent sur l'influence du conditionnement de surface par des macromolécules organiques sur l'adhésion de microorganismes. Il a été observé que la formation de biofilm est précédée par une étape d'adsorption de molécules organiques (Baier, 1972 ; Loeb et Neihof, 1975 ; Taylor *et al.*, 1997 ; Compère *et al.* 2001) permettant la formation du film primaire (paragraphe 1.1.1). Les molécules organiques peuvent influencer l'adhésion des microorganismes en se liant à la surface, à la bactérie ou simplement en étant présentes dans le milieu liquide pendant la phase d'adhésion. Il a également été montré que l'adsorption de protéines sur une surface permet de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface (Schakenraad et Busscher, 1989) et par la même d'influencer l'adhésion du biofilm (Fletcher, 1976 ; Bradshaw *et al.*, 1997 ; Rubio, 2002).

Concernant les matériaux médicaux, différents conditionnements à l'aide de protéines (albumine, héparine, caséine...) ont été étudiés et ont montré une influence concernant l'adhésion de microorganismes pathogènes, pouvant augmenter ou inhiber l'adhésion (An *et al.*, 2000). Ceci a également été réalisé dans le domaine de l'agroalimentaire, où le conditionnement de surface par des protéines du lait peut diminuer l'adhésion de microorganismes (Barnes *et al.*, 1999). De même, l'influence de l'adsorption de SAB et/ou d'un polysaccharide sur des surfaces de PTFE, d'acier inoxydable et de verre a été étudiée sur l'adhésion de microorganismes marins (Rubio, 2002).

D'autre part, certaines études portent sur le couplage de macromolécules, polymères, afin de passiver une surface chargée en créant une interface ou un film biocompatible. Par exemple, le greffage de polyéthylène glycol (PEG) sur des surfaces a été beaucoup étudié. Ce polymère soluble dans l'eau, polyéther non chargé et non toxique est connu pour résister à l'adhésion de bactéries et à l'adsorption de protéines notamment concernant les biomatériaux (Harris, 1992).

L'effet de molécules adsorbées dont l'activité inhibitrice sur le biofilm a déjà été prouvée en solution a été également étudié. Par exemple, l'adsorption de furanones sur des biomatériaux permet de réduire un biofilm de *Staphylococcus epidermis* (Baveja *et al.*, 2004).

### 1.3.3. Traitements des circuits de refroidissement

Dans les circuits de refroidissement, c'est le milieu qui est traité. Il existe différents traitements chimiques possibles (Bott, 1998 ; Flemming, 2002) :

- chlore, eau de javel : la chloration est la technique la plus utilisée en France et dans le monde. La forme active de l'eau de javel est le chlore libre, correspondant à l'association de la forme ionisée  $\text{OCl}^-$  et de l'acide hypochloreux. C'est ce dernier qui est actif en désinfection. L'eau de javel présente l'avantage d'être efficace, peu coûteuse et facile d'utilisation (forme liquide). Cependant sa stabilité dépend fortement de la température et du pH, les performances étant diminuées à pH alcalin. Elle peut également présenter un caractère oxydant, corrosif et d'entartrage des lignes d'injections.
- brome : la bromation est plus efficace à pH alcalin que la chloration.
- cuivre-argent : ces métaux lourds sont connus comme agents bactéricides. Les ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Ag}^+$  sont générés par une chambre d'ionisation composée d'un alliage de cuivre et d'argent. Leur efficacité n'est pas affectée par la température, mais le cuivre peut être un facteur de corrosion et l'argent devient inactif à pH 8 par précipitation.
- ozone :  $\text{O}_3$  est produit par oxydation de l'air par décharges électriques dans un ozoneur. L'ozone est très efficace contre les biofilms, mais le système est coûteux et complexe.
- surfactants ou tensioactifs : ces biodispersants sont des molécules organiques de la famille des mouillants. Ils modifient la tension superficielle de l'eau et favorisent la dislocation du biofilm. Ils ne sont pas toxiques. En association avec un traitement bactéricide, ils permettent une meilleure diffusion des molécules dans les biofilms.
- bactéricides de synthèse : non ioniques comme les isothiazolines ou cationiques de la famille des ammoniums quaternaires.

Ces traitements chimiques permettent de contrôler la biomasse présente dans le circuit. L'objectif est de maintenir les biofilms en dessous d'un seuil de tolérance ; l'éradiquer entièrement est difficile. Cependant sur les circuits ouverts, l'injection de produits toxiques pour l'environnement n'est pas une bonne chose. C'est pourquoi certaines méthodes physiques ont été développées afin de limiter les rejets et les risques environnementaux des produits chimiques :

- filtration : filtrer 5 à 10% de l'eau du circuit permet d'éliminer une grande partie des bactéries. Il est utilisé le plus souvent en association avec un traitement désinfectant en amont.
- ultraviolet : cette technique est très efficace pour détruire les bactéries. Cependant, seule l'eau passant devant la lampe UV va être désinfectée. C'est pourquoi ce traitement est utilisé en association avec d'autres techniques (chloration, bromation, cuivre-argent...).
- ultrasons : leur utilisation permet de créer des micro-bulles sur la surface.

Les nouvelles voies de recherche développées considèrent notamment l'apport de nutriments. Le TNO (organisation néerlandaise pour la recherche scientifique appliquée) a mis au point un piège positif à biofilm. Il s'agit d'un filtre (microweb biofilter) contenant

une importante aire de surface et des nutriments, ainsi les bactéries sont piégées avant d'aller adhérer sur des surfaces du circuit.

Flemming décrit des stratégies alternatives concernant le problème des salissures en circuits de refroidissement (Flemming, 2002). Il s'agit de :

- détecter et surveiller le biofilm, c'est-à-dire connaître sa composition, sa localisation afin de traiter au plus tôt,
- limiter l'accès aux nutriments,
- combiner diverses techniques (biocides, surfactants, surface à faible adsorption)

### 1.3.4. Traitements enzymatiques

L'utilisation d'enzymes commerciales est une stratégie alternative à l'utilisation de composés chimiques présentant une toxicité. Les enzymes sont des protéines naturelles. Elles permettent de catalyser des réactions de transformation qui se produisent dans les organismes vivants. Elles sont spécifiques d'un substrat. Elles permettraient d'intervenir directement sur les molécules organiques impliquées dans l'adhésion des micro et macroorganismes sur les surfaces. En effet, l'adhésion des diatomées, de spores de macroalgues et de larves de balanes est médiée par la production de mucilage adhésif pouvant être composé de sucres (Wetherbee *et al.*, 1998), de glycoprotéines (Daniel *et al.*, 1987) et de protéines formant un ciment (Walker, 1972 ; Yule et Walker, 1984a, b). Concernant les premières étapes de l'adhésion, les enzymes permettraient de dégrader le film primaire, des molécules intramembranaires impliquées dans les premières étapes de l'adhésion (type adhésine), de détruire les EPS présents dans la matrice extracellulaire des biofilms ou encore d'interférer dans le QS via l'inhibition de molécules signal.

L'utilisation de préparations enzymatiques commerciales présente divers avantages :

- ce sont des molécules naturelles dont certaines sont non bactéricides
- elles sont déjà caractérisées et produites en quantités industrielles

Le désavantage des enzymes concerne surtout leur potentiel d'activité sur le long terme. En effet l'activité des enzymes dépend largement de leur conformation protéique, tributaire des conditions environnementales telles que le pH, la température, la salinité.

Un autre désavantage est leur spécificité d'action sur un substrat précis. Or, les molécules ciblées impliquées dans l'adhésion des organismes marins sont de compositions variées et pas toujours caractérisées.

L'utilisation d'enzymes comme solutions de lavage contre les biofilms a fait l'objet de différentes études et de nombreux brevets ont été publiés. Les plus anciens brevets, apparus à la fin des années 1970 et surtout dans les années 1990, concernent principalement les biofilms en milieux industriels de circuits de refroidissement. Presque tous font référence à des brevets portant sur des compositions de lavage des textiles, édités à partir de 1920 et surtout dans les années 1970, qui ont permis de décrire des mélanges d'enzymes et de détergents stables. C'est dans les années 1990 que les brevets portent sur

l'élimination de biofilms sur des surfaces et les plus récents concernent l'utilisation d'enzymes contre la formation de biofilms associés à des bactéries pathogènes plus particulièrement. Des détergents enzymatiques sont déjà sur le marché pour la stérilisation de matériels médicaux. Les publications scientifiques sont moins nombreuses que les brevets. Elles sont plus descriptives concernant les expériences réalisées et permettent une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la formation et le développement des différents types de biofilms.

On peut répertorier trois différentes stratégies en matière d'essais pour déterminer le potentiel d'enzymes à inhiber les biofilms associés à des bactéries pathogènes. La stratégie la plus répandue, consiste à cribler un grand nombre d'enzymes sur différents biofilms, visant l'hydrolyse en général de protéines et de sucres, principaux constituants de la matrice extracellulaire. Le criblage s'effectue sur des mélanges d'enzymes, des enzymes commerciales et notamment des enzymes à large spectre de substrats. Une autre stratégie consiste à caractériser des enzymes issues d'un biofilm et à tester leur potentiel d'inhibition sur d'autres types de biofilms. Enfin, la dernière stratégie consiste à tester une enzyme spécifique d'un substrat caractérisé et impliqué dans le développement du biofilm.

Nous allons décrire dans le détail les différentes publications et brevets publiés concernant les traitements enzymatiques contre les biofilms en milieux industriels, ceux associés à des bactéries pathogènes et aussi contre les salissures marines.

#### 1.3.4.1. Biofilms associés à des bactéries pathogènes

Johansen *et al.* en 1997 testent des enzymes sur un biofilm de bactéries pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) développé 4 jours sur une surface en acier inoxydable ou polypropylène en milieu de culture bactérien et quantifié par dénombrements en microscopie à épifluorescence et par mesure de conductance indirecte (Johansen *et al.*, 1999). Ils montrent que le mélange commercial Pectinex Ultra SP est capable d'éliminer une partie d'un biofilm. Cette action est plus efficace contre les biofilms formés par *Staphylococcus* que contre ceux formés par *Pseudomonas*. En 2001, Charlotte Johansen dépose un brevet concernant une méthode de traitement enzymatique pour éliminer le biofilm. Ce traitement est composé d'une solution contenant des hydrolases (non bactéricides) en association avec des oxydases (bactéricides), et un surfactant.

Anderson *et al.* en 2003 montrent l'efficacité d'une cellulase immobilisée, en utilisant de la gélatine de peau de bovin et du glutaraldéhyde, sur membrane de polytetrafluoroéthylène (PTFE) contre l'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa*. Certains désinfectants contenant des enzymes, spécialisés dans la désinfection de matériaux médicaux, sont évalués *in vitro* (Augustin et Ali-Vehmas, 2004 ; Henoun Loukili *et al.*, 2004b ; Vickery *et al.*, 2004). Ces différentes études montrent que l'efficacité de ces désinfectants enzymatiques commerciaux varie selon le biofilm ciblé (dépendant de la nature de la bactérie, de la surface et du milieu) et soulève la nécessité de tester différents produits commerciaux en laboratoire avant de choisir le mieux adapté. Pitts *et al.* (2003) testent une protéase à 2 g.l<sup>-1</sup> et observent

l'élimination de 60% d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* mesuré en microplaque par marquage au crystal violet alors que cette même enzyme augmente un biofilm de *Staphylococcus epidermis* de 15%. De même, Walker *et al.* (2003) observent 70% d'inhibition d'un biofilm dentaire par dénombrement des cfu (unité formant colonie) et 45% d'inhibition par mesure de pourcentage de surface recouverte en utilisant le mélange commercial Combizyme (mélange d'activités protéinases et carbohydrases).

Hahn Berg *et al.* (2001) montrent l'efficacité de la Krillase contre les biofilms dentaires, un mélange de protéases digestives issues d'un crustacé, actif contre la formation d'un biofilm composé de *Streptococcus*.

Le potentiel d'inhibition d'enzymes non commerciales, issues de biofilm, ont été testées sur un type de biofilm de nature différente de celui à partir duquel l'enzyme a été isolée et caractérisée. L'équipe de Kaplan en 2004 a caractérisé une glycoside hydrolase produite au cours de biofilms composés d'un microorganisme pathogène *Actinobacillus actinomycetemcomitans* et montre son efficacité contre d'autres biofilms associés à des bactéries pathogènes composés de *Staphylococcus epidermis* (Kaplan *et al.*, 2004). Cette enzyme nommée Dispersine B hydrolyse les N-acétylglucosamines (Ramasubbu *et al.*, 2005). Il démontre ainsi l'efficacité d'enzymes produites au cours de la formation de biofilms par certains microorganismes contre d'autres biofilms et la possibilité d'utiliser ces enzymes en tant qu'agent antibiofilm. Itoh *et al.* en 2005 élargissent l'utilisation de la Dispersine B aux biofilms dépendant des loci pgaABCD et icaABCD, ensemble de gènes responsables de la synthèse d'adhésines de type N-acétylglucosamine impliquées dans la formation de biofilms d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermis*. Cette enzyme semble très intéressante, mais son mécanisme d'activité reste encore mal connu, il semble lié aux mécanismes d'adhésion utilisant les adhésines intercellulaires.

Enfin, la dernière stratégie consiste à tester une enzyme spécifique d'un substrat caractérisé et impliqué dans le développement du biofilm. Le substrat ciblé peut soit faire partie des EPS de la matrice, soit faire partie des molécules signal identifiées au sein du QS. Xu et ses collaborateurs (2003) en vue de déacyler les AHL, identifiées comme molécules du QS, ont montré qu'un biofilm d'aquarium (de population mixte inconnue) pouvait être en partie inhibé par l'action de l'acylase I du rein de porc. Plusieurs recherches sont effectuées sur les AHL lactonases qui permettent d'interrompre le QS en inactivant les AHL (Roche *et al.*, 2004). Dong *et al.* (2000) observent qu'une enzyme nommée AiiA, probablement une métallohydrolase, diminue la quantité de AHL libérée et notamment la virulence d'une bactérie pathogène *Erwinia carotovora*.

Dans les biofilms dentaires impliquant *Streptococcus mutans* et *S. sobrinus*, un ensemble de sucres liés en  $\alpha$ -1,3 et  $\alpha$ -1,6 ont été caractérisés sous le nom de mutane comme des facteurs impliqués dans la formation de caries dentaires. Wiater et ses collaborateurs (2004) montrent que l'utilisation d'une mutanase et/ou d'une dextranase inhibe la formation et le développement de biofilms dentaires respectivement utilisées à 0,3 et 5 U.ml<sup>-1</sup> (à 37°C). Ceci a également été montré en 1997 par Johansen *et al.*

Contre les alginates de *Pseudomonas aeruginosa*, Christensen *et al.* en 2001 ont testé une alginate lyase sur des biofilms de *Pseudomonas* principalement et ont montré son inefficacité à empêcher la formation et le développement des biofilms. Il avait pourtant été montré que l'expression d'alginate lyase chez *Pseudomonas* pouvait être associée à un détachement du biofilm (Boyd et Chakrabarty, 1994).

### 1.3.4.2. Biofilms en milieux industriels

Les hydrolases ont été utilisées sous forme de composition de lavage depuis de nombreuses années. Dans le domaine des détergents utilisés pour le nettoyage des textiles, elles permettent la décomposition des salissures et des taches sur les tissus, augmentant ainsi l'élimination de ces taches par le lavage. Dès 1920, Rhöm a trouvé que les tissus pouvaient être nettoyés plus facilement et à des températures moins élevées après un prétraitement avec des enzymes trypsiques (Rhöm, 1920). En 1932, des enzymes ont été utilisées dans une composition de savon qui a permis d'augmenter l'efficacité du nettoyage (Frelinghuysen, 1932). C'est véritablement dans les années 1970 que les brevets concernant l'industrie des lessives ont été déposés. Ils portent notamment sur l'utilisation d'une enzyme de type protéase à sérine au sein d'un mélange de détergents organiques et de sels (McCarty, 1971). Différents brevets du même type se succéderont en ajoutant au mélange des glycosidases, de type  $\alpha$ -amylase (Jones et Collier, 1974 ; Inamorato et Hunter, 1976), et lipase (Mausner *et al.*, 1972). Dans le traitement des eaux industrielles issues de l'industrie du papier, Hatcher *et al.* déposent un brevet en 1973 concernant l'utilisation d'une levane hydrolase afin de contrôler (retarder ou éliminer) la formation de boues. Christensen et Zivtins (1977) décrivent l'injection d'une pentosanase-hexosanase, à 10 ppm pendant une heure dans un simulateur de tour de refroidissement à l'échelle de laboratoire, permettant une diminution de biomasse de 60%.

Wiatr (1990) publie un brevet portant sur le contrôle des boues industrielles. Il crible 40 enzymes commerciales sur une culture de *Pseudomonas* productrice d'exopolysaccharides, adhérente sur une lame de verre de microscope. Il en sélectionne 9 qu'il teste ensuite sur un biofilm mixte développé dans un dispositif permettant de simuler une tour de refroidissement en laboratoire. Le mélange le plus efficace contient une protéase, une  $\alpha$ -amylase ainsi qu'une  $\beta$ -glucanase (cellulase) et permet l'élimination de 37% du biofilm déterminé par pesée de biomasse séchée et par mesure des variations de pression.

Dans le domaine des extractions d'agrégats bactériens, présents dans les boues industrielles, des enzymes sont testées pour augmenter la capacité de défloculation d'agrégats bactériens en vue de caractériser les bactéries composant ces boues (Salhani et Uelker-Deffur, 1998 ; Böckelmann *et al.*, 2003 ; Malik et Kakii, 2003). Salhani et Uelker-Deffur augmentent la défloculation de bactéries contenues dans des boues en utilisant, en plus d'un traitement mécanique, des préparations enzymatiques de champignons de type cellulases. Böckelmann *et al.* montrent que le nombre de bactéries désagrégées est augmenté lorsque l'on ajoute en solution au traitement par ultrasons un mélange enzymatique d' $\alpha$ -amylases,  $\beta$ -galactosidases et de lipases. Malik et Kakii (2003) observent qu'une protéase sera efficace concernant la désagrégation de 2 espèces bactériennes précises mais pas pour 2 autres,



montrant ainsi une spécificité d'action selon les mécanismes impliqués dans l'agrégation, c'est-à-dire selon la nature des molécules de surfaces des bactéries.

Buckman Laboratories International Inc. développent des produits à base d'enzymes. Ils ont notamment édité un brevet en 1995 (Hollis *et al.*, 1995) et publié des articles sur l'utilisation d'enzymes dans le traitement des eaux industrielles (Lutey, 1997 ; Delord, 1999). Hollis *et al.* déposent un brevet concernant une composition de protéases et d'amylases associées à des surfactants afin de contrôler le développement de biofilm, en vue d'applications dans les circuits de refroidissement. Il crible dans un premier temps les différentes enzymes et surfactants sur un biofilm de différentes espèces bactériennes provenant de l'industrie du papier et développé en Erlenmeyer puis sur un simulateur d'échangeur de chaleur. Le mélange sélectionné permet une inhibition de 90% du biofilm développé en Erlenmeyer par mesure des variations de coloration à l'INT DYE et 96% en simulateur d'échangeur de chaleur par mesure des variations de pression.

En 1998, Aldridge *et al.* éditent un brevet concernant l'utilisation de protéases en vue d'inhiber et d'éliminer le biofilm formé sur des surfaces dans un système aqueux. Les enzymes sont testées sur un biofilm microbien composé de souches issues de biofilms isolés de circuits de refroidissement et développés durant 7 à 10 jours sur des coupons d'acier immergés dans un milieu d'eau de refroidissement synthétique. Les enzymes sont injectées avant ou après la formation du biofilm. Ils étudient l'action de 3 protéases et montrent que l'Alcalase se révèle la plus efficace. Ils étudient également la population de bactéries planctoniques et vérifient la non toxicité des enzymes sur le biofilm bactérien. Puis ils étudient l'action séquentielle d'une protéase suivie d'une lipase ou d'une glycosidase permettant ainsi d'optimiser l'hydrolyse des molécules du biofilm. Ils regardent également la stabilité des activités enzymatiques en présence d'adjuvants chimiques utilisés régulièrement pour laver les circuits de refroidissement (dispersants, produits anticorrosifs, biocides et hypochlorite de sodium) et montrent qu'en présence d'hypochlorite de sodium les enzymes sélectionnées perdent de leur activité.

Les brevets concernant le contrôle, la prévention et l'élimination de biofilms par l'utilisation d'hydrolases sont trop nombreux pour les détailler tous. Les différentes enzymes utilisées dans ces brevets sont répertoriées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 – Enzymes dont l'utilisation est brevetée dans des compositions de lavages et/ou contre la formation de biofilms.

Inventeurs	Enzymes testées	Domaines d'applications
McCarty (1971)	Alcalase, Maxatase	Composition détergente, Lavage des textiles
Aunstrup <i>et al.</i> (1972)	Protéase de <i>Bacillus alcalophilus</i> NCBI 8772	Composition détergente, Lavage des textiles
Mausner <i>et al.</i> (1972)	Enzyme AP (mélange de protéase et amylase), Lipase A	Composition détergente, Lavage des textiles
Barrat (1973)	Alcalase, protéase de <i>Bacillus alcalophilus</i> NCBI 8772 , protéase de souche bactérienne NCBI 10 147	Composition détergente, Lavage des textiles
Hatcher <i>et al.</i> (1973)	Levane hydrolase	Boue des eaux industrielles issues de l'industrie du papier
Jones et Collier (1974)	Subtilisine, $\alpha$ -amylase	Composition détergente, Lavage des textiles

Inamorato et Hunter (1976)	$\alpha$ -amylase, protéase alcaline	Composition détergente, Lavage des textiles
Christensen et Zivtins (1977)	Rhozyme HP-150	Boue des eaux industrielles, Circuits de refroidissement
Weber (1979)	Subtilisine	Composition détergente, Lavage des textiles
Stanislawski et Wiersema (1985)	Protéases alcalines ou neutres : Esperase, Alcalase, Savinase, Maxacal, Maxatase, Mylezyme	Composition de lavage
Durham <i>et al.</i> (1986)	Cellulase	Systèmes d'égouts
Miyajima <i>et al.</i> (1987)	Cellulosin (cellulase ou hémicellulase), Gluczyme (amylase), pectinase, héparinase, dextranase	Composition détergente pour lentilles de contact
Liu (1990)	Alginate lyase	Circuits de refroidissement
Wiatr (1990)	Protéase alcaline	Circuits de refroidissement
Carpenter <i>et al.</i> (1990)	$\alpha$ -amylase, $\beta$ -glucanase (cellulase) Endoglycosidase type II	Elimination de biofilm sur des surfaces
Hernandez-Mena et Friend (1993)	Pectinex, Novozyme 234, galactosidase, galacturonidase, rhamnosidase, xylosidase, fucosidase, arabinosidase, $\alpha$ -glucosidase	Boues des eaux industrielles
Hollis <i>et al.</i> (1995)	Diazyme L-200 (glucohydrolase), HT Proteolytic 175	Circuits de refroidissement Industrie du papier
van Pee <i>et al.</i> (1996)	Mannanase	Elimination de biofilm sur des surfaces
Aldridge <i>et al.</i> (1998)	Espérance, Alcalase, Vibriolysine, carbohydrase, Lipolase	Circuits de refroidissement
Letartre (2002)	Alginate lyase, dextranase, cellulase, glucosidase, amylase, carbohydrase, protéase, lipase	Désinfection de matériels médicaux
Budny et Budny (2000)	Polysaccharides hydrolases	Contrôle de la plaque dentaire
Johansen (2001)	Pectinex Ultra SP	Composition de lavage et ou de désinfection (matériels médicaux)
Serran <i>et al.</i> (2001)	Citrozym, trypsine	Elimination de biofilm aux interfaces solide/liquide/air ou solide/liquide
Heinen <i>et al.</i> (2002)	$\alpha$ -amylase (Aquazyme 120L, AMG300L), cellulases (Viscozyme, Celluclast, Denimax, Novozyme 188L), lipase (Lipolase, Novozyme 868), protéases (Savinase, Neutrase, Flavourzyme, Alcalase)	Extraction de microorganismes à partir de boues
Yacobi-Zeevi (2002)	Héparanase	Désinfection de surfaces contre <i>Pseudomonas</i>
Baldrige et Michalow (2003)	Estérase, lipase, chymotrypsine, cystine arylamidase, $\beta$ -galactosidase, $\beta$ -glucuronidase, $\beta$ -glucosidase, $\alpha$ -mannosidase	Systèmes de filtration (osmose inverse, traitement des eaux usées)
Manyak <i>et al.</i> (2004)	Mélange d'enzymes produites par <i>Alteromonas</i> 2-40 sur agar complétement en polysaccharides représentant ceux des biofilms	Applications industrielles et thérapeutiques
Marion et Sanchez (2004)	Trypsine, pancréatine, protéase fongique, thermolysine	Désinfection et décontamination de matériels (médicaux)
Barton <i>et al.</i> (2004)	Décacétylase, cellulase, estérase, glycosidase, xylanase, amylase, transaminase, laminarinase, $\beta$ -galactosidase, $\beta$ -mannosidase, pullulanase, amidase	Contrôle du biofilm
Sava (2004)	Protéase, amylase	Systèmes de recirculation d'eau
Xu (2004)	Acylase (Substrat : Lactone)	Elimination, prévention de biofilm

La liste des brevets concernant l'utilisation d'enzymes pour lutter contre le développement des biofilms n'est pas exhaustive sachant que les brevets portant sur ce sujet sont nombreux. Les enzymes répertoriées dans le tableau sont celles qui sont décrites comme testées et la plupart de ces brevets revendiquent l'utilisation de majorité des familles des hydrolases de type protéases et glycosidases principalement. Certaines souches bactériennes sont testées et la plupart des domaines d'application sont revendiqués (tous les biofilms en général, circuits de refroidissement, industrie du papier, matériels chirurgicaux...).

Ces enzymes sont rarement utilisées seules mais plutôt avec des adjuvants de type : surfactants (tensioactif), détergents, biocides, inhibiteurs de corrosion, composés chimiques (urée, sels, chlore...) et aussi avec des enzymes bactéricides de type oxydase. Elles sont ajoutées en séquence ou non, avant ou après formation du biofilm. Elles sont souvent utilisées en mélange entre elles, la plupart des préparations étant déjà sous forme de mélange de diverses activités enzymatiques.

La nature des hydrolases utilisées est variée. Concernant les domaines d'applications pour le nettoyage des textiles les protéases alcalines sont principalement utilisées pour leur stabilité d'activité à pH alcalin car elles sont en présence de détergent. La protéase la plus utilisée est la subtilisine. Les préparations commerciales telles que l'Alcalase, la Savinase, l'Espérase, Maxacal ainsi que la Maxatase en contiennent.

La diversité des glycosidases utilisées reflète la grande diversité de substrat au sein des différents biofilms testés. Les plus citées sont les  $\alpha$ -amylases et les  $\beta$ -glucosidases (cellulases).

On remarque que peu utilise des lipases ou estérases. Seules 2 types d'enzymes ne font pas partie de la famille des hydrolases : les lyases et les acylases.

### 1.3.4.3. Salissures marines

Dès 1977 Danielsson *et al.* publient l'effet de certaines enzymes sur des bactéries marines adhérentes du genre *Pseudomonas*. La Pronase, la trypsine et le lysosyme sont incubées en solution d'eau de mer en présence du biofilm formé sur lame de verre. Les bactéries adhérentes sont marquées à l'acridine orange et dénombrées au microscope à épifluorescence. Ils observent une inhibition de 60% du biofilm par action de la Pronase à 0,1 g.l<sup>-1</sup> dès les 5 premières minutes d'incubation. L'inhibition est de 70% après 30 minutes. La trypsine inhibe de 40% à 50% et le lysosyme d'environ 10%. La Pronase est un mélange d'endo et d'exoprotéinases. Sa large spécificité de substrat pourrait expliquer ce résultat.

En 1995, Brisou publie un ouvrage sur les méthodes pour extraire des microorganismes de la surface qui les abrite (organique et inorganique) par voie enzymatique. Il teste notamment l'action d'une pectinase et d'une hyaluronidase sur des sédiments marins et des moules. Il augmente ainsi le nombre de bactéries extraites.

Pettitt *et al.* en 2004 ont publié une étude sur le criblage d'enzymes commerciales concernant l'inhibition de l'adhésion de diatomées, de spores d'algues et de larves de

balanes sur des surfaces de verre. Ils ont observé une forte inhibition d'adhésion en utilisant l'Alcalase.

Concernant les brevets, aucun à ce jour ne porte sur l'utilisation d'enzymes en solution dans le cadre des biofilms d'origine marine de manière spécifique. Ils portent sur l'incorporation d'enzymes dans les peintures antisalissures et les enzymes sont testées sur l'adhésion d'organismes marins tels que des algues ou les balanes. Nippon Paint Company a édité un brevet en 1998 concernant l'incorporation d'enzymes (lipases, protéases, cellulases, chitinase, lysosyme) via des lipides ou dérivés glucoxy dans une peinture antisalissures auto-polissante (Hamade *et al.*, 1998). Cette méthode permet une activité enzymatique et antisalissure stable sur 12 mois d'immersion en eau de mer. Duke University a déposé en 1999 un brevet sur l'incorporation d'hydrolases au sein d'une matrice polymérique en polyuréthane (Bonaventura *et al.*, 1999). Biolocus a déposé un brevet en 2001 concernant l'incorporation d'enzymes au sein d'un liant colophane (Allermann et Sneider, 2001). L'efficacité de ce mode d'incorporation et notamment avec comme enzyme l'Alcalase a été décrite en laboratoire sur l'adhésion de larves de balanes et *in situ*, après immersion à un mètre de profondeur en eau de mer durant 6 mois de plaques d'acryliques recouvertes des différentes formulations de peintures.

#### 1.4. Tests *in vitro*

Il n'existe pas à ce jour de test normalisé pour tester l'efficacité de produits contre les biofilms. Les tests vont se différencier par la nature de la surface, du milieu (nutritif ou non, pH, température) et par celle des bactéries utilisées. Il s'agit de s'approcher des conditions naturelles de formation du biofilm ciblé.

D'une manière générale le biofilm est formé en présence ou non de désinfectant. La problématique est en fait de pouvoir dénombrer et quantifier le biofilm formé. Les méthodes utilisées relèvent de la microbiologie en général. L'énumération des bactéries du biofilm se fait habituellement par microscopie à épifluorescence après avoir marqué le biofilm via des marqueurs fluorescents comme le DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole) ou bien par étalements des bactéries viables cultivables sur agar, après avoir décroché le biofilm de la surface (Christensen *et al.*, 2000). Ces techniques sont fastidieuses, lentes et peuvent induire des détériorations du biofilm de par la phase de séchage ou de décrochage. De plus, les bactéries n'adhèrent pas toujours de façon uniforme, elles peuvent former des amas ; dans ce cas, le comptage en microscopie s'avère impossible, il est nécessaire de décrocher le biofilm de la surface ou de posséder des microscopes équipés de logiciels permettant de comptabiliser le pourcentage de surface recouverte. Ces différentes méthodes ne sont pas adaptées au criblage.

Des études ont déjà été réalisées afin de cribler différents extraits naturels sur des microorganismes d'origine marine et d'en caractériser les propriétés antisalissures, notamment sur des extraits issus de macroalgues (Hellio *et al.*, 2001 ; Maréchal *et al.*, 2004) ou de microorganismes (Holmström *et al.*, 2002). Pour cela, les essais développés sont similaires à des tests d'antibiotiques selon la technique de disque-diffusion sur gel d'agar ou

celle en solution en microplaque (Amsterdam, 1996). Ces méthodes ne sont pas adaptées aux conditions de formation d'un biofilm marin car l'activité antisalissure mesurée, définie par une concentration minimum d'inhibition (MIC), correspond davantage à une activité toxique qu'à une activité de détachement, d'inhibition de l'adhésion. De plus on sait que les bactéries au sein de biofilms sont plus résistantes aux traitements antibiotiques (Russel, 2003) ; la détermination des MIC serait alors sous estimée par rapport à celles calculées sur des bactéries en biofilm.

En 1999, Ceri *et al.* ont développé un nouvel appareil permettant de tester la sensibilité de biofilms associés à des bactéries pathogènes aux antibiotiques par une méthode de criblage rapide et reproductible (MBECTM). Récemment commercialisé, ce matériel consiste en un couvercle de microplaque 96 puits recouvert de 96 chevilles pouvant être incubées chacune dans les puits d'une microplaque standard ou dans une cuve striée. Après incubation du couvercle dans la microplaque 96 puits contenant des bactéries, le biofilm est formé sur chaque cheville ; puis le couvercle est à nouveau incubé dans une autre microplaque 96 puits contenant différents désinfectants à différentes concentrations. Après décrochage du biofilm adhérent, les cellules sont dénombrées. Cette technique permet de déterminer une concentration minimum d'éradication du biofilm (MBEC) pouvant être comparée aux MIC de bactéries planctoniques ou sur gels d'agar.

O'Toole *et al.* en 1999 publient une méthode de formation de biofilm en microplaque inspirée de celle de Christensen (Christensen *et al.*, 1985b) où le biofilm formé sur les parois du puits est révélé par une coloration au crystal violet (CV) et quantifié par une mesure spectrophotométrique de la densité optique à 570 nm. Ce test est utilisé pour cribler des microorganismes mutés incapables de se développer en biofilm afin d'étudier et d'identifier les gènes impliqués dans la formation des biofilms associés à des bactéries pathogènes. Récemment, ce test a été utilisé afin d'évaluer l'efficacité d'agents désinfectants sur des bactéries pathogènes (Pitts *et al.*, 2003 ; Augustin et Ali-Vehmas, 2004 ; Kaplan *et al.*, 2004 ; Henoun Loukili *et al.*, 2004a et 2004b). Cette technique a aussi été récemment adaptée avec différents marqueurs comme le CTC (chlorure de tétrazolium 5-cyano-2,3-ditoly) (Pitts *et al.*, 2003), le calcofluor (Stagoj *et al.*, 2004), des substrats fluorogéniques (Augustin et Ali-Vehmas, 2004), des marquages radioactifs et des variants marqués à la GFP (protéine fluorescente verte) (Vesterlund *et al.*, 2005). Nous nous baserons sur cette technique en microplaque afin de déterminer le potentiel des préparations enzymatiques commerciales à inhiber l'adhésion et la formation d'un biofilm marin.



## 2. Enzymes

Les enzymes sont des protéines, présentes dans tous les organismes vivants et responsables de la catalyse (accélération) de différentes réactions chimiques. Il existe un nombre très important d'enzymes et on en découvre encore aujourd'hui de nouvelles. Six classes d'enzymes sont répertoriées selon la réaction chimique qu'elles catalysent : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases. Selon cette classification, à chaque enzyme correspond un numéro EC (« Enzyme Commission »). Nous nous intéresserons uniquement aux hydrolases (EC 3), enzymes dont la réaction fait intervenir une molécule d'eau et aboutit à la scission d'un composé. Certaines enzymes peuvent cependant présenter plusieurs activités.

Une enzyme est spécifique d'un substrat, molécule dont elle catalyse la transformation. A la fin de la réaction la structure de l'enzyme se retrouve inchangée. Leur mode d'action est basé sur la reconnaissance spécifique du substrat par un domaine particulier chez l'enzyme (site actif ou site catalytique). L'activité enzymatique est liée à la structure tertiaire de l'enzyme, et notamment à celle du site actif. Des facteurs comme le pH ou la température, pouvant influencer cette structure tridimensionnelle ou encore l'état d'ionisation du site actif, affectent fortement l'activité enzymatique. Chaque enzyme possède donc une température et un pH d'activité optimale.

Les enzymes produites en quantités industrielles sont majoritairement d'origine microbienne. Leurs applications concernent principalement les détergents et le secteur agroalimentaire.

Nous décrirons dans un premier temps les hydrolases que nous utiliserons pour le criblage de potentiel antisalissure. Nous étudierons ensuite certaines préparations enzymatiques commerciales, leurs applications industrielles, leur mode de production ainsi que leur composition.

### 2.1. Hydrolases

Les hydrolases constituent une classe d'enzymes qui catalysent notamment les réactions d'hydrolyse des liaisons peptidiques (peptidases ou protéases, EC 3.4), de liaisons osidiques (glycosidases, EC 3.2) et d'esters (estérases, EC 3.1). Nous nous attarderons plus précisément dans chaque partie sur les enzymes ayant été sélectionnées pour le criblage de potentiel antisalissure.

#### 2.1.1. Protéases

Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques et permettent ainsi le clivage de protéines. Il existe 2 familles de protéases, les exoprotéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques par l'extrémité N-terminale ou C-terminale de la protéine et les endoprotéases qui hydrolysent les liaisons peptidiques internes. Les endoprotéases sont ensuite classées selon la nature de leurs acides aminés fonctionnels, arrangés dans une certaine

conformation tridimensionnelle pour former le site catalytique. Parmi elles il existe les 4 classes suivantes (Neurath, 1989) :

- protéases à sérine (EC 3.4.21)
- protéases à cystéine (EC 3.4. 22)
- métalloprotéases (EC 3.4.24)
- protéases à acide aspartique (EC 3.4.23)

La spécificité des endoprotéases dépend également de la nature des acides aminés impliqués dans la liaison à hydrolyser (acides aminés basiques, aromatiques...). Les protéases sont dites à large spectre lorsqu'elles présentent une faible spécificité de clivage.

### 2.1.1.1. Protéases à sérine – Subtilisine

Cette famille de protéase possède un site catalytique composé de 3 acides aminés caractéristiques : histidine, acide aspartique et sérine (Figure 6) (Rawlings et Barrett, 1994b).

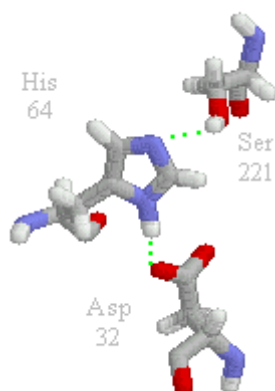


Figure 6 – Triade catalytique de la subtilisine.

On distingue les enzymes de mammifères, enzymes digestives pancréatiques comme la trypsine (EC 3.4.21.4), la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) ou encore l'élastase (EC 3.4.21.11), des enzymes bactériennes comme la subtilisine (3.4.21.62). Malgré un mécanisme enzymatique et la géométrie du site actif en commun, ces deux types d'enzymes diffèrent de part leur séquence en acides aminés et aussi de part leur conformation tridimensionnelle.

Leur mécanisme de coupure est basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine (Kraut, 1977). Grâce à l'histidine et l'acide aspartique qui forment une triade avec la sérine, la liaison OH de la sérine est alors très fortement polarisée. Le mécanisme se déroule en deux temps (Figure 7) :

- le peptide C terminal est relargué dans le milieu , le peptide N terminal acyle la sérine (enzyme acylée).
- l'eau coupe la liaison acyle, libérant le second peptide et régénérant la forme initiale de l'enzyme.



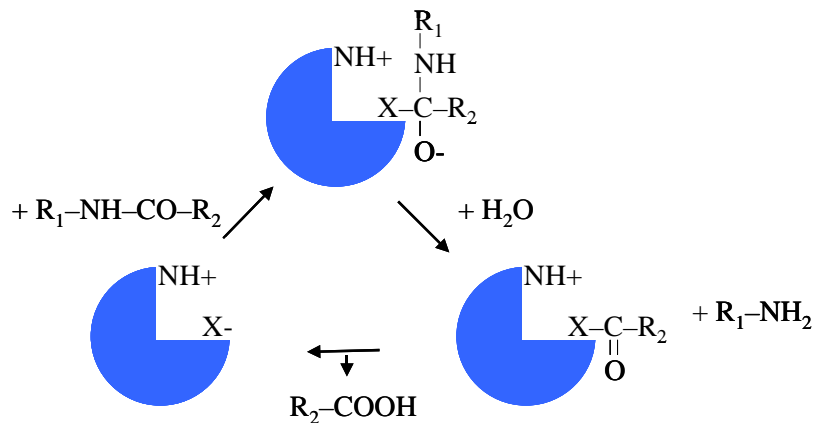


Figure 7 – Mécanisme d'action des protéases à sérine (X=O) et à cystéine (X=S)

La subtilisine est une protéase à large spectre mais qui présente une préférence pour les acides aminés non chargés (Ottesen et Svendsen, 1970).

### 2.1.1.2. Protéases à cystéine – Papaïne

Les protéases à cystéine possèdent un site actif composé d'une cystéine, d'un acide aspartique et d'une histidine (Rawlings et Barrett, 1994a). Leur mode de fonctionnement est similaire à celui des protéases à sérine. La réaction se produit via un intermédiaire thiol ester. On distingue dans cette famille les enzymes de plantes, comme la papaïne (EC 3.4.22.2), de celle des mammifères (cathepsines).

La papaïne est une protéase à large spectre, mais qui a tendance à cliver préférentiellement les liaisons impliquant des acides aminés hydrophobes (Drenth *et al.*, 1971). Elle est présente dans le latex (liquide laiteux) qui se retrouve entre l'écorce et la pulpe de la papaye et, à un moindre degré, dans les feuilles de l'arbre.

### 2.1.1.3. Métallo-protéases

Les métallo-protéases lient un ion métallique au niveau de leur site actif, le plus souvent  $Zn^{2+}$  mais aussi  $Ca^{2+}$ . La composition du site actif peut varier selon les métallo-protéases, il est composé de deux acides glutamiques et d'une histidine pour les carboxypeptidases. On distingue les enzymes de mammifères, enzymes pancréatiques (carboxypeptidase) et les enzymes bactériennes (thermolysine). Comme pour les protéases à sérine, elles diffèrent de part leur structure chimique malgré un mécanisme enzymatique commun.

Une des métalloprotéases est la deutérolisine (EC 3.4.24.39) qui clive principalement les liaisons impliquant des résidus hydrophobes (Nakadai *et al.*, 1973).

### 2.1.1.4. Protéases à acide aspartique

Les protéases à acide aspartique présentent un site actif composé de deux acides aspartiques. Elles regroupent des enzymes de mammifères (pepsine, chymosine), d'origine bactérienne (penicillopepsine) et quelques unes d'origine fongique. Leur mécanisme d'action repose sur une réaction acido-basique.

## 2.1.2. Glycosidases

Les glycosidases hydrolysent les liaisons O- et S- entre des composés glycosidiques et permettent ainsi le clivage des polysaccharides (Figure 8).

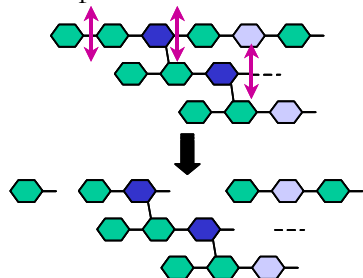


Figure 8 – Représentation schématique d'un clivage enzymatique d'un hétéropolysaccharide, chaque couleur représentant un monosaccharide différent.

En comparaison avec les protéases, les glycosidases présentent une grande spécificité d'action qui dépend de :

- la nature du résidu glycosidique impliqué dans la liaison
- sa configuration D ou L
- sa forme cyclique, pyranose ou furanose
- la nature de leur carbone impliqué dans la liaison
- la configuration anomérique  $\alpha$  ou  $\beta$  de la liaison
- la présence de substituants

Nous allons donc sélectionner différentes glycosidases spécifiques de sucres et de liaisons les plus rencontrés dans la nature.

### 2.1.2.1. Cellulases

La cellulase (EC 3.2.1.4) est en fait un complexe enzymatique comportant 3 types d'enzymes (Odier et Rouau, 1985) :

- endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase ou cellulase (EC 3.2.1.4) qui hydrolyse la cellulose en glucane, soit les liaisons 1,4- $\beta$ -D-glucosidiques,
- cellulose  $\beta$ -1,4-cellobiosidase (EC 3.2.1.91) qui hydrolyse le glucane en cellobioses, soit les liaisons  $\beta$ -1,4-D-glucosidiques également,
- $\beta$ -glucosidase ou cellobiase (EC 3.2.1.21) qui hydrolyse le cellobiose en glucose.

Ce complexe cellulolytique permet une dégradation complète de la cellulose en glucose. Il est produit principalement par des bactéries, notamment celles vivant en symbiose avec des herbivores, leur permettant ainsi de digérer les végétaux.

Il existe également une endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanase (EC 3.2.1.6) qui hydrolyse les liaisons 1,3- et 1,4- des  $\beta$ -D-glucanes lorsque le glucose est substitué en C3 (Reese et Mendels, 1959). Elles permettent notamment la dégradation de l'hémicellulose.

### 2.1.2.2. $\alpha$ -Amylases

Les  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1) hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,4-D-glucosidiques contenues dans des polysaccharides contenant au moins 3 résidus D-glucose. Elles hydrolysent l'amidon, le glycogène et notamment l'amylose en maltose (Schwimmer et Balls, 1949). Les amylases sont présentes dans le jus pancréatique et la salive et sont également synthétisées par les fruits ou les plantes durant leur maturation ainsi que par les céréales durant la germination.

L'amyloglucosidase (EC 3.2.1.3) hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,4-D-glucosidiques des glucoses terminaux. Elle permet l'hydrolyse du maltose, de l'amylopectine et de l'amylose en glucose.

### 2.1.2.3. Xylanases

Les xylanases (EC 3.2.1.8) clivent les liaisons  $\beta$ -1,4-D-xylosidiques des xylanes en xylose (Whistler et Masek, 1955). Elles permettent notamment l'hydrolyse d'hémicellulose. Elles sont produites principalement par des bactéries présentes chez les herbivores comme pour les cellulases.

### 2.1.2.4. Pectinases

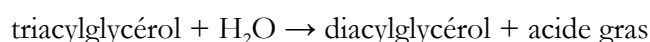
La pectinase (EC 3.2.1.15) ou polygalacturonase hydrolyse le pectate (pectine non méthylée) et autres galacturonanes (Lineweaver et Jansen, 1951). Elle clive la liaison  $\alpha$ -1,4 des polymères de D-galacturonanes en libérant des monomères ou des dimères.

Les pectinases regroupent différentes activités enzymatiques :

- les exopolygalacturonases qui hydrolysent le pectate par une extrémité,
- les pectines méthylestérases qui dé-estérifient les acides galacturoniques méthylés,
- les lyases : endopectine lyase, endopectate lyase et exopectate lyase, elles clivent les liaisons  $\alpha$ -1,4 des polymères des D-galacturonanes selon un mécanisme de  $\beta$ -élimination et non plus d'hydrolyse.

### 2.1.3. Estérases et Lipases

Il existe différentes familles d'estérases. Nous nous intéresserons plus spécialement à celle des hydrolases d'esters carboxyliques (EC 3.1.1) et notamment à la lipase (EC 3.1.1.3). C'est une triacylglycérol lipase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons esters présentes entre l'acide gras et le glycérol des lipides insolubles dans l'eau (Singer et Hofstee, 1948) :



Les lipases hydrolysent les triacylglycérols en monoacylglycérol, diacylglycérol, glycérol et acide gras libres. La distinction entre l'activité lipase et l'activité estérase n'est pas claire à ce jour. On définit les lipases comme des estérases qui peuvent hydrolyser des triacylglycérols à longue chaîne d'acide gras (Villeneuve et Frogilia, 1997).

## 2.2. Mélanges enzymatiques commerciaux

Les enzymes sont de plus en plus utilisées en applications industrielles. Elles permettent notamment de remplacer les produits chimiques. Elles sont produites par fermentation de microorganismes (bactéries, levures ou champignons) génétiquement modifiés ou non. Ces préparations enzymatiques ne sont pas pures, elles possèdent de nombreux additifs et impuretés. Elles renferment généralement plusieurs activités enzymatiques.

### 2.2.1. Applications

Les préparations enzymatiques commerciales sont utilisées dans divers secteurs industriels :

- agroalimentaire : alimentation animale, production de boisson (jus de fruits, vins, brassage de bière), industrie laitière et fromagère, alimentation céréalière, panification, produits carnés, fabrication d'aliments à base de produits de la mer,
- industrie de fabrication du papier,
- industrie du textile, délavage des jeans,
- détergents ménagers et industriels...

Leur activité, leur spécificité d'action ainsi que les conditions réactionnelles en font d'excellents outils de catalyse.

La subtilisine, présente dans différents mélanges enzymatiques commerciaux, est notamment utilisée en industrie du textile en tant que détergent pour augmenter l'efficacité de lavage. Les lipases sont également employées dans l'industrie du textile et sont présentes dans les détergents ménagers et industriels afin d'éliminer les taches de gras.

Les applications de la papaine sont diverses. Elle peut être utilisée en pharmaceutique car elle présente des propriétés anti-inflammatoires, en industrie alimentaire notamment pour l'attendrissement de la viande, et en industrie du textile, comme agent nettoyant ou détergent. La deutérollysine est employée dans l'industrie laitière et notamment dans la fabrication de fromages comme enzyme coagulante (Desmazeaud et Spinnler, 1997).

Les hémicellulases, pectinases et cellulases sont utilisées pour la dégradation des parois des cellules végétales (Bonnin *et al.*, 1997). Les pectinases permettent d'augmenter la capacité d'extraction dans la fabrication des jus de fruits et de légumes et, en œnologie, d'augmenter l'arôme des vins. Les hémicellulases et les xylanases sont utilisées dans la valorisation des sous produits végétaux destinés à l'alimentation animale. Les cellulases sont également employées dans l'industrie du textile et dans la fabrication du papier. Les xylanases servent aussi pour le blanchiment (sans chlore) des pulpes de bois dans l'industrie de fabrication du papier.

Les amylases et les  $\beta$ -glucanases sont très utilisées dans les procédés de production de bière (Boivin, 1997). Les amylases permettent notamment la dégradation de l'amidon et ainsi une meilleure assimilation par les levures. Les  $\beta$ -glucanases sont utilisées pour prévenir des difficultés de filtration dues aux  $\beta$ -glucanes. Les amylases servent aussi pour les procédés

de panification. Les  $\beta$ -glucanases sont également utilisées en œnologie permettant la lyse des parois des levures.

### 2.2.2. Production

Les enzymes sont produites par fermentation de microorganismes (bactéries, levures ou champignons). La fermentation liquide est adaptée aux bactéries aérobies, alors que la fermentation sur milieu solide est adaptée aux microorganismes fongiques. La souche est sélectionnée en fonction de différents critères. Elle doit être non pathogène, ne pas produire de toxines en milieu de culture, permettre une bonne productivité de l'enzyme et posséder une stabilité génétique. Les microorganismes producteurs d'enzymes peuvent être génétiquement modifiés afin d'en augmenter la capacité de production. Ceux rencontrés le plus souvent sont des champignons du genre *Aspergillus* comme *Aspergillus oryzae*, *A. niger* et *A. aculeatus* qui sont notamment utilisés pour produire les estérases, xylanases, amylases, glucanases, pectinase et la deutérollysine. *Trichoderma* est un champignon utilisé pour la production de cellulases (*T. reesei*) et de xylanases (*T. longibradiatum*). La subtilisine est naturellement produite par *Bacillus subtilis* et peut être produite par d'autres espèces du genre *Bacillus* comme *B. licheniformis*. Certaines levures peuvent aussi être utilisées comme *Candida*.

Les enzymes produites peuvent être extracellulaires ou intracellulaires impliquant des procédés de purification très différents. L'extraction se fait par des techniques telles que la filtration stérile, la centrifugation et l'ultrafiltration, réalisées dans les conditions de pH de stabilité optimale pour l'enzyme.

Les préparations commerciales enzymatiques peuvent contenir plusieurs enzymes ou plusieurs activités enzymatiques différentes. Elles se présentent sous forme liquide ou en poudre. Contrairement aux enzymes produites en laboratoire, celles contenues dans les préparations commerciales ne sont pas pures. La part d'enzyme dans le mélange peut être parfois négligeable (Soupe, 1997). Les préparations sont en fait caractérisées par une quantité d'activité enzymatique. Il est difficile de connaître la composition exacte de ces préparations. Les enzymes liquides sont stabilisées par l'ajout de polyols ou de sels (NaCl, MgSO<sub>4</sub>...) voire de bactériostatiques alimentaires (benzoates, sorbates, ascorbates...). Les polyols comme le sorbitol ou le glycérol représentent entre 20 et 50% de la formulation. Les enzymes en poudre sont supplémentées en support d'atomisation (supports alimentaires comme l'amidon, maltodextrine, sucre ou sel) afin notamment d'éviter la formation de grumeaux ou d'agrégats. Il existe également des enzymes sous forme de microgranulés.

La papaïne est produite par le papayer. Elle est extraite par incision de la papaye et récoltée du latex. Elle est purifiée par filtration, centrifugation et atomisation. On ajoute ensuite des réducteurs (glutathion, sulfite, cystéine) afin d'éviter toute oxydation.

Certaines enzymes sont d'origine animale, elles sont utilisées en industrie laitière surtout. Elles sont produites par présure animale ou par extraction d'estomacs macérés de jeunes bovidés.

Les hydrolases commerciales du fait de leur disponibilité, de leur biodégradabilité, de leur moindre toxicité, seront étudiées dans le domaine des étapes initiales d'adhésion des salissures marines, en solution d'eau de mer, en prévention comme en nettoyage d'un biofilm marin, afin d'hydrolyser les molécules organiques (protéines, polysaccharides et lipides) impliquées dans les mécanismes de formation des biofilms.

## Chapitre 2 – Matériels et méthodes

---





L'ensemble des réactifs et des produits chimiques utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich sauf pour certains dont l'origine est alors précisée.

## 1. Produits à potentiel antisalissures

### 1.1. Enzymes

#### 1.1.1. Préparations enzymatiques commerciales

Les caractéristiques des différentes préparations enzymatiques commerciales que nous avons choisies d'utiliser sont répertoriées dans le Tableau 3. Les enzymes ont été sélectionnées en fonction de leur large spectre d'activité, de l'étude bibliographique sur la nature des EPS et aussi de leur disponibilité, la plupart des enzymes nous ayant été données par les fournisseurs. Concernant les protéases, nous avons sélectionné différentes sous classes d'enzymes au spectre d'activité large. Concernant les glycosidases, nous avons choisi une large gamme de diverses activités représentatives de la nature des résidus glycosidiques et des liaisons les plus rencontrées. Concernant les lipases nous avons choisi une triacylglycérol lipase sous différentes formulations. Nous pouvons ainsi tester 5 protéases, 15 glycosidases et 3 lipases.

Les données regroupées dans le Tableau 3 proviennent des fiches produits des fabricants. Certaines informations n'étant pas complètes, l'étude bibliographique a permis d'apporter des précisions. En effet, les activités secondaires des préparations Viscozyme et Shearzyme proviennent de la publication de Pettitt *et al.* (2004), celles de Pectinex de Johansen *et al.* (1997), celles de Finizyme de Sorensen *et al.* (2005) et celles de Glucanex de Kim *et al.* (2004). Les optima de pH et de température varient d'une source à une autre du fait d'un mélange d'activités présentes dans la préparation. Les pH et température optima de Pectinex sont issus de la publication de Landbo et Meyer (2004) et ceux de Ultraflo de Sorensen *et al.* (2005) ainsi que de Heo *et al.* (2005).

Tableau 3 – Caractéristiques des préparations enzymatiques commerciales testées sur le biofilm en microplaque.

Classe d'enzyme	Nom de marque	Fabricant / Provenance	Origine	Numéro EC	Nom de l'enzyme (Sous classe)	Formulation	Optima pH Tp (°C)	Application
Lipases	Lipex 50T	Novozymes	<i>Aspergillus sp.</i>	EC3.1.1.3	lipase (phosphoric monoester hydrolases)	Poudre		Textile
	Liponan FBG	Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>	EC3.1.1.3	lipase (phosphoric monoester hydrolases)	Poudre		Détergent Panification
	Lipolase 100L L0777	Novozymes / Sigma Aldrich	<i>Aspergillus oryzae</i>	EC3.1.1.3	lipase (phosphoric monoester hydrolases)	Liquide		Détergent

Classe d'enzyme	Nom de marque	Fabricant / Provenance	Origine	Numéro EC	Nom de l'enzyme (Sous classe)	Formulation	Optima		Application
							pH	Tp (°C)	
Protéases	Protéase A Amano 2	Amano Enzyme / Unipex	<i>Aspergillus oryzae</i>	EC3.4.24.39	deuterolysine, (metalloendopeptidase)	Poudre	7	50	Procédé des protéines
	Papaïne P3250	Sigma Aldrich	Latex de papaye séché	EC3.4.22.2	papaïne (cystéine endopeptidase)	Poudre	6-7	25	Divers (alimentaire, pharmaceutique, textile)
	Umamizyme	Amano Enzyme / Unipex	<i>Aspergillus oryzae</i>	EC3.4.11.1	leucyl aminopeptidase (aminopeptidase)	Poudre	8	45	Brasseries
	Savinase 16L type EX	Novozymes	<i>Bacillus sp.</i>	EC3.4.21.62	subtilisine (sérine endopeptidase)	Liquide	>8,5	50	Textiles
	Subtilisine P5380	Novozymes / Sigma Aldrich	<i>Bacillus licheniformis</i>	EC3.4.21.62	subtilisine (sérine endopeptidase)	Poudre	>8,5	50	Détergent
Glycosidases	Cellulve TR400	Lyven	<i>Trichoderma reesei</i>	EC3.2.1.4 EC3.2.1.91 EC3.2.1.21	cellulase, cellulose 1,4- $\beta$ -cellobiosidase, $\beta$ -glucosidase	Poudre	4,5	65	Textile, alimentation, papeterie.
	Celluclast 1,5L	Novozymes	<i>Trichoderma reesei</i>	EC3.2.1.4	cellulase	Liquide	4,5-6	50-65	Dégradation de cellulose
	Ultraflo L	Novozymes	<i>Humicola insolens</i>	EC3.2.1.6	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase + cellulase, xylanase, pentosanase, arabanase	Liquide	6-7	40-60	Brasseries
	Feedlyve AXC	Lyven	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	EC3.2.1.8	endo-1,4- $\beta$ -xylanase	Poudre	4-5	60	Alimentation animale
	Pulpzyme HC	Novozymes	<i>Bacillus sp.</i>	EC3.2.1.8	endo-1,4- $\beta$ -xylanase	Liquide	7	50	Papeterie
	Panlyve AMY 10	Lyven	<i>Aspergillus oryzae</i>	EC3.2.1.1	$\alpha$ -amylase	Poudre	5	55	Panification
	Panlyve AG	Lyven	<i>Aspergillus niger</i>	EC3.2.1.3	amyloglucosidase	Poudre	4-5	70	Jus de fruit
	Glucanex 200G	Novozymes		EC3.2.1.58	$\beta$ -glucanase + $\beta$ -1,6-glucanase, protéase, chitinase, cellulase,	Poudre			Oenologie
	Finizyme 200L	Novozymes	<i>Aspergillus niger</i>	EC3.2.1.6	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase + cellulase, xylanase, pentosanase et arabanase	Liquide	5	60	Brasserie
	Viscozyme L	Novozymes	<i>Aspergillus aculeatus</i>	EC3.2.1.6	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase,	Liquide	3,5-5,5	25-55	Brasseries et industries d'alcool.
				EC3.2.1.4	cellulase,				
				EC3.1.1.73	feruloyl esterase,				
				EC3.2.1.8	endo-1,4- $\beta$ -xylanase,				
	Shearzyme 500L	Novozymes	<i>Aspergillus oryzae</i>	EC3.2.1.8	endo-1,4- $\beta$ -xylanase	Liquide	5	70	Spécifiques des pentosanes solubles du blé
				EC3.2.1.6	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase,				
	Pectinase Sigma P4716	Sigma Aldrich	<i>Aspergillus niger</i>	EC3.2.1.15	polygalacturonase	Liquide			
				EC3.2.1.1	$\alpha$ -amylase				
EC3.2.1.6				endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase					
$\alpha$ -Amylase A7720	Novozymes / Sigma	<i>Bacillus sp.</i>	EC3.2.1.1	$\alpha$ -amylase	Liquide				
$\beta$ -Glucanase 49101	Biochemika / Sigma Aldrich	<i>Aspergillus niger</i>	EC3.2.1.6	endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanase	Poudre				
Pectinex Ultra SP L	Novozymes	<i>Aspergillus aculeatus</i>	EC3.2.1.15	Polygalacturonase + xylanase, $\beta$ -glucanase et hémicellulase, arabanase	Liquide	3,5	35	Jus de fruits	

## 1.1.2. Activités spécifiques

Les activités spécifiques de chaque enzyme sont déterminées afin de pouvoir comparer leur efficacité sur le biofilm. L'enzyme est incubée à différentes concentrations avec le substrat et l'apparition du produit est mesurée en fonction du temps afin de déterminer les vitesses initiales. Elles sont exprimées en unités enzymatiques c'est-à-dire en unités d'absorbance apparues par minute. Elles permettent, en fonction des différentes concentrations en enzyme testées, de déterminer l'activité spécifique. Les activités spécifiques sont exprimées en unités enzymatiques par gramme ou millilitre de préparation enzymatique.

Chaque vitesse initiale est mesurée trois fois. Au minimum cinq concentrations sont testées par enzyme. Les substrats sont utilisés en concentration saturante afin qu'ils n'aient pas d'effet sur la vitesse de la réaction enzymatique. Les caractérisations des enzymes s'effectuent à 25°C à pH 8,15 et en eau de mer préfiltrée sur 0,22 µm (salinité 36g.l<sup>-1</sup>).

### 1.1.2.1. Activité protéase

Les activités des protéases ont été mesurées à l'aide de l'azocaséine (Tomarelli *et al.*, 1949). Le substrat est une protéine (la caséine) liée à un chromophore. Son hydrolyse génère de petits peptides solubles dans l'acide trichloroacétique (TCA). L'intensité de la couleur dépend donc de l'activité protéase de l'enzyme. L'hydrolyse est mesurée au cours du temps par mesure spectrophotométrique à 450 nm.

La préparation enzymatique est solubilisée ou diluée en eau de mer naturelle (préalablement filtrée sur 0,22 µm) pour une gamme finale comprise entre 0,5 et 20 g.l<sup>-1</sup> selon les préparations enzymatiques testées. L'azocaséine est préparée à 2% dans un tampon phosphate 100 mM à pH 8,15. 200 µl d'enzyme sont mis en présence de 330 µl d'azocaséine. 80 µl sont prélevés toutes les 3 minutes pendant 12 minutes et déposés dans 250 µl de TCA 10% afin de stopper la réaction. L'azocaséine non hydrolysée et précipitée par l'acide trichloroacétique est éliminée par centrifugation pendant 5 minutes à 10 000 rpm. 140 µl de surnageant est déposé sur une microplaque 96 puits et neutralisé par 160 µl de NaOH 1M. La densité optique est alors mesurée à 450 nm.

### 1.1.2.2. Activités glycosidases

Le dosage du produit repose ici sur un dosage colorimétrique d'extrémités réductrices des sucres substrats. En effet, l'hydrolyse d'une liaison à l'intérieur d'une molécule de polysaccharide conduit à la formation d'un nouveau carbone anomérique. Ce carbone, non impliqué dans une liaison, permet un équilibre entre les deux formes anomériques α et β (Figure 9). Les activités glycosidases ont été mesurées à l'aide du dosage des extrémités réductrices de Nelson et Somogyi (Somogyi, 1960 ; Spiro, 1966).

Le principe du dosage de Nelson et Somogyi repose sur la réduction d'une solution cuivrique (Cu<sup>2+</sup>) en présence de sucres réducteurs avec précipitation d'oxyde cuivreux (Cu<sup>+</sup>). Par addition d'une solution arséniomolybdique les ions cuivreux forment un complexe coloré dont l'absorbance est mesurée à 550 nm. Une équivalence entre

l'absorbance mesurée à 550 nm et la quantité de glucose en  $\mu\text{mol}$  a été établie permettant d'exprimer les activités enzymatiques en équivalent de  $\mu\text{mol}$  de glucose libéré par minute.

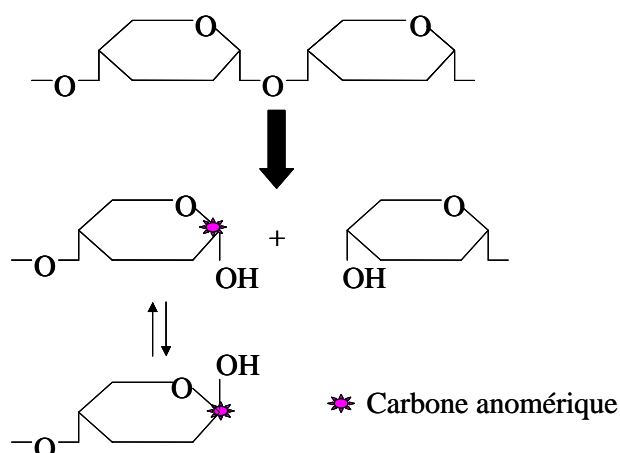


Figure 9 – Représentation schématique de l'hydrolyse d'un polysaccharide menant à la formation d'un sucre possédant une extrémité réductrice.

Les différentes préparations enzymatiques sont solubilisées ou diluées en eau de mer (préalablement filtrée sur  $0,22\ \mu\text{m}$ ) pour une gamme finale qui varie selon l'enzyme de  $0,005$  à  $10\ \text{g.l}^{-1}$ . Le substrat est préparé à  $12,5\ \text{g.l}^{-1}$  dans de l'eau milliQ. Le substrat est adapté à l'activité à mesurer (Tableau 4).  $500\ \mu\text{l}$  d'enzyme sont mis en présence de  $100\ \mu\text{l}$  de substrat.  $100\ \mu\text{l}$  sont prélevés toutes les 3 minutes pendant 12 minutes et déposés à  $100^\circ\text{C}$  5 minutes afin d'arrêter la réaction d'hydrolyse. Les échantillons sont ensuite refroidis et conservés à  $4^\circ\text{C}$  avant le dosage des extrémités réductrices.

Tableau 4 – Nature du substrat utilisé en fonction de l'activité enzymatique à caractériser.

Activité mesurée	Substrat ( $12,5\ \text{g.l}^{-1}$ )
Cellulase	Carboxyméthyl cellulose à viscosité moyenne
Glucanase	$\beta$ -Glucane d'orge
Xylanase	Xylane
Amylase	Amidon soluble
Pectinase	Pectine

#### Réactif à l'arséniomolybdate :

$25\ \text{g}$  de molybdate d'ammonium sont dissous dans  $450\ \text{ml}$  d'eau distillée.  $21\ \text{ml}$  d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentré sont ajoutés ainsi que  $3\ \text{g}$  d'arsénate de sodium préalablement solubilisés dans  $25\ \text{ml}$  d'eau distillée. Cette solution est incubée de 24 à 48 heures à  $38^\circ\text{C}$  et conservée à l'abri de la lumière à température ambiante. Juste avant son utilisation, cette solution est diluée dans deux volumes d'acide sulfurique  $1,5\ \text{N}$ .

#### Réactif cuivreux :

Réactif 1 :  $15\ \text{g}$  de sels de Rochelle (tartrate double sodium/potassium) et  $30\ \text{g}$  de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) anhydre sont dissous dans  $300\ \text{ml}$  d'eau distillée.  $20\ \text{g}$  de

carbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) sont ensuite ajoutés. 180 g de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhydre préalablement solubilisés dans 500 ml d'eau dégazée sont ajoutés au mélange. Le volume est ajusté à 1 l.

Réactif 2 : 5 g de sulfate de cuivre pentahydraté ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) sont mélangés à 45 g de sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et solubilisés dans 250 ml d'eau distillée.

Juste avant son utilisation, un volume du réactif 2 est mélangé à 4 volumes du réactif 1.

#### Dosage de Nelson et Somogyi :

100  $\mu\text{l}$  d'échantillon à doser sont mélangés avec 100  $\mu\text{l}$  de réactif cuivreux et incubés 20 minutes à  $100^\circ\text{C}$ . 100  $\mu\text{l}$  de réactif à l'arsénomolybdate sont ensuite ajoutés et incubés 10 minutes à température ambiante. 300  $\mu\text{l}$  d'eau milliQ sont ensuite ajoutés. Les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 10 000 rpm et 300  $\mu\text{l}$  de surnageant sont déposés sur une microplaque 96 puits. L'absorbance est mesurée à 550 nm.

Après chaque étape à  $100^\circ\text{C}$  les échantillons sont refroidis dans la glace et centrifugés 3 minutes à 10 000 rpm. Une courbe étalon est réalisée avec une gamme de glucose comprise entre 0 et 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  permettant d'exprimer les activités des glycosidases en équivalent  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  de glucose libérés par minute.

### **1.1.2.3. Activités lipase et estérase**

On utilise cette fois un substrat lié à un groupement paranitrophényl. L'hydrolyse du substrat libère le paranitrophénol de couleur jaune, dont l'absorbance est mesurée à 400 nm. Pour caractériser les activités estérase et lipase on utilise, respectivement, le p-nitrophényl butyrate ( $\text{C}_{4:0}$ ) et le p-nitrophényl palmitate ( $\text{C}_{16:0}$ ) comme substrats (Kilcawley *et al.*, 2002).

Les différentes préparations enzymatiques sont solubilisées ou diluées en eau de mer naturelle (filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ ) pour une gamme finale qui varie selon l'enzyme de 0,5 à 25  $\text{mg.l}^{-1}$ . Le substrat p-nitrophényl palmitate est utilisé à 50  $\text{mmol.l}^{-1}$  dans l'acétonitrile. Le substrat p-nitrophényl butyrate est d'abord solubilisé à 100  $\text{mg.l}^{-1}$  dans une solution de chloroforme puis dilué dans l'acétonitrile pour une concentration finale à 50  $\text{mmol.l}^{-1}$ . 10  $\mu\text{l}$  de substrat sont ajoutés à 1 ml de solution enzymatique dans l'eau de mer et l'absorbance est mesurée toutes les secondes à 400 nm pendant 5 à 10 minutes.

### **1.1.2.4. Activité d'enzymes en mélange 2 à 2**

Le dosage d'activité enzymatique en mélange d'enzymes deux à deux est effectuée à la suite du plan d'expérience réalisé sur la prévention du biofilm en microplaque en présence d'un mélange d'enzyme (protocole paragraphe 3.9.1).

200  $\mu\text{l}$  d'enzyme 1 sont incubées avec 200  $\mu\text{l}$  d'enzyme 2, chacune aux concentrations répertoriées dans le Tableau 5 en présence de 600  $\mu\text{l}$  d'eau de mer stérile. Ces concentrations correspondent à celles du mélange testé dans le plan d'expérience avant incubation avec les bactéries (protocole paragraphe 3.9.1). Des témoins sont réalisés avec

200  $\mu\text{l}$  d'enzyme 1 ou 2 et 800  $\mu\text{l}$  d'eau de mer. Après incubation pendant 1 heure à température ambiante, des dilutions sont effectuées et les enzymes sont mises en présence de leur substrat. Une cinétique est alors réalisée en utilisant le protocole adapté à l'activité enzymatique à mesurer. 3 cinétiques sont réalisées par concentration d'enzyme.

Tableau 5 – Concentrations initiales des enzymes dans le mélange enzymatique deux à deux en  $\text{mg.ml}^{-1}$  ou  $\mu\text{l.ml}^{-1}$  correspondant aux concentrations du mélange testé dans le plan d'expérience avant incubation avec les bactéries (protocole paragraphe 3.9.1).

Concentration en mg ou $\mu\text{l.ml}^{-1}$	
Subtilisine	1
Papaïne	60,7
$\alpha$ -amylase	Pure
Lipolase	333,3

## 1.2. Produits industriels

Les produits industriels testés ont été fournis par Mexel® S.A., une société spécialisée dans la commercialisation de surfactants utilisés en lavage dans les circuits de refroidissement. Les produits que nous avons testés sont les suivants :

- 432/0 : alkylamines (amines grasses) en émulsion aqueuse. Ce produit est utilisé comme antisalissure.
- 336 : alkylamines en solution sous différentes formulations (336 HO, 336 02 5, 336 10 5). Ce produit est utilisé notamment pour la désinfection de surfaces.
- D2010 : agent de nettoyage à base de phosphonates.
- AG 6202 : alkylglucoside, agent nettoyant dégraissant.

Ces produits sont sous forme liquide. En tenant compte de leur densité (Tableau 6) leur concentration dans le milieu réactionnel bactérien est exprimée en  $\text{mg.l}^{-1}$ .

Tableau 6 – Densité des produits Mexel® testés en  $\text{g.ml}^{-1}$

Produit	Densité en $\text{g.ml}^{-1}$
AG 6202	1,16
D2010	1,32
336 HO	0,976
336 02 5	0,99
336 10 5	0,998
432/0	0,98

Nous avons également utilisé l'hypochlorite de sodium provenant de Sigma Aldrich sous forme liquide. Sa densité est de  $1,206 \text{ g.ml}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$  et cette solution comporte de 83 à 90% d'eau. La solution est donc concentrée entre  $0,1206$  et  $0,205 \text{ g.ml}^{-1}$  en hypochlorite de sodium.

## 2. Microbiologie

Les expériences en microbiologie sont réalisées en conditions stériles soit sous hotte à flux laminaire soit à la flamme. Toutes les solutions, les matériels et les milieux de culture sont préalablement stérilisés à l'autoclave (120°C pendant 15 minutes). Certaines solutions ne pouvant pas être autoclavées (comme les solutions enzymatiques, les marqueurs) sont stérilisées par filtration sur filtres seringues Millex stériles 0,22 µm à usage unique (Fischer Scientific Labosi, Elancourt) en conditions stériles.

L'eau de mer utilisée a été prélevée en février 2003 au large de la baie de Lavarde près de Saint Malo. Elle a été filtrée sur des filtres en ligne de 0,22 µm (Milipore Sterivex) en conditions stériles et stockée à 4°C.

### 2.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de biofilms marins naturels adhérents sur des coupons immergés dans des bains d'eau de mer à Sainte Anne du Porzic (Brest) en novembre 1998. Les différents isolats ont fait l'étude d'une caractérisation dans la thèse de Céline Rubio en 2002. Nous avons choisi d'utiliser la bactérie modèle *Pseudoalteromonas sp.* D41 pour ses fortes capacités d'adhésion sur différents matériaux (Pradier *et al.*, 2005) et sa capacité à produire des EPS (Rubio, 2002).

*Pseudoalteromonas sp.* D41 a été isolée à partir d'un biofilm marin naturel formé sur lame de Téflon immergée en eau de mer 24 heures. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, possédant un seul flagelle à une extrémité. Cette bactérie a été attribuée au genre *Pseudoalteromonas* par séquençage de l'ARN 16S. La séquence a été déposée sur la banque de données EMBL sous le numéro d'accès AJ555627.

Nous avons également utilisé au cours de cette étude une autre bactérie nommée D01 aux caractéristiques différentes de la D41. Elle adhère moins que la D41 et présente des propriétés physico-chimiques de surface différentes de celle de D41 (Pradier *et al.* 2005). Elle possède notamment un caractère plus hydrophile que la D41. D01 a été isolée à partir d'un biofilm marin naturel formé sur lame de verre immergée pendant 6 heures. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, possédant un seul flagelle à une extrémité. Cette bactérie a été attribuée au genre *Vibrio lentus* (98%) et *Vibriolentus sp.-like* (96%) par séquençage de l'ARN 16S ribosomal (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005).

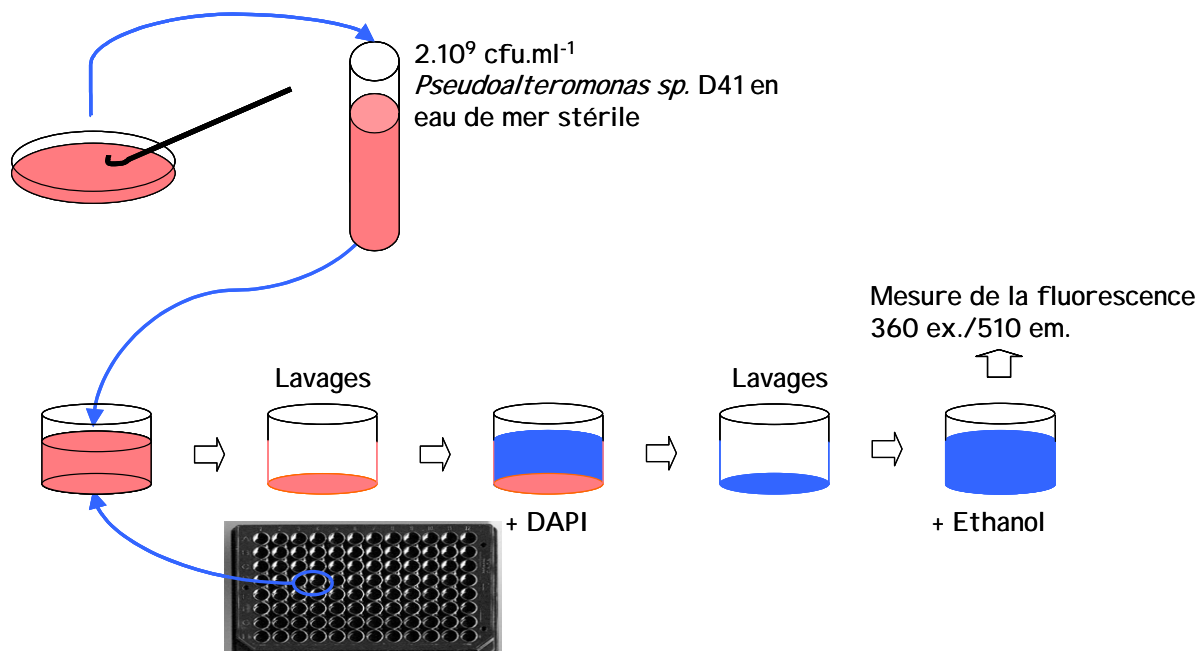
### 2.2. Conditions de culture

Pour le stockage à long terme, les bactéries sont stockées à -80°C dans du glycérol 15% (v/v) après culture liquide dans Marine Broth (MB) 2216 (Fischer Scientific Labosi, Elancourt).

En culture solide et liquide, elles sont cultivées respectivement sur marine agar (MA) et dans MB 2216 à 25°C. D41 et D01 atteignent respectivement leur phase stationnaire de croissance à partir de 9 heures et 6 heures d'incubation (Rubio, 2002).

## 2.3. Formation du biofilm en microplaque

La Figure 10 ci-dessous représente le protocole mis au point afin de former des biofilms en microplaque, révélés et quantifiés grâce au marqueur d'ADN, le Di Aminido Phenyl Indol (DAPI). Ce protocole est détaillé dans les paragraphes qui suivent.



eau de mer stérile, 20°C, agitation (300 rpm), surface de polystyrène.

Figure 10 – Représentation schématique du protocole de formation du biofilm en microplaque révélé au DAPI solubilisé dans l'éthanol.

### 2.3.1. Suspension bactérienne

Les bactéries sont récoltées sur MA après avoir été incubées une nuit à 25°C. Elles sont raclées à l'aide d'une pipette pasteur au bout arrondi dans la flamme et mises en suspension dans de l'eau de mer préalablement stérilisée par filtration sur 0,22 µm. L'absorbance à 600 nm est ajustée à 2 correspondant à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup> (Figure 11).

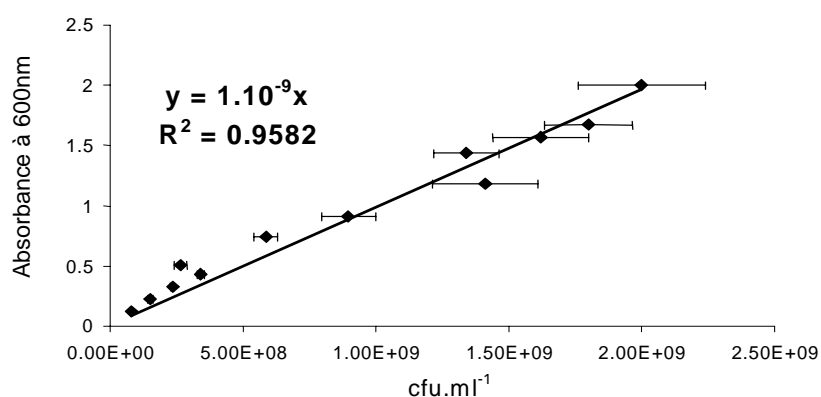


Figure 11 – Corrélation entre la concentration en cfu.ml<sup>-1</sup> et l'absorbance à 600 nm pour D41 prélevée sur MA en phase stationnaire et mise en suspension en eau NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> stérile. L'écart type représente la variation de 3 séries d'expériences.



### 2.3.2. Biofilm en microplaque

200  $\mu\text{l}$  d'eau de mer stérile est distribuée sur les 12 puits de la première rangée de microplaque et 200  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne est distribuée dans les 84 autres puits d'une microplaque 96 puits noire stérile Nunc à fond plat en polystyrène (Bioblock). La microplaque est recouverte et incubée de 45 minutes à 24 heures à 20°C sous agitation orbitale (vitesse 300 rpm). Les différents dépôts sont effectués par colonne à l'aide d'une pipette à 8 cannaux.

Les bactéries non adhérentes sont éliminées par 3 lavages successifs à l'eau contenant NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> préalablement stérilisée à l'autoclave. Les lavages sont effectués manuellement : la microplaque est renversée, 200  $\mu\text{l}$  d'eau salée NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> stérile est ajoutée par puits, la microplaque est agitée et à nouveau renversée. 200  $\mu\text{l}$  d'eau salée à 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl contenant 2,5% de formaldéhyde, préalablement stérilisé par filtration sur 0,22  $\mu\text{m}$ , sont ajoutés par puits. La microplaque est incubée au minimum 1h30 à 4°C puis, l'ADN des bactéries est coloré au DAPI (Coleman, 1980) 20 minutes à l'obscurité par ajout de 200  $\mu\text{l}$  par puits d'une solution de DAPI à 4  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  dans l'eau salée NaCl 36 g.l<sup>-1</sup>, préalablement filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ . L'excès de DAPI est éliminé par 3 lavages manuels successifs en eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl. Le DAPI complexé aux bactéries adhérentes est alors solubilisé par ajout de 200  $\mu\text{l}$  par puits d'une solution d'éthanol à 95% pendant 15 minutes sous agitation orbitale (250 rpm). La fluorescence est alors mesurée à 360 nm de longueur d'onde d'excitation et 510 nm de longueur d'onde d'émission avec le fluorimètre Genios Plus (TECAN).

### 2.3.3. Optimisation de la solubilisation de la fluorescence DAPI

La solubilisation dans l'éthanol 95% du DAPI fixé aux bactéries adhérentes en microplaque a été étudiée pendant 5 à 45 minutes sur un biofilm développé 3 et 24 heures (voir paragraphe ci-dessus pour le protocole).

Les biofilms sur lame de verre sont réalisés comme en microplaque. On utilise des lames de verre à microscopie équipées d'une chambre amovible à 4 compartiments fixée sur la lame par un joint silicone, Lab-TEK NUNC (Fisher Scientific Labosi).

Pour l'étude de solubilisation du DAPI dans l'éthanol, 900  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne D41 (paragraphe 2.3.1) sont déposés par compartiment d'une Lab-TEK et sont incubés 24 heures à 20°C sous agitation. Le biofilm suit le même protocole qu'en microplaque (paragraphe 2.3.2) : lavages trois fois à l'eau salée, formulation, coloration au DAPI 20 minutes à l'obscurité, puis addition de 900  $\mu\text{l}$  d'éthanol. L'éthanol est éliminé du puits et 900  $\mu\text{l}$  sont à nouveau rajoutés, l'éthanol est ajouté de 1 à quatre fois en tout. Les compartiments de la lame de verre sont ensuite retirés ainsi que les joints en silicone. Les lames sont séchées à l'air puis montées entre lame et lamelle et observées au microscope à épifluorescence (Olympus BH201) sous filtre UV en immersion au grossissement 100.

### 2.3.4. Quantification des bactéries marquées au DAPI

Une corrélation a été établie entre la fluorescence mesurée dans un puits de microplaque noire Nunc et le dénombrement des bactéries au microscope à épifluorescence. La solution de départ est commune, il s'agit d'une suspension bactérienne D41 en eau salée NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> contenant 2,5% de formaldéhyde stérile et marquées au DAPI.

Les bactéries sont récoltées sur MA après avoir été incubées une nuit à 25°C. Elles sont raclées à l'aide d'une pipette pasteur au bout arrondi dans la flamme et suspendues dans de l'eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> de NaCl contenant 2,5% de formaldéhyde stérile. 14 dilutions sont réalisées pour atteindre une absorbance à 600 nm comprise entre 0,05 et 0,5 dans un volume final de 4 ml. Chaque dilution est marquée au DAPI pendant 20 minutes à l'obscurité à une concentration finale de 4 µg.ml<sup>-1</sup> en eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl. Trois séries de 5 dilutions sont testées.

Une partie de la suspension (1,5 ml) est filtrée sur des filtres noirs en polycarbonate de 0,22 µm (45 mm de diamètre, Isopore GTBP Millipore, Fischer Scientific Labosi). Les filtres sont rincés à l'eau milliQ stérile et montés sur lames de verre. Juste avant observation, une goutte de produit Vectashield H1000 (AbCys, Paris) est déposée sur le filtre. C'est un milieu de préparation au montage qui permet de diminuer la perte de fluorescence liée à l'observation. Les lames sont observées sous un objectif à immersion de grossissement 100 en microscopie à épifluorescence. Le microscope est un Olympus BH201 et la fluorescence DAPI est observée sous lumière UV (filtre U, cube U-MWU, filtre d'excitation 330-385 nm, miroir dichroïque 400 nm et filtre barrière 420 nm). Approximativement 1250 bactéries sont comptées par filtre à partir de 25 champs différents.

L'autre partie de D41 en suspension (1 ml) est débarrassée de l'excès en DAPI par 3 lavages successifs à l'eau salée (36 g.l<sup>-1</sup> NaCl) formolée (2,5%) après centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Après la dernière centrifugation, le culot est repris par 500 µl d'éthanol 95%. 200 µl sont déposés dans les puits et la fluorescence est mesurée comme décrite précédemment (2.3.2).

La fluorescence mesurée dans les puits est alors reportée en fonction du nombre de bactéries totales comptées sur les lames précédentes pour le même volume d'échantillon traité.

La limite de détection est déterminée par le nombre minimum de bactéries adhérentes par puits nécessaire pour obtenir une fluorescence. Pour cela, on calcule le rapport entre le nombre de bactéries correspondant à une fluorescence nulle, calculé d'après l'équation de la droite de corrélation obtenue précédemment, et la surface de contact entre le puits et la suspension bactérienne, calculé par les Équation 1 et Équation 2, en additionnant les surfaces du fond et des bords du puits en contact avec la suspension bactérienne.

$$\text{Équation 1 : } S = \pi r^2 + 2\pi r h$$

$$\text{Équation 2 : } h = v / \pi r^2$$

S, surface ; h, hauteur ; r, rayon ; v, volume de bactéries en suspension.

### 2.3.5. Fluorescence des bactéries en suspension en microplaque

*Pseudoalteromonas sp.* D41 est incubée dans 3 puits d'une microplaque selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent 2.3.2. Après 45 minutes, 1h30, 3, 6 et 24 heures d'incubation, 100 µl du surnageant de 3 puits sont prélevés. Le reste du surnageant des puits est éliminé, les puits sont lavés, marqués au DAPI et la fluorescence des bactéries adhrées est mesurée comme décrit précédemment dans le paragraphe 2.3.2.

Les 100 µl du surnageant prélevé sont marqués au DAPI. L'excès en DAPI est éliminé par 3 lavages successifs à l'eau salée (36 g.l<sup>-1</sup> NaCl) formolée (2,5%) après centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Après la dernière centrifugation, le culot est repris par 200 µl d'éthanol 95% et la fluorescence est mesurée dans un puits de microplaque.

### 2.3.6. Autofluorescence du biofilm

L'autofluorescence du biofilm en microplaque a été mesurée sur un biofilm formé en microplaque pendant 3, 8, 24 et 48 heures. Le spectre a été réalisé entre 300 et 600 nm de longueur d'onde d'émission et entre 300 et 400 nm de longueur d'onde d'excitation par palier de 20 nm à l'aide du fluorimètre, lecteur en microplaque, Safire (TECAN) sur le biofilm solubilisé dans l'éthanol 95% et marqué ou non au DAPI. Le rapport entre l'autofluorescence, c'est-à-dire la fluorescence du biofilm non marqué au DAPI, et la fluorescence du biofilm marqué au DAPI est ensuite calculé à partir des valeurs de fluorescence mesurées au longueurs d'ondes d'excitation 360 nm et d'émission 510 nm.

### 2.3.7. Statistiques : reproductibilité de la formation du biofilm

Les études de variances du biofilm ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics Plus 5.0 (Sigma Plus). Le niveau statistique de significativité est fixé à 95% soit  $p < 0,05$ .

L'étude de variance du biofilm d'une microplaque à une autre a été étudiée sur 3 microplaques différentes incubées pendant 3 heures. La variable fixée était la fluorescence et le facteur la microplaque.

L'étude de variance du biofilm au sein d'une microplaque a été étudiée sur 7 microplaques différentes incubées de 30 minutes à 24 heures. La variable fixée était la fluorescence et le facteur, le rang ou la colonne.

Sur les graphiques est représenté l'écart type, calculé à l'aide du logiciel Microsoft Excel à partir des 84 valeurs obtenues par microplaque.



### 3. Traitements du biofilm

Les produits Mexel® ont été testés deux fois dans deux colonnes différentes au sein de la même microplaque pour une gamme de concentration étendue de  $10^5$  à  $10^{-2}$  mg.l<sup>-1</sup>, concernant les protocoles de prévention et de lavage.

Les enzymes ont été testées au moins 4 fois sur 4 microplaques différentes, dans une gamme de 6 concentrations diluées en série au demi concernant les protocoles de prévention et de lavage. Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration des enzymes en activité enzymatique par millilitre de milieu réactionnel.

#### 3.1. Plan de microplaque

On dépose par puits 200 µl de suspension bactérienne et 50 µl de produit ou d'enzyme dont l'effet sur le biofilm est à étudier, avant ou après la formation du biofilm. Lorsque l'on ne dépose pas de produit, on dépose de l'eau de mer stérile. Le volume total par puits quel que soit le protocole est de 250 µl.

Les produits Mexel®, tous sous forme liquide, sont déposés purs au départ dans les puits et sont ensuite dilués au demi dans de l'eau de mer stérile.

Ne sachant pas si nous observerons un effet ni à partir de quelle concentration il serait observable, nous avons décidé de tester les préparations enzymatiques à la plus forte concentration possible, étant donné les conditions de notre test. Les enzymes sous forme liquide sont donc déposées pures au départ. Les enzymes sous forme solide (poudre) sont reprises par de l'eau de mer à des concentrations au maximum de leur solubilisation pour les glycosidases et lipases, les protéases étant reprises pour une concentration finale à 10 UP.ml<sup>-1</sup> sauf pour subtilisine à 2,5 UP.ml<sup>-1</sup> (Tableau 7). Elles sont ensuite testées à 6 concentrations différentes (12 concentrations différentes pour certaines enzymes), successivement diluées au demi. Elles sont filtrées sur 0,22 µm en conditions stériles. Ces solutions sont alors stockées à 4°C et utilisées durant la semaine.

Tableau 7 – Concentration en mg.ml<sup>-1</sup> des solutions enzymatiques initiales solubilisées en eau de mer stérile avant d'être déposées en microplaque

Papaïne	Protéase	Subtilisine	Umamizyme	Cellulyse	Feedlyse	β-Glucanase	Glucane	Panlyse	Panlyse	Lipona	Lipase
e	e	e	e	e	e	e	x	e AG	AMY1	n	x
Amano									0		
503	287	90	252	250	250	200	500	200	200	80	250

Chaque microplaque comporte en première ligne (A) les témoins négatifs ou blancs composés uniquement d'eau de mer stérile sans bactérie et en dernière ligne (H) les témoins positifs ou contrôles composés uniquement de bactéries D41 incubées sans traitement. Le plan de la microplaque est résumé sur la Figure 12.

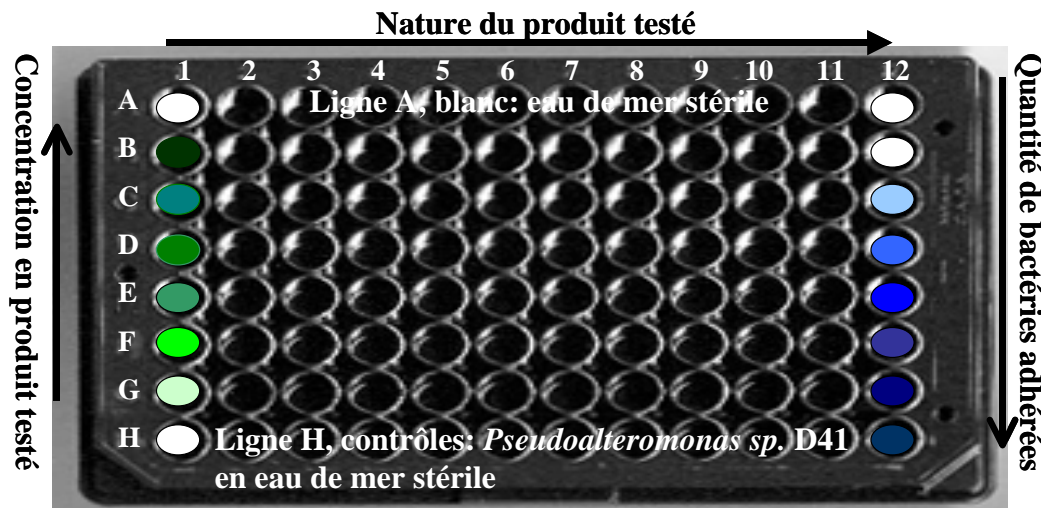


Figure 12 – Plan de microplaque en vue de tester l'effet des enzymes et des produits Mexel®.

Ai : Blancs, 50  $\mu$ l eau de mer stérile + 200  $\mu$ l eau de mer stérile

Bi : 50  $\mu$ l E<sub>1</sub> + 200  $\mu$ l suspension bactérienne à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>

Ci : 50  $\mu$ l E<sub>1</sub>/2 + 200  $\mu$ l suspension bactérienne à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>

Di : 50  $\mu$ l E<sub>1</sub>/4 + 200  $\mu$ l suspension bactérienne à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>

Ei : 50  $\mu$ l E<sub>1</sub>/8 + 200  $\mu$ l suspension bactérienne à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>

Fi : 50  $\mu$ l E<sub>1</sub>/16 + 200  $\mu$ l suspension bactérienne à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>

Gi : 50  $\mu$ l E<sub>1</sub>/32 + 200  $\mu$ l suspension bactérienne à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>

Hi : Contrôles, 50  $\mu$ l eau de mer stérile + 200  $\mu$ l suspension bactérienne à 2.10<sup>9</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>

Le pourcentage d'inhibition (PI) est alors calculé de la manière suivante (Équation 3), par colonne.

$$\text{Équation 3 : PI} = [(F_C - F_B) - (F_T - F_B)] / (F_C - F_B) \times 100$$

F<sub>C</sub>, Fluorescence du contrôle (Ligne H) ; F<sub>B</sub>, Fluorescence du blanc (Ligne A) ; F<sub>T</sub>, Fluorescence de l'échantillon traité.

Puis, les valeurs des taux d'inhibition sont reportées en fonction de la concentration dans le milieu réactionnel en produit déposé (exprimé en mg.l<sup>-1</sup> pour les produits Mexel® et en activité enzymatique par millilitre de milieu réactionnel pour les enzymes). Certaines valeurs expérimentales obtenues en présence d'enzymes ou de produits Mexel® ont été ajustées respectivement à une équation logistique à 4 paramètres (Équation 4) et à 3 paramètres (Équation 5) à l'aide du logiciel SigmaPlot 9.0 (Systat software GmbH).

$$\text{Équation 4 : } y = y_0 + a / [1 + (x/x_0)^b]$$

$$\text{Équation 5 : } y = a / [1 + (x/x_0)^b]$$

y, effet (pourcentage d'inhibition) ; y<sub>0</sub>, effet minimum (pourcentage d'inhibition minimum) ; x, concentration ; x<sub>0</sub>, IC50 (concentration pour atteindre 50% de l'effet maximum) ; a, effet maximum (pourcentage d'inhibition maximum) ; b, pente.

Concernant l'équation logistique à 3 paramètres, il s'agit de fixer le minimum d'effet atteint à 0 par rapport à une équation logistique à 4 paramètres.

### 3.2. Protocole de prévention

Le protocole de prévention consiste à déposer 50 µl de chaque produit à chaque concentration testée par puits et de pré-incuber 1 heure à température ambiante avant d'ajouter les bactéries.

Un produit est testé sur une colonne dans une gamme de concentration en utilisant des dilutions en série au demi. Un volume de 50 µl recouvre la surface du fond du puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, les bactéries sont ajoutées (200 µl par puits d'une suspension à  $2 \cdot 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>) et le biofilm est révélé au DAPI après 3 et 24 heures d'incubation, à 20°C sous agitation orbitale (300 rpm), comme décrit dans le paragraphe 2.3.2.

### 3.3. Protocole de lavage

Le protocole de lavage consiste à déposer 50 µl de chaque produit à chaque concentration testée par puits sur un biofilm pré-formé de 3 heures.

Le biofilm est formé préalablement comme décrit dans le paragraphe 2.3.2. Après 3 heures d'incubation, la microplaque est alors lavée trois fois à l'eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl stérile. 50 µl de chaque produit à chaque concentration est ajouté par puits et 50 µl d'eau de mer stérile est ajouté pour le blanc et le contrôle en colonnes A et H. Les dilutions en série au demi des produits sont réalisées préalablement juste avant le dépôt. On ajoute à nouveau 200 µl d'eau de mer stérile par puits et on laisse incuber 1 heure à 20°C sous agitation orbitale (300 rpm).

### 3.4. Protocole de conditionnement

50 µl de produit est incubé par puits à température ambiante pendant une heure, puis la microplaque est renversée et chaque puits est lavé 3 fois avec de l'eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> stérile. Les bactéries sont ensuite ajoutées (D41 à  $2 \cdot 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>) et incubées pendant 3 heures sous agitation, en eau de mer, à 20°C. La microplaque est rincée et les bactéries adhérentes quantifiées par marquage au DAPI comme décrit dans le paragraphe 2.3.2. Cette expérience est réalisée 3 fois sur 3 microplaques différentes pour la subtilisine, Mexel 432/0 et l'hypochlorite de sodium.

### 3.5. Témoins enzymatiques chauffés

Les préparations enzymatiques (aux concentrations initialement déposées et décrites dans le paragraphe 3.1) sont inactivées par chauffage à 100°C pendant 20 minutes. Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes, le surnageant est déposé dans les microplaques.

### 3.6. Toxicité des enzymes

Afin de tester la toxicité des enzymes sur les bactéries en solution (non adhérentes) dans chaque puits, 10 µl du surnageant d'un puits est prélevé dans la microplaque et déposé dans 990 µl d'eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl stérile. Trois dilutions successives au 1/100<sup>ième</sup> et 2 dilutions successives au 1/10<sup>ième</sup> sont réalisées. 100 µl des trois dernières dilutions sont étalées sur MA. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C et dénombrées 24 à 48 heures après. Le dénombrement des cfu est également effectué sur un contrôle sans traitement de la microplaque.

La toxicité des enzymes est testée à la suite du protocole de prévention d'un biofilm de 3 heures. Elle est définie par la concentration maximale observée de non toxicité (CmONT). Elle correspond à la concentration maximale en enzyme testée pour laquelle on observe une concentration en cfu.ml<sup>-1</sup> du surnageant correspondant à celle des contrôles. Autrement dit aucune cfu n'est détectée, dans les conditions de comptage décrites ci-dessus, lorsque l'on dépose l'enzyme à la concentration supérieure testée (deux fois la CmONT puisque des dilutions au demi en série sont effectuées). Cette étude est réalisée au moins trois fois pour une même enzyme.

### 3.7. Statistiques : reproductibilité des taux d'inhibitions

L'étude de variance des taux d'inhibition a été réalisée en étudiant les effets des produits industriels Mexel® 336 10 15, AG6202 et 432/0 sur les protocoles de prévention d'un biofilm de 3 et 24 heures et lors du protocole de lavage. Les produits ont été testés 2 fois au sein de la même microplaque dans 2 colonnes différentes. Les facteurs sont la concentration en produit et la colonne ; la variable est le taux d'inhibition.

Les T-test de Student ont été réalisés à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Ce test permet de comparer les moyennes entre groupes de petits nombres d'échantillons (< 30). Il s'agit de comparer les valeurs de fluorescence ou de comptage obtenues pour le contrôle (biofilm non traité) à celles obtenues avec traitement. Le T-test de Student suppose au départ que les 2 moyennes sont égales et si la valeur de p calculée est inférieure à 0,05 alors, les 2 échantillons sont statistiquement différents. Le type de T-test réalisé est bilatéral et suppose que les variances des deux plages de données sont différentes.

### 3.8. Marquage des cellules vivantes

Le biofilm traité avec les enzymes et développé en microplaque a également été révélé au chlorure de tétrazolium 5-cyano-2,3-ditoyl (CTC), marqueur de cellules vivantes. Le CTC pénètre dans la cellule bactérienne et est réduit par le système de transport d'électrons au cours de la respiration des bactéries pour donner des cristaux de formazan (CTF). Le CTF réduit est fluorescent uniquement sous forme solide, solubilisé dans l'éthanol il absorbe à 450 nm.

Le protocole de test d'efficacité des enzymes en prévention et en lavage du biofilm est le même que celui décrit dans les paragraphes précédents (3.2, 3.3). D'une manière générale,



les enzymes sont déposées avant ou après la formation du biofilm selon le protocole testé et le biofilm est marqué au CTC. Cependant, puisque le CTC marque les cellules vivantes, le biofilm est formolé après le marquage au CTC.

Après traitements et incubation en microplaque, les bactéries non adhérentes sont éliminées par 3 lavages successifs à l'eau salée NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> stérile. 200 µl d'eau salée à 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl contenant 5 mM de CTC, préalablement stérilisé par filtration sur 0,22 µm, sont ajoutés par puits. La microplaque est incubée à l'obscurité durant 2 heures. L'excès de CTC est éliminé par 3 lavages à la main successifs en eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl. 200 µl d'eau salée à 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl contenant 2,5% de formaldéhyde, préalablement stérilisé par filtration sur 0,22 µm, sont ajoutés par puits et la microplaque est incubée au minimum 1h30 à 4°C. Le CTC complexé aux bactéries adhérentes est solubilisé par ajout de 200 µl par puits d'une solution d'éthanol à 95% pendant 15 minutes sous agitation orbitale (250 rpm). L'absorbance est alors mesurée à 450 nm avec le lecteur de microplaque Genios Plus (TECAN).

## 3.9. Enzymes en mélange

### 3.9.1. Plans d'expérience

Les plans d'expériences permettent de planifier les expériences selon un protocole précis afin d'en tirer le maximum d'information. Ils sont généralement utilisés dans le but de déterminer des conditions expérimentales optimales, en faisant varier différents facteurs, pour obtenir un rendement maximum. Il existe différents types de plans d'expériences, il s'agit de choisir celui qui permet de répondre au mieux au problème que l'on se pose. Nous avons choisi d'appliquer un plan factoriel complet à 5 facteurs et 2 niveaux. Ce plan a été sélectionné car il permet d'étudier les interactions entre deux facteurs. Ils sont réalisés à l'aide du logiciel Statgraphics Plus 5.0 (Sigma Plus).

Le plan d'expérience est défini par des facteurs (les 5 enzymes), des niveaux (les concentrations auxquelles les enzymes sont utilisées) et la réponse (la fluorescence mesurée). La stratégie consiste à se placer pour chaque facteur à des niveaux déterminant le domaine expérimental. Les 2 niveaux affectés correspondent à l'absence d'enzyme et à la présence d'enzyme :

- le niveau -1 fixé à 0 (niveau le plus bas)
- le niveau +1 est fixé à la concentration nécessaire pour une inhibition ni trop forte ni trop faible pour permettre de visualiser la présence ou non d'effets synergiques et antagonistes (niveau le plus haut). Ce niveau est déterminé en fonction de chaque enzyme.
- le niveau 0 est fixé entre le niveau +1 et -1, soit dans notre cas la concentration du niveau 1 divisé par 2.

Ce plan à 5 facteurs et 2 niveaux implique 2<sup>5</sup> expériences. Certains plans d'expériences peuvent aussi être fractionnaires afin de diminuer le nombre d'expérimentations. Mais nous avons décidé de faire un plan factoriel complet à 5 facteurs et 2 niveaux car d'une part, la

méthode expérimentale mise au point permet de tester un nombre important d'essais de mélange au sein de la microplaque, et d'autre part, les résultats obtenus permettront d'obtenir une information complète sur toutes les interactions. Les essais sont réalisés en double et de manière aléatoire par rapport à leur position au sein de la microplaque. 5 points centraux seront testés, les points centraux sont placés au niveau intermédiaire entre le niveau 0.

Les résultats sont traités par le logiciel Statgraphics Plus 5.0 sous la forme d'un diagramme de Pareto. Ce diagramme représente les effets calculés pour chaque facteur et pour chaque interaction par rapport à la moyenne, permettant de visualiser et de classer les effets par ordre d'importance. Les facteurs présentant le maximum d'influence statistiquement significative sur la réponse seront déterminés. Les interactions d'ordre 2, c'est à dire interaction entre 2 enzymes, seront prises en compte alors que les interactions d'ordre supérieur à 2 sont considérées comme faisant partie du bruit de fond et servent à caractériser l'erreur expérimentale.

Les conditions du protocole sont celles utilisées pour la prévention d'un biofilm développé pendant 3 heures en microplaque. La seule différence réside dans le rapport entre le volume d'enzyme déposée et celui des bactéries qui est augmenté de 0,2 à 0,4. On dépose en tout 100  $\mu\text{l}$  d'enzymes et 150  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne ( $2 \cdot 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>). 20  $\mu\text{l}$  de chaque enzyme sont déposés par puits. Le volume d'additifs est ajusté à 100  $\mu\text{l}$  avec de l'eau de mer stérile. La microplaque est incubée 1 heure à température ambiante. On dépose ensuite 150  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne par puits (paragraphe 2.3.1) et on laisse le biofilm se former 3 heures à 20°C sous agitation orbitale. Le biofilm est ensuite lavé, marqué au DAPI et quantifié au fluorimètre comme décrit précédemment dans le paragraphe 2.3.2. Les valeurs de fluorescence mesurées sont alors traitées par le logiciel Statgraphics Plus 5.0 (Sigma Plus).

### 3.9.2. Traitement du biofilm par le mélange sélectionné

Le mélange sélectionné à partir des plans d'expériences réalisés est testé en microplaque à différentes dilutions selon le protocole de prévention d'un biofilm développé 3 heures. 25  $\mu\text{l}$  de chaque enzyme aux concentrations initiales décrites dans le Tableau 8 sont déposés dans le puits pour un volume final de 100  $\mu\text{l}$  par puits. Le mélange est ensuite dilué en série au demi. Après une heure d'incubation à température ambiante, les bactéries sont ajoutées (150  $\mu\text{l}$  par puits à  $2 \cdot 10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>) et le biofilm est révélé au DAPI après 3 heures d'incubation à 20°C comme décrit dans le paragraphe 2.3.2. Cette expérience a été réalisée 2 fois sur 2 microplaques différentes.

Tableau 8 – Concentrations initiales (en solution) et finales (dans le puits et en présence des suspensions bactériennes) en mg.ml<sup>-1</sup> ou  $\mu\text{l}$ .ml<sup>-1</sup> des solutions enzymatiques du mélange.

	Concentration initiale	Concentration finale
Subtilisine	0,8	0,08
Papaïne	48,58	4,858
$\alpha$ -amylase	800	80
Lipolase	266,4	26,64

### 3.9.3. Dénombrements

Afin de vérifier les taux d'inhibition observés par fluorimétrie, les bactéries totales et viables cultivables adhérentes pendant 3 heures en microplaque, en présence du mélange préventif enzymatique à la concentration décrite dans le Tableau 8, sont décrochées et dénombrées respectivement en microscopie à épifluorescence et sur MA.

25 µl de chaque enzyme du mélange à la concentration décrite dans le Tableau 8 est déposé par puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, les bactéries sont ajoutées (150 µl par puits à  $2.10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup>) et incubées 3 heures à 20°C sous agitation orbitale (300 rpm). Le biofilm formé est d'abord lavé 3 fois à l'eau salée stérile 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl. 250 µl d'eau salée sont ajoutés par puits et la surface est grattée à l'aide d'une spatule en acier préalablement passée à la flamme. Cette opération est répétée 4 fois en tout, on obtient 1 ml de suspension bactérienne issue du biofilm. Un contrôle est réalisé avec 100 µl d'eau de mer filtrée déposé par puits à la place des enzymes.

Afin de dénombrer les cellules viables cultivables, la suspension est successivement diluée au 1/10<sup>ième</sup> jusqu'à la concentration appropriée. 100 µl des trois dernières dilutions sont étalées sur MA. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C et dénombrées 24 à 48 heures après. Les colonies de D01 sont distinguées de celles des D41 de par leur différence de morphologie (taille et de couleur) sur MA.

Avant de compter le nombre de cellules totales, la suspension bactérienne est fixée avec du formol à une concentration finale à 2,5% et incubée au minimum 1h30 à 4°C. Le volume à filtrer est allongé pour un volume final de 2 ml en eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl formolée (2,5% formol). Afin de bien séparer les amas bactériens, du triton X-100 est ajouté à une concentration finale de 0,05% et l'échantillon est passé aux ultrasons durant 10 minutes à 47 kHz (bain à ultrasons Branson 1210). Le DAPI est alors ajouté à une concentration finale de 4 µg.ml<sup>-1</sup> et incubé pendant 20 minutes à l'obscurité. Le volume est à nouveau allongé à 12 ml avec de l'eau salée et la solution est filtrée sur filtre noir en polycarbonate. Le comptage est effectué au microscope à épifluorescence (Olympus BH20) sous lumière UV comme décrit précédemment dans le paragraphe 2.3.4.

Chaque expérience est réalisée au minimum 3 fois.

### 3.9.4. Biofilm sur verre

L'étude de l'adhésion sur lame de verre a été réalisée avec des lames de verre à microscopie équipées d'une chambre amovible à 4 compartiments fixée sur la lame par un joint silicone (Lab-TEK Nunc, Fisher Scientific Labosi).

Le mélange enzymatique sélectionné à partir des plans d'expériences réalisés est testé sur lame de verre en présence de D01 et/ou de D41 selon le protocole de prévention d'un biofilm développé 3 heures et dans les mêmes conditions de volume déposés. 90 µl de chaque enzyme du mélange à la concentration décrite dans le Tableau 8 sont déposés dans un puits et 360 µl d'eau de mer stériles sont déposés dans le puits contrôle (bactéries sans

traitement). Après une heure d'incubation à température ambiante, 540  $\mu$ l de suspension bactérienne sont déposés. Les lames sont incubées 3 heures à 20°C sous agitation orbitale et le biofilm est lavé, gratté et dénombré comme décrit dans le paragraphe 3.9.3.

Pour les suspensions bactériennes D41 et D01, les bactéries sont récoltées en phase stationnaire sur MA, elles sont ajustées pour une absorbance à 600 nm de 2 en eau de mer stérile. En ce qui concerne le biofilm mixte composé de D41 et D01, la suspension bactérienne est réalisée en mélangeant volume à volume les suspensions D01 et D41 (chacune à une absorbance de 2).

## 4. Caractérisation des EPS

### 4.1. EPS issus de fermentation

#### 4.1.1. Culture en fermenteur

La fermentation de la D41 a été réalisée par G. Raguénès au laboratoire Biotechnologie et Molécules Marines de l'Ifremer de Brest. Elle est effectuée en fermenteur de 5 litres (Discovery NBS) selon le protocole décrit en 1997 par Raguénès *et al.* *Pseudoalteromonas sp.* D41 est inoculée en phase exponentielle (10%) et cultivée en milieu MB supplémenté par 30 g.l<sup>-1</sup> de glucose durant 3 jours à 25°C. Le pH est maintenu à 7,4 et l'aération à 50 l.h<sup>-1</sup> sous agitation (350 à 450 rpm). La fermentation est stoppée par ajout d'azide de sodium à une concentration finale de 0,4 g.l<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2. Extraction

Les méthodes d'extractions sont inspirées des études décrites (Vincent *et al.*, 1994 ; Samain *et al.*, 1997). Les fractions EPS solubles sont récupérées à partir du surnageant de culture après une centrifugation de 2 heures à 20 000 g. Le surnageant est dessalé par ultrafiltration contre de l'eau milliQ sur membranes (Minisette™ cassette, Pall Corporation) de seuil de coupure 100 kDa. Le filtrat est récupéré et à nouveau ultrafiltré sur membranes au seuil de coupure 10 kDa. Les rétentats sont alors congelés et lyophilisés.

On observe autour du culot cellulaire une couche blanchâtre correspondant à la fraction EPS appelée non soluble. Afin de bien éliminer les EPS solubles et de dessaler progressivement, le culot est repris dans une solution d'eau milliQ contenant NaCl à 20 g.l<sup>-1</sup>. Après une centrifugation d'une heure à 20 000 g le culot est à nouveau repris dans une solution d'eau milliQ contenant NaCl à 10 g.l<sup>-1</sup>. Il est alors dialysé contre de l'eau milliQ avec une membrane de dialyse (Spectra/Por, Spectrum Laboratories INC.) au seuil de coupure compris entre 6 et 8 kDa. La fraction est ensuite centrifugée à 20 000 g durant 2 heures, le culot est éliminé et le surnageant, d'aspect visqueux et jaunâtre, est congelé avant d'être lyophilisé.

#### 4.1.3. Dosages colorimétriques

##### 4.1.3.1. Dosage des oses neutres

La teneur en oses neutres est déterminée par la méthode de dosage à l'orcinol sulfurique décrite par Tillmans et Philippi en 1929 et modifiée par Rimington en 1931 avec comme standard le glucose. Le polysaccharide subit une hydrolyse totale en présence d'acide sulfurique concentré à chaud. Les monosaccharides libérés forment des dérivés de furfural dont l'absorbance est mesurée à 420 nm. La mesure à cette longueur d'onde est moins

sensible qu'à 510 nm mais permet de réduire les interférences liées à la présence d'oses acides.

Le réactif à l'orcinol est constitué de 0,2 g d'orcinol dissous dans 100 ml d'une solution d'acide sulfurique concentrée à 95-97%. Ce réactif est stocké à l'abri de la lumière et à 4°C.

Dans des tubes en verre brûlé, 200 µl d'échantillon et 1 ml de réactif à l'orcinol sont incubés au bain-marie à 80°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, le mélange est incubé 45 minutes à l'obscurité et l'absorbance est mesurée à 420 nm. Une gamme étalon de 0 et 50 µg de glucose est réalisée pour chaque nouveau dosage.

#### 4.1.3.2. Dosage des oses acides

La teneur en oses acides est déterminée par la méthode de dosage de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzi et Carpita (1991) avec comme standard l'acide glucuronique. L'action de l'acide sulfurique concentré provoque l'hydrolyse de toutes les liaisons osidiques et une déshydratation des monosaccharides libérés pour donner des dérivés de furfural. Les acides uroniques réagissent avec le 3-hydroxybiphenyl pour donner une coloration rose dont l'absorbance est mesurée à 525 nm. La coloration est améliorée en présence de borate. Cependant, la réaction colorimétrique est sensible aux interférences dues aux sucres neutres qui brunissent en présence d'acide sulfurique. Cette interférence est minimisée par traitement de l'échantillon avec du sulfamate avant l'hydrolyse acide.

Pour ce dosage 3 réactifs sont nécessaires. 38,8 g d'acide sulfamique sont dissous dans 50 ml d'eau distillée pour réaliser une solution d'acide sulfamique à 4 mol.l<sup>-1</sup> dont le pH est ajusté à 1,6 par ajout de KOH 1 mol.l<sup>-1</sup> avant de compléter la solution à 100 ml de volume final. Une solution de tétraborate de sodium à 0,075 mol.l<sup>-1</sup> est préparée par dissolution de 2,86 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O dans 100 ml d'acide sulfurique à 95-97%. Une solution de meta-hydroxydiphenyl (MHDP) à 0,15% dans NaOH 0,5% est préparée par dissolution de 15 mg de MHDP dans 10 ml de solution de NaOH à 0,5%.

400 µl d'échantillon, 40 µl de réactif de sulfamate de potassium et 2,4 ml de solution sulfurique de tétraborate de sodium sont incubés au bain-marie dans des tubes en verre pyrolysé à 80°C pendant 20 minutes. Après refroidissement suivi de l'addition de 80 µl de solution MHDP, le mélange est laissé 10 minutes puis l'absorbance est mesurée à 525 nm. Une gamme étalon d'acide glucuronique de 0 et 50 µg est réalisée à chaque nouveau dosage.

#### 4.1.3.3. Dosage des protéines

La teneur en protéines est déterminée par la méthode de dosage au BCA (acide bicinchoninique) (Smith *et al.*, 1985) avec comme standard l'albumine de sérum bovin ou SAB. En milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques Cu<sup>++</sup> en ions cuivreux Cu<sup>+</sup> qui forment un complexe avec le BCA coloré en pourpre dont l'absorbance se mesure à 562 nm.

Le réactif est préparé de façon extemporanée en mélangeant 50 ml de réactif BCA et 1 ml de réactif  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 4%. 100  $\mu\text{l}$  d'échantillon sont mélangés à 2 ml de réactif dans un tube en verre brûlé. Le mélange est vortexé et placé 30 minutes au bain marie à 37°C. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 562 nm. L'étalonnage est réalisé en faisant une gamme SAB de 0 à 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### 4.1.4. Caractérisation des résidus glycosidiques

L'analyse des résidus glycosidiques est réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) sous forme de dérivés triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling *et al.* (1975) modifiée par Montreuil *et al.* (1986). Les résidus glycosidiques libérés après méthanolyse du polysaccharide sont transformés en méthylglycosides N-acétylés ou O-triméthylsilylés. Leur analyse en CPG permet de déterminer la composition en monosaccharide du polymère. L'identification d'oses neutres et d'oses acides est réalisée lors de la même injection par injection d'un étalon interne (*myo*-inositol) et par comparaison des temps de rétention relativement à cet étalon. Les standards utilisés sont le rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, acide glucuronique, acide galacturonique, galactose, glucose, N-acétyl-glucosamine ou N-acétyl-galactosamine.

L'injection des composés dérivés des résidus osidiques est réalisée sur un chromatographe HP-5890 (Hewlett-Packard) avec passeur automatique, équipé d'un injecteur en colonne, d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire apolaire en silice fondue CP-Sil-5CB (Chrompack). Le gaz vecteur est l'Hélium, la température du détecteur est de 300°C.

Toute la verrerie est préalablement portée à 400°C. A 200  $\mu\text{g}$  de standard ou 400  $\mu\text{g}$  d'échantillon et 20  $\mu\text{g}$  de *myo*-inositol sont ajoutés 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{MeOH}/\text{HCl}$  2 N. Les tubes sont fermés hermétiquement, puis incubés au bain à sec à 100°C pendant 4 heures. Après refroidissement du méthanolysat, le pH est ajusté à 6-7 à l'aide de carbonate d'argent. Les osamines éventuellement présentes sont alors N-acétylées par addition de 50  $\mu\text{l}$  d'anhydride acétique. Les échantillons sont placés à l'obscurité pendant 24 heures. Le chlorure d'argent formé est éliminé par centrifugation (3000 rpm, 10 minutes), puis le surnageant est transféré dans un tube propre et ramené à sec sous jet d'azote. Les méthylglycosides sont triméthylsilylés par ajout de 50  $\mu\text{l}$  de pyridine et de 50  $\mu\text{l}$  de silon et placés à température ambiante pendant 3 heures. Après évaporation sous jet d'azote, les méthylglycosides triméthylsilylés sont repris dans 500  $\mu\text{l}$  de dichlorométhane.

1  $\mu\text{l}$  est injecté sur la colonne à 50°C, le four reste à 50°C pendant 1 minute puis un gradient de 20°C par minute jusqu'à 120°C est appliqué, suivi d'un gradient de 2°C par minute jusqu'à 240°C et d'un dernier de 10°C par minute jusqu'à 280°C. La température est ensuite maintenue à 280°C pendant 10 minutes.

### 4.1.5. Teneur en matière inorganique

La teneur en matière inorganique des différentes fractions EPS a été effectuée par thermogravimétrie sur un appareil TGA 92. Cet appareil permet de suivre les variations de masse d'un échantillon soumis à un programme de température contrôlée.

De 2 à 4 mg d'échantillon sont déposés au départ puis la température augmente de 20°C à 700°C par gradient de 10°C par minute, stagne à 700°C pendant 8 heures et diminue jusqu'à 20°C par gradient de 99°C par minute avec des enregistrements de masse effectués toutes les 6,8 secondes. La matière inorganique correspond à ce qui ne s'est pas évaporé au cours du traitement.

### 4.1.6. Gels d'électrophorèse

L'électrophorèse permet de séparer des molécules selon leur charge par action d'un champ électrique. La technique du SDS-PAGE (électrophorèse en gel polyacrylamide avec sulfate de sodium dodécyle) permet de séparer les protéines en fonction de leur masse molaire (Laemmli, 1970). Les protéines soumises au SDS et au  $\beta$ -mercaptoéthanol sous l'action de la chaleur sont dénaturées. Les protéines étant chargées de façon homogène en présence de SDS, elles migrent et sont séparées sur le gel en fonction de leur masse molaire selon les mailles du gel qui ralentissent les grosses protéines. Par contre, ce n'est pas le cas des polysaccharides pour lesquels le SDS n'a aucune affinité. Ils vont donc garder leur charge propre et migrer en fonction de leur taille et de leur charge. Cependant, lorsqu'ils sont liés de façon covalente à des protéines dans le cas d'une glycoprotéine, ils migreront avec la protéine chargée.

L'analyse des EPS est effectuée sur gels 8% en acrylamide en conditions dénaturantes avec une révélation des protéines au bleu de Coomassie et des polysaccharides au réactif de Schiff. Le matériel utilisé est le système vertical « Mini Protean III Bio-Rad ».

30  $\mu$ l d'échantillon EPS à 5 mg.ml<sup>-1</sup> dans l'eau milliQ sont ajoutés à 10  $\mu$ l de tampon dénaturant. Ce mélange est placé 5 minutes à 100°C puis refroidi. 33  $\mu$ l d'échantillon et 10  $\mu$ l de marqueur de taille sont déposés par puits sur le gel d'alignement. La migration est effectuée à 150 V au début puis augmentée à 200 V une fois le gel d'alignement dépassé.

Deux gels identiques sont réalisés. Une fois la migration terminée, un gel est placé dans la solution de coloration au bleu de Coomassie. L'autre gel est placé dans une solution de fixation à 25% isopropanol et 10% acide acétique.

**Réactifs:** Le tampon dénaturant concentré 4 fois est préparé par mélange de 1 ml de tampon Tris HCl 0,5 mol.l<sup>-1</sup> pH 6,8, avec 1,6 ml de glycérol, 5 ml d'eau, 1,6 ml de SDS 10%, 0,4 ml de bleu de bromophénol 0,5% et 0,4 ml de  $\beta$ -mercaptoéthanol à 14,3 mol.l<sup>-1</sup>. Le tampon de migration (50 mmol.l<sup>-1</sup> en tris et 383 mmol.l<sup>-1</sup> en glycine) est préparé par mélange de 6 g de Tris et de 28,8 g de glycine dans un volume final de 1 litre, avec 10 ml de SDS à 10%.



Gels : Le gel de migration 8% en acrylamide est préparé par mélange, dans l'ordre, de 4,8 ml d'eau milliQ, 2,5 ml de tampon Tris HCl 1,5 mol.l<sup>-1</sup> pH 8,8, 2,67 ml d'acrylamide/bis-acrylamide, de 100 µl de SDS 10%, et juste avant d'être coulé 50 µl de persulfate d'ammonium (APS) à 10% et 10 µl de tétraméthyléthylènediamine (Temed). Le gel d'alignement est à 5% en acrylamide. Il est préparé par addition de 5,8 ml d'eau milliQ, 2,5 ml de tampon Tris HCl 0,5 mol.l<sup>-1</sup> pH 6,8, 1,67 ml d'acrylamide/bisacrylamide, 100 µl de SDS 10%, et juste avant d'être coulé 50 µl d'APS 10% et 10 µl de Temed.

Fixation et coloration des protéines : la fixation et la coloration au bleu de Coomassie sont effectuées dans une solution d'éthanol à 50%, d'acide acétique 10%, d'eau 40% et de bleu de Coomassie 0,25%. La décoloration est effectuée en solution d'éthanol 30%, acide acétique 10% et eau 60%.

Coloration des sucres au réactif de Schiff : le gel est placé 30 minutes dans une solution d'acide acétique à 7,5%, puis 1 heure à 4°C dans une solution d'acide périodique 0,2%, à nouveau 1 heure à 4°C dans une solution de réactif de Schiff, et enfin décoloré dans une solution d'acide acétique à 7,5%. Les bains de décoloration sont renouvelés régulièrement et les gels sont ensuite scannés et séchés pour être conservés.

#### 4.1.7. Spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par l'échantillon analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques entre deux atomes, d'identifier des groupements chimiques présents au sein de molécules.

2 mg d'EPS lyophilisés sont mélangés avec du bromure de potassium (KBr) et compactés sous forme de pastille. La pastille est analysée sur un spectrophotomètre Bruker Vector 22 avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> et sur une région de 4000 à 400 cm<sup>-1</sup>.

## 4.2. EPS du biofilm

Des suspensions bactériennes de D01 et D41 sont préparées par raclage sur MA en phase stationnaire et mises en eau de mer stérile pour atteindre une absorbance à 600 nm de 2 (paragraphe 2.3.1). 900 µl sont déposés par puits sur les lames LabTek (paragraphe 3.9.4). Les lames sont incubées à 20°C sous agitation orbitale (300 rpm) pendant 24 heures. Le biofilm formé est lavé trois fois à l'eau salée 36 g.l<sup>-1</sup> NaCl stérile. 900 µl d'eau salée NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> et contenant du formol à 2,5% sont ajoutés et la lame est incubée au minimum 1h30 à 4°C. Des lavages à salinité décroissante sont réalisés successivement (25% eau milliQ/75% eau 36g.l<sup>-1</sup> NaCl ; 50% eau milliQ/50% eau 36g.l<sup>-1</sup> NaCl ; 75% eau milliQ/25% eau 36g.l<sup>-1</sup> NaCl ; 100% eau milliQ).

Les solutions de marquage sont toutes filtrées stérilement sur filtres seringues stériles Millex à usage unique de 0,22 µm.

Pour le marquage des cellules totales au DAPI, 900 µl de DAPI à 4 µg.ml<sup>-1</sup> sont déposés dans les puits des lames et incubés à l'obscurité durant 20 minutes. Pour le marquage au

calcofluor, 900  $\mu\text{l}$  d'une solution calcofluor à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans l'eau milliQ sont incubés 1 heure à l'obscurité à température ambiante par puits. Pour le marquage à la fluorescamine, 450  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate borate  $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  à pH 9,7 sont ajoutés à 450  $\mu\text{l}$  de fluorescamine à  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans l'acétone, soit une solution de fluorescamine à  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  en concentration finale. 900  $\mu\text{l}$  sont ajoutés par puits et incubés 5 minutes à température ambiante à l'obscurité.

Les lames sont ensuite rincées trois fois à l'eau milliQ pour le marquage au calcofluor et DAPI et en solution tampon borate  $0,4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  à pH 9,7 pour le marquage à la fluorescamine. Les puits et les joints en silicone sur la lame de verre LabTek sont retirés. Les lames sont séchées à l'air puis observées, avec une lamelle, au microscope à épifluorescence (Olympus BH201) sous filtre UV au grossissement 100 en immersion.

## **Chapitre 3 – Biofilm marin en microplaque**

---



## 1. Essais et optimisation

Une méthode d'évaluation du potentiel antisalissure des enzymes a été mis au point *in vitro*. Les objectifs sont de s'approcher le plus possible des conditions naturelles de formation d'un biofilm marin et de pouvoir cribler un nombre important d'enzymes à des concentrations différentes de manière rapide et efficace. Pour cela, nous nous sommes inspirés du test développé par O'Toole *et al.* en 1999. Cette méthode repose sur la formation de biofilm en microplaque, les bactéries adhérees sont révélées par une coloration au crystal violet (CV) et quantifiées par une mesure spectrophotométrique de la densité optique à 570 nm. Cette méthode présente cependant des désavantages, peu d'études décrivent une corrélation entre l'absorbance mesurée et la quantité de cellules adhérees. Le CV est un marqueur très utilisé en microbiologie, notamment pour la coloration de Gram, mais son mécanisme d'action n'est pas clairement défini. Le CV forme un carbocation en solution aqueuse et peut réagir avec les anions intercellulaires (Davies *et al.*, 1983) en se liant à des protéines (Santhanalakshmi et Balaji, 2001). Le CV pourrait donc interagir avec les cellules du biofilm mais également avec la matrice extracellulaire. De plus, il présente le désavantage d'être un marqueur très puissant, il n'est donc pas pratique à utiliser et persiste notamment sur différents matériels.

Le marqueur Di Aminido Phenyl Indol (DAPI) est un marqueur fluorescent. La spectroscopie par fluorescence est connue pour être sensible. Le DAPI est très utilisé en microscopie à épifluorescence pour la quantification des bactéries adhérees. Son mécanisme d'action est bien connu : il se lie à l'ADN des cellules (Coleman, 1980 ; Trotta *et al.*, 1995 ; Breusegem *et al.*, 2002).

De plus, O'Toole *et al.* (1999) ont développé ce test dans le but de cribler des mutants incapables de croître en biofilm. Pour cela, les bactéries sont incubées en milieu de croissance. Afin de nous placer dans les conditions des premières étapes de l'adhésion bactérienne, nous avons choisi de ne pas incuber les bactéries en milieu de culture. Afin également de se rapprocher des conditions naturelles marines nous incubons les bactéries en eau de mer stérile. L'eau de mer est stérilisée par filtration sur 0,22 µm afin de ne pas dégrader la matière organique qu'elle contient, pouvant influencer l'adhésion bactérienne par la formation du film primaire.

La bactérie modèle utilisée est une bactérie marine du genre *Pseudoalteromonas sp.* D41 pionnière de l'adhésion de part sa présence durant les phases initiales de formation d'un biofilm marin naturel (Rubio, 2002). En effet, cette bactérie a été isolée d'un biofilm développé sur coupon de Téflon immergé 24 heures en rade de Brest. Elle a été sélectionnée pour ses fortes capacités d'adhésion, ses capacités à produire des EPS et enfin sa facilité de culture en laboratoire (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005).

Les bactéries sont incubées en eau de mer stérile, en microplaque et marquées au DAPI. Les cellules adhérees sont ensuite quantifiées par mesure de la fluorescence après solubilisation du DAPI dans l'éthanol. Afin de valider la méthode, des études de reproductibilité seront réalisées. La corrélation entre la fluorescence mesurée et la quantité

de bactéries adhérentes sera caractérisée afin de déterminer la limite de détection du test développé. De plus, l'efficacité de produits, utilisés généralement en circuits de refroidissement pour éliminer le biofilm marin (tensioactifs et hypochlorite de sodium), sera testée.

## 1.1. Quantification par fluorimétrie

### 1.1.1. Solubilisation du DAPI dans l'éthanol

Des essais réalisés sans solubiliser le marqueur dans un solvant mènent à une mesure d'absorbance hétérogène, représentant le biofilm adhérent sur le fond du puits, sans tenir compte des cellules adhérentes sur les bords (Christensen *et al.*, 1985b). L'étape de solubilisation est donc importante, différents solvants peuvent être utilisés (O'Toole *et al.*, 1999), nous avons choisi l'éthanol 95%.

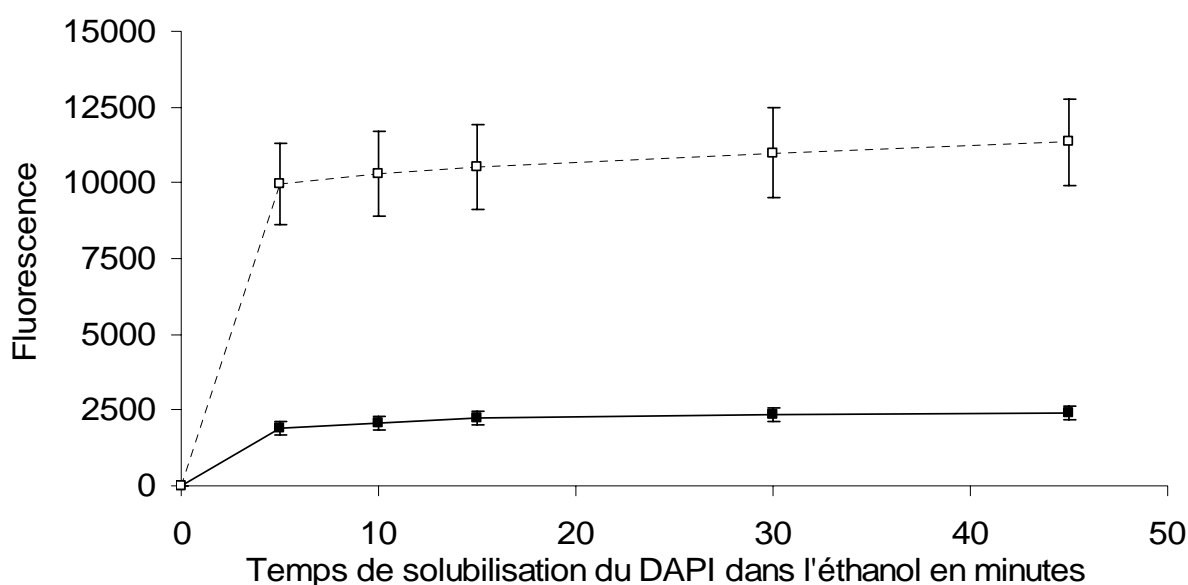


Figure 13 – Fluorescence mesurée en fonction du temps d'incubation de l'éthanol dans les puits marqués au DAPI à partir d'un biofilm développé 3h (■) et 24h (□) en microplaque. Les écarts types sont calculés à partir de 84 valeurs dans une microplaque. La Figure 13 montre la moyenne des mesures de la fluorescence de 84 puits en fonction du temps de solubilisation du DAPI dans l'éthanol. Les bactéries sont incubées 3 et 24 heures en eau de mer stérile dans les puits d'une microplaque et marquées au DAPI. L'éthanol est ajouté dans chacun des puits et les fluorescences sont mesurées après 5, 10, 15, 30 et 45 minutes de temps d'incubation. On observe qu'un plateau de fluorescence maximale est atteint dès les 5 premières minutes de temps de solubilisation, quel que soit l'âge du biofilm.

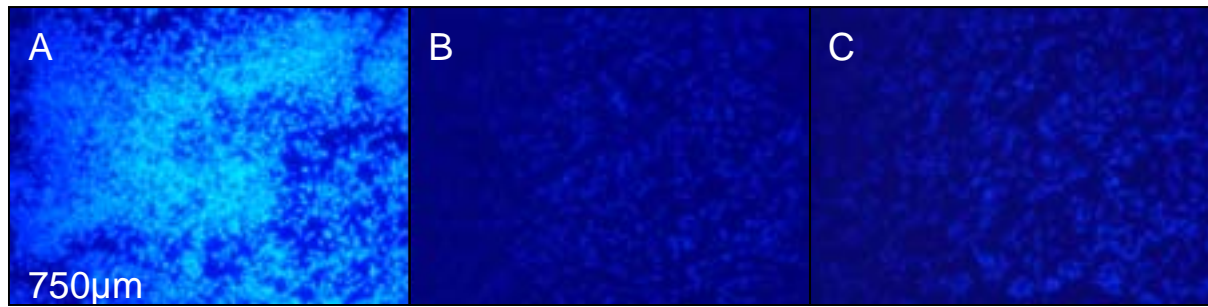


Figure 14 – Images de microscopie à épifluorescence de bactéries *Pseudoalteromonas sp.* D41 adhérentes sur une surface de verre et marquées au DAPI (A) solubilisé une fois 15 minutes dans l'éthanol (B) et 4 fois 15 minutes dans l'éthanol (C) avant observation microscopique.

*Pseudoalteromonas sp.* D41 est incubée 24 heures sur une lame de verre LabTEK et les bactéries adhérentes sont marquées au DAPI (Figure 14A). Le DAPI est ensuite solubilisé une fois 15 minutes (Figure 14B) et 4 fois 15 minutes (Figure 14C) dans l'éthanol. On peut observer en microscopie à épifluorescence que les cellules ne sont plus autant fluorescentes après solubilisation du marqueur. On observe également que la fluorescence en microscopie apparaît similaire après une, comme après quatre incubations dans l'éthanol. La majeure partie du DAPI a bien été solubilisée dans l'éthanol dès la première incubation de 15 minutes. L'analyse en microscopie à épifluorescence permet de confirmer que le DAPI est bien solubilisé dans l'éthanol.

Pour la suite de l'étude, une incubation de 15 minutes des cellules marquées au DAPI dans l'éthanol a été choisie.

### 1.1.2. Limite de détection

Afin de quantifier la biomasse adhérent dans le puits, une corrélation a été établie entre la fluorescence mesurée et le nombre de bactéries correspondant (Figure 15).

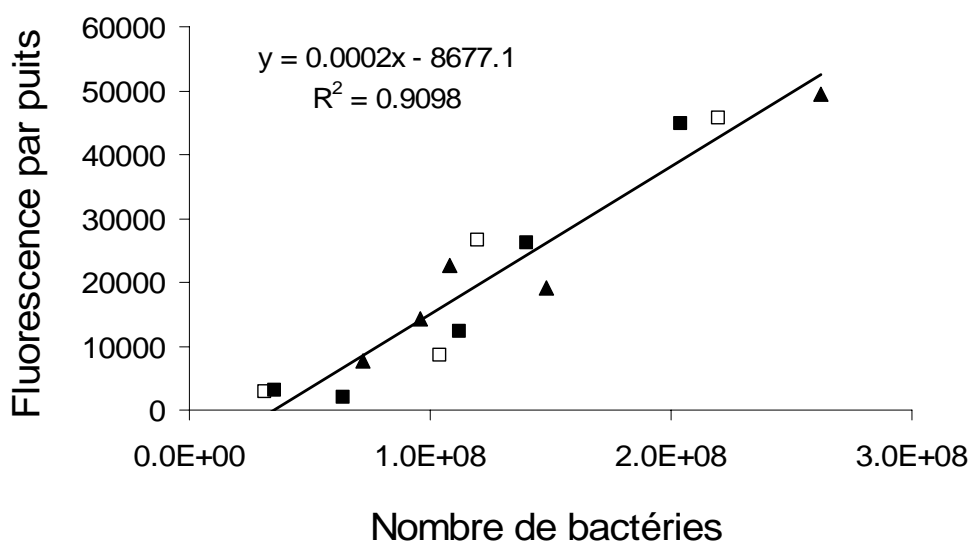


Figure 15 – Corrélation entre la mesure de la fluorescence du DAPI, solubilisé dans l'éthanol dans un puits de microplaque, et le nombre de bactéries marquées au DAPI, comptées au microscope à épifluorescence. Trois séries (□, ■, ▲) de 5 dilutions ont été réalisées.

Trois gammes de cinq concentrations en *Pseudoalteromonas sp.* D41 en suspension sont marquées au DAPI. Une partie est filtrée et comptée au microscope à épifluorescence et une autre est centrifugée, pour éliminer le DAPI non fixé, et le DAPI fixé au culot bactérien est finalement solubilisé dans l'éthanol dont la fluorescence est mesurée dans un puits de microplaque. La fluorescence mesurée par puits est reportée en fonction du nombre de bactéries énumérées en suspension. On suppose que le même nombre de bactéries adhérees et en suspension est marqué avec la même intensité de DAPI.

La Figure 15 montre une bonne corrélation entre la fluorescence mesurée par puits et le nombre de bactéries correspondant. Cette méthode permet de quantifier un biofilm marin de  $2.10^7$  à  $2.10^8$  bactéries par  $cm^2$ . Ce biofilm marin développé dans notre modèle correspond à la quantité de bactéries adhérees dans une microplaque décrite par Pitts *et al.* (2003) qui supposent que la densité de bactéries adhérees sur la surface du puits est de  $10^7$  cfu. $cm^{-2}$ . Ce biofilm marin peut apparaître jusqu'à 500 fois plus important qu'un biofilm développé en milieu marin naturel. En effet, un échantillon d'acier inoxydable immergé 10 jours en mai 1985 en eau de mer naturelle permet l'apparition d'un biofilm de  $2.10^7$  cellules. $cm^{-2}$ , et une immersion de 15 jours en janvier donne un biofilm de  $4.10^5$  cellules. $cm^{-2}$  (Féra, 1985). De même, un biofilm de  $2,6.10^3$  bactéries aérobies par  $cm^2$  a été détecté sur des échantillons d'acier inoxydables immergés 60 jours dans un circuit de refroidissement utilisant de l'eau de mer (Lutterbach et França, 1996).

La limite de détection représente  $3,75.10^7$  bactéries adhérees par puits soit, en tenant compte de la surface de contact dans le puits de la solution bactérienne ( $1,8148 cm^2$ ), une limite de détection de l'ordre de 1 bactérie pour  $5 \mu m^2$ . Les limites de détection des tests de biofilms développés en microplaque sont difficiles à trouver dans la littérature. Celle décrite par O'Toole *et al.* (1999) avec le CV est de 1 bactérie par  $\mu m^2$  et Christensen *et al.* (2000) confirment que cette méthode ne détecte que de faibles niveaux de colonisation de surface.

Cette limite de détection semble élevée. En effet, aucune fluorescence peut signifier qu'il reste encore  $3,75.10^7$  bactéries adhérees par puits. Ce test permettra donc une présélection de potentiel antisalissure et notamment de comparer l'effet des enzymes entre elles. Toutefois, il sera nécessaire de confirmer et d'approfondir le meilleur potentiel antisalissure sélectionné en microplaque par un comptage en microscopie.

D'autre part pour les besoins d'expériences ultérieures décrites dans les paragraphes 4.2.2 et 5.2.2 du chapitre 3 qui suit, des puits ont été grattés. Les bactéries ainsi détachées ont été marquées au DAPI et énumérées par comptage au microscope à épifluorescence. Les expériences ont été réalisées au minimum sur 3 puits d'une microplaque après 3 et 24 heures d'incubation de D41 en microplaque (le protocole est décrit dans le chapitre 2 paragraphe 3.9.3). On observe la présence de  $6,02.10^7 \pm 1,88.10^7$  bactéries adhérees par puits après trois heures d'incubation et de  $3,28.10^8 \pm 3,19.10^7$  après 24 heures d'incubation. Ce dénombrement se situe dans la gamme de mesure décrite ci-dessus et permet de confirmer la corrélation observée.



## 1.2. Cinétique d'adhésion

La fluorescence par puits a été mesurée en fonction du temps d'incubation des suspensions bactériennes. Une cinétique d'adhésion de *Pseudoalteromonas sp.* D41 en microplaque est ainsi obtenue (Figure 16).

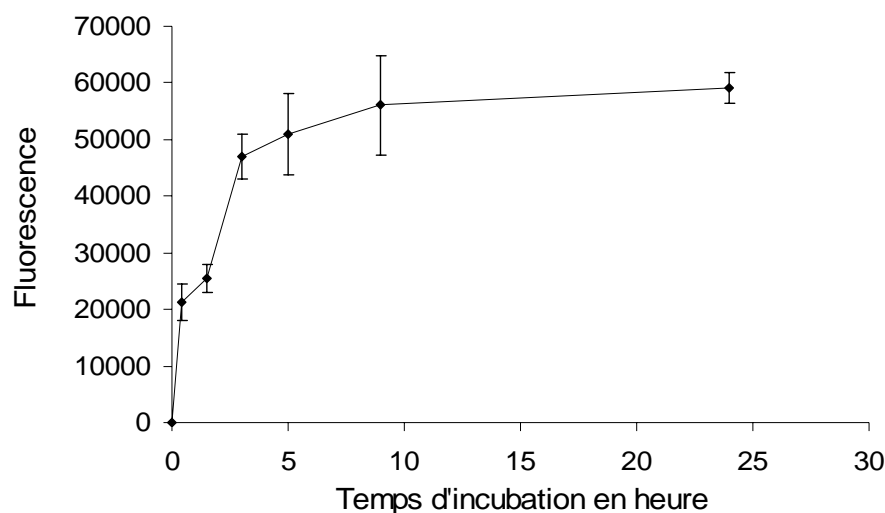


Figure 16 – Cinétique de la formation du biofilm en microplaque par mesure de la fluorescence DAPI complexé à l'ADN des cellules adhérees. Les écarts types sont calculés sur 84 valeurs au sein d'une même microplaque par temps d'incubation.

Selon le protocole, *Pseudoalteromonas sp.* D41 est prélevée sur Marine Agar (MA) en phase stationnaire et incubée en eau de mer stérile dans les puits de la microplaque, en absence de milieu nutritif contrairement à la plupart des tests décrits. Nous avons choisi de travailler en eau de mer afin de nous rapprocher des conditions naturelles de formation de biofilm marin et aussi de se placer dans les étapes initiales de l'adhésion bactérienne. On observe sur la Figure 16 une augmentation du nombre de bactéries adhérees avec le temps d'incubation en suivant une courbe de type logarithmique. Le nombre de bactéries adhérees sur la surface de polystyrène de la microplaque augmente très rapidement au début et se stabilise à partir de 3 heures de temps d'incubation pour atteindre un plateau. Cette courbe nous permet de définir 2 temps d'incubation auxquels nous observerons l'effet des enzymes sur la formation du biofilm : 3 et 24 heures correspondant respectivement à la fin de la phase exponentielle et à la phase de plateau de la cinétique d'adhésion.

Selon la quantité initiale en bactérie déposée et l'âge de la culture (phase stationnaire ou logarithmique) ainsi que la nature du milieu d'incubation (salinité, pH et température), des cinétiques d'adhésion de type linéaires ou logarithmiques peuvent être observées (Fletcher, 1977). La forme de ces courbes varie également en fonction de la nature de la surface utilisée ainsi que de celle de la bactérie, et de la présence d'appendices ou non (Dalton et March, 1998).

La bactérie modèle D41 utilisée pour le test possède une surface cellulaire globalement hydrophobe (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005) permettant d'expliquer sa forte affinité pour la surface hydrophobe du polystyrène ; et elle possède un flagelle (Rubio, 2002) lui

permettant se rapprocher de la surface (Vallet *et al.*, 2001). Ces observations permettent d'expliquer la phase exponentielle d'adhésion de *Pseudoalteromonas sp.* D41 sur le puits en polystyrène.

D'autre part, notre essai permet de former un biofilm compris entre  $3,75.10^7$  et  $3,75.10^8$  bactéries par puits ce qui représente 10 à 90% des unités formant colonies (cfu) initialement déposées par puits. La phase plateau de la courbe de cinétique d'adhésion peut s'expliquer par la diminution des bactéries en suspension.

### 1.3. Croissance du biofilm

Selon le protocole, *Pseudoalteromonas sp.* D41 est prélevée en phase stationnaire et incubée à forte densité ( $2.19^9$  cfu.ml<sup>-1</sup> ou  $4.10^8$  cfu par puits). En absence de milieu nutritif, on considère que la D41 ne croît pas au cours des 24 heures d'incubations en microplaque. Nous avons voulu vérifier cette hypothèse. Pour cela, 100 µl de surnageant est prélevé, après différents temps d'incubation en microplaque, marqué au DAPI, centrifugé, pour éliminer le DAPI non fixé, et le DAPI fixé au culot bactérien est finalement solubilisé dans 200 µl d'éthanol qui sont déposés dans un puits de microplaque et dont la fluorescence est mesurée. Le biofilm de chaque puits correspondant au surnageant prélevé est ensuite révélé au DAPI selon le protocole habituel. La fluorescence mesurée est ensuite rapportée au nombre de bactéries correspondant, grâce à la corrélation présentée sur la Figure 15.

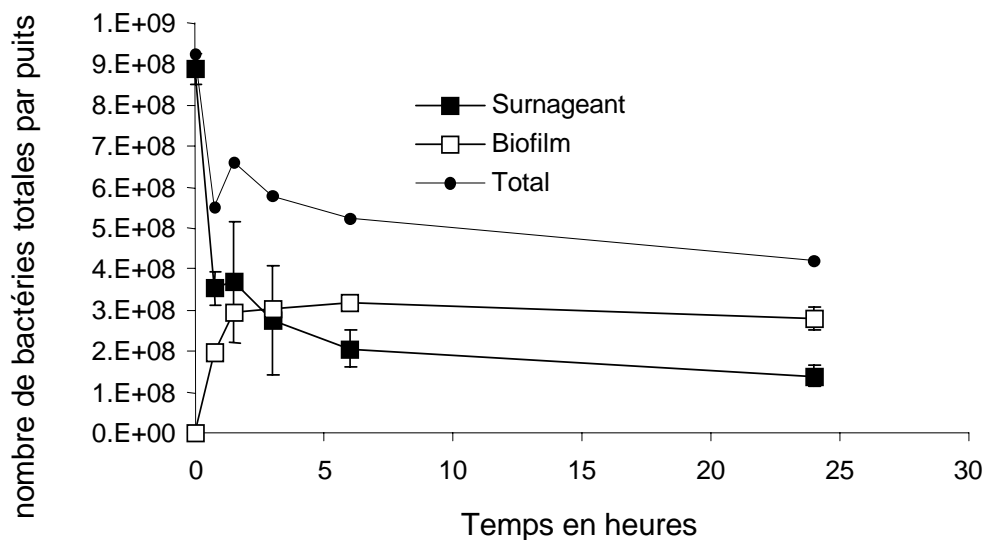


Figure 17 – Nombre de bactéries totales adhérentes et non adhérentes par puits au cours du temps. La fluorescence du biofilm et de son surnageant correspondant est mesurée, puis le nombre de bactérie correspondant est calculé à l'aide de l'équation de la corrélation effectuée paragraphe 1.1.2 (Figure 15). L'écart type est calculé sur 3 expériences réalisées sur 3 puits différents d'une même microplaque pour chaque temps d'incubation.

La Figure 17 montre que le nombre de bactéries en suspension diminue au cours du temps alors que celui des bactéries adhérentes augmente. Le nombre total des bactéries, adhérentes et non adhérentes, n'augmente pas au cours du temps. On n'observe pas de croissance de la D41 incubée en eau de mer stérile en microplaque sur 24 heures. Le test mis au point cible les premières étapes d'adhésion d'une bactérie marine.

## 1.4. Autofluorescence du biofilm

Afin de s'assurer que la mesure de la fluorescence dans les puits corresponde bien au nombre de bactéries adhérentes, nous avons vérifié que le biofilm ne présentait pas d'autofluorescence, susceptible d'interférer avec la mesure.

Pour cela, nous avons réalisé un spectre de fluorescence d'un biofilm développé en microplaque 3, 8, 24 et 48 heures, solubilisé dans l'éthanol 95% et marqué ou non au DAPI. Le rapport entre l'autofluorescence et la fluorescence du biofilm marqué au DAPI est ensuite calculé.

Après examen des courbes et calcul des rapports, on peut observer qu'après 8 heures d'incubation de la suspension bactérienne en microplaque, le rapport autofluorescence/fluorescence des bactéries marquées au DAPI, mesuré à 360 nm de longueur d'onde d'excitation et à 510 nm de longueur d'onde d'émission, reste d'environ 2,4%. Cependant, il augmente jusqu'à atteindre 8,8% à 24 heures d'incubation. L'autofluorescence du biofilm n'est pas statistiquement significatif à 90%.

Cette autofluorescence pourrait être due à des biomolécules comme les EPS ou à des débris, des particules inorganiques.

## 1.5. Reproductibilité du biofilm

Des analyses de variances ont été effectuées afin de connaître la reproductibilité de la formation du biofilm en microplaque.

Tableau 9 – Valeurs de p obtenues par analyse de variance avec comme facteurs les colonnes ou les rangées et comme variables les 84 valeurs de fluorescence mesurées au sein de chaque microplaque par temps d'incubation.

Temps de Formation du biofilm	30 min.	1h	3h	4h	6h	16h	24h
Rangée	0,5001	0,9590	0,7372	0,9259	0,0879	0,5021	0,5264
Colonne	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

L'analyse de variance a été effectuée au sein d'une microplaque, par temps d'incubation, avec comme variable les valeurs de fluorescence mesurées et comme facteurs les rangées ou les colonnes (Tableau 9). On observe que l'effet des rangées n'est pas statistiquement significatif à 95% contrairement à celui des colonnes. Après avoir effectué un test des étendues multiples permettant d'observer les variations des moyennes par colonne, on ne peut imputer cette variation à une colonne précisément. La moyenne de fluorescence par colonne varie en fonction de sa position spatiale sur la microplaque. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les dépôts de suspension bactérienne en microplaque sont effectués par colonne à l'aide d'un pipette à 8 canaux.

L'analyse de variance a également été effectuée entre 3 microplaques, incubées pendant la même durée (3h) mais pas le même jour. Cette analyse montre une faible reproductibilité d'un jour sur l'autre.

Ces données nous permettent de déterminer un plan de microplaque en vue de tester le potentiel antisalissure des enzymes. En effet, afin de pallier l'effet « jour » et l'effet

« colonne », il sera nécessaire de placer un contrôle, avec bactérie et sans enzyme, par colonne au sein de chaque microplaque, nous permettant ainsi d'analyser l'effet de traitement d'un produit par rapport au contrôle non traité au sein d'une même colonne (voir le plan de microplaque dans le paragraphe 3.1 du chapitre 2). Les résultats seront exprimés en pourcentage d'inhibition du biofilm. Nous placerons également par colonne un blanc, sans bactérie et sans produit, afin de vérifier la non contamination de notre eau de mer.

## 1.6. Conclusion

Le test mis au point présente donc l'avantage d'obtenir un biofilm marin en eau de mer et en microplaque. Il est adapté aux conditions marines, aux premières étapes de l'adhésion bactérienne ainsi qu'au criblage. Sa limite de détection a été augmentée d'un facteur 5 par rapport à la technique en microplaque qui utilise le crystal violet. Deux temps d'incubation sont choisis : 3 et 24 heures, permettant une évaluation rapide de potentiels antisalissures. Cependant la reproductibilité de la formation du biofilm n'a pas été démontrée, nous allons donc tester des produits dont les propriétés antisalissures sont connues et étudier la reproductibilité des taux d'inhibitions sur la formation du biofilm en microplaque.

## 2. Application de détergents industriels

Afin d'appliquer le test développé et d'étudier la reproductibilité des taux d'inhibitions, nous avons testé l'efficacité de produits industriels détergents utilisés en circuits de refroidissement pour lutter contre les salissures marines. Il s'agit de produits industriels de la société Mexel® tels que des alkylamines en émulsion ou en solution aqueuse (agent antisalissure ou produit de désinfection), un alkylglucoside (agent nettoyant dégraissant) ainsi que de l'hypochlorite de sodium en solution provenant de chez Sigma-aldrich.

### 2.1. Effet de détergents industriels

Les produits ont été testés sur le biofilm marin développé en microplaque selon le protocole de prévention d'un biofilm développé 3 ou 24 heures, ainsi que selon le protocole de lavage (pendant 1 heure) d'un biofilm déjà formé de 3 heures (Figure 18 et Figure 19). Ils sont testés dans une gamme de concentration de  $10^{-2}$  à  $10^5$  mg.l<sup>-1</sup> avec des dilutions au demi en série, un duplicat étant réalisé par concentration.

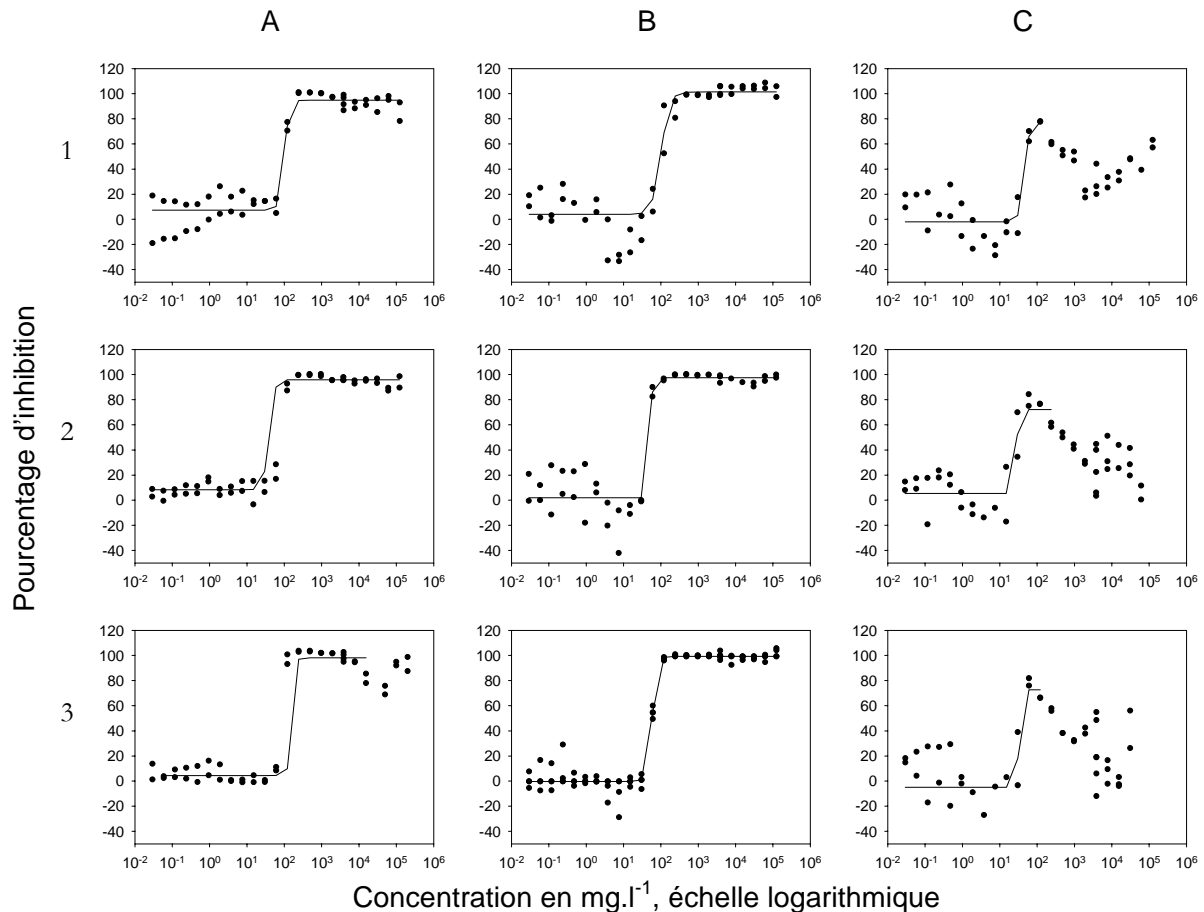


Figure 18 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en mg.l<sup>-1</sup> pour les 3 produits industriels testés (alkylamines en solution) 336 10 5 (ligne 1), 336 HO (ligne 2) et 336 02 5 (ligne 3) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C. Les courbes représentent l'ajustement des valeurs expérimentales (réalisées en duplicat) selon une équation logistique à 4 paramètres.

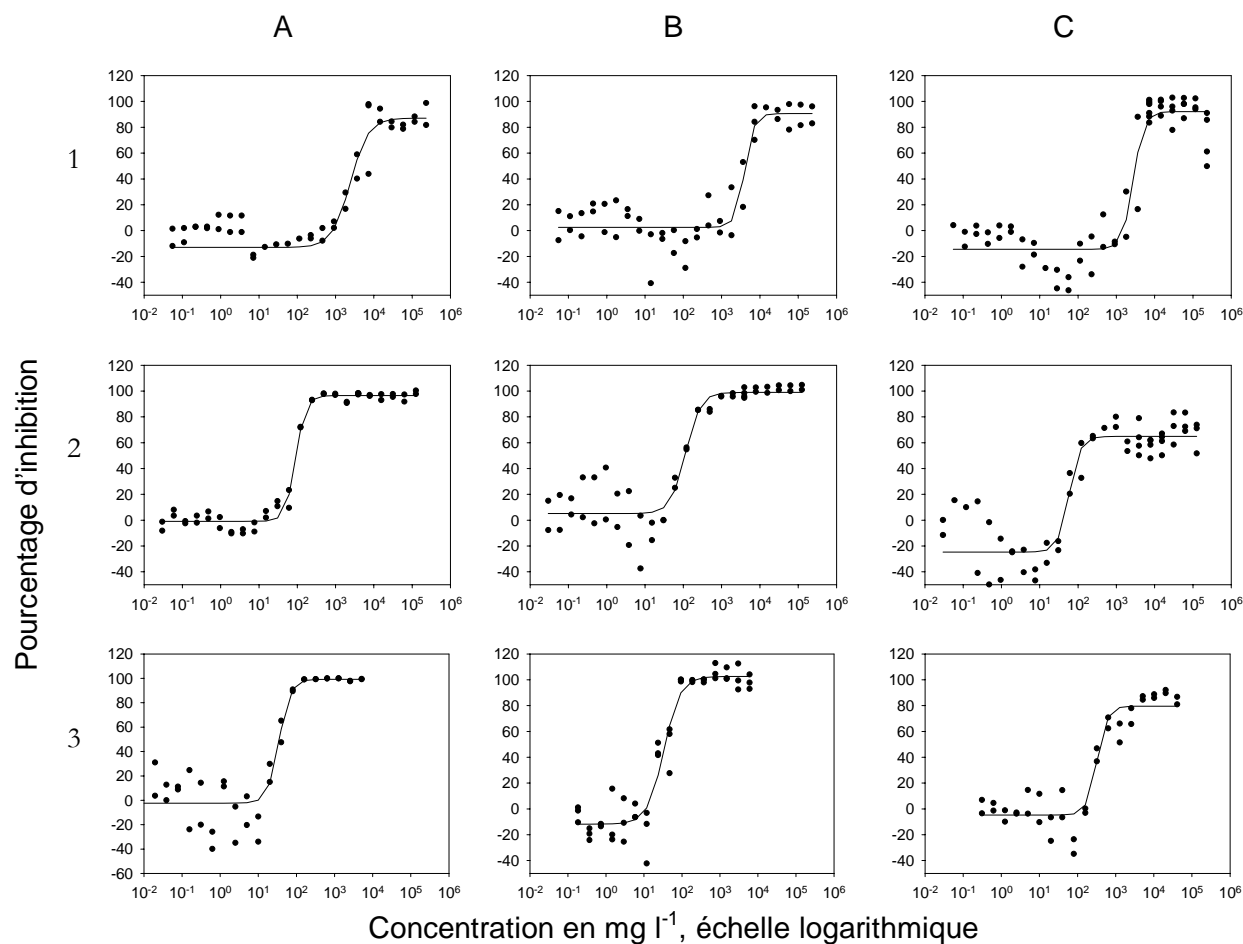


Figure 19 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en  $\text{mg.l}^{-1}$  pour les 3 produits testés l'alkylglucoside AG6202 (ligne 1), l'alkylamine en émulsion 432/0 (ligne 2) et l'hypochlorite de sodium (ligne 3) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C. Les courbes représentent l'ajustement des valeurs expérimentales (réalisées en duplicat) selon une équation logistique à 4 paramètres.

Tous les points sont représentés et ajustés selon une courbe logistique à 4 paramètres à l'aide du logiciel SigmaPlot. On observe une courbe connue sous le nom d'effet-dose ou dose-réponse, rencontrée généralement en pharmacologie et en toxicologie. On emploie le terme bioessai pour décrire tout type d'expérimentation mesurant une activité biologique quelconque en fonction de la dose administrée d'une substance. La dose exprimée en échelle logarithmique permet d'obtenir une courbe sigmoïde qui montre que jusqu'à une certaine dose aucun effet n'apparaît puis l'effet augmente avec la dose jusqu'à atteindre un effet maximum ou plateau. L'ajustement des points expérimentaux à une courbe permet de définir certains paramètres dont notamment l'IC50, correspondant à la dose à administrer pour obtenir 50% de l'effet maximum, figurant dans le Tableau 10 ci dessous.

Le calcul des IC50 nous permet de comparer l'efficacité des différents produits entre eux. Concernant les produits Mexel®, il apparaît que l'alkylglucoside (AG6202) est beaucoup moins efficace que les alkylamines (336 et 432/0). L'alkylglucoside étant un dégraissant alors que les alkylamines des agents antisalissures, le résultat est donc corrélé avec l'application industrielle des produits testés.

Tableau 10 – Valeurs des IC50 en mg.l<sup>-1</sup> calculées à partir des paramètres des équations des courbes logistiques ajustées aux points expérimentaux (p à 95% sauf pour \*).

	Prévention 3h	Prévention 24h	Lavage
336 10 5	101	100,9	46
336 HO	77,5	55,9*	28,89*
336 02 5	79,2	58,7	31,14*
AG6202	2417	3999	2748
Mexel® 432/0	90,2	114,7	59,11
HClO	20,58	33,39	190

On observe différentes IC50 selon le protocole utilisé. En prévention, l'efficacité semble prolongée jusqu'à un biofilm de 24 heures. Les IC50 semblent plus faibles en lavage qu'en prévention (d'un facteur 2) concernant les produits Mexels®. Ce résultat est en corrélation avec leur propriété de tensioactifs. En effet, ses produits agissent directement sur les membranes des bactéries et permettent ainsi d'inhiber leur adhésion sur les surfaces. On observe cependant sur les graphes que le maximum d'inhibition en lavage est plus faible qu'en prévention (de l'ordre de 60% à 80% contre 100% en prévention).

L'hypochlorite de sodium est plus actif en prévention qu'en lavage (d'un facteur 10). Contrairement aux tensioactifs Mexels® l'hypochlorite de sodium est un désinfectant. En prévention il tue les bactéries avant qu'elles n'adhèrent. Par contre en lavage, son efficacité est diminuée, il faut davantage de chlore pour éliminer les bactéries déjà adhérentes que pour prévenir de leur adhésion. Ce résultat montre que tuer des bactéries adhérentes ne suffit pas à les décrocher.

On peut donc observer différents profils d'efficacité en fonction du protocole de prévention ou de lavage, montrant ainsi l'efficacité des différents protocoles mis au point.

D'autre part, concernant les trois alkylamines en solution (336) testées selon le protocole de lavage (Figure 18), les valeurs expérimentales n'atteignent pas de plateau au maximum d'effet mais présentent plutôt une courbe en cloche, montrant une concentration optimale pour un maximum d'effet. Ce n'est pas le cas pour le 432/0 qui est également une alkylamine, mais sous forme d'émulsion aqueuse. Des problèmes de solubilité aux fortes concentrations pourraient expliquer ce phénomène, mais ces alkylamines 336 sont solubles et l'inefficacité observée aux fortes concentrations en protocole de lavage d'un biofilm formé ne s'observe pas en protocole de prévention. En lavage, au delà d'une certaine concentration, le produit fixerait les membranes et rigidifierait le biofilm, diminuant l'effet d'inhibition.

Par rapport aux doses communément employées en lavage de circuits de refroidissement, les IC50 calculées sont élevées. En effet, l'hypochlorite de sodium doit être utilisé en général à moins de 5 mg.l<sup>-1</sup> en chlore libre. Concernant les produits Mexel®, le 432/0 est utilisé à 5 mg.l<sup>-1</sup> en lavage de circuits de refroidissement, or l'IC50 correspond à 59,11 mg.l<sup>-1</sup> dans notre test de lavage. On observe donc une différence d'un facteur 4 pour l'hypochlorite de sodium à 10 pour le Mexel 432/0. Ceci peut s'expliquer par la forte densité de cellules adhérentes par puits (2.10<sup>7</sup> à 2.10<sup>8</sup> bactéries par cm<sup>2</sup>) et le faible volume de traitement (250 µl). De plus, concernant le protocole de lavage, on pourrait améliorer

l'efficacité des produits en augmentant la durée d'exposition et plus probablement en renouvelant le produit utilisé. En effet, Grant et Bott (2005) montrent notamment que l'injection régulière d'un biocide (8 fois 15 minutes en 24 heures) sur une installation pilote simulant les conditions d'un circuit de refroidissement est beaucoup plus efficace que la même quantité de biocide injecté en continu durant 24 heures.

## 2.2. Reproductibilité des taux d'inhibition

L'étude de variance des taux d'inhibition a été réalisée en étudiant les valeurs des effets des produits industriels Mexel® 336 10 15, AG6202 et 432/0 concernant les protocoles de prévention 3 et 24 heures et le protocole de lavage. Les produits ont été testés 2 fois au sein de la même microplaque dans 2 colonnes différentes et 6 dilutions sont testées par microplaque :

- la microplaque 1 correspond aux plus fortes concentrations testées dans la gamme de  $1,25 \cdot 10^5$  à  $4 \cdot 10^3$  mg.l<sup>-1</sup>,
- la microplaque 2 correspond aux concentrations testées dans la gamme de  $4 \cdot 10^3$  à  $1,2 \cdot 10^2$  mg.l<sup>-1</sup>,
- la microplaque 3 correspond aux concentrations testées dans la gamme de 60 à 2 mg.l<sup>-1</sup>,
- la microplaque 4 correspond aux plus faibles concentrations testées dans la gamme de 1 à  $3 \cdot 10^{-2}$  mg.l<sup>-1</sup>.

Nous avons étudié le caractère significatif des effets colonne et concentration par produit, par microplaque et par protocole par rapport à la réponse correspondant au taux d'inhibition. L'ensemble de l'étude est résumée dans le Tableau 11.

Tableau 11 – Caractère significatif de l'effet colonne ou de l'effet concentration par microplaque, par produit et par protocole.

Protocole	Microplaque	336 10 5		AG6202		432/0	
		Colonne	Concentration	Colonne	Concentration	Colonne	Concentration
3hPrévention	M1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	M2	NS	NS	NS	NS	NS	S
	M3	NS	NS	S	NS	NS	NS
	M4	S	S	S	S	NS	NS
24hPrévention	M1	NS	NS	S	NS	NS	NS
	M2	NS	NS	NS	NS	NS	S
	M3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	M4	S	NS	S	NS	S	NS
Lavage	M1	NS	NS	NS	S	S	NS
	M2	NS	S	NS	S	NS	NS
	M3	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	M4	NS	S	NS	NS	NS	NS

NS : effet statistiquement non significatif à 95% ; S : effet statistiquement significatif à 95%.

Etant donné que 6 dilutions sont testées par microplaque, l'étude de variance sur les réponses se situant sur le plateau d'inhibition maximum ou minimum, ne montre pas d'effet significatif de la concentration. Seule la microplaque testant les produits aux



concentrations induisant la forte pente d'inhibition montre un effet significatif de la concentration, comme pour le produit 432/0 testé en microplaque 2 selon le protocole de prévention.

On observe que l'effet colonne est non significatif dans la majorité des cas, sauf pour les concentrations faibles (microplaque 4) correspondant à un taux d'inhibition proche de 0. L'effet colonne est significatif aux faibles concentrations en produit testé dans 7 cas sur 9. En effet, on peut observer sur les graphes que les variations des taux d'inhibition sont plus élevées sur le plateau du minimum d'inhibition. Cet effet significatif des colonnes correspond à celui déjà observé sur les valeurs de fluorescence brutes du biofilm (paragraphe 1.5). Il peut s'expliquer par les dépôts de suspension bactérienne dans les puits de la microplaque réalisés par colonne avec une pipette à 8 canaux.

D'autre part, dans 2 cas sur 9 l'effet concentration est statistiquement significatif sur la microplaque testant la gamme des plus faibles concentrations, comme pour AG6202 et 336 10 5 en prévention 3 heures. Dans ce cas l'effet colonne et l'effet concentration sont confondus.

Cependant tester une large gamme de concentration avec des dilutions successivement réalisées au demi nous permet d'obtenir une courbe dose-réponse dont l'effet du produit sur le biofilm est évident. L'effet mixte colonne et concentration observé pour des faibles pourcentages d'inhibition correspond en fait à un bruit de fond qui n'empêche pas de voir l'effet du produit sur le biofilm dans sa globalité. De plus, les paramètres calculés lors du lissage des points expérimentaux avec une courbe logistique à 4 paramètres sont statistiquement significatifs à 95%.

On peut également observer la présence, aux faibles concentrations, de pourcentages d'inhibition négatifs, impliquant une augmentation du biofilm. Ces valeurs sont également liées à une forte variabilité. Par exemple, on observe, pour le produit 336HO en prévention 24 heures, à la concentration 10 mg.l<sup>-1</sup> deux pourcentages d'inhibition de 30 et -20%. En fait, la significativité des pourcentages d'inhibition observés a été étudiée par un T-test de Student permettant de comparer les valeurs de fluorescence de biofilms contrôles à celles de biofilms traités. Les résultats sont statistiquement significatifs lorsque l'on observe des pourcentages d'inhibition supérieurs à environ 40% (ou inférieurs à -40%), ce point sera détaillé dans le chapitre 4 qui suit, paragraphe 2.4. D'autre part, l'effet d'augmentation du biofilm pourrait être dû à une croissance bactérienne, utilisant le produit comme substrat nutritif, ou à une augmentation de l'adhésion des bactéries sur la surface, induite par le produit. Nous étudierons plus en détail ce point lors du criblage des enzymes.

## 2.3. Conclusion

Nous avons mis au point un test adapté au criblage en milieu marin de potentiels antisalissures de molécules, ciblé sur les premières étapes de l'adhésion bactérienne. Ce test permet une présélection rapide d'un composé efficace et, en le testant dans une large gamme de concentration, d'obtenir des paramètres caractéristiques de ce composé de type IC50. Le plan de microplaque effectué permet une bonne reproductibilité des taux

d'inhibition, meilleure que celle de la fluorescence du biofilm formé. Des potentiels préventif à court et moyen terme (3 et 24 heures) et curatif (lavage) peuvent également être caractérisés.

## **Chapitre 4 – Potentiel antisalissure des enzymes**

---



Nous avons choisi d'étudier l'effet de préparations enzymatiques commerciales sur le biofilm. Leur utilisation en prévention comme en lavage permettrait d'éliminer les molécules organiques impliquées dans la formation, la cohésion et le développement des biofilms comme le film primaire présent dans les premières étapes de l'adhésion, les molécules membranaires de type adhésines, les EPS de la matrice extracellulaire ou les molécules signal du quorum sensing (QS). Nous avons choisi de nous tourner vers l'utilisation d'enzymes commerciales qui présentent l'intérêt d'être déjà caractérisées et produites en quantité industrielles.

Les caractéristiques des différentes préparations enzymatiques commerciales que nous avons choisies d'utiliser sont répertoriées dans le Tableau 3 du chapitre 2 paragraphe 1.1.1. Les enzymes sélectionnées font partie de la famille des hydrolases et sont spécifiques de protéines, polysaccharides et lipides (Allison, 2003), molécules organiques composant les EPS au sein de biofilms divers (chapitre 1 paragraphe 1.1.4). Nous avons donc sélectionné des protéases, des glycosidases et des lipases.

Bien que la nature de la composition des EPS soit connue, aucun des composés organiques n'a encore été caractérisé au niveau de leur séquence en acide aminé concernant les protéines ou leur séquence osidique concernant les polysaccharides de biofilms marins. Les enzymes ont donc été choisies principalement en fonction de leur large spectre d'activité, des mélanges de différentes activités enzymatiques ont notamment été sélectionnés. Concernant les protéases, nous avons sélectionné différentes sous classes d'enzymes au spectre d'activité large. Une large gamme de diverses activités glycosidases représentatives de la nature des monosaccharides et des liaisons les plus rencontrées a été sélectionnée. Enfin, nous avons choisi une triacylglycérol lipase sous différentes formulations.

En plus de ces critères de sélection, nous avons aussi pris en compte les différentes études bibliographiques sur les traitements enzymatiques déjà publiés concernant les biofilms en milieux industriels et ceux associés à des bactéries pathogènes (chapitre 1 paragraphe 1.3.4). Le choix s'est également orienté sur des préparations enzymatiques commerciales disponibles à moindre coût pour les expérimentations, certaines enzymes nous ayant été données par les fournisseurs.

En tout, nous allons tester le potentiel antisalissures de 5 protéases, 15 glycosidases et 3 lipases sur le modèle d'adhésion bactérienne en microplaque mis au point précédemment.

## 1. Caractérisation des activités enzymatiques

Afin de pouvoir comparer les effets des enzymes sur le biofilm, il est nécessaire de quantifier les activités enzymatiques selon un protocole identique. Nous avons choisi de les caractériser en eau de mer (pH 8,15, salinité 36 g.l<sup>-1</sup>) à 25°C afin de connaître leur activité dans les conditions les plus proches de leur application future en tant qu'agent antisalissures marines. Le principe repose sur des dosages colorimétriques de l'apparition du produit de réaction au cours du temps, permettant de mesurer une vitesse initiale. Différentes vitesses initiales seront calculées en fonction de la concentration en enzyme

permettant ainsi de caractériser l'activité spécifique de chaque enzyme, exprimée en unité enzymatique (une unité correspondant à l'apparition d'une unité de produit par minute) par g ou ml de préparation enzymatique selon que la préparation est sous forme solide (poudre) ou liquide.

## 1.1. Activité protéase

Nous avons choisi de caractériser les activités protéases par le test à l'azocaséine (Tomarelli *et al.*, 1949). Par exemple, pour la Savinase, la Figure 20 représente les cinétiques enzymatiques mesurant l'apparition des peptides au cours du temps.

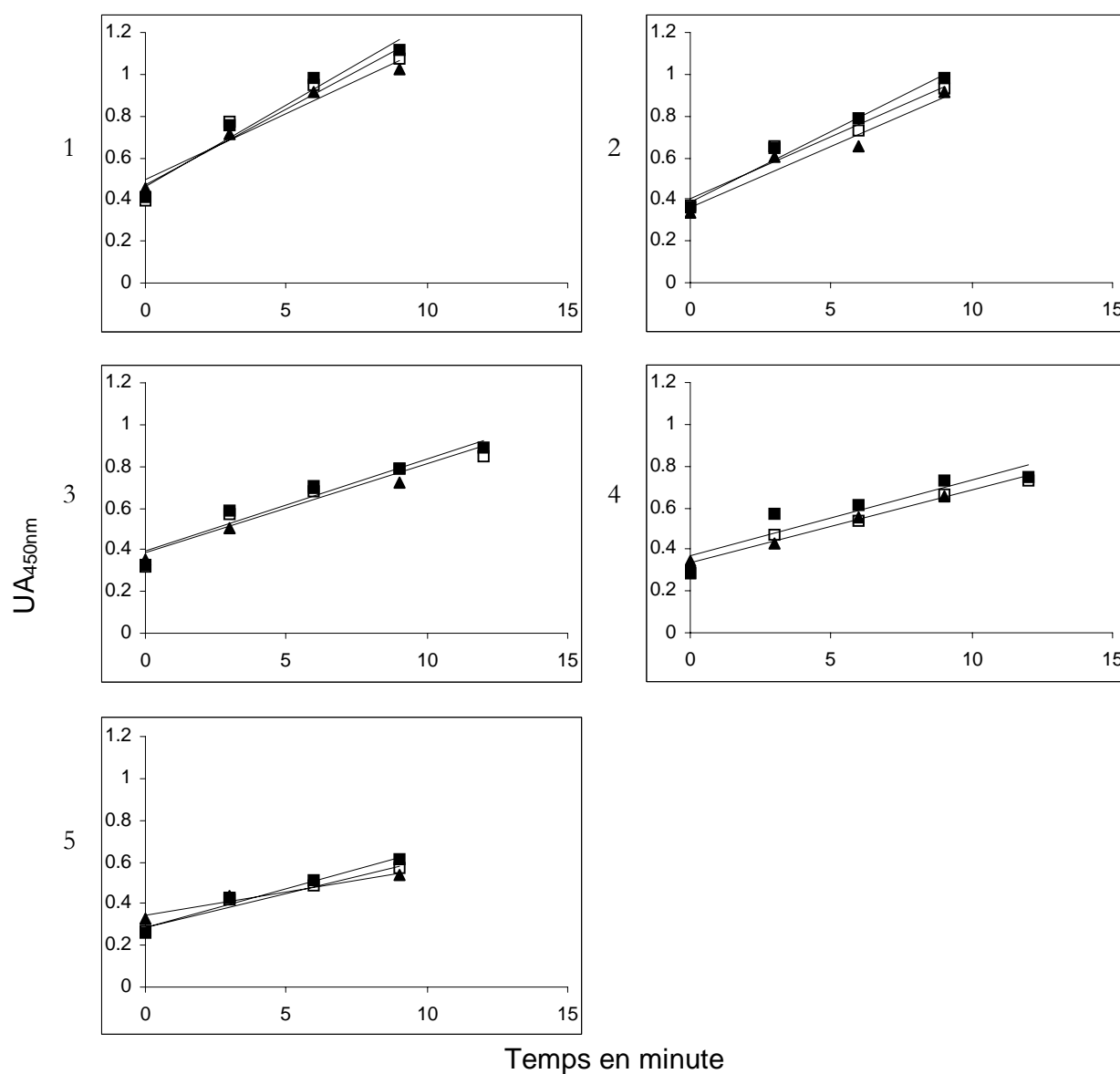


Figure 20 – Cinétique enzymatique mesurant l'apparition du produit en UA<sub>450nm</sub> par unité de temps (minutes) en présence de Savinase concentrée à 20 µl.ml<sup>-1</sup> (1), 10 µl.ml<sup>-1</sup> (2), 5 µl.ml<sup>-1</sup> (3), 2,5 µl.ml<sup>-1</sup> (4) et 1,25 µl.ml<sup>-1</sup> (5) par le test à l'azocaséine (1,25%) à 25°C pH 8,15. Trois séries sont effectuées.

Les pentes de chaque droite correspondant aux vitesses initiales sont exprimées en unité d'absorbance (UA) par minute, correspondant à l'unité d'activité protéase ou UP. Elles sont répertoriées dans le Tableau 12.

Tableau 12 – Vitesses initiales en  $UA_{450nm} \cdot \text{min}^{-1}$  ou UP correspondant aux pentes des droites figurant sur la Figure 20.

Concentration en Savinase en $\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$	Série	Vitesses initiales en $UA_{450nm} \cdot \text{min}^{-1}$ ou UP	Coefficient de corrélation ( $R^2$ )
20	1	0,0733	0,9357
	2	0,0784	0,9626
	3	0,0635	0,9668
10	1	0,0592	0,9563
	2	0,0674	0,9825
	3	0,0595	0,9430
5	1	0,0425	0,9308
	2	0,0441	0,9381
	3	0,0448	0,9310
2,5	1	0,0356	0,9675
	2	0,0362	0,8476
	3	0,035	0,9957
1,25	1	0,0329	0,9685
	2	0,0375	0,9767
	3	0,0225	0,9643

Si l'on reporte ces vitesses initiales en fonction des concentrations en enzyme, on obtient l'activité spécifique de l'enzyme, correspondant aux pentes des droites figurant sur la Figure 21. L'activité spécifique de chaque enzyme est l'activité protéase (UP) par g ou ml de préparation enzymatique.

Toutes les activités spécifiques des protéases ainsi mesurées et calculées sont répertoriées dans le Tableau 13.

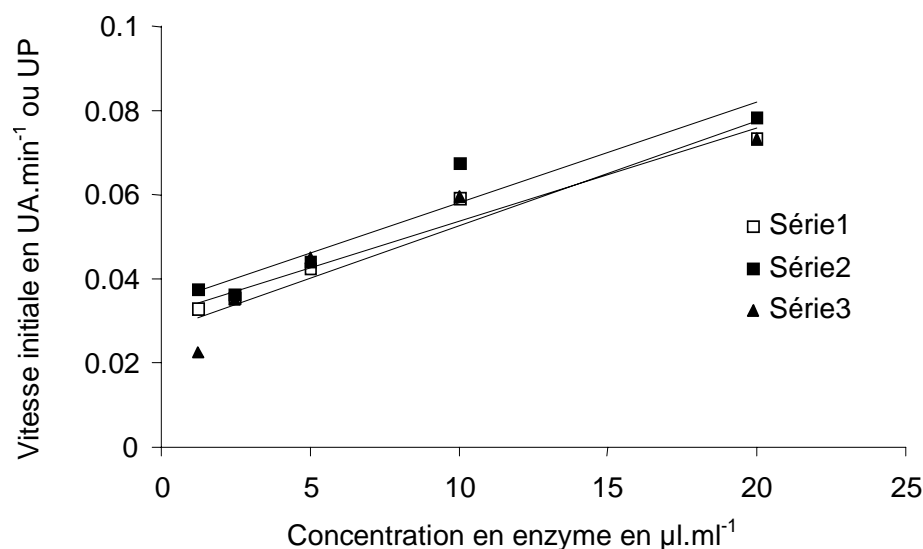


Figure 21 – Vitesses initiales ou UP des trois séries de la réaction enzymatique de la Savinase en présence d'azocaséine en fonction de la concentration en enzyme ( $\mu\text{l.ml}^{-1}$ ).

Tableau 13 – Activités spécifiques (AS) des préparations industrielles protéases calculées après mesures par le test à l'azocaséine (1,25%) à 25°C et pH 8,15 exprimées en unité protéase (UP) par g ou ml de préparation enzymatique. L'écart type est calculé sur les 3 AS obtenues à partir des 3 séries effectuées.

	Activité Spécifique en $\text{UP.g}^{-1}$ ou $\text{UP.ml}^{-1}$
Protéase Amano	$34,84 \pm 2,01$
Umamizyme	$39,56 \pm 1,77$
Savinase	$11,11 \pm 1,01$
Papaïne	$19,86 \pm 1,27$
Subtilisine	$27,61 \pm 1,27$
Glucanex	$0,45 \pm 0,07$

## 1.2. Activité glycosidase

Le principe de caractérisation des activités glycosidases est le même que précédemment. Nous allons mesurer les cinétiques enzymatiques en dosant l'apparition du produit de la réaction au cours du temps en fonction de différentes concentrations en enzyme. Le clivage de polysaccharides conduit à l'apparition d'oses aux extrémités réductrices, dont le dosage permettra de suivre les vitesses initiales.

La méthode de dosage choisie est celle de Nelson et Somogyi (Somogyi, 1960) dont la sensibilité s'est révélée la plus adaptée aux préparations enzymatiques commerciales. En effet, le dosage de Park (Park et Johnson, 1949), plus sensible, montre une forte interaction avec les préparations enzymatiques, probablement dûe à la présence d'additifs comme le glycérol. Celui de Kidby et Davidson (1973) ne s'est pas révélé suffisamment sensible.

Contrairement aux protéases, nous devons mesurer différentes activités enzymatiques : cellulase, xylanase, glucanase, amylase et pectinase. Nous allons donc utiliser par activité enzymatique le substrat adapté : la cellulose, le xylane, le  $\beta$ -glucane, l'amidon et la pectine. Les activités sont exprimées en unité cellulase (UC), unité xylanase (UX), unité glucanase



(UG), unité amylase (UA) et unité pectinase (UPe), une unité correspondant à l'apparition d'une  $\mu\text{mole}$  équivalent glucose par minute. Les substrats sont utilisés en concentration saturante ( $2 \text{ g.l}^{-1}$ ) et les réactions enzymatiques sont effectuées à pH 8,15 et à  $25^\circ\text{C}$ .

Le principe de calcul des activités glycosidases étant le même que pour celui des protéases tous les résultats expérimentaux obtenus ne seront pas détaillés. Les activités spécifiques sont répertoriées dans le Tableau 14.

Tableau 14 – Activités spécifiques (AS) des préparations industrielles glycosidases à  $25^\circ\text{C}$  et pH 8,15 exprimées en unité par g ou ml de préparation enzymatique. UC (unité cellulase), UX (unité xylanase), UG (unité glucanase), UA (unité amylase) et UPe (unité pectinase). L'écart type est calculé sur les 3 AS obtenues à partir des 3 séries effectuées.

	UC.g <sup>-1</sup> ou UC.ml <sup>-1</sup>	UX.g <sup>-1</sup> ou UX.ml <sup>-1</sup>	UG.g <sup>-1</sup> ou UG.ml <sup>-1</sup>	UA.g <sup>-1</sup> ou UA.ml <sup>-1</sup>	UPe.g <sup>-1</sup> ou UPe.ml <sup>-1</sup>
Cellulyve	5,40 ± 0,16		12,81 ± 1,05		
Celluclast	0,85 ± 0,04				
β-Glucanase			2,56 ± 0,15		
Glucanex	1,58 ± 0,08		2,56 ± 0,18		
Finizyme	0,31 ± 0,03		0,47 ± 0,02		
Ultraflo	0,85 ± 0,08	4,36 ± 0,36	3,81 ± 0,03		
Viscozyme		21,71 ± 2,05	4,47 ± 0,33		
Pulpzyme		11,41 ± 1,08			
Shearzyme		11,26 ± 0,28			
Feedlyve		176,1 ± 12,6			
Panlyve AG				26,52 ± 1,49	
Panlyve AMY10				79,98 ± 1,38	
α-Amylase				326 ± 55	
Pectinex					12,05 ± 3,07
Pectinase					45,37 ± 9,83

### 1.3. Activités estérase et lipase

Le principe du dosage des activités spécifiques estérase et lipase reste identique aux précédents. On utilise cette fois un substrat lié à un groupement paranitrophényl. L'hydrolyse du substrat libère le paranitrophénolate de couleur jaune, dont l'absorbance est mesurée à 400 nm. Pour caractériser les activités estérase et lipase on utilise respectivement le p-nitrophényl butyrate ( $C_{4:0}$ ) et le p-nitrophényl palmitate ( $C_{16:0}$ ) comme substrats (Kilcawley *et al.*, 2002). Les activités spécifiques sont répertoriées dans le Tableau 15. Les

activités sont plus élevées que celles obtenues précédemment pour les glycosidases et les protéases d'environ un facteur  $10^3$  du fait de la sensibilité de la méthode de caractérisation utilisée. Une unité estérase (UE) ou lipase (UL) correspond à l'apparition d'une  $UA_{400nm}$  par minute.

Tableau 15 – Activités spécifiques (AS) des préparations industrielles lipases à 25°C, pH 8,15 exprimées en UE (unité estérase) et UL (unité lipase) par g ou ml de préparation enzymatique. L'écart type est calculé sur les 3 AS obtenues à partir des 3 séries effectuées.

	UE.g <sup>-1</sup> ou UE.ml <sup>-1</sup>	UL.g <sup>-1</sup> ou UL.ml <sup>-1</sup>
Liponan	5467 ± 396	423 ± 17
Lipex	5911 ± 479	2866 ± 50
Lipolase	4527 ± 666	1907 ± 124

## 1.4. Conclusion

Nous avons donc caractérisé l'activité de chacune des préparations enzymatiques. Ces valeurs nous permettront de comparer l'intensité de leur effet sur le biofilm.

On observe, pour l'ensemble des caractérisations enzymatiques, des coefficients de variation (rapport de l'écart type sur l'activité spécifique mesurée) différents s'élevant de 0,8% jusqu'à 25% :

- 12 enzymes présentent un coefficient de variation inférieur à 5%,
- 16 enzymes présentent un coefficient de variation compris entre 5 et 10%,
- 3 enzymes présentent un coefficient de variation proche de 15%,
- 2 enzymes présentent un coefficient de variation compris entre 20 et 25%. Il s'agit des pectinases.

La présence de forts coefficients de variation peut s'expliquer par le faible niveau d'activité à mesurer. Cette observation peut être liée au fait que la caractérisation des activités spécifiques a été effectuée dans des conditions de température et de pH qui n'étaient pas optimales, mais aussi à des problèmes de solubilisation de substrat ou de l'enzyme en milieu salé. En effet, dans le but d'établir le potentiel antialissure des enzymes, il nous a paru important de caractériser l'activité des préparations enzymatiques dans les conditions le plus proches de leur future application : l'eau de mer.

De même, nous avons voulu garder, pour le dosage des activités glycosidases, un protocole commun de caractérisation, pas forcément le mieux adapté pour les activités pectinases notamment.

De plus, il s'est avéré difficile de caractériser des activités enzymatiques secondaires, on peut notamment observer un coefficient de variation de 15% concernant l'activité protéase de Glucanex.

Cependant, l'avantage de caractériser les activités enzymatiques en eau de mer est d'effectuer une première sélection. Les enzymes ne présentant pas d'activité dans ces conditions ne seraient pas adaptées à une application en milieu marin.

## 2. Criblage des enzymes

Les préparations enzymatiques ont été testées au moins 4 fois sur 4 microplaques différentes.

### 2.1. Protéases

De la même manière que pour les produits industriels et l'hypochlorite de sodium (chapitre 3, paragraphe 1), l'effet des protéases a été testé sur le biofilm développé en microplaque, selon les protocoles de prévention (enzyme incubée une heure avant la solution bactérienne et biofilm développé 3 ou 24 heures) et de lavage (enzyme incubée une heure sur un biofilm formé de 3 heures). Les résultats comportant tous les points expérimentaux sont présentés sur la Figure 22 donnant les pourcentages d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en unités protéases par millilitre de milieu réactionnel ( $\text{UP}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) des quatre protéases testées.

On observe que la Savinase semble la plus intéressante. En effet, pour les 3 protocoles un plateau d'inhibition maximum proche des 100% d'inhibition est rapidement atteint. De plus les valeurs obtenues sont très reproductibles. Il en est de même pour la papaïne concernant la prévention d'un biofilm de 3 heures, mais à des concentrations en  $\text{UP}\cdot\text{ml}^{-1}$  plus élevées que pour la Savinase. Son effet est diminué sur 24 heures et davantage encore en lavage. D'autre part, la protéase Amano présente une inhibition partielle en prévention sur un biofilm de 3 heures, mais sur 24 heures montre un effet contraire menant à une augmentation du biofilm. De plus les valeurs expérimentales obtenues présentent une grande variabilité, notamment aux faibles pourcentages d'inhibition. On peut également observer ce phénomène avec Umamizyme et papaïne, notamment en lavage.

Contrairement aux résultats obtenus avec les produits industriels, les valeurs expérimentales observées avec les enzymes ne peuvent pas être ajustées à une courbe logistique à 4 paramètres. En effet, les variations entre les valeurs sont parfois trop élevées et il est difficile, pour la plupart des enzymes, d'atteindre le plateau d'inhibition maximale aux plus fortes concentrations d'enzymes que l'on peut tester. Cependant, afin d'analyser au mieux ces résultats, il est possible d'effectuer une transformation log-log des valeurs expérimentales. On obtient alors une droite dont l'équation permet d'établir la concentration en enzyme nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition, notée C50. Ces valeurs, en plus des graphiques, nous permettront de mieux comparer l'efficacité de chaque enzyme sur le biofilm et en fonction des différents protocoles testés. La Figure 23 montre l'exemple de la Savinase. Ces concentrations sont répertoriées dans le Tableau 16 pour toutes les protéases.

Cependant, les valeurs expérimentales obtenues avec la Savinase peuvent être ajustées selon une courbe logistique à 3 paramètres (Figure 24), correspondant aux courbes logistiques à 4 paramètres dont le pourcentage d'inhibition minimal est fixé à 0. On observe donc que le mécanisme d'action de la Savinase semble proche de celui des produits industriels testés précédemment, de type dose-réponse. On peut alors calculer les IC50 (concentration pour

atteindre 50% de l'effet maximum) de la Savinase. Sachant que son activité maximale est proche des 100% et son activité minimale est fixée à 0, l'IC50 correspond à un pourcentage d'inhibition proche de 50% permettant donc de la comparer avec la C50. On observe des C50 et IC50 du même ordre avec une légère différence en prévention 24 heures (Tableau 16). On observe une efficacité équivalente pour la Savinase en prévention 3 heures comme en lavage. De plus, son efficacité est doublée en prévention entre 3 et 24 heures de formation du biofilm, contrairement à toutes les autres protéases criblées.

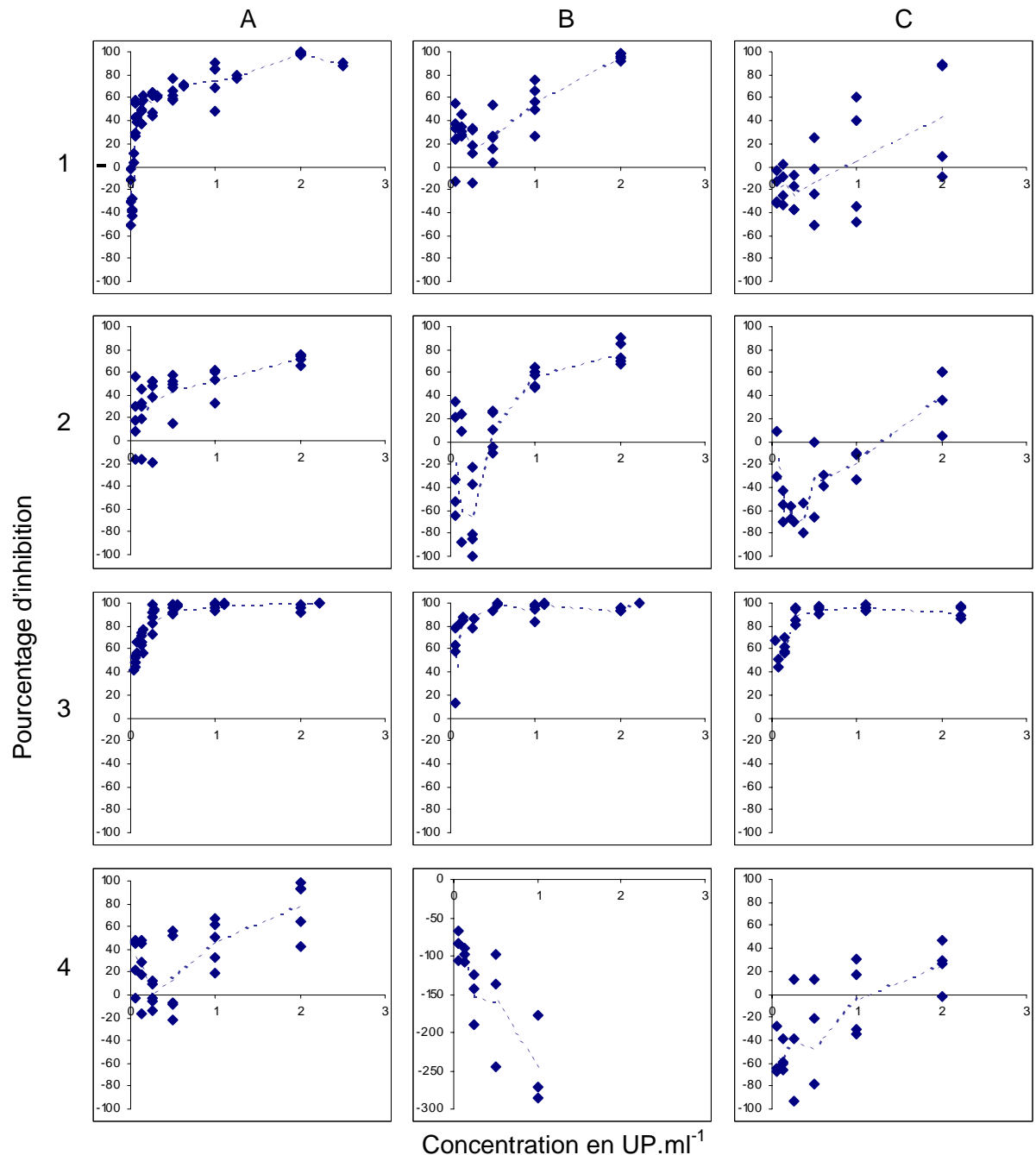


Figure 22 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration ( $\text{UP}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) dans le puits pour les 4 protéases testées papaine (ligne 1), Umamizyme (ligne 2), Savinase (ligne 3) et protéase Amano (ligne 4) selon les 3 protocoles d'essais : prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.

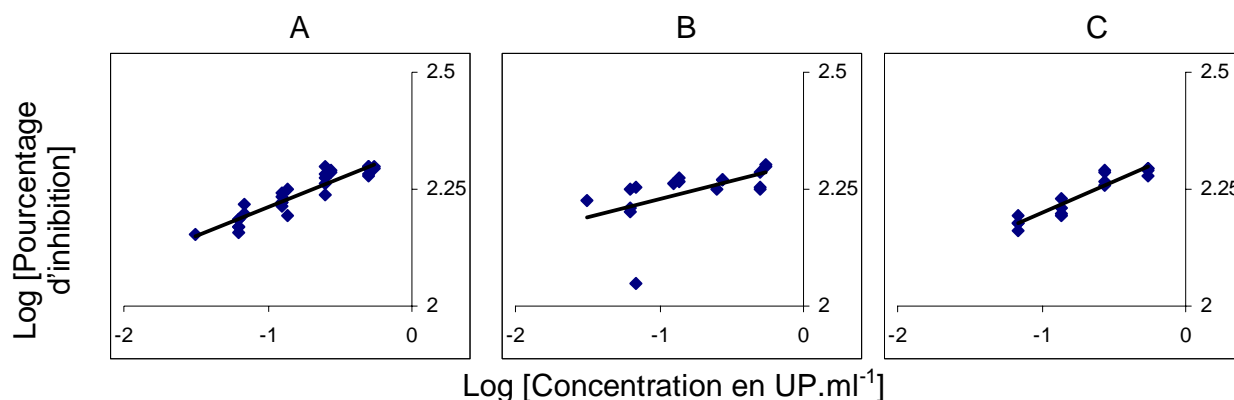


Figure 23 – Logarithme du pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction du logarithme de la concentration ( $\text{UP.ml}^{-1}$ ) dans le puits en Savinase selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.

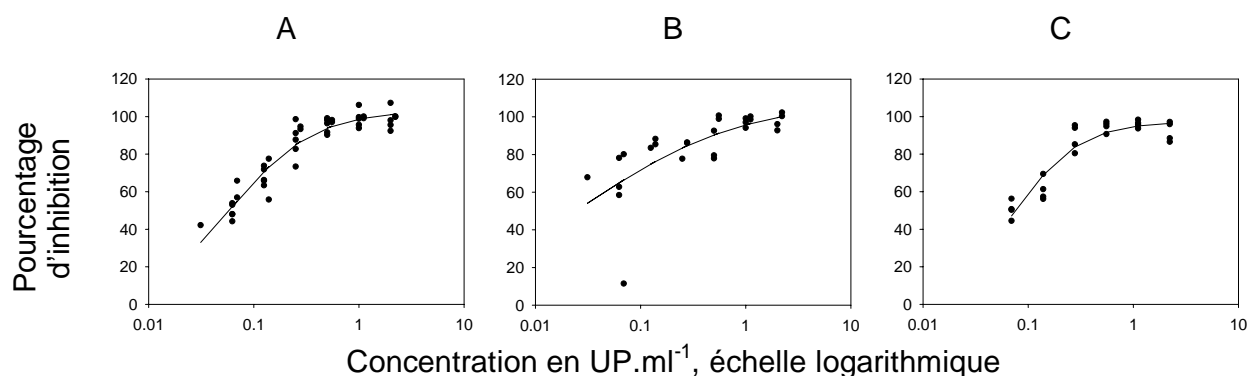


Figure 24 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration ( $\text{UP.ml}^{-1}$ ) dans le puits en Savinase selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C. Les courbes représentent l'ajustement des valeurs expérimentales selon une équation logistique à 3 paramètres.

Tableau 16 – Concentrations  $\text{C}_{50}$  d'enzyme en  $\text{UP.ml}^{-1}$  de milieu réactionnel dans le puits pour obtenir une inhibition du biofilm de 50%, calculées à partir de la réduction logarithmique des valeurs expérimentales.

	Prévention 3h	Prévention 24h	Lavage
Papaïne	0,1764	0,83	3,67
Umamizyme	0,7291	1,366	2,1
Savinase	0,0515	0,019	0,0687
Savinase*	0,0617	0,0314	0,0728
Protéase Amano	1,17	NC	3,66
Subtilisine*	0,0092	0,0007	0,0581

\*  $\text{IC}_{50}$  calculée à partir des paramètres des équations des courbes logistiques à 3 paramètres ajustées aux points expérimentaux de la Savinase (Figure 24) et de la subtilisine (Figure 25) ( $p < 0,05$ ). NC : non calculable

La Savinase est composée de subtilisine. Son efficacité étant importante, nous avons testé la subtilisine pure directement. Les résultats sont représentés sur la Figure 25. Si l'on compare les valeurs des  $\text{IC}_{50}$  calculées à partir des équations des courbes logistiques à 3 paramètres (Tableau 16), on observe que la subtilisine est 6,7 et 45 fois plus efficace que la Savinase en

prévention sur un biofilm de 3 et 24 heures respectivement. En lavage les IC50 sont comparables. La subtilisine est 13 fois plus active en prévention du biofilm de 24 heures que de 3 heures. De même, elle apparaît 100 fois plus active en prévention 24 heures qu'en lavage.

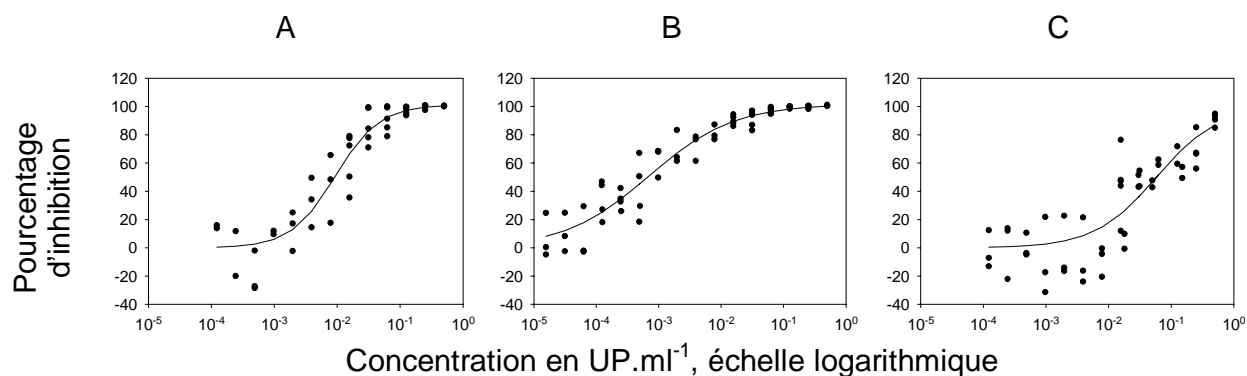


Figure 25 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en  $\text{UP}\cdot\text{ml}^{-1}$  dans le puits de la subtilisine selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C. Les courbes représentent l'ajustement des valeurs expérimentales selon une équation logistique à 3 paramètres.

D'une manière générale, l'efficacité des protéases est meilleure en prévention d'un biofilm de 3 heures puis de 24 heures et enfin en lavage, sauf pour la Savinase et la subtilisine où leur efficacité est accrue en prévention d'un biofilm de 24 heures par rapport à un biofilm de 3 heures.

On peut classer l'efficacité des protéases selon l'ordre suivant :

- en prévention : subtilisine > Savinase > papaïne > Umamizyme > protéase Amano
- en lavage : subtilisine  $\approx$  Savinase > Umamizyme > protéase Amano  $\approx$  papaïne

## 2.2. Glycosidases

De la même manière que pour les protéases, l'effet des glycosidases a été testé sur le biofilm développé en microplaque. Les résultats comportant tous les points expérimentaux sont présentés sur la Figure 26 jusqu'à la Figure 30 par activité. Le Tableau 17 présente également les concentrations calculées à partir des transformations log-log des valeurs expérimentales permettant une inhibition de 50%.

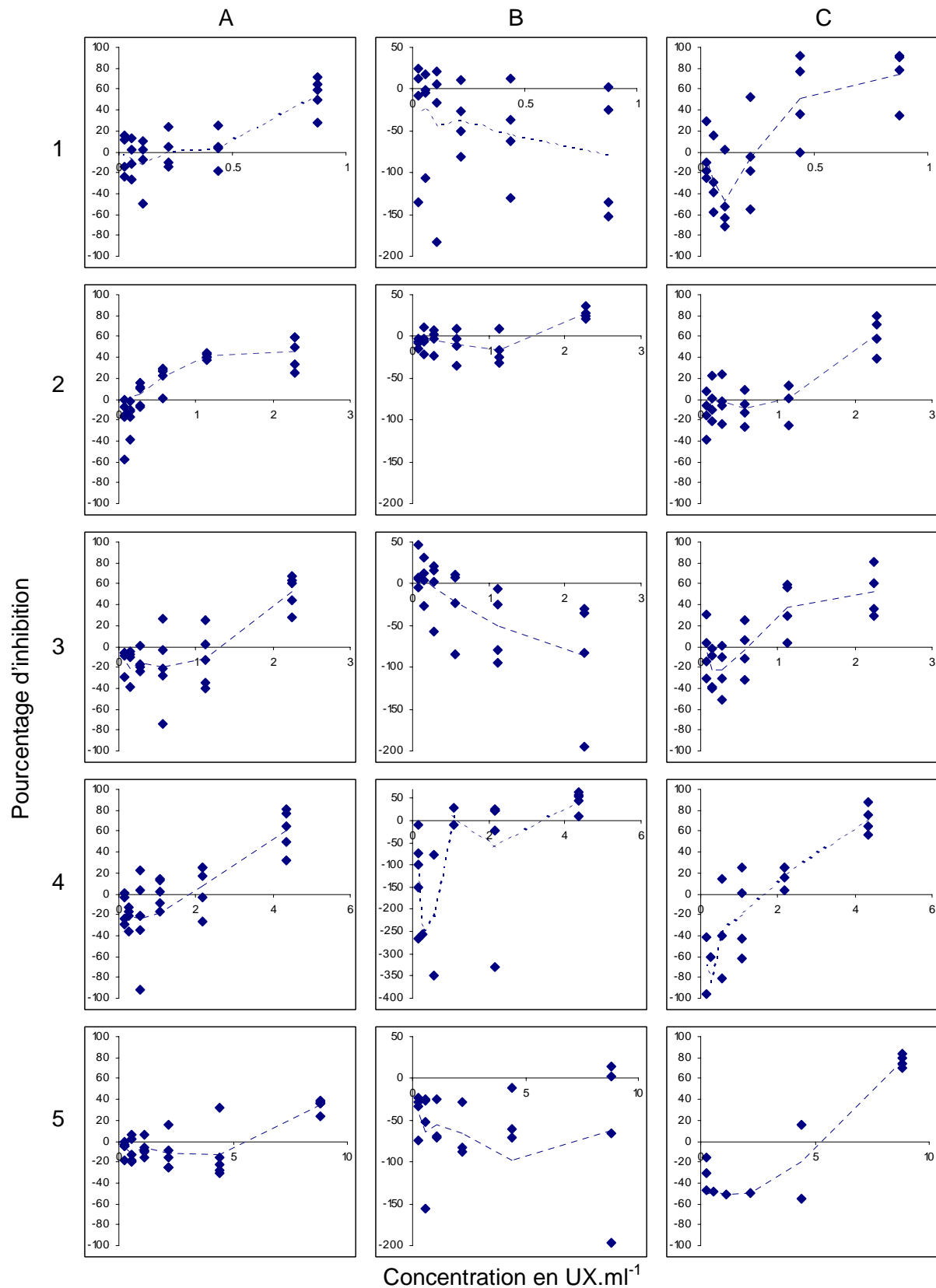


Figure 26 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UX.ml<sup>-1</sup>) par puits des 5 xylanases testées Ultraflo (ligne 1), Pulpzyme (ligne 2), Shearzyme (ligne 3), Viscozyme (ligne 4) et Feedlyve (ligne 5) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.

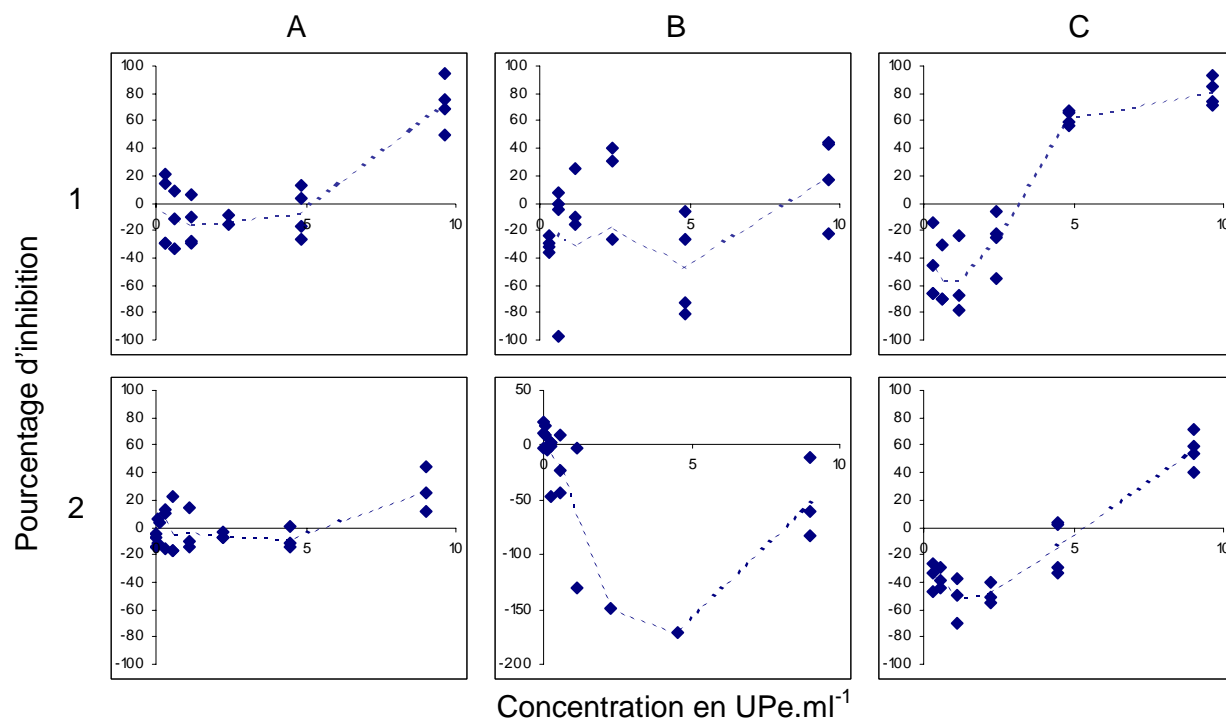


Figure 27 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UPE.ml<sup>-1</sup>) dans le puits des deux pectinases testées Pectinex (ligne 1) et pectinase (ligne 2) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.



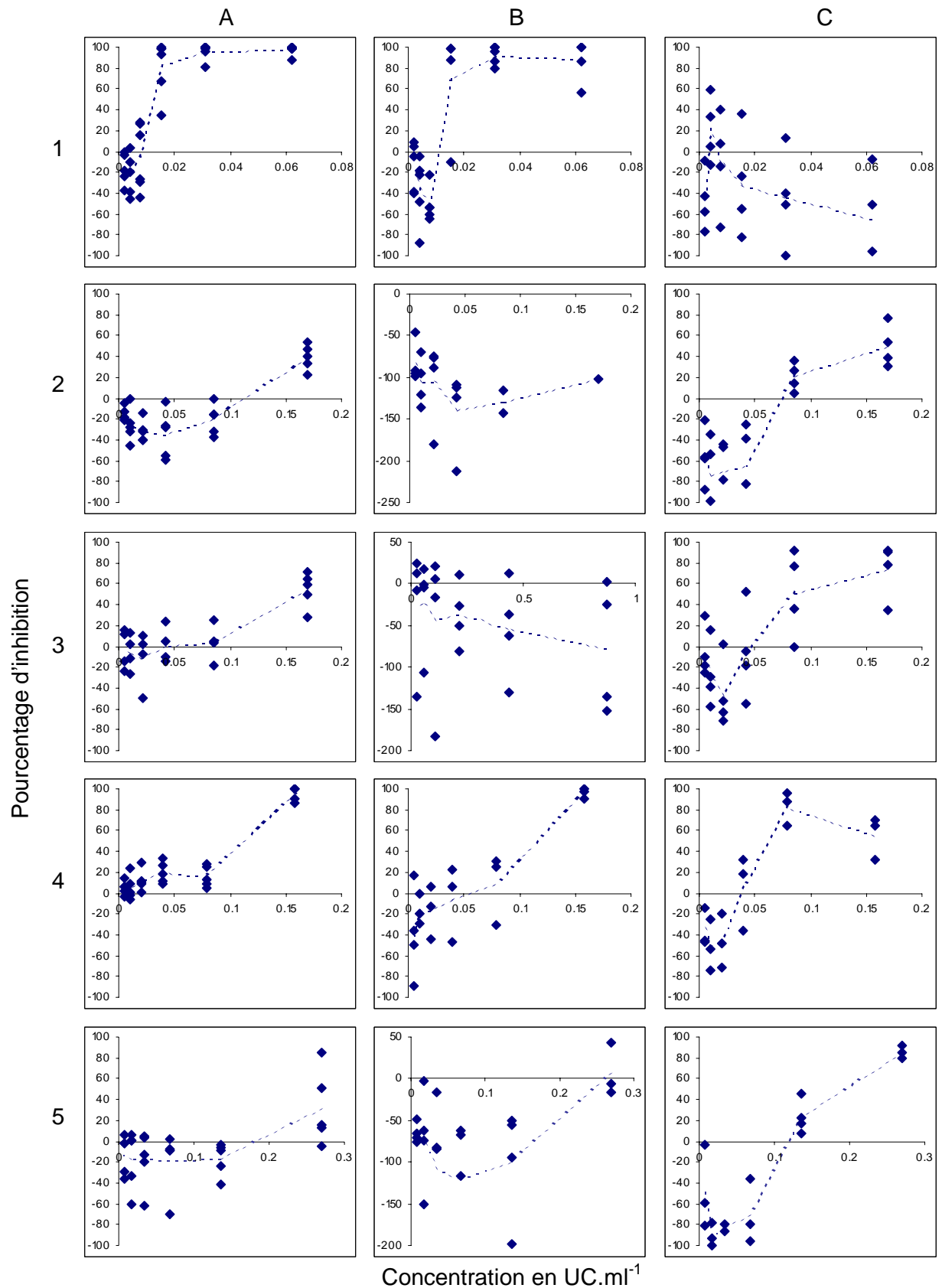


Figure 28 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UC.ml<sup>-1</sup>) par puits des 5 cellulases testées Finizyme (ligne 1), Celluclast(ligne 2), Ultraflo (ligne 3), Glucanex (ligne 4) et Cellulyve (ligne 5) selon les 3 protocoles d’essais, prévention d’un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d’un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d’un biofilm de 3h en colonne C.

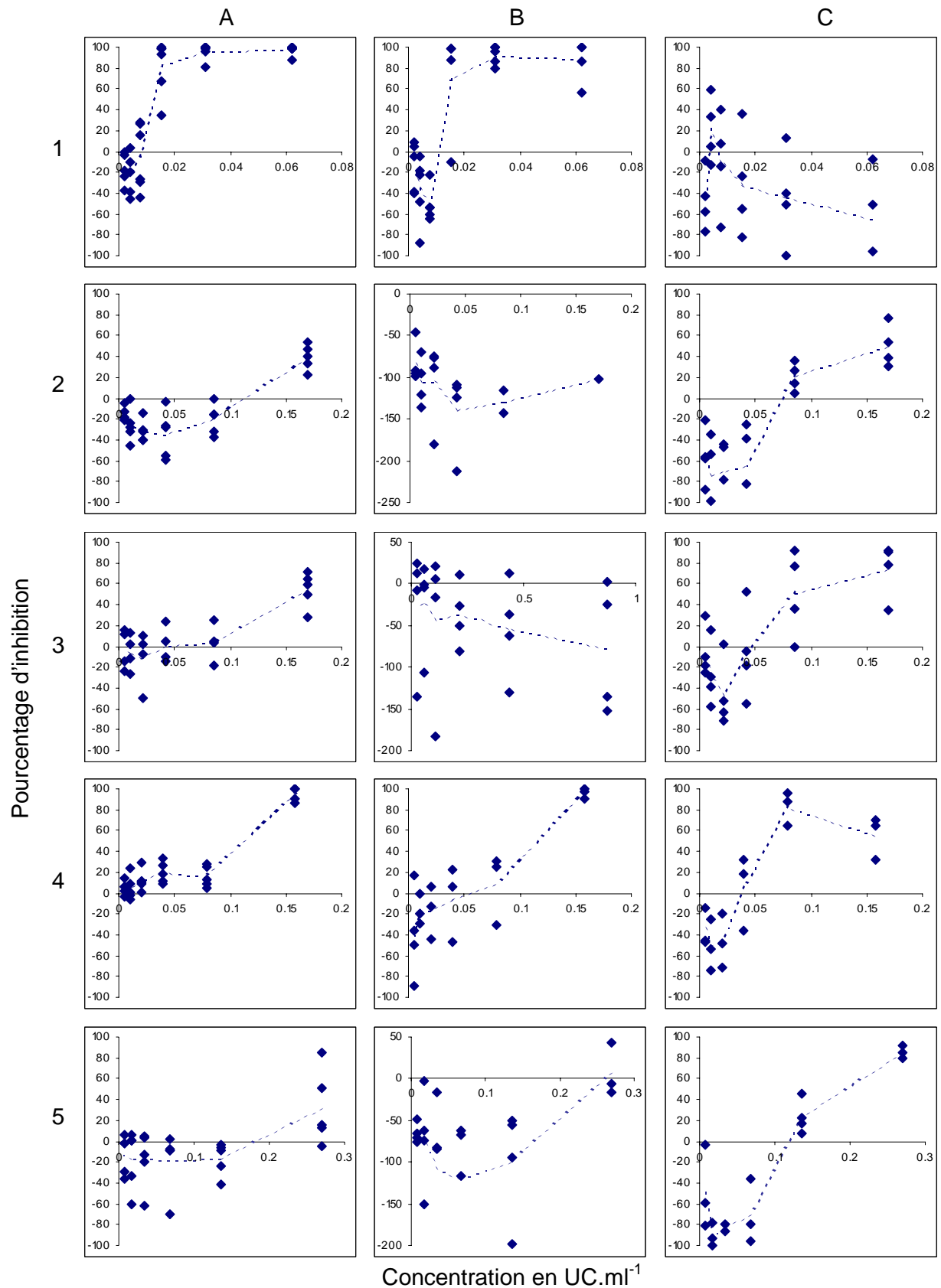


Figure 29 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UA.ml<sup>-1</sup>) des 3 amylases testées Panlyve AG (ligne 1), Panlyve AMY10 (ligne 2) et α-amylase (ligne 3) selon les 3 protocoles d’essais, prévention d’un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d’un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d’un biofilm de 3h en colonne C.

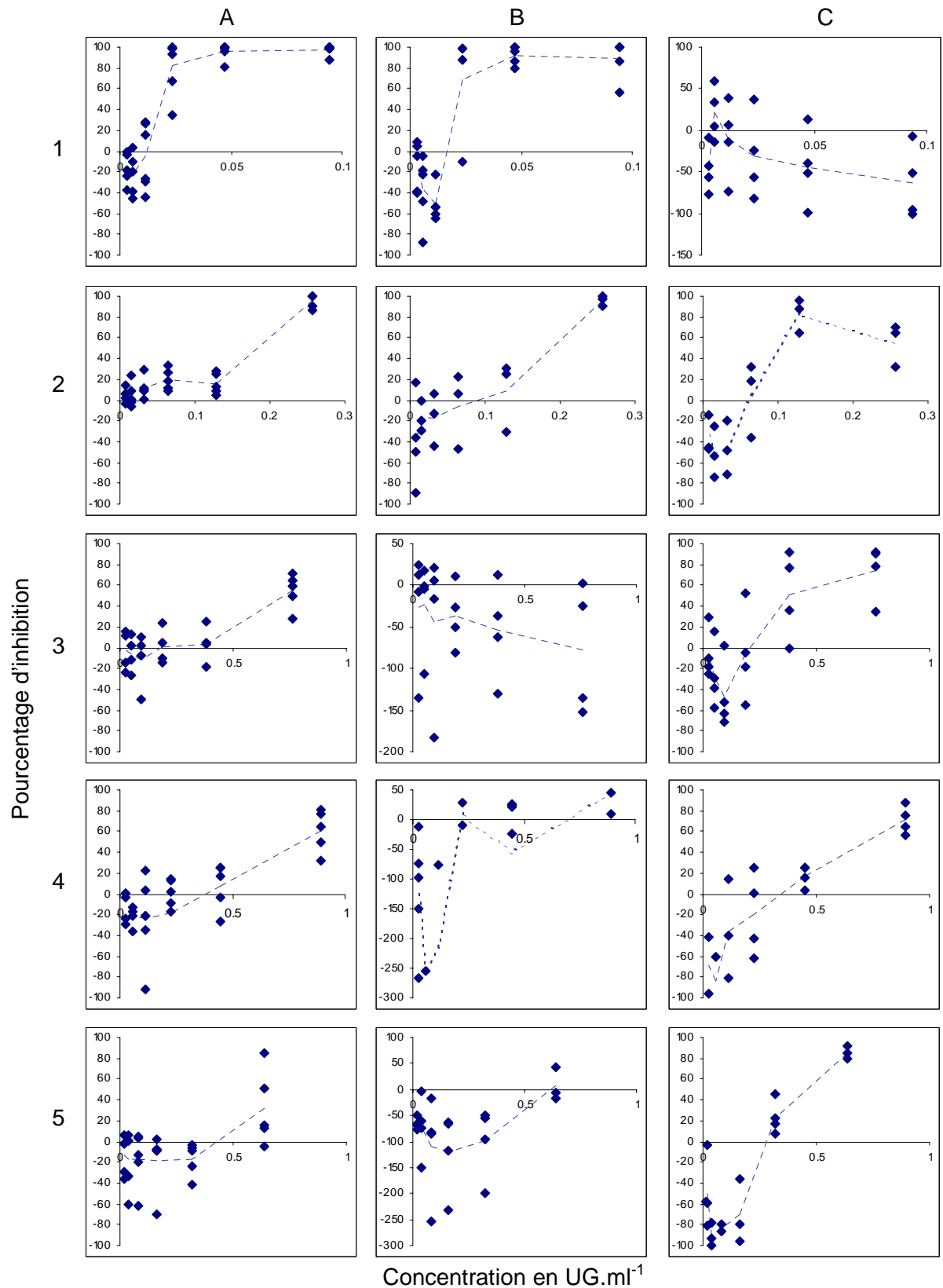


Figure 30 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UG.ml<sup>-1</sup>) par puits des 5 glucanases testées Finizyme (ligne 1), Glucanex (ligne 2), Ultraflo (ligne 3), Viscozyme (ligne 4) et Cellulyse (ligne 5) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.

La forme des courbes des pourcentages d'inhibition, en fonction de la concentration en activité enzymatique dans le puits, concernant le criblage des glycosidases présente peu de plateau d'inhibition maximale. On observe plutôt une droite qui atteint son maximum d'efficacité entre 60 et 80% d'inhibition. Peu de glycosidases approchent les 100% d'inhibition, seules Finizyme en prévention (Figure 28 A1 et B1), Glucanex en prévention et en lavage (Figure 28 A4, B4 et C4) ainsi que Pectinex en lavage (Figure 27 C1) sont suffisamment efficaces.

On observe une importante variabilité des valeurs, et parfois une forte augmentation du biofilm.

Tableau 17– Concentrations C50 donnant une inhibition du biofilm de 50%, calculées à partir de la réduction logarithmique des valeurs expérimentales.

	Prévention 3h	Prévention 24h	Lavage	Unités enzymatiques
Finizyme	0,0195	0,0226	NC	UG.ml <sup>-1</sup>
Glucanex	0,18	0,219	0,102	
Ultraflo	0,730	NC	0,390	
Viscozyme	0,887	0,909	0,695	
Cellulyve	0,818	NC	0,450	
Ultraflo	0,836	NC	0,447	UX.ml <sup>-1</sup>
Pulpzyme	1,994	2,97	2,06	
Shearzyme	2,215	NC	1,93	
Viscozyme	4,31	4,42	3,37	
Feedlyve	NC	NC	7,73	
Finizyme	0,013	0,015	NC	UC.ml <sup>-1</sup>
Celluclast	0,187	NC	0,161	
Ultraflo	0,163	NC	0,087	
Glucanex	0,111	0,135	0,063	
Cellulyve	0,345	NC	0,189	
Panlyve AG	NC	NC	NC	UA.ml <sup>-1</sup>
Panlyve AMY10	NC	NC	NC	
α-Amylase	NC	NC	63,23	
Pectinex	8,29	11,47	4,52	UPe.ml <sup>-1</sup>
Pectinase	12,93	NC	8,78	

NC : non calculable

Le Tableau 17 confirme que les glycosidases sont plus ou moins efficaces. En effet, certaines C50 n'ont pas pu être calculées car certaines glycosidases n'atteignent pas ce pourcentage d'inhibition. Leur efficacité a légèrement tendance à diminuer entre la prévention d'un biofilm de 3 heures et celle d'un biofilm de 24 heures. Elle est légèrement augmentée jusqu'à parfois doublée entre la prévention d'un biofilm de 3 heures et le lavage. Seule Finizyme présente une efficacité en prévention et pas en lavage.

Si on étudie le type d'activité enzymatique, en regard des pourcentages d'inhibition maximale atteints, il semblerait que les glucanases et les cellulases soient les plus efficaces et les amylases les moins. Par enzyme, Finizyme présente une très bonne inhibition en prévention, avec un profil proche de celui de la Savinase, ainsi qu'un maximum d'inhibition atteignant les 97% et cela à de faibles concentrations en activité cellulase et glucanase par

rapport aux autres cellulases et glucanases. Cependant, elle présente l'effet contraire en lavage, avec une augmentation du biofilm. Glucanex semble très intéressante également. Elle présente un profil d'inhibition linéaire dont les valeurs maximales d'inhibition sont de 95% en prévention et en lavage. Comme pour les produits Mexel® 336, elle semble présenter en lavage une courbe en cloche avec un maximum d'inhibition à une concentration optimale.

### 2.3. Lipases et estérases

De la même manière que pour les protéases, l'effet d'activités lipases et des estérases a été testé sur le biofilm développé en microplaque. Les résultats comportant tous les points expérimentaux sont présentés sur la Figure 31 et la Figure 32 par activité. Le Tableau 18 présente également les concentrations calculées à partir des réductions logarithmiques des valeurs expérimentales donnant une inhibition de 50%.

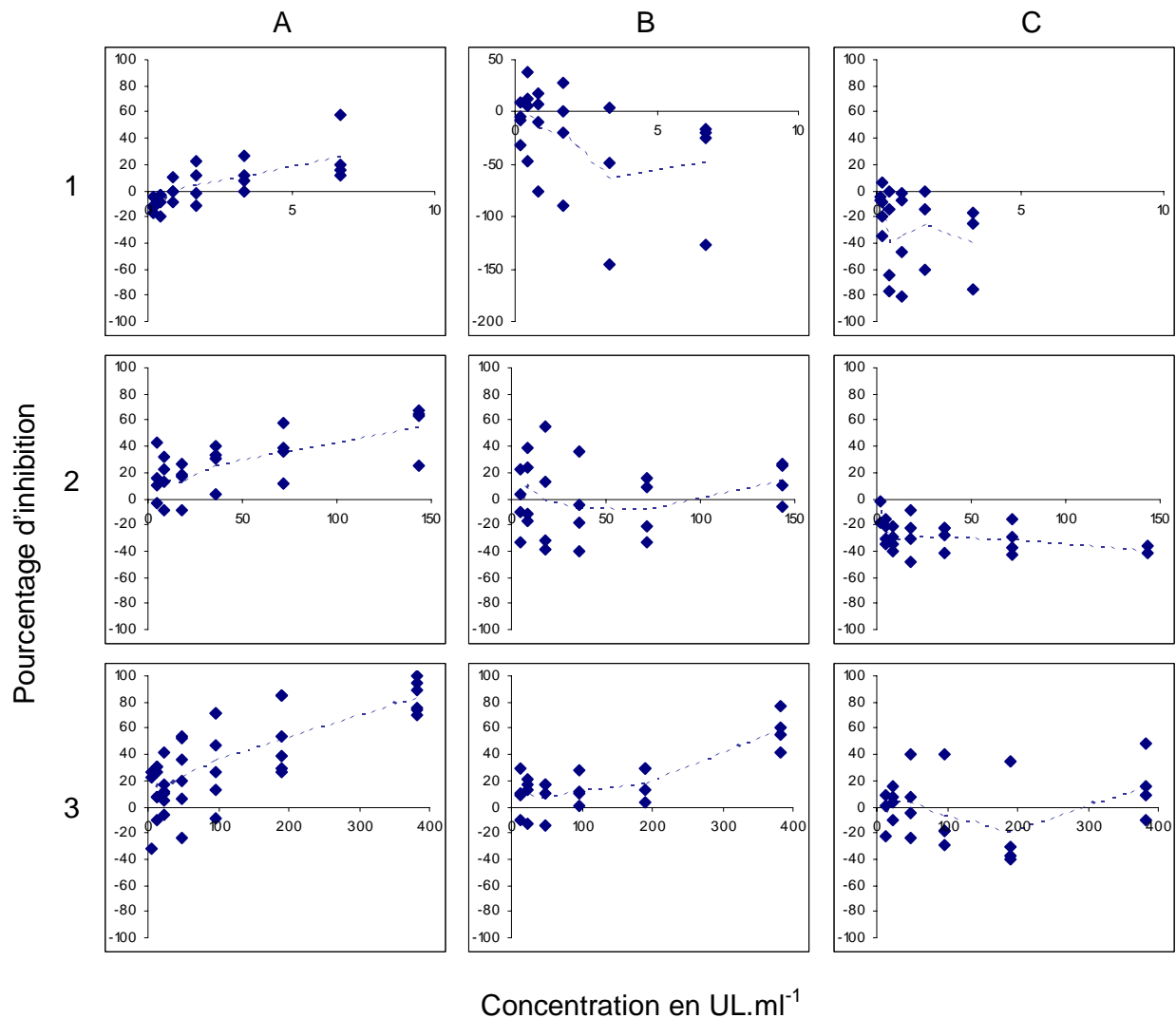


Figure 31 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration (UL.ml<sup>-1</sup>) par puits des 3 lipases testées Liponan (ligne 1), Lipex (ligne 2) et Lipolase (ligne 3) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.

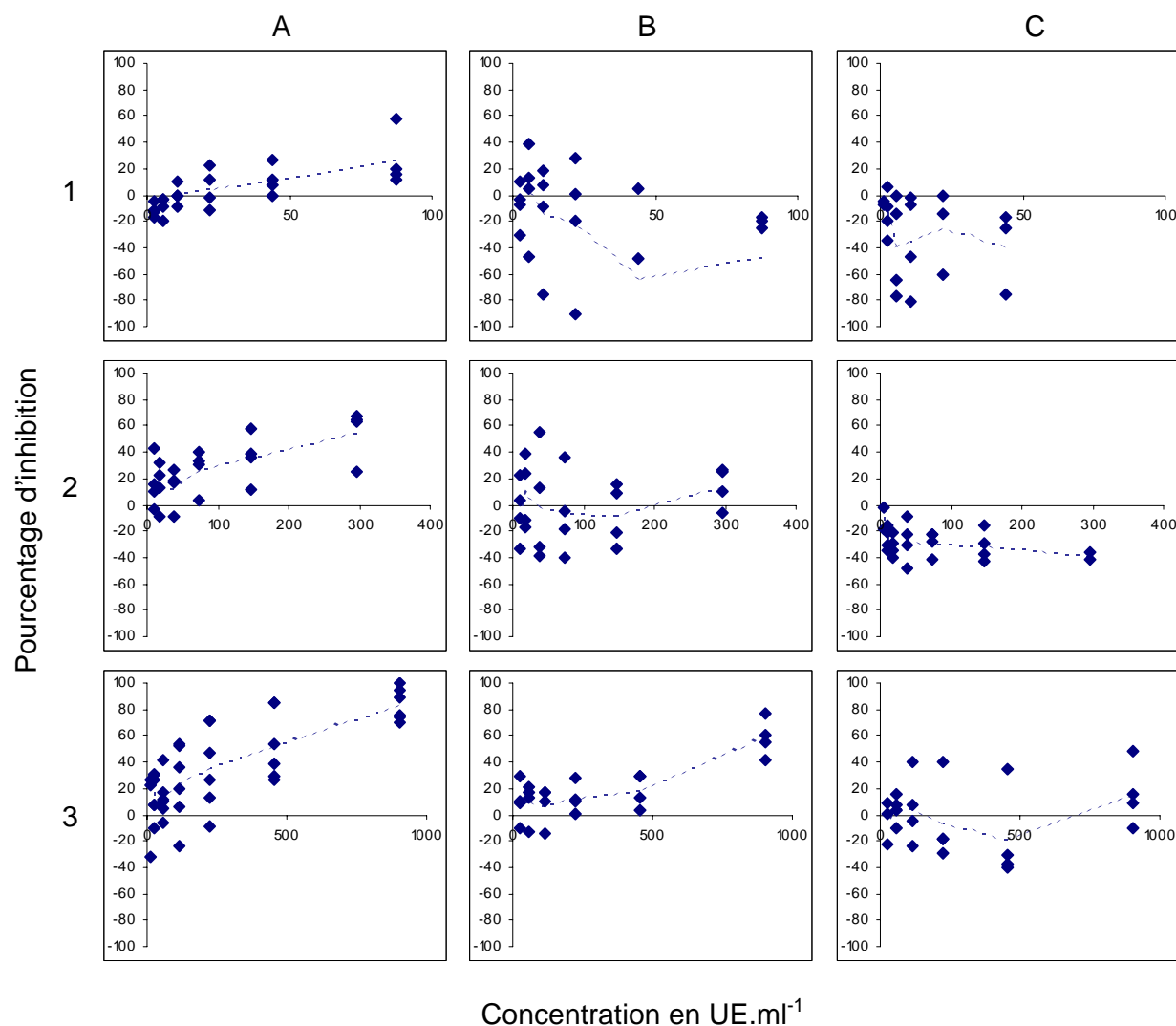


Figure 32 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration ( $\text{UE.ml}^{-1}$ ) par puits des 3 estérases testées Liponan (ligne 1), Lipex (ligne 2) et Lipolase (ligne 3) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.

Tableau 18 – Concentrations C50 donnant une inhibition du biofilm de 50%, calculées à partir de la réduction logarithmique des valeurs expérimentales

	Prévention 3h	Prévention 24h	Lavage	Unités enzymatiques
Liponan	799,45	NC	NC	$\text{UE.ml}^{-1}$
Lipex	424,95	NC	NC	
Lipolase	371,18	800,2	NC	
Liponan	61,23	NC	NC	$\text{UL.ml}^{-1}$
Lipex	205,32	NC	NC	
Lipolase	156,46	337,34	NC	

NC : non calculable

Les lipases et estérases ne sont pas très efficaces. La plus efficace est la Lipolase qui atteint des pourcentages d'inhibition plus élevés que les autres lipases mais à des concentrations supérieures à celle des autres lipases. Elle atteint un maximum d'inhibition autour de 84% en prévention d'un biofilm de 3 heures, diminuée en prévention d'un biofilm de 24 heures

et diminuée davantage encore en lavage. Les inhibitions sont plus élevées en prévention d'un biofilm développé pendant 3 heures que pendant 24 heures.

## 2.4. Reproductibilité des taux d'inhibition

Comme pour les produits Mexels®, une forte variation des pourcentages d'inhibition peut être observée. La significativité des pourcentages d'inhibition a été étudiée par un test T-test de Student permettant de comparer les valeurs de fluorescence de biofilms contrôles à celles de biofilms traités. Le type de T-test réalisé est bilatéral, on observe en effet des valeurs de fluorescence de biofilms traités supérieures ou inférieures à celle des contrôles ; ce type de T-test suppose que les variances des deux populations sont différentes, les groupes étudiés étant distincts. Les exemples des valeurs de p calculées à partir de la variation des moyennes de fluorescence du contrôle et du biofilm traité avec la Savinase et Pulpzyme sont décrits dans le Tableau 19.

Tableau 19 – Exemple de valeurs de p, répertoriées en fonction du pourcentage d'inhibition moyen, de l'écart type et de la concentration testée par protocole pour le traitement avec Savinase et Pulpzyme. Les écarts types et p value sont calculés à partir d'au moins 4 réplicats.

	Savinase				Pulpzyme			
	Pourcentage d'inhibition	Valeur de p	Concentration en UP.ml <sup>-1</sup>	Ecart type	Pourcentage d'inhibition	Valeur de p	Concentration en UX.ml <sup>-1</sup>	Ecart type
Prévention d'un biofilm de 3 heures	98,28	0,00	2,00	6,42	45,02	0,04	2,28	15,32
	99,95	0,01	2,22	0,23	40,85	0,04	1,14	3,03
	98,81	0,00	1,00	5,48	21,46	0,21	0,57	11,78
	99,54	0,01	1,11	0,67	4,67	0,68	0,29	10,89
	95,07	0,00	0,50	4,51	-15,94	0,50	0,14	14,15
	97,59	0,01	0,56	0,76	-20,00	0,42	0,07	22,36
	86,69	0,00	0,25	10,59				
	93,98	0,01	0,28	1,01				
	68,21	0,00	0,13	4,91				
	66,67	0,03	0,14	15,35				
Prévention d'un biofilm de 24 heures	49,42	0,02	0,06	4,52				
	61,38	0,01	0,07	6,27				
	94,43	0,00	2,22	2,32	27,55	0,24	2,28	6,42
	101,33	0,00	2,00	1,39	-15,77	0,62	1,14	17,47
	96,73	0,00	1,11	2,52	-10,35	0,70	0,57	18,88
	99,30	0,00	1,00	1,13	-4,05	0,95	0,29	13,32
	83,34	0,00	0,50	8,04	-4,92	0,95	0,14	12,97
	99,77	0,00	0,56	1,25	-7,65	0,79	0,07	5,02
Protocole de lavage	86,21	0,00	0,28	0,29				
	86,82	0,00	0,14	2,04				
	66,42	0,00	0,06	10,36				
	92,01	0,00	2,22	5,30	61,78	0,005	2,28	17,63
	95,99	0,00	1,11	1,96	0,76	0,99	1,14	17,91
	94,68	0,00	0,56	2,87	-8,65	0,58	0,57	14,76
	88,73	0,00	0,28	7,13	-2,17	0,99	0,29	19,71
61,06	0,00	0,14	6,01	-2,07	0,99	0,14	18,75	
50,47	0,00	0,07	4,80	-13,36	0,45	0,07	19,64	

Les résultats sont statistiquement significatifs lorsque l'on observe des pourcentages d'inhibitions supérieurs à environ 40% (ou inférieurs à -40%). Par exemple pour la Savinase (Figure 22, 3A, B et C), toutes les valeurs obtenues sont statistiquement significatives à 95%. Concernant Pulpzyme (Figure 26, 2B), en prévention d'un biofilm de 24 heures à 2,28 UX.ml<sup>-1</sup>, malgré un faible écart type ( $\pm 6,4\%$ ), le pourcentage d'inhibition s'élevant à 27,5% en moyenne est statistiquement significatif à 76% seulement, par contre un pourcentage d'inhibition de 40,85% à 1,14 UX.ml<sup>-1</sup> en prévention d'un biofilm de 3 heures apparaît statistiquement significatif ( $p = 0,04$ ). Cependant certains pourcentages d'inhibition moyens élevés peuvent ne pas être significatifs si l'écart type est important. Pitt's *et al.* (2003) considèrent un test positif pour un pourcentage d'inhibition moyen supérieur à 40%.

Ce résultat permet de valider les études réalisées précédemment sur la comparaison des IC50 en fonction de la nature des activités enzymatiques, nous permettant de discuter les mécanismes impliqués dans l'adhésion de *Pseudoalteromonas sp.* D41. Toutefois, pour considérer un potentiel antislissure significatif, il paraît raisonnable en fait de considérer l'ensemble des données sur la gamme de dilution testée. Si la courbe peut être lissée par une équation logistique à 3 ou 4 paramètres dont les paramètres calculés sont statistiquement significatifs, alors l'échantillon testé peut être considéré comme présentant un potentiel antislissure significatif. Le calcul d'IC90 à ce niveau serait intéressant à effectuer davantage que celui des IC50.

## 2.5. Toxicité des enzymes

Nous avons pu mesurer l'effet toxique de certaines préparations enzymatiques en dénombrant les bactéries du surnageant de chaque puits. Cette étude a été réalisée avec les 4 enzymes présentant un potentiel antislissure d'au moins 90% en prévention d'un biofilm développé pendant 3 heures: Finizyme, Savinase, Glucanex et subtilisine. Les prélèvements sont effectués sur le surnageant de chacun des puits et, après dilutions, étalés sur Marine Agar afin de comptabiliser la concentration en cfu.ml<sup>-1</sup> des cellules non adhérentes de chaque puits et de les comparer à celle d'un biofilm contrôle non traité.

De même que l'on peut déterminer des MIC correspondant à une concentration minimale d'inhibition pour les antibiotiques, on peut déterminer une concentration maximale pour laquelle aucune toxicité n'a été détectée, que l'on nommera CmONT, concentration maximale observée de non toxicité. Autrement dit, elle correspond à la concentration maximale en enzyme testée pour laquelle on observe une concentration en cfu.ml<sup>-1</sup> du surnageant correspondant à celle des contrôles. Cette concentration peut alors être comparée avec la concentration minimale permettant d'atteindre le plateau d'inhibition de formation du biofilm s'élevant au moins à 90%, CmOEM, ou concentration minimale observée pour un effet maximum. Ces concentrations ne sont pas calculées mais observées à partir des données expérimentales obtenues. Le test en microplaque nous permet donc d'obtenir à la fois un potentiel antislissure via la caractérisation de la CmOEM et aussi de connaître la toxicité du composé testé via la détermination de la CmONT. Le Tableau 20 résume l'ensemble de ces données.



Tableau 20 – Comparaison des CmONT et CmOEM exprimées en g.l<sup>-1</sup> et en U.ml<sup>-1</sup> concernant le protocole de prévention d'un biofilm marin modèle développé 3h en microplaque. ND : non déterminée.

	CmONT	CmOEM
Finizyme	50 g.l <sup>-1</sup> 0.0235 UG.ml <sup>-1</sup>	100 g.l <sup>-1</sup> 0.0470 UG.ml <sup>-1</sup>
Glucanex	ND, > 100 g.l <sup>-1</sup> > 0.256 UG.ml <sup>-1</sup>	100 g.l <sup>-1</sup> 0.256 UG.ml <sup>-1</sup>
Savinase	45 g.l <sup>-1</sup> 0.5 UP.ml <sup>-1</sup>	45 g.l <sup>-1</sup> 0.5 UP.ml <sup>-1</sup>
Subtilisine	ND, > 18 g.l <sup>-1</sup> > 0.5 UP.ml <sup>-1</sup>	2,25 g.l <sup>-1</sup> 0.0625 UP.ml <sup>-1</sup>

Glucanex et subtilisine ne présentent pas de toxicité aux concentrations les plus élevées auxquelles elles ont été utilisées (respectivement 100 000 mg.l<sup>-1</sup> et 18 000 mg.l<sup>-1</sup>), ce qui n'est pas le cas de Finizyme et Savinase qui sont toxiques à une concentration supérieure à 50 000 mg.l<sup>-1</sup> et 45 000 mg.l<sup>-1</sup> respectivement. La quantité nécessaire de Finizyme pour atteindre le plateau d'inhibition maximale (100 000 mg.l<sup>-1</sup>) présente une toxicité. Par contre, la quantité nécessaire en subtilisine, Glucanex et Savinase pour atteindre le plateau d'inhibition maximale ne présente pas de toxicité.

On peut noter que les CmOEM sont très élevées et limiteraient une application industrielle dans l'environnement maritime.

## 2.6. Discussion

Au regard des maxima de pourcentage d'inhibition atteints, l'effet des protéases semble supérieur à celui des glycosidases, lui-même supérieur à celui des lipases ou estérases.

Si l'on regarde l'ensemble des courbes et des valeurs des IC<sub>50</sub>, il semble que les lipases et surtout les protéases soient moins efficaces en lavage qu'en prévention. Au contraire, les glycosidases présentent une efficacité ayant une tendance à augmenter en lavage par rapport à la prévention, sauf pour Finizyme.

La Savinase, préparation à base de subtilisine, apparaît de loin l'enzyme la plus efficace, notamment en prévention.

Ces résultats semblent prometteurs. Dans notre modèle de biofilm marin développé en microplaque, selon la nature des préparations enzymatiques testées et selon le protocole de lavage ou de prévention, différentes efficacités d'inhibition du biofilm peuvent être observées. Nous allons donc discuter des mécanismes pouvant être impliqués dans ce phénomène ainsi que de l'effet observé en présence de la Savinase et subtilisine.

### 2.6.1. Efficacité des enzymes et nature des molécules organiques ciblées

Les protéases permettent d'atteindre des pourcentages d'inhibition en moyenne supérieurs à ceux atteints avec les glycosidases ou les lipases et semblent donc plus efficaces. Des études de physicochimie de surface de la bactérie modèle *Pseudoalteromonas sp.* D41 ont permis de montrer qu'elle possède une surface plus riche en protéines qu'en polysaccharides (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005). En effet, des analyses d'extrême surface en spectroscopie de photoélectrons induite par rayons X (XPS) sur D41 lyophilisée ont montré une forte proportion de groupements aminés et une faible proportion de groupements oxygénés. Cette observation a été complétée par des tests d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) de la D41 en solution montrant un caractère électron-donneur et électron accepteur faible, attribué principalement à la présence de groupements  $\text{RNH}_2$  à la surface de la bactérie. L'efficacité supérieure des protéases sur celle des glycosidases pour inhiber l'adhésion de la *Pseudoalteromonas sp.* D41 notamment en prévention semble corrélée avec la présence majoritaire de groupements  $\text{RNH}_2$ , caractéristiques des protéines, plutôt que des groupements  $\text{RCOO}^-$ , caractéristiques des polysaccharides, en extrême surface de la D41. L'efficacité des protéases en prévention serait donc liée à la composition d'extrême surface de la D41, avant qu'elle ne produise la matrice extracellulaire du biofilm, suggérant que les protéases agiraient directement sur les molécules de surface des bactéries. Certaines enzymes peuvent agir directement sur des molécules membranaires comme Glucanex, utilisée en œnologie pour extraire les protéines membranaires à GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) de la paroi cellulaire des levures (Sampaio *et al.*, 1999), impliquées dans des mécanismes d'adhésion cellulaire.

La capacité du biofilm à se développer en présence d'enzyme diffère selon les activités enzymatiques mais également selon le protocole utilisé. Les protéases sont plus efficaces en prévention qu'en lavage, contrairement aux glycosidases qui présentent des pourcentages d'inhibition équivalents en lavage et en prévention d'un biofilm de 3 heures, voire deux fois supérieurs. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que l'efficacité des enzymes serait corrélée à la nature des molécules organiques composant le biofilm au cours de sa formation. L'excrétion d'exopolysaccharides dans la matrice extracellulaire est décrite dans la littérature comme le résultat d'une cascade de changements physiologiques, induite par la densité cellulaire (Allison et Sutherland, 1987). De plus, certaines enzymes interférant dans les cascades d'activation du QS (Roche *et al.*, 2004 ; Itoh *et al.*, 2005), ensemble de signaux permettant aux bactéries de percevoir la densité de population bactérienne et de coordonner une réponse à cette information via la régulation de certains gènes (Fuqua *et al.*, 1994), et d'autres intervenant directement sur les polysaccharides de la matrice (Wiater *et al.*, 2004) présentent chacune un potentiel anti-biofilm. Ainsi, il existerait plusieurs voies possible permettant d'inhiber la formation de biofilms via l'utilisation d'hydrolases. Les glycosidases permettraient davantage de perturber la matrice du biofilm déjà formé, alors que les protéases pourraient interférer soit au niveau des cascades d'activation aboutissant à

la synthèse des EPS ou comme décrit précédemment sur les molécules d'extrême surface des bactéries impliquées dans les phases initiales d'adhésion.

De la même manière, aucune inhibition en lavage et une inhibition partielle du biofilm en prévention de la Lipolase suggèrent l'implication de lipides davantage dans les mécanismes initiaux de formation du biofilm. On sait notamment que des lipopolysaccharides membranaires sont présents à la surface des bactéries à Gram négatif, ou que des N-acyl homosérine lactone (AHL) impliquées dans le QS sont substituées par des chaînes d'acides gras plus ou moins longues.

Parmi les glycosidases, les glucanases et les cellulases semblent les plus efficaces suggérant la présence de glucanes ou de glucoses liés en  $\beta$ -1,4 au sein de la matrice du biofilm modèle. Cependant, le potentiel antialissure de Glucanex pourrait s'expliquer par l'activité glucanase et cellulase mais aussi protéase (Tableau 3). De même, des études récentes ont montré que la protéase papaine pouvait hydrolyser un polysaccharide comme le chitosane (Vishu Kumar *et al.*, 2004). Il est donc impossible de déterminer la nature des EPS du biofilm en fonction des différentes activités enzymatiques à l'origine du potentiel antialissure. Ce dernier pourrait être lié au large spectre d'activité des préparations enzymatiques étudiées. Pour connaître la nature des EPS une étude plus approfondie sur les EPS produits par la bactérie marine modèle utilisée sera réalisée dans le chapitre 5.

## 2.6.2. Efficacité des enzymes et adsorption

Le potentiel antialissure des enzymes en prévention pourraient également s'expliquer par le simple fait qu'elles s'adsorbent sur la surface. L'adsorption de protéines ou de sucres sur une surface induit un changement des propriétés physicochimiques de la surface (Schakenraad et Busscher, 1989) interférant dans le phénomène d'adhésion des cellules (Fletcher, 1976 ; Bradshaw, 1997), surtout dans les tous premiers temps de l'adhésion (Rubio, 2002).

Excepté pour Savinase, subtilisine, Glucanex et Finizyme, les pourcentages d'inhibition du biofilm sont diminués entre la prévention d'un biofilm de 3 heures et celle d'un biofilm de 24 heures (Papaine, Pulpzyme, Viscozyme, Umamizyme et Pectinex). On observe même que certaines enzymes ne sont plus du tout efficaces en prévention d'un biofilm de 24 heures par rapport à la prévention d'un biofilm de 3 heures (protéase Amano, Ultraflo, Shearzyme, Celluclast, Cellulyve, Pectinase et les lipases). Ce résultat pourrait s'expliquer par une perte de stabilité enzymatique dans le milieu marin au cours du temps, mais plus probablement par le fait que le phénomène d'inhibition observé en prévention d'un biofilm de 3 heures ne serait pas lié à l'activité enzymatique propre de la préparation mais au phénomène d'adsorption des enzymes ou des composés de la préparation enzymatique. Lorsque le taux d'inhibition préventif est constant ou augmenté avec le temps de formation du biofilm, c'est le cas pour Finizyme, Glucanex, Savinase et subtilisine, cela signifierait que le potentiel antialissure est lié à l'activité enzymatique propre.

D'autre part, le manque d'efficacité de certaines enzymes pourrait être dû à une perte d'activité enzymatique liée à l'adsorption protéique sur la surface. En effet certaines études

montrent que les phénomènes d'adsorption peuvent entraîner un remaniement tridimensionnel de la protéine (Norde et Favier, 1992 ; Servagent-Noinville *et al.*, 2000) induisant une perte de son activité enzymatique (Sosa *et al.*, 1996).

### 2.6.3. Subtilisine

La Savinase est l'enzyme la plus efficace pour inhiber la formation de biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 en lavage comme en prévention. Cette préparation contient de la subtilisine. L'étude de la subtilisine montre qu'elle est plus active encore que la Savinase, jusqu'à 45 fois en prévention d'un biofilm développé 24 heures. Son activité, en prévention, est notamment augmentée avec le temps d'un facteur 13. Ce résultat est très prometteur et permet de supposer que le potentiel antialissure de l'enzyme est lié à son activité enzymatique propre. Le comportement antialissure observé est similaire à celui des produits industriels de type dose-réponse. La CmOEM ne présente pas de toxicité.

D'autres auteurs ont montré l'efficacité de la subtilisine ou de préparation à base de subtilisine pour le nettoyage des textiles (McCarty, 1971; Barrat, 1973 ; Weber, 1979; Stanislawski et Wiersema, 1985 ), pour celui des circuits de refroidissements (Aldridge *et al.*, 1998), pour la dissociation des boues industrielles (Heinen *et al.*, 2002) ou encore contre l'adhésion des salissures marines où elle s'est révélée la plus efficace parmi 20 enzymes testées à une dilution  $10^{-3}$  sur l'adhésion de diatomées, de spores d'algues et de larves de balanes (Pettitt *et al.*, 2004). La subtilisine semble donc posséder un large spectre de potentiel antialissure.

Nous avons donc démontré le potentiel antialissure de la subtilisine sur notre biofilm marin modèle développé en microplaque. En vue d'une application industrielle, la concentration nécessaire pour obtenir une inhibition maximale (97%) reste élevée (2,25 g.l<sup>-1</sup>). Cependant, en prévention d'un biofilm de 24 heures (Figure 25), l'IC50 reste comparable (25,18 mg.l<sup>-1</sup>) à celle des produits industriels testés dans les mêmes conditions (Tableau 10). Elle est notamment 4 fois plus faible que celle du produit 432/0.

### 2.6.4. Comparaison avec des études précédentes

Augustin et Ali-Vehmas en 2004 n'observent pas de résultats concluants avec l'Alcalase, composée de subtilisine, sur des biofilms associés à des bactéries pathogènes. De même, Pectinex ne semble pas être la glycosidase la plus efficace pour inhiber notre biofilm modèle alors que son efficacité sur des biofilms associés à des bactéries pathogènes a été démontrée, notamment par Johansen *et al.* en 1997. Ces résultats suggèrent une spécificité d'activité inhibitrice en fonction de l'espèce microbienne composant le biofilm et des conditions de développement de ce biofilm. En effet, la nature des protocoles d'essais entre les diverses études réalisées diffèrent en de nombreux points :

- nature du biofilm (mono ou multi espèces, nature de la surface, du milieu d'incubation, âge du biofilm).

- quantification de l'inhibition du biofilm (dénombrements, mesures spectrophotométriques diverses selon le marqueur utilisé, calcul de surface de recouvrement, mesure de conductance ou d'épaisseur de biofilm, mesure de pression...).
- quantification des activités enzymatiques. Il est difficile de comparer des effets d'enzymes en fonction de leurs activités enzymatiques, qui sont la plupart du temps caractérisées par des méthodes différentes.
- méthodes d'incubation des enzymes (avant ou après la formation du biofilm, temps et milieu d'incubation). En effet, certaines enzymes sont utilisées dans les conditions optimales (pH et température) de leur activité enzymatique. Nous les avons testées dans les conditions les plus proches du milieu marin permettant ainsi une présélection d'enzymes efficaces dans les conditions de leur utilisation en tant qu'agent antialissures.

On peut observer que les quantités d'enzymes déposées sont très élevées mais pas si éloignées de celles observées dans plusieurs publications. Par exemple, Pitts *et al.* (2003) déposent 6 fois 2000 mg.l<sup>-1</sup> d'une protéase en une heure de lavage d'un biofilm formé en milieu de culture durant 24 heures à 37°C pH 7 et en microplaque pour obtenir une inhibition de 60% d'un biofilm composé de *Pseudomonas aeruginosa*. Cette valeur est comparable à la CmOEM de la subtilisine (2250 mg.l<sup>-1</sup>). Par contre ces valeurs semblent encore élevées par rapport aux quantités de Dispersin B utilisées par Itho *et al.* (2005), 50 mg.l<sup>-1</sup> ajoutés avec les bactéries et incubées 24 heures en microplaque en milieu de culture à 26°C pour obtenir une inhibition proche de 100% concernant *Escherichia coli*. Ce point reste donc à améliorer, c'est pourquoi nous étudierons par la suite un mélange d'enzyme diverses afin de détecter une éventuelle synergie et d'optimiser les quantités d'enzymes à déposer pour obtenir un maximum d'inhibition de biofilm.

De plus, des valeurs négatives élevées de certains pourcentages d'inhibition ont été observés avec certaines enzymes, pouvant s'élever jusqu'à -285% comme pour la protéase Amano en prévention d'un biofilm de 24 heures (Figure 22 B4). Nous chercherons par la suite à éclaircir ce point.

De même, nous allons tester des témoins de préparations enzymatiques chauffés afin de s'assurer que l'effet d'inhibition mesuré est bien lié à l'activité propre de la préparation enzymatique. Ce point sera étudié dans la partie qui suit.



### 3. Rôle des additifs

Les préparations enzymatiques commerciales contiennent des additifs comme le glycérol par exemple pour les solutions ou comme l'amidon pour les enzymes en poudre. Il est difficile de connaître la composition exacte de ces préparations.

On a pu observer que la subtilisine présente un potentiel antisalissure beaucoup plus important que celui de la Savinase (Tableau 16). C'est pourquoi nous avons voulu comparer le potentiel antisalissure d'enzymes pures avec celui des préparations commerciales à usage industriel afin de déterminer l'activité enzymatique responsable de l'inhibition observée.

De plus, dans le but de s'assurer que l'effet d'inhibition mesuré est lié aux activités enzymatiques, nous avons cherché à vérifier si les effets observés pouvaient être éventuellement liés la présence d'additifs au sein des préparations commerciales. Nous avons donc réalisé des témoins de préparations enzymatiques chauffés permettant d'inhiber l'activité enzymatique de la préparation.

#### 3.1. Préparations commerciales et enzymes pures

Les enzymes que nous avons pu trouver chez Sigma correspondant aux activités principales des préparations commerciales décrites par les fabricants sont les suivantes : pectinase (Sigma Aldrich, référence P4716)/ Pectinex (EC 3.2.1.15, Figure 27),  $\alpha$ -amylase (Sigma Aldrich, référence A7720)/Panlyve AMY10 (EC 3.2.1.1, Figure 29),  $\beta$ -glucanase Sigma (Aldrich, référence 49101)/Finizyme, Ultraflo et Viscozyme (EC 3.2.1.6, Figure 30), subtilisine (Sigma Aldrich, référence P5380)/Savinase (EC 3.4.21.62 Figure 24 et Figure 25 et Tableau 16).

On peut observer sur la Figure 33 que l' $\alpha$ -amylase présente un profil comparable à celui de Panlyve AMY10 en prévention d'un biofilm de 3 heures pour une même concentration en activité amylase, et présente moins d'augmentation du biofilm en prévention après 24 heures et en lavage. On peut cependant observer sur la Figure 29 qu'en lavage, l' $\alpha$ -amylase atteint un pourcentage d'inhibition de 54%, mais à des concentrations supérieures à celle de Panlyve AMY10. L'expérimentation, la différence de formulation ainsi que la plus forte activité amylase de l' $\alpha$ -amylase (Tableau 14) nous limitant dans les concentrations que l'on peut déposer en microplaque, des concentrations plus élevées n'ont pu être déposées pour Panlyve AMY10. Nous ne sommes donc pas en mesure de savoir si en fonction de la même concentration en activité amylase l'effet de Panlyve AMY10 serait comparable à celui de l' $\alpha$ -amylase.

La Figure 27 permet de comparer le potentiel antisalissure des pectinases. Il apparaît que pour une même activité pectinase déposée, la préparation commerciale Pectinex présente un potentiel antisalissure supérieur à celui de la pectinase Sigma d'un facteur deux en protocole de lavage et de prévention d'un biofilm de 3 heures. Ces deux pectinases sont sous forme liquide composée à 40% de glycérol. La différence d'inhibition pourrait s'expliquer par la présence d'activités enzymatiques secondaires dans la préparation

commerciale. En effet, la Pectinex Ultra SP est décrite comme possédant une activité principale polygalacturonase mais on peut noter dans la littérature qu'elle est décrite comme possédant des activités secondaires de type hémicellulase, arabanase,  $\beta$ -glucanase et xylanase (Johansen *et al.*, 1997).

La Figure 34 montre que Finizyme inhibe plus le biofilm en prévention que la  $\beta$ -glucanase pour une même concentration. Ce résultat suggère une possible inhibition liée à la présence d'additifs dans la préparation commerciale, mais aussi que l'activité  $\beta$ -glucanase ne serait pas la seule responsable de l'inhibition observée. En effet, Finizyme présente un potentiel antisalissure plus important que Ultraflo et Viscozyme (Figure 30), caractérisées par la même activité  $\beta$ -glucanase principale, mais pouvant posséder des activités enzymatiques secondaires comme l'activité cellulase que nous avons pu caractériser.

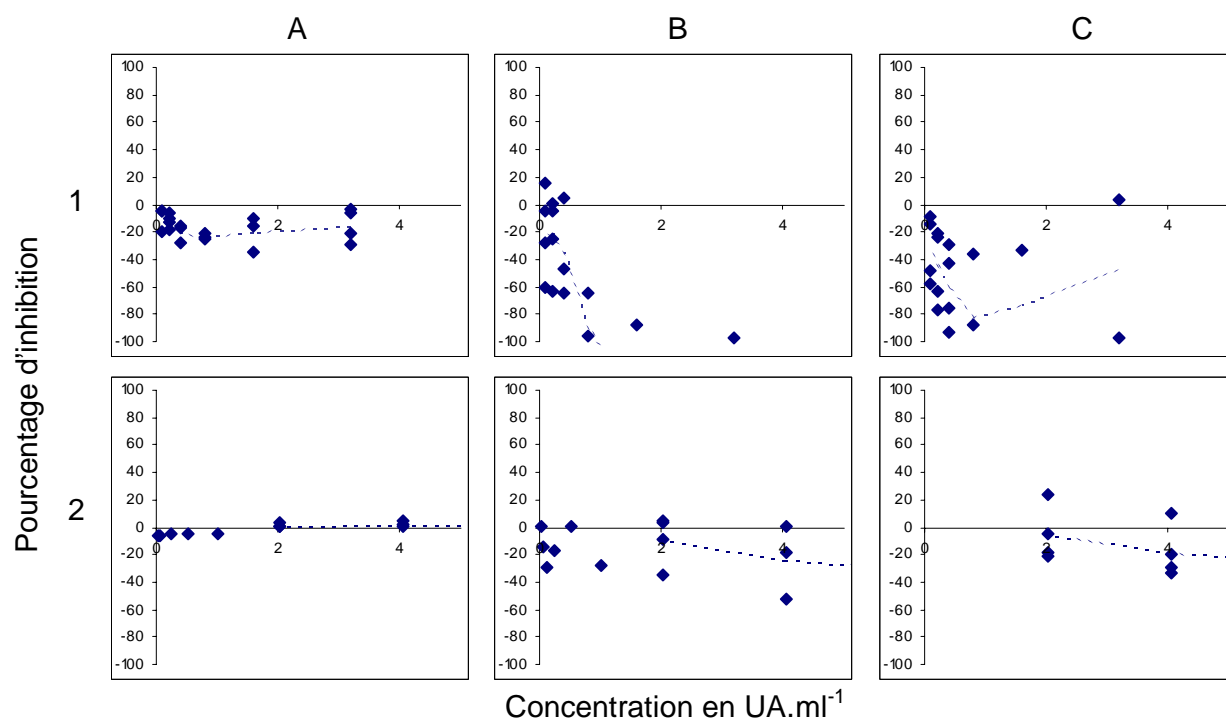


Figure 33 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en  $\text{UA}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour les 2 amylases EC 3.2.1.1 Panlyve AMY10 (ligne 1) et  $\alpha$ -Amylase (ligne 2) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.



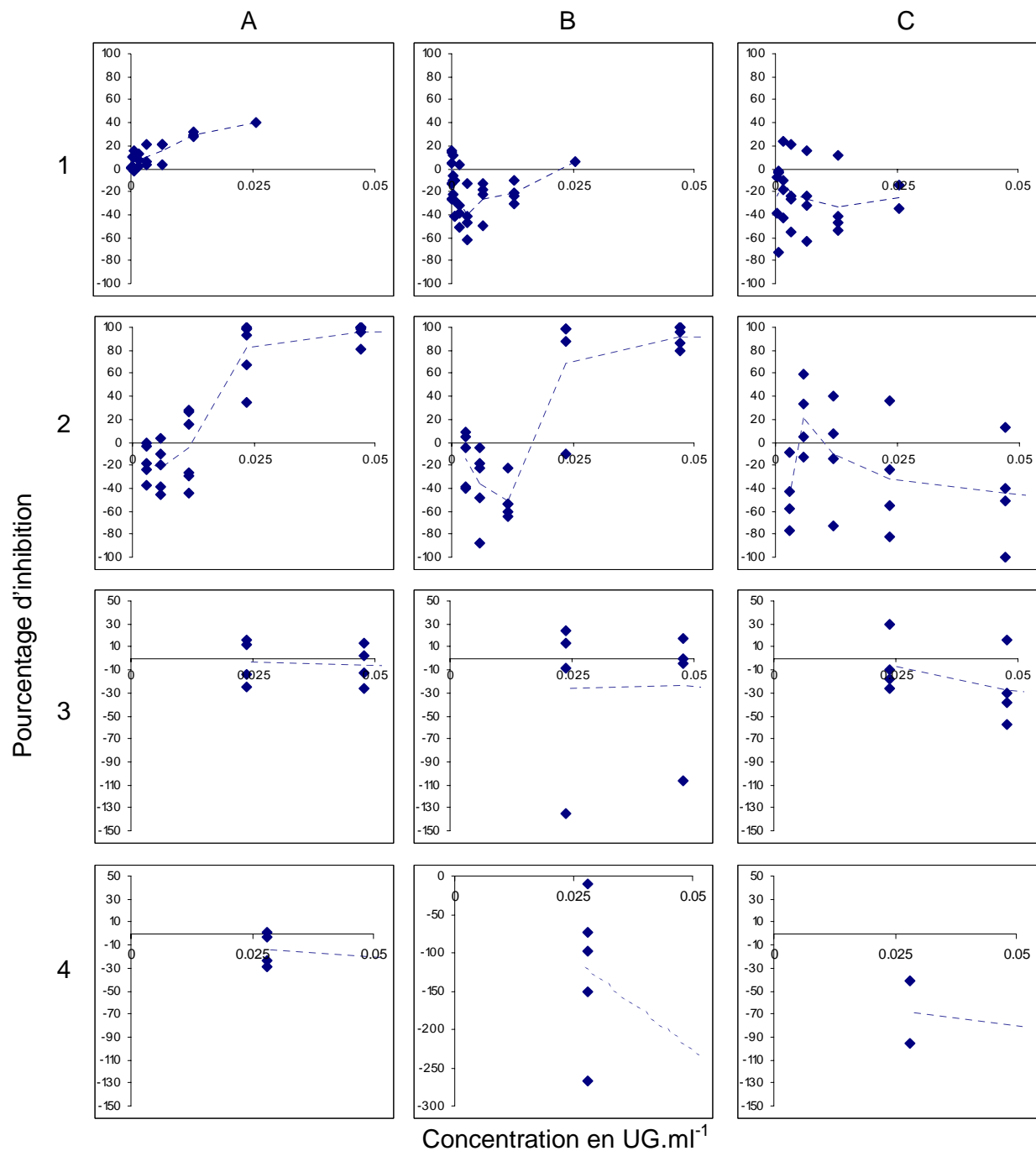


Figure 34 – Pourcentage d’inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en UG.ml<sup>-1</sup> pour 4 glucanases EC 3.2.1.6 β-glucanase (ligne 1), Finizyme (ligne 2), Ultraflo (ligne 3) et Viscozyme (ligne 4) selon les 3 protocoles d’essais, prévention d’un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d’un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d’un biofilm de 3h en colonne C.

En conclusion, on a pu observer une meilleure efficacité de la subtilisine par rapport à la Savinase (Figure 24, Figure 25 et Tableau 16). Ce résultat n’apparaît pas avec les activités β-glucanase et pectinase. Ces différences de potentiel antisalissure entre les préparations « pures » et les préparations à usage industriel peuvent s’expliquer à la fois par la présence d’activités enzymatiques secondaires au sein de la préparation mais aussi par la présence d’additifs, suggérant un effet des additifs sur le développement du biofilm.

### 3.2. Témoins enzymatiques chauffés

Dans la plupart des études en enzymologie, des témoins d'enzyme inactivée par la chaleur sont généralement effectués afin de vérifier que l'effet observé est lié à l'activité enzymatique. Le problème que nous avons rencontré ici est qu'avec les préparations commerciales, la chaleur induit non seulement l'inactivation de l'enzyme mais aussi d'autres réactions avec les additifs. La plupart des préparations enzymatiques commerciales sous forme liquide, une fois chauffées se sont d'ailleurs solidifiées. Il a donc été impossible de tester tous les témoins. Cependant, nous en avons réalisé quelques uns (Figure 35 et Figure 36).

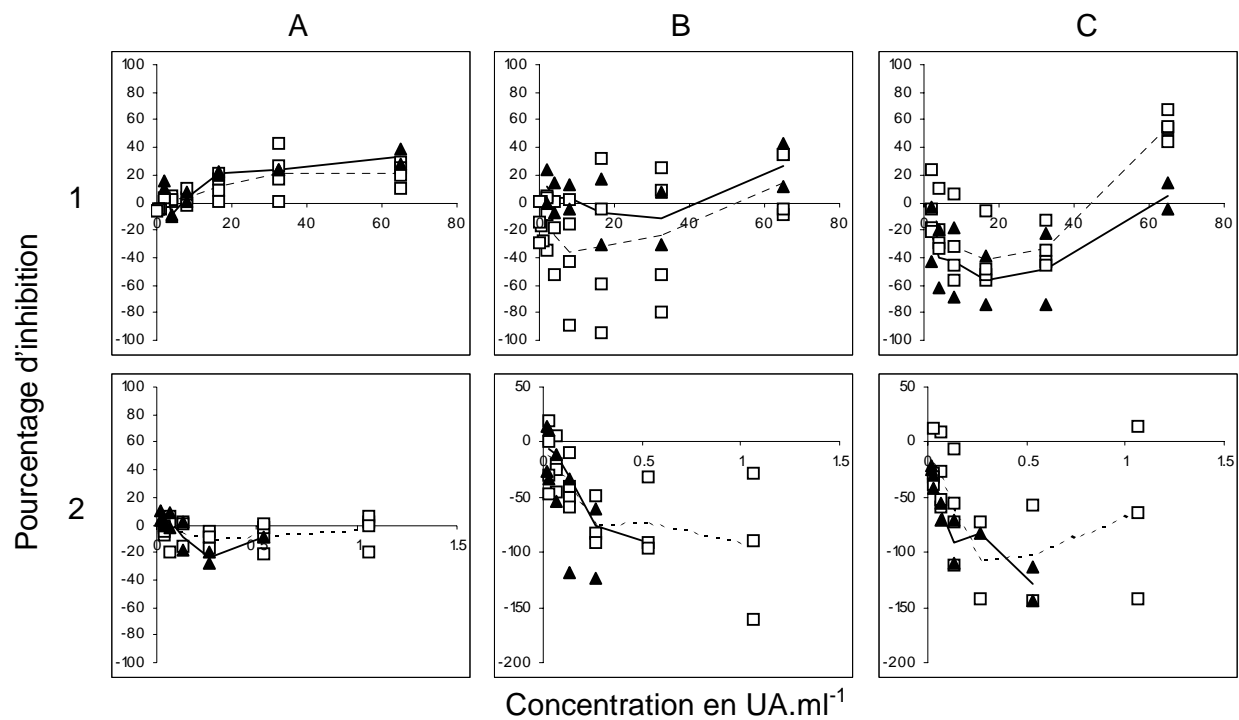


Figure 35 – Comparaison des pourcentages d'inhibition du biofilm en microplaque entre les témoins chauffés (▲) et les enzymes (□) pour  $\alpha$ -amylase (ligne 1) et Panlyve AG (ligne 2) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne

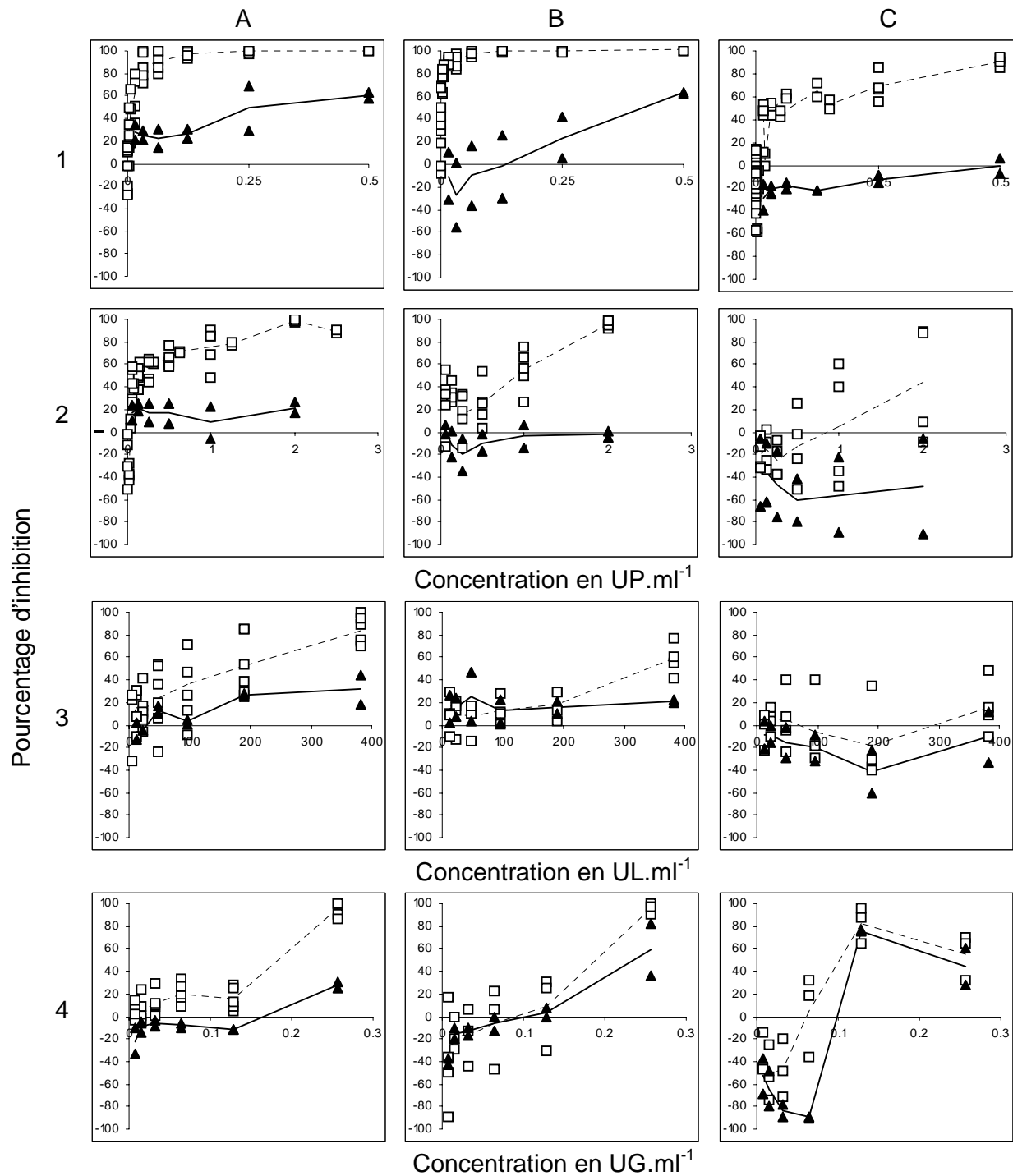


Figure 36 – Comparaison des pourcentages d’inhibition du biofilm en microplaque entre les témoins chauffés (▲) et les enzymes (□) pour la subtilisine (ligne 1), papaïne (ligne 2), Lipolase (ligne 3) et Glucanex (ligne 4) selon les 3 protocoles d’essais, prévention d’un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d’un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d’un biofilm de 3h en colonne C.

Sur ces essais, la papaïne et la subtilisine présentent un niveau d’inhibition différent de celui du témoin (enzyme chauffée). En effet, on s’attendait à ce que l’enzyme soit plus active en inhibition que le témoin chauffé, ce qui est le cas. Cependant, la subtilisine chauffée inhibe partiellement le biofilm de 3 heures en prévention et aux plus fortes concentrations en prévention du biofilm de 24 heures. En prévention pendant 3 heures, aux fortes

concentrations de la Lipolase et Glucanex, les témoins chauffés présentent moins d'inhibition.

Pour les autres enzymes testées (amylases, Lipolase, Glucanex), on observe un niveau d'inhibition identique en présence de la préparation enzymatique chauffée ou non. La Figure 37 montre que le traitement à la chaleur a pourtant bien inactivé les enzymes. Il apparaît évident que certaines inhibitions observées ne seraient donc pas liées à l'activité enzymatique propre de la préparation mais aussi à la présence d'additifs dans ces préparations, additifs qui seraient non sensibles à des températures élevées.

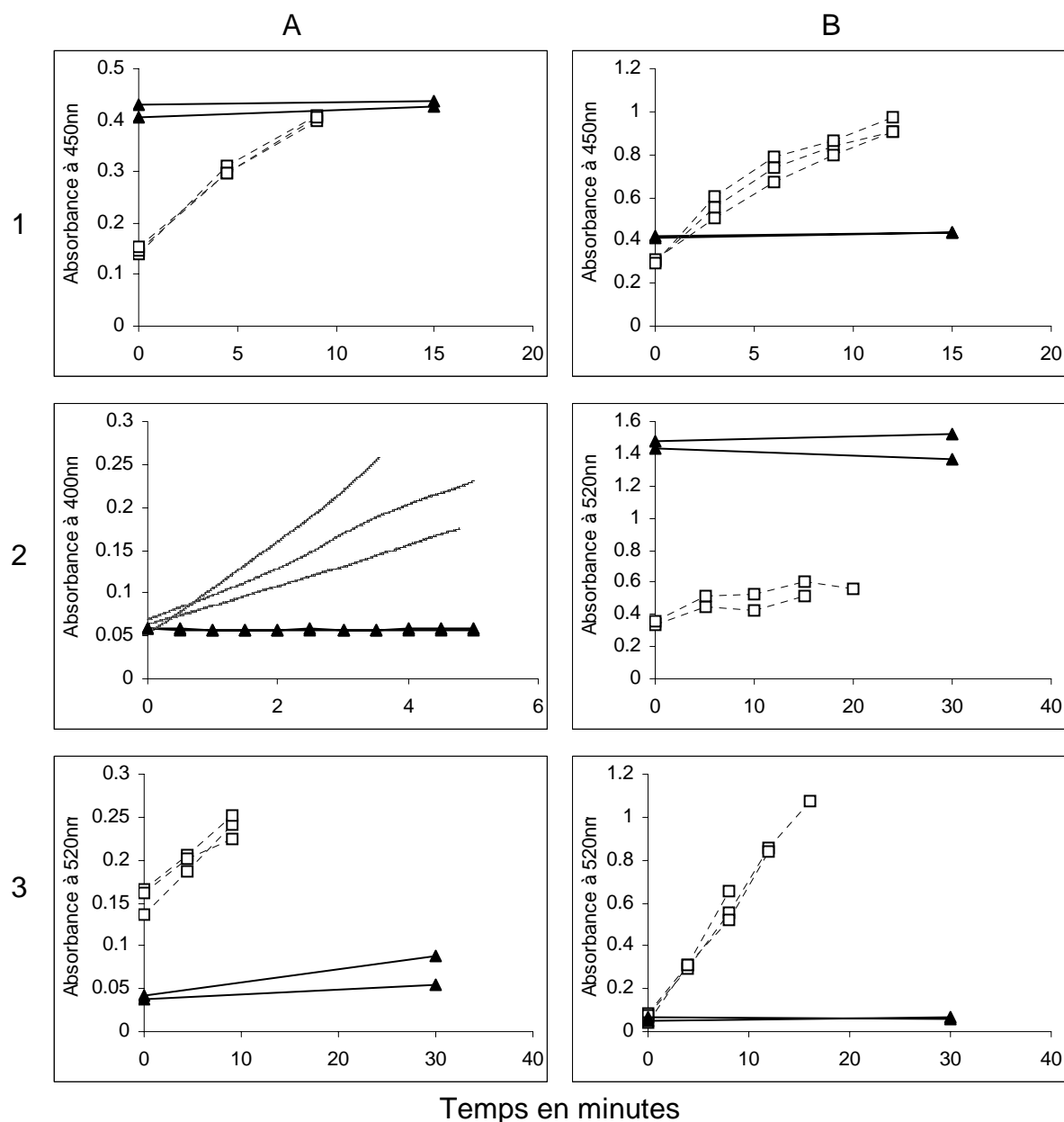


Figure 37 – Comparaison des cinétiques enzymatiques des témoins chauffés (▲) et des enzymes (□) pour la subtilisine (1A), la papaine (1B), la Lipolase (2A), Glucanex (2B),  $\alpha$ -amylase (3A) et Panlyve AG (3B) selon les protocoles de mesure de cinétiques enzymatiques à l'azocaséine pour les protéases, au p-nitrophényl butyrate pour l'estérase et Nelson et Somogyi pour les glycosidases, à 25°C pH 8,15.

### 3.3. Conclusion

Concernant Pectinex et Finizyme, il apparaît difficile de caractériser l'activité enzymatique responsable de l'inhibition observée, comme on a pu le faire avec la subtilisine par rapport à la Savinase. En effet, ces préparations contiennent des activités secondaires qui semblent elles aussi impliquées dans les inhibitions du biofilm.

Des inhibitions statistiquement significatives en présence des préparations enzymatiques inactivées sont observées. Le risque de travailler avec des enzymes commerciales est l'observation d'effets non spécifiques. Il semblerait que les additifs de ces préparations jouent un rôle dans le potentiel antisalissure des préparations enzymatiques, suggérant que les inhibitions observées peuvent être expliquées à la fois par les différentes activités enzymatiques des préparations commerciales mais aussi par la présence d'additifs.

Toutefois le fait de chauffer les préparations commerciales ne mène pas uniquement à l'inactivation de l'enzyme mais peut aussi provoquer des réactions non maîtrisées sur les additifs. Il faut donc rester vigilant quant à l'analyse des résultats de ces témoins.

De cette étude, les enzymes les plus efficaces et dont l'action ne semble pas liée à la présence d'additifs sont la subtilisine et la papaïne.



## 4. Augmentation du biofilm

Pour certaines enzymes, on peut observer à certaines concentrations une augmentation significative du biofilm. Cet effet d'augmentation du biofilm pourrait être dû à la fois à une augmentation du nombre de cellules adhérees mais aussi à une croissance du biofilm. Le comportement du biofilm vivant en microplaque sera donc étudié en présence de certaines enzymes. Puis, l'exemple de la protéase Amano en prévention d'un biofilm développé 24 heures en microplaque sera approfondi.

### 4.1. Marquage des cellules vivantes

Afin de connaître le comportement des cellules vivantes qui sont adhérees en présence d'une enzyme, le biofilm développé en microplaque est marqué au chlorure de tétrazolium 5-cyano-2,3-ditoyl (CTC). Ce marqueur de cellules vivantes pénètre dans la cellule bactérienne et est réduit par le système de transport d'électrons au cours de la respiration des bactéries. La Figure 38 et la Figure 39 montrent les valeurs expérimentales obtenues en comparaison avec celles déjà présentées, concernant le biofilm total marqué au DAPI. Nous avons choisi de montrer les résultats de 6 enzymes représentatives.

On observe en général un profil identique d'inhibition, quels que soient le protocole et l'enzyme, sur le biofilm vivant et sur le biofilm total. Les seules exceptions se rencontrent en présence de fortes augmentations du biofilm. En effet, pour Finizyme en lavage, protéase Amano en prévention d'un biofilm de 24 heures et Panlyve AG, on observe une faible inhibition des cellules vivantes adhérees alors que nous sommes en présence d'une augmentation significative du biofilm total. On peut donc conclure que les fortes augmentations de biofilm observées ne semblent pas dues à une croissance cellulaire au sein du biofilm qui résulterait plutôt en une augmentation du nombre de cellules vivantes.

Cette observation suggère également qu'en présence d'une augmentation du biofilm en microplaque, sa composition est différente : la proportion de cellules mortes est augmentée. On pourrait penser à une toxicité des préparations, cependant, les valeurs de la CmONT concernant Finizyme (Tableau 20) ne corroborent pas cette hypothèse.

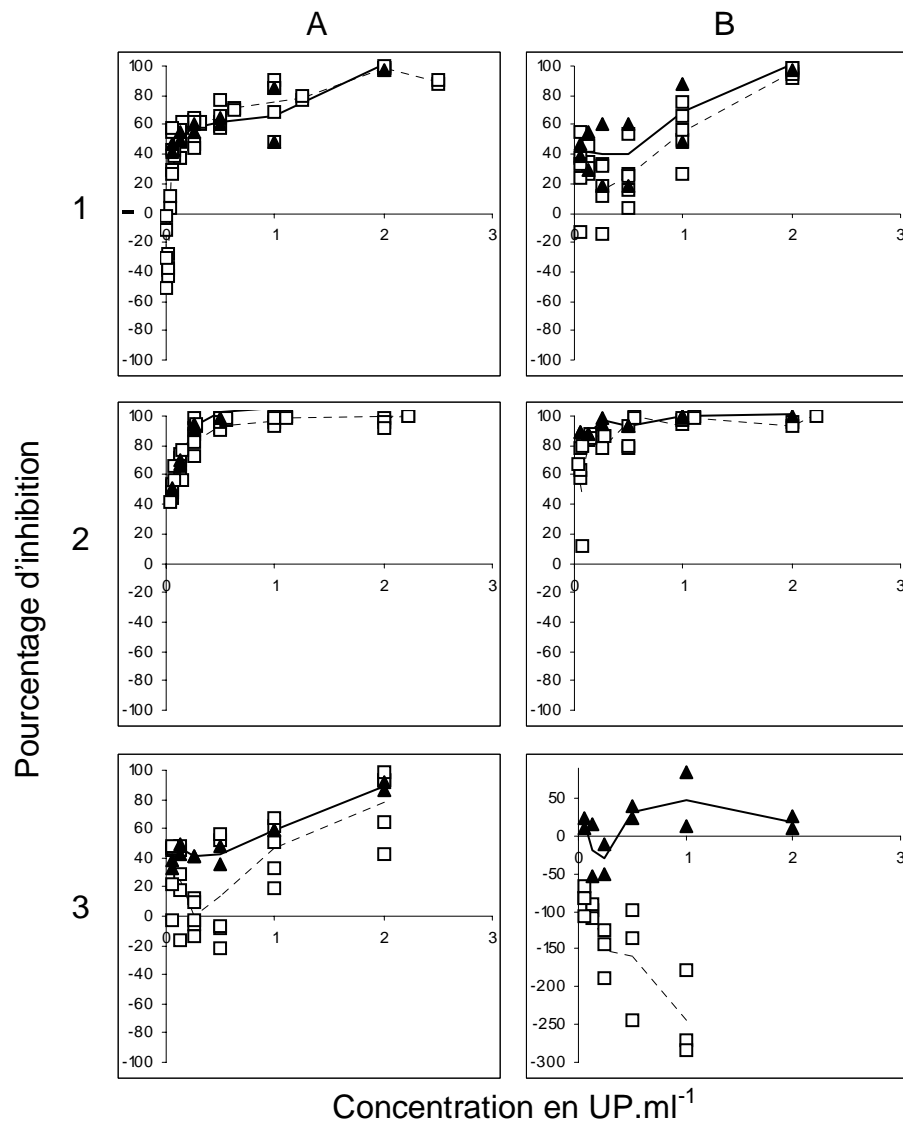


Figure 38 – Comparaison des pourcentages d'inhibition en microplaque du biofilm total marqué au DAPI (□) et du biofilm vivant marqué au CTC (▲) en présence de la papaine (ligne 1), Savinase (ligne 2) et protéase Amano (ligne 3) selon 2 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A et prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B.



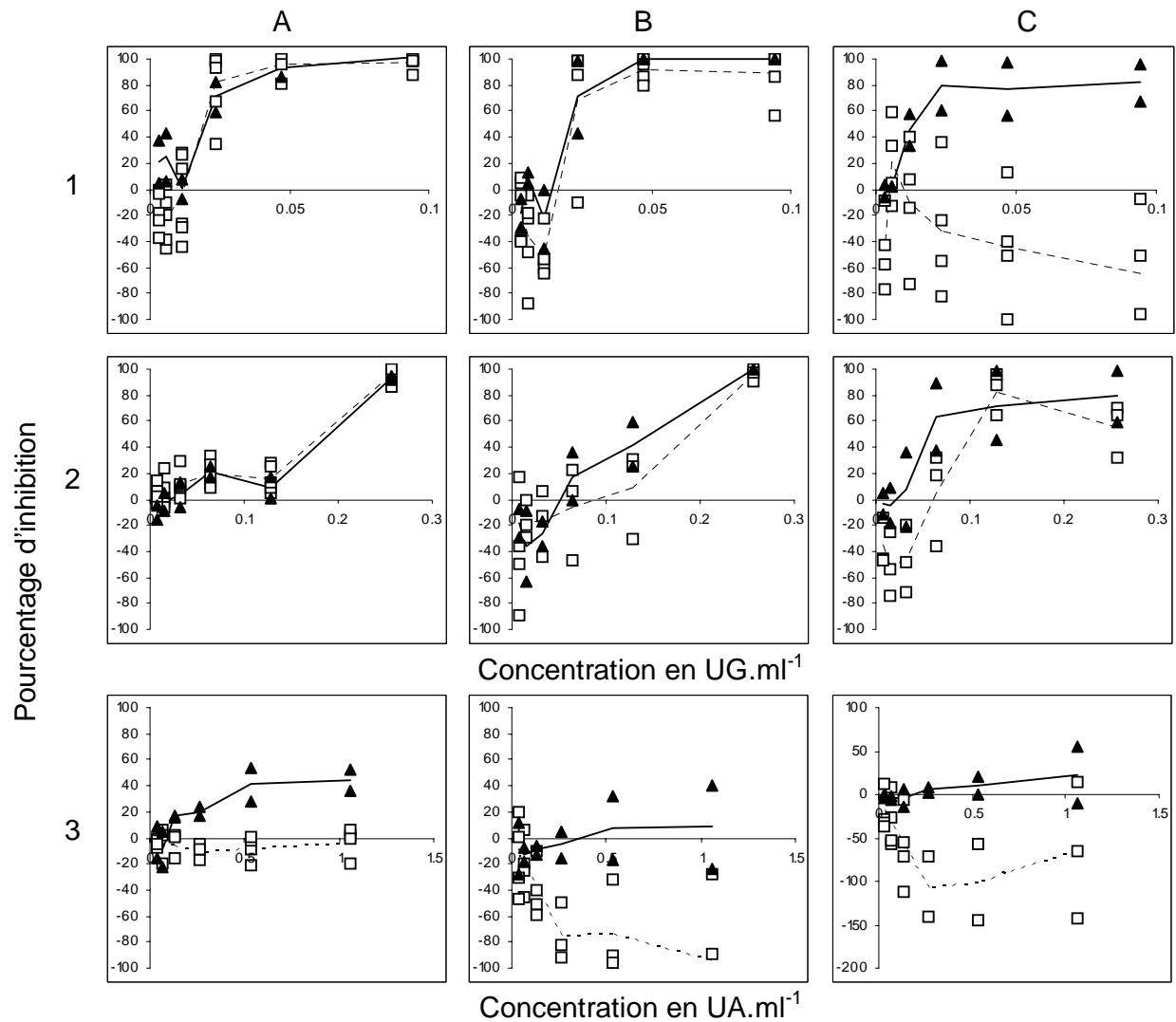


Figure 39 – Comparaison des pourcentages d’inhibition en microplaque du biofilm total marqué au DAPI (□) et du biofilm vivant marqué au CTC (▲) en présence de Finizyme (ligne 1), Glucanex (ligne 2) et Panlyve AG (ligne 3) selon les 3 protocoles d’essais, prévention d’un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d’un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d’un biofilm de 3h en colonne C.

En présence de certaines enzymes comme la protéase Amano en prévention d’un biofilm de 24 heures (Figure 38 3B), le signal DAPI augmente fortement par rapport au signal du contrôle sans protéase Amano, impliquant un pourcentage d’inhibition significativement négatif. Ceci ne s’observe pas en présence du CTC. Nous pouvons poser plusieurs hypothèses que nous allons tenter de vérifier par la suite :

- il existerait un artefact dans la mesure du signal DAPI. Pour cela, nous allons vérifier qu’il n’y a pas d’autofluorescence du biofilm en présence de la protéase Amano ou de la protéase Amano seule, ni de complexation de la protéase Amano avec le DAPI.
- l’augmentation de la fluorescence DAPI serait liée à une augmentation de la présence d’ADN au sein du biofilm ou d’un autre composé pouvant complexer le DAPI. Dans ce cas, l’augmentation de la fluorescence ne serait pas due à une augmentation du nombre de cellules. Nous allons donc racler le biofilm de sa surface et compter les bactéries décrochées au microscope à épifluorescence afin de s’assurer que nous

sommes bien en présence d'une augmentation du nombre de cellules totales et de confirmer ou non les résultats observés au marquage CTC via le dénombrement des cfu.

- s'il y a augmentation du nombre de cellules du biofilm, les bactéries en suspension adhèrent-elles davantage ou y a-t-il croissance des bactéries en suspension en eau de mer en présence de la protéase Amano ?
- on observe une inhibition en prévention d'un biofilm de 3 heures mais plus à 24 heures, la protéase Amano perdrait-elle de son activité en eau de mer en 24 heures ?

De plus, une observation en microscopie à épifluorescence sur lame de verre sera effectuée.

## 4.2. Exemple : protéase Amano

La protéase Amano présente une forte augmentation du biofilm en prévention d'un biofilm développé pendant 24 heures en microplaque (Figure 22 4B). Nous l'avons donc choisie pour étudier et tenter d'expliquer plus précisément l'effet d'augmentation du biofilm en microplaque en présence d'enzyme.

### 4.2.1. Autofluorescence et affinité DAPI

Nous avons réalisé des témoins afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'autofluorescence de la protéase Amano elle-même ou du biofilm développé en sa présence. La Figure 40 montre que la protéase Amano avec la D41 donne lieu à un faible signal d'autofluorescence du même ordre que celui du biofilm contrôlé non traité avec la protéase Amano.

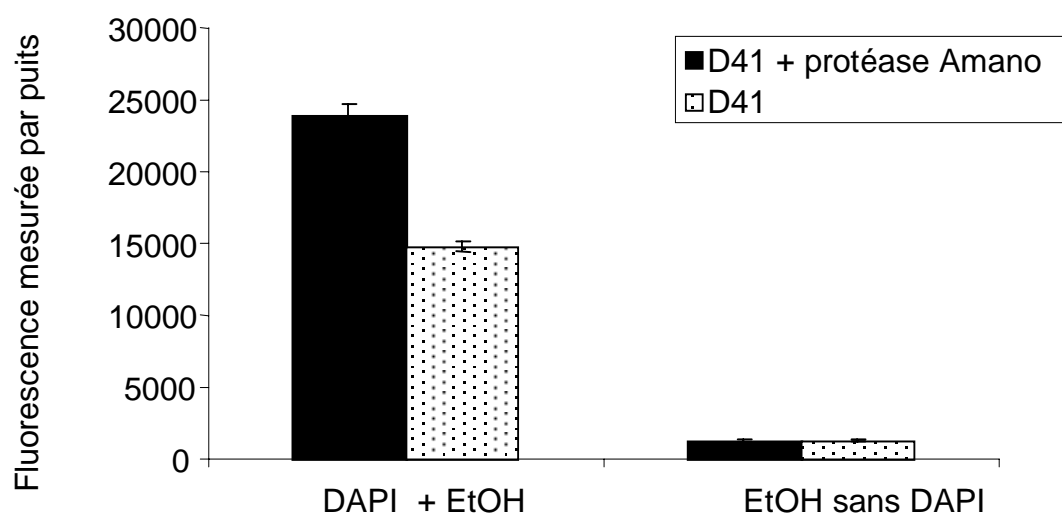


Figure 40 – Fluorescence mesurée par puits du biofilm en présence de la protéase Amano à 1 UP.ml<sup>-1</sup> (■) ou non (▨) selon le protocole de prévention 24h en microplaque, marquées ou non au DAPI avant solubilisation dans l'éthanol. L'écart type est calculé à partir de 3 mesures effectuées sur 3 puits d'une même microplaque.

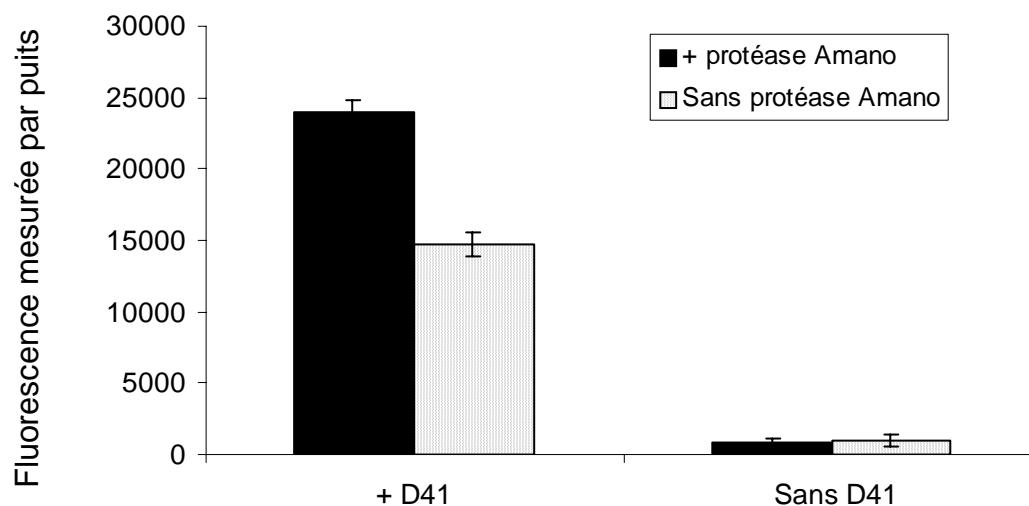


Figure 41 – Fluorescence mesurée par puits de la protéase Amano (■) ou de l'eau de mer (•••) incubées selon le protocole de prévention 24h en microplaque en présence ou non de la D41, marquées au DAPI avant solubilisation dans l'éthanol. L'écart type est calculé à partir de 3 mesures effectuées sur 3 puits de 3 microplaques différentes.

Nous avons réalisé des témoins afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'affinité du DAPI pour la protéase Amano elle-même. La Figure 41 montre que la protéase Amano sans D41 marquée au DAPI présente un faible signal de fluorescence du même ordre que celui des témoins sans la protéase Amano.

Ces expériences nous permettent d'écarter l'hypothèse d'un artéfact dans la mesure de la fluorescence lié à une complexation d'un composé au marqueur DAPI. Le dénombrement nous permettra de l'affirmer.

#### 4.2.2. Dénombrement

Le DAPI possède une grande affinité pour l'ADN et forme un complexe stable qui fluoresce approximativement 20 fois mieux que le DAPI seul. L'augmentation de la fluorescence pourrait être liée à une augmentation d'acides nucléiques au sein du biofilm. Afin de vérifier qu'on est bien en présence d'une augmentation du nombre de cellules du biofilm, les cellules adhérentes par puits ont été décrochées et dénombrées en présence ou non de la protéase Amano (Figure 42) selon le protocole décrit dans le chapitre 2 paragraphe 3.9.3.

Pour le contrôle, le nombre de cfu est supérieur à celui des cellules totales. Normalement, la quantité de cellules totales est augmentée d'au moins un log comparée à celle des cfu (Rubio, 2002). Ce résultat peut s'expliquer par le protocole employé pour dénombrer les cellules totales. En effet, la présence d'amas de cellules a rendu le comptage en microscopie à épifluorescence difficile. Afin de désagréger ces amas, les cellules ont subi un traitement aux ultrasons (10 min. à 47 kHz) ayant pu induire une lyse d'une partie des cellules (Garabétian *et al.*, 1999 ; Fykse *et al.*, 2003), ce qui n'est pas le cas pour le comptage des cfu, non traitées aux ultrasons. Le nombre de cellules totales adhérentes serait donc sous-

estimé ; cependant on peut supposer que ce résultat n'influe pas sur les valeurs des pourcentages d'inhibition, puisque chaque échantillon (contrôle et traitement avec la protéase Amano) est traité selon le même protocole.

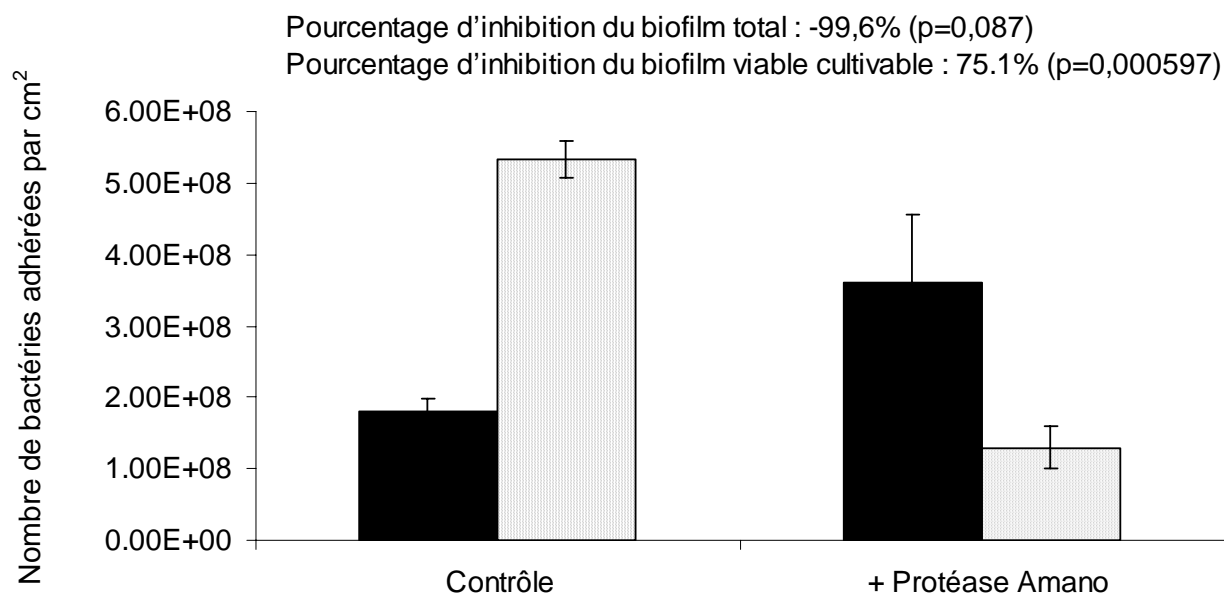


Figure 42 – Nombre moyen de cellules totales (■) et de cfu (▨) adhérentes par cm<sup>2</sup> de surface d'un puits de microplaque, les cellules décrochées sont d'un côté étalées sur Marine Agar et d'un autre marquées au DAPI puis comptées au microscope à épifluorescence. La protéase Amano (1 UP.ml<sup>-1</sup>) est incubée 1h avant les bactéries, incubées ensuite 24h. L'écart type est calculé à partir de 4 expérimentations au sein d'une même microplaque.

On observe une augmentation du nombre total des cellules de 99,6% et une inhibition des cfu de 75,1%. Ce résultat est en accord avec les résultats observés sur le biofilm en microplaque marqué au CTC. L'ensemble de ces données confirme que le signal DAPI mesuré au sein des puits de la microplaque est bien corrélé à une augmentation du nombre de cellules adhérentes en présence de la protéase Amano et non à un artefact de la mesure lié à la présence d'acides nucléiques ou d'autres molécules complexant le DAPI.

De plus, le nombre de cellules vivantes est diminué mais celui des cellules totales est augmenté, on observe donc une forte proportion de cellules mortes au sein de ce biofilm.

### 4.2.3. Stabilité enzymatique

Une inhibition est observée sur le biofilm développé 3 heures en microplaque en présence de la protéase Amano mais l'effet contraire (augmentation du biofilm) est observé sur 24 heures. La stabilité enzymatique de la protéase Amano en eau de mer a donc été vérifiée par une mesure de cinétique enzymatique en présence d'azocaséine après 10 minutes d'incubation (Figure 43). Le résultat montre que la protéase Amano est stable en eau de mer sur 24 heures et son activité semble un peu diminuée à partir de 48 heures d'incubation.

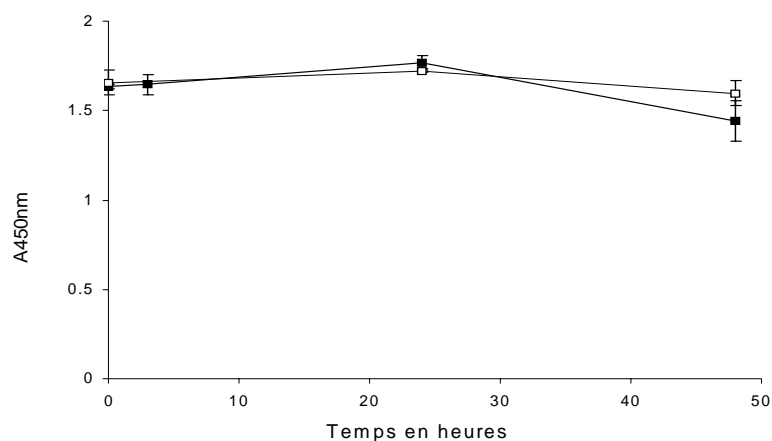


Figure 43 – Mesure de l'activité de la protéase Amano ( $1 \text{ UP.ml}^{-1}$ ) avec l'azocaséine. La protéase Amano est incubée en eau de mer en présence de D41(□) ou non(■) à  $20^{\circ}\text{C}$  sous agitation. L'écart type est calculé à partir de 3 séries effectuées.

#### 4.2.4. Substrat nutritif

Les enzymes étant des protéines, nous nous sommes posés la question de savoir si elles pouvaient servir de substrat et permettre au biofilm de croître. L'absorbance de la solution de D41 en présence de la protéase Amano additionnée à de l'eau de mer se comporte jusqu'à 24 heures d'incubation comme la D41 ajoutée à du milieu nutritif Marine Broth (Figure 44). Une légère croissance de la D41 en eau de mer additionnée de la protéase Amano est observée sur 48 heures. Les préparations enzymatiques seraient donc susceptibles d'être utilisées comme substrat par les bactéries.

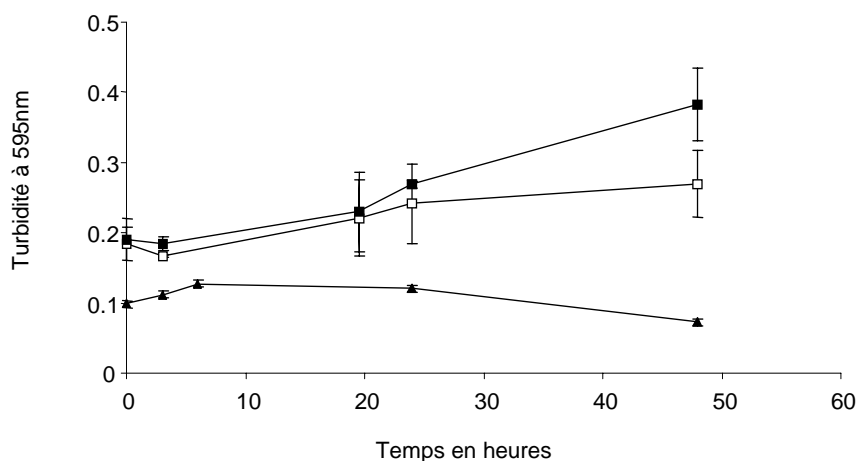


Figure 44 – Croissance de la D41 en MB(■), eau de mer naturelle filtrée + Protéase Amano ( $1 \text{ UP.ml}^{-1}$ ) (□) et eau de mer naturelle filtrée seule (▲), en tubes de verre (Volume final 10 ml) à  $20^{\circ}\text{C}$ . L'écart type est calculé à partir de 3 séries effectuées.

### 4.2.5. Observations en microscopie

La D41 a été immergée 24 heures en eau de mer naturelle stérile en présence de la protéase Amano ou non sur lame de verre. Le biofilm marqué au DAPI est ensuite observé en microscopie à épifluorescence (Figure 45). Les bactéries adhèrent de manière homogène sur le verre après une immersion de 24 heures en eau de mer stérile (Figure 45A). En présence de la protéase Amano (Figure 45B), elles adhèrent en amas.

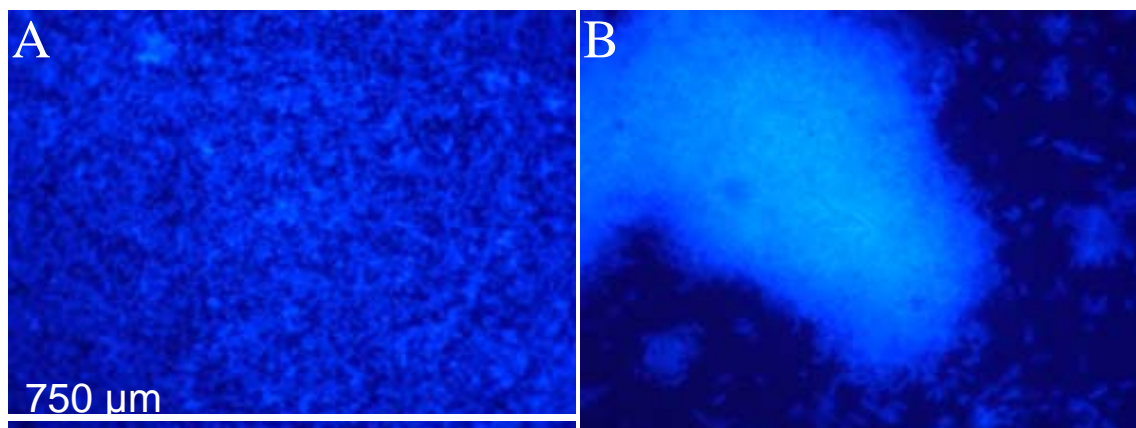


Figure 45 – Images de microscopie à épifluorescence de bactéries *Pseudoalteromonas sp.* D41 incubées 24h en eau de mer (A) en présence de la protéase Amano ( $1\text{UP}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) ajoutée 1 heure avant la D41 (B), sur une surface de verre et marquées au DAPI avant observation microscopique.

Sachant que les propriétés physico-chimiques de surface influencent les premières étapes de l'adhésion des bactéries, la différence observée ici suggère que l'adsorption de la protéase a induit des changements de propriétés physico-chimiques de la surface. L'étude de la composition de biofilms mixtes en amas a montré que la base pouvait être formée de bactéries de natures différentes de celles formant la microcolonie supérieure, suggérant une différence d'organisation spatiale selon l'affinité des bactéries pour la surface (Sasahara et Zottola, 1993 ; Hood et Zottola, 1995 ; Stewart *et al.*, 1997). Ces résultats ont également été observés au sein d'un biofilm mono espèce chez *Pseudoalteromonas aeruginosa*. Les cellules de la base du biofilm en forme de champignon ne présentent pas le même phénotype que celle de la partie supérieure (Lawrence *et al.*, 1991 ; Klausen *et al.*, 2003). On observe en microplaque une inhibition du biofilm en prévention sur un biofilm de 3 heures mais une augmentation à 24 heures. En présence de la protéase Amano, il apparaît que la surface ne semble plus propice à une adhésion, les bactéries pionnières pourraient donc servir d'ancrage aux suivantes en leur évitant d'adhérer sur la surface non propice, menant ainsi à la formation d'amas.

### 4.3. Discussion

Nous avons donc montré, au cours de ces différentes études, que l'augmentation du biofilm de 24 heures en microplaque en présence de la protéase Amano n'est pas liée à une perte d'activité enzymatique en eau de mer, ni à un artefact dans la mesure de fluorescence.

Le marquage au CTC révèle que l'augmentation du biofilm est visible sur les cellules totales alors que les cellules vivantes ne semblent pas être augmentées. La Figure 38 (3B) et la

Figure 39 (3B, 3C) montrent que le nombre de cellules total augmente de façon significative contrairement au nombre de cellules vivantes qui n'est pas inhibé de façon significative par rapport au biofilm non traité. La composition du biofilm en présence de protéase Amano serait plus importante en cellules mortes que le biofilm non traité.

L'observation en microscopie à épifluorescence a montré que les bactéries en présence de la protéase Amano adhèrent en amas par rapport à un biofilm non traité. Le fait d'adhérer en amas pourrait expliquer la forte proportion en cellules mortes. La superposition de cellules sur la surface induirait une forte mortalité pouvant être liée à des problèmes de diffusion d'oxygène au sein du biofilm. Cependant, l'adhésion en amas permettrait de diminuer la diffusion de la protéase Amano au sein du biofilm, montrant une adaptabilité des bactéries en présence d'un stimuli néfaste à leur adhésion. Ce mécanisme est également décrit concernant la résistance des biofilms aux antibiotiques. La formation d'amas permettrait de retarder la diffusion de l'antibiotique au sein du biofilm (Stewart et Costerton, 2001).

Les cellules incubées en phase stationnaire à  $2.10^9$  cfu.ml<sup>-1</sup> par puits continuent de se multiplier et un équilibre s'établit entre le nombre de cellules mortes et celui de cellules vivantes menant à un nombre de cellules total constant. L'adhésion des bactéries après 3 heures d'incubation est inhibée en présence de la protéase Amano, mais pas après 24 heures. A partir de 3 heures, les bactéries pionnières adhèrent sur la surface non propice à l'adhésion mais de façon réduite par rapport au contrôle. Avec le temps les bactéries adhèrent en amas et limiteraient ainsi les contacts avec la surface non propice à leur adhésion. Cette adhésion en amas pourrait induire une forte mortalité mais plus probablement pourrait retarder la pénétration de la protéase Amano au sein du biofilm. La mort de certaines cellules permettrait à d'autres de persister et de survivre, leur servant de réservoir nutritif, c'est pourquoi on observe un nombre de cellules vivantes constant alors que celui des cellules mortes augmente. Ce phénomène, observable à 24 heures et non à 3 heures, est dépendant du temps d'une part pour permettre l'adhésion sur une surface non propice et d'autre part pour permettre la croissance.

Il a été montré récemment qu'une quantité insuffisante en biocide (2,2 dibromo-3-nitrilopropionamide) pouvait induire une augmentation du biofilm (Grant et Bott, 2005). En présence de la protéase Amano nous observons une adhésion en amas et une augmentation de la densité cellulaire adhérente. Ces résultats s'expliqueraient par un mécanisme de résistance aux enzymes, similaire à ceux décrits en présence d'antibiotiques ou d'agents antimicrobiens de type biocides (Mach et O'Toole, 2001 ; Stewart et Costerton, 2001).





## 5. Mélange d'enzymes

Nous nous sommes demandés si l'utilisation d'enzymes en mélange pouvait être possible dans le but à la fois d'établir un mélange d'activités enzymatiques diverses, permettant d'obtenir un spectre d'action plus large. Nous voulons également optimiser les concentrations d'enzymes à utiliser. En effet, dans la nature les enzymes sont rarement utilisées seules mais plutôt en tant que complexe enzymatique. Ces complexes permettent une action concertée sur un substrat.

Le fait de mélanger des enzymes peut entraîner des interactions. Ces interactions peuvent être de différentes natures entraînant des effets de type :

- additif : l'effet combiné de deux produits est égal à la somme des effets de chaque produit pris individuellement.
- antagoniste : l'effet combiné de deux produits est inférieur à la somme des effets de chaque produit pris individuellement.
- synergique : l'effet combiné de deux produits est supérieur à la somme des effets de chaque produit pris individuellement.

Pour cette étude nous avons utilisé la méthode des plans d'expériences avec le logiciel Statgraphics Plus 5.0. Un plan factoriel complet à 2 niveaux a été réalisé afin d'étudier les interactions des enzymes entre elles. Les enzymes constituant le mélange ont été sélectionnées en fonction des résultats observés avec le protocole de prévention d'un biofilm développé pendant 3 heures. Nous avons choisi celles qui présentaient un profil d'inhibition maximal comme la papaïne, la subtilisine et Glucanex. Nous avons également sélectionné des enzymes afin d'obtenir une diversité d'activités hydrolases au sein du mélange. Nous avons donc choisi d'ajouter l' $\alpha$ -amylase et Lipolase.

### 5.1. Etude des interactions d'enzymes en mélange

#### 5.1.1. Plan d'expérience

Les conditions du protocole sont celles utilisées pour la prévention d'un biofilm développé pendant 3 heures en microplaque. La seule différence réside dans le rapport entre le volume d'enzyme déposée et celui des bactéries qui est augmenté de 0,2 à 0,4.

Dans le but d'étudier les interactions des enzymes nous avons choisi un plan d'expérience factoriel complet à 5 facteurs et 2 niveaux. Les facteurs sont les 5 enzymes à tester, la réponse la mesure de fluorescence et les niveaux -1 et +1 correspondent respectivement à l'absence d'enzyme et à la présence d'enzyme à la concentration nécessaire pour une inhibition permettant de visualiser la présence ou non d'effets synergiques et antagonistes. Les essais sont réalisés avec 5 points centraux, en double et de manière aléatoire par rapport à leur position au sein de la microplaque. Le nombre d'essais est de 74. Les valeurs de fluorescence mesurées seront traitées par le logiciel Statgraphics Plus 5.0 sous la forme d'un diagramme de Pareto. Ce diagramme permet de visualiser et de classer les facteurs par

ordre d'importance concernant leur effet sur les valeurs de fluorescences obtenues. De plus, les résultats seront également analysés comme précédemment, en calculant les pourcentages d'inhibition des enzymes seules ou en mélange par 2, par 3, par 4 et enfin toutes les 5.

Le niveau +1 de la concentration en enzyme déposée est décrit dans le Tableau 21. Les concentrations sont calculées, à partir des résultats expérimentaux déjà obtenus, pour obtenir un pourcentage d'inhibition proche de 25% afin de pouvoir visualiser des effets synergiques ou antagonistes éventuels.

Le graphique de Pareto est représenté sur la Figure 46. Les pourcentages d'inhibition sont représentés sur la Figure 47 et la Figure 48.

Tableau 21 – Niveau +1 de concentration finale en U.ml<sup>-1</sup> et en mg.ml<sup>-1</sup> d'enzyme déposée dans le puits de la microplaque après le dépôt des bactéries.

	Concentration en U.ml <sup>-1</sup>	Concentration en mg.ml <sup>-1</sup> ou µl.ml <sup>-1</sup>
Subtilisine	0,0022 UP.ml <sup>-1</sup>	0,08
Papaïne	0,096 UP.ml <sup>-1</sup>	4,858
Glucanex	0,05 UC.ml <sup>-1</sup>	32
	0,082 UG.ml <sup>-1</sup>	
	0,0144 UP.ml <sup>-1</sup>	
α-amylase	26 UA.ml <sup>-1</sup>	80
Lipolase	50,88 UL.ml <sup>-1</sup>	26,64
	120,6 UE.ml <sup>-1</sup>	

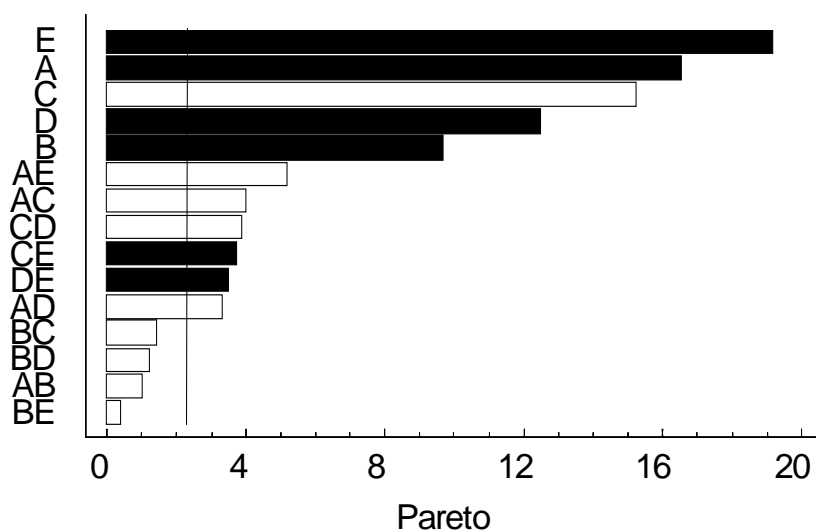


Figure 46 – Diagramme de Pareto montrant en noir les effets d'inhibition (■) et en blanc les effets d'augmentation (□) de la fluorescence pour chaque enzyme et pour les mélanges d'enzymes 2 à 2. La droite représente le seuil de significativité à 95%. A : subtilisine ; B : papaïne ; C : Glucanex ; D : α-amylase ; E : Lipolase.

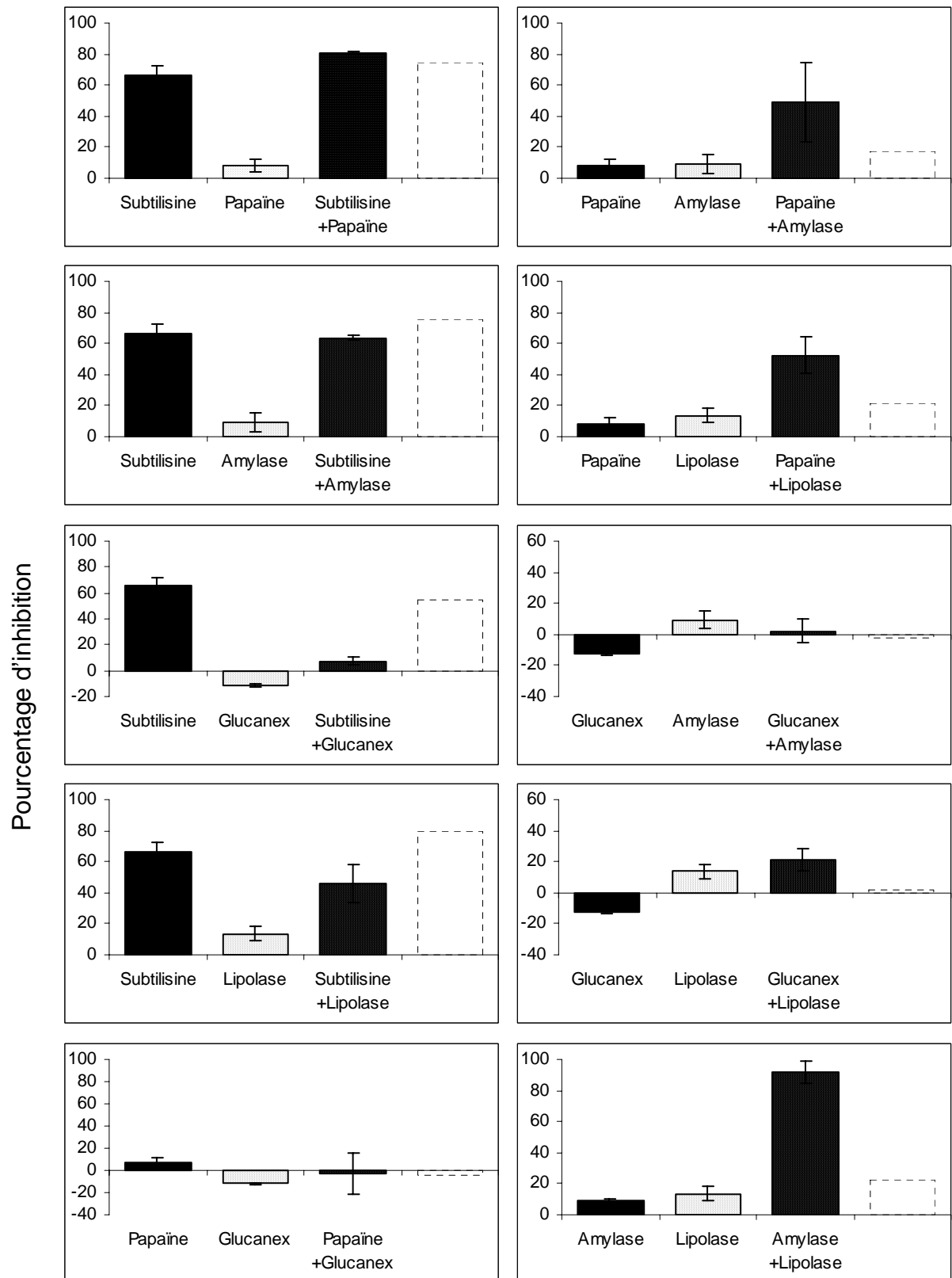


Figure 47 – Etude des interactions d'ordre 2 : pourcentage d'inhibition mesuré en fonction de la nature de l'enzyme déposée seule ou en mélange de 2. La somme des 2 pourcentages d'inhibition des enzymes seules est calculée et représentée en pointillé (résultat attendu si les interactions sont nulles). Les enzymes sont déposées selon le protocole de prévention d'un biofilm développé 3h en microplaque. L'écart type est calculé à partir des 2 séries effectuées.

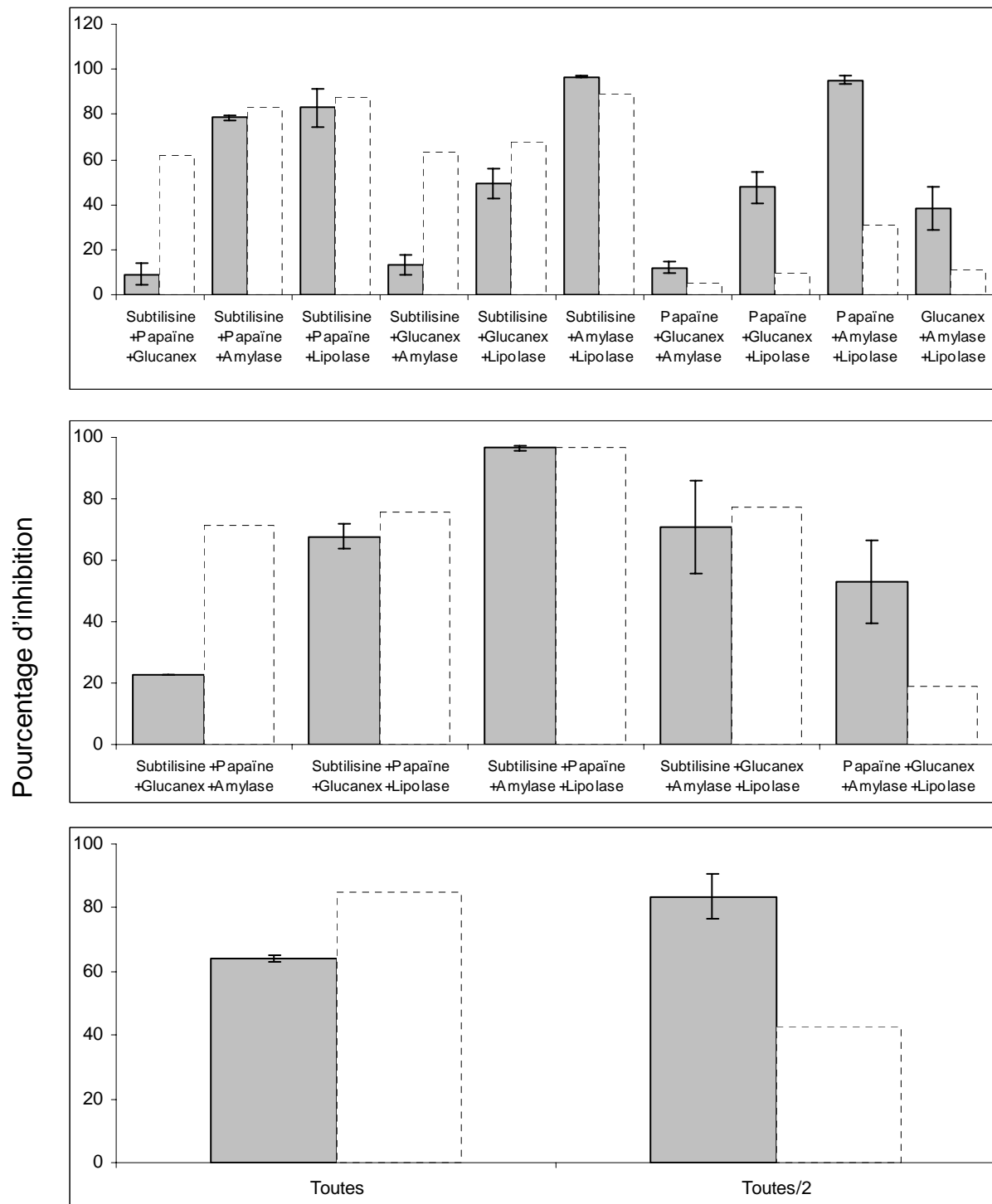


Figure 48 – Etude des interactions d'ordre supérieur à 2 : pourcentage d'inhibition mesuré en fonction de la nature des enzymes déposée en mélange (de 3, 4 ou 5). La somme des pourcentages d'inhibition des enzymes seules est calculée et représentée en pointillé (résultat attendu si les interactions sont nulles). Les enzymes sont déposées selon le protocole de prévention d'un biofilm développé 3h en microplaque. L'écart type est calculé à partir des 2 séries effectuées.

Le graphique de Pareto nous montre que les enzymes ayant comme effet de diminuer de manière significative à 95% la fluorescence sont classées selon l'ordre d'importance suivant : Lipolase > subtilisine >  $\alpha$ -amylase > papaïne. Seule Glucanex est un facteur qui

augmente la fluorescence. Certaines interactions d'ordre 2 influencent de manière significative la fluorescence : Lipolase, Glucanex ainsi que Lipolase et  $\alpha$ -amylase diminuent la fluorescence ; toutes les interactions avec la subtilisine, sauf avec la papaïne, l'augmente. Les interactions en présence de papaïne n'ont pas d'effet significatif.

La Figure 47 présente les interactions d'ordre 2. On n'observe pas d'interaction entre la subtilisine et la papaïne, subtilisine et  $\alpha$ -amylase et Glucanex et  $\alpha$ -amylase. On observe un effet antagoniste entre subtilisine et Glucanex, subtilisine et Lipolase. On observe un faible effet synergique (compte tenu des écarts types) entre la papaïne et l' $\alpha$ -amylase, papaïne et Lipolase. On observe un effet synergique entre Lipolase,  $\alpha$ -amylase et Glucanex, Lipolase.

Concernant les interactions d'ordre 3 (Figure 48), on observe un fort effet antagoniste entre subtilisine-papaïne-Glucanex ainsi qu'avec subtilisine- $\alpha$ -amylase-Glucanex ; cet effet se retrouve mais plus faiblement avec le mélange subtilisine-Glucanex-Lipolase. D'une manière générale en présence du mélange subtilisine-Glucanex l'effet antagoniste est présent quelle que soit la troisième enzyme présente dans le mélange. Cependant, en présence de la Lipolase l'effet antagoniste subtilisine-Glucanex semble diminué probablement à cause de l'effet synergique du mélange Glucanex-Lipolase et  $\alpha$ -amylase-Lipolase.

On observe un effet synergique important pour les mélanges papaïne-Glucanex-Lipolase, papaïne- $\alpha$ -amylase-Lipolase, Glucanex-Lipolase- $\alpha$ -amylase et moins important pour papaïne-Glucanex - $\alpha$ -amylase. En effet, en présence des mélanges de 2 enzymes présentant une synergie, on observe une synergie à nouveau en présence de la papaïne. Ces résultats confirment la non interaction de la papaïne quelque soit l'enzyme mélangée avec elle, ainsi que le fort effet synergique de Glucanex-Lipolase.

On n'observe pas ou peu d'interaction entre les autres : subtilisine- $\alpha$ -amylase-Lipolase, subtilisine-papaïne- $\alpha$ -amylase et subtilisine-papaïne-Lipolase. Ces résultats montrent que l'effet antagoniste subtilisine-Lipolase semble être diminué en présence d'une troisième enzyme.

Les meilleurs pourcentages d'inhibition sont obtenus en présence des mélanges subtilisine-Lipolase- $\alpha$ -amylase ainsi que papaïne-Lipolase- $\alpha$ -amylase. Ce résultat suggère que la présence de l' $\alpha$ -amylase et Lipolase est intéressante au sein d'un mélange. Il présente notamment un fort effet synergique en présence de la papaïne, davantage qu'en présence de la subtilisine, ceci pouvant s'expliquer par l'effet élevé de la subtilisine seule.

Concernant les interactions d'ordre 4, la présence de subtilisine et Glucanex induit un important effet antagoniste, diminué en présence de Lipolase. Le mélange papaïne- $\alpha$ -amylase-Lipolase-Glucanex présente un important effet synergique, lié à celui de Glucanex-Lipolase et de  $\alpha$ -amylase-Lipolase. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé reste cependant celui du mélange subtilisine-papaïne- $\alpha$ -amylase-Lipolase.

On observe également que le pourcentage d'inhibition des 5 enzymes mélangées chacune au niveau 0 (concentration du niveau 1 divisée par deux) est supérieur à celui en présence des 5 enzymes mélangées chacune au niveau 1. On observe donc la présence d'un fort effet inhibiteur au sein du mélange.

En conclusion, on observe des interactions à la fois négatives et positives selon la nature des enzymes impliquées dans le mélange. Les résultats observés en pourcentage d'inhibition sont en adéquation avec ceux du diagramme de Pareto. Ce dernier a permis de caractériser les facteurs les plus influents du mélange sur la fluorescence. Il apparaît que la Lipolase est le facteur dans le mélange qui influence le plus la diminution de la fluorescence. Ces résultats nous apportent de nouvelles informations par rapport à celles déjà obtenues lors du criblage. En effet, la Lipolase seule ne présente pas un fort potentiel antialissure. Par contre en mélange, la Lipolase influence fortement la diminution de la fluorescence. Il apparaît qu'elle présente un effet synergique en présence de Glucanex et de l' $\alpha$ -amylase et un effet antagoniste en présence de subtilisine. Cette enzyme semble posséder un fort potentiel d'interaction lorsqu'elle est en mélange avec d'autres.

Dans le but d'optimiser les quantités de chaque enzyme à déposer au sein du mélange, nous avons voulu utiliser la méthodologie de surface de réponse. Cette méthode permet, par ajustement des valeurs expérimentales selon un modèle mathématique, de prévoir les concentrations de chaque facteur permettant d'obtenir une réponse optimale. Pour cela, le logiciel Statgraphics Plus 5.0 calcule des valeurs prédictives, ajustées aux valeurs expérimentales observées selon un modèle linéaire. Cependant, le modèle linéaire ne correspond pas au modèle sigmoïde que nous observons et les valeurs calculées ne présentaient pas d'adéquation avec les valeurs expérimentales obtenues.

Pour la suite de l'étude, nous avons sélectionné le mélange subtilisine, papaïne,  $\alpha$ -amylase et Lipolase aux concentrations du niveau +1 du plan d'expérience (Tableau 21). Nous avons sélectionné la subtilisine pour son fort potentiel antialissure, la Lipolase pour son fort potentiel d'interaction, l' $\alpha$ -amylase pour son effet synergique avec la Lipolase. Du fait de l'effet antagoniste entre la subtilisine et Glucanex nous avons éliminé Glucanex du mélange. Enfin, c'est en présence du mélange subtilisine, papaïne,  $\alpha$ -amylase et Lipolase que les plus forts pourcentages d'inhibition ont été observés. Ce mélange a de plus l'avantage de mettre en œuvre différentes activités enzymatiques : protéase,  $\alpha$ -amylase et lipase, estérase.

### 5.1.2. Cinétiques enzymatiques des interactions d'ordre 2

Afin de comprendre le mécanisme des interactions d'ordre 2 et savoir notamment s'il est dépendant du substrat biofilm ou intrinsèque aux préparations enzymatiques, nous avons réalisé des cinétiques sur le substrat naturel de chaque enzyme. Nous avons mesuré les cinétiques enzymatiques des 4 enzymes sélectionnées, mélangées 2 à 2 et comparé les résultats avec ceux observés sur le biofilm.

Les enzymes ont été mélangées 2 à 2 dans les conditions de concentrations déposées initialement dans les puits pour l'étude précédente (Tableau 21) et incubées une heure avant de mesurer les activités enzymatiques. On ajoute alors le substrat naturel de chaque enzyme et la mesure est effectuée, après avoir préalablement réalisé les dilutions nécessaires. Les résultats sont présentés sur la Figure 49 et les observations sont résumées dans le Tableau 22.

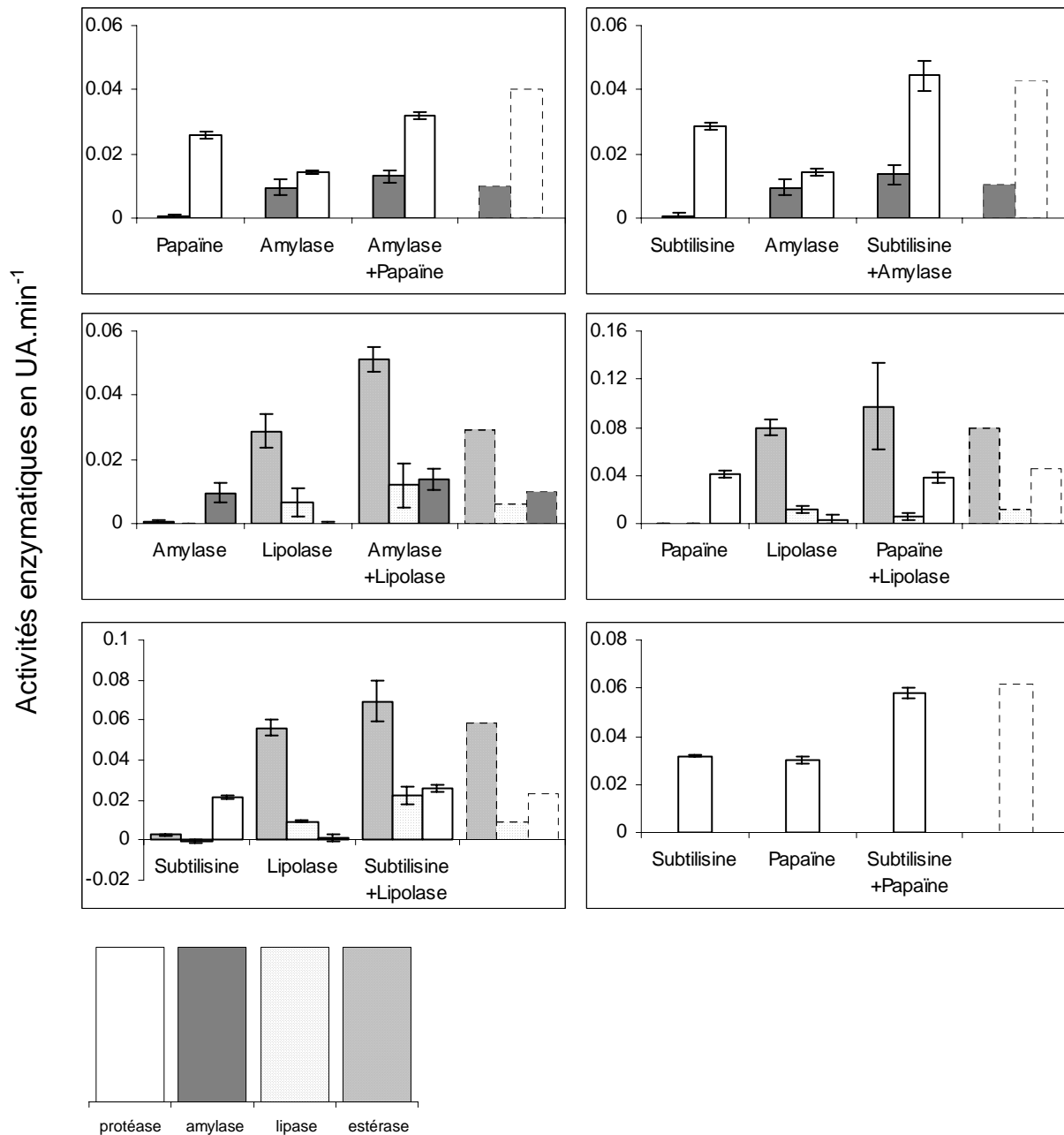


Figure 49 – Etude des interactions d'ordre 2 : activités mesurées par activité enzymatique au sein du mélange de 2 enzymes. La somme des 2 vitesses initiales mesurées par activité est calculée et représentée en pointillés. Les vitesses initiales des protéases, des amylases, des estérases et des lipases sont mesurées respectivement par le test à l'azocaséine, celui de Nelson et Somogyi, celui avec le p-nitrophényl butyrate (C<sub>4:0</sub>) et le p-nitrophényl palmitate (C<sub>16:0</sub>). L'écart type est calculé à partir des 3 séries effectuées.

Tableau 22 – Résumé des variations des vitesses initiales des enzymes en mélanges 2 à 2 et comparaison avec les résultats observés sur le biofilm en microplaque après dépôts en prévention d'enzymes mélangées 2 à 2. – signifie que l'activité de l'enzyme mesurée au sein du mélange est inférieure à celle mesurée pour l'enzyme seule et + que l'activité de l'enzyme mesurée au sein du mélange est supérieure à celle mesurée pour l'enzyme seule.

Mélange enzymatique	Activité protéase	Activité amylase	Activité estérase	Activité lipase	Nature de l'effet observé en microplaque sur le biofilm
Papaïne-amylase	–				Additif
Amylase-Lipolase			+ +		Synergique
Subtilisine-Lipolase				+	Antagoniste
Subtilisine-amylase		+			Légèrement antagoniste
Papaïne-Lipolase					Additif
Subtilisine-papaïne					Additif

Afin d'étudier les interactions, on compare l'activité mesurée du mélange des 2 enzymes à la somme de chaque activité mesurée par enzyme (représenté en pointillé sur la Figure 49). On observe alors qu'en présence du mélange papaïne- $\alpha$ -amylase, l'activité protéase diminue ; en présence du mélange  $\alpha$ -amylase-Lipolase, l'activité estérase est fortement augmentée ; en présence du mélange subtilisine-Lipolase, l'activité lipase est augmentée ; en présence du mélange subtilisine- $\alpha$ -amylase, l'activité amylase est légèrement augmentée ; en présence du mélange papaïne-Lipolase et papaïne-subtilisine, aucune activité n'est augmentée ni diminuée (et on remarque un fort écart type pour l'activité estérase du mélange).

Les résultats observés en présence de mélange enzymatique sur l'inhibition du biofilm en microplaque sont parfois en contradiction avec ceux des mesures de cinétiques enzymatiques. En effet, l'effet antagoniste précédemment observé entre la subtilisine et la Lipolase n'apparaît pas lors de la mesure des vitesses initiales sur le substrat naturel. On observe même une augmentation de la vitesse initiale de l'activité lipase. Il en est de même entre la subtilisine et l' $\alpha$ -amylase où la vitesse initiale de l'activité  $\alpha$ -amylase augmente alors que l'effet du mélange en microplaque était additif voir légèrement antagoniste. De même, alors que l'effet en microplaque du mélange papaïne- $\alpha$ -amylase semblait additif, on observe que la vitesse initiale de l'activité protéase diminue.

Par contre la vitesse initiale de l'activité estérase augmente fortement en présence du mélange  $\alpha$ -amylase-Lipolase, permettant d'expliquer en partie la synergie d'action des ces 2 enzymes sur le biofilm développé en microplaque. De même les effets additifs en présence du mélange papaïne-subtilisine ou papaïne-Lipolase sont confirmés par la mesure des vitesses initiales.

D'autre part, lors de cette étude, on a pu noter la présence d'une activité protéase associée à l'amylase et la Lipolase ainsi qu'une activité estérase associée à la subtilisine.

### 5.1.3. Discussion

Nous avons observé un effet de nature synergique entre la Lipolase et l' $\alpha$ -amylase. L'effet inhibiteur sur le biofilm traité en prévention est augmenté. On a montré que le mélange des



2 enzymes permet une augmentation de l'activité estérase. Leur interaction synergique ne semblerait pas dépendant du substrat biofilm mais serait en partie intrinsèque aux préparations enzymatiques. Cette information suggère un rôle de l'activité estérase en prévention du biofilm modèle utilisé. Cette hypothèse est également confortée par le fait que nous avons pu observer une activité estérase de la subtilisine, contrairement à la papaïne. De plus, la Lipolase présente la plus faible C50 en unités estérase par rapport aux autres lipases (Tableau 18).

Cependant, comment expliquer que le mélange Lipolase- $\alpha$ -amylase en eau de mer testé présente une hydrolyse du substrat p-nitrophényl butyrate supérieure à celle en absence de l' $\alpha$ -amylase. Les conditions de pH et de température sont les mêmes lorsque la Lipolase est seule ou en mélange. On a pu observer que l' $\alpha$ -amylase présentait une faible activité estérase. La présence d'un activateur de l'activité estérase de l' $\alpha$ -amylase ou de la Lipolase dans l'une des deux préparations enzymatiques permettrait d'expliquer ce phénomène.

D'autre part, la Lipolase présente différentes natures d'interactions positives ou négatives avec différentes enzymes (Glucanex,  $\alpha$ -amylase et subtilisine) sur le biofilm. Le fort potentiel d'interactions synergiques de la Lipolase pourrait s'expliquer d'une part par sa nature d'origine fongique, qui apporterait une complémentarité d'activité avec les autres enzymes d'origine bactérienne. En effet, il a été montré que l'utilisation d'enzymes d'origine d'espèces fongique et bactérienne au sein d'un mélange permettait d'augmenter la capacité d'hydrolyse de la chitine (Donzelli *et al.*, 2003). Un mélange d'enzymes d'origines diverses, notamment procaryote et eucaryote, apporterait une plus grande efficacité qu'un mélange d'enzyme provenant d'une même source.

La synergie pourrait s'expliquer d'autre part par le fait que le mélange de plusieurs enzymes permettrait une meilleure hydrolyse des molécules organiques cibles via un plus grand accès aux substrats. En effet, la ramification ou la substitution de certains sucres ou protéines peut entraîner un encombrement stérique empêchant l'accès de l'enzyme au site de son substrat (Vardakou *et al.*, 2004). De même, les polymères peuvent s'agréger entre eux et ainsi rendre difficile l'accès à certains substrats. La présence de ramifications ou de substituants via des liaisons esters sur des polysaccharides ou des protéines impliqués dans les phénomènes d'adhésion de la D41 expliquerait les synergies observées en présence de Lipolase.

Les effets antagonistes sont plus difficiles à expliquer. On pourrait penser que la présence d'une protéase au sein d'un mélange enzymatique pourrait dégrader les autres enzymes qui sont de nature protéique. Cela ne semble pas être le cas ici. En effet, la présence de subtilisine augmente l'activité lipase et amylase en présence respectivement de la Lipolase et de l' $\alpha$ -amylase. La formation d'un intermédiaire inhibiteur par hydrolyse d'un substrat du biofilm pourrait expliquer les effets antagonistes observés en présence du mélange subtilisine-Lipolase sur le biofilm.

Les effets synergiques et antagonistes pourraient également s'expliquer par une différence d'adsorption sur la surface. L'adsorption entraînant une modification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme (Norde et Favier, 1992 ; Servagent-Noinville *et al.*, 2000)

peut conduire à une perte de son activité (Sosa *et al.*, 1996). La présence du mélange pourrait induire une adsorption différente de chaque enzyme qui expliquerait les variations observées.

## 5.2. Mélange sélectionné

Nous avons choisi d'étudier plus précisément le biofilm en présence du mélange sélectionné issu du criblage et du plan d'expérience : subtilisine, papaïne,  $\alpha$ -amylase et Lipolase. Nous allons dans un premier temps observer les inhibitions en microplaque, à partir des concentrations initiales décrites dans le Tableau 21 et ensuite diluées successivement au demi, en prévention d'un biofilm développé pendant 3 et 24 heures ainsi qu'en lavage. Nous pourrions ainsi comparer le comportement des enzymes seules par rapport à celui des enzymes au sein du mélange.

Nous validerons ensuite les inhibitions observées en microplaque par un dénombrement précis des cellules totales et des bactéries viables cultivables (cfu) adhérentes après décrochage. Enfin, nous regarderons le comportement du biofilm traité sur une surface de verre et en présence d'un biofilm mixte composé de D41 et de D01. La bactérie nommée D01, isolée à partir d'un biofilm marin naturel formé sur lame de verre, a été choisie pour ses propriétés de surface différentes de celles de la D41 : en composition d'extrême surface, elle semble davantage enrichie en RCOOH, caractéristique des polysaccharides, que en RNH<sub>2</sub>, caractéristique des protéines (Pradier *et al.* 2005).

### 5.2.1. Gain d'activité inhibitrice

Nous avons choisi d'étudier le biofilm en présence du mélange sélectionné précédemment à différentes dilutions, en prévention d'un biofilm développé 3 et 24 heures ainsi qu'en lavage. Les concentrations de départ sont les mêmes que pour les concentrations du plan d'expérience (Tableau 21), puis le mélange est dilué successivement au demi. Nous pourrions ainsi comparer les inhibitions du biofilm en microplaque en présence du mélange par rapport à chaque enzyme seule. Les résultats sont présentés sur la Figure 50.

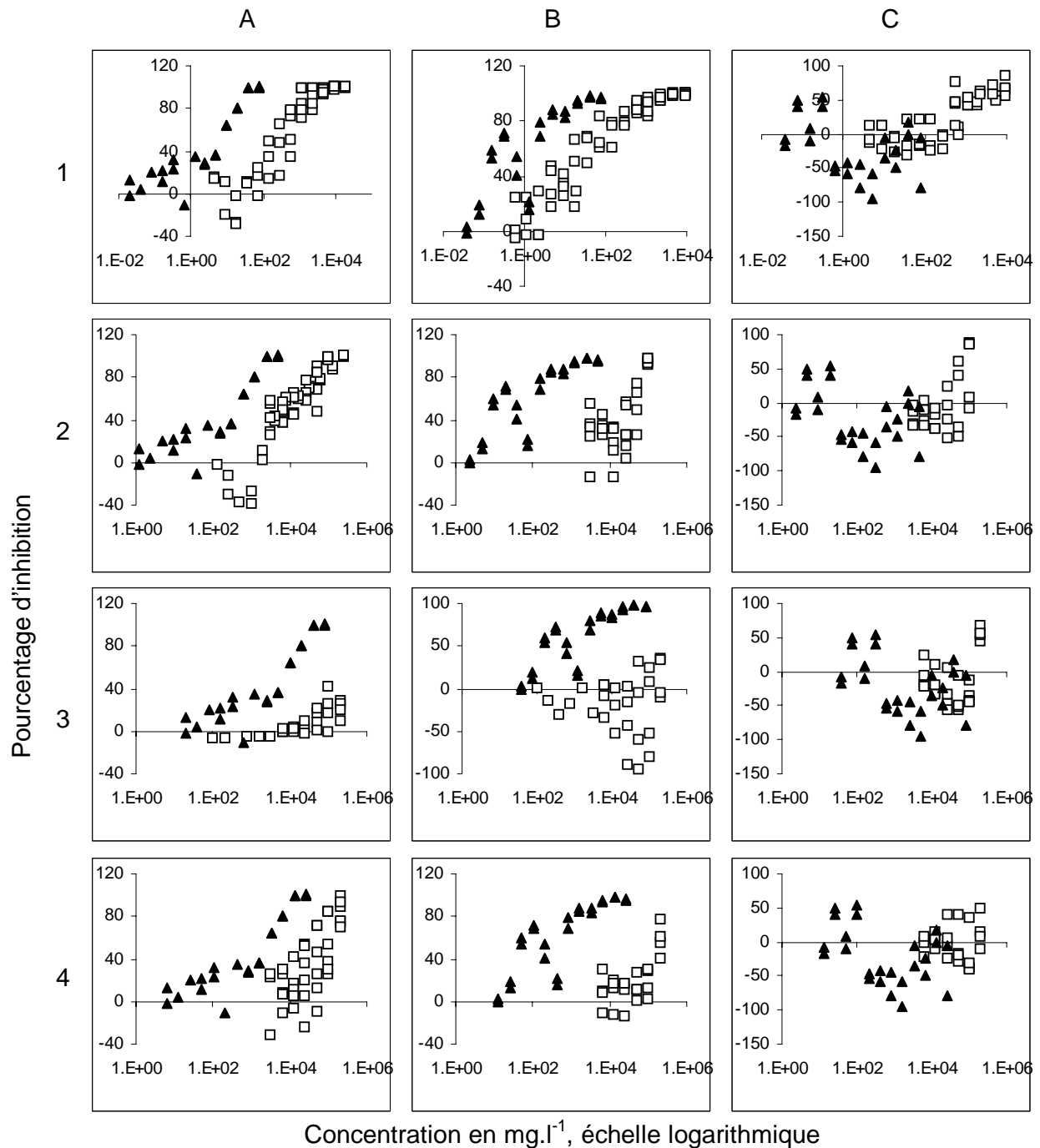


Figure 50 – Comparaison des pourcentages d'inhibition du biofilm en microplaque en présence des enzymes en mélange (▲) et des enzymes seules (□) subtilisine (ligne 1), papaïne (ligne 2),  $\alpha$ -amylase (ligne 3) et Lipolase (ligne 4) selon les 3 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B et lavage 1h d'un biofilm de 3h en colonne C.

Lorsque l'échelle des ordonnées est logarithmique, une courbe sigmoïdale de type dose-réponse en prévention d'un biofilm développé 3 et 24 heures est observée. A ces concentrations, ce mélange n'est pas efficace en lavage d'un biofilm en microplaque. Par contre en prévention 3 et 24 heures, un même pourcentage d'inhibition donné est atteint pour des concentrations de chaque enzyme plus faibles en mélange que si les enzymes étaient utilisées seules. La Figure 51 représente la courbe sigmoïdale logistique à 3

paramètres ajustée aux points expérimentaux, que nous avons choisi d'exprimer en fonction du logarithme de la concentration en subtilisine au sein mélange, permettant de calculer les IC50 (Tableau 23).

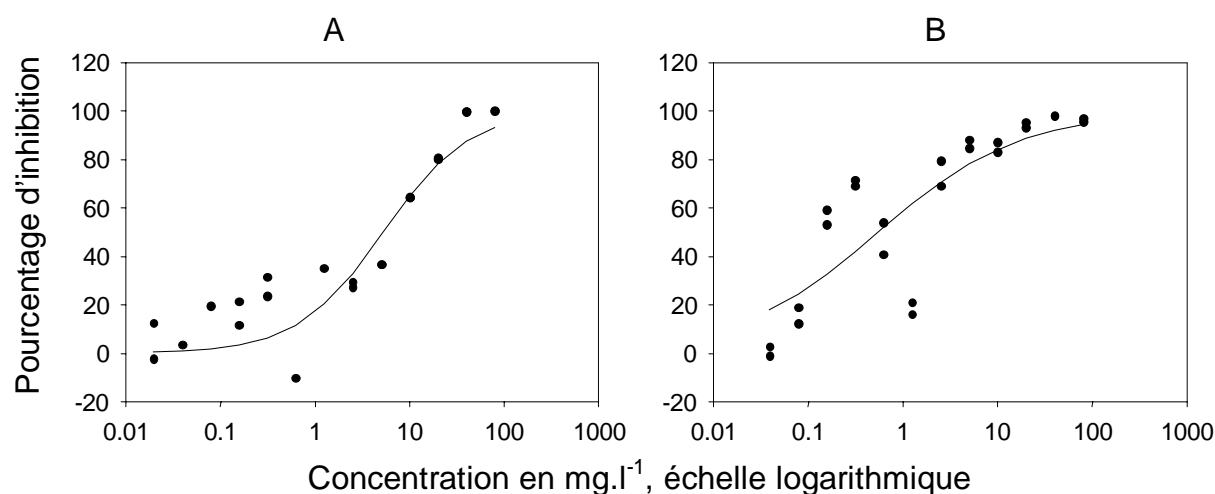


Figure 51 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en présence du mélange enzymatique en fonction de la concentration en  $\text{mg.l}^{-1}$  de la subtilisine selon les 2 protocoles d'essais, prévention d'un biofilm développé 3h en colonne A, prévention d'un biofilm développé 24h en colonne B. Les courbes représentent l'ajustement des valeurs expérimentales selon une équation logistique à 3 paramètres. Cette expérience a été réalisée 2 fois sur 2 microplaques différentes.

Tableau 23 – IC50 des enzymes au sein du mélange, calculées à partir des paramètres des équations des courbes logistiques à 3 paramètres ajustées aux points expérimentaux (Figure 51), et C50 des enzymes seules, concentrations calculées à partir de la réduction logarithmique des valeurs expérimentales pour obtenir une inhibition du biofilm de 50%, exprimées en  $\text{mg.l}^{-1}$ . Le facteur représente le gain en concentration enzymatique pour obtenir une même inhibition de 50%.

	Prévention 3h			Prévention 24h		
	IC50 ( $p=0,0383$ )	C50	Facteur	IC50 ( $p=0,2426$ )	C50	Facteur
Subtilisine	5,22	332*	63	0,5455	25,18*	47
Papaïne	317	8 880	28	33,1	41 800	1263
$\alpha$ -Amylase	5220	NC		545,5	NC	
Lipolase	1738	81 916	47	181,66	176 618	972

\*Pour la subtilisine uniquement il s'agit d'une IC50 et non d'une C50. NC : non calculable

Les paramètres des équations en prévention d'un biofilm de 3 et 24 heures montrent un maximum d'inhibition à 100% ( $p<0,0001$ ), et fixe le minimum d'inhibition à 0. Par conséquent, l'IC50 correspondra à la concentration à 50% d'inhibition. On peut donc comparer les IC50 de chaque enzyme au sein du mélange avec les C50 de chaque enzyme seule. On observe un gain important de l'IC50 variant d'un facteur 28 à un facteur 1263 pour la papaïne. D'autre part l'efficacité du mélange d'enzyme est augmentée d'un facteur 10 en prévention de biofilm développé pendant 24 heures par rapport à celle d'un biofilm de 3 heures.

### 5.2.2. Inhibition sur polystyrène et sur verre

Afin de savoir si le mélange enzymatique sélectionné possède un large spectre antibiofilm, nous avons choisi de tester son effet sur une surface présentant des propriétés différentes de celle du polystyrène : le verre, une surface hydrophile. De même nous avons choisi de tester l'effet inhibiteur du mélange sur une bactérie marine D01 aux propriétés de surface différentes de celles de la D41 : en composition d'extrême surface, elle semble davantage enrichie en RCOOH, caractéristique des polysaccharides, qu'en RNH<sub>2</sub>, caractéristique des protéines (Pradier *et al.* 2005). Les résultats sont présentés sur la Figure 52 et le Tableau 24.

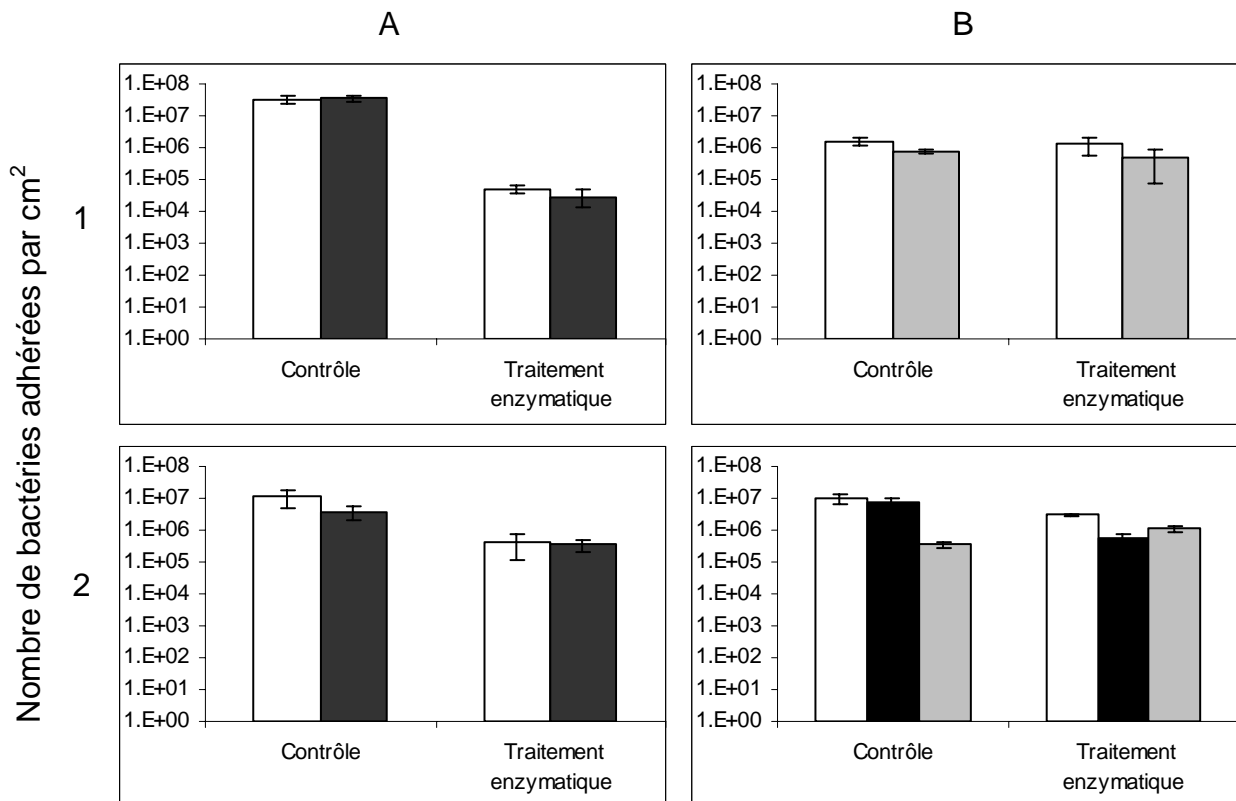


Figure 52 – Dénombrement des cellules totales (blanc), des cfu D41 (noir) et des cfu D01 (gris) adhérentes sur la surface en polystyrène de la microplaque (1A), sur verre en présence de D41 (2A), sur verre en présence de D01 (1B) et sur verre en présence d'un biofilm mixte D01 et D41 (2B) après traitement préventif avec le mélange d'enzymes sélectionné aux concentrations finales dans le puits décrites dans le Tableau 21 d'un biofilm développé 3h. Les écarts types sont calculés sur au moins trois expériences réalisées.

La Figure 52 montre que les bactéries D01 adhèrent en quantité moindre que la bactérie D41 sur du verre, d'une différence d'un log environ (Figure 52 1A et 1B). Cette adhésion reste constante quantitativement en biofilm mixte (Figure 52 2B). Peu de différences sont observées entre la quantité de cfu et de cellules totales. Comme dans le cas d'étude de la protéase Amano, afin de dénombrer les cellules totales par microscopie à épifluorescence et de désagréger les amas bactériens, les cellules ont subi un traitement aux ultrasons (10 min. à 47 kHz) ayant pu induire une lyse d'une partie des cellules (Garabétian *et al.*, 1999 ; Fykse *et al.*, 2003).

Tableau 24 – Pourcentages d'inhibition et réductions logarithmiques calculés à partir des dénombrements de biofilms traités avec le mélange enzymatique en prévention d'un biofilm 3h sur polystyrène et surface de verre en présence de D41 et/ou D01 (Figure 52).

	Polystyrène		Verre		D01		D41 + D01		
	Bactéries cfu	Bactéries cfu	Bactéries cfu	Bactéries cfu	Bactéries cfu	Bactéries cfu	Bactéries cfu	Bactéries cfu	Bactéries cfu
Pourcentage d'inhibition	99,85%	99,91%	95,95%	90,47%	19,39%	36,83%	69,07%	92,60%	-220%
Réduction Logarithmique	2,82	3,06	1,39	1,02	0,09	0,20	0,51	1,13	-0,50
p	0,0006	<0,0001	0,017	0,01	0,58	0,43	0,075	0,0026	0,088

On observe une diminution de 3 logarithmes du nombre de cellules adhérees (totales et cfu) sur polystyrène après traitement enzymatique (Figure 52 1A). Ce taux d'inhibition est diminué lorsque l'on change la nature du support (Figure 52 2A). Le polystyrène et le verre sont des surfaces respectivement hydrophobes et hydrophiles. La bactérie D41 adhère en quantité similaire quelle que soit la nature du support (verre, acier inoxydable et PTFE ; Rubio, 2002), on retrouve en partie ces résultats avec une adhésion d'environ  $10^7$  bactéries par  $\text{cm}^2$  sur verre et sur polystyrène. Les bactéries et les enzymes étant les mêmes dans les deux essais, la différence de réponse pourrait s'expliquer par une différence d'adsorption des enzymes sur la surface qui entraînerait un changement de conformation des enzymes différent pouvant induire une perte partielle de l'activité.

L'effet du mélange enzymatique est quasiment inexistant en présence de la D01 puisque l'on n'observe pas d'inhibition significative de son adhésion sur le verre (Figure 52 1B). L'expérience n'a pu être réalisée sur polystyrène en microplaque car la D01 n'adhérait pas en quantité suffisante. On peut donc dire que le mélange sélectionné reste spécifique du biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 et de son support d'adhésion, le polystyrène. L'effet du type de support pourrait être contrôlé par immobilisation de l'enzyme sur la surface.

L'effet du mélange sur les cellules viables cultivables de D41 d'un biofilm mixte adhéé sur verre reste inchangé par rapport à un biofilm unique de D41. Par contre, on observe une augmentation de la quantité en cfu de D01 significatif à 91% par rapport à un biofilm unique de D01. Rubio en 2002 avait montré que l'adhésion de la D01 sur du PTFE est augmentée d'un log en présence de la D41. On peut observer sur verre une augmentation d'un demi log, qui serait due à la présence de la D41. Par contre l'effet global du mélange enzymatique sur le biofilm mixte est une inhibition de 70% soit d'un demi log significatif à 92%, plus important que sur la D01 seule et moins que sur la D41 seule. Ceci montre que la D01 bénéficie de caractéristiques d'adhésion de la D41 pour adhérer.

### 5.2.3. Conclusion

Le mélange sélectionné permet de diminuer les quantités enzymatiques à déposer pour obtenir une même réponse par rapport aux enzymes seules. Ce mélange pourrait être encore optimisé au niveau des concentrations de chaque enzyme en utilisant la méthodologie de surface de réponse par un nouveau plan d'expérience, permettant

d'ajuster les valeurs expérimentales observées selon le modèle logistique à 3 paramètres, ou en définissant à nouveau les niveaux +1 et -1 afin de se situer dans la gamme d'inhibition linéaire.

Le mélange enzymatique optimisé selon le protocole de prévention ne s'adapte pas au protocole de lavage. Ce résultat peut être lié à la diminution de l'efficacité observée pour la papaïne, la subtilisine et la Lipolase seules en lavage par rapport à la prévention, contrairement à l' $\alpha$ -amylase. Il pourrait aussi s'expliquer par des problèmes de diffusion des enzymes dans le biofilm déjà formé, par le fait que ces enzymes soient efficaces via leur adsorption sur la surface ou encore par la nature différente des molécules organiques à hydrolyser entre un biofilm en formation et un biofilm déjà formé.

Le mélange enzymatique testé sur une surface et un biofilm bactérien aux propriétés différentes de celles du polystyrène et de la D41 n'inhibe pas le biofilm. Le mélange reste donc adapté à notre biofilm modèle, dans les conditions opératoires étudiées (en eau de mer, sur polystyrène) et ne semble pas posséder de large spectre anti-biofilm.

La stratégie développée dans cette étude a permis de mettre au point un mélange d'enzymes inhibant de 3 log un biofilm marin de *Pseudoalteromonas sp.* D41 développé sur polystyrène et en eau de mer à 20°C. Les enzymes peuvent donc être utilisées pour inhiber le développement de biofilm bactérien mais des études complémentaires seraient nécessaires afin de mettre au point un mélange d'enzymes universel. L'effet du type de support pourrait être contrôlé après immobilisation de l'enzyme sur la surface. L'effet du type de biofilm pourrait être amélioré en testant des enzymes sur un biofilm composé de différentes bactéries. De plus, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'inhibition de formation des biofilms et notamment dans la caractérisation des substrats hydrolysés au sein du biofilm permettrait d'ouvrir des pistes pour mettre au point un mélange d'enzymes à large spectre antialissures.





## 6. Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre la capacité de préparations enzymatiques commerciales à inhiber la formation d'un biofilm marin modèle à partir d'une monoculture de *Pseudoalteromonas sp.* D41 en eau de mer, qu'elles soient déposées avant la formation du biofilm ou après. La plus efficace étant la subtilisine qui présente un profil d'inhibition de type dose-réponse.

Cependant, certaines préparations peuvent présenter l'effet contraire sur le biofilm c'est-à-dire l'augmenter. On a montré que cette augmentation était observée uniquement sur les cellules totales et pas sur les cellules vivantes et qu'elle était liée à une adhésion en amas. De plus, en prévention, l'augmentation des cellules adhérees induite par la présence de la protéase Amano n'est observable que sur un biofilm de 24 heures et pas de 3 heures laissant penser à une adaptation de l'adhésion des cellules sur une surface non propice. Ce phénomène serait semblable aux mécanismes de résistance des biofilms soumis à un traitement d'agents antimicrobiens (biocide ou antibiotiques).

Nous avons mis au point un mélange de quatre enzymes permettant de minimiser les concentrations en enzymes à déposer pour obtenir une même inhibition du biofilm que pour les enzymes seules. Ce mélange s'est révélé très efficace en prévention du biofilm modèle développé en microplaque de polystyrène en réduisant de 3 log le nombre de cellules adhérees. Cependant, il ne semble pas posséder un large spectre anti-biofilm.

Nous avons identifié une protéase au large spectre antibiofilm et antialissure marine : la subtilisine. Il apparaît que l'activité protéase et estérase semblent efficaces contre notre biofilm modèle. Il est cependant difficile d'associer une inhibition à une activité enzymatique précise. La présence d'additifs dans les préparations commerciales induit des effets d'inhibition du biofilm non spécifiques à l'activité enzymatique propre. De plus, certaines inhibitions sont corrélées à l'activité principale de la préparation, c'est le cas de la subtilisine et de la Savinase, mais d'autres sont dues à un ensemble d'activités contenues dans la préparation, c'est le cas de Finizyme.

Cependant, l'utilisation d'enzymes visait à hydrolyser des molécules organiques comme notamment les EPS impliqués dans la structure et le développement des biofilms. Afin de discuter cette hypothèse, nous allons, dans la partie suivante, étudier la nature des EPS produits par *Pseudoalteromonas sp.* D41 en fermentation et nous observerons au microscope à épifluorescence après marquage à l'aide de fluorochrome les EPS au sein du biofilm formé.



## **Chapitre 5 – Substances polymériques extracellulaires**

---



La bactérie modèle *Pseudoalteromonas sp.* D41 utilisée pour former le biofilm en microplaque a été sélectionnée pour ses fortes capacités d'adhésion sur tout type de matériau ainsi que son aspect mucoïde sur milieu agar supplémenté en glucose indiquant une capacité de production de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005). La nature des EPS produites par des bactéries formant des biofilms est démontrée comme spécifique de la souche productrice. L'utilisation d'enzymes dans le but d'inhiber la formation du biofilm marin repose sur l'hypothèse d'une hydrolyse des molécules organiques du biofilm. La connaissance de la nature des EPS produites par *Pseudoalteromonas sp.* D41 nous permettra d'étayer la discussion concernant une éventuelle relation entre la nature des enzymes qui permettent d'inhiber le biofilm et celle des EPS.

La composition de la matrice des biofilms est aujourd'hui mieux connue grâce notamment à des techniques récentes d'étude de biofilm *in situ* par observations microscopiques (confocale à balayage laser, électronique, épifluorescence) avec des marqueurs adaptés (lectines) (Neu et Lawrence, 1999a et b ; Strathmann *et al.*, 2002 ; Kämper *et al.*, 2004 ; Neu *et al.*, 2004). Cependant, pour caractériser la nature des EPS, certaines analyses nécessitent de les purifier et de les extraire à partir de biofilms. Ce processus expérimental est complexe et les quantités d'EPS extraites nécessaires à une caractérisation biochimique sont limitées. C'est pourquoi la plupart des EPS caractérisées l'ont été à partir de monoculture de bactéries planctoniques et peu à partir de biofilms véritablement.

Nous avons donc effectué une étude biochimique des EPS produits par la D41 en fermentation ainsi qu'une analyse en microscopie à épifluorescence via l'utilisation de marqueurs spécifiques, après adhésion de la D41 sur lame de verre.

## 1. EPS issues de la fermentation de D41

### 1.1. Composition biochimique

La fermentation de *Pseudoalteromonas sp.* D41 a conduit à la production de 3 fractions d'EPS. Deux fractions solubles, secrétées dans le milieu de culture notées EPS1 et EPS2 respectivement isolées de la fraction ultrafiltrée comprise entre 10 et 100 kDa et celle supérieure à 100 kDa. L'EPS3 correspond à la fraction non soluble, séparée du culot cellulaire par centrifugation après dialyse (Samain *et al.*, 1997). Nous avons effectué différents dosages, suivant les protocoles décrits dans le chapitre 2, afin de connaître la composition de ces fractions décrite en pourcentage massique dans le Tableau 25. La composition osidique a également été analysée en chromatographie gazeuse.

On observe que la fraction EPS2 possède une forte proportion en matière inorganique (40%) alors que les fractions EPS1 et 3 n'en possèdent que 20 et 26% respectivement. Le total de la composition est proche de 100%.

Concernant la composition en matière organique, la fraction EPS1 est majoritairement constituée de sucres contrairement à EPS2 et EPS3 majoritairement composées de

protéines. Peu d'oses acides sont présents et aucun osamine. La fraction EPS1 est constituée en majorité de mannose et les autres de glucose. On retrouve pour les 3 fractions du mannose, glucose, galactose et de l'acide glucuronique.

En milieu glucosé la bactérie modèle *Pseudoalteromonas sp.* D41 produit peu d'EPS et consomme peu de glucose. En effet pour une concentration initiale en glucose de 30 g.l<sup>-1</sup> on en dose en fin de fermentation encore 15 g.l<sup>-1</sup> et le rendement de production des EPS est inférieur à 100 mg.l<sup>-1</sup>. Les fractions EPS1, EPS2 et EPS3 sont produites à 48,6 mg.l<sup>-1</sup>, 18 mg.l<sup>-1</sup> et 68,6 mg.l<sup>-1</sup> respectivement.

Tableau 25 – Composition globale en pourcentage massique des fractions EPS issues de la fermentation de *Pseudoalteromonas sp.* D41

Fraction	EPS1	EPS2	EPS3
Matière inorganique	20,2	40,1	25,9
Matière organique :			
Protéines	30,3	41,0	59,2
Oses neutres	43,0	15,3	8,2
Oses acides	3,2	2,4	2,6
Total	96,7	98,8	95,9
Composition en oses :			
Mannose	31,1	1,2	0,2
Galactose	2,9	1,3	0,07
Glucose	2,1	8,3	1,7
Acide galacturonique	0,7	0	0
Acide glucuronique	0,2	0,6	0,1

La fraction EPS 3 est composée en majorité de protéines et la fraction EPS1 en majorité d'oses, parmi lesquels le mannose est majoritaire. Enfin, la fraction EPS2 est composée de protéines et de matière inorganique principalement.

## 1.2. Glycoprotéines

Le rôle des glycoprotéines est encore peu étudié au sein des biofilms. Les dosages réalisés précédemment ne nous permettent pas de définir si nous sommes en présence de glycoprotéines ou non. D'autre part, EPS2 et 3 étant composées majoritairement de protéines, il sera intéressant d'en connaître la composition. Les techniques d'électrophorèse et de marquage au bleu de Coomassie et au réactif de Schiff nous permettront de déceler la présence éventuelle de glycoprotéines mais aussi de connaître la composition en protéines. Le bleu de Coomassie et le réactif de Schiff permettent de détecter les protéines et les composés glycosylés respectivement. Une bande colorée à la fois par le bleu de Coomassie et par le réactif de Schiff permet de démontrer la présence de glycoprotéines.

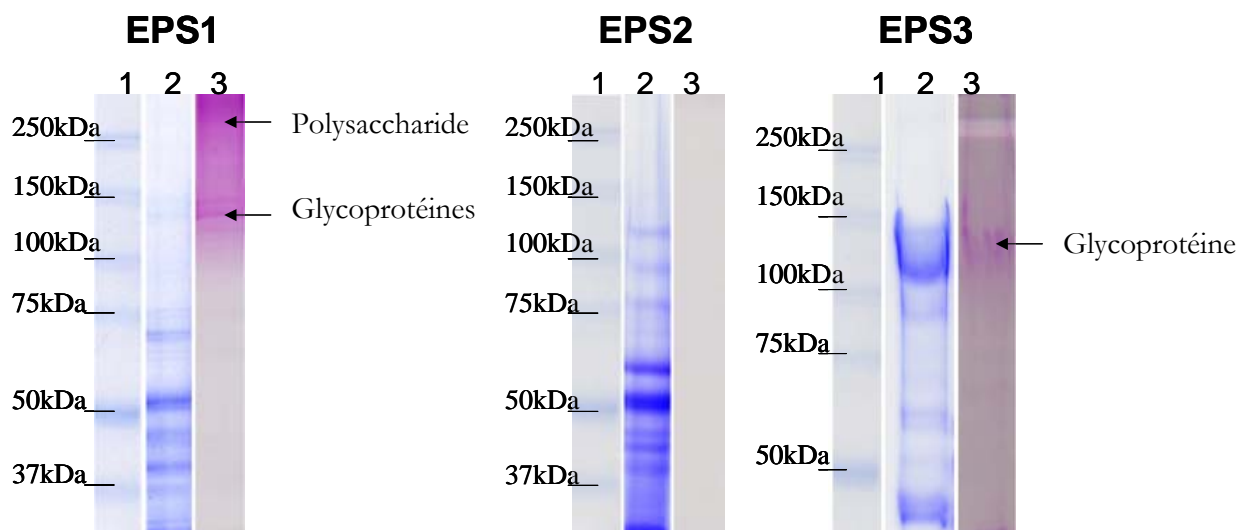


Figure 53 – Gels d'électrophorèse (8%) en conditions dénaturantes et en présence de SDS des 3 fractions d'EPS, issues de la fermentation de *Pseudoalteromonas sp.* D41, révélés au bleu de Coomassie (Colonne 2) et au réactif de Schiff (Colonne 3) pour détecter respectivement les protéines et les glucides. Les marqueurs de masses molaires sont en colonne 1.

La Figure 53 montre la présence de bandes colorées au bleu de Coomassie de masse molaire inférieure à 150 kDa. Chaque profil est différent selon la fraction déposée, on peut tout de même observer une bande commune aux fractions EPS1 et EPS2 à 50 kDa colorée au bleu de Coomassie. L'électrophorèse étant réalisée en conditions dénaturantes, les différentes bandes observées peuvent correspondre à des peptides ou à des sous unités protéiques. En particulier la fraction EPS2 ayant été ultrafiltrée sur une membrane de seuil de coupure de 100 kDa, ne devrait pas présenter de protéines de masse molaire inférieure à 100 kDa.

La fraction EPS1 contient un polysaccharide resté en haut du gel (Colonne 3). Elle présente également 2 bandes colorées à la fois par le réactif de Schiff et le bleu de Coomassie montrant la présence de deux glycoprotéines d'une masse molaire comprise entre 150 et 100 kDa.

La fraction EPS2 n'est pas colorée au réactif de Schiff et ne contient pas de glycoprotéine. Ce résultat est en contradiction avec les dosages montrant la présence de polysaccharides (Tableau 25). Ceux ci peuvent, s'ils ne sont pas suffisamment chargés ou s'ils sont de taille trop importante par rapport aux mailles du gel, ne pas migrer. On peut dire que dans nos conditions, les glucides de la fraction EPS2 n'ont pu pénétrer dans le gel.

Concernant la fraction EPS3, une bande majoritaire comprise entre 100 et 150 kDa est observée à la fois sur le gel révélant les protéines et les glucides. La fraction EPS3 semble donc contenir une glycoprotéine.

### 1.3. FTIR

Une analyse en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été réalisée afin de compléter l'analyse des dosages colorimétriques des fractions EPS (Figure 54). On

observe une forte homologie entre les spectres FTIR des trois échantillons. Le massif situé entre 3500 et 3100  $\text{cm}^{-1}$  correspond aux vibrations des liaisons OH d'alcool et NH d'amine. On observe notamment un massif de plus grande intensité pour l'EPS1 pouvant être corrélé à la présence de fonctions OH de composés glucidiques. Les vibrations des liaisons CH des groupes  $\text{CH}_2$  absorbant de 2960 à 2850  $\text{cm}^{-1}$  sont notamment lié à la présence de lipides.

On observe un faible épaulement pour EPS2 à 1744  $\text{cm}^{-1}$  attribué à la vibration de la liaison  $\text{C}=\text{O}$  associée par liaison ester, qui correspondraient à diverses liaisons esters comme celles avec des O-acétyls ou à des liaisons esters de triglycérides.

Les bandes amides I et amide II correspondant respectivement à la vibration de  $\text{C}=\text{O}$  (entre 1650 et 1640  $\text{cm}^{-1}$ ) et à la vibration de  $\text{N}-\text{H}$  combinée à celle de  $\text{C}-\text{N}$  (entre 1550 et 1530  $\text{cm}^{-1}$ ) sont caractéristiques de la liaison peptidique des protéines. On peut observer leur présence de forte amplitude pour les 3 fractions.

Les bandes observées à 1439  $\text{cm}^{-1}$ , 1394  $\text{cm}^{-1}$  et 1242  $\text{cm}^{-1}$  peuvent être attribuées respectivement aux déformations de vibrations CH des  $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}=\text{O}$  des fonctions carboxylates et CH des  $\text{CH}_3$ . On observe une bande de très faible intensité vers 1320-1310  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique des  $\text{C}-\text{O}$  des acides carboxyliques, confirmant le faible taux d'oses acides au sein des polymères.

On observe la présence d'un massif pour la fraction EPS1 d'intensité supérieure à celui des autres fractions EPS entre 1100 et 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Cette région est attribuée aux vibrations des liaisons  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  et  $\text{C}-\text{O}$  et  $\text{C}-\text{O}-\text{H}$  caractéristiques notamment des polysaccharides.

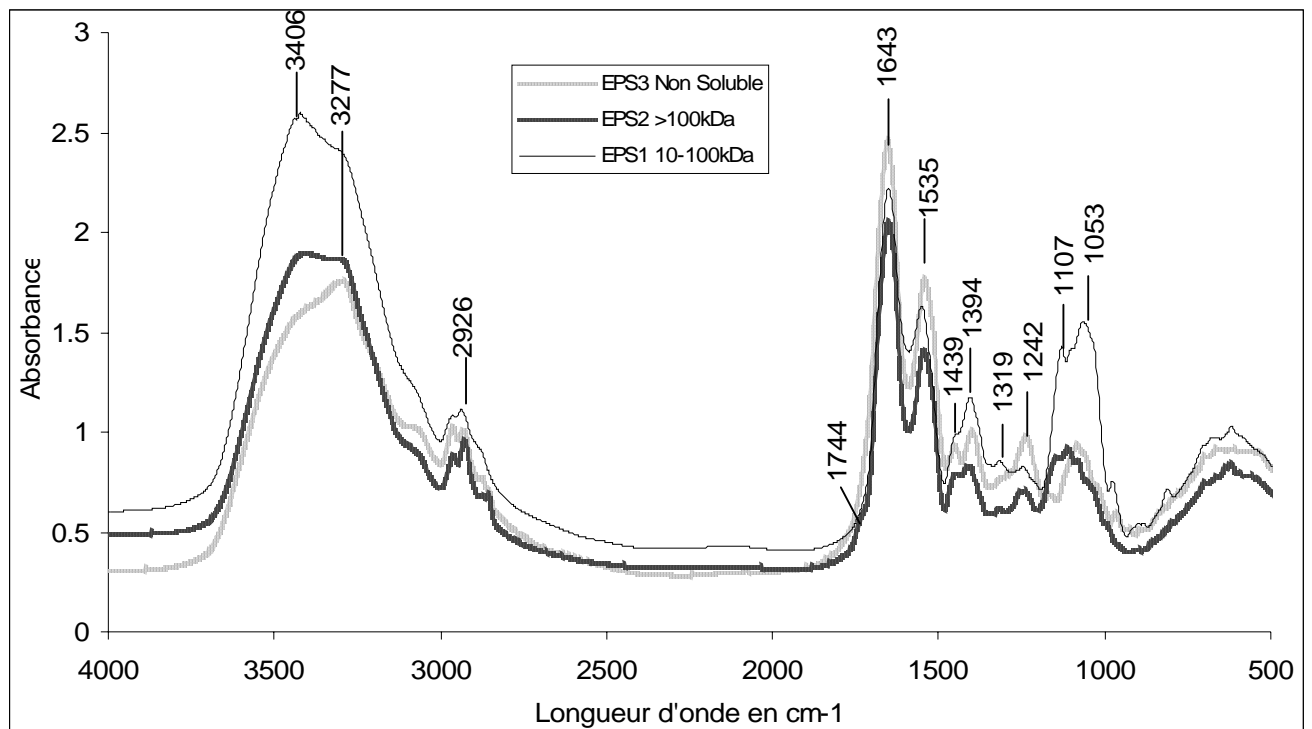


Figure 54 – Spectre FTIR des fractions EPS issues de la fermentation de *Pseudoalteromonas sp.* D41.



Ces résultats confirment ceux obtenus par les dosages colorimétriques réalisés, montrant la prédominance des protéines dans les fractions EPS2 et 3 et celle des polysaccharides dans la fraction EPS1. De plus, le spectre FTIR apporte une information nouvelle concernant la présence de lipides dans les 3 fractions et de liaisons esters dans la fraction EPS2.

## 1.4. Discussion

En comparaison avec les taux de production d'exopolysaccharides issus de bactéries marines atteignant 240 mg.l<sup>-1</sup> chez *Pseudomonas sp.* NCMB 2021 (Christensen *et al.*, 1985a) jusqu'à 5,5 g.l<sup>-1</sup> chez *Alteromonas infernus* (Raguénès *et al.*, 1997) et 10 g.l<sup>-1</sup> chez *Zoogloea sp.* (Kwon *et al.*, 2002), nous observons des taux de production de 48 mg.l<sup>-1</sup>, 18 mg.l<sup>-1</sup> et 68 mg.l<sup>-1</sup> respectivement pour EPS1, EPS2 et EPS3. On peut donc dire que *Pseudoalteromonas sp.* D41 produit peu d'EPS en fermenteur. Différentes analyses montrent que la production en exopolysaccharide de bactéries peut être optimisée en fonction du milieu de culture plus ou moins supplémenté en sucre (glucose, sucrose) (Kwon *et al.*, 1994) et de la phase de croissance où le polymère est récolté (exponentielle ou stationnaire). En effet, Christensen *et al.* (1985a) montrent qu'une bactérie marine du genre *Pseudomonas sp.* produit deux exopolysaccharides, l'un durant la phase exponentielle de croissance bactérienne et l'autre en fin de phase exponentielle et durant la phase stationnaire. Vincent *et al.* en 1994 montrent que la fermentation d'une souche issue d'écosystèmes hydrothermaux profonds du genre *Alteromonas sp.* ne produit pas d'exopolysaccharides en milieu non glucosé et que leur production est maximale (entre 1,8 et 2 g.l<sup>-1</sup>) en présence de glucose en concentration initiale dans le milieu de 20 à 70 g.l<sup>-1</sup>. Cet exopolysaccharide est produit en phase stationnaire. Ce protocole a été utilisé par la suite pour d'autres souches bactériennes marines du genre *Pseudoalteromonas sp.* et *Alteromonas sp.* (Rougeaux *et al.*, 1996, Raguénès *et al.*, 1997) et c'est celui que nous avons choisi d'utiliser pour la fermentation de *Pseudoalteromonas sp.* D41. La faible production d'EPS par la D41 peut donc s'expliquer par le fait que ce protocole n'était pas au mieux adapté à une production optimale d'EPS par cette souche.

L'analyse biochimique des EPS issus de la fermentation de *Pseudoalteromonas sp.* D41 nous a montré la présence d'EPS à la fois excrétés dans le milieu de culture mais aussi liés au culot cellulaire. Ce phénomène est connu, en effet, les EPS sont décrits dans la littérature sous le nom anglais de « slime » s'ils sont excrétés dans le milieu et capsulaire ou « polysaccharide lié à la cellule » s'ils restent dans le culot cellulaire (Nielsen et Jahn, 1999). Nous avons choisi de l'appeler EPS non soluble en opposition aux deux autres fractions qui sont solubles dans le milieu de culture. Cet EPS non soluble est souvent associé à un rôle protecteur, via la formation d'une matrice gélifiée autour de la bactérie, et n'est pas considéré comme indispensable à l'adhésion initiale des cellules (Sutherland, 2001).

La fraction non soluble EPS3 semble davantage composée de protéines que les EPS solubles. Ce phénomène a déjà été observé. Raguénès et ses collaborateurs (1997) rapportent que la fraction EPS non soluble produite par *Alteromonas infernus* contient 40% de protéines. Beech *et al.* en 1999 montrent que la fraction EPS capsulaire contient 14,14 µg.ml<sup>-1</sup> de protéines pour 11,46 µg.ml<sup>-1</sup> de polysaccharide chez *Pseudomonas sp.* NCIMB

2021. De même Flemming et Wingender (2001) rapportent des données sur la composition en EPS largement majoritaire en protéine concernant l'EPS capsulaire. De plus, la présence majoritaire de protéines dans la fraction EPS3, fraction liée au culot cellulaire après centrifugation de la fermentation de *Pseudoalteromonas sp.* D41, est en corrélation avec les analyses d'extrême surface de *Pseudoalteromonas sp.* D41 qui présentait un profil davantage protéique que glycosidique (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005). Cependant, comme peu d'études se sont portées sur la fraction protéique des EPS, peu de données sont disponibles. En effet, les voies de recherche sur les EPS de biofilms se sont surtout portées sur les exopolysaccharides aux propriétés gélifiantes ou émulsifiantes, les protéines et l'ADN étant considérés comme des contaminants provenant du matériel intracellulaire (Nielsen et Jahn, 1999). Leur rôle concernant leur implication dans les phénomènes initiaux de formation de biofilms reste encore peu étudié. Il en est de même concernant les glycoprotéines, peu étudiées dans le domaine des EPS de biofilm bactérien mais davantage dans les biofilms de levures et de champignons où les protéines membranaires à GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) liées à des structures glycosidiques jouent notamment un rôle dans les phénomènes d'adhésion (De Groot *et al.*, 2005).

La présence de lipide dans les fractions a pu être mise en évidence via les spectres FTIR. La faible sensibilité des dosages colorimétriques associées à la faible quantité d'EPS produits n'ont pas permis d'analyser quantitativement les lipides des différentes fractions d'EPS isolées.

Nous avons donc montré le potentiel de *Pseudoalteromonas sp.* D41 à produire des EPS de différentes natures. La fraction soluble EPS1 contient un polysaccharide de faible masse (comprise entre 10 et 100 kDa) et deux glycoprotéines, composés de mannose majoritairement. La fraction EPS2 contient un polysaccharide composé en majorité de glucose et montre la présence de liaisons esters. Le profil électrophorétique de la fraction EPS2 laisse à penser que les protéines sont présentes en agrégats de sous unités aux masses inférieures à 150 kDa. La fraction EPS3 contient une majorité de protéines dont une glycoprotéine de masse comprise entre 100 et 150 kDa.

## 2. EPS au sein de biofilm

L'objectif de cette étude est de pouvoir comparer les résultats obtenus concernant l'analyse des EPS issues de la fermentation et celle des EPS produites au sein de biofilm.

L'étude en microscopie à épifluorescence s'est limitée à une observation d'un biofilm de D41 et D01 développé pendant 24 heures en eau de mer stérile sur une lame de verre. Afin d'observer la présence de protéines, nous avons marqué le biofilm à la fluorescamine, connue pour son affinité pour les groupes  $\text{NH}_2$  (Udenfriend *et al.*, 1972) et au calcofluor, connu pour son affinité pour les groupes  $\beta$ -glucanes (Maeda et Ishida, 1967). Le biofilm est également marqué au DAPI afin de comparer la densité de bactéries adhérees par rapport à l'intensité de marquage au calcofluor et à la fluorescamine.

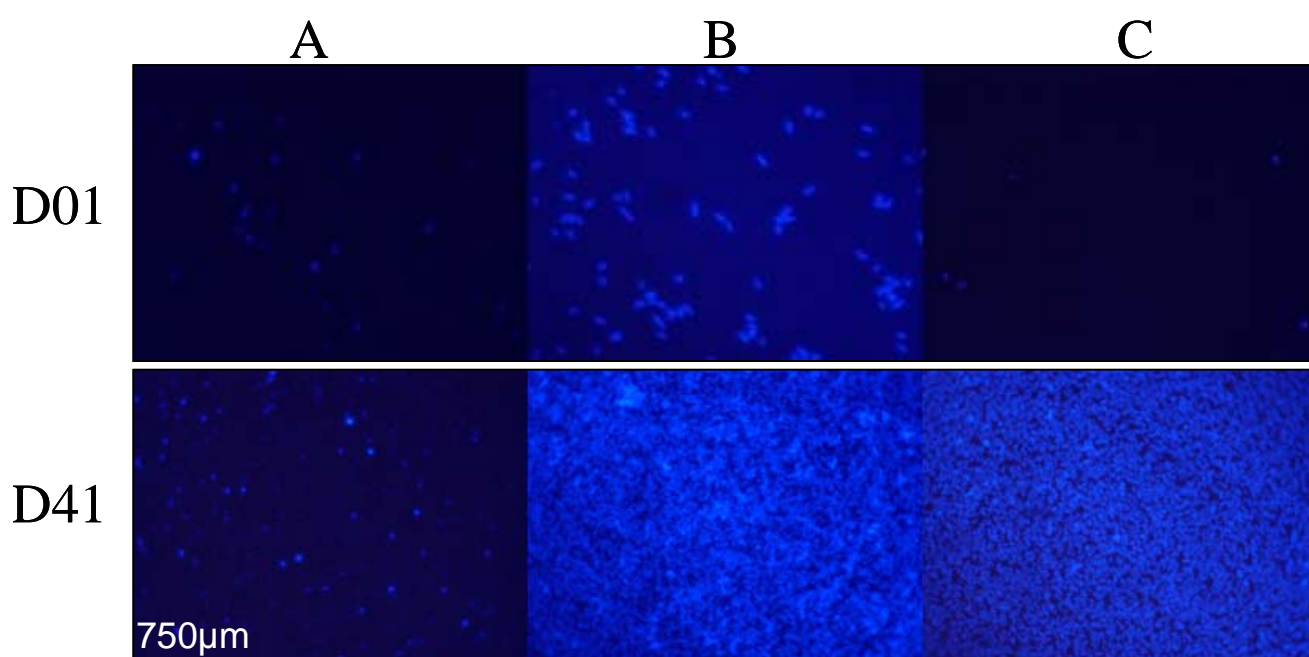


Figure 55 – Images en microscopie à épifluorescence de D41 et D01 adhérees 24h sur une surface de verre et marquées au calcofluor (A), au DAPI (B) et à la fluorescamine (C).

La Figure 55B montre la forte adhésion de la D41 par rapport à la D01. En effet, la D41 a déjà formé un tapis bactérien alors que la D01 adhère moins. La présence de  $\beta$ -glucanes (Figure 55A) est observée sur les 2 types de biofilms, avec une prédominance pour la D01, en comparaison à sa faible adhésion. Les protéines (Figure 55C) sont observées au sein des deux biofilms. On les voit très majoritairement sur le biofilm de D41. La présence de protéine est nettement plus élevée que celle des  $\beta$ -glucanes et relativement importante par cellule en comparaison avec le marquage DAPI. En effet, le biofilm marqué au DAPI ou à la fluorescamine montre un tapis bactérien, laissant penser à une forte expression de protéines autour des cellules.

La présence de protéines au sein du biofilm et dans la fraction EPS3 liée au culot cellulaire montre que les profils biochimiques observés sur les EPS en fermenteurs peuvent être proches de ceux observés au sein du biofilm. La D41 semble donc produire des EPS

composés majoritairement de protéines, les  $\beta$ -glucanes représentant une faible partie de ces EPS.

### 3. Discussion

L'étude en microscopie a permis de montrer que la D41 au sein du biofilm produisait, à la surface des cellules, une majorité de protéines et peu de  $\beta$ -glucanes. En fermenteur, une forte concentration en protéines a été retrouvée dans la fraction EPS non soluble, liée au culot cellulaire, fraction majoritairement produite. Parmi les oses composant les polysaccharides issus des fractions du surnageant EPS1, fraction la plus riche en oses, le glucose est minoritaire par rapport au mannose. La fraction EPS2, faiblement produite, est minoritairement chargée en oses neutres. Ces informations montrent une corrélation entre les résultats obtenus à partir de l'étude microscopique des EPS du biofilm et des EPS de la fermentation, ou l'on n'observe peu de  $\beta$ -glucanes par rapport aux extrémités  $\text{NH}_2$ . Limitée par les problèmes quantitatifs d'extraction et de purification des EPS produits au sein des biofilms, la majeure partie des études concernant la nature des EPS issues de bactéries est effectuée sur des EPS produites en milieu de culture en fermenteurs (Nielsen et Jahn, 1999). Cependant, certaines études ont montré que les bactéries en suspension étaient phénotypiquement différentes de bactéries en biofilm, l'adhésion entraînant l'inactivation de certains gènes et l'activation d'autres, comme chez *Pseudomonas aeruginosa* où le gène de la synthèse d'alginate est surexprimé suite à l'adhésion (Davies *et al.*, 1993). Branda *et al.* en 2005 pensent qu'une même souche de bactérie pourrait produire plusieurs et différents polysaccharides extracellulaires selon qu'elle est en biofilm ou non. Au contraire, Sutherland (2001) pense que certaines EPS du biofilm possèdent la même composition que ceux issus de bactéries planctoniques. Une étude biochimique comparative entre des EPS solubles et non solubles issues d'une fermentation et une fraction EPS issue du biofilm a été réalisée montrant une forte homologie des spectres IR des EPS mais aussi une augmentation de la conformation en hélice  $\beta$  de l'exopolymère soluble (Beech *et al.*, 1999). Costerton *et al.* en 1981 utilise des anticorps ciblés contre les exopolymères de cellules planctoniques pour révéler des interactions avec le biofilm (Costerton *et al.*, 1981). Les EPS produites en fermenteurs ne seraient pas de nature différente de celles produites au sein du biofilm. Cependant, en fonction des conditions du milieu de production des EPS (fermentation ou biofilm), les conformations des protéines ou des sucres ainsi que leurs substitutions, ou les quantités produites peuvent être différentes.

D'autre part, le potentiel inhibiteur des enzymes semble corrélé aux observations issues de la caractérisation biochimique des EPS. En effet, on a vu dans le chapitre précédent que les protéases inhibaient de manière plus efficace le biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 que les glycosidases et lipases. Cette observation est corrélée avec la forte présence de protéines au sein du biofilm et des EPS non solubles produites par *Pseudoalteromonas sp.* D41. Cette observation suggère à la fois une forte implication des protéines dans les phénomènes de l'adhésion, et aussi des EPS non solubles ou capsulaires jusqu'ici décrites comme non impliquées dans les phénomènes d'adhésion initiale (Sutherland, 2001).

De même, nous avons montré que la Glucanex présentait un fort potentiel antibiofilm. Cette enzyme est connue pour son activité lui permettant d'hydrolyser les glycoprotéines dites protéines membranaires à GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) de la paroi cellulaire

des levures (Sampaio *et al.*, 1999), impliquées notamment dans les phénomènes d'adhésions cellulaires (De Groot *et al.*, 2005). Nous avons montré la présence de glycoprotéines dans les EPS produites de la D41, suggérant une implication des glycoprotéines dans les phénomènes d'adhésion.

D'autre part, nous avons montré la présence de mannose en quantité majoritaire dans l'exopolysaccharide issu de la fraction EPS1. Il aurait été intéressant de tester une mannanase afin de vérifier les corrélations entre le potentiel antibiofilm D41 des enzymes et la nature des EPS produites par la D41.

De plus, la présence majoritaire de protéines au sein du biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 est en corrélation avec les analyses d'extrême surface de *Pseudoalteromonas sp.* D41 qui présentait un profil davantage protéique que glycosidique (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005).

## Perspectives : conditionnement de surface

On a montré que certaines enzymes permettaient d'inhiber l'adhésion de *Pseudoalteromonas sp.* D41 en solution en microplaque. Cependant, nous nous sommes demandés si la surface du puits était conditionnée ou si l'inhibition n'était due qu'à une hydrolyse en solution. Pour cela, nous avons réalisé l'expérience suivante : la subtilisine, le Mexel 432/0 et l'hypochlorite de sodium sont déposés dans les puits des microplaques et sont éliminés une heure après par lavage des puits à l'eau salée. Les bactéries sont ensuite ajoutées et incubées pendant 3 heures. Les résultats sont montrés sur la Figure 56 en comparaison des résultats obtenus avec le protocole de prévention d'un biofilm développé 3 heures.

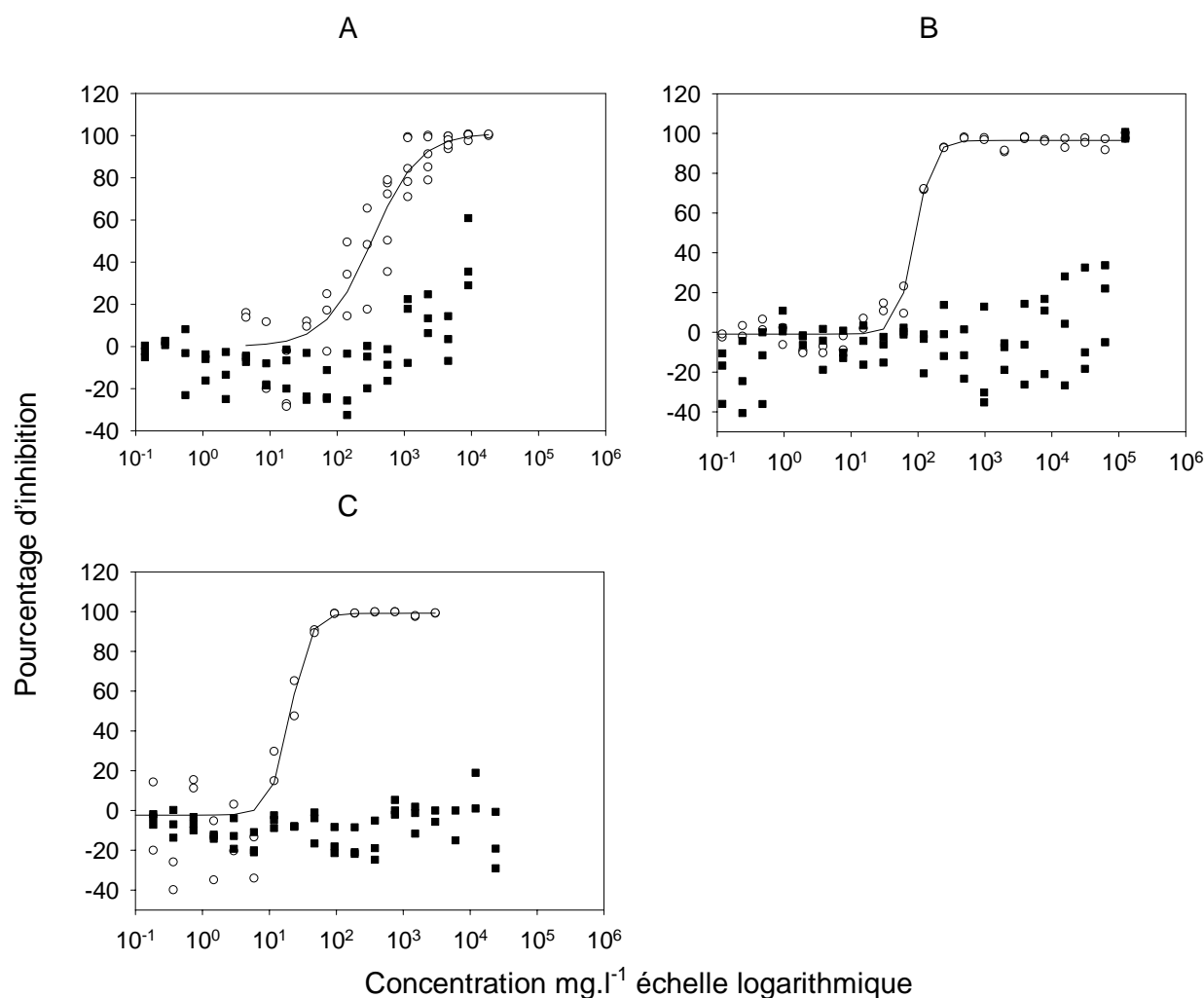


Figure 56 – Pourcentage d'inhibition du biofilm en microplaque en fonction de la concentration en mg.l<sup>-1</sup> pour 3 produits testés subtilisine (A), 432/0 (B) et hypochlorite de sodium (C) selon un protocole de conditionnement de surface en microplaque (■) et celui de prévention d'un biofilm de 3h (○).

On observe une inhibition partielle en présence d'un conditionnement avec subtilisine, et totale avec le Mexel 432/0, mais uniquement aux plus fortes concentrations testées. Comme attendu, aucune inhibition n'est observée en présence d'hypochlorite de sodium. L'hypochlorite de sodium n'est efficace que sur les suspensions bactériennes et ne peut être utilisé pour un pré-conditionnement de surface.

En ce qui concerne la subtilisine, les effets observés sans rinçage peuvent donc être en partie liés à une altération du milieu bactérien en suspension mais aussi à une altération des propriétés de surface. Cette observation confirmerait le fait que la diminution du potentiel antibiofilm observée sur verre serait liée à une différence d'adsorption. La subtilisine pourrait donc être utilisée pour pré-conditionner une surface.

Dans le cas de notre expérience, la subtilisine est beaucoup plus efficace en solution qu'en conditionnement. Cependant, nous avons montré qu'il était possible d'observer une inhibition de la formation du biofilm après une adsorption non contrôlée de la subtilisine sur la surface. Ce résultat ouvre des perspectives concernant une fonctionnalisation de surface avec des enzymes.



## Conclusions et perspectives

Nous avons mis au point un test modèle adapté au criblage et au milieu marin permettant de détecter le potentiel de molécules à prévenir la formation ou éliminer un biofilm marin de *Pseudoalteromonas sp.* D41 en microplaque, sur surface de polystyrène. Le test développé permet également de vérifier la toxicité de la préparation enzymatique sur les cellules non adhérentes, montrant ainsi que la non adhésion des bactéries n'est pas liée à un effet toxique de l'enzyme. C'est le cas pour la subtilisine. Le niveau des taux d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en enzyme est une courbe sigmoïde de type dose-réponse pour les préparations les plus efficaces comme la Savinase et la subtilisine. Selon la classe des enzymes testées, des niveaux d'inhibitions différents ont été observés. Les protéases se sont révélées plus efficaces que les glycosidases et plus encore que les lipases. Des protéases, la subtilisine est l'enzyme la plus efficace. En prévention d'un biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 développé en microplaque sur surface en polystyrène, elle présente une IC50 de 25,18 mg.l<sup>-1</sup>.

Cependant, la reproductibilité du test peut encore être améliorée en maîtrisant un dépôt homogène des suspensions bactériennes par puits. De même, il serait nécessaire d'augmenter l'efficacité du protocole de lavage en microplaque en renouvelant le dépôt de produit testé sur le biofilm.

Nous avons pu détecter des effets d'inhibition indirectement liés à l'activité enzymatique propre de la préparation, pouvant être attribués à un simple phénomène d'adsorption protéique des protéines (enzymes) ou des additifs (glycérol, amidon). Pour pallier cet effet, il semble indispensable d'étudier les effets en augmentant le temps de formation du biofilm et de tester des témoins avec l'activité enzymatique inhibée.

Certaines enzymes comme la protéase Amano ont montré une augmentation du biofilm. Cette augmentation apparaît en prévention d'un biofilm de 24 heures alors qu'en prévention d'un biofilm de 3 heures on observe une inhibition. On a pu montrer que l'augmentation du nombre de cellules adhérentes n'est observable que sur les cellules totales et non pas sur les cellules vivantes et que leur adhésion s'effectuait en amas. Il s'agirait ici d'un phénomène d'adaptation des bactéries à des conditions défavorables d'adhésion comme ceux déjà observés en présence d'agents antimicrobiens (biocides, antibiotiques).

Nous avons également testé l'efficacité d'un mélange de 4 activités enzymatiques différentes : protéase,  $\alpha$ -amylase, lipase et estérase. Des activités synergiques sur l'inhibition du biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 sur microplaque ont été observées montrant qu'en mélange un même pourcentage d'inhibition est atteint pour des concentrations de chaque enzyme plus faibles que si elles étaient utilisées seules. De plus, cette étude a permis de montrer le potentiel antialissure de l'activité estérase au sein d'un mélange, non détectée lors du criblage. Cette observation suggère que l'hydrolyse de liaisons esters de molécules organiques, en association avec d'autres activités enzymatiques, jouerait un rôle dans l'inhibition de l'adhésion de *Pseudoalteromonas sp.* D41 sur le polystyrène.

Ce mélange s'est révélé efficace contre la formation de biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 sur polystyrène mais moins sur surface de verre. Son efficacité disparaît en présence d'un

biofilm composé d'une bactérie marine D01 aux propriétés de surface différentes de celle de *Pseudoalteromonas sp.* D41 et diminue en présence du biofilm mixte composé de D41 et D01. Le mélange est donc spécifique de la surface et de la bactérie modèle sur lequel il a été sélectionné. L'effet de la surface pourrait être évité suite à une immobilisation contrôlée des enzymes sur le support. Le mélange d'enzymes à large spectre antibiofilm reste encore à optimiser. De part notre étude et l'étude bibliographique, nous avons identifié une protéase à large spectre antisalissure : la subtilisine. A l'aide de la méthodologie mise au point dans cette étude, il sera utile de tester des mélanges, contenant au moins la subtilisine, sur des biofilms mixtes.

Concernant ces mécanismes impliqués dans l'inhibition de la formation et du développement du biofilm par les enzymes, plusieurs hypothèses peuvent être posées. Les molécules organiques cibles des enzymes peuvent être à la fois les molécules organiques adsorbées dans les tous premiers temps (film primaire), les molécules membranaires impliquées dans la phase d'adsorption initiale (type adhésines), les substances polymériques formées à la surface de la bactérie ou excrétées dans la matrice et les molécules organiques du quorum sensing. Les études réalisées sur les substances polymériques produites par *Pseudoalteromonas sp.* D41 en fermenteur ont révélé une présence majoritaire de protéines dans la fraction d'EPS liée au culot cellulaire. Les observations en microscopie ont montré la forte présence d'extrémités NH<sub>2</sub>, caractéristiques des acides aminés des protéines, au sein du biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41 formé pendant 24 heures en eau de mer sur lame de verre. Ces observations sont en adéquation avec les différents résultats de caractérisation de surface de *Pseudoalteromonas sp.* D41 (Rubio, 2002 ; Pradier *et al.*, 2005) montrant une composition à majorité protéique. Les protéases montrent la meilleure efficacité d'inhibition du biofilm de *Pseudoalteromonas sp.* D41. On peut donc supposer que les molécules capsulaires des bactéries seraient davantage la cible des enzymes que les EPS excrétées dans la matrice ou les molécules du quorum sensing en ce qui concerne notre étude. Les EPS capsulaires seraient impliquées dans les phénomènes d'adhésion initiaux, expliquant le potentiel plus élevé d'inhibition du biofilm observé en prévention par rapport au lavage.

Nous avons démontré le potentiel anti-biofilm de certaines préparations enzymatiques en solution dans les conditions de laboratoire. Nous avons également montré que la subtilisine pouvait conditionner en partie la surface du puits par simple adsorption protéique. Il serait très intéressant de confirmer ce potentiel directement en eau de mer sur l'adhésion de salissures marines naturelles, après adsorption par exemple de la subtilisine sur une surface.

La perspective d'utilisation des enzymes en tant qu'agent antisalissure sera de les incorporer dans des peintures antisalissures, via la mise au point de méthode d'encapsulation d'enzymes afin qu'elles puissent garder leur activité enzymatique au sein de la matrice ; ou de les greffer directement sur des alliages métalliques ou polymères. De plus, l'application d'enzymes en circuits de refroidissement pourrait se faire par injection directement de solutions enzymatiques en discontinue. Il serait d'ailleurs très intéressant d'étudier leur activité en présence de détergents comme les produits Mexels® afin d'observer une éventuelle synergie. L'injection d'enzymes en circuits de refroidissement permettrait de

diminuer l'utilisation de produits biocides. Il sera cependant nécessaire d'injecter des doses d'enzyme suffisantes pour être efficaces mais non polluantes et à un coût abordable.



# Bibliographie

Aldridge I.Y., Chmurny A.B., Durham D.R., Roberts R.L., 1998. Proteases to inhibit and remove biofilm. Brevet BetzDearborn. EP0590746B1.

Allermann K. et Sneider I., 2001. Antifouling paint composition comprising rosin and enzyme. Brevet Biocus. WO 01/729011.

Allison D.G., 2003. The Biofilm matrix. *Biofouling*. 19, 139-150.

Allison D.G. et Sutherland I.W., 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *The journal of general microbiology*. 133, 1319-1327.

Alzieu C., 1996. Biological effects of tributyltin on marine organisms. Dans "Tributyltin: case study of an environmental contaminant". de Mora S.J. Ed. Cambridge University Press, Cambridge. 167-211.

Alzieu C., 1998. Tributyltin: case of study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean and Coastal Management*. 40, 23-36.

Amsterdam D., 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Dans "Antibiotics in Laboratory Medicine (4th ed.)". Lorian V.M.D. Ed. Williams & Wilkins. 52-111.

An Y.H., Blair B.K., Martin K.L., Friedman R.J., 2000. Macromolecule surface coating for preventing bacterial adhesion. Dans "Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications". An Y.H. et Friedman R.J. Ed. Humana Press Inc., Totowa N.J. 609-625.

Anderson K.W., Loisel M., Bachas L., 2003. Use of enzymes to inhibit biofouling. *26th Proceedings of the annual meeting of the adhesion society*. 451-453.

Armstrong E., Boyd K.G., Burgess J.G., 2000a. Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnology annual review*. 6, 221-241.

Armstrong E., Boyd K.G., Pisacane A., Peppiatt C.J., Burgess J.G., 2000b. Marine microbial natural products in antifouling coatings. *Biofouling*. 16, 215-224.

Augustin M. et Ali-Vehmas T., 2004. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of pharmacy and pharmaceutical science*. 7, 55-64.

Aunstrup K., Andresen O., Outtrup H., 1972. Preparation of proteolytic enzymes having maximum activity at high alkalinity. Brevet Novo Therapeutisk Labor AS. US3674643.

Baier R.E., 1972. Organics films on natural waters: their retrieval, identification, and modes of elimination. *Journal of geophysical research*. 77, 5062-5075.

Baier R.E., 1984. Initial events in microbial film formation. Dans "Marine biodetermination: an interdisciplinary study". Costlow J.D. et Tipper R.C. Ed. E. & F.N. Spon Ltd., London. 57-62.

Baldrige J.W. et Michalow A., 2003. Biofilm reduction in crossflow filtration systems. Brevet Advanced Biocatalytics Corp. WO03022752.

Barnes L.-M., Lo M.F., Adams M.R., Chamberlain A.H.L., 1999. Effect of milk proteins on

adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and environmental microbiology*. 65, 4543-4548.

Barrat C., 1973. Composition détergente contenant des enzymes. Brevet Procter et Gamble. FR2164700.

Barton N., Robertson D., Chang K., Elkins J., 2004. Enzymes and the nucleic acids encoding them and methods for making and using them. Brevet Diversa Corporation. WO2004066945.

Bassler B.L., 1999. A multichannel two-component signalling relay controls quorum sensing in *Vibrio harveyi*. Dans "Cell-cell signalling in bacteria". Dunny G.M., Winans S.C. Ed. Washington DC, ASM Press. 259-273.

Baum C., Fleisher L.G., Roessner D., Meyer W., Siebers D., 2002. A covalently cross-linked gel derived from the epidermis of the pilot whale *Glociphala melas*. *Biorheology*. 39, 703-717.

Baum C., Meyer W., Roessner D., Siebers D., Fleisher L.G, 2001. A zymogel enhances the self-cleaning abilities of the skin of the pilot whale *Glociphala melas*. *Comparative biochemistry and physiology Part A*. 130, 845-847 .

Baveja J.K., Willcox M.D.P., Hume E.B.H., Kumar N., Odell R., Poole-Warren L.A., 2004. Furanones as potential anti-bacterial coatings on biomaterials. *Biomaterials*. 25, 5003-5012.

Beech I.B. et Sunner J., 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology*. 15, 181-186.

Beech I., Hanjagsit L., Kalaji M., Neal A.L., Zinkevich V., 1999. Chemical and structural characterization of exopolymers produced by *Pseudomonas sp.* NCIMB 2021 in continuous culture. *Microbiology*. 145, 1491-1497.

Bennett R.F., 1996. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. Dans "Tributyltin: case study of an environmental contaminant". de Mora S.J. Ed. Cambridge University Press, Cambridge. 21-61.

Birkhed D., Rosell K-G., Granath K., 1979. Structure of extracellular water-soluble polysaccharides synthesized from sucrose by oral strains of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces viscosus*. *Archives of oral biology*. 24, 53-61.

Blumenkrantz N. et Asboe-Hansen G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*. 54, 484-489.

Bockelmann U., Szewzyk U., Grohmann E., 2003. A new enzymatic method for the detachment of particle associated soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 55, 201-211.

Boivin P., 1997. Les enzymes en brasserie. Dans "Enzymes en agroalimentaire". Larreta-Garde V. Ed. Lavoisier TEC & DOC. 138-164.

Bonaventura C., Bonaventura J., Irving R., 1999. Anti-fouling methods using enzyme coatings. Brevet Duke University. US 5 998 200 .

Bonnin E., Renard C., Thibault J.F., Ducroo P., 1997. Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisations alimentaires. Dans "Enzymes en agroalimentaire". Larreta-Garde V. Ed. Lavoisier TEC & DOC. 169-197.

- Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*. 23, 179-229.
- Bos R., van der Mei H.C., Gold J., Busscher H.J., 2000. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. 189, 311-315.
- Boschin F., Boutigny H., Delcourt-Debruyne E., 2004. Maladies gingivales induites par la plaque . *Dentisterie*. 1, 462-480.
- Bott T.R., 1998. Techniques for reducing the amount of biocide necessary to counteract the effects of biofilm growth in cooling water systems. *Applied thermal engineering*. 18, 1059-1066.
- Boyd A. et Chakrabarty A.M., 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied in environmental microbiology*. 60, 2355-2359.
- Bradshaw D.J., 1997. Effect of conditioning films on oral microbial biofilm development. *Biofouling*. 11, 217-226.
- Brady R.F., 2001. A fracture mechanical analysis of fouling release from nontoxic antifouling coatings. *Progress in organic coatings*. 43, 188-192.
- Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R., 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*. 13, 20-26.
- Breusegem S.Y., Clegg R.M., Loontjens F.G., 2002. Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)<sub>4</sub> DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AAAT complex. *Journal of molecular biology*. 315, 1049-1061.
- Briandet R., Herry J.M., Bellon-Fontaine M.-N., 2001. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 21, 299-310.
- Brisou J.F., 1995. "Biofilms, methods for enzymatic release of microorganisms". Brisou J.F. Ed. CRC Press.
- Bryan P.J., Rittschof D., McClintock J.B., 1996. Bioactivity of echinoderm ethanolic body-wall extracts: an assessment of marine bacterial attachment and macroinvertebrate larval settlement. *Journal of experimental marine biology and ecology*. 196, 79-96.
- Budny J.A. et Budny M.J., 2000. Compositions for controlling bacterial colonization. Brevet PharmaCal Biotechnologies. US6159447.
- Callow M., 1986. A world-wide survey of slime formation on antifouling paints. Dans "Algal biofouling, studies environmental science". Evans L. and Hoagland K. Elsevier, New York. 1-20.
- Carpenter R., Wolff A.M., Lad P.J., 1990. Method employing type II endoglycosidase. Brevet The Procter and Gamble Company. EP0425017.
- Cerf O., 2002. Risques bactériens liés aux produits laitiers. *Revue Française des Laboratoires*. 2002, 67-69.
- Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A., 1999. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.

*Journal of clinical microbiology*. 37, 1771-1776.

Characklis W.G., 1990. Microbial fouling. Dans "Biofilms". Characklis W.G., Marshall K.C. Ed. Wiley, New York. 523-584.

Chasseignaux E., G rault P., Toquin M.T., Salvat G., Colin P., Ermel G., 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology letters*. 210, 271-275.

Christensen B.E. et Characklis W.G., 1990. Physical and chemical properties of biofilms. Dans "Biofilms". Characklis W.G., Marshall K.C. Ed. Wiley, New York. 93-130.

Christensen B.E., Ertesvag H., Beyenal H., Lewandowski Z., 2001. Resistance of biofilms containing alginate-producing bacteria to disintegration by an alginate degrading enzyme. *Biofouling*. 17, 203-210.

Christensen B.E., Kjosbakken J., Smidsrod O., 1985a. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Applied and environmental microbiology*. 50, 837-845.

Christensen G.D., Simpson W.A., Anglen J.O., Gainor B.J., 2000. Methods for evaluating attached bacteria and biofilms. Dans "Handbook of bacterial adhesion : principles, methods and applications" An Y. H. et Friedman R.J. Ed. Humana Press Inc., Totowa. NJ. 213-233.

Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E. H., 1985b. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical device. *Journal of clinical microbiology*. 22, 996-1006.

Christensen R.J. et Zivtins G.J., 1977. Enzymatic dispersion of biological slimes. Brevet Nalco Chemical Company. US4055467.

Chugani S.A., Whiteley M., Lee K.M., D'Argenio D., Manoil C., Greenberg E.P., 2001. QscR, a modulator of quorum sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences*. 98, 2752-2757.

Coleman A.W., 1980. Enhanced detection of bacteria in natural environment by fluorochrome staining of DNA. *Limnology and oceanography*. 25, 948-951.

Collic-Jouault S., Zanchetta P., Helley D., Ratiskol J., Sinquin C., Fisher A.M., Guezennec J., 2004. Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en th rapeutique humaine. *Pathologie Biologie*. 52, 127-130.

Compère C., Bellon-Fontaine M.-N., Bertrand P., Costa D., Marcus P., Poleunis C., Pradier C.-M. Rondot B., Walls M.G., 2001. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling*. 17, 129-145.

Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T., 2002. Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 26, 373-378.

Corbett J. et Fischbank F., 1997. Emissions from ships. *Science*. 278, 823-824.



- Corpe W.A., 1970a. An acid polysaccharide produced by a primary film-forming bacterium. *Developpement in industrial microbiology*. 11, 402-412.
- Corpe W.A., 1970b. Attachment of marine bacteria to solid surfaces. Dans "Adhesion in biological systems", Manly R.S. Ed. Academic press Inc. 73-85.
- Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.-J., 1978. Comment collent les bactéries. *Pour la science*. 5, 100-110.
- Costerton J.W., Irvin R.T., Cheng K.-J., 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual review of Microbiology*. 35, 299-324.
- Courtney H.S., Ofek I., Hasty D.L., 1997. M protein mediated adhesion of M type 24 *Streptococcus pyogenes* stimulates release of interleukin-6 by HEP-2 tissue culture cells. *FEMS Microbiology Letters*. 151, 65-70.
- Dalton H.M. et March P.E., 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology*. 9, 252-255.
- Daniel G., Chamberlain A., Jones E., 1987. Cytochemical and electron microscopical observations of the adhesive materials of marine fouling diatoms. *British phycollogical journal*. 22, 101-118.
- Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 28, 261-289.
- Danielsson A., Norkrans B., Björnsson A., 1977. On bacterial adhesion - The effect of certain enzymes on adhered cells of a marine *Pseudomonas* sp. *Botanica Marina*. XX, 13-17.
- Davey M.E., Caiazza N.C., O'Toole G.A., 2003. Rhamnolipide surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Journal of bacteriology*. 185, 1027-1036.
- Davies D.G., Chakrabarty A.M., Geesey G.G., 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*. 59, 1181-1186.
- Davies D.G., Parsek M.R.M., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., 1998. The involvement of cell-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280, 295-298.
- Davies J.A., Anderson G.K., Beveridge T.J., Clark H.C., 1983. Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain. *The journal of bacteriology*. Nov, 837-845.
- De Groot P.W.J., Ram A.F., Klis F.M., 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal genetics and biology*. 42, 657-675.
- Delord F., 1999. Le contrôle des biofilms par voie enzymatique: une solution écologique et économique. *L'eau, l'industrie, les nuisances*. 219, 43-49.
- Desmazeaud M. et Spinnler E., 1997. Les enzymes dans la fabrication des aliments. Dans "Enzymes en agroalimentaire". Larreta-Garde V. Lavoisier TEC & DOC. 48-71.
- Dong Y.-H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L.H., 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the

- acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Microbiology*. 97, 3526-3531.
- Donlan R.M., Priede J.A., Heyes C.D., Sani L., Murga R., Edmonds P., El-Sayed I., El-Sayed M.A., 2004. Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms *in situ* and in real time. *Applied and environmental microbiology*. 70, 4980-4988.
- Donzelli D.G.G., Ostroff G., Harman G.E., 2003. Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydrate research*. 338, 1823-1833.
- Drenth J.I., Jansonius J.N., Koekoek R., Walther B.G., 1971. *Advances in protein chemistry*. 25, 79-115.
- Dunny G.M. et Winans S.C., 1999. "Cell-cell signaling in bacteria". Dunny G.M. and Winans S.C. Ed. Washington D.C. ASM Press.
- Durham D., Glick J.H., Fodge D.W., Swann W. E., 1986. Method for unclogging drainage pipes. Brevet Genex Corporation. US4610800.
- Evans L.R. et Linker A., 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *The journal of bacteriology*. 116, 915-924.
- Evans L.V. et Christie A.O. 1970. Studies on the ship-fouling alga *enteromorpha*. *Annals of botany*. 34, 451-456.
- Evans S.M., Birchenough A.C., Brancato M.S., 2000. The TBT ban : out of the trying pan into the fire? *Marine pollution bulletin*. 40, 204-211.
- Farge P., 1998. Données récentes sur l'étiopathogénie de la carie. *Archives de Pédiatrie*. 5, 1140-1144.
- Féra P. 1985. Etude expérimentale de la colonisation par les bactéries de surfaces immergées en milieu marin. Thèse de l'Université de Bretagne Occidentale, Brest. 203 p.
- Filisetti-Cozzi C.C. et Carpita N.C., 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry*. 197, 157-162.
- Filloux A. et Vallet I., 2003. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine/sciences*. 19, 77-83.
- Flemming H.-C., 2002. Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures. *Applied and environmental biotechnology*. 59, 629-640.
- Flemming H.-C. et Wingender J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water science and technology*. 43, 1-8.
- Fletcher M., 1976. The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. *Journal of general microbiology*. 94, 400-404.
- Fletcher M., 1977. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian journal of microbiology*. 23, 1-6.

- Frelinghuysen G.G., 1932 . Process of making a soap compound. Brevet P. Ballantine & Sons. US1882279.
- Fuqua C. et Greenberg E.P., 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Molecular cell biology Nature reviews*. 3, 685-695.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P., 1994. Quorum sensing in bacteria - the luxR–luxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *The journal of bacteriology*. 176, 269-275.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*. 13, 34-40.
- Fykse E.M., Olsen J.S., Skogan G., 2003. Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. *Journal of microbiological methods*. 55, 1-10.
- Garabétian F., Petit M., Lavandier P., 1999. Does storage affect epifluorescence microscopic counts of total bacteria in freshwater samples? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 322, 779-784.
- Garrett-Price B.A., Smith S.A., Watts R.L., Knudsen J.G., 1985. "Fouling of heat exchangers - Characteristics, costs, prevention, control and removal." New-Jersey: Noyes publications.
- Gollasch S., 1999. The Asian decapod hemigrapsus penicillatus introduced in european waters: status quo and further perspectives. *Helgolander meeresunters*. 52, 359-356.
- Göransson U., Sjögren M., Svangard E., Claeson P., Bohlin L., 2004. Reversible antifouling effect of the cyclotide cycloviolacin O2 against barnacles. *Journal of natural products*. 67, 1287-1290.
- Gough M.A., Fothergill J., Hendrie J.D., 1994. A survey of southern England coastal waters for the s-triazine antifouling compound Irgarol 1051. *Marine pollution bulletin*. 28, 613-620.
- Grant D.M., Bott T.R., 2005. Biocide dosing strategies for biofilm control. *Heat transfer engineering*. 26, 44-50.
- Hahn Berg I.C., Kalfas S., Malmsten M., Arnebrant T., 2001. Proteolytic degradation of oral biofilms *in vitro* and *in vivo* : potential of proteases originating from *Euphausia superba* for oral plaque control. *European Journal of Oral Sciences*. 109, 316-324.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P., 2004. Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*. 2, 95-108.
- Hamade R.K., Yamamori N.T., Okahata Y.K, 1998. Glucoside derivatives for enzyme modification, lipid-coated enzymes, method of producing such enzymes and antifouling paint composition. Brevet Nippon Paint Co. US 5 770 188.
- Harris J.M., 1992. "Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications". Harris J.M. Ed. New York Plenum press.
- Hatcher H.J., Truda R.J., Lechner T.G., McDuff C.R., 1973. Slime control in industrial waters. Brevet Economics Laboratory. US3773623.
- Heinen E., Zorzi W., Zorzi D., El Moualij B., Melen L., 2002. Method for extracting intact micro-organisms from sludge or biofilms. Brevet Université de Liège. WO02/31184A2.

- Hellio C., Berge J.P., Beaupoil C., Le gal Y., Bourgougnon N., 2002. Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling*. 18, 205-215.
- Hellio C., de la Broise D., Dufossé L., Le Gal Y., Bourgougnon N., 2001. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine environmental research*. 52, 231-247.
- Henoun Loukili N., Becker H., Harno J., Bientz M., Meunier O., 2004a. Effect of peracetic acid and aldehyde disinfectants on biofilm. *Journal of Hospital Infection*. 58, 151-154.
- Henoun Loukili N., Zink E., Grandadam S., Bientz M., Meunier O., 2004b. Effectiveness of detergent-disinfecting agents on *Escherichia coli* 54127 biofilm. *Journal of Hospital Infection*. 57, 175-178.
- Heo S.-J., Park E.J., Lee K.W., Jeon Y.J., 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 96, 1613-1623.
- Hernandez-Mena R. et Friend P.L., 1993. Enzyme treatment for industrial slime control. Brevet Betz Laboratories. WO5238572.
- Hollis C., Terry J., Jaquess P., 1995. Composition and methods for removing or preventing biofilm. Brevet Buckman Laboratories international, INC. EP0525166.
- Holmström C., Egan S., Franks A., McCloy S., Kjelleberg S., 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology ecology*. 41, 47-58.
- Holmström C., Rittschof D., Kjelleberg S., 1992. Inhibition of settlement of larvae of *Balanus amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a surface-colonising marine bacterium. *Applied and environmental microbiology*. 58, 2111-2115.
- Holmström C., Steinberg P., Christov V., Christie G., Kjelleberg S., 2000. Bacteria immobilised in gels: improved methodologies for antifouling and biocontrol applications. *Biofouling*. 15, 109-117.
- Hood S.K. et Zottola E.A. 1995. Biofilms in food processing. *Food control*. 6, 9-18.
- Inamorato J.T. et Hunter R.T, 1976. Detergent materials containing enzymes. Brevet Colgate-Palmolive Company. US3931034.
- Itoh Y., Wang X., Hinnebush B.J., Preston III J.F., Romeo T., 2005. Depolymerization of  $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *Journal of bacteriology*. 187, 382-387.
- Jahn A., Griebe T., Nielsen P.H., 1999. Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling*. 14, 49-57.
- Johansen C., 2001. A Method for enzymatic treatment of biofilm. Brevet Novozymes. EP0946207.
- Johansen C., Bredtved B.K., Moller S., 1999. Use of conductance measurements for determination of enzymatic degradation of microbial biofilm. *Methods in enzymology*. 310, 353-361.
- Johansen C., Falholt P., Gram L., 1997. Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms.

*Applied and environmental microbiology*. 63, 3724-3728.

Jones J.D. et Collier E.J., 1974. Enzyme-containing detergent compositions. Brevet The Procter and Gamble Company. US3790482.

Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegthart J.F.G., Clamp J.R., 1975. Characterization by gas-liquid chromatography mass spectrometry of permethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal*. 151, 491-495.

Kämper M., Vetterkind S., Berker R., Hoppert M., 2004. Methods for *in situ* detection and characterization of extracellular polymers in biofilms by electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods*. 57, 55-64.

Kaplan J.B., Ragnath C., Velliyagounder K., Fine D.H., Ramasubbu N., 2004. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermis* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 48, 2633-2636.

Kenne L. et Lindberg B., 1983. Bacterial polysaccharides. Dans "The polysaccharides". Aspinall G.O. Ed. Academic Press Inc. 287-363.

Kidby D.K. et Davidson D.J., 1973. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Analytical biochemistry*. 55, 321-325.

Kilcawley K.N., Wilkinson M.G., Fox P.F., 2002. Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources . *Enzyme and Microbial Technology*. 31, 310-320.

Kim K.S., Chang J.E., Yun H.S., 2004. Estimation of soluble  $\beta$ -glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex® 200G treatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 35, 672-677.

Kjelleberg S., Molin S., 2002. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology*. 5, 254-258.

Klausen M., Aes-jorgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T., 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular microbiology*. 50, 61-68.

Konkel M.E., Garvis S.G., Tipton S.L., Anderson D.E., Cleptak W., 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*. 24, 953-963.

Kraut J., 1977. *Annual review of biochemistry*. 46, 331-358.

Kwon K.-J., Park K.-J., Kim J.-D., Kong J.-Y., Kong I.-S., 1994. Isolation of two different polysaccharides from halophilic *Zoogloea* sp. *Biotechnology letters*. 16, 783-788.

Kwon K.K., Lee H.S., Jung S.-Y., Yim J.-H., Lee J.-H., Lee H.K., 2002. Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike, Korea. *The journal of microbiology*. 40, 260-266.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Landbo A.-K. et Meyer A.S., 2004. Effects of different enzymatic maceration treatments on

enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 5, 503-513.

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

Lejeune P., 2003. Contamination of abiotic surfaces : what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends in microbiology*. 11, 179-184.

Leriche V. et Carpentier B., 2000. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of applied microbiology*. 88, 594-605.

Letartre B., 2002. Composition pour le traitement d'objets destinés à être désinfectés. Brevet Laboratoires Anios. FR2818150.

Levi Y., 2001. Ecologie microbienne des réseaux d'eau potable et risque microbiologique : l'exemple de *Legionella pneumophila*. *Revue Française des Laboratoires*. 2001, 33-37.

Lineweaver H. et Jansen E.F. 1951. Pectic enzymes. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*. 11, 267-295.

Liu C., 1990. Thermophilic alginate lyase from *Bacillus stearothermophilus* NRRL B-18394. Brevet Novo-Nordisk. WO90/02794.

Loeb G.I. et Neihof R.A., 1975. Marine conditioning films. Dans "Applied chemistry at protein interfaces". Baier R.E. Ed. American chemical society Washington. 319-335.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.J., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 193, 265-275.

Lutey R.W., 1997. Enzyme technology: a tool for the prevention and mitigation of microbiologically influenced corrosion. *58th International conference water*. 676-683.

Lutterbach M.T.S. et França F.P. 1996. Biofilm formation in water cooling systems. *World journal of microbiology and biotechnology*. 12, 391-394.

Mack D., Fisher W., Krokotsch A., Leopold K., Hartmann R., Egge H., Laufs R., 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermis* is a linear  $\beta$ -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of bacteriology*. 178, 175-183.

Maeda H. et Ishida N., 1967. Specificity of binding of hexopyranosyl polysaccharides with fluorescent brightener. *The journal of biochemistry*. 62, 276-278.

Mah T.-F.C. et O'Toole G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*. 9, 34-39.

Makin S.A. et Beveridge T.J., 1996. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and surfaces. *Microbiology*. 142, 299-307.

Malik A. et Kakii K., 2003. Intergeneric coaggregations among *Oligotropha carboxidovorans* and *Acinetobacter* species present in activated sludge. *FEMS Microbiology Letters*. 224, 23-28.

- Manefield M., de Nys R., Kumar N., Read R., Givskov M., Steinberg P., Kjelleberg S., 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*. 145, 283-291.
- Manyak D.M., Weiner R.M., Carlson P.S., Quintero E.J., 2004. Preparation and use of biofilm-degrading, multiple-specificity, hydrolytic enzyme mixtures. Brevet University of Maryland. US6759040.
- Marion K. et Sanchez T., 2004. Procédé d'élimination du biofilm. Brevet WO4004041988.
- Martinez K., Ferrer I., Hernando M.D., Fernandez-Alba A.R., Marcé R.M., Borull F., Barcelo D., 2001. Occurrence of antifouling biocides in the spanish mediterranean marine environment. *Environmental Technology*. 22, 543-552.
- Maréchal J.-P., Culioli G., Hellio C., Thomas-Guyon H., Callow M.E., Clare A.S., Ortalo-Magné A., 2004. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (*Cystoseiraceae*) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 313, 47-62.
- Mausner M.L., Teaneck Wiesenfeld A., 1972. Stable enzyme containing liquid detergent. Brevet Witco Chemical Corporation. US3697451.
- McCarty C. B., 1971. Enzyme containing detergent composition and a process for conglutination of enzymes and detergent composition. Brevet The Procter and Gamble Company. US3553139.
- McLean R.J.C., Whiteley M., Stickler D.J., Fuqua W.C., 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. 154, 259-263.
- Miyajima N., Hata K., Nakayama J., 1987. Detergent composition for contact lenses. Brevet Lion Corporation. US4710313.
- Montreuil J., Bouquelet S., Debray H., Fournet B., Spik G., Strecker G., 1986. Glycoproteins. Dans "Carbohydrate analysis, a practical approach". Chaplin M.F. et Kennedy J.F. Ed. IRL press, Oxford. 143-204.
- Muralidharan J. et Jayachandran S., 2003. Physicochemical analysis of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Process biochemistry*. 38, 841-847.
- Nakadai T., Nasuno S., Iguchi N., 1973. Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agricultural and biological chemistry*. 37, 2703-2708.
- Neu T.R. et Lawrence J.R., 1999a. *In situ* characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilms systems. Dans "Microbial extracellular polymeric substances". Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. Ed. Springer, Berlin. 21-47.
- Neu T.R. et Lawrence J.R., 1999b. Lectin-binding analysis in biofilm systems. *Methods in Enzymology*. 310, 145-150.
- Neu T.R., Woelfl S., Lawrence J.R., 2004. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy (single-photon and two-photon excitation). *Journal of Microbiological Methods*. 56, 161-172.

- Neurath H., 1989. The diversity of proteolytic enzymes. Dans "Proteolytic enzymes: a practical approach". Beynon R.J. et Bond J.S. Ed. Oxford university press. 1-13.
- Nielsen P.H. et Jahn A., 1999. Extraction of EPS. Dans "Microbial extracellular polymeric substances". Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. Ed. Springer, Berlin. 49-72.
- Norde W. et Favier J.P. 1992. Structure of adsorbed and desorbed proteins. *Colloids Surfaces*. 64, 87-93.
- Odier E. et Rouau X., 1985. Les cellulases et les enzymes de dépolymérisation de la lignine. Dans "Hydrolases et dépolymérasés: enzymes d'intérêt industriel". Mouranche A. et Costes C. Ed. Collection biochimie appliquée, Gauthier-Villars. 199-237.
- Omae I., 2003. Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied organometallic chemistry*. 17, 81-105.
- O'Toole G.A. et Kolter R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 30, 295-304.
- O'Toole G.A., Pratt L.A., Watnick P.I., Newman D.K., Weaver V.B., Kolter R., 1999. Genetic approaches to study biofilms. *Methods in enzymology*. 310, 91-109.
- Ottesen M. et Svendsen I. 1970. The subtilisins. *Methods in enzymology*. 19, 199-215.
- Otto K., Elwing H., Hermansson M., 1999. The role of type 1 fimbriae in adhesion of *Escherichia coli* to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 15, 99-111.
- Park J.T. et Johnson M.J., 1949. A submicrodetermination of glucose. *Journal of biological chemistry*. 181, 149-151.
- Pettitt M.E., Henry S.L., Callow M.E., Callow J.A., Clare A.S., 2004. Activity of commercial enzymes on settlement and adhesion of cypris larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, spores of the green alga *Ulva Linza*, and the diatom *Navicula permituta*. *Biofouling*. 20, 299-311.
- Pitts B., Hamilton M.A., Zilver N., Stewart P.S., 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*. 54, 269-276.
- Pradier C.-M., Rubio C., Poleunis C., Bertrand P., Marcus P., Compère C., 2005. Surface characterisation of three marine bacteria strains by FT-IR, XPS and ToF-SIMS, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. *The journal of physical chemistry*. 109, 9540-9549.
- Pratt L.A. et Kolter R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia Coli* biofilm formation : roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 30, 285-293.
- Pratt L.A. et Kolter R., 1999. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. *Current opinion in microbiology*. 2, 598-603.
- Prigent-Combaret C., Prensier G., Le Thi T.T., Vidal O., Lejeune P., Dorel C., 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology*. 2, 450-464.
- Pritchard A.M., 1987. The economics of fouling. Dans "Fouling science and technology, NATO



- ASI Series E". Melo L.F., Bott T.R., Bernardo C.A. Ed. Kluwer academic publishers. 31-45.
- Qian P.-Y., Thiyagarajan V., Lau S.C.K., Cheung S.C.K., 2003. Relationship between community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*. *Aquatic microbial ecology*. 33, 225-237.
- Raguénes G.H.C., Peres A., Ruimy R., Pignet P., Christen R., Loaec M., Rougeaux H., Barbier G., Guezennec J. G., 1997. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of applied microbiology*. 82, 422-430.
- Ramasubbu N., Thomas L.H., Raganath C., Kaplan J.B., 2005. Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of molecular biology*. 349, 475-486.
- Rawlings N.D. et Barrett A.J., 1994a. Families of cysteine peptidases. *Methods in enzymology*. 244, 461-486.
- Rawlings N.D. et Barrett A.J., 1994b. Families of serine peptidases. *Methods in enzymology*. 244, 19-61.
- Reese E.T. et Mandels M., 1959.  $\beta$ -D-1,3-Glucanases in fungi. *Canadian journal of microbiology*. 5, 173-185.
- Reise K., Gollasch S., Wolff W.J., 1999. Introduced marine species of the North Sea coasts. *Helgolander meeresunters*. 52, 219-234.
- Reisner A., Haagensen J.A.J., Schembri M.A., Zechner E.L., Molin S., 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular microbiology*. 48, 933-946.
- Rhöm O., 1920. Procédés et produit pour le nettoyage par l'emploi d'enzymes. FR506655.
- Rimington C., 1931. The carbohydrate complex of serum protein. II : Improved method of isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of ox blood. *Biochemical journal*. 25, 1062-1071.
- Rittschof D., 2000. Natural product antifoulants: one perspective on the challenges related to coatings development. *Biofouling*. 15, 119-127.
- Roche D.M., Byers J.T., Smith D.S., Glansdorp F.G., Spring D.R., Welch M., 2004. Communications blackout? Do *N*-acylhomoserine-lactone-degrading enzymes have any role in quorum sensing? *Microbiology*. 150, 2023-2028.
- Rougeaux H., Kervarec N., Pichon R., Guezennec J., 1999. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent . *Carbohydrate research*. 332, 40-45.
- Rougeaux H., Pichon R., Kervarec N., Raguénes G.H.C., Guezennec J.G., 1996. Novel bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate polymers*. 31, 237-242.
- Rubio C., 2002. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse, Université Paris 6. 213 p.
- Russel A.D., 2003. Biocide use and antibiotics resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet infectious diseases*. 3, 794-800.

- Salhani N. et Uelker-Deffur A., 1998. Improved quantification of aggregated bacteria by combined enzymatic and mechanical treatment of flocs and biofilm from a rotating drum bioreactor. *Water Research*. 32, 1287-1295.
- Samain E., Miles M., Bozzi L., Dubreucq G., Rinaudo M., 1997. Simultaneous production of two different gel-forming exopolysaccharides by an *Alteromonas* strain originating from deep sea hydrothermal vents. *Carbohydrate polymers*. 34, 235-241.
- Sampaio G., Bourdineaud J.-P., Lauquin G.J.-M., 1999. A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisia*: cell wall targeting. *Molecular microbiology*. 34, 247-252.
- Santhanalakshmi J. et Balaji S. 2001. Binding studies of crystal violet on proteins. *Colloides surfaces A*. 186, 173-177.
- Sasahara K.C. et Zottola E.A., 1993. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal of food protection*. 56, 1022-1028.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology*. 184, 1140-1154.
- Sava A., 2004. Treating micro-organisms in water using boron conditioned enzymes. Brevet Novapharm Res Australia et Sava A.. WO2004002896.
- Scarlett A., Donkin P., Fileman T.W., Evans S.V., Donkin M.E., 1999. Risk posed by antifouling agent Irgarol 1051 to the seagrass, *Zoster marina*. *Aquatic toxicology*. 45, 159-170.
- Schakenraad J.M. et Busscher H.J., 1989. Cell-polymer interactions: The influence of protein adsorption. *Colloids and surfaces B: Biointerface*. 42, 331-343.
- Schwimmer S. et Balls A.K. 1949. Isolation and properties of crystalline  $\alpha$ -amylase from germinated barley. *Journal of biological chemistry*. 179, 1063-1074.
- Schürks N., Wingender J., Flemming H.C., Mayer C., 2002. Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of biological macromolecules*. 30, 105-111.
- Serran S.J.C., Rodriguez A.J., Perez B.R., Litran T.M., 2001. Enzymatic process for fluidizing or detaching biofilms from different interfaces. Brevet Univ. complutense de Madrid rec. WO0153010.
- Servagent-Noinville S., Revault M., Quiquampoix H., Baron M.H., 2000. Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces: FTIR analysis. *Journal of colloid and interface science*. 221, 273-283.
- Shin H.-W., Smith C.M., Haslbeck E.G., 2001. Minimum effective release rate of antifoulants. 1. Effects of zosteric acid at Ford Island, Hawai (USA). *The journal of environmental biology*. 22, 234-240.
- Singer T.P. et Hofstee B.H.J., 1948. Studies on wheat germ lipase. I. Methods of estimation, purification and general properties of the enzyme. *Archives of biochemistry*. 18, 229-243.
- Sitnikov D.M., Schineller J.B., Baldwin T.O., 1995. Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Molecular microbiology*. 17, 801-812.

- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150, 76-85.
- Somogyi M., 1960. Modifications of two methods for the assay of amylase. *Clinical Chemistry*. 6, 23-35.
- Sorensen H.R., Pedersen S., Vikso-Nielsen A., Meyer A.S., 2005. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Enzyme and Microbial Technology*. 36, 773-784.
- Sosa R.C., Parton R.F., Neys P.E., Lardinois O., Jacobs P.A., Rouxhet P.G., 1996. Surface modification of carbon black by oxidation and its influence on the activity of immobilized catalase and iron-phthalocyanines. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 110, 141-151.
- Soupe J., 1997. La production d'enzymes pour l'agroalimentaire. Dans "Enzymes en agroalimentaire". Larreta-Garde V. Ed. Lavoisier TEC & DOC. 286-303.
- Spiro R.G., 1966. Analysis of sugars found in glycoproteins. *Methods in enzymology*. 8, 3-26.
- Stagoj M.N., Komel R., Comino A., 2004. Microtiter plate assay of yeast cell number using fluorescent dye Calcofluor White M2R. *BioTechniques*. 36, 380-382.
- Stanislawski A.G. et Wiersema R.J., 1985. Cooperative enzymes comprising alkaline or mixtures of alkaline and neutral proteases without stanilizers. Brevet The Clorox Company. US4511490.
- Steinhagen R., Müller-Steinhagen H.M., Maani K., 1993. Fouling problem and fouling costs in New Zealand industries. *Heat transfert engeneering*. 14, 19-29.
- Stewart P.S., Camper A.K., Handran S.D., Huang C.T., Warnecke M., 1997. Spatial distribution and coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Microbial ecology*. 33, 2-10.
- Stewart P.S. et Costerton J.W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358, 135-138.
- Strathmann M., Wingender J., Flemming H.-C., 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods*. 50, 237-248.
- Sutherland I.W., 1999. Biofilm exopolysaccharides. Dans "Microbial extracellular polymeric substances". Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. Ed. Springer, Berlin. 73-92.
- Sutherland I.W., 2001. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*. 9, 222-227.
- Taylor G.T., Zheng D., Lee M., Troy P.J., Gyananath G., Sharma S.K., 1997. Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters. *Biofouling*. 11, 31-57.
- Tillmans J. et Philippi K., 1929. Über den Gehalt der wichtigsten Protein des Nahrungsmittel an Kohlehydraten und über ein kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von stickstoffreien Zucker in Eiweiß. *Boochemistry Z*. 215, 36-60.

- Tomarelli R. M., Charney J., Harding M.L., 1949. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *Journal of laboratory and clinical medicine*. 34, 428-433.
- Trotta E., D'Ambrosio E., Ravagnan G., Paci M., 1995. Evidence for DAPI intercalation in CG sites of DNA oligomer[d(CGACGTTCG)]<sub>2</sub>: a <sup>1</sup>H NMR study. *Nucleic acids research*. 23, 1333-1340.
- Tsoukatou M., Hellio C., Vagias C., Harvala C., Roussis V., 2002. Chemical defense and antifouling activity of three mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57, 161-171.
- Tsukamoto S., Kato H., Hirota H., Fusetani N., 1996. Ceratinamides A et B: new antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron*. 52, 8181-8186.
- Turley P.A., Fenn R.J., Ritter J.C., 2000. Pyrithiones as antifoulants: environmental chemistry and preliminary risk assessment. *Biofouling*. 15, 175-182.
- Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigle M., 1972. Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science*. 178, 871-872.
- Vallet I., Olson J.W., Lory S., Lazdunski A., Filloux A., 2001. The chaperone/ usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceeding of the national academy of science of the USA*. 98, 6911-6916.
- van der Aa B.C. et Dufrêne Y.F., 2002. *In situ* characterization of bacterial extracellular polymeric substances by AFM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 23, 173-182.
- van der Mei H.C., Noordmans J., Busscher H.J., 1990. The influence of a salivary coating on the molecular surface composition of oral *Streptococci* as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Infrared Physics*. 30, 143-148.
- van Houdt R. et Michiels C.W., 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*. 156, 626-633.
- van Loodsrecht M.C.M., Norde W., Lyklema J., Zehner A.J.B., 1990. Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquatic Science*. 52, 103-114.
- van Pee K., van Speybroeck M., van Poele J., 1996. Use of mannanases as slime control agent. Brevet Grace W.R. and Co. WO9636569.
- van Wezel A.P. et van Vlaardingen P., 2004. Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic toxicology*. 66, 427-444.
- Vardakou M., Katapodis P., Topakas E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P., 2004. Synergy between enzymes involved in the degradation of insoluble wheat flour arabinoxylan. *Innovative food science and emerging technologies*. 5, 107-112.
- Vesterlund S., Paltta J., Karp M., Ouwehand A.C., 2005. Measurement of bacterial adhesion: *in vitro* evaluation of different methods. *Journal of microbiological methods*. 60, 225-233.
- Vickery K., Pajkos A., Cossart Y., 2004. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of

detergent efficiency. *American Journal of Infection Control*. 32, 170-176.

Vidal O.L., Pringent-Combaret R.C., Dorel C., Hooreman M., Lejeune P., 1998. Isolation of an *Escherichia Coli* K-12 mutants strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *Journal of bacteriology*. 180, 2442-2449.

Villeneuve P. et Fogilia T.A., 1997. Lipase specificities: potential application in lipid bioconversions. *Inform*. 8, 640-650.

Vincent P., Pignet P., Talmont F., Bozzi L., Fournet B., Guezennec J., Jeanthon C., Prieur D., 1994. Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and environmental microbiology*. 60, 4134-4141.

Vishu Kumar A.B., Varadaraj M.C., Lalitha R.G., Tharanathan R.N., 2004. Low molecular weight chitosans: preparation with the aid of papain and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1670, 137-146.

Voulvoulis N., Scrimshaw M.D., Lester J.N., 1999. Review: alternative antifouling biocides. *Applied organometallic chemistry*. 13, 135-143.

Wahl M., 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine ecology progress series*. 58, 175-189.

Walker G., 1972. The biochemical composition of the cement of two barnacles species, *Balanus hameri* and *Balanus crenatus*. *Journal of the marine biological association of the U.K.* 52, 429-435.

Walker J.T., Bradshaw D.J., Fulford M.R., Marsh P.D., 2003. Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Applied and environmental microbiology*. 69, 3327-3332.

Weber M.M., 1979. Liquid cleaning composition containing stabilized enzymes. Brevet Midwest Biochemical Corporation. US4169817.

Welin J., Wilkins J.C., Beighton D., Svensäter G., 2004. Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*. 70, 3736-3741.

Wetherbee R., Lind J.L., Burke J., 1998. The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *Journal of phycology*. 34, 9-15.

Whistler R.L. et Masek E. 1955. Enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of the american chemical society*. 77, 1241-1243.

Whiteley M., Bangera M.G., Bumgarner R.E., Parsek M.R., Teitzel G.M., Lory S., Greenberg E.P., 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. 413, 860-864.

Wiater A., Szczodrak J., Rogalski J., 2004. Hydrolysis of mutan and prevention of its formation in *Streptococcal* films by fungal  $\alpha$ -glucanases. *Process Biochemistry*. 39, 1481-1489.

Wiatr C., 1990. Controlling industrial slime. Brevet Nalco chemical company. EP0388115.

Wieczorek S.K. et Todd C.D., 1998. Biofilms cues and larval settlement. *Biofouling*. 12, 81-118.

- Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C., 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? Dans "Microbial extracellular polymeric substances". Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. Ed. Springer, Berlin. 1-19.
- Wong A.C.L. 1998. Biofilms in food processing environments. *Journal of dairy science*. 81, 2765-2770.
- Xu F., 2004. Methods for eliminating the formation of biofilm. Brevet Novozymes US6777223.
- Xu F., Byun T., Dussen H.J., Duke K.R., 2003. Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *Journal of Biotechnology*. 101, 89-96.
- Yacobi-Zeevi, 2002. Compositions including glycosaminoglycans degrading enzymes and use of same against surface protected bacteria. Brevet Insight Strategy and Marketing Ltd. US6423312.
- Yebrá D.M., Kiil S., Dam-Johansen K., 2004. Anti-fouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in organic coatings*. 50, 75-104.
- Yu J., 2003. Biodegradation-based polymer surface erosion and surface renewal for foul-release at low ship speeds. *Biofouling*. 19, 83-90.
- Yule A. et Walker G., 1984a. The adhesion of *Balanus balanoides*: the effect of cyprids antennular secretion. *Journal of the marine biological association of the U.K.* 64, 439-442.
- Yule A. et Walker G., 1984b. The temporary adhesion of barnacle cyprids: effect of some differing surface characteristics. *Journal of the marine biological association of the U.K.* 64, 429-439.
- Zobell C.E., 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*. 46, 39-56.
- Zobell C.E. et Allen E.C., 1935. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of bacteriology*. 29, 239-251.