THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Microbiologie

présentée par

Géraldine Klein

Préparée à :

IFREMER centre de Brest, service Interfaces et Capteurs ;

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine, Univerité de Bretagne Sud

« Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines »

Thèse soutenue le 21 novembre 2011
devant le jury composé de :

Philippe Lejeune
Professeur, INSA de Lyon / *Rapporteur*
Etienne Paul
Professeur, INSA de Toulouse/ *Rapporteur*
Mohamed Jebbar
Professeur, Université de Bretagne Occidentale/ *Examinateur*
Vianney Pichereau
Professeur, Université de Bretagne Occidentale / *Examinateur*
Romain Briandet
Docteur, INRA Agro-Paris Tech / *Examinateur*
Djamel Drider
Professeur, Université de Lille1/ *Examinateur*

Alain Dufour
Professeur, Université de Bretagne-Sud / *Directeur de thèse*
Chantal Compère
Docteur, IFREMER centre de Brest / *Co-directrice de thèse*

En science, la phrase la plus excitante que
l'on peut entendre, celle qui annonce de
nouvelles découvertes, ce n'est pas
« Eurêka » mais « c'est drôle ».

Isaac Asimov

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Région Bretagne et l'IFREMER pour le financement et le GIS Europôle Mer pour l'encadrement de ce projet.

Je remercie également mes directeurs de thèse Chantal Compère et Alain Dufour pour la confiance qu'ils ont mis en moi durant ces trois années. Ils ont toujours fait preuve de patience et de bienveillance envers moi tout en me poussant toujours plus loin. Ils m'ont, tous deux, appris à développer un œil critique sur mes résultats et à garder l'esprit ouvert pour avancer en recherche.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Philippe Lejeune et Etienne Paul qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'en être les rapporteurs. Merci également aux autres membres du jury, Mohamed Jebbar, Vianney Pichereau, Romain Briandet et Djamel Drider qui ont accepté de participer à l'examen de mon travail.

J'adresse aussi de vifs remerciements à Catherine Dreanno pour avoir suivi ce projet durant ces trois années et pour m'avoir donné régulièrement des conseils et des réponses.

A l'Ifremer, je remercie chaleureusement tout le service Interfaces et Capteurs dans lequel j'ai passé trois années inoubliables. Merci à Marie-Pierre qui m'a apporté beaucoup de soutien et avec qui j'ai adoré partager le bureau, à Caroline, Florence M., Isabelle, Florence S., Emmanuel, Florent, Emmanuelle, Stéphanie, et à ceux qui ne sont plus là maintenant comme Elodie, Célia, Aurélie, Sébastien, Olivier et Romain. Vous m'avez fait sentir que j'appartenais à l'équipe et je vous en remercie profondément.

A l'Ifremer, je remercie tout le service Matériaux et Structure : Yvon, Amélie (et bien sûr Christophe), Nicolas L., Pierre-Yves, Benoit, Florence, Albert, Peter, Dominique, André,

Patrick, Christophe, Denise, Marie-Michèle, Bertrand, Van Trung, Philippe, Luc, Jack. Merci pour votre amitié, votre sympathie et les discussions souvent passionnantes.

A l'Ifremer encore, je tiens à remercier Claire, Joëlle et Christophe pour l'aide qu'ils m'ont apporté au cours de la purification, sans vous je n'aurais pas pu autant avancer tant scientifiquement que personnellement. Merci aussi à Claudie, sans qui j'aurais eu du mal à mettre au point mes dosages. Et un très grand merci à Emmanuelle et Catherine, votre amitié et nos discussions étaient comme une bouffée d'air frais.

Au LBCM à Lorient, je tiens particulièrement à remercier Emmanuelle, Laure, Anne-Cécile, Johan, Alexis, Pierre, Gaëlle, Caroline, Gaël, Florence, David, Jat et Kim. Vous m'avez accueillie à chaque fois avec chaleur. L'ambiance était toujours enthousiasmante et dynamique ! Je remercie également Philippe Potin et Ludovic qui m'ont accueilli à la Station Biologique de Roscoff et m'ont permis de profiter de conseils avisés et de leurs compétences en purification.

Je n'oublie pas non plus tous mes amis qui m'ont encouragé et soutenu, je ne ferai pas la liste de peur d'oublier quelqu'un, mais je leur dis à tous un très grand MERCI ! Je remercie aussi toute la team Ame no Tsuki pour m'avoir donné ma place dans la grande famille du « fansub » et pour nos longues conversations du soir et les parties de rigolade qui m'ont permis de me déconnecter de la thèse ! Merci de m'avoir encouragée, aidée et de m'avoir supportée quand je venais râler sur TS !

Enfin, je remercie mes parents, ma sœur et ma famille pour m'avoir soutenue tout au long de mes études, pour votre amour, votre confiance et votre présence dans les moments difficiles et de déprime. J'ai pu à chaque fois me ressourcer auprès de vous pour repartir avec les batteries chargées à bloc.

Recevez ce mémoire en guise de remerciement pour votre dévouement et de témoignage de tout mon amour !

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

INDEX DES FIGURES **4**

INDEX DES TABLEAUX **6**

RESUME **7**

ABSTRACT **8**

INTRODUCTION GENERALE **9**

1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **13**

1.1 LES BIOFILMS 14

1.1.1 Les principaux constituants du biofilm *16*

1.1.2 Formation des biofilms *17*

1.1.2.1 Conditionnement de surface 18

1.1.2.2 Transport et déplacement 19

1.1.2.3 Adhésion réversible 21

1.1.2.4 Adhésion irréversible 22

1.1.2.5 Maturation 23

1.1.2.6 Dispersion 26

1.1.3 Avantages conférés par le mode de vie en biofilm *27*

1.1.3.1 Avantages métaboliques 28

1.1.3.2 Protection mécanique et résistance aux stress exterieurs 28

1.1.4 Utilité des biofilms *32*

1.1.5 Problèmes engendrés par les biofilms *33*

1.1.5.1 Dans le domaine médical 33

1.1.5.2 Dans le domaine de l'industrie 37

1.1.5.3 Dans l'environnement 38

1.1.6 Moyens de lutte contre les biofilms marins *40*

1.2 MOLECULES ACTIVES PRODUITES PAR LES ORGANISMES MARINS 42

1.3 FOCUS SUR LE GENRE *PSEUDOALTEROMONAS* 43

1.4 BACTERIES ETUDIEES : *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6 ET D41 46

1.5 METHODES D'ETUDES DES BIOFILMS 48

1.6 OBJECTIFS DE L'ETUDE 49

2 MATERIELS ET METHODES **52**

2.1 MICROBIOLOGIE 53

2.1.1 Solutions, milieux et conditions de culture *53*

2.1.1.1 VNSS 54

2.1.1.2 Marine Broth 54

2.1.1.3 Zobell 54

2.1.1.4 Infusion de cœur de bœuf additionné de NaCl 55

2.1.1.5 M9 salé 55
2.1.1.6 EDMA 55
2.1.2 Souches bactériennes 56
2.1.3 Courbes de croissance et de production d'activité antibiofilm 57
2.1.4 Préparation des surnageants de culture 58
2.1.5 Dosage de l'activité antibiofilm 59
2.1.5.1 Préparation des suspensions bactériennes 59
2.1.5.2 Biofilms en conditions statiques : croissance en microplaque 96 puits 59
2.1.5.3 Biofilms en conditions dynamiques : croissance en chambre en flux 64
2.1.6 Recherche de l'activité antibactérienne de SN_{3J6} et SN_{D41} 68
2.1.6.1 En milieu liquide 68
2.1.6.2 En milieu solide 69
2.1.7 Etude de la stabilité des molécules antibiofilm 70
2.1.7.1 A la température 70
2.1.7.2 En présence de Diméthylsulfoxyde 70
2.1.7.3 En présence d'enzyme protéolytique 71
2.2 BIOCHIMIE : EXTRACTION, PURIFICATION, CARACTERISATION DES MOLECULES ACTIVES 71
2.2.1 Techniques d'extraction 72
2.2.1.1 Ultrafiltration 72
2.2.1.2 Précipitations au TCA et au sulfate d'ammonium 73
2.2.1.3 Extraction liquide-liquide 74
2.2.2 Techniques de purification 75
2.2.2.1 Chromatographie liquide en phase inverse C18 75
2.2.2.2 Chromatographie liquide d'échange d'anions 76
2.2.2.3 Chromatographie de filtration sur gel 77
2.2.2.4 Calcul du taux de purification 78
2.2.3 Analyse des fractions de purification 78
2.2.3.1 Electrophorèse SDS-PAGE 78
2.2.3.2 Analyses spectrométriques 80
2.2.4 Techniques de dosage 83
2.2.4.1 Des protéines 83
2.2.4.2 Des sucres totaux 84

3 DOSAGE ET PRODUCTION DES MOLECULES ANTIBIOFILM 85

3.1 MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE L'ACTIVITE ANTIBIOFILM EN MICROPLAQUE 96 PUITS 86
3.1.1 Influence de l'agitation des microplaques 87
3.1.2 Influence de la durée d'incubation 89
3.1.3 Influence de la fixation des biofilms 90
3.1.4 Influence de la concentration en cristal violet 92
3.2 PARAMETRES INFLUENÇANT LA PRODUCTION DE MOLECULES ANTIBIOFILM 93
3.2.1 Influence de la composition de milieu de culture 94
3.2.1.1 Surnageants de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 95
3.2.1.2 Surnageants de *Pseudoalteromonas* sp. D41 97
3.2.2 Influence de la durée des cultures 100
3.2.2.1 Surnageants de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 100
3.2.2.2 Surnageants de *Pseudoalteromonas* sp. D41 102
3.2.3 Conclusions 103

4 DESCRIPTION DE L'ACTIVITE DES COMPOSES ANTIBIOFILM PRODUITS PAR *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6 ET D41 104

4.1 SPECTRES D'ACTIONS DES MOLECULES ANTIBIOFILM 105
4.1.1 produites par Pseudoalteromonas sp. 3J6 105
4.1.1.1 Introduction 105
4.1.1.2 Manuscrit 107
4.1.1.3 Conclusion 118
4.1.2 produites par Pseudoalteromonas sp. D41 119
4.1.2.1 Introduction 119
4.1.2.2 Manuscrit 120
4.1.2.3 Conclusion 131
4.2 EFFETS DES MOLECULES ACTIVES 132
4.2.1 Influence d'un conditionnement de surface 133
4.2.2 Influence sur l'adhésion des bactéries 135
4.2.3 Recherche de la présence de tensioactifs 139
4.2.4 Conclusions 140

5 PURIFICATION DES MOLECULES ACTIVES 144

5.1 MOLECULES ANTIBIOFILMS PRODUITES PAR 3J6 145
5.1.1 Ultrafiltration 145
5.1.2 Extraction liquide-liquide 147
5.1.3 Chromatographie en phase inverse 151
5.2 MOLECULES ANTIBIOFILMS PRODUITES PAR D41 156
5.2.1 Ultrafiltration 156
5.2.2 Chromatographie en phase inverse 157
5.2.3 Chromatographie échangeuse d'anions 157
5.2.4 Chromatographie de filtration sur gel 166

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 173

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 180

INDEX DES FIGURES

FIGURE 1. IMAGE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UN CATHETER EN SILICONE COLONISE PAR UN BIOFILM (A, JONES ET AL. 2006), TUBE ANOXKALDNES™ MBBR BIOFILM TECHNOLOGY FAVORISANT LES DEPOTS DE BIOFILM (B), GALET DE GUIDAGE D'UN PONTON DE BOYARDVILLE, ÎLE D'OLERON (C, PHOTOGRAPHIE DE G. KLEIN) ET CAPTEUR DE CONDUCTIVITE-TEMPERATURE D'UNE SONDE SMATCH APRES 3 MOIS D'IMMERSION SUR LE SITE DE LES MATS (D, PHOTO DE E. LOAEC) 15
FIGURE 2. PHASES DE FORMATION D'UN BIOFILM BACTERIEN 17
FIGURE 3. IMAGE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION DE P. TUNICATA MONTRANT LES PILI A SA SURFACE (CROISSANCE SUR VNSS AGAR PENDANT 24 H, COLORATION NEGATIVE AVEC DE L'ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE A 2 %). BARRE = 1 µM. (D'APRES DALISAY ET AL. 2006) 20
FIGURE 4. IMAGE DE MICROCOCCUS SP. 5J6 OBTENUE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE, X14000 SUR MEMBRANE (DE C. GUEGAN, LBCM, UNIVERSITE DE BRETAGNE SUD) 29
FIGURE 5. IMAGE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE DE PLAQUE DENTAIRE HUMAINE MATURE MONTRANT UNE FORMATION DITE EN EPIS DE MAÏS (GROSSISSEMENT X2 000), PROVIENT DE L'ORDRE DES HYGIENISTES DENTAIRES DU QUEBEC (WWW.OHDQ.COM). 33
FIGURE 6. PHOTOGRAPHIES D'UN BIOFILM SUR UNE PROTHESE DE CORDE VOCALE (A, WWW.PIERCECOLLEGE.EDU) ET D'UN BIOFILM FORME DANS UN BOITIER DE STOCKAGE POUR LENTILLES DE CONTACT (B, CHRISTINE SINDT WWW.REVIEWOFCONTACTLENSES.COM) 35
FIGURE 7. ILLUSTRATION DE LA COLONISATION D'ALVEOLES PULMONAIRES PAR UN BIOFILM BACTERIEN (CHILDREN'S HOSPITAL OF PITTSBURGH) 36
FIGURE 8. PHASES D'ETABLISSEMENT DE SALISSURES MARINES SUR UNE SURFACE (D'APRES WAHL ET AL. 1989) 38
FIGURE 9. PHOTOGRAPHIES DE SALISSURES SUR UNE COQUE DE BATEAU (A, CLEANABOAT, QUEENSLAND), ET SUR UN FILET (B, AKVAGROUP™) 39
FIGURE 10. MECANISMES DE FORMATIONS DE LA ROUILLE VERTE GR (ZEGEYE ET AL. 2007) 40
FIGURE 11. COLONIES DE P. TUNICATA D2 SUR VNSS AGAR APRES 72 H DE CROISSANCE (PHOTOGRAPHIE DE G. KLEIN) 45
FIGURE 12. IMAGE DE PSEUDOALTEROMONAS SP. 3J6 OBTENUE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE, X10000 SUR LAME DE VERRE APRES 2 H DE CONTACT (PHOTO DE CAROLINE GUEGAN, LBCM, UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD) 46
FIGURE 13. IMAGE DE PSEUDOALTEROMONAS SP. D41 OBTENUE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE, X10000 SUR LAME DE VERRE APRES 2 H DE CONTACT (PHOTO DE CAROLINE GUEGAN, LBCM, UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD) 47
FIGURE 14. SCHEMA DU PROTOCOLE DE PREPARATION DES SURNAGEANTS BACTERIENS 58
FIGURE 15. SCHEMA DU PROTOCOLE DE BIOESSAI EN MICROPLAQUE 96 PUITS ASSOCIE A UNE COLORATION AU CRISTAL VIOLET 60
FIGURE 16. PLAN DE MICROPLAQUE EN VUE DE TESTER L'ACTIVITE DES SURNAGEANTS BRUTS ET DE LEURS DILUTIONS SUR LA FORMATION DE BIOFILM D'UNE SEULE BACTERIE 61
FIGURE 17. CRISTAL VIOLET (WWW.SIGMAALDRICH.COM) 62
FIGURE 18. PHOTOGRAPHIE DE DEUX PUITS DE MICROPLAQUE APRES ADHESION DE VIBRIO SP. D02, FORMATION DE BIOFILM, COLORATION ET DISTRIBUTION D'ETHANOL. + : UN EFFET ANTIBIOFILM DU COMPOSE MELANGE A LA SUSPENSION BACTERIENNE EST OBSERVE, – : BIOFILM DE CONTROLE. 63
FIGURE 19. SCHEMA DES CHAMBRES D'ADHESION EN FLUX (PAMP ET AL. 2008) 64
FIGURE 20. COLLAGE AU SILICONE DE LA LAMELLE DE VERRE FERMANT LES CHAMBRES D'ADHESION 65
FIGURE 21. SCHEMA DU MONTAGE PERMETTANT LA CROISSANCE BACTERIENNE EN CONDITIONS DYNAMIQUES (WEISS NIELSEN ET AL. 2011) 65
FIGURE 22. METHODE MISE EN PLACE POUR L'EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE EN MILIEU LIQUIDE 69
FIGURE 23. DIAGRAMME DETAILLANT LES ETAPES D'UN PROTOCOLE DE PURIFICATION D'UN ECHANTILLON CONTENU DANS UN MELANGE (AMERSHAM PURIFICATION GUIDE) 71
FIGURE 24. PRINCIPE DE L'ULTRAFILTRATION (ARIST BOURGOGNE) 73
FIGURE 25. TABLEAU DE CORRESPONDANCE ENTRE LA QUANTITE EN MASSE DE SELS DE SULFATE D'AMMONIUM ET LE VOLUME DE SOLUTION POUR OBTENIR LE POURCENTAGE DE SATURATION DESIRE (USHERBROOK, CANADA) 74
FIGURE 26. SCHEMA DU MONTAGE D'EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE ET RAPPEL BREF DU PROTOCOLE DE SEPARATION 75
FIGURE 27. DO A 590 NM DES BIOFILMS COLORES D'ALGIBACTER SP. 1M6 ET PARACOCCUS SP. 4M6 MESURES DANS LES PUITS DE MICROPLAQUE SELON LA VITESSE D'AGITATION DES MICROPLAQUES PENDANT LA FORMATION DES BIOFILMS 88
FIGURE 28. DO A 590 NM DES BIOFILMS COLORES DE PSEUDOALTEROMONAS SP. 3J6 ET VIBRIO SP. D02 MESURES DANS LES PUITS DE MICROPLAQUE SELON LA DUREE DE FORMATION DES BIOFILMS 89

FIGURE 29. DO A 590 NM DES BIOFILMS COLORES DE VIBRIO SP. D01 ET D02 MESURES DANS LES PUITS DE MICROPLAQUE AVEC FIXATION OU NON DES BIOFILMS FORMES AVANT LA COLORATION AU CRISTAL VIOLET 91
FIGURE 30. DO A 590 NM DES BIOFILMS COLORES DE VIBRIO SP. D02 ET COLORATIONS RESIDUELLES MESUREES DANS LES PUITS DE MICROPLAQUE SELON LA CONCENTRATION EN CRISTAL VIOLET DISTRIBUEE 92
FIGURE 31. ACTIVITE ANTIBIOFILM DES SURNAGEANTS DE PSEUDOALTEROMONAS SP. 3J6 MESUREE EN FONCTION DES MILIEUX DE CULTURES AYANT SERVI A LA PRODUCTION DE MOLECULES ACTIVES, SUR LES TROIS ESPECES BACTERIENNES SENSIBLES. LES ECART-TYPES ONT ETE CALCULES SUR 6 VALEURS. 95
FIGURE 32. ACTIVITE ANTIBIOFILM DES SURNAGEANTS DE PSEUDOALTEROMONAS SP. D41 MESUREE EN FONCTION DES MILIEUX DE CULTURES AYANT SERVI A LA PRODUCTION DE MOLECULES ACTIVES SUR LES TROIS ESPECES BACTERIENNES SENSIBLES. LES ECART-TYPES ONT ETE CALCULES SUR 6 VALEURS. 98
FIGURE 33. COURBE DE CROISSANCE DE PSEUDOALTEROMONAS SP. 3J6 ET ACTIVITE ANTIBIOFILM DES FRACTIONS MARQUEES 1, 2, 3 ET 4, SUR VIBRIO SP. D02, EN FONCTION DU TEMPS DE PRODUCTION DE MOLECULE ANTIBIOFILM, SUR 24 H..... 101
FIGURE 34. COURBE DE CROISSANCE DE PSEUDOALTEROMONAS SP. D41 ET ACTIVITE ANTIBIOFILM SUR VIBRIO SP. D02 EN FONCTION DU TEMPS DE PRODUCTION DE MOLECULE ANTIBIOFILM, SUR 24 H. 102
FIGURE 35. POURCENTAGES D'INHIBITION MESURES LORSQUE SN_{3J6} EST INTRODUIT 2 H AVANT (CONDITIONNEMENT DE SURFACE) OU EN MEME TEMPS QUE LES SUSPENSIONS BACTERIENNES DE VIBRIO SP. D02 ET PARACOCCUS SP. 4M6..... 134
FIGURE 36. POURCENTAGES D'INHIBITION MESURES LORSQUE SN_{D41} EST INTRODUIT 2 H AVANT (CONDITIONNEMENT DE SURFACE) OU EN MEME TEMPS QUE LES SUSPENSIONS BACTERIENNES DE VIBRIO SP. D02 ET PSEUDOALTEROMONAS SP. 3J6..... 134
FIGURE 37. EFFET DU SN_{3J6} SUR L'ADHESION DES CELLULES BACTERIENNES SUR DES LAMES DE VERRES, A 20°C. L'ADHESION EN STATIQUE DES BACTERIES A ETE REALISEE SANS (CONTROLE) OU AVEC DU SN_{3J6} PENDANT 2 H. LES VALEURS MESUREES SONT NORMALISEES PAR RAPPORT AUX VALEURS DES CONTROLES. LES RESULTATS MONTRES SONT LA MOYENNE DE QUATRE ZONES DIFFERENTES SUR LA LAME DE VERRE. 136
FIGURE 38. EFFET DU SN_{D41} SUR L'ADHESION DES CELLULES BACTERIENNES SUR DES SURFACES EN VERRE, A 20°C. L'ADHESION EN STATIQUE DES BACTERIES A ETE REALISEE SANS (CONTROLE) OU AVEC DU SN_{D41} PENDANT 2 H. LES VALEURS MESUREES SONT NORMALISEES PAR RAPPORT AUX VALEURS DES CONTROLES. LES RESULTATS MONTRES SONT LA MOYENNE DE TROIS PUITS DIFFERENTS SUR LA MICROPLAQUE. 137
FIGURE 39. PHOTOGRAPHIES ILLUSTRANT LE COMPORTEMENT DE GOUTTES DE SN_{D41} ET DE GOUTTES D'EAU MILLIQ (EMQ) A DIFFERENTS ANGLES D'INCLINAISON (LA FLECHE POINTE L'EMPLACEMENT DES GOUTES D'EMQ)..... 140
FIGURE 40. ACTIVITES ANTIBIOFILMS DE SN_{3J6} ET DE QUATRE FRACTIONS D'ULTRAFILTRATION, LE RETENTAT (MOLECULES > 100 KDA) ET LE PERMEAT (MOLECULES < 100 KDA) DE LA PREMIERE UF (MEMBRANE 100 KDA) ET LE RETENTAT (MOLECULES ENTRE 100 ET 10 KDA, 100>M>10) ET LE PERMEAT (MOLECULES < 10 KDA) DE LA DEUXIEME UF REALISEE A PARTIR DU PERMEAT DE LA PREMIERE UF. 146
FIGURE 41. ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DU SN_{3J6} ET DES DEUX FRACTIONS, AQUEUSE ET ORGANIQUE, ISSUES DE L'ELL A L'ACETATE D'ETHYLE..... 150
FIGURE 42. SEPARATION DE LA FRACTION AQUEUSE D'ELL PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE C18. L'ELUTION DES PEPTIDES ET/OU PROTEINES ET DONNEE PAR LES MESURES D'ABSORBANCE A 280 NM ET L'ACTIVITE ANTIBIOFILM DE CHAQUE FRACTION COLLECTEE EST MESUREE PAR LE TEST EN MICROPLAQUE 96 PUITS. 152
FIGURE 43. ANALYSE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DES TROIS FRACTIONS PRESENTANT UNE ACTIVITE ANTIBIOFILMS C18-ACN10, -ACN25 ET –ACN35, ISSUES DE LA SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE SUR COLONNE C18. 154
FIGURE 44. ACTIVITE ANTIBIOFILMS DE SN_{D41} ET DE TROIS FRACTIONS D'ULTRAFILTRATION, LE RETENTAT (MOLECULES > 100 KDA) DE LA PREMIERE UF (MEMBRANE 100 KDA) ET LE RETENTAT (MOLECULES ENTRE 100 ET 10 KDA, 100>M>10) ET LE PERMEAT (MOLECULES < 10 KDA) DE LA DEUXIEME UF REALISEE A PARTIR DU PERMEAT DE LA PREMIERE UF..... 156
FIGURE 45. SEPARATION DE SN_{D41} PAR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS DE TYPE Q FAST FLOW. L'ELUTION EST EXPRIMEE EN µG DE PROTEINES PAR ML (EN NOIR) ET L'ACTIVITE ANTIBIOFILM DE CHAQUE FRACTION COLLECTEE EST MESUREE ET PRESENTEE EN POURCENTAGE D'INHIBITION DE BIOFILMS DE VIBRIO SP. D02 (EN BLEU). 158
FIGURE 46. LOCALISATION DES PRINCIPALES LIAISONS EN SPECTROSCOPIE VIBRATIONNELLE INFRA-ROUGE (ILLUSTRATION DE DAVID R. KELLY, WIKIMEDIA.ORG) 161
FIGURE 47. SPECTRE INFRA-ROUGE EN TRANSMISSION DU SN_{D41} ET DES FRACTIONS ACTIVES ISSUES DE LA SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'ANIONS. 161
FIGURE 48. SPECTRE INFRA-ROUGE EN TRANSMISSION DU SN_{D41} ET DES FRACTIONS ACTIVES ISSUES DE LA SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ANIONS ENTRE 900 ET 1800 CM^{-1} DE LONGUEUR D'ONDE 163
FIGURE 49. GEL DE POLYACRYLAMIDE (4-20 %) APRES ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES ET EN PRESENCE DE SDS DES 4 FRACTIONS DE SEPARATION (AIEX-0,3, AIEX-0,4, AIEX-0,5 ET AIEX-0,7) DU SN_{D41} PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ANIONS, COLORE AU BLEU DE COOMASSIE. 165

FIGURE 50. SEPARATION DE AIEX-0,3 PAR CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL SUR COLONNE SUPERDEX200 10/300 GL. L'ELUTION EST PRESENTEE EN ABSORBANCE A 280 NM (TRAIT PLEIN) ET L'ACTIVITE ANTIBIOFILM DE CHAQUE FRACTION COLLECTEE EST MESUREE ET PRESENTEE EN POURCENTAGE D'INHIBITION DE BIOFILMS DE VIBRIO SP. D02 (EN HISTOGRAMME). 167
FIGURE 51. SEPARATION DE AIEX-0,4 PAR CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL SUR COLONNE SUPERDEX200 10/300 GL. L'ELUTION EST PRESENTEE EN ABSORBANCE A 280 NM (TRAIT PLEIN) ET L'ACTIVITE ANTIBIOFILM DE CHAQUE FRACTION COLLECTEE EST MESUREE ET PRESENTEE EN POURCENTAGE D'INHIBITION DE BIOFILMS DE VIBRIO SP. D02 (EN HISTOGRAMME). 168
FIGURE 52. SEPARATION DE AIEX-0,5 PAR CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL SUR COLONNE SUPERDEX200 10/300 GL. L'ELUTION EST PRESENTEE EN ABSORBANCE A 280 NM (TRAIT PLEIN) ET L'ACTIVITE ANTIBIOFILM DE CHAQUE FRACTION COLLECTEE EST MESUREE ET PRESENTEE EN POURCENTAGE D'INHIBITION DE BIOFILMS DE VIBRIO SP. D02 (EN HISTOGRAMME). 170
FIGURE 53. SEPARATION DE AIEX-0,7 PAR CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL SUR COLONNE SUPERDEX200 10/300 GL. L'ELUTION EST PRESENTEE EN ABSORBANCE A 280 NM (TRAIT PLEIN) ET L'ACTIVITE ANTIBIOFILM DE CHAQUE FRACTION COLLECTEE EST MESUREE ET PRESENTEE EN POURCENTAGE D'INHIBITION DE BIOFILMS DE VIBRIO SP. D02 (EN HISTOGRAMME). 171
FIGURE 54. GEL D'ELECTROPHORESE (4-20 %) EN CONDITIONS DENATURANTES ET EN PRESENCE DE SDS DU SN_{D41} ET DE FRACTIONS DE SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS AIEX-0,4 ET AIEX-0,5 ET PAR CHROMATOGRAPHIE EN FILTRATION SUR GEL AIEX-0,4GF ET AIEX-0,5GF, REVELE AU BLEU DE COOMASSIE. LE MARQUEUR DE POIDS MOLECULAIRE EST PLACE A GAUCHE. 172

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU 1. ORIGINE DES SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES DANS CES TRAVAUX 57
TABLEAU 2. TABLEAU DE PURIFICATION DE SN_{3J6} PAR EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE 148
TABLEAU 3. TABLEAU DE PURIFICATION DE SN_{D41} PAR CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS 160

RESUME

Dès qu'une surface est immergée dans un fluide, elle peut être colonisée par des microorganismes et être recouverte d'un biofilm. La formation des biofilms est une préoccupation majeure en médecine, mais aussi en agroalimentaire et dans le secteur industriel car pouvant engendrer des pertes économiques. La description et la purification de nouvelles molécules visant à prévenir ou à éradiquer la formation de biofilm est donc d'un intérêt majeur. Deux souches bactériennes, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *Pseudoalteromonas* sp. D41, ont montré un effet inhibiteur du développement de biofilms d'autres bactéries. Le travail effectué a consisté dans un premier temps à optimiser la production des molécules inhibitrices, et à décrire leur spectre d'action et leurs effets. Puis, dans un second temps, nous avons partiellement purifié ces molécules.

Pour quantifier rapidement l'activité antibiofilm des molécules produites dans les surnageants de culture de 3J6 et D41 sur un grand nombre d'échantillons, nous avons développé un test en microplaque 96 puits. Ce test est adapté pour des études de l'adhésion bactérienne et de la croissance des biofilms. Nous avons ainsi pu démontrer que les conditions de culture optimales pour la production de molécules inhibitrices par 3J6 et D41 étaient les suivantes : respectivement 24 et 12 h de culture en VNSS à 25°C. Nous avons démontré que ces molécules antibiofilm présentaient un large spectre d'action inhibant la formation de biofilm par 13 des 19 souches différentes testées. De plus, nous avons pu constater que les spectres d'action de 3J6 et D41 ne sont pas identiques pour 4 des souches sensibles, suggérant la production de molécules différentes. L'originalité de ces dernières réside dans leur action ciblée sur le mode de vie en biofilm. En effet, les molécules des surnageants de 3J6 et D41 n'ont aucun effet bactéricide sur les bactéries planctoniques, tandis qu'elles limitent la biomasse et l'épaisseur des biofilms et/ou diminue la viabilité des bactéries les constituant. Cependant, seules les molécules produites par D41 ont une action inhibitrice sur l'adhésion des bactéries à la surface.

La purification des molécules inhibitrices, en partie de nature protéique, a été conduite à partir des surnageants bruts. Ces molécules ayant montré des propriétés différentes, deux stratégies ont été mises en place. Une chromatographie en phase inverse C18 sur le surnageant de 3J6 nous a permis d'associer l'activité inhibitrice à des molécules de poids moléculaire inférieur à 10 kDa, potentiellement des peptides. Sur le surnageant de D41, une combinaison de chromatographie échangeuse d'anions suivie d'une chromatographie en filtration sur gel ont été utilisées pour purifier plusieurs protéines d'environ 100 kDa.

Mots clés : activités antibiofilm, bactéries marines, *Pseudoalteromonas*, méthodes de criblage, chambres d'adhésion en flux, microscopie confocale, purification.

ABSTRACT

As soon as a surface area is immersed in a fluid, it can be colonised by micro-organisms and then be covered by a biofilm. The biofilms formation is a major preoccupation in medicine, as well as in the food industry as it could lead to substantial economic losses. The description and purification of new molecules, preventing or inhibiting the formation of biofilms are, therefore, of major interest. Two bacterial strains, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and *Pseudoalteromonas* sp. D41 have been shown to have an inhibitory effect on the development of biofilms from other bacteria. The study involved, firstly, optimizing the production of inhibitory molecules and describing their scope of action and their effects. Secondly, these molecules were partially purified.

In order to screen and evaluate the antibiofilm activity of molecules produced in 3J6 and D41 culture supernatants on a large number of bacteria and samples, a 96-well microtiter-plate test was set up. This bioassay was adapted and optimized for bacterial adhesion and biofilm growth studies. We demonstrated that the optimal culture conditions for the production of inhibitory molecules by 3J6 and D41 were the following: 24 h and 12 h of culture in VNSS medium at 25°C respectively. We also showed that these antibiofilm molecules have a wide range of activities, inhibiting the formation of biofilm in 13 out of the 19 different strains under study. Moreover, we also noted that the activity spectra of 3J6 and D41 are not identical in 4 of the sensitive strains, suggesting that different molecules may have been produced. In fact, the 3J6 and D41 antibiofilm molecules do not have any bactericidal effects on planktonic bacteria, but they reduce the biomass and the thickness of biofilms and/or restrict the viability of their constituent bacteria. However, only the molecules produced by D41 have an inhibitory effect on bacterial adhesion.

The purification of inhibitory molecules, partly from protein origin, was carried out using crude supernatants. As these molecules displayed different properties, two different techniques were employed. By using reversed phase chromatography C18 for 3J6 antibiofilm molecules, it was possible to associate the inhibitory activity with molecules of less than 10 kDa in molecular weight, primarily peptides. By combining anion-exchange chromatography and gel-filtration chromatography for D41 antibiofilm molecules, several proteins of around 100 kDa molecular mass were purified

Key words: antibiofilm activities, marine bacteria, *Pseudoalteromonas,* screening methods, flow-cell chambers, confocal microscope, purification.

INTRODUCTION GENERALE

« Pourquoi les surfaces immergées sont-elles sales ? D'abord, au bout d'un certain temps d'immersion, la surface se couvre de matières organiques en suspension dans l'eau. Ces matières adhèrent aux rugosités de la surface. De l'ordre du millimètre mais ça suffit. Des micro-organismes se fixent ensuite dessus, qui vont former une mince pellicule vivante, on appelle ça un biofilm, qui permettra à des organismes plus gros de vivre à leur tour sur la surface. »

Oui, tiens, pourquoi ? *Philippe Vandel, 2010*

Le terme « biofilm » est proposé pour la première fois en 1978 par Costerton et son équipe (Costerton 1978). Après avoir observé des bactéries sessiles engluées dans une matrice extracellulaire appelée glycocalix, ils ont défini les biofilms comme des populations de bactéries adhérentes les unes aux autres et/ou à des surfaces et englobées dans une matrice. Depuis ces premières études, la définition du terme biofilm a constamment évolué selon l'avancement des différents travaux réalisés. En 1989, Characklis définit les biofilms comme étant une association de micro-organismes inclus dans une matrice composées d'exopolymères et généralement attachés à la surface de divers matériaux (plastiques, métaux, particules, tissus vivants, etc.). En 1995, Bourion décrivait les biofilms comme une communauté microbienne protégée par une matrice fibreuse de polymères extracellulaires et immobilisée sur une surface. Plus tard, en 2003, Bosgiraud définit les biofilms comme des structures organisées permettant de nombreuses communications intercellulaires, afin d'assurer un équilibre et un mode de vie coopératif entre les micro-organismes composant les biofilms. Aujourd'hui les biofilms sont décrits comme un ensemble de micro-organismes, adhérant entre eux ou à une interface (solide-liquide, liquide-gaz ; Ecole Thématique CNRS, Vittel 2009) et entourés d'une matrice hautement hydratée contenant en majorité des sucres, lipides, protéines, acides nucléiques extracellulaires et des matières minérales comme des sels (Compère et al. 2001, Lahaye 2006).

La découverte par Zobell (1946) des biofilms bactériens, et la confirmation par Costerton (1999a et b, Blenkinsopp et Costerton 1991) de la prédominance de ce mode de vie chez les bactéries, ont ouvert la voie aux études portant sur les mécanismes d'établissement des biofilms. Au sein des biofilms, les micro-organismes sessiles développent des caractéristiques très différentes de celles des micro-organismes libres, planctoniques : mise en œuvre d'expressions génétiques spécifiques, utilisation de systèmes de communication chimique, modifications structurales, production d'exopolymères, etc. Ces modifications échappent aux méthodes d'investigation de la microbiologie traditionnelle en suspension. Etudier la complexité des biofilms exige un travail transversal utilisant des compétences liées à de nombreux domaines complémentaires : microbiologie, biologie, chimie des solutions, physico-chimie des surfaces, géologie, hydrologie, sciences des matériaux, etc. Les équipes engagées dans ces études ont souvent développé des outils, des procédures et des langages différents pour appréhender et décrire des concepts fondamentaux identiques.

Les études menées en majorité jusqu'à présent sont liées au secteur médical et agro-alimentaire, par des travaux sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Listeria monocytogenes*. En milieu hospitalier, la colonisation de la surface des implants, des cathéters et des salles d'intervention est responsable d'environ 60 % des infections nosocomiales par an en Amérique, induisant des milliers de décès (rapport CDC, 2007). L'industrie agro-alimentaire est aussi largement concernée par les biofilms ; ceux-ci peuvent conduire à la dégradation des qualités organo-leptiques des produits et au développement de toxi-infections alimentaires collectives du fait de l'accumulation de pathogènes à la surface des équipements. Des études montrent que les bactéries des biofilms ne sont pas seulement différentes phénotypiquement des bactéries libres, mais qu'elles produisent aussi un grand nombre de composés originaux, liés à ce mode de développement, notamment l'expression des facteurs d'adhésion et l'augmentation des facteurs de virulence.

Les biofilms sont aussi de plus en plus souvent identifiés comme la source de lourds problèmes industriels, sociétaux et de santé publique. Plus particulièrement en milieu marin, les biofilms, appelés salissures, sont responsables de multiples conséquences économiques et environnementales : risques accrus de corrosion des matériaux, colmatage des canalisations, augmentation du poids des navires et des bouées, augmentation des forces de frottement des navires induisant une surconsommation de carburant et des émissions de CO_2 (Fusetani 2004), dérive des mesures des capteurs *in situ*. L'enjeu majeur, aujourd'hui, est d'empêcher l'établissement des biofilms. Une des voies envisagées est d'agir sur les primo-colonisateurs des surfaces.

Parmi les méthodes de lutte contre les biofilms marins, une des plus usités est l'application d'un revêtement sur les surfaces. Les revêtements antisalissure agissent généralement par relargage de produits toxiques incorporés dans un liant. Certaines peintures, notamment à base de dérivés organiques de l'étain, se sont révélées extrêmement toxiques pour la faune et/ou la flore. Des réglementations de l'Organisation Maritime Internationale (directive 99/51/CEE) et de la Communauté Européenne (directive 2008/86/CE), appliquées depuis 2008, interdisent l'usage de certains composés, notamment les organostaniques. L'étain a alors été remplacé par des oxydes de cuivre qui peuvent former des dépôts toxiques dans les boues et la vase des lits de rivière et des zones portuaires (Huang et al. 2000).

C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon travail de thèse, dont l'objectif est de purifier et d'étudier des composés naturels originaux, produits par des bactéries marines et ayant démontré de forts potentiels antibiofilm vis-à-vis d'autres organismes marins et terrestres. Les biofilms de bactéries marines sont encore peu étudiés et seuls deux genres bactériens sont bien documentés : *Vibrio* et *Pseudoalteromonas*. Les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* sont intéressantes car elles produisent beaucoup de molécules possédant une activité biologique, telles que des molécules de communication, des antibiotiques, etc. Dans ce cadre, le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines de l'Université de Bretagne Sud et l'IFREMER de Brest ont isolé deux souches bactériennes : *Pseudoalteromonas* sp. D41 (Pradier et al. 2005) et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (Grasland et al. 2003) (notées D41 et 3J6). Des biofilms mixtes de 3J6 avec d'autres souches bactériennes ont mis en évidence des propriétés inhibitrices de 3J6 vis-à-vis du développement de

biofilms d'autres espèces (Dheilly 2007). Des travaux précédents ont également révélé que D41 inhibait le développement de 3J6 en biofilms mixtes.

La première étape de la démarche développée dans cette thèse est l'étude des conditions optimales de production et de conservation de ces composés. Elle sera suivie par l'étude du spectre d'action des composés inhibiteurs produits par 3J6 et D41 vis-à-vis d'autres souches bactériennes, afin d'évaluer leur étendue. Enfin la purification des molécules antibiofilm permettra d'identifier et de caractériser les composés d'intérêt. Ce manuscrit est composé de cinq parties. La première partie fait un état des lieux ciblé et non exhaustif des connaissances bibliographiques sur les biofilms, les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, et les méthodes d'études des biofilms. La deuxième partie présente les différents protocoles et méthodes utilisés au cours de ces travaux. La troisième partie détaille le développement d'un test rapide d'activité antibiofilm en microplaque et les conditions optimales de production des molécules antibiofilm. La quatrième partie décrit le spectre d'action et l'effet des composés antibiofilm produits par chacune des deux bactéries. Le chapitre cinq porte sur la purification des molécules inhibitrices. Enfin, une dernière partie présente les principales conclusions ainsi que les ouvertures vers de nouvelles voies de recherche et d'applications.

1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 LES BIOFILMS

En conditions naturelles, les bactéries se développent sous deux formes (Clutterbuck et al. 2007) : une forme libre ou planctonique, et une forme sessile ou attachée en biofilm. Les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes. Un mode de vie planctonique permet aux microorganismes de proliférer et de coloniser de nouvelles niches environnementales. Puis, en s'attachant à une surface de façon irréversible, les micro-organismes peuvent alors adopter une forme de vie sessile, qui est le mode de vie majoritaire des bactéries (Costerton et al. 1978, 1999a, 1999b).

Une fois attachées entre elles et/ou à une interface, les bactéries se développent et produisent des polymères extracellulaires, formant une matrice à forte teneur en eau, protéines, polysaccharides et lipides (Sutherland 2001). La proximité entre bactéries au sein de la matrice leur permet alors de réaliser des échanges de signaux et de nutriments. Cet ensemble complexe forme un biofilm et confère à la communauté bactérienne une protection contre un certain nombre de stress environnementaux comme par exemple la dessiccation ou l'action d'agents antimicrobiens. L'étude de la structure des biofilms et des mécanismes de leur formation a donc un intérêt dans la recherche concernant les moyens de lutte contre les biofilms.

Les biofilms sont très hétérogènes et sans cesse remodelés selon des facteurs endogènes et exogènes (Tolker-Nielsen et al. 2000). Les différences peuvent se situer aussi bien au niveau structural (biofilms mono- ou pluri-espèces, épaisseurs et architectures diverses) qu'au niveau des surfaces colonisées. La diversité des biofilms constituerait l'un des éléments clés dans leur robustesse face aux agents antimicrobiens et autres agressions (Singh et al. 2002). Les biofilms bactériens peuvent se former sur des surfaces biotiques ou abiotiques d'une grande diversité (Figure 1) : tissus vivants, appareillage médical (cathéters, broches, etc.), canalisations (industrielles ou d'eau potable), surfaces humides ou immergées (capteurs marins, coques de bateau, etc.).

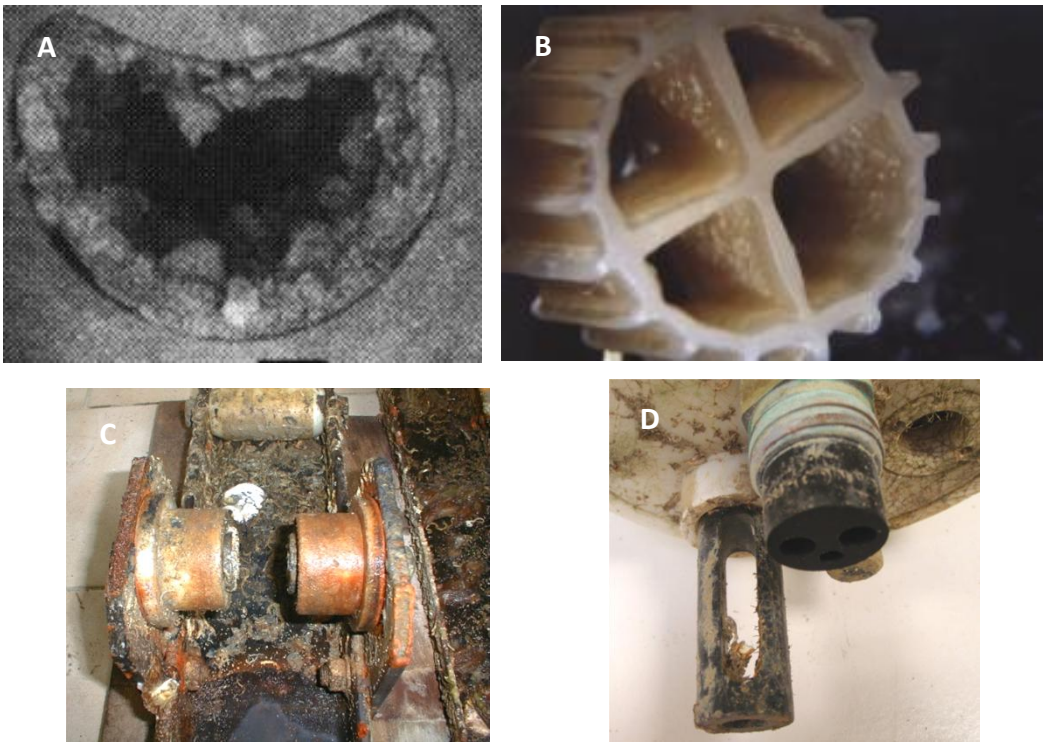


Figure 1. Image en microscopie électronique d'un cathéter en silicone colonisé par un biofilm (A, Jones et al. 2006), tube AnoxKaldnes™ MBBR biofilm technology favorisant les dépôts de biofilm (B), galet de guidage d'un ponton de Boyardville, Île d'Oléron (C, photographie de G. Klein) et capteur de conductivité-température d'une sonde SMATCH après 3 mois d'immersion sur le site de Les Mâts (D, photo de E. Loaec)

Les mécanismes de formation des biofilms et leur organisation structurale vont dépendre essentiellement de trois paramètres, à savoir le milieu, la flore bactérienne et les propriétés physico-chimiques des surfaces. Un premier exemple est un biofilm développé dans une canalisation (Figure 1.B). Il a une structure complexe en multi-espèces bactériennes, sédiments et algues, et contient des produits issus de réactions de corrosion. Alors que dans un second exemple, l'observation de biofilms formés à la surface d'un cathéter (Figure 1.A) indique une organisation plus simple comprenant des micro-colonies de coques associées à une matrice exopolymérique (Donlan et Costerton 2002, Jones et al. 2006).

De plus, les observations des biofilms bactériens mettent en évidence qu'ils ne présentent pas la même épaisseur ni la même architecture selon les conditions nutritives de l'environnement démontrant la facilité de développement des biofilms (Courfort et al. 2007, Derlon et al. 2008). Les biofilms des eaux naturelles sont plus fins que ceux de milieux riches comme la plaque dentaire, par exemple. De bonnes conditions nutritives sont nécessaires

aux étapes de formation du biofilm, alors que des phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins favorables (Jouenne 2008).

Formés par une ou plusieurs espèces bactériennes, sur des supports très variés avec des architectures et des épaisseurs différentes, les biofilms possèdent néanmoins certaines caractéristiques structurelles communes :

- Une monocouche de micro-organismes à sa base, fixés à la surface du support,
- Une couche plus ou moins épaisse de micro-organismes enrobés dans une matrice polymérique pouvant être reliés entre eux par des canaux aqueux.

C'est une organisation spatiale stratifiée, permettant des échanges de nutriments et la communication entre les micro-organismes constituant le biofilm (Stoodley et al. 1997, Tolker-Nielsen et al. 2000, Derlon et al. 2008). L'organisation en strates des biofilms s'explique par l'existence de gradients de nutriments et d'ions en son sein. Les nutriments présents dans le milieu extérieur diffusent en plus grande quantité dans les couches superficielles du biofilm. Plus on avance vers les couches profondes du biofilm, moins la diffusion est efficace et plus les concentrations en éléments nutritifs sont faibles. Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des micro-organismes (Courfort et al. 2007). Au sein du biofilm, les micro-organismes morts ou lysés sont réutilisés comme nutriments (cannibalisme cellulaire). L'ADN libéré lors de la mort programmée de certains micro-organismes du biofilm aurait aussi un rôle structural, dans la stabilité des biofilms (Whitchurch et al. 2002, Steinberger et Holden 2005, Flemming et al. 2007).

1.1.1 LES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DU BIOFILM

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. La présence de canaux permet l'établissement de flux d'eau, d'ions et de nutriments (Clutterbuck et al. 2007). Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm. La matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée d'un biofilm. Le rapport C/N d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une

suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice (Sutherland 2001, Branda et al. 2005).

Les propriétés physico-chimiques de la matrice d'exopolymères sont variables d'un biofilm à l'autre. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet à certains biofilms de lutter contre la dessiccation dans le milieu naturel. La matrice d'exopolymères joue aussi un rôle majeur dans les propriétés de résistance aux biocides des biofilms, en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (Donlan et Costerton 2002). Ainsi, la matrice exopolymérique joue un rôle structural et fonctionnel important puisqu'elle sert de barrière protectrice contre la dessiccation, les biocides mais aussi contre les bactériophages (Donlan et Costerton 2002).

1.1.2 FORMATION DES BIOFILMS

La formation des biofilms est largement décrite dans la littérature (Pratt et Kolter 1998, Filloux et Vallet 2003, Lejeune 2003, Hall-Stoodley et al. 2004, Kolter et Greenberg 2006). La généralisation des étapes de formations des biofilms reposent principalement sur les études menées sur *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi cinq étapes peuvent être suivies lors du développement d'un biofilm (Figure 2).

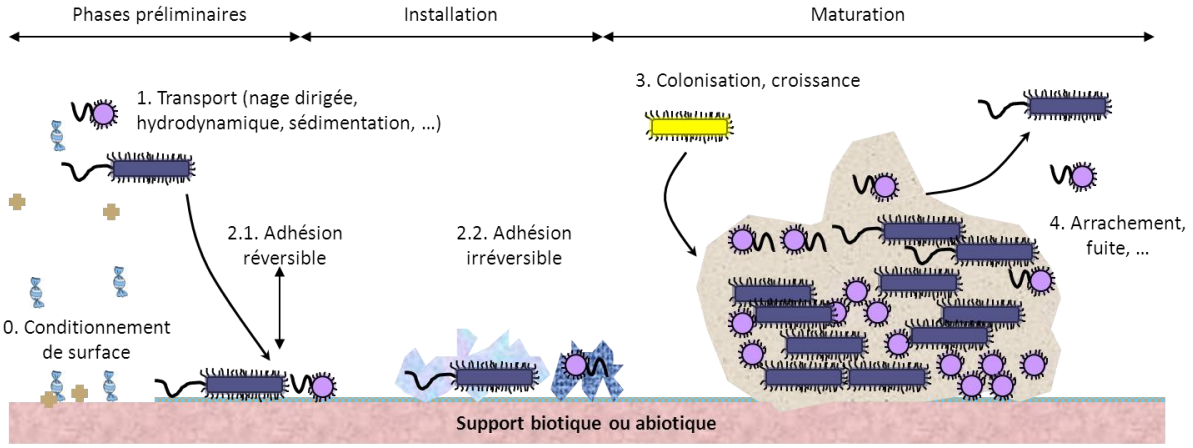


Figure 2. Phases de formation d'un biofilm bactérien

Cependant c'est un schéma très généraliste qui ne rend pas compte de la spécificité de toutes les souches bactériennes. En effet, certaines souches bactériennes peuvent adhérer à une surface sans conditionnement préalable. Il existe également des souches bactériennes, notamment dans le genre *Bacillus*, qui ne produisent pas de matrice extracellulaire en biofilms (Bridier et al. 2011).

1.1.2.1 CONDITIONNEMENT DE SURFACE

La formation d'un biofilm suit plusieurs phases, la première étape est l'établissement d'un film primaire conditionnant la surface et facilitant l'attachement des bactéries. C'est un phénomène rapide n'excédant pas quelques heures. Durant cette première phase, les molécules organiques et inorganiques présentes dans le milieu se déposent sur la surface. Cette accumulation de molécules à l'interface liquide/solide définit le film de conditionnement et apporte une plus grande concentration en nutriments sur la surface par rapport au milieu liquide. L'adsorption de ces molécules joue un rôle important dans l'attachement des bactéries à une surface par l'altération des propriétés physico-chimiques de la surface (énergie libre de surface, hydrophobicité, charges électrostatiques, etc.).

Cependant, l'importance du conditionnement de surface dans l'adhésion bactérienne est encore à ce jour discuté. Fletcher (1976) a montré que la présence d'albumine, de gélatine ou de fibrinogène inhibe l'adhésion de certains *Pseudomonas* marins. En 2001, Parkar et al. ont démontré qu'une concentration de lait écrémé inférieure à 1 % réduit l'adhésion de spores et de cellules végétatives de bacilles thermophiles sur de l'acier inoxydable. Une des raisons avancée pour expliquer ce phénomène est que les protéines présentes dans le lait écrémé pourraient entrer en compétition pour des sites de liaison sur la surface d'acier inoxydable, réduisant la possibilité des bactéries à adhérer. Cependant, Speer et Gilmour (1985) ont démontré une augmentation de l'adhésion de bactéries associées au lait lors d'un traitement de l'acier inoxydable avec des protéines du lactosérum. Jeong et Frank (1994) ont proposé que la présence de protéines sur une surface favorise la formation de biofilms en devenant une source de nutriments pour les bactéries. Plus récemment, Verran et Whitehead (2006) montrent que des bactéries restent attachées en plus grand nombre à une surface en présence de matière protéique, comme de l'albumine sur une surface inerte

lors d'un cycle de nettoyage. Le film primaire joue donc un rôle important dans l'adhésion et le maintien des bactéries sur des surfaces.

En milieu marin, la phase liquide est assez pauvre en nutriments et en carbone organique dissous (entre 1 et 4 mg/l à une profondeur d'un mètre, jusqu'à 20 mg/ml en zone côtière, Rubio 2002). Des analyses réalisées par Compère et al. (2001) montrent que deux types de composés s'adsorbent successivement sur les surfaces : des molécules riches en azote comme les protéines puis des polysaccharides. Cependant, le film primaire formé sur les surfaces est hétérogène en composition et en répartition formant de petits amas d'épaisseur variable ou des zones où la surface reste nue.

1.1.2.2 TRANSPORT ET DEPLACEMENT

La deuxième étape permettant l'établissement d'un biofilm est le transport, ou le déplacement, des micro-organismes vers une interface. Cette étape dépend fortement de la composition du milieu (viscosité, force ionique) et des mouvements des bactéries. Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en condition statique ou en écoulement laminaire) les micro-organismes peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (Characklis et Cooksey 1983, Marshall 1986, Characklis et al. 1990) :

- Passif, par un mouvement brownien (Brown 1866) menant à une sédimentation due à la force de gravité s'exerçant sur tous les corps (Dickson et Daniels 1991, Banks et Bryers 1992), ou par des mouvements de convection du milieu amenant physiquement les bactéries vers une surface.
- Actif, par le déplacement des bactéries grâce à des appareils locomoteurs (pili, flagelles) vers des substances nutritives (chimiotactisme) (Davies 2000).

Le transport de micro-organismes par convection vers une surface pourrait faciliter l'approche des bactéries et jouer un rôle non négligeable dans l'adhésion initiale (Banks et Bryers 1992). Pour des flux plus turbulents, la création de multiples petites turbulences localisées pourrait déplacer les bactéries vers les surfaces en neutralisant l'énergie libre de

Gibbs nécessaire à leur approche. L'énergie libre de Gibbs est la somme des interactions de van der Waals, elle est généralement négative car les bactéries et les surfaces sont souvent chargées négativement (Donlan et Costerton 2002, Vadillo-Rodrìguez 2005).

Les travaux réalisés par Davies (2000) ont montré que le transport actif, via l'action de flagelles, pili de type I et IV, curli, représente un important mécanisme permettant aux bactéries d'interagir avec les surfaces (Figure 3). Par exemple, les bactéries à Gram-négatif, comme *Escherichia coli* ou *Salmonella*, possèdent des flagelles. Ces derniers, mesurant environ 10 µm, permettent l'adhésion des bactéries sans qu'elles n'entrent en contact direct avec la surface (Pratt et Kolter 1998, Goller et Romeo 2008). Cependant, la motilité flagellaire n'est pas essentielle pour l'attachement initial et la formation d'un biofilm, phénomènes montrés chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella epidermitis* (O'Toole et Kolter 1998, Klausen et al. 2003). L'absence de flagelle est compensée par l'existence d'autres molécules adhésives, comme les curli, permettant l'attachement de la bactérie à la surface (Beloin et al. 2008).

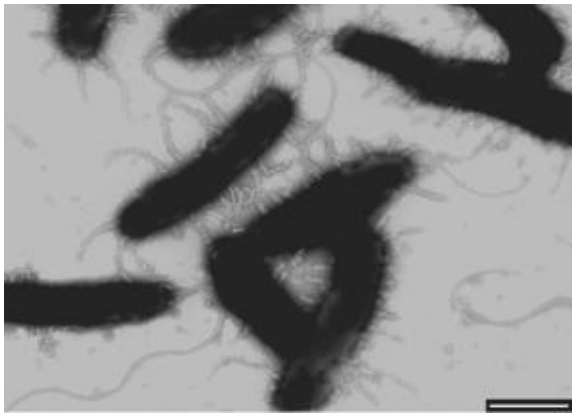


Figure 3. Image en microscopie électronique à transmission de P. tunicata montrant les pili à sa surface (croissance sur VNSS agar pendant 24 h, coloration négative avec de l'acide phosphotungstique à 2 %). Barre = 1 µm. (d'après Dalisay et al. 2006)

De plus, pour pouvoir détecter et réagir à la présence d'une surface, les bactéries doivent être capables de percevoir leur proximité. Les bactéries planctoniques libèrent des protons et des molécules signal dans leur environnement lors des déplacements dans le milieu. Les

protons et molécules signal diffusent de façon radiale depuis la cellule si aucune surface n'est proche, donc la concentration en molécules signal sera plus importante sur le côté de la bactérie se trouvant à proximité d'une surface. Les bactéries établissent alors un contact avec la surface par ces mécanismes de signalisation et expriment par la suite des adhésines à leur surface (Pratt et Kolter 1998, Wang et al. 2004, Thar et Khul 2005). Cependant, les gènes codant pour les caractères de motilité (synthèse du flagelle, motilité, chimiotactisme, etc.) peuvent être inhibés une fois que les bactéries se sont fixées à la surface (Prigent-Combaret et Lejeune 1999).

1.1.2.3 ADHESION REVERSIBLE

La troisième étape de la formation d'un biofilm est l'adsorption réversible et non-spécifique des bactéries à une surface. L'attachement primaire à une surface est sous l'influence de nombreux facteurs : pH, osmolarité du milieu, température, ... (Beloin et al. 2008) et fait intervenir principalement des processus physiques de type van der Waals, électrostatique, interactions hydrophobes (van Lossdrecht et al. 1987, Bellon-Fontaine et Cerf 1991, Faille et al. 2002) et acide-base de Lewis, dépendant de la nature du support et de son conditionnement. Elle combine les effets d'attraction de forces de van der Walls et les effets de répulsion générés par la double couche d'ions chargés formée en surface. La théorie DVLO (Dejarguin et Landau 1941, Verwey et Overbeek 1948) prend en compte la variation d'énergie entre l'énergie d'attraction due aux interactions dipolaires intermoléculaires et l'énergie de répulsion en fonction de la distance entre deux particules. La somme des deux énergies donne l'énergie totale d'interaction.

La répulsion électrostatique est fortement influencée par la concentration ionique de la solution : plus la concentration ionique est importante, plus la force de répulsion électrostatique diminue et plus la distance entre les cellules et la surface est réduite. Les cations polyvalents augmentent l'adhésion entre les cellules et la surface, souvent chargée négativement. Un pont intermoléculaire se crée alors entre la bactérie et la surface par interaction électrostatique entre les deux. Pendant cette phase initiale, les bactéries subissent encore un mouvement brownien et peuvent se détacher alors facilement sous l'action de contraintes hydrodynamiques (Gauthier et al. 1989).

1.1.2.4 ADHESION IRREVERSIBLE

L'adhésion irréversible, quant à elle, correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface. Les structures d'adhésion varient selon les types de micro-organismes concernés. Pour les bactéries à Gram-négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries à Gram-positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. D'autres bactéries vivant en partie fixées, comme *Caulobacter* ou *Hyphomicrobium*, peuvent utiliser des structures spécifiques comme un pédoncule ou une gaine (Van Houdt et Michiels 2005). Ces molécules d'adhésion permettent d'établir des contacts cellule-surface et des contacts cellule-cellule (Lemon et al. 2008). Chez certaines souches de streptocoques, des protéines exprimées à la surface des bactéries, la protéine Bap entre autres, favorisent les contacts entre cellules et contribuent à la synthèse de la matrice extracellulaire (Lasa et Penades 2006).

Les fimbriae de type I, ou pili, interviennent aussi dans la colonisation de surfaces abiotiques et de tissus vivants, et dans la formation de biofilms. Ce sont des polymères d'environ 1 µm de long présents à la surface des bactéries à Gram négatif (de 10 à 1000 fimbriae par cellule) comme par exemple chez les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli, Shigella*, *Citrobacter, Enterobacter,* etc.). La production de fimbriae de type I est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules et les conditions environnementales (Goller et Romeo 2008).

Les curli sont des fibres extracellulaires produites aussi par des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*. Les curli (protéines d'environ 15 kDa) peuvent se fixer à des protéines de la matrice extracellulaire : fibronectine, laminine. Leur synthèse est sous l'influence de nombreuses conditions environnementales comme la température, l'osmolarité, le pH et les concentrations en oxygène (Beloin et al. 2008). Les curli ont un rôle dans l'adhésion et la colonisation d'une surface et la formation de biofilms (Vidal et al. 1998). L'aptitude de souches environnementales d'*Escherichia coli* à former des biofilms dépend de leur capacité à exprimer des curli à leur surface (Castonguay, 2006, Goller et Romeo 2008).

Les pili de conjugaison (environ 1 µm de long, 1 à 10 par cellule) interviennent plutôt lors du contact initial avec la surface et lors de la phase de maturation du biofilm. Ils joueraient un rôle de stabilisation de la structure du biofilm (Ghigo 2001 ; Beloin et al. 2008). L'utilisation des pili de conjugaison met un terme à la mobilité et la déstabilisation des bactéries et permet des interactions stables. Dès lors, l'attachement devient irréversible (O'Toole et Kolter 1998) et peut être renforcé grâce à la sécrétion d'exopolymères permettant ainsi de consolider la fixation des bactéries au support. Un exemple est le cas de *Staphylococcus epidermidis* qui produit une adhésine polysaccharidique intercellulaire pour l'adhésion entre cellules et la formation de biofilm (Heilmann et al. 1996, Mack et al. 1996).

1.1.2.5 MATURATION

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation. La synthèse des substances exopolymériques (EPS), qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75 - 95 % du volume d'un biofilm mature (Ghigo 2001, Kuchma et al. 2005).

La matrice extracellulaire est constituée de différentes molécules telles que des exopolysaccharides (40 - 95 %), des protéines (1 - 60 %), des acides nucléiques (1 - 10 %) et des lipides (1 - 40 %) (Wingender et al. 2001). La composition et la quantité d'EPS produites par les bactéries varient en fonction du genre bactérien, de l'âge du biofilm et des facteurs environnementaux (Donlan et Costerton 2002). De plus, d'autres micro-organismes tels que des micro-algues (diatomées) peuvent sécréter des exopolymères dont profitent les bactéries. De nombreuses molécules d'eau sont associées aux exopolymères rendant la matrice hautement hydratée, visqueuse et élastique, on peut alors parler d'hydrogel. Seuls 1 à 2 % de matières organiques sont nécessaires pour lier 98 à 99 % d'eau et former un gel stable (Donlan et Costerton 2002).

La maturation du biofilm est divisée en deux phases (Clutterbuck et al. 2007). La première phase est marquée par des régulations de gènes engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Par exemple, au cours de la formation

d'un biofilm d'*Escherichia coli*, 22 % des gènes sont stimulés et l'expression de 16 % des gènes est inhibée (Prigent-Combaret et Lejeune 1999, Prigent-Combaret et al. 1999). Lors de la formation de biofilms de *Staphyloccocus aureus* par exemple, des gènes codant pour des enzymes intervenant dans la fermentation et la glycolyse (phosphoglycérate mutase, triosephosphate isomérase et alcool déshydrogénase) sont stimulés. Les régulations concernent essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies, suggérant la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support (Sauer et al. 2002, Becker et al. 2001). La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses polymériques importantes. L'épaisseur maximale du biofilm est alors atteinte durant la phase de maturation (Clutterbuck et al. 2007).

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de Quorum-Sensing (QS). Il s'agit de mécanismes de contrôle au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception de densité cellulaire. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (Costerton 1999b, Tomlin et al. 2005). Une fois que les concentrations en molécules signal atteignent une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (Costerton et al. 1999a, Clutterbuck et al. 2007, Irie et Parsek 2008). Des mutations de gènes impliqués dans les mécanismes de QS entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms. Cependant ces phénomènes sont très variables d'une espèce bactérienne à l'autre. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome et du protéome, permettant de réguler positivement ou négativement la croissance en biofilm.

Les molécules du QS sont nombreuses (Bassler 1999, Lazdunski et al. 2004). La majorité des bactéries utilisent des peptides auto-inducteurs (type AI-2), dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). On trouve aussi des N-acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries. Ces molécules du QS peuvent être dégradées par des enzymes : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du QS au sein d'un biofilm (Irie et Parsek 2008).

Le QS régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, et en prenant en compte les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage de bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie et Parsek 2008). Le QS aurait aussi un rôle dans l'épaisseur du biofilm (Clutterbuck et al. 2007). Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme des protéases (Tomlin et al. 2005, Clutterbuck et al. 2007, Irie et Parsek 2008). Les molécules du QS jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme des protozoaires tels que *Serratia marcescens* (Queck et al. 2006). Les synergies observées au sein des biofilms constitués de différentes espèces de micro-organismes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le QS (Bjarnsholt et al. 2005). Les biofilms composés de plusieurs communautés de bactéries d'espèces différentes ont de fortes concentrations en molécules du QS, compte-tenu de la densité élevée de cellules présentes.

Parmi les autres mécanismes régulateurs de la formation et de la maturation de biofilms, les polysaccharides présents à la surface des cellules jouent un rôle important dans les interactions entre bactéries et leur environnement immédiat. Par exemple, on trouve à la surface d'*Escherichia coli* une endotoxine faisant partie du lipopolysaccharide (LPS) et l'antigène polysaccharidique de capsule K. Les lipopolysaccharides font partie de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Ils peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilm selon les cas (Flemming et al. 1999, Decho 2010). Les polysaccharides des capsules sont des facteurs de virulence ; ils protègent les bactéries des défenses immunitaires de l'hôte (par exemple de la phagocytose) (Beloin et al. 2008).

Par ailleurs, un biofilm mature peut être considéré comme l'ensemble de plusieurs sous-populations bactériennes. Ces sous-populations sont le résultat de différents micro-environnements localisés dans le biofilm. Ainsi certaines sous-populations seront plutôt actives et produiront des EPS, alors que d'autres seront métaboliquement inactives ou en train de mourir (Stewart et Franklin, 2008). La lyse et la mort cellulaire contrôlée pendant la maturation du biofilm ou par des phénomènes de fratricide apportent des nutriments et de l'ADN extracellulaire au reste de la population bactérienne. L'ADN ainsi libéré est un constituant essentiel de la matrice (Whitchurch et al. 2002, Steinberger et Holden 2005).

1.1.2.6 DISPERSION

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le biofilm subit des phénomènes de dispersion. Lors de cette phase, des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur. Cette libération permet de promouvoir une diversité génétique et de favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques engendrant la formation d'autres biofilms (Parsek et Greenberg 2005, Clutterbuck et al. 2007).

La libération des formes planctoniques à partir du biofilm peut se faire de plusieurs façons différentes (Characklis et al. 1990, Brading et al. 1995). Les bactéries peuvent se détacher du biofilm de façon passive par érosion (détachement continu de cellules individuelles ou de petits agrégats), par relargage (détachement massif et rapide de quantités importantes de bactéries), ou par abrasion (détachement par collision de particules). Mais il existe aussi des processus de détachement actifs dus à des remaniements de l'expression de certains gènes spécifiques (Morgan et al. 2006). Cependant le phénomène de détachement semble dépendant des bactéries car différentes espèces bactériennes cultivées dans un système sous flux ne subissent pas toutes ce mécanisme au même moment (Korber et al. 1995).

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques des bactéries du biofilm, comme l'antibiorésistance. En effet, les bactéries planctoniques essaimant d'un biofilm sont capables de résister aux défenses immunitaires d'un hôte et être à l'origine d'une infection (Donlan et Costerton 2002). Par exemple, les bactéries planctoniques qui se dispersent à partir de prothèses et d'implants médicaux sont capables de survivre à la phagocytose réalisée par les polynucléaires neutrophiles et d'engendrer une infection systémique (Clutterbuck et al. 2007).

Les mécanismes d'attachement et de détachement d'un biofilm sont étroitement liés puisque les facteurs moléculaires intervenant dans l'attachement doivent être détruits ou inactivés pour qu'il y ait détachement (Spormann 2008). Plusieurs facteurs peuvent induire le détachement du biofilm et l'essaimage de bactéries sous forme planctonique, permettant ainsi la colonisation d'autres sites. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- l'arrêt de la synthèse de matériaux constitutifs du biofilm : polysaccharides de la matrice par exemple,
- la lyse des cellules du biofilm par l'induction d'un prophage, de l'EDTA, du NaCl, du $CaCl_2$, ou encore par l'action d'agents chélateurs (Spormann 2008),
- l'action de facteurs de détachements : agents tensioactifs ou enzymes dégradant la matrice (Otto 2008).

La dispersion d'un biofilm peut aussi être initiée par des changements environnementaux : limitation en oxygène ou en nutriments (Spormann 2008), modification du pH ou présence de certains composés spécifiques (Gjermansen et al. 2005) ou par l'action mécanique exercée par un flux de liquide. Chez des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* par exemple, une augmentation de la concentration en carbone, citrate, glutamate ou glucose, entraîne un détachement massif de plus de 80 % des cellules constituant le biofilm (Goller et Romeo 2008, Sauer 2004). Les conditions environnementales, notamment la privation en oxygène, jouent un rôle très important dans le déclenchement de la dispersion des biofilms (Thormann et al. 2006). Des biofilms de *Shewanella oneidensis* ont été créés *in vitro* puis soumis 14 heures après leur formation à une privation en oxygène. Un détachement massif et immédiat a pu être observé, avec 50 à 80 % des cellules se détachant du biofilm durant les 15 premières minutes d'hypoxie. Ce type de détachement diminue avec l'âge et l'épaisseur du biofilm (Thormann et al. 2006).

1.1.3 AVANTAGES CONFERES PAR LE MODE DE VIE EN BIOFILM

Le mode de vie sous forme de biofilm protège les micro-organismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques, synergies entre micro-organismes, expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress (Costerton et al. 1999a et b, Tomlin et al. 2005, Jouenne 2008). Les études menées sur les biofilms ces dernières années ont permis d'établir l'existence de modifications de l'expression génétique et des phénotypes entre les formes planctonique et sessile. Ces changements permettent d'expliquer l'adaptation des biofilms à des conditions environnementales stressantes et l'acquisition d'avantages évolutifs (Clutterbuck et al. 2007,

Goller et Romeo 2008). Par exemple, les micro-organismes au sein des biofilms sont plus résistants à la réponse immunitaire de l'hôte et aux agents antibactériens que leurs congénères vivant sous forme planctonique (Clutterbuck et al. 2007). Depuis quelques années, certaines équipes cherchent à comprendre et à identifier les facteurs génétiques et environnementaux permettant la transition entre ces deux modes de vie (Goller et Romeo 2008). La partie suivante présente les différents avantages conférés par le mode de vie sous forme de biofilms.

1.1.3.1 AVANTAGES METABOLIQUES

La croissance bactérienne en biofilm permet l'acquisition d'avantages métaboliques par l'action synergique des différentes espèces bactériennes. L'organisation structurée en communauté des biofilms permet l'optimisation des mécanismes de capture des nutriments et ainsi la réalisation d'économies énergétiques et de réserves (Sutherland 2001, Branda et al. 2005). De plus, des canaux peuvent traverser tout le biofilm formant un système circulatoire primitif, comme c'est le cas chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ils permettent un échange de nutriments et de métabolites avec la phase aqueuse augmentant leur disponibilité et l'évacuation de métabolites toxiques (Costerton et al. 1995). Par ailleurs, l'organisation architecturale complexe des biofilms permet aux micro-organismes de coopérer pour dégrader certains nutriments complexes (Tomlin et al. 2005). Un exemple à noter est le phénomène de nitrification intervenant dans l'épuration des eaux. Les bactéries du genre *Nitrosomonas* métabolisent l'ammonium présent dans les eaux produisant des nitrites qui sont alors métabolisés en nitrates par les bactéries du genre *Nitrospira*. La structure en biofilm pluri-espèces de *Nitrosomonas* et *Nitrospira* permet à cette dernière de disposer directement de son substrat pour réaliser la réaction de nitratation (Wanner et Bauchrowitz 2006).

1.1.3.2 PROTECTION MECANIQUE ET RESISTANCE AUX STRESS EXTERIEURS

Le mode de vie en biofilm est accompagné de la sécrétion d'une matrice exopolymérique (Figure 4) constituant une gangue stabilisatrice et protectrice vis-à-vis d'un certain nombre

de facteurs d'agression environnementaux (dessiccation, action de biocides, forces de cisaillement, etc.).

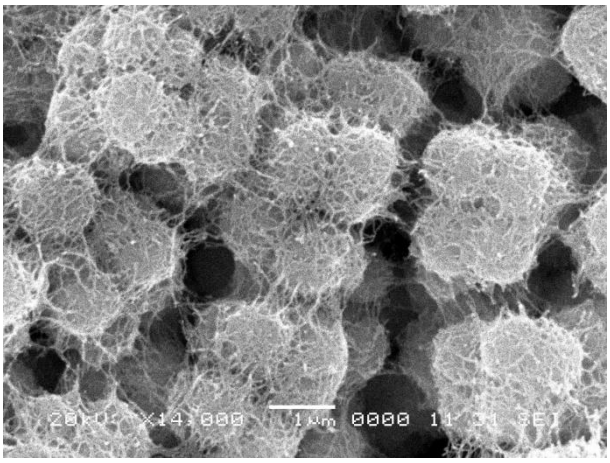


Figure 4. Image de Micrococcus sp. 5J6 obtenue par microscopie électronique à balayage, x14000 sur membrane (de C. Guégan, LBCM, Université de Bretagne Sud)

La sécrétion d'exopolymères protège les micro-organismes du biofilm de la dessiccation (Clutterbuck et al. 2007), la couche la plus externe de la matrice se déshydratant afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (Sutherland 2001). La matrice, par sa viscoélasticité, limite la dispersion des biofilms en empêchant les bactéries d'être arrachées par les flux de surface. Les biofilms résistent aussi mieux aux stress thermiques et à l'exposition aux rayons UV que les formes planctoniques (Martinez et Casadevall 2007). Ils ont la capacité d'altérer l'environnement local afin de permettre la survie des bactéries en modifiant certains paramètres comme le pH ou les taux d'oxygène dissous (Lee et de Beer 1995).

De plus, l'organisation en microcosme des bactéries au sein d'un biofilm favorise l'échange d'informations, avec entre autres, la possibilité de transfert de caractères de résistance (Costerton et al. 1999a). Des plasmides conférant la résistance au mercure ont été isolés de bactéries marines vivant en biofilms et ont pu être transférés à des bactéries sensibles (Ghigo 2001, May et al. 2009). La matrice assure aussi une protection mécanique contre l'entrée dans le biofilm de biocides tels que des antiseptiques, des détergents et des antibiotiques (Costerton et al. 1999a). Certaines bactéries en biofilms (*Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus*) sont viables à des concentrations

minimales inhibitrices d'ampicilline et de ciprofloxacine 1000 fois supérieures à celles mesurées pour les mêmes bactéries planctoniques (Stewart et Costerton 2001). La résistance des bactéries en biofilms peut être attribuée au phénotype particulier des bactéries, à la limitation de la diffusion des molécules dans les couches du biofilm et à la création d'un environnement local particulier. La nature de la matrice, en hydrogel, induit une diminution des cibles accessibles pour les antibiotiques et une réduction de la diffusion des plus grosses molécules (Gilbert et al. 2002, Simoes et al. 2009).

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la résistance générale des biofilms aux biocides :

1- Protection liée à la matrice.

Ce mécanisme est le plus pertinent pour des réactifs (détergents, superoxydes) ou des agents antimicrobiens chargés (métaux) ou de haut poids moléculaires (immunoglobulines). Ils sont neutralisés par les polymères de la matrice et dilués à des concentrations non létales avant d'avoir pu accéder aux bactéries à l'intérieur du biofilm (Stewart et Costerton 2001, Gilbert et al. 2002, Mah et O'Toole 2001). La résistance accrue des biofilms multi-espèces aux agents antimicrobiens peut être liée à des modifications de la matrice extracellulaire des biofilms, qui serait alors moins perméable. Il y aurait aussi des interactions entre les polymères sécrétés par les divers micro-organismes du biofilm, qui aboutiraient à une augmentation de viscosité de la matrice (Burmolle et al. 2007). De plus, certains polysaccharides peuvent se lier aux antibiotiques et les empêcher de pénétrer au sein du biofilm. C'est le cas de l'alginate, un exopolysaccharide produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit d'un polymère anionique : il capte facilement les molécules cationiques, comme par exemple les aminoglycosides ou aminosides, et les inhibe. Les alginates produits par *Pseudomonas aeruginosa* durant les étapes de formation du biofilm réduisent aussi la phagocytose leucocytaire (Leid et al. 2005). Il existe d'autres facteurs spécifiques de biofilms intervenant dans la résistance aux antibiotiques, comme par exemple l'enzyme codée par le gène *ndvB* chez *Pseudomonas aeruginosa*. Elle est impliquée dans la synthèse de glycanes cycliques, qui se lient à l'antibiotique (principalement la tobramycine), le séquestrent et empêchent la destruction de la bactérie (Mah et al. 2003).

2- Protection liée au mélange d'espèces au sein des biofilms.

Bien que beaucoup de biocides puissent pénétrer librement le biofilm, les cellules peuvent toujours être protégées. La création de zones où les bactéries sont en phase stationnaire dormante car non alimentées en nutriments paraît être un facteur significatif de résistance des bactéries du biofilm face aux biocides (Derlon et al. 2008). Ce phénomène est particulièrement notable contre des antibiotiques comme les β-lactames qui sont actifs contre les bactéries en phase exponentielle de croissance, par l'interruption de la synthèse du peptidoglycane de la paroi. Les antibiotiques nécessitent un certain niveau d'activité métabolique des bactéries pour être actif. La résistance des biofilms peut donc être associée à des poches où les bactéries sont en phase de dormance. Les biofilms hétérogènes en espèces bactériennes sont aussi plus résistants à l'invasion par d'autres micro-organismes. Un exemple est l'invasion de biofilms préexistants par *Pseudoalteromonas tunicata* D2, une bactérie marine produisant des substances bactéricides de haut poids moléculaire dont la protéine AlpP qui est active contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Des biofilms mono-espèce et jusqu'à des biofilms à quatre espèces isolées du milieu marin ont été exposés à *Pseudoalteromonas tunicata* D2 et les résultats montrent que l'invasion des biofilms par *Pseudoalteromonas tunicata* D2 est moindre dans les biofilms hétérogènes, comparativement aux biofilms homogènes (Burmolle et al. 2007).

3- Protection liée à l'état physiologique des bactéries et la présence de sous-populations résistantes.

Il existe au sein des biofilms des sous-populations d'une même espèce présentant des caractères phénotypiques différents et des résistances accrues (Suci et Tyler 2003). Par exemple l'altération de l'expression de certains gènes, comme rpoS ou algT, expliquerait l'apparition de phénotypes présentant une susceptibilité réduite aux agents antibactériens (Cochran et al. 2000). Des transferts de caractères de résistance de cellule à cellule permettent aussi d'expliquer l'apparition d'antibiorésistances au sein de biofilms (Ghigo 2001). Ces bactéries résistantes représentent une faible proportion de la biomasse totale du biofilm. Cette capacité de résistance exprimée par les biofilms rend leur élimination difficile et ceci a un impact considérable, compte-tenu de l'importance médicale et industrielle des biofilms.

1.1.4 UTILITE DES BIOFILMS

Les biofilms, de par leurs caractéristiques particulières, peuvent être utilisés et mis à profit, dans des procédés de traitement des eaux usées par exemple (auto-épuration des lacs, système de boues activées dans certaines stations d'épuration). En effet, les micro-organismes sont capables de dégrader les polluants présents dans les effluents. Certaines bactéries, comme les cyanobactéries, présentes dans des cours d'eau ou des lacs jouent un rôle non négligeable dans le cycle des métaux, dont elles sont en mesure de réduire les concentrations dans l'eau. Les biofilms bactériens peuvent être utiles de par leurs propriétés de synthèse de certaines substances chimiques (éthanol, poly-3-hydroxybutyrate, benzaldéhyde, plastiques) ou encore par leurs propriétés électriques qui en font de bon candidats pour les biopiles (Wanner et Bauchrowitz 2006).

Les biofilms peuvent être utilisés en bioremédiation de façon ciblée, afin d'épurer des nappes phréatiques souterraines contaminées, à la suite par exemple de pollutions chimiques accidentelles. Si les polluants sont biodégradables, des microorganismes spécifiques peuvent être injectés dans l'aquifère concerné dans l'espoir que ceux-ci forment des biofilms et utilisent les polluants comme source d'énergie pour leur métabolisme, à défaut d'autres substrats (Wanner et Bauchrowitz 2006). Dans le procédé des boues activées, les bactéries forment des biofilms (jusqu'à une épaisseur de 2 mm), maintenus en suspension dans des bassins d'aération. Les micro-organismes des biofilms vont interagir avec les polluants, les utiliser comme substrats métaboliques et ainsi épurer les eaux.

L'écotoxicologie fait souvent appel aux micro-organismes pour la détermination du degré de pollution des eaux ou le risque représenté par les substances toxiques. Les biofilms interagissent avec les toxiques en fixant et en accumulant les polluants éventuels sur de longues périodes. Les biofilms peuvent alors être utilisés comme marqueurs du degré de pollution chronique de leur habitat (Wanner et Bauchrowitz 2006). Les biofilms peuvent aussi servir d'indicateurs de stress métallique. De fortes précipitations peuvent amplifier l'écoulement au sein d'un cours d'eau et provoquer des remaniements au niveau des sédiments, qui vont relarguer des métaux dans l'eau. Les biofilms fluviaux réagissent très

rapidement à ces nouvelles conditions environnementales ; peu de temps après les précipitations, la concentration en métaux à l'intérieur des biofilms augmente de façon significative. Le stress métallique se manifeste par la formation de polypeptides (phytochélatines) neutralisant les métaux en se liant à ces derniers dans des biofilms composés d'algues (Wanner et Bauchrowitz 2006).

1.1.5 PROBLEMES ENGENDRES PAR LES BIOFILMS

Les biofilms peuvent être d'une grande utilité, notamment en matière d'épuration et de bioremédiation. Cependant, les biofilms peuvent aussi être source de problèmes tant dans le domaine médical que dans l'industrie ou même l'environnement.

1.1.5.1 DANS LE DOMAINE MEDICAL

Le mode de vie sessile est prédominant dans les environnements aqueux, tels que la bouche, où les biofilms sont responsables de la formation de la plaque dentaire (Figure 5).

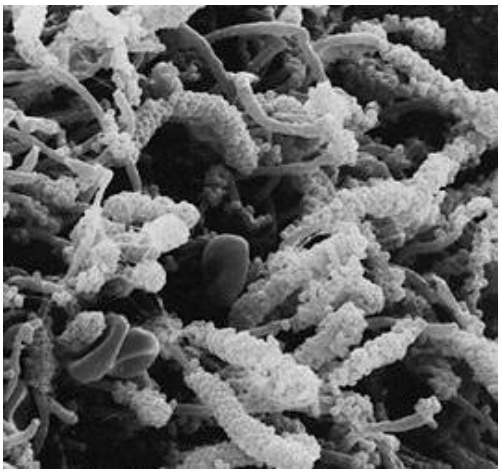


Figure 5. Image en microscopie électronique à balayage de plaque dentaire humaine mature montrant une formation dite en épis de maïs (grossissement x2 000), provient de l'ordre des hygiénistes dentaires du Québec (www.ohdq.com).

La croissance en biofilm protège les bactéries en leur permettant de rester dans un environnement riche en nutriments et en leur évitant de migrer vers un milieu plus hostile (Rosenberg et al. 1983). En effet, en se maintenant attachées aux dents, les bactéries évitent les conditions acides rencontrées dans l'estomac (Gibbons et van Houte 1975). La plaque dentaire est définie comme un ensemble hétérogène adhérant à la surface des dents ou logée dans l'espace gingivo-dentaire. Elle se compose de bactéries aérobies et anaérobies (plus de 500 espèces différentes dont 300 ont été identifiées), enveloppées dans une matrice extracellulaire d'origine bactérienne et salivaire. Le microbiote oral est constitué principalement de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, et d'organismes filamenteux à Gram-positif comme *Actinomyces*, *Rothia*, *Nocardia*, *Bacterionema*, *Leptotrichia* et *Corynebacterium* spp.

La plaque dentaire est un exemple de collaboration métabolique entre espèces (Palmer et al. 2001). *S. mutans* utilise le sucrose présent dans la bouche pour former des glucanes extracellulaires qui vont permettre l'adhésion d'autres espèces bactériennes sur la surface des dents, notamment de *S. salivarius*. Cette bactérie possède des activités biologiques importantes dans la régulation des voies métabolisant le lactose et la production d'uréase, qui contribuent à la stabilité de la microflore de la plaque dentaire. Les produits métaboliques de *S. salivarius* peuvent réguler la formation de biofilm dans toute la cavité buccale (Sissons et Yakub 2000, Ogawa et al. 2011). Les biofilms dentaires deviennent de réels problèmes lorsque l'équilibre entre les différentes espèces est rompu. L'apparition de mutants (le plus souvent au genre *Streptococcus*) à proximité de fissures sur une dent peut conduire à la formation de biofilms cariogène. Ces biofilms détruisent progressivement la dent, c'est la carie (Loesche 1986).

En médecine, les biofilms ont une importance particulière car ils sont impliqués dans un large éventail d'infections chez l'homme. Environ 65 % des infections sont dues à des biofilms dans les pays dits développés. Les biofilms sont aussi impliqués dans 60 % des infections nosocomiales et dans toutes les infections prothétiques (Costerton et al. 1995). De plus, près de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Hall-Stoodley et al. 2004). Les infections résultantes d'un biofilm sont résistantes aux traitements antibiotiques et donc posent problème en santé publique. Des biofilms ont

ainsi pu être observés sur des pansements, du matériel de suture, dans des tubes de drainage, des seringues, des cathéters, des pacemakers, des prothèses (Figure 6A), dans les supports de stockage des lentilles de contact (Figure 6B) ou sur les verres de contact eux-mêmes, dans les systèmes de distribution d'eau et sur les murs des hôpitaux (Jouenne 2008).

Figure 6. Photographies d'un biofilm sur une prothèse de corde vocale (A, www.piercecollege.edu) et d'un biofilm formé dans un boitier de stockage pour lentilles de contact (B, Christine Sindt www.reviewofcontactlenses.com)

En 2008, Lewis établissait une liste non exhaustive des principales infections liées aux biofilms : caries dentaires, mucoviscidose, ostéomyélites, otite moyenne, péritonites, prostatites, endocardites, escarres, et infections nosocomiales. Une infection sévère due à un biofilm fait souvent suite à une première infection ayant laissé des bactéries persistantes. Les individus présentant le plus de risques de développer des infections à biofilms sont des patients immunodéprimés ou porteurs de prothèses médicales. Les bactéries les plus fréquemment rencontrées font partie de la flore commensale de l'organisme et sont organisées en biofilms (Costerton et al. 1999a).

Certaines maladies comme la mucoviscidose (maladie génétique caractérisée par la présence d'un mucus très visqueux dans les poumons, Figure 7) favorisent l'invasion de bactéries et leur développement en biofilms. Dans le cas de la mucoviscidose, la mutation du gène codant pour un régulateur transmembranaire des flux de l'ion Cl^- provoque un excès d'ions calcium Ca^{2+} dans le mucus. Il se produit alors une accumulation de mucus dans les poumons qui peut plus facilement retenir les bactéries. Une succession de pathogènes opportunistes se crée et finit par l'établissement de *Pseudomonas aeruginos*a qui domine la flore présente

dans le mucus pulmonaire (Clutterbuck et al. 2007). Au fur et à mesure de la progression de la maladie le phénotype de *Pseudomonas aeruginosa* change et celle-ci forme des colonies mucoïdes en adoptant un mode de vie en biofilm. À partir de ce stade les bactéries surproduisent des exopolymères (alginate, acide α-l-guluronique, …) (Ramsey and Wojzniak, 2005). Les biofilms des poumons sont alors très difficilement éradiqués.

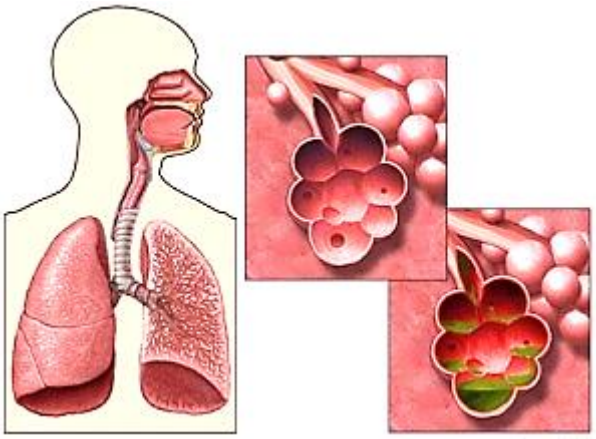


Figure 7. Illustration de la colonisation d'alvéoles pulmonaires par un biofilm bactérien (Children's Hospital of Pittsburgh)

Lors de maladies liées aux biofilms, les défenses de l'hôte ne sont souvent pas assez efficaces pour éliminer les biofilms présents dans l'organisme, engendrant ainsi des infections chroniques. Suite à la stimulation de la réponse immunitaire de l'hôte par les biofilms nouvellement formés, l'organisme colonisé déclenche un afflux massif d'anticorps spécifiques et de phagocytes sur le lieu de formation du biofilm. Cependant, les bactéries adhérées sont protégées par la matrice extracellulaire. Les anticorps synthétisés éliminent alors uniquement les bactéries de la surface du biofilm et les bactéries planctoniques détachées du biofilm. Ils ne peuvent pas accéder aux bactéries à l'intérieur du biofilm et peuvent endommager les tissus voisins (Costerton et al. 1999a). De même, les enzymes phagocytaires libérées localement vont endommager les tissus proches et éroder la surface du biofilm, permettant la libération de bactéries planctoniques qui vont alors pouvoir essaimer. Les cellules planctoniques stimulent à nouveau les défenses immunitaires et peuvent engendrer une dissémination de l'infection dans d'autres parties de l'organisme provoquant ainsi des infections aigües. Ces cellules sont capables de passer outre les

défenses immunitaires de l'hôte en sécrétant des protéases qui peuvent digérer les tissus de l'hôte et sont ainsi assimilées à des facteurs de virulence (Percival et Bowler 2004).

Les biofilms sont une cause importante d'infection et de chronicité en restant fixés à leur support. Les antibiothérapies sont inefficaces pour les éradiquer et souvent les symptômes réapparaissent, signant une rechute. Ainsi des infections peuvent persister des années au sein d'un organisme (Costerton et al. 1999a).

1.1.5.2 DANS LE DOMAINE DE L'INDUSTRIE

Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'industrie agro-alimentaire, en termes d'hygiène alimentaire et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires. Ils sont présents dans tous les secteurs : laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, salaisonneries, etc. Les installations fabriquant des produits humides sont exposées à la formation de biofilms car tout équipement non stérilisé est porteur de micro-organismes. Des bactéries comme *Listeria monocytogenes* peuvent coloniser des surfaces en quelques heures entre deux procédures de nettoyage (Jeyasekaran et al. 2000). Par exemple, des cas de listériose survenus au Canada ont été liés à la consommation de salade de choux contaminée (Schlech et al. 1983). Plus récemment, une épidémie de gastro-entérite et de syndrome hémolytique et urémique s'est déclarée en Europe au printemps 2011. Elle apparaissait liée à la présence de la souche *Escherichia coli O104:H4* sur des graines germées.

Des biofilms peuvent aussi se développer dans les réseaux d'alimentation en eau potable et dans les systèmes de climatisation. La présence de biofilms dans les canalisations peut être à l'origine de la détérioration de la qualité organoleptique et microbiologique de l'eau. De hauts taux de coliformes sont détectés dans les canalisations, mais aussi des bactéries hétérotrophes où prédominent les genres *Pseudomonas* et *Flavobacterium*. Un traitement avec 1,8 mg/l de chlore libre n'a pas permis de contrôler ce problème de biofilm car les bactéries sont protégées du désinfectant par la matrice extracellulaire (Paquin et al. 1992). De plus, les systèmes des tours aéroréfrigérantes peuvent abriter des biofilms de *Legionella*

pneumophila. Ces biofilms représentent un risque pour la santé humaine, comme l'a montré l'épidémie survenue dans le nord de la France à l'hiver 2003.

1.1.5.3 DANS L'ENVIRONNEMENT

Les biofilms sont à l'origine d'un certain nombre de dégradations (bâtiments, corrosion pouvant mener à la perforation de la coque des bateaux, altération de machines par corrosion localisée …) et ont, par conséquent, un impact économique important. Les façades de nombreux bâtiments sont également attaquées par des algues et des champignons organisés en biofilms et entraînent d'importantes dégradations. Les réparations nécessaires représentent un coût important. Les biofilms qui se développent sur les échangeurs de chaleur, afin de récupérer la chaleur des eaux usées, altèrent fortement l'efficacité de ces appareils en diminuant de 20 à 30 % leur capacité de transfert thermique (Wanner et Bauchrowitz 2006).

En milieu marin, tout matériau est colonisé rapidement par des bactéries et des diatomées créant un biofilm. La formation de biofilms bactériens est considérée comme étant une des étapes pionnières de l'établissement des salissures, en créant des points d'ancrage pour des micro-algues, puis des larves et ensuite des macro-organismes au corps mou comme les ascidies ou présentant un corps calcaire comme les balanes (Figure 8).

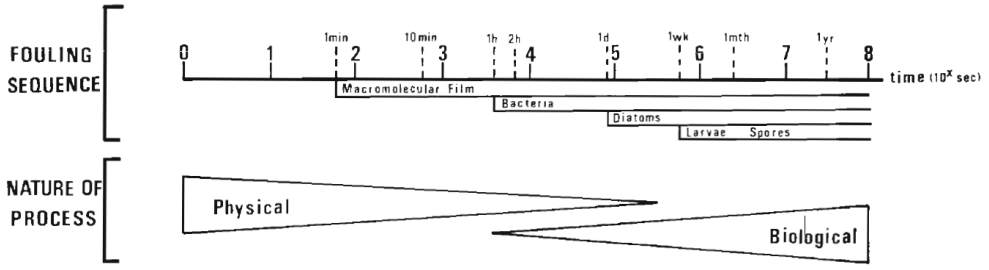


Figure 8. Phases d'établissement de salissures marines sur une surface (d'après Wahl et al. 1989)

C'est un phénomène ubiquitaire qui concerne toutes les structures (Figure 9A et B), toutes les industries, les parcs ostréicoles, les filets utilisés en aquaculture et certaines espèces animales marines (moules, baleines, etc.).

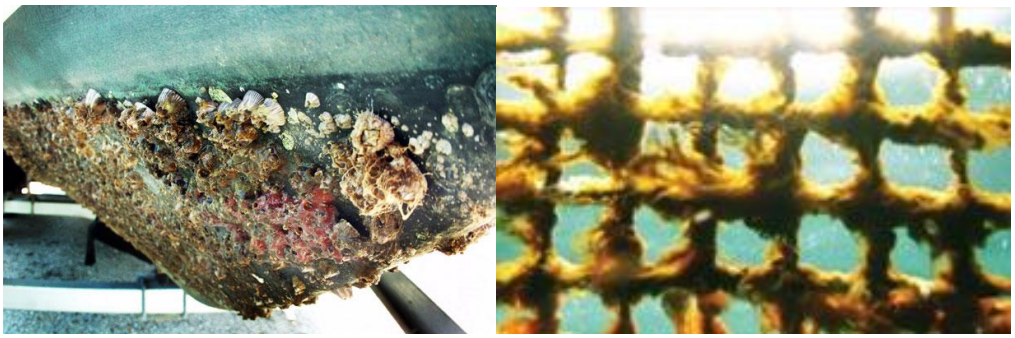


Figure 9. Photographies de salissures sur une coque de bateau (A, CleanAboat, Queensland), et sur un filet (B, Akvagroup™)

L'industrie navale, par exemple, est fortement touchée par les biofilms bactériens puis l'accrochage de macro-organismes sur les coques de navires et les structures portuaires. Dans le cas des bateaux, les conséquences des salissures sont bien connues (Yebra et al. 2004). Elles provoquent une augmentation des frictions à la surface des coques à cause d'une augmentation de la rugosité, ce phénomène mène à une augmentation non négligeable du poids du navire et une manœuvrabilité moindre. Ces problèmes sont compensés par une consommation accrue de carburant et donc une augmentation des émissions de CO_2 allant jusqu'à 40 % supplémentaire. La présence de salissures induit des opérations de carénage plus fréquentes provoquant l'accumulation de déchets toxiques dans les sédiments de ces zones portuaires et un coût supplémentaire pour les industriels.
De plus, des problèmes de corrosions sont associés aux salissures lorsqu'elles abritent en particulier (Guezennec et al. 1992) :

- des bactéries sulfato-réductrices proliférant en des milieux anaérobies et dont la respiration induit la formation de sulfures par réduction de l'ion sulfate,
- des bactéries thio-oxydantes qui produisent de l'acide sulfurique par oxydation de l'ion sulfure,
- des bactéries nitrifiantes ou dénitrifiantes,
- des bactéries ferro-oxydantes qui oxydent des ions ferreux pour former des chlorures ferriques hydrolysés en acide chlorhydrique.

Un exemple de corrosion par des bactéries du biofilm est la formation de rouille verte sulfatée ou hydroxysulfate Fe(II-III) (Figure 10). Des bactéries comme *Desulfovibrio*

desulfuricans utilisent les sulfates présents dans cette rouille verte comme accepteurs d'électrons et créent une strate supplémentaire de sulfures de fer sous la couche de rouille verte résultant de leur activité métabolique (Langumier et al. 2010).

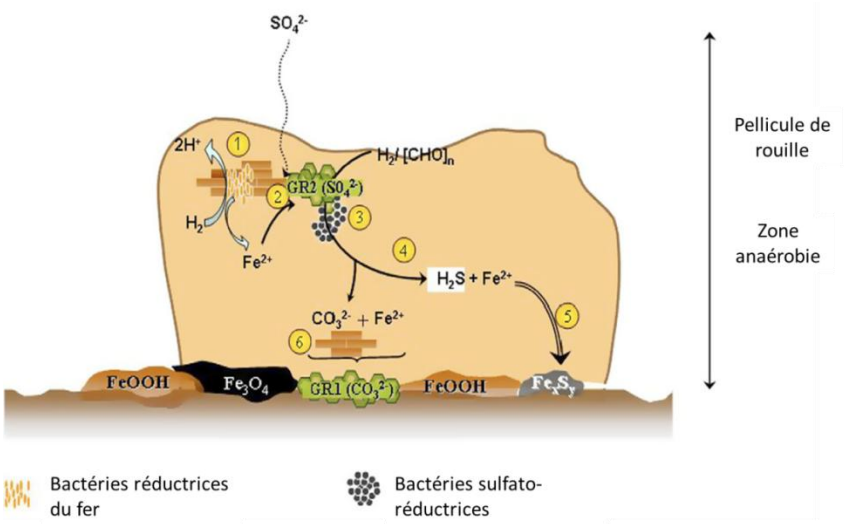


Figure 10. Mécanismes de formations de la rouille verte GR (Zegeye et al. 2007)

Un autre problème non négligeable concerne les capteurs immergés pendant des temps très longs en milieu marin. Les mesures prises par ces capteurs vont être modifiées et il en résulte une déviation progressive de celles-ci. C'est par exemple le cas des fluorimètres ou des néphélomètres ; les caméras sous-marines perdent également leur efficacité en raison d'un voile biologique qui se développe sur la partie optique.

1.1.6 MOYENS DE LUTTE CONTRE LES BIOFILMS MARINS

Par les dommages qu'ils causent en industrie et sur les structures, les biofilms ont un impact économique important. Il est nécessaire de développer des moyens de lutte efficaces et pérennes contre la formation de biofilms. De manière croissante ces dix dernières années, les recherches concernant les moyens de lutte contre les biofilms se multiplient. Le contrôle des biofilms passe généralement par des mesures préventives avec l'application de peintures sur les structures immergées. Deux principales stratégies peuvent être adoptées :

l'utilisation de biocides incorporés dans la peinture lui conférant un effet toxique ; ou des peintures anti-adhérentes, sans biocide, généralement à base de silicone ou de fluoropolymère dont l'effet est de limiter les forces d'adhésion des organismes aux surfaces.

Les peintures utilisées contiennent le plus souvent des biocides toxiques. Ils sont progressivement relargués et préviennent ainsi l'accrochage des micro-organismes. L'utilisation massive de peintures contenant des oxydes de cuivre associés à du zinc, des organochlorés, et même du trioxyde d'arsenic a engendré de fortes pollutions de l'environnement en métaux. Ces peintures posent à présent problème par leur interaction avec les populations marines (Claisse et Alzieu 1993, Thomas et Brooks 2010). Ainsi d'autres stratégies prévoient l'incorporation de composés anti-salissures d'origine naturelle, produits par des organismes marins comme les algues, les éponges et les bactéries. Des études sur les mécanismes d'inhibition de la formation de biofilms ont été réalisées sur une algue rouge, *Delisea pulchra*, car elle ne porte aucun biofilm à sa surface. Elle sécrète des furanones, qui sont des homologues des N-acylhomosérine lactones. Ces substances exercent un contrôle négatif de la communication bactérienne (Brint and Ohman 1995). Des résultats intéressants ont aussi été obtenus avec des cocktails enzymatiques constitués de protéase, de glycosidases et de lipases (Leroy 2008a et b, Kristensen et al. 2008, Pettitt et al. 2004). Parmi les hydrolases testées, des protéases, dont la subtilisine, ont montré la plus forte efficacité. Un mélange d'amylases, lipases, protéases a également montré une forte action synergique contre l'adhésion de *Pseudoalteromonas* et notamment à l'encontre de *Pseudoalteromonas* sp. D41. Cependant, de telles peintures, incluant des composés d'origine naturelle, n'ont pas encore été commercialisées (Yebra et al. 2004).

Une autre voie de recherche a permis le développement de revêtements non toxiques et sans biocides à base de silicone (Towsin et Anderson 2009). Ils ne préviennent pas totalement l'adhésion des organismes mais réduisent les forces d'adhésion de façon à permettre un décrochage des salissures par l'augmentation des vitesses de flux et des forces de cisaillement.

Par ailleurs, des méthodes vibrationnelles avec des systèmes d'ondes acoustiques ont aussi été étudiées (Sanford et Rittscho 1984), elles inhibent jusqu'à un certain point l'attachement

d'organismes par une source externe de vibration ou un revêtement piézoélectrique (Miloud et Mireille 1995). Cependant, la consommation considérable d'énergie est une difficulté non négligeable dans la mise en œuvre d'une telle méthode. D'autres études ont aussi évalué l'effet de l'application de champs magnétiques, d'irradiation UV ou de revêtements légèrement radioactifs, mais ces méthodes ne permettent pas une application à échelle industrielle (Yebra et al. 2004).

1.2 MOLECULES ACTIVES PRODUITES PAR LES ORGANISMES MARINS

L'adhésion et la croissance d'organismes sur les structures immergées posent de sérieux problèmes aux industries marines et aux flottes dans le monde (Yebra et al. 2004) comme indiqué précédemment. Les biofilms bactériens peuvent servir de point d'ancrage pour d'autres organismes, c'est pourquoi le contrôle de la formation de biofilm sur les structures immergées représente une cible importante pour le développement de nouveaux composés antisalissure. Un exemple bien connu est l'algue rouge *Delisea pulchra* qui produit des furanones halogénées qui perturbent les signaux du QS chez les bactéries, inhibent la croissance bactérienne et la formation de biofilm (Rice et al. 1999) ainsi que l'adhésion de larves et de spores d'algues (de Nys et al. 1995).

Les bactéries sont également une source potentiellement intéressante de composés anti-salissures, mais seule une faible proportion de bactéries marines a été criblée et peu de composés antiadhésion isolés et identifiés (Fusetani 2004, Dobretsov et al. 2006, Paul et al. 2006). Parmi les molécules isolées se trouvent des inhibiteurs de l'adhésion des larves de *Balanus amphitrite* : l'ubiquinone-8, produit par une bactérie marine du genre *Alteromonas* isolée de l'éponge *Halichondria okadai* (Kon-ya et al. 1995), et un autre composé, le 6-bromoindole-3-carbaldéhyde, produit par une bactérie du genre *Acinetobacter* isolée de la surface d'ascidies *Stomosa murrayi* (Olguin-Uribe et al. 1997). Plus récemment, cinq composés anti-salissures (testé contre des balanes), des diketopiperazines, ont été isolés à partir des bactéries *Streptomyces fungicidus* vivant en milieu profond (Li et al. 2006). Plus proche des côtes, Thenmozhi et al. (2009) ont isolé des bactéries associées aux coraux permettant d'inhiber la formation de biofilms de *Streptococcus pyogenes*. Parmi ces bactéries produisant une activité, *Bacilus horikoshii* inhibe de façon significative le QS en

réduisant de 80 % la production de violacéine. D'autres travaux réalisés en dehors du milieu marin par Seghal Kiran et al. (2010) ont permis d'isoler une bactérie, *Brevibacterium casei* MSA19, qui produit un glycolipide possédant un effet biosurfactant qui perturbe la cohésion des biofilms pathogènes pluri-espèces.

Des composés anti-salissures sont aussi produits par des macro-organismes mais l'utilisation de produits bactériens comporte des avantages :

- Il est difficile d'extraire ou de cultiver assez de macro-organismes pour satisfaire les besoins liés à une commercialisation des composés actifs, alors qu'il est possible de développer des cultures bactériennes à grande échelle pouvant couvrir les besoins industriels,
- Les bactéries productrices de composés anti-salissures, une fois leur génome connu, peuvent être modifiées génétiquement pour accroître leur rendement,
- Des souches bactériennes différentes mais de la même espèce peuvent produire des composés actifs différents selon les conditions de culture, ce qui augmente le nombre potentiel de molécules actives pouvant être produites.

1.3 FOCUS SUR LE GENRE *PSEUDOALTEROMONAS*

Seul un nombre limité de groupes phylogénétiques de bactéries marines a été étudié pour leur activité anti-salissures. La difficulté dans la recherche de métabolites actifs chez les bactéries vient de la faible proportion de bactéries cultivées. Haglund et al. (2002) ont estimé que 95 % des bactéries présentes dans l'environnement sont incultivées.

Certains genres bactériens très représentés en environnement marin comprennent une forte proportion de bactéries productrices d'activités originales, ainsi de plus en plus d'études sont réalisées sur les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*. Quelques bactéries sont maintenant bien connues. Elles proviennent d'association avec des macro-organismes marins pour la plupart. Par exemple les espèces bactériennes *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *P. tunicata*, *P. aurantia* ou encore *P. rubra* ont été isolées depuis des éponges ou des algues et inhibent la croissance d'autres bactéries marines (Holmstrom et al. 2002).

Les composés de haut poids moléculaire produits par *P. aurantia* (Gauthier et Breittmayer 1979), *P. rubra* (Gauthier 1976) et *P. luteoviolacea* (Gauthier et Flatau 1976) sont des inhibiteurs de la respiration cellulaire. *P. citrea* produit aussi un composé antibiotique dépendant de la présence de molécules polyanioniques (Gauthier 1977). Par la suite, Lemos et al. (1985) étudièrent l'activité antibactérienne de 38 bactéries isolées à partir d'algues vertes et d'algues brunes. Le fait notable ici est qu'elles appartenaient toutes au genre *Pseudoalteromonas*. Les travaux réalisés par Barbieri et al., en 2001, ont montré que le genre *Pseudoalteromonas* présente la plus grande variété d'activités antibactériennes et les plus fortes activités antifongiques à l'encontre aussi d'une très grande variété d'organismes.

Une autre bactérie bien connue et très étudiée est *Pseudoalteromonas tunicata* D2, isolée à partir d'ascidies *Ciona intestinalis*. Elle produit la protéine AlpP (190 kDa) constituée de deux sous-unités et possédant une activité antibactérienne (James et al. 1996, Mai-Prochnow et al. 2004). Par la suite, d'autres composés antifongiques, antialgaux et antilarves ont été isolés (Holmstrom et al. 1996, Holmstrom et Kjelleberg 1999, Egan et al. 2001). L'activité antialgale est, par exemple, due à un composé extracellulaire polaire de 3 à 10 kDa. Ce composé prévient la germination des spores de l'algue rouge *Polysodonia* sp. (Egan et al. 2001).

Des études sur *P. tunicata*, ainsi que sur *P. luteoviolacea*, ont montré que ces deux espèces bactériennes produisent des composés autoinhibiteurs, comme AlpP (James et al. 1996). Cette activité autoinhibitrice pourrait prévenir la prédominance de bactéries spécifiques et permettre de maintenir la diversité bactérienne dans la niche écologique occupée. De plus cette activité pourrait permettre la dispersion des bactéries du biofilm. La sécrétion de ces composés joue alors un rôle important dans les jeux de compétitions entre espèces pour l'occupation d'un même habitat (Bowman 2007).

Cette activité autoinhibitrice est également présente chez d'autres espèces bactériennes sous différentes formes. Un exemple connu de composés autoinhibiteurs sont les autolysines produites par des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Ces molécules hydrolysent le peptidoglycane des membranes cellulaires et provoquent la lyse de certaines bactéries et potentiellement la dispersion des bactéries du biofilm. De façon analogue, les travaux de Li et al. (1996) ont permis d'identifier une autolysine de 26 kDa produite par

Pseudomonas aeruginosa, importante pour la croissance et la division cellulaire. La production de cette autolysine est optimale en fin de phase exponentielle de croissance. C'est aussi à ce moment de la croissance que *P. tunicata* D2 produit son composé autoinhibiteur AlpP. Un fait intéressant à noter est que *P. tunicata* développe une résistance à cette protéine durant sa phase stationnaire de croissance (James et al. 1996). Par la suite, des études ont démontré que *P. citrea* et *P. rubra* exprimaient aussi une activité autoinhibitrice (Holmstrom et al. 2002).

D'autres études (Egan et al. 2002) ont exploré la relation entre la pigmentation de certaines bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, notamment de *P. tunicata* D2, et la production de composés anti-salissures. L'hypothèse est venue de l'observation que 90 % des isolats présentant une pigmentation noire montraient une activité inhibitrice de l'adhésion des larves de balanes (Holmstrom et al. 1996) (Figure 11).

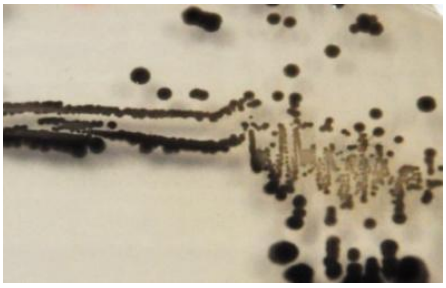


Figure 11. Colonies de P. tunicata D2 sur VNSS agar après 72 h de croissance (photographie de G. Klein)

De façon générale, les espèces pigmentées du genre *Pseudoalteromonas* ont montré de plus fortes activités par rapport aux espèces non pigmentées. Par exemple, le variant de *P. tunicata* D2 pigmenté en vert foncé (pigments violet et jaune) montre la plus grande variété d'activités inhibitrices alors que les bactéries non pigmentées *P. nigrifaciens* et *P. haloplanktis* ne montrent aucune activité lors des bioessais. Les travaux réalisés par Egan et al. (2002) démontrent de multiples niveaux de co-régulation entre la production de pigments et la production d'une activité anti-salissures. En effet *P. tunicata* D2 exprime principalement deux pigments, un violet et un jaune. Un fait remarquable ici est la perte de presque toutes les activités anti-salissures exprimées par *P. tunicata* chez le mutant n'exprimant pas le pigment jaune.

1.4 BACTERIES ETUDIEES : *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6 ET D41

Deux souches de *Pseudoalteromonas*, D41 et 3J6, ont été isolés respectivement en mer d'Iroise par l'Ifremer et dans le golfe du Morbihan par l'Université de Bretagne Sud. Ces deux bactéries présentent toutes deux une légère pigmentation rose et produisent des molécules ayant une activité antibiofilm.

La souche bactérienne, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (notée 3J6 par la suite), appartenant à la collection du LBCM (Figure 12), a été prélevée sur des lames de verre après 6 heures d'immersion. Les colonies formées sur VNSS sont rondes et muqueuses, de 2 mm de diamètre après 3 jours dans une étuve à 25°C. Elles sont d'abord translucides puis prennent une teinte rose pâle après quelques jours de croissance. Cette bactérie de 0,5 à 1 µm de long est à Gram-négatif, aérobie, mobile (« swimming », « swarming » et léger « twitching ») et très muqueuse sur milieu glucosé.

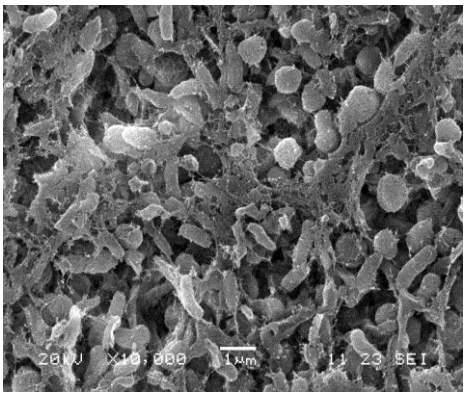


Figure 12. Image de Pseudoalteromonas sp. 3J6 obtenue par microscopie électronique à balayage, x10000 sur lame de verre après 2 h de contact (photo de Caroline Guégan, LBCM, Université de Bretagne-Sud)

L'ARN 16S de cette bactérie a été séquencé et déposé en banque de données EMBL sous le numéro FJ966949. Lors de la recherche de molécules de communications, intervenant notamment dans le QS, aucune production de molécules de type N-acyl homosérine lactone ou de type furanosyl borate diester (AI-2) n'a été détectée. L'activité protéasique a

également été évaluée et a permis de démontrer la capacité de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 à hydrolyser les caséines du lait. Une activité protéasique est donc bien présente mais elle n'a pu être identifiée ni quantifiée. Des travaux réalisés sur des biofilms pluri-espèces ont montré que *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 était prédominante sur deux autres bactéries marines, *Vibrio* sp. D01 et *Paracoccus* sp. 4M6 (Dheilly et al. 2010). Par la suite, des études sur les produits extracellulaires de 3J6 ont démontré leur activité inhibitrice vis-à-vis des souches bactériennes *Vibrio* sp. D01 et *Paracoccus* sp. 4M6.

La souche bactérienne, *Pseudoalteromonas* sp. D41 (notée D41 par la suite), appartenant à la collection de l'IFREMER (Figure 13), a été prélevée sur des surfaces de Téflon après 24 heures d'immersion. Les colonies formées sur VNSS agar sont rondes et muqueuses, de 2 à 4 mm de diamètre après 3 jours dans une étuve à 25°C. Elles sont d'abord blanchâtres puis prennent une teinte rosâtre après quelques jours. Cette bactérie de 1 à 1,5 µm de long est à Gram négatif, aérobie, oxydase et catalase positive, mobile (flagelle monotriche polaire, soit un seul flagelle à une extrémité) et très muqueuse sur milieu glucosé. Cette bactérie est capable d'utiliser des sucres (arabinose, cellobiose, D-fructose, α-D-glucose, maltose, D-mannose, saccharose et D-tréhalose) et des acides-aminés (alanine, leucine, sérine et thréonine) comme source de carbone (Rubio 2002). C'est une bactérie qualifiée de chimiohétérotrophe (molécules organiques comme source de carbone), mésophile (développement entre 4 et 37°C) et halophile (besoin de fortes concentrations en sels pour son développement).

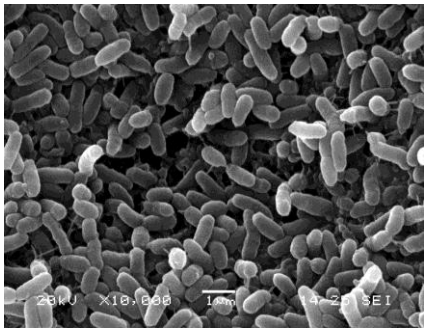


Figure 13. Image de Pseudoalteromonas sp. D41 obtenue par microscopie électronique à balayage, x10000 sur lame de verre après 2 h de contact (photo de Caroline Guégan, LBCM, Université de Bretagne-Sud)

L'ARN 16S de cette bactérie a été séquencé et déposé en banque de données GenBank sous le numéro d'accession AJ555627. Les bactéries appartenant à la souche D41 ont été identifiées comme assez peu hydrophiles. Grâce à des analyses en XPS réalisées par Rubio en 2002, nous savons qu'elles possèdent une forte proportion de groupements aminés et une faible proportion de groupements oxygénés à leur surface. Ces bactéries sont très adhésives, notamment sur des substrats hydrophobes avec un point isoélectrique inférieur à 3,2. Des recherches de molécules de communications ont également été réalisées pour D41. Comme 3J6, elles n'ont montré aucune production de molécules de type N-acyl homosérine lactone ou de type furanosyl borate diester (AI-2). Une activité protéasique (hydrolyse de caséine) a aussi été détectée, mais sans être identifiée. Des travaux similaires à ceux réalisés sur 3J6 avec des biofilms pluri-espèces ont montré que *Pseudoalteromonas* sp. D41 était prédominante sur *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (Dheilly et al. 2010). L'hypothèse par la suite émise est que D41 sécrète un composé dans son environnement empêchant l'établissement de 3J6.

1.5 METHODES D'ETUDES DES BIOFILMS

Plusieurs méthodes différentes ont été développées pour cultiver, quantifier et observer les biofilms (McLean et al. 2004). La toute première technique utilisée pour étudier un biofilm est la quantification par dénombrement sur gélose (Donlan and Costerton 2002). C'est une méthode longue et fastidieuse avec des problèmes de dissociation des bactéries. Par la suite, d'autres systèmes plus rapides ont été développés. La culture de bactéries en biofilms sur les parois des tubes de culture suivi d'un marquage pour la quantification a été alors développée (Christensen et al. 1982). Puis les microplaques 96 puits ont été utilisées pour réaliser les cultures de biofilms, autorisant une plus grande variété de paramètres testés en un minimum de temps. La quantification est réalisée par un marquage des bactéries du biofilm associé à des mesures en spectrophotométrie. Les systèmes et protocoles en microplaques sont aujourd'hui très largement utilisés pour l'étude des biofilms. Ils peuvent être classés en trois catégories : les mesures de biomasse (basées sur la quantification des cellules et de la matrice), les mesures de viabilité (basées sur la quantification différentielle

des cellules vivantes et mortes) et les mesures réalisées sur la matrice des biofilms (basées sur des marquages spécifiques des différents composants de la matrice).

Un des marqueurs le plus couramment utilisé pour quantifier la biomasse totale, et utilisé aussi dans cette thèse, est le cristal violet. La coloration au cristal violet a été pour la première fois décrite par Christensen et al. (1985). Le cristal violet est un marqueur basique qui se lie aux molécules chargées négativement. Depuis, la méthode a été modifiée et améliorée pour augmenter sa précision et sa sensibilité, et aussi adaptée selon l'origine des bactéries utilisées (Surman at el. 1996, Stepanovic et al. 2000, Pitts et al. 2003, Dhanasekaran et al. 2009). Par la suite d'autres marqueurs, fluorescents, ont été utilisés en routine : le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), le Syto 9, et le marquage bactérien à la « Green Fluorescent Protein » (GFP).

En parallèle de ces développements de protocoles en microplaque, l'analyse des biofilms a été révolutionnée par l'utilisation de techniques microscopiques, qui ont permis d'avoir des mesures de biomasse mais aussi d'avoir des informations quant à leur structure, leur composition, leur organisation et certaines activités spécifiques comme la respiration bactérienne. Au début des années 1990, la microscopie confocale à balayage laser a permis un bond en avant dans l'étude des biofilms. Cette technique permet l'observation, en temps réel et en 3D, de la formation de biofilms depuis les premières étapes d'adhésion et sans détruire l'architecture. Les biofilms peuvent ainsi être cultivés *in vitro* dans des chambres dans lesquelles un flux de milieu de culture est appliqué (Pamp et al. 2008). Avant l'utilisation de la microscopie confocale, d'autres méthodes étaient, et sont toujours, utilisées comme les microscopies électroniques. Cependant les biofilms nécessitent un traitement pour être observables, provoquant ainsi une perte des structures formées (Surman et al. 1996).

1.6 OBJECTIFS DE L'ETUDE

Au vu des données de la littérature, de nombreuses bactéries marines appartenant à diverses espèces colonisent dès les premières heures les matériaux immergés en milieu marin. Les quelques études de biofilms multi-espèces de bactéries marines ont révélé que

certaines bactéries peuvent agir en synergie pour former des biofilms, ou entrer en compétition entre elles. Les bactéries des biofilms produisent des composés originaux en quantité importante, notamment les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* qui produisent des inhibiteurs d'autres micro- et macro-organismes. L'étude de bactéries appartenant à ce genre est d'autant plus intéressante du fait de leur capacité à s'associer à des hôtes eucaryotes. Des travaux précédents (Rubio 2002, Grasland et al. 2003, Pradier et al. 2005, Leroy 2006, Dheilly 2007) ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes d'adhésion des bactéries marines sur un support, ces connaissances sont primordiales pour l'étude du développement des biofilms marins et de leur inhibition. Dans le cadre de ces études plusieurs dizaines de bactéries marines ont été isolées et deux d'entre elles, des bactéries primo-adhérentes, possèdent des activités inhibitrices de la formation de biofilms d'autres bactéries. Ces deux souches appartiennent au genre *Pseudoalteromonas* (*Pseudoalteromonas* sp. D41 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6). Les présents travaux visent à caractériser et identifier les molécules naturelles sécrétées par ces deux souches bactériennes, molécules responsables des activités inhibitrices de la formation de biofilms par d'autres espèces bactériennes, et à mieux comprendre les mécanismes entrant en jeu lors de l'inhibition de biofilms d'autres espèces. Dans cette optique, a été entrepris un travail pluridisciplinaire dont les objectifs étaient les suivants :

(i) Définir les conditions optimales de production (Chapitre 3) et décrire le mode d'action et l'effet des molécules antibiofilm produites par les souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 (Chapitre 4).

L'activité antibiofilm de 3J6 n'avait été testée que sur trois autres bactéries, et l'activité de D41 n'avait été testée que sur 3J6 lors des travaux de thèses précédents par Dheilly (2007). En vue de futures applications, il est essentiel d'examiner si ces deux bactéries modèles sont capables d'agir sur une grande variété de bactéries ou sur un groupe spécifique. L'approche mise en œuvre dans ces travaux a conjugué l'étude de la formation de biofilms en conditions dynamiques avec l'application d'un flux continu de milieu de culture et en conditions statiques en microplaque 96 puits permettant un criblage rapide des activités. Puis, afin de se placer dans des conditions optimales pour entreprendre la caractérisation et l'isolement des molécules inhibitrices, il a été nécessaire de déterminer dans quelles conditions de

culture les souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 produisent la plus grande quantité de ces molécules (nature des cultures, composition des milieux de cultures, durée de croissance, etc.). Enfin, l'étude des composés actifs nécessite de savoir à quelle étape de formation d'un biofilm ils vont agir et s'ils vont être bactéricides ou seulement bactériostatiques afin de pouvoir définir plus précisément les applications possibles des composés inhibiteurs produits.

(ii) Purifier les molécules actives (Chapitre 5).

Avant d'entreprendre la purification des molécules actives, la définition des conditions de stockage et de leur stabilité était nécessaire. L'action de la protéinase K, de la température et du DMSO sur l'activité de ces molécules a été évaluée. Les molécules actives produites dans les surnageants de cultures des deux souches bactériennes ont été purifiées en utilisant la chromatographie liquide d'échange d'ions. Puis les fractions actives ont été concentrées et dessalées pour permettre la poursuite de la purification par chromatographie liquide. Le contenu des fractions a été analysé par électrophorèse des protéines et par spectrométrie de masse, pour pouvoir être séquencé.

Nous pourrons alors déterminer l'intérêt d'une utilisation de ces molécules antibiofilm dans d'autres secteurs que le milieu marin, et concernés par les formations de biofilms (domaine médical ou de l'agro-alimentaire). Nous pourrons également rechercher des solutions adaptées et non toxiques dans la prévention ou l'élimination de biofilms indésirables.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 MICROBIOLOGIE

Les expérimentations microbiologiques sont effectuées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire, ou proche d'un bec bunsen à gaz ou électrique. Toutes les solutions et milieux de culture sont stérilisés par autoclave (121°C, 20 minutes ou 110°C, 30 minutes pour les solutions contenant du glucose à 30 g/L). Cependant, certaines solutions ne peuvent être autoclavées (surnageants de cultures bactériennes, solution de glucose à 20 %, eau de mer artificielle EDMA) et sont stérilisées par filtration sur des filtres de porosité 0,22 µm en conditions stériles.

2.1.1 SOLUTIONS, MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

Les souches bactériennes marines sont principalement cultivées en milieu Väätänen Nine Salt Solution (VNSS, Mården et al. 1985). Certaines expérimentations, notamment celles menées dans le but d'optimiser la production de composés antibiofilm ont nécessité l'utilisation d'autres milieux de culture : Infusion de cœur de bœuf (Difco 238400) additionné de NaCl, Zobell, MB (Difco 273110) et M9. Ils ont été utilisés seuls ou additionnés de glucose à une concentration finale de 30 g/L. Des milieux solides ont aussi été fabriqués en ajoutant 1,5 % d'agar bactériologique de type E.

Les expérimentations nécessitent aussi de fabriquer de l'eau de mer artificielle (EDMA). La norme ASTM D1141-90 (1992) est utilisée afin d'avoir une solution stable et contrôlée en sels, et proche du milieu naturel. De plus du tampon phosphate salé (PBS) est utilisé comme solvant notamment pour les extraits de purification. Les protocoles permettant la fabrication de ces milieux sont décrits plus bas. Pour le stockage à long terme, les bactéries en phase stationnaire sont stockées à -80°C dans du glycérol à une concentration finale de 25 % (v/v) après culture en VNSS.

2.1.1.1 VNSS

Composition du milieu Väätänen Nine Salts Solution, (VNSS, Mården *et* al. 1985) : Peptone (1 g/l) ; Extrait de levure (0,5 g/l) ; Glucose (0,5 g/l) ; Amidon soluble (0,5 g/l) ; $FeSO_4$, $7H_2O$ (0,01 g/l) ; Na_2HPO_4 (0,01 g/l) ; NSS [Nacl (17,6 g/l) ; Na_2SO_4 (1,47 g/l) ; $NaHCO_3$ (0,08 g/l) ; KCl (0,25 g/l) ; KBr (0,04 g/l) ; $SrCl_2$, $6H_2O$ (0,01 g/l) ; H_3BO_3 (0,01 g/l)] ; Eau milliQ (qsp 1 litre).

2.1.1.2 MARINE BROTH

Composition du Marine Broth (MB), acheté en poudre (Difco ref 273110) : Peptone (5g/l) ; Extrait de levure (1 g/l) ; Citrate de fer (0,1 g/l) ; NaCl (19,45 g/l) ; $MgCl_2$ (5,9 g/l) ; Na_2SO_4 (3,24 g/l) ; $CaCl_2$ (1,8 g/l) ; KCl (0,55 g/l) ; Na_2CO_3 (0,16 g/l) ; KBr (0,08 g/l) ; $SrCl_2$ (0,034 g/l) ; H_3BO_3 (0,022 g/l) ; Na_2O_3Si (4 mg/l) ; NaF (2,4 mg/l) ; $(NH_4)NO_3$ (1,6 mg/l) ; Na_2HPO_4 (8 mg/l) ; Eau milliQ (qsp 1 litre).

Pour préparer le milieu de culture MB, 37,4 g de poudre est suspendu dans 1 litre d'eau milliQ et est porté à ébullition pendant 1 minute pour dissoudre complètement la poudre.

2.1.1.3 ZOBELL

Composition du milieu Zobell (pH ajusté à 7,6 avec une solution de HCl 1N) : Peptone (5 g/l) ; Extraits de levure (1 g/l) ; Eau de mer artificielle (800 ml) ou Sea salts (35 g/l, Sigma S9883) ; Eau milliQ (qsp 1 litre).

2.1.1.4 INFUSION DE CŒUR DE BŒUF ADDITIONNE DE NACL

Composition du milieu : Infusion de cœur de bœuf salé (pH ajusté à 7,4 avec une solution de HCl 1N) : Infusion de cœur de bœuf en poudre (500 g/l); NaCl (5g/l); Tryptose (10 g/l); Eau milliQ (qsp 1 litre).

2.1.1.5 M9 SALE

Composition du milieu M9 salé (quatre solutions préparées et stérilisées séparément) :

- Solution 1 (solution stock 5X) : Na_2HPO_4 (30 g/l) ; KH_2HPO_4 (15 g/l) ; NaCl (100 g/l) ; NH_4Cl (5 g/l) ;
- Solution 2 : $MgSO_4$, 7H2O (1 mole/l);
- Solution 3 : $CaCl_2$ (1mole/l);
- Solution 4 : glucose 20 % (stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0,2 µm).

Le milieu M9 salé 1X est constitué de 200 ml de solution 1, additionné de 2 ml de solution 2, puis de 0,1 ml de solution 3 et enfin 20 ml de solution 4. Le volume est complété à 1 litre avec de l'eau milliQ.

2.1.1.6 EDMA

Les expérimentations nécessitent de fabriquer de l'eau de mer artificielle (EDMA, norme ASTM D1141-90). Le pH est ajusté à 8,2.

- Solution 1 : $MgCl_2$, $6H_2O$ (555,6 g/l) ; $CaCl_2$ anhydre (57,9 g/l) ; $SrCl_2$, $6H_2O$ (2,1 g/l) ;
- Solution 2 : KCl (69,5 g/l) ; $NaHCO_3$ (20,1 g/l) ; KBr (10 g/l) ; H_3BO_3 (2,7 g/l) ; NaF (0,3 g/l) .

Pour constituer 1 L d'EDMA, il faut mélanger : NaCl (24,534 g/l) ; Na_2SO_4 anhydre (4,064 g/l) ; Solution 1 (20 ml) ; Solution 2 (10 ml) ; Eau milliQ (qsp 1 litre).

2.1.2 SOUCHES BACTERIENNES

Une partie des souches bactériennes provient de la collection de l'IFREMER REM-RDT-IC. Les bactéries de cette collection ont été isolées à partir de biofilms marins formés sur des coupons d'acier inoxydable AISI 316L, de Téflon et de verre immergés pendant 6, 24 ou 48 h dans un courant d'eau de mer circulante pompée depuis la rade de Brest sur le site de Sainte Anne du Portzic en novembre 1998 (Tableau 1). Les différents isolats bactériens ont été caractérisés par Rubio (2002).

Une autre partie des souches bactériennes utilisées dans ces travaux provient de la collection du LBCM (UBS). Ces bactéries ont été isolées à partir de biofilms marins naturels adhérés sur des lames de verre immergées à 1 mètre de profondeur pendant 3 ou 6 h, près de l'Ile de Bailleron (Golfe du Morbihan) en mars et juin 2000 (Tableau 1). Les différents isolats ont été caractérisés par Grasland et al. (2003).

De plus trois bactéries marines bien connues ont été utilisées pour servir de référence et de modèle de comparaison. Ces souches sont *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (n° d'assession dans GenBank : CP000388.1 ; Yaphe 1957), *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125 (Médigue et al. 2005) et *Pseudoalteromonas tunicata* D2 (ref fournisseur DSMZ14096 ; Holmström et al. 1998) (Tableau 1).

Nous avons choisi d'utiliser dans cette étude les bactéries *Pseudoalteromonas* sp. D41 et 3J6 car elles ont montré, toutes deux, une activité inhibitrice de l'établissement de biofilms d'autres espèces bactériennes en biofilms mixtes (Dheilly, 2010) et appartiennent à 2 espèces différentes.

Tableau 1. Origine des souches bactériennes utilisées dans ces travaux

Souche	Origine	Surface utilisée et temps d'immersion
***Algibacter* sp. 1M6**	LBCM	Lame de verre, 6h en mars
***Alteromonas* sp. 1J3**	LBCM	Lame de verre, 3h en juin
***Alteromonas* sp. 2J3**	LBCM	Lame de verre, 3h en juin
***Bacillus* sp. 4J6**	LBCM	Lame de verre, 6 h en juin
***Colwellia* sp. 4J3**	LBCM	Lame de verre, 3h en juin
***Micrococcus* sp. 5J6**	LBCM	Lame de verre, 6h en juin
***Paracoccus* sp. 3M6**	LBCM	Lame de verre, 6h en mars
***Paracoccus* sp. 4M6**	LBCM	Lame de verre, 6h en mars
***Pseudoalteromonas* sp. 3J3**	LBCM	Lame de verre, 3h en juin
***Pseudoalteromonas* sp. 3J6**	LBCM	Lame de verre, 6h en juin
***Pseudoalteromonas* sp. 5M6**	LBCM	Lame de verre, 6h en mars
***Pseudoalteromonas* sp. D41**	IFREMER	Téflon, 24h
***Sulfitobacter* sp. 8J6**	LBCM	Lame de verre, 6h en juin
***Vibrio* sp. D01**	IFREMER	Coupon de verre, 6h
***Vibrio* sp. D02**	IFREMER	Coupon de verre, 6h
***Vibrio* sp. D22**	IFREMER	Coupon de verre, 24h
***Vibrio* sp. D66**	LBCM	Coupon de verre, 48h
***Pseudoalteromonas atlantica* T6c (forme mucoïde)**	Baie de San Diego, Californie	Carapace de crabe
***Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125**	Antarctique	Echantillon d'eau
***Pseudoalteromonas tunicata* D2**	Gullmarsfjorden, Suède	*Ciona intestinalis*

2.1.3 COURBES DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION D'ACTIVITE ANTIBIOFILM

La croissance des bactéries est effectuée en erlenmeyer dans un volume de 2 litres, à 25°C sous une agitation de 170 rpm avec plusieurs milieux de culture : VNSS, MB, Zobell, Infusion de cœur de bœuf additionné de NaCl. La croissance bactérienne est suivie au cours du temps par mesure de densité optique à 600 nm (DO_{600}) à l'aide d'un spectrophotomètre Jenway 6400 par prélèvement de 1 ml comme suit :

- Toutes les heures jusqu'au début de la phase exponentielle de croissance ;
- Toutes les 30 min pendant la phase exponentielle de croissance ;
- Toutes les heures entre la fin de phase exponentielle de croissance et t_0+12h ;
- Toutes les 24 h sur 7 jours.

2.1.4 PREPARATION DES SURNAGEANTS DE CULTURE

Dheilly (2007) a montré que l'activité antibiofilm de 3J6 provient de composés qu'elle sécrète dans son milieu. Pour pouvoir tester aussi les produits sécrétés par D41, les surnageants de culture de ces deux bactéries sont récupérés et séparés des bactéries qui les composent. Ce protocole est détaillé dans la Figure 14 qui suit.

Les surnageants de 3J6 et de D41 sont nommés respectivement SN_{3J6} et SN_{D41}.

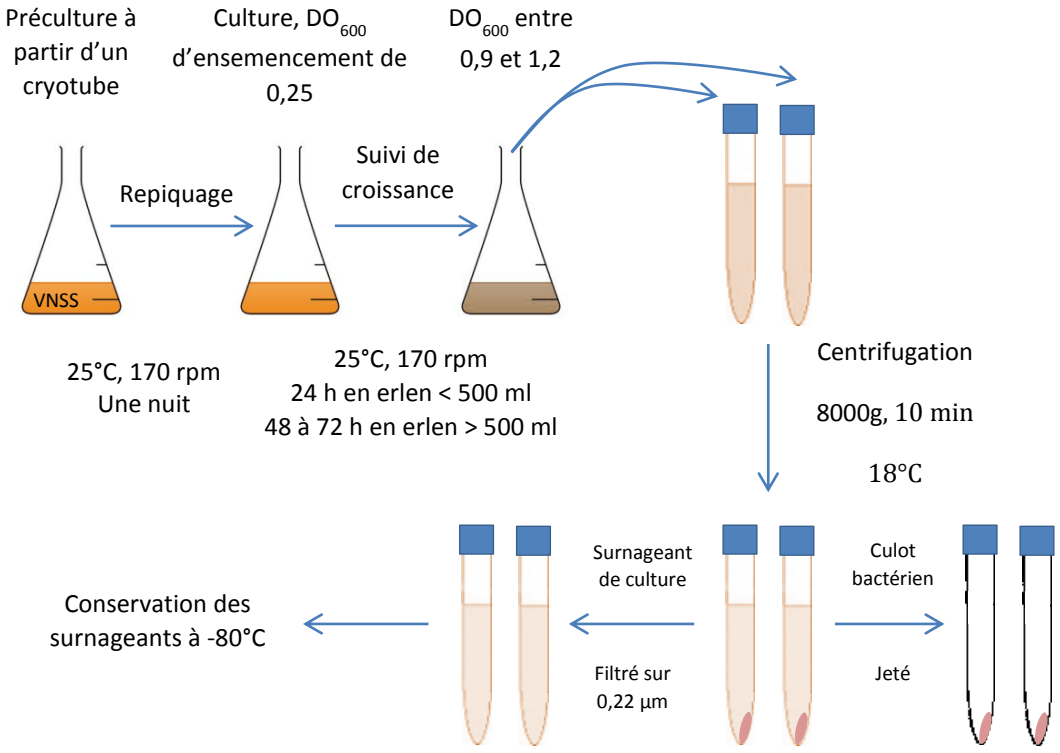


Figure 14. Schéma du protocole de préparation des surnageants bactériens

2.1.5 DOSAGE DE L'ACTIVITE ANTIBIOFILM

Les essais ont été réalisés d'une part en condition statique en microplaque 96 puits couplés à des mesures de biomasse par coloration au cristal violet. D'autre part des essais d'activité ont été réalisés en condition dynamique, en chambres à flux, avec des observations en microscopie confocale à balayage laser.

2.1.5.1 PREPARATION DES SUSPENSIONS BACTERIENNES

Les bactéries sont collectées à partir d'une culture liquide en VNSS de 24 h. La DO_{600} est mesurée et est ramenée à une valeur de 1 soit par ajout de VNSS soit par concentration grâce à une centrifugation à 5000 g. Un volume de 250 µl est prélevé puis centrifugé à 5000 g pendant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant est jeté et le culot est remis en suspension dans 1 ml d'EDMA stérile (pour le contrôle) ou dans 1 ml d'échantillon à tester (SN_{D41} ou SN_{3J6} ou fraction purifiée à partir de surnageant brut) de façon à préparer une suspension bactérienne de DO_{600} de 0,25.

2.1.5.2 BIOFILMS EN CONDITIONS STATIQUES : CROISSANCE EN MICROPLAQUE 96 PUITS

Protocole

Un protocole de dosage rapide d'activité antibiofilm a été développé en microplaques 96 puits (plaques en polystyrène transparent à fond U stérile avec un couvercle et plaques µclear noires à fond plat en verre transparent, Greiner Bio-One GmbH, Allemagne). Le but est de quantifier l'adhésion après 2 h et le biofilm formé en 24 h par des bactéries en contact ou non avec des molécules sécrétées par les bactéries D41 et 3J6 dans les surnageants de culture ou dans les fractions de purification. De façon à conserver un environnement stérile, les microplaques sont systématiquement ouvertes sous une hotte microbiologique à flux

laminaire. La Figure 15, ci-dessous schématise le protocole d'adhésion bactérienne et de croissance des biofilms suivi de la coloration au cristal violet.

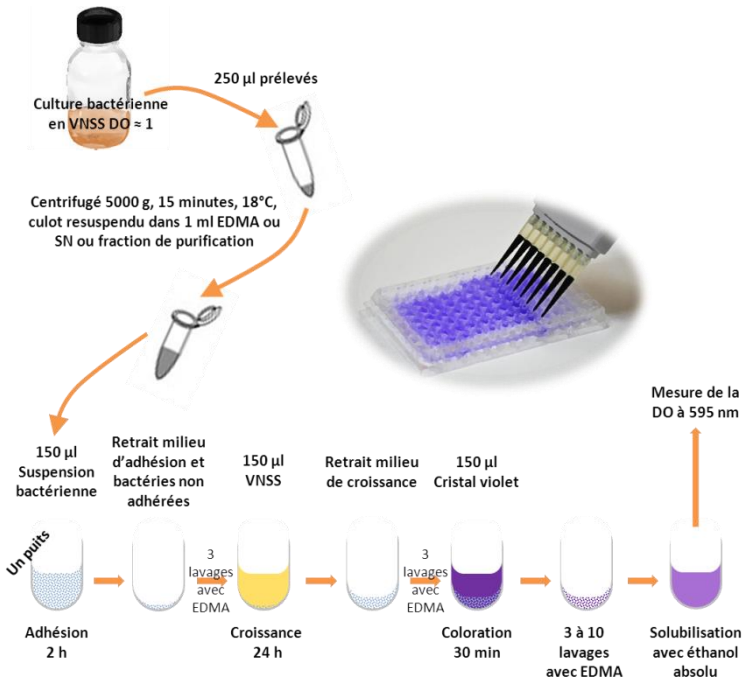


Figure 15. Schéma du protocole de bioessai en microplaque 96 puits associé à une coloration au cristal violet

Un volume de 150 µl d'EDMA stérile est distribué dans les 12 puits de la première ligne de la microplaque (A1 – L1). Puis 150 µl de la suspension bactérienne en EDMA sont distribués dans 6 puits (A2 – A7) de la première colonne (Figure 16). Ensuite, chacune des suspensions bactériennes réalisées avec les composés à tester est distribuée dans les colonnes suivantes. La dernière ligne (A8 – L8) est laissée vide pendant la croissance du biofilm pour préparer un blanc de coloration au cristal violet. Un plan de microplaque type est présenté Figure 16, il est utilisé lorsque plusieurs dilutions d'une solution (surnageant, fraction de purification) sont testées sur une même bactérie. Un plan similaire est utilisé pour tester simultanément l'effet d'un surnageant sur 11 bactéries différentes (elles seront alors introduites à raison de une souche par colonne).

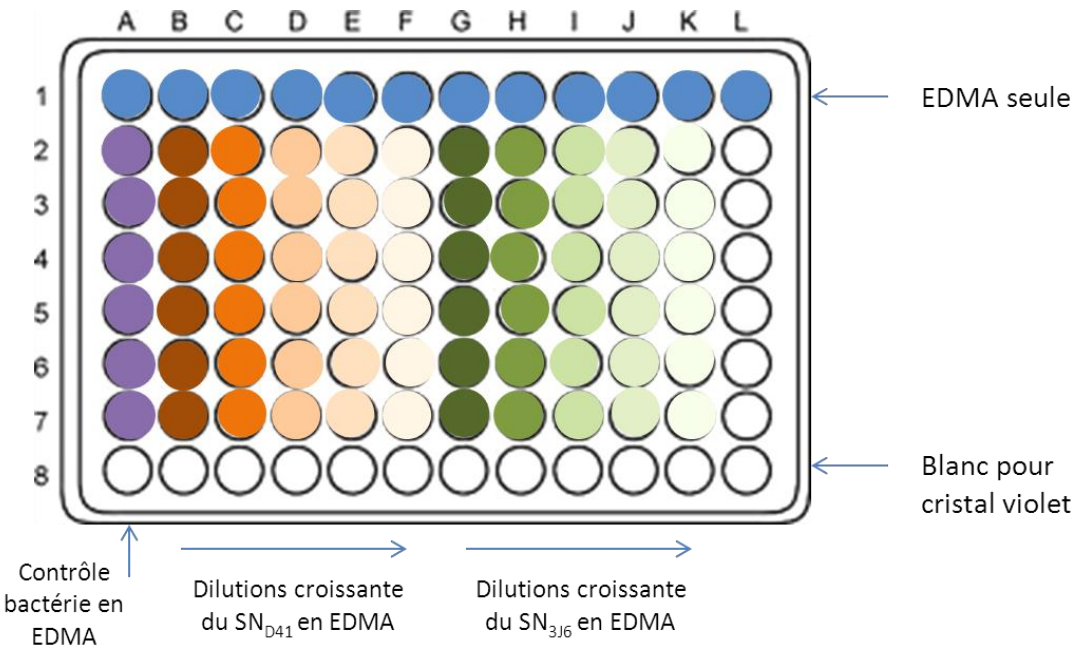


Figure 16. Plan de microplaque en vue de tester l'activité des surnageants bruts et de leurs dilutions sur la formation de biofilm d'une seule bactérie

Une fois ensemencée, la microplaque est couverte et incubée pendant 2 h à température ambiante sans agitation, c'est la phase d'adhésion. Puis, deux variantes de protocole sont utilisées selon si l'intérêt est d'observer l'effet sur l'adhésion ou sur la formation de biofilm.

⇨ *Effet sur l'adhésion bactérienne*

Les bactéries non adhérées sont éliminées par pipetage et les puits sont lavés 3 fois à l'EDMA stérile. Puis l'ADN des bactéries adhérées est coloré avec des marqueurs fluorescents pendant 10 min à l'obscurité par ajout de 50 µl par puits d'une solution contenant du Syto 61 red et du Sytox green :

- Syto 61 red (Molecular probes) : coloration en rouge de la totalité des bactéries, excitation à 633 nm, émission de 645 à 700 nm, concentration injectée de 5 µM en EDMA ;
- Sytox green (Molecular Probes) : coloration en vert des bactéries ayant une membrane poreuse, soit considérées comme non viables, excitation à 488 nm, émission de 500 à 550 nm, concentration injectée de 0,5 µM en EDMA.

L'excès de fluorochrome est éliminé par 3 lavages successifs en EDMA stérile à l'aide d'une pipette à 8 canaux. Les bactéries ainsi marquées sont observées en microscopie à épifluorescence inversée.

⇨ *Effet sur la formation de biofilm*

Les bactéries non adhérées sont éliminées par pipetage et les puits sont lavés 3 fois à l'EDMA stérile. Puis 150 µl de milieu de culture VNSS sont distribuées dans les puits A1 à L7 car la dernière ligne doit rester vide (blanc de coloration de la microplaque). La microplaque est fermée et incubée pendant 24 h à 25°C.

Le milieu de culture et les bactéries planctoniques restantes sont éliminés par trois lavages successifs à l'EDMA stérile. Les lavages sont effectués manuellement : la microplaque est renversée, 150 µl d'EDMA stérile est distribué par puits à l'aide d'une pipette à 8 canaux et la microplaque est à nouveau renversée. Ensuite, 150 µl de cristal violet à 0,5 % (v/v) sont distribués dans tous les puits, y compris la dernière ligne. Le cristal violet est une petite molécule (Figure 17) qui diffuse à travers les membranes bactériennes et pénètre à l'intérieur des bactéries pour se complexer aux molécules chargées négativement.

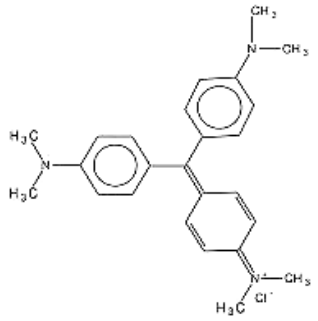


Figure 17. Cristal violet (www.sigmaaldrich.com)

La microplaque est incubée pendant 30 min à température ambiante. L'excès de cristal violet est éliminé par 3 à 10 lavages manuels successifs à l'eau milliQ, car les sels font précipiter le cristal violet. Le colorant ayant pénétré les bactéries en biofilm est alors solubilisé par ajout de 150 µl par puits d'une solution d'éthanol absolu, y compris dans la dernière ligne qui sert de blanc de coloration car le cristal violet colore aussi légèrement le

plastique de la microplaque. La coloration est alors proportionnelle à la quantité de bactéries s'étant développé dans chaque puits (Figure 18).

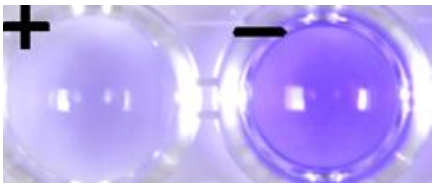


Figure 18. Photographie de deux puits de microplaque après adhésion de Vibrio sp. D02, formation de biofilm, coloration et distribution d'éthanol. + : un effet antibiofilm du composé mélangé à la suspension bactérienne est observé, – : biofilm de contrôle.

La concentration en colorant est mesurée à 595 nm de longueur d'onde avec le lecteur de microplaque Synergy™ HT Multi-Mode (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA), relié au logiciel d'analyses de données KC4™ (BioTek Instruments, Inc., Vermont, USA).

Paramètres variables lors des mises au point et optimisations

Le protocole décrit plus haut a été élaboré au début de ces travaux et a nécessité certaines mises au point pour définir les conditions optimales d'expérimentations tout en construisant un essai simple et rapide. Plusieurs paramètres ont été testés :

- L'agitation : 200 rpm, 300 rpm ou sans agitation ;
- Le temps de formation des biofilms : 24 ou 48 h ;
- La fixation des biofilms avant coloration : au méthanol, au formaldéhyde 2,5 % ;
- La concentration en cristal violet à distribuer : 0,1 ou 0,5 ou 1 % ;
- Les fluorochromes à utiliser lors de l'observation de l'effet des composés antibiofilm sur l'adhésion bactérienne : le kit BacLight (mélange de Syto 9 et d'iodure de propidium) ou le mélange Syto 61 red/Sytox green.

Quantification de l'inhibition de la formation de biofilm et statistiques

Le pourcentage d'inhibition de la formation de biofilm (PI) est calculé selon Eq 1. C'est la comparaison entre les DO_{595} des puits blancs sans bactéries (B), des puits de contrôle sans molécule antibiofilm (C) et enfin avec les puits contenant les molécules antibiofilms (S).

Eq 1 $$PI = \frac{(C-B)-(S-B)}{C-B} * 100$$

Les écart-types des PI sont calculés à l'aide d'un programme Matlab® (programme réalisé spécialement par Zakoua Guedes de RDT-HO) à partir des 6 réplicats du contrôle et des 6 réplicats de la suspension testée. Les études statistiques (test de *Student*) ont été réalisées à l'aide du logiciel avec un niveau de significativité fixé à 95 % (p << 0,05). Les graphiques présentés dans les résultats sont réalisés avec Microsoft® Office Excel et incluent les écart-types calculés.

2.1.5.3 BIOFILMS EN CONDITIONS DYNAMIQUES : CROISSANCE EN CHAMBRE EN FLUX

2.1.5.3.1 PREPARATION DU SYSTEME

La formation de biofilm a été étudiée en conditions dynamiques grâce à un système comprenant des chambres d'adhésion en flux (Figure 19, design copyright DTU-Biosys, Pamp et al. 2008).

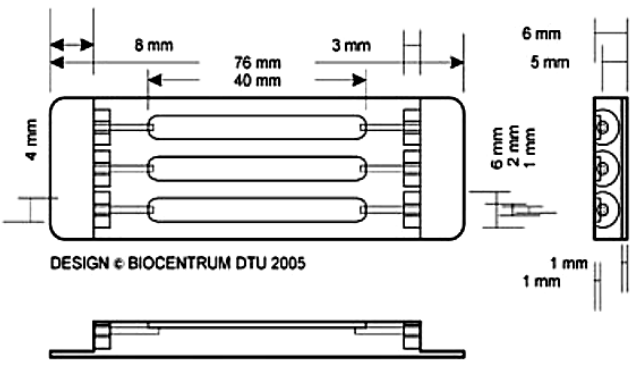


Figure 19. Schéma des chambres d'adhésion en flux (Pamp et al. 2008)

Les chambres en flux utilisées présentent 3 canaux indépendants de 1x40x4 mm et permettent l'écoulement d'un flux laminaire. La base formant les canaux est en polystyrène et est recouverte d'une lamelle de verre collée au silicone au minimum 24 h avant l'utilisation du système (Figure 20). Les canaux sont ainsi isolés les uns des autres.

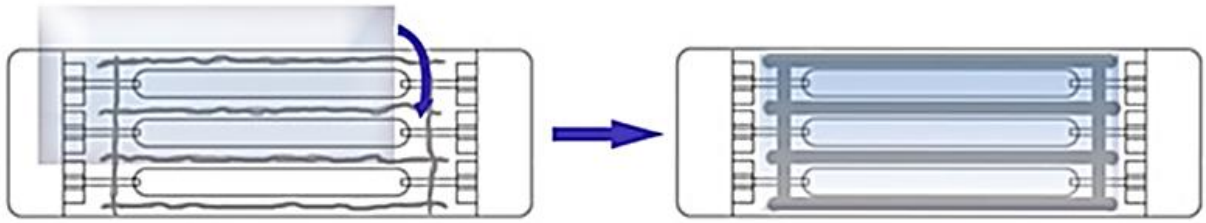


Figure 20. Collage au silicone de la lamelle de verre fermant les chambres d'adhésion

Une fois les chambres préparées, le système est monté comme indiqué Figure 21. Il est à noter que des pièges à bulles sont positionnés en amont des chambres pour empêcher d'éventuelles bulles d'air d'entrer dans les canaux de la chambre en flux et de détruire l'architecture 3D des biofilms. Toutes les expérimentations ont été réalisées dans une pièce thermostatée à 21 ± 1°C.

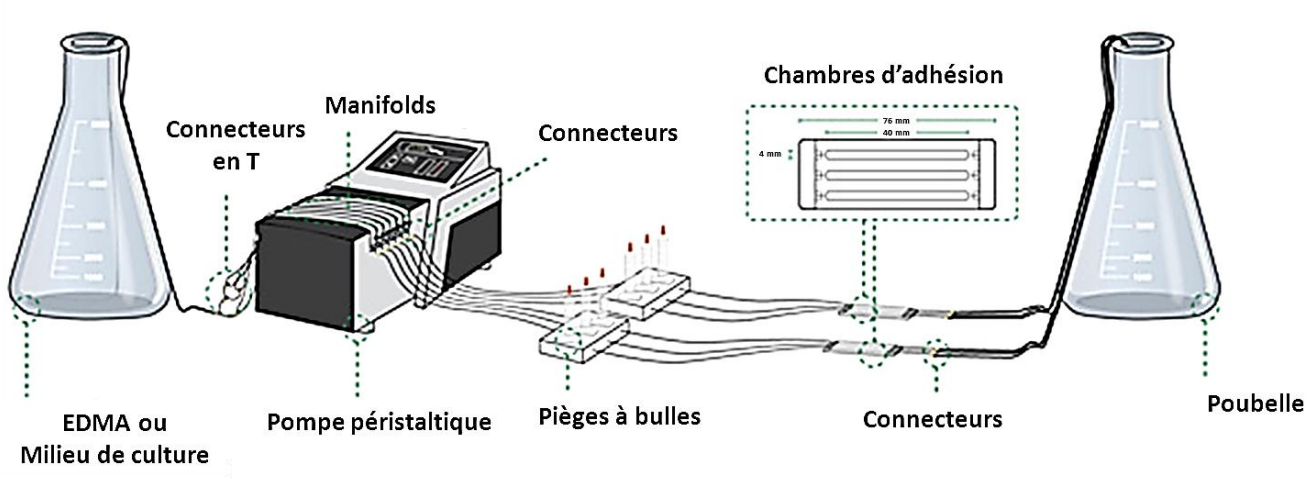


Figure 21. Schéma du montage permettant la croissance bactérienne en conditions dynamiques (Weiss Nielsen et al. 2011)

L'EDMA est utilisée comme milieu d'adhésion dans les contrôles. Les tubes sont raccordés de façon stérile à proximité d'un bec bunsen électrique. L'EDMA est pompée à 2,5 ml/h par une pompe péristaltique Watson and Marlow 205S jusqu'au remplissage du système. Puis le flux est stoppé par arrêt de la pompe et le volume est stabilisé dans la chambre par clampage du tube juste en amont de celle-ci.

2.1.5.3.2 PHASE D'ADHESION BACTERIENNE DANS LES CHAMBRES EN FLUX

Chacune des suspensions bactériennes préalablement préparées suivant le protocole décrit précédemment est aspirée dans une seringue de 1 ml et est injectée après le clamp amont, à l'entrée d'un canal de la chambre. L'injection doit être réalisée en perçant le tube de silicone sans introduire de bulle, les trous sont ensuite rebouchés par de la colle de silicone (3M). Une fois les bactéries dans les canaux, les clamps en aval des chambres à flux sont fermés à leur tour. Les chambres d'adhésion sont retournées afin de permettre aux bactéries d'adhérer à la lamelle de verre couvrant les canaux des chambres d'adhésion. L'adhésion est réalisée ainsi en conditions statiques pendant 2 h à 20°C.

Après cette phase d'adhésion bactérienne, les erlenmeyers d'EDMA sont remplacés par des erlenmeyers de milieu VNSS en tête de système ; ce changement est réalisé à proximité d'un bec bunsen électrique pour conserver la stérilité du système. Les clamps en amont et en aval des chambres d'adhésion sont ouverts et le flux rétabli à une vitesse relative de 0,5 ml/h pendant 15 min afin d'éliminer les bactéries restées planctoniques et d'amener le milieu de culture jusqu'aux chambres. Après ces 15 min, l'intérieur des chambres est observé en contraste de phase en microscopie confocale à balayage laser TCS-SP2 (MCBL, Leica Microsystems, Heidelberg, Allemagne) avec un objectif à immersion de grossissement X63.

2.1.5.3.3 PHASE DE CROISSANCE DES BIOFILMS

Une fois les observations préliminaires réalisées, un flux laminaire de milieu de culture VNSS est établi à 0,2 ml/h pendant 48 h à 20°C. Les biofilms formés sont ensuite colorés et observés comme suit.

Le flux est interrompu et les clamps sont fermés en amont des chambres. Un volume de 1 ml d'une solution de fluorochromes est très doucement injecté à la seringue dans les canaux des chambres d'adhésion. Les clamps en aval des chambres sont alors fermés et le système est laissé pendant 15 min à température ambiante et surtout à l'obscurité afin d'éviter toute détérioration des fluorochromes. Les fluorochromes utilisés sont des marqueurs d'ADN, le Syto 61 red et le Sytox green (décrits précédemment).

Après les 15 min de coloration, les biofilms formés dans les canaux sont observés au microscope confocal à balayage laser (MCBL), avec un objectif à immersion X63. Les canaux sont observés dans toute leur longueur pour pouvoir évaluer l'hétérogénéité du biofilm formé, puis 5 photographies sont prises à intervalle régulier le long du canal. Pour chaque prise de vue, un même champ est pris en photographie sur des plans différents, chacun espacé de 1 µm. Les photographies de tous les plans sont regroupées en « stack ». Chaque photographie peut être traitée, indépendamment des autres ou alors toutes les photos d'un même « stack » peuvent être rassemblées afin d'obtenir des images tridimensionnelles des biofilms.

Les images réalisées sont des prises de vues brutes qui nécessitent un traitement pour être exploitables. La première étape est effectuée directement par le logiciel de pilotage du MCBL Leica Confocal® ; celui-ci permet de reconstituer une image en 3D du biofilm à partir des images prises en z. Il est également possible de changer de point de vue et d'obtenir des images de coupe, des sections et des effets d'ombres avec ce logiciel.

Puis vient la seconde étape, tous les fichiers de chaque photo sont analysés par les logiciels COMSTAT® ou COMSTAT2® (Heydorn et al. 2000). Ils permettent de calculer les épaisseurs maximales et moyennes (exprimées en µm), ainsi que la biomasse bactérienne (exprimée en $\mu m^3/\mu m^2$ de surface sur laquelle le biofilm est formé) totale et relative à chaque colorant. Nous pouvons ainsi connaître le pourcentage de bactéries viables au sein des biofilms. Les

mesures de biomasse des biofilms sont utilisées pour calculer le pourcentage d'inhibition (PI, Eq 2) des biofilms lorsqu'ils ont été mis en présence d'un composé antibiofilm.

Eq 2 $$PI = \frac{\text{biomasse sans surnageant} - \text{biomasse avec surnageant}}{\text{biomasse sans surnageant}} * 100$$

Les biofilms formés en chambres d'adhésion sont présentés après reconstruction des images en z de microscopie confocale à balayage laser en 3D avec les ombres, et en coupes (transversales et longitudinales). Les PI calculés à partir des biomasses mesurées sont reportées en tableau, et l'erreur type est calculée de la même façon que précédemment par un programme Matlab® (programme réalisé par Zakoua Guedes de RDT-HO).

2.1.6 RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE SN_{3J6} ET SN_{D41}

2.1.6.1 EN MILIEU LIQUIDE

L'activité antibactérienne des SN_{3J6} et SN_{D41} a été évaluée vis-à-vis de bactéries planctoniques en solution. La méthode (Figure 22) consiste à incuber des bactéries (en phase stationnaire de croissance) en VNSS, pour le contrôle, et en présence de SN_{3J6} et SN_{D41}, pour tester les composés, pendant 10 min, 30 min, 2 h ou une nuit à 4°C. Puis les suspensions bactériennes sont diluées au 1/10e et étalées sur des géloses de VNSS. Les unités formant colonie (UFC) sont ensuite dénombrées. Ces dénombrements bactériens permettront de déterminer si les SN_{3J6} et SN_{D41} ont un effet significatif par rapport au contrôle.

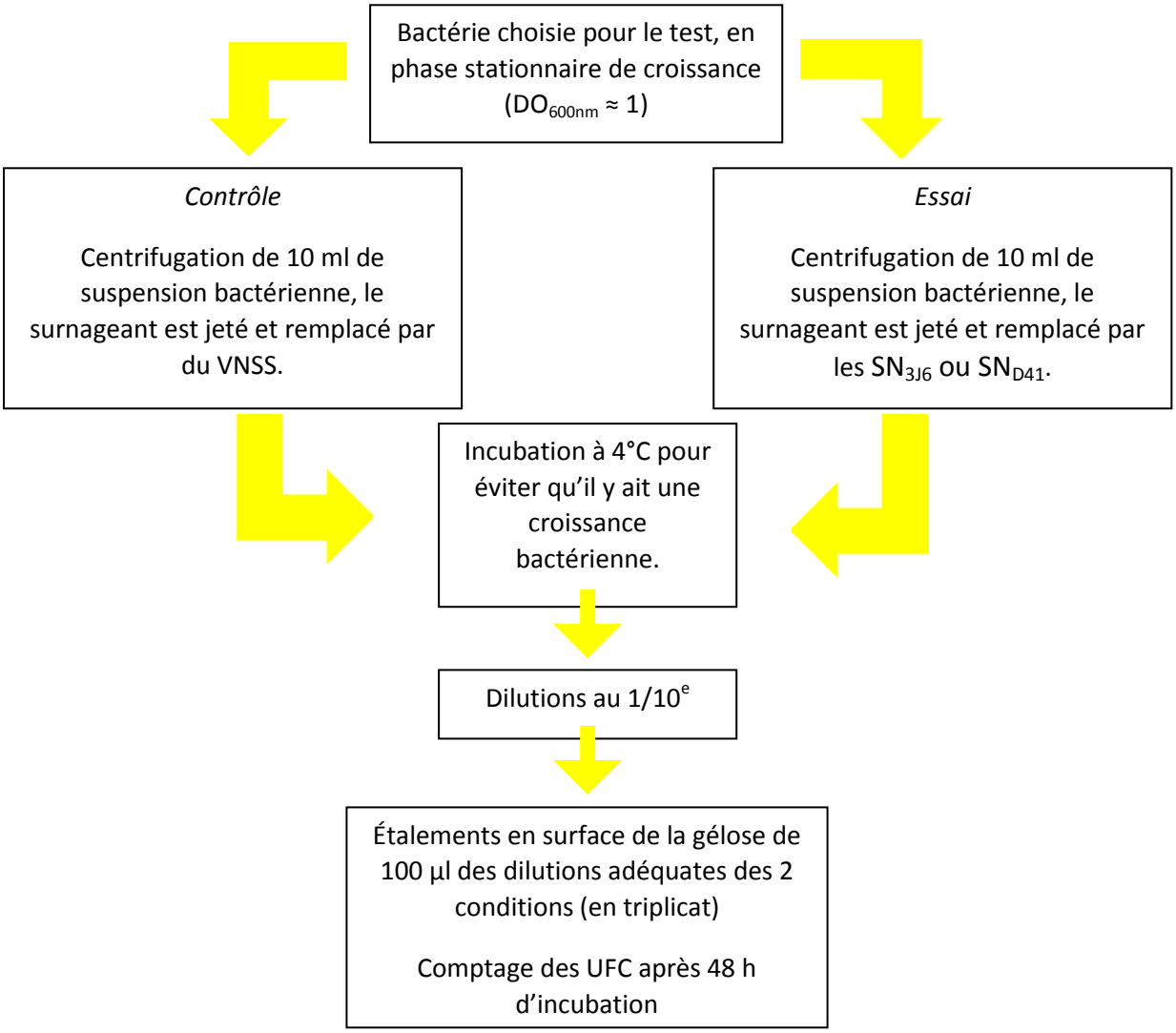


Figure 22. Méthode mise en place pour l'évaluation de l'activité antibactérienne en milieu liquide

2.1.6.2 EN MILIEU SOLIDE

L'activité antibactérienne des SN_{3J6} et SN_{D41} a été recherchée par diffusion sur gélose.

Des colonies bactériennes de *Vibrio* sp. D02, *Paracoccus* sp. 4M6 et *Algibacter* sp. 1M6 sont prélevées sur une gélose, et suspendues en EDMA stérile de façon à obtenir une concentration bactérienne de 10^8 cellules/ml. Puis l'ensemencement des géloses d'antibiogramme (VNSS agar) est réalisé par inondation, 5 ml de suspension bactérienne sont déposés en surface, l'excédent est réaspiré et jeté alors que la boîte est mise à l'envers pendant 15 minutes à 25°C (température optimale des bactéries marines utilisées). Des

disques de cellulose de 6 mm de diamètre sont déposés à la surface de la gélose, puis 20 µl d'antibiotique (streptomycine (Str) à 1 mg/ml, ampicilline (Amp) à 1mg/ml, kanamycine (Kn) à 1 mg/ml, chloramphénicol (Cm) à 1 mg/ml)) ou de SN_{3J6} ou SN_{D41} sont déposés sur le disque. Puis les boîtes sont incubées pendant 24 à 48 h selon la bactérie utilisée pour l'ensemencement et les halos d'inhibition de croissance sont mesurés autour des disques après incubation.

2.1.7 ETUDE DE LA STABILITE DES MOLECULES ANTIBIOFILM

2.1.7.1 A LA TEMPERATURE

Pour vérifier la stabilité des molécules antibiofilm, un test à la chaleur a été mis en œuvre. Un volume de 10 ml de surnageant est plongé pendant 1 minute dans un bain-marie à 50°C, 60°C, 70°C ou 100°C. Puis l'activité antibiofilm des surnageants est alors évaluée en microplaque 96 puits sur *Algibacter* sp. 1M6 pour SN_{3J6} et *Vibrio* sp. D02 pour SN_{D41}. Le maintien de l'activité antibiofilm dans le temps à basse température est aussi évalué en vue de la conservation des composés. Des aliquotes de 10 ml de SN_{3J6} et SN_{D41} bruts ont été conservés à 4°C, -20°C et -80°C (congélation directe et décongélation à 4°C). Puis chaque mois, pendant 1 an, l'activité sur la formation de biofilms de ces surnageants a été testée en microplaque 96 puits sur *Algibacter* sp. 1M6 pour SN_{3J6} et sur *Vibrio* sp. D02 pour SN_{D41}.

2.1.7.2 EN PRESENCE DE DIMETHYLSULFOXYDE

Le diméthyle sulfoxyde (DMSO) est un solvant généralement utilisé pour la préparation de solutions de stockage, notamment de protéines. Pour évaluer l'influence du DMSO sur les SN_{3J6} et SN_{D41}, ce composé a été ajouté à du surnageant brut pour des concentrations finales de 0,01 %, 0,1 %, 1 % et 10 %. Puis l'activité antibiofilm de ces solutions a été évaluée en microplaque 96 puits.

2.1.7.3 EN PRESENCE D'ENZYME PROTEOLYTIQUE

Les surnageants ont été incubés pendant 1 h à 37 °C avec de la protéinase K à 1 mg/ml (Sigma Aldrich). Puis l'activité antibiofilm de ces solutions a été évaluée en microplaque 96 puits. Un contrôle est réalisé en traitant du VNSS avec la protéase, le but est de vérifier que la protéase ajoutée n'a pas d'effet sur la formation de biofilm des bactéries choisies pour l'essai.

2.2 BIOCHIMIE : EXTRACTION, PURIFICATION, CARACTERISATION DES MOLECULES ACTIVES

Les composés antibiofilm doivent être purifiés pour permettre leur identification. Les purifications suivent un protocole général en trois grandes étapes présentées Figure 23.

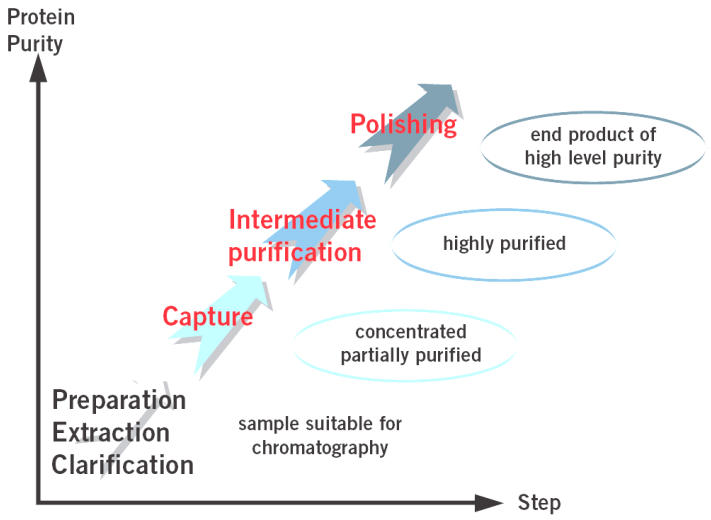


Figure 23. Diagramme détaillant les étapes d'un protocole de purification d'un échantillon contenu dans un mélange (Amersham Purification Guide)

La première étape d'une purification est la capture de la ou des molécules d'intérêt. Cette étape permet de concentrer rapidement les composés à partir de grands volumes (jusqu'à 1 L), de stabiliser et d'isoler les composés d'une grande partie des contaminants du milieu. La deuxième étape peut regrouper plusieurs sous-étapes appelées purifications intermédiaires. Ces étapes ont pour but d'éliminer tous les contaminants de la solution et de concentrer en

une fraction la plus pure possible les composés d'intérêt. La troisième et dernière étape est le polissage. Il consiste en l'élimination des dernières traces de contaminants et de variants structurels, le but étant d'obtenir un produit final de haute pureté.

2.2.1 TECHNIQUES D'EXTRACTION

Plusieurs techniques d'extraction ont été utilisées pour tenter de réaliser une séparation préliminaire des composés antibiofilm du mélange complexe qu'est un surnageant brut. Cette étape peut être nécessaire pour préparer les échantillons à une purification par chromatographie.

Trois techniques ont été utilisées sur les SN_{3J6} et SN_{D41} : l'ultrafiltration, la précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) ou au sulfate d'ammonium, et l'extraction liquide-liquide avec des solvants organiques.

2.2.1.1 ULTRAFILTRATION

L'ultrafiltration (UF) est une technique de séparation d'éléments contenus dans un liquide qui utilise des membranes semi-perméables dont le diamètre des pores est inférieur à 0,1 µm. Cette technique a été utilisée avec deux dispositifs différents selon la quantité d'échantillon de départ :

- Pour les surnageants bruts (volumes supérieurs à 2 litres) : module d'ultrafiltration Millipore Pellicon à cassettes contenant des membranes avec des seuils de coupure de 100 kDa ou 10 kDa (Figure 24). La solution est amenée à la surface de la cassette par une pompe péristaltique. Les molécules de masse supérieure au seuil de coupure de la membrane sont récupérées dans le rétentat. Les molécules de masse inférieure au seuil de coupure de la membrane sont récupérées dans le perméat.

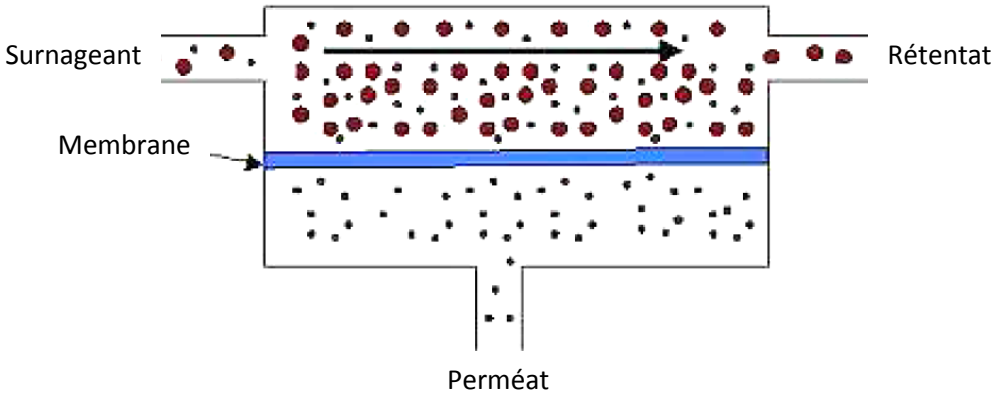


Figure 24. Principe de l'ultrafiltration (ARIST Bourgogne)

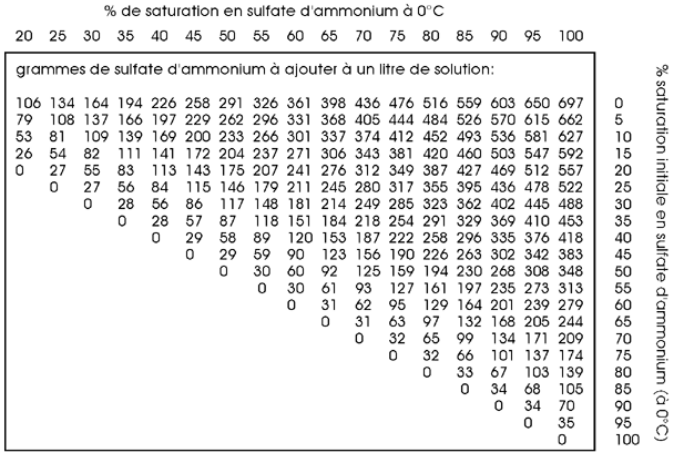
- Pour le dessalage et la concentration des fractions de purification (petits volumes inférieurs à 100 ml) : Tubes d'UF Vivaspin 20 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). C'est une microconcentration par centrifugation. Des seuils de coupure de 50 ou 100 kDa ont été utilisés avec une centrifugation à 10000 g pendant 15 min à 4°C, dans le but de fractionner la solution. Egalement utilisé, un seuil de coupure de 3 kDa (centrifugation à 8000 g pendant 120 min à 4°C) permet le dessalage et la concentration des fractions de séparation.

2.2.1.2 PRECIPITATIONS AU TCA ET AU SULFATE D'AMMONIUM

La première approche consiste à mettre une solution contenant des protéines en présence de TCA d'une concentration en TCA de 5 % (v/v). La solution mère de TCA est préparée à 100 % (v/v) pour conserver la stabilité de l'acide. Un volume de 50 ml de surnageant est incubé pendant 10 min en présence de TCA à 4°C, puis centrifugé pendant 15 min à 5000 g, 4°C. Le culot est lavé 3 fois à l'éther puis est resuspendu dans du PBS.

La seconde approche est une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Cette méthode est relativement peu spécifique et s'applique bien à de grands volumes. C'est une méthode qui a l'avantage de peu dénaturer les protéines précipitées. Elle est basée sur l'effet du salting-out, les protéines précipitent pour des forces ioniques (donc des concentrations en sels) données. Plusieurs concentrations en sels ont été testées. Un même

surnageant est réparti en 10 tubes de 10 ml. Dans chacun de ces tubes, une quantité croissante de sulfate d'ammonium a été ajoutée de 10 à 100 % de saturation en sels (Figure 25).



% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C

20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

Figure 25. Tableau de correspondance entre la quantité en masse de sels de sulfate d'ammonium et le volume de solution pour obtenir le pourcentage de saturation désiré (Usherbrook, Canada).

Les tubes sont agités pendant 1 h dans la glace puis centrifugés à 5000 g pendant 15 min. Les surnageants sont récupérés et les culots sont resuspendus dans du PBS. Chaque échantillon est dessalé par ultrafiltration sur une membrane avec un seuil de coupure de 3 kDa. Les rétentats sont alors resuspendus dans du PBS. L'activité des solutions ainsi obtenues (surnageants et rétentats) est testée en microplaque 96 puits.

2.2.1.3 EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

L'extraction liquide-liquide est réalisée par ajout d'un volume d'acétate d'éthyle au surnageant brut. La solution diphasique est alors mélangée en ampoule dont le volume est égal à 2 ou 3 fois le volume à extraire, la séparation des phases est obtenue par décantation gravimétrique (Figure 26).

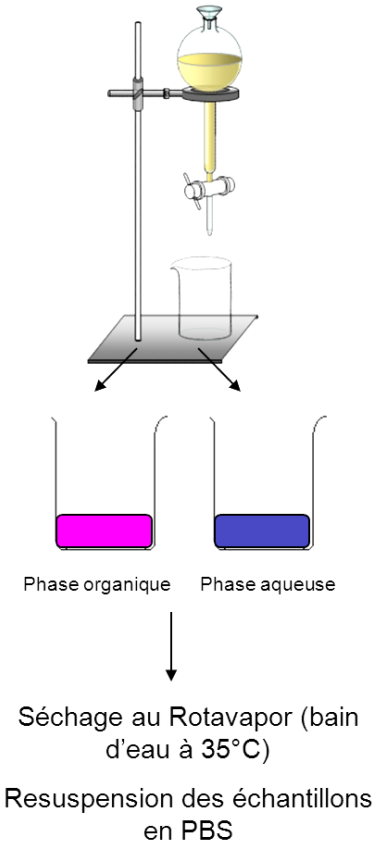


Figure 26. Schéma du montage d'extraction liquide-liquide et rappel bref du protocole de séparation.

Le solvant de la phase organique est évaporé au rotavapor avec un bain d'eau à 35°C, puis le précipité obtenu a été resuspendu dans du PBS. Les résidus de solvant restant dans la phase aqueuse sont également évaporés au rotavapor. L'activité antibiofilm de chaque phase est ensuite évaluée en microplaque 96 puits.

2.2.2 TECHNIQUES DE PURIFICATION

2.2.2.1 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE EN PHASE INVERSE C18

C'est une chromatographie d'adsorption liquide-solide. La phase stationnaire est constituée de silice apolaire greffée par une chaîne aliphatique à 18 carbones. La phase mobile utilisée, polaire et hydrophile, est l'acétonitrile (ACN). La séparation est basée sur des interactions

hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire. Ainsi plus le composé à purifier est apolaire, plus il sera retenu par la phase stationnaire. A l'inverse, plus le composé est polaire et hydrophile, plus il sera entraîné par la phase mobile liquide.

Les colonnes de chromatographie utilisées pour ce protocole sont des Sep-Pak® Plus C18 (WATERS Corporation, Milford, MS, USA). Ces colonnes sont montées à l'extrémité d'une seringue. Pour chaque fractionnement, les composés contenus dans 500 ml de surnageant sont déposés sur la colonne. Au cours de ce fractionnement, les composés non retenus lors du dépôt de l'échantillon sont récupérés pour des tests d'activités ultérieurs. Suite au dépôt d'échantillon, la colonne est rincée trois fois avec 10 ml d'eau milliQ, chaque éluat est conservé. Puis les composés sont élués par paliers de 5 ml avec des solutions de concentrations croissantes en ACN (ε_0 = 0,95) dans de l'eau milliQ (ε_0 = 0,35). Les concentrations en ACN des solutions d'élution vont de 5 % d'ACN à 100 %, tous les 5 %. Les fractions collectées sont lyophilisées et les poudres sont resuspendues en PBS pour les dosages de leur activité antibiofilm et concentration en protéines.

2.2.2.2 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE D'ECHANGE D'ANIONS

Les surnageants sont aussi purifiés par chromatographie échangeuse d'anions. C'est une purification selon la charge des molécules. La phase stationnaire est constituée d'agarose greffé avec un groupement $-N^+(CH_3)_3$. La phase mobile utilisée est un tampon Tris HCl (pH 7,8) additionné de NaCl de 0,1 à 1 M. La séparation est basée sur des interactions ioniques entre les molécules à séparer, la phase stationnaire et les ions Cl^- contenus dans le tampon. Ainsi plus le composé à purifier est anionique, plus il sera retenu par la phase stationnaire et nécessitera une forte concentration en NaCl pour être entraîné par le tampon.

Le montage utilisé est constitué d'une pompe péristaltique alimentant une colonne HiTrap Q FF (1 ml, GE Healthcare, CN, USA) équilibrée avec un tampon A (Tris HCl 20 mM, pH 7,8), par des tubes en silicone (Tygon, 2,06 mm de diamètre). L'élution est réalisée à un débit de 1 ml/min avec des solutions de concentration croissante en NaCl (0,1 à 1 M) dans le

tampon A. L'absorbance de chaque fraction récoltée est mesurée à 280 nm. Des fractions de 2 ml sont collectées lors de la mise au point de la méthode et pour identifier les concentrations en NaCl nécessaire à l'élution des fractions présentant une activité antibiofilm. Par la suite des fractions de 10 ml sont collectées pour chacune des concentrations en NaCl éluant une activité. Les fractions présentant un effet antibiofilm sont concentrées 50 fois et dessalées sur membrane d'ultrafiltration à 3 kDa pour réaliser les électrophorèses et les purifications suivantes.

Les fractions collectées suite à la séparation sont nommées AIEX-[NaCl] (par exemple, la fraction éluée lors de l'application de NaCl 0,4 M sera nommée AIEX-0,4).

2.2.2.3 CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL

Après la concentration et le dessalage des fractions actives obtenues par chromatographie en phase inverse ou d'échange d'anions, la purification est poursuivie par une séparation par chromatographie de filtration sur gel. Cette technique est très efficace, mais nécessite une forte concentration et un faible volume de matériel de départ car les molécules sont diluées le long de la colonne, ce qui réduit la qualité de leur séparation.

Il s'agit ici d'une séparation des composés selon leur taille en utilisant un tamis moléculaire. Les grosses molécules sortent en premier et les autres sont retardées proportionnellement à leur encombrement stérique par leurs interactions avec les billes de la phase stationnaire. La colonne utilisée contient une résine dextran Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare, CN, USA) montée sur un système Äkta™ FPLC™ couplé à un détecteur de conductivité et un moniteur UPC-900 de mesure d'absorbance à 280 nm et de température. Le système est piloté par le logiciel UNICORN™ 6.0. Un volume de 500 µl d'échantillon est injecté sur la colonne et l'élution est réalisée avec un débit de 0,5 ml/min de PBS en mode isocratique.

La calibration en poids moléculaire est faite par l'injection de 500 µl d'un mélange de BSA (67 kDa, 2,5 mg) et de cytochrome C (13,6 kDa, 1 mg) puis l'injection de 500 µl d'un mélange aprotinine (6,5 kDa, 1,5 mg), alcool déshydrogénase (149,5, 2,5 mg) et d'anhydrase carbonique (30 kDa, 1 mg). Les temps de rétention de ces différentes molécules permettent,

par corrélation, de déterminer le poids moléculaire des différents composés des fractions séparées. L'activité antibiofilm des fractions collectées est évaluée par le test en microplaque 96 puits.

2.2.2.4 CALCUL DU TAUX DE PURIFICATION

La pureté d'une préparation de protéines est exprimée par son activité spécifique. L'activité des fractions de purification est calculée à partir de la concentration minimale d'inhibition des biofilms. L'activité est donc le produit de l'inverse de la dernière dilution active par le volume déposé dans le puits pour l'essai en microplaque, soit 150 µl. Le résultat est multiplié par 6,67 (pour passer d'un volume de 150 µl à 1 ml) pour établir des valeurs en UA/ml. L'activité spécifique est l'activité par rapport à la quantité totale des protéines dans la préparation. Elle est généralement exprimée en unités (enzymatiques ou arbitraires) par mg de protéines totales. Plus l'activité spécifique est élevée, plus la protéine est pure.

La concentration en protéines totales est obtenue par la méthode de Bradford (Bradford 1976, cf. paragraphe 2.2.4 plus loin). Enfin, le taux de purification est le rapport de l'activité spécifique des fractions de purification avec l'activité spécifique initiale de l'échantillon.

2.2.3 ANALYSE DES FRACTIONS DE PURIFICATION

2.2.3.1 ELECTROPHORESE SDS-PAGE

L'absorption UV et les méthodes colorimétriques utilisées tout au long de la purification donnent respectivement une indication de la présence ou non de protéines et leur concentration. Il est cependant important de connaître la complexité des fractions et de suivre la disparition des contaminants. Un critère utile des composés d'intérêts outre la taille est la charge.

Le gel utilisé est un gel pré-coulé discontinu comprenant un gel de séparation à gradient de polyacrylamide de 4 à 20 % (Precise™ Protein gel, Pierce Biotechnology, Inc., USA) surmonté d'un gel de concentration. Le système utilisé est une cuve Mini-PROTEAN™ Tetra cell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Le protocole suit plusieurs étapes :

- Tampon de séparation 1X : 12,1 g Tris base, 23,8 g HEPES, 1 g SDS, qsp 1 Litre d'eau milliQ ;
- Préparation des échantillons : 30 µl de fraction concentrée à 0,5 mg/ml sont incubés à 100°C pendant 3 minutes puis 10 µl de tampon de charge 4X (2,4 ml Tris 1M pH 6,8, 0,8 g SDS, 4 ml glycérol 100 %, 1 ml β-mercaptoethanol, 0,01 % Bleu de bromophénol C250, 2,8 ml d'eau milliQ, Laemmli 1970) sont ajoutés, ce mélange est incubé à 100°C pendant 3 minutes ;
- Dépôt des marqueurs et des échantillons dans chaque puits : 5 µl de marqueur (Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers 12000-225000 Da, GE Healthcare) à chaque extrémité et 20 µl d'échantillon dans les autres puits.
- Migration : les conditions sont fixées comme recommandées par le fournisseur avec une intensité de 100 mA pendant les 10 premières minutes puis une séparation à une intensité de 60 mA.

Après la migration, les gels sont colorés soit au bleu de Coomassie soit au nitrate d'argent.

2.2.3.1.1 COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE

La première coloration utilisée, au bleu de Coomassie, est la plus rapide à mettre en œuvre. Cependant elle a un seuil de détection de l'ordre de 100 ng. L'avantage de cette coloration est qu'elle permet le séquençage des protéines marquées.

Le gel est placé dans une boîte sur un agitateur orbital et agité doucement dans une solution de pré-coloration (200 ml méthanol, 50 ml acide acétique, 250 ml eau milliQ) pendant 20 minutes, puis dans une solution de coloration (180 ml méthanol, 36,5 ml acide acétique, 1 g de Coomassie brilliant blue G-250, 183,2 ml d'eau milliQ) pendant 30 minutes. Le gel est rincé 3 fois dans la solution de décoloration (250 ml méthanol, 100 ml acide acétique, 650 ml

d'eau milliQ) jusqu'à la visualisation de bandes (environ une nuit). Enfin le gel est rincé dans de l'eau milliQ, scanné et placé dans un bain de solution de fixation (50 ml acide acétique, 450 ml d'eau milliQ) où il est conservé à 4°C.

2.2.3.1.2 COLORATION AU NITRATE D'ARGENT

La deuxième coloration utilisée au nitrate d'argent est plus sensible (de l'ordre du ng) mais est plus longue en temps et ne permet pas de séquencer les protéines marquées.

Le gel est placé dans un bain de fixateur (500 ml méthanol, 500 ml eau milliQ, 1 ml formaldéhyde 37 %) pendant 3 h de façon à fixer les protéines et pour que le fond du gel soit blanc après le développement. Puis le fixateur est remplacé par une solution de Dithiothréitol (DTT) (90 µl DTT 0,1M, 250 ml d'eau milliQ) pendant 30 minutes ; ce bain permet au gel de reprendre en volume. Ensuite le gel est incubé dans une solution de nitrate d'argent (0,2 g $AgNO_3$, 200 ml d'eau milliQ) pendant 10 min puis pendant 25 min sur l'agitateur orbital. Le gel est alors lavé dans 200 ml d'eau milliQ et plongé 2 fois rapidement dans 100 ml de solution de développeur (12 g Na_2CO_3, 400 ml eau milliQ, 200 µl formaldéhyde 37 %). Le gel est ensuite laissé dans un bain de 200 ml de développeur jusqu'à apparition de bandes marron/grise. La coloration est alors arrêtée en ajoutant 50 ml d'acide acétique dans le dernier bain de développeur. Le gel est agité doucement pendant 15 min jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulles dans la solution. Enfin le gel est rincé à l'eau milliQ et conservé dans un bain d'acide acétique à 10 %.

2.2.3.2 ANALYSES SPECTROMETRIQUES

Les surnageants bruts et les fractions de séparations ont tous subit des analyses spectrométriques en spectrométrie infra-rouge (IR), Raman, ou de masse. Les spectrométries optiques infra-rouge et Raman sont basées sur l'absorption des différentes liaisons chimiques à différentes longueurs d'ondes, ces liaisons vibrent sous l'effet d'un

laser. Les absorbances obéissent à la loi de Beer-Lambert permettant ainsi d'avoir des informations qualitatives et quantitatives selon l'intensité des pics.

2.2.3.2.1 LA SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE

Deux techniques ont été utilisées selon l'état de l'échantillon :

- Solide : acquisition d'un spectre IR en transmission avec un conditionnement en pastille de KBr ;
- Liquide : acquisition d'un spectre sur une platine ATR-Ge.

Lorsque les échantillons sont lyophilisés, il est possible de fabriquer des pastilles de KBr pour les analyses IR. Le KBr est utilisé le plus couramment car il est transparent jusqu'à 400 cm^{-1}, cependant il est hygroscopique. Les échantillons se chargent rapidement en eau si l'atmosphère est concentrée en vapeurs d'eau.

Pour préparer la pastille, 10 mg de poudre à analyser (ou de KBr pour le bruit de fond) sont mélangés avec 90 mg de KBr dans un mortier. Le mélange est finement broyé et déposé dans une presse hydraulique. L'échantillon est placé entre deux supports métalliques tenus dans le cylindre et une pression de 5 tonnes est appliquée. La formation de verre de KBr prend 1 à 2 min, à l'issue desquelles la pastille est placée dans un support adapté au spectromètre. Le spectre est alors enregistré en utilisant le logiciel de pilotage OMNIC (Thermo Fisher), on obtient un spectrogramme de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde, avec lequel les liaisons caractéristiques des molécules de l'échantillon sont déterminées.

Lorsque les échantillons sont des solutions concentrées, l'analyse en mode ATR-Ge est préférée. Ce mode fait intervenir la réflexion interne qui a lieu lorsque les radiations infrarouges pénètrent dans un cristal ATR dont le matériau, fortement réfractif, facilite la transmission infrarouge. Le cristal est prévu pour permettre une réflexion interne totale qui crée une onde évanescente à la surface de celui-ci. Cette onde pénètre dans l'échantillon gardé en parfait contact avec le cristal. L'analyse est réalisée sur un échantillon dont le volume recouvre totalement la platine ATR. Le spectre est enregistré en utilisant le logiciel OMNIC et affiche un spectrogramme de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

2.2.3.2.2 LA SPECTROSCOPIE RAMAN

Nous avons réalisé des analyses en spectrométrie RAMAN car elle présente plusieurs avantages par rapport à des analyses en IR. L'analyse des échantillons ne nécessite pas de préparation comme une lyophilisation car l'eau interfère peu en spectrométrie RAMAN. L'acquisition des spectres peut aussi être réalisée avec de faibles quantités d'échantillons (quelques µg ou µl). De plus les analyses ne sont pas toujours destructives. Cependant l'émission de fluorescence par les molécules des échantillons peuvent perturber les analyses. La source laser utilisée ici pour les analyses est un laser de 670 nm, et les échantillons sont conservés sous leur forme de solution concentrée. Des analyses ont été réalisées suite à une lyophilisation.

2.2.3.2.3 LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF

Cette technique est une méthode d'ionisation douce utilisant un faisceau laser pulsé pour désorber et ioniser un mélange de matrice-échantillon co-cristallisé et séché sur une surface métallique. Le solide résultant est alors irradié par des impulsions de laser par nanoseconde (Karas et Hillenkamp 1988).

Pour les composés des SN_{3J6}, SN_{D41} et des fractions de purification, la matrice utilisée est un dérivé de l'acide cinnamique (l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique). Cette matrice permet d'analyser de petites molécules biologiques et notamment des peptides. Cette matrice est très énergétique et donne généralement une sensibilité élevée.

Sur un substrat de métal, capable de contenir de un à 96 dépôts d'échantillon, sont déposés des volumes de 1 µl de matrice (α-cyano-4-hydroxycinnamique 14 mg/ml dilué dans ACN/eau 1/1 additionné de TFA à 0,1 % final). Les dépôts sont séchés, puis 1 µl d'échantillon est déposé et encore séché avant de finir par déposer encore 1 µl de matrice. Le dépôt, dit en « sandwich », est séché puis placé sur l'emplacement réservé dans le spectromètre MALDI-TOF (Bruker Microflex Daltonics). Ces dépôts sont alors irradiés par une impulsion laser, pour produire un court largage d'ions. L'acquisition est linéaire avec un voltage positif

regroupant 200 impulsions laser de courte durée (laser azote à 337 nm, pendant 3 ns) sur une fenêtre de 800 à 150000 m/z. Les ions libérés sont accélérés par une quantité fixe d'énergie cinétique et voyagent en bas d'un tube de vol. Les petits ions ont une vitesse plus élevée et sont enregistrés sur un détecteur avant les plus grands, produisant le spectre du temps de vol (TOF). La sensibilité de MALDI-TOF est de l'ordre de quelques parties par million de masse et une quantité minimum d'une femtomole de peptide est nécessaire pour produire un signal.

La gamme de masse inférieure à 500 daltons (Da) est souvent masquée par les ions matrices secondaires dans le MALDI, ce qui entraîne une perte de sensibilité. La calibration en masse est faite de façon externe par le dépôt d'1 µl d'un mélange de peptides et de protéines à 10 pM comprenant : angiotensine II, ACTH, insuline chaîne β oxydée, insuline bovine, cytochrome C. De plus tous les spectres ont subi une correction de leur ligne de base ainsi qu'un lissage.

2.2.4 TECHNIQUES DE DOSAGE

2.2.4.1 DES PROTEINES

Le dosage des protéines en solution (solution d'enzymes, protéines co-extraites dans une solution de polysaccharides, …) utilise le réactif de Bradford (Coomassie Brillant Blue G-250, Bio-Rad, Bradford 1976). Le réactif de Bradford contient du méthanol et de l'acide orthophosphorique et est rouge en condition acide (forme cationique, A_{max} = 470 nm). Cependant, en présence de protéines, la coloration vire au bleu (forme anionique, A_{max} = 595 nm). Le bleu de Coomassie est un colorant capable de se fixer aux protéines pour former un complexe dont le coefficient d'extinction molaire reste constant sur une large gamme de concentration. Ainsi, pour un rapport approprié de colorant et de protéines, la DO lue à 595 nm varie linéairement avec la concentration en protéines.

Les dosages sont réalisés sur un grand nombre de fractions en microdosage microplaque 96 puits. Le réactif est placé à température ambiante et agité. Puis, à 50 µl de réactif sont

ajoutés 200 µl d'échantillon à doser dans un puits. Le mélange est homogénéisé et placé 10 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 595 nm sur un lecteur de microplaque Synergy HT (Bio-tek).

L'étalonnage est réalisé sur une gamme de BSA de 0 à 20 µg à partir d'une solution mère de BSA à 1 mg/ml. Chaque dosage est effectué en triplicat en trois puits différents, et chaque mesure est réalisée trois fois dans le même puits. La proportion en protéines des échantillons est aussi mesurée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance des solutions à 280 nm.

2.2.4.2 DES SUCRES TOTAUX

Le dosage des sucres totaux en solution utilise la méthode de Dubois au phénol sulfurique (Dubois 1956). La méthode au phénol présente l'avantage, pour les oses totaux, d'une réponse homogène et surtout peu sous-estimée de chaque monosaccharide par rapport à une gamme étalon de glucose. L'ajout de phénol et d'un acide fort permet d'hydrolyser les sucres contenus dans l'échantillon à doser. De plus l'utilisation d'un di-acide tel que le H_2SO_4 permet la formation de furfuranes colorant la solution en jaune de façon quantitative.

Les réactifs sont du phénol à 5 % en eau milliQ (m/v) et du H_2SO_4 à 97% (v/v). À 200 µl d'échantillon à doser sont ajoutés 200 µl de phénol 5 % dans un tube résistant aux conditions acide. Puis, 1 ml de H_2SO_4 est ajouté rapidement sans le faire couler le long des parois. Une réaction exothermique se produit et une coloration jaune se développe, stable durant plusieurs heures. Le mélange est placé 5 minutes à température ambiante pour le refroidir, puis est vortexé et enfin est placé 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesuré à 485 nm, dans un spectrophotomètre Nanodrop 2000c (Thermo Scientifics).

L'étalonnage est réalisé sur une gamme de glucose de 0 à 50 mg à partir d'une solution mère de glucose à 1 mg/ml. Chaque dosage est réalisé en triplicat en trois tubes différents, et chaque mesure est réalisée trois fois dans le même tube.

3 DOSAGE ET PRODUCTION DES MOLECULES ANTIBIOFILM

3.1 MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE L'ACTIVITE ANTIBIOFILM EN MICROPLAQUE 96 PUITS

Une méthode de dosage rapide d'activité antibiofilm en microplaque 96 puits a été mise au point. L'objectif principal est de disposer d'une méthode permettant d'examiner simultanément un grand nombre d'échantillons et d'en consommer une faible quantité. Le but majeur est d'être capable de rechercher une activité antibiofilm dans des fractions issues de chromatographie lors des différentes étapes de purification des molécules d'intérêt. L'utilisation de la méthode en microplaque permet également de déterminer les spectres d'actions des molécules antibiofilm sécrétées par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41.

Pour cela, nous nous sommes inspirés des tests développés par Pitts et al. (2003), par Leroy (2006) et du protocole déjà utilisé au LBCM (UBS) pour l'étude des biofilms en chambres en flux. Cette méthode repose sur la formation de biofilms en microplaque, les bactéries adhérées à la surface des puits sont révélées par une coloration au cristal violet qui permet de quantifier le biofilm par une mesure de densité optique (DO) à 590 nm. Cette méthode, classiquement utilisée, permet de collecter des données quantitatives sur les biomasses colorées avec une sensibilité acceptable, les écart-types obtenus étant en majorité inférieurs à 10 %.

La méthode en microplaque développée par Leroy (2006) permettait de quantifier les bactéries adhérées après 2 h d'adhésion en EDMA grâce à un marquage au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Le DAPI est un marqueur fluorescent qui se lie fortement à l'ADN. Cette méthode a été mise au point pour quantifier des bactéries n'ayant pas encore formé de matrice extracellulaire, or notre étude devait prendre en compte la formation de biofilms d'au moins 24 h dans les puits des microplaques. Nous avons alors jugé plus pertinent d'utiliser un colorant comme le cristal violet qui permet d'avoir des mesures de la biomasse totale du biofilm dans chaque puits (Pitts et al. 2003). Par ailleurs, le cristal violet est un marqueur bon marché. Ces deux paramètres sont à prendre en compte lors de la mise au point d'un test servant à analyser un grand nombre d'échantillons et donc consommant beaucoup de réactifs.

Le dosage en microplaque mis au point suit deux étapes, comme pour la méthode en chambres d'adhésion. La première étape est une adhésion bactérienne en EDMA (contrôles) ou en présence de surnageant. La seconde étape est la croissance des biofilms en milieu VNSS. Les bactéries utilisées lors de ces tests sont *Vibrio* sp. D02 et D01, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, *Algibacter* sp. 1M6 et *Paracoccus* sp. 4M6. La biomasse totale des biofilms est quantifiée par mesure de la densité optique (DO) à 590 nm après solubilisation du cristal violet dans l'éthanol. Afin de mettre au point cette méthode, l'influence de différents paramètres a été étudiée :

- L'agitation pendant la croissance des biofilms : 200 rpm, 300 rpm ou sans agitation ;
- Le temps de formation des biofilms : 24 ou 48 h ;
- La fixation des biofilms avant coloration : au méthanol ou au formaldhéhyde 2,5 % ;
- La concentration en cristal violet à distribuer dans les puits : 0,1 %, 0,5 % ou 1 %.

3.1.1 INFLUENCE DE L'AGITATION DES MICROPLAQUES

Le protocole utilisé par Pitts et al. (2003) ne décrit pas si la microplaque a été agitée au cours des 24 h d'incubation ou si les suspensions sont restées statiques. C'est pourquoi nous avons décidé de tester si une agitation orbitale des microplaques avait une influence sur la croissance des biofilms dans les puits. Ainsi nous avons testé deux conditions d'agitation des microplaques : 200 rpm, 300 rpm et sans agitation orbitale.

Les résultats obtenus, après coloration des biofilms au cristal violet, sont présentés dans la Figure 27.

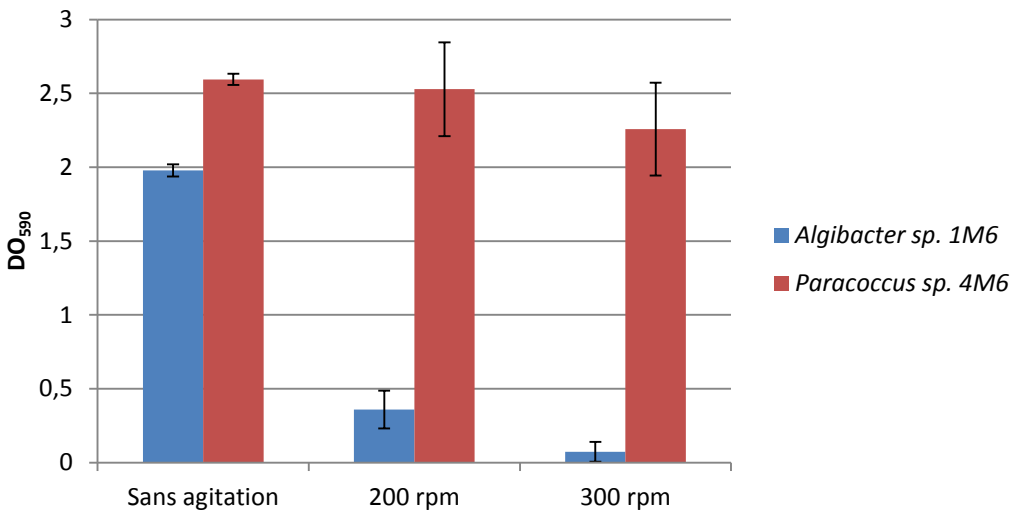


Figure 27. DO à 590 nm des biofilms colorés d'Algibacter sp. 1M6 et Paracoccus sp. 4M6 mesurés dans les puits de microplaque selon la vitesse d'agitation des microplaques pendant la formation des biofilms

Nous observons des différences notables entre les résultats obtenus à partir de biofilms formés par *Algibacter* sp. 1M6 en absence d'agitation et ceux qui ont subi une agitation orbitale pendant leur croissance. Les deux espèces bactériennes testées montrent chacune une réponse différente à l'agitation. Alors que *Algibacter* sp. 1M6 présente une diminution de la DO mesurée de 5 et 27 fois, pour des agitations respectives de 200 et 300 rpm, comparativement aux mesures réalisées sans agitation. *Paracoccus* sp. 4M6 n'a subi que faiblement l'effet de l'agitation montrant une diminution non significative de la DO_{590}.

Le calcul des écart-types montre par ailleurs qu'une agitation des microplaques induit une variation 10 fois supérieure des valeurs mesurées comparativement aux essais réalisés en statique. De plus, nous avons observé la formation de gouttes de milieu de culture sur le couvercle des microplaques agitées à 300 rpm induisant des variations de volume dans les puits.

Nous retenons donc, afin de mieux évaluer l'effet des surnageants bactériens, une formation de biofilms sans agitation. Nous cherchons ainsi à obtenir les DO à 590 nm les plus élevées avec les écart-types les plus faibles.

3.1.2 INFLUENCE DE LA DUREE D'INCUBATION

Le protocole utilisé en chambres à flux, et utilisé aussi en partie comme base pour le développement du test en microplaque, fait intervenir une période d'incubation de 48 h pour former des biofilms. Cependant, le test en microplaque développé doit être rapide. C'est pourquoi nous avons étudié l'influence de la durée d'incubation et choisi de former des biofilms de 24 et 48 h. La durée de 24 h a été choisie par commodité d'expérimentation. En effet, en tenant compte des 2 h d'adhésion des espèces bactériennes dans les puits, des lavages et des colorations, l'expérience dure un total de 28 h. L'expérience peut alors être démarrée le matin et terminée le lendemain en début d'après-midi.

Les résultats obtenus, après coloration des biofilms au cristal violet, sont présentés dans la Figure 28.

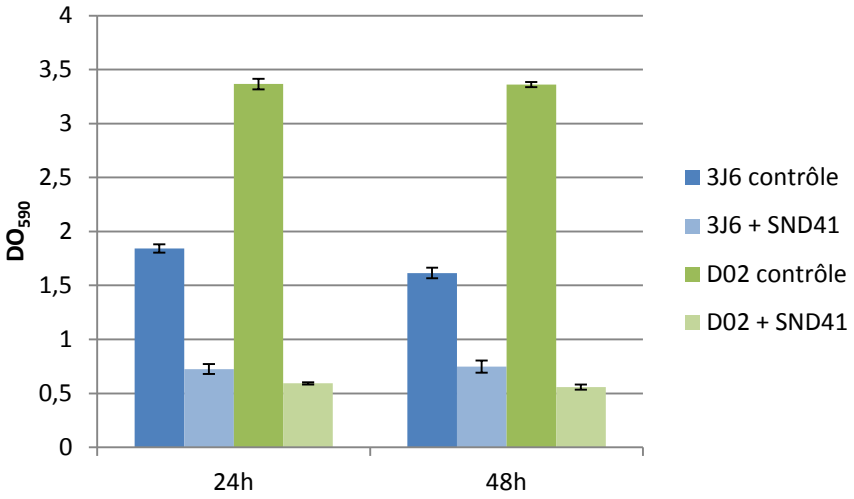


Figure 28. DO à 590 nm des biofilms colorés de Pseudoalteromonas sp. 3J6 et Vibrio sp. D02 mesurés dans les puits de microplaque selon la durée de formation des biofilms

Nous n'observons aucune différence significative entre les résultats obtenus à partir de biofilms formés en 24 h d'incubation et ceux qui ont eu un temps de croissance de 48 h. Quelle que soit l'espèce bactérienne considérée, nous retrouvons des biomasses bactériennes similaires aux deux temps d'incubation. Il semblerait que nous atteignons une

biomasse bactérienne maximale dès 24h dans les conditions utilisées. Nous conservons aussi des écart-types faibles après seulement 24 h de formation de biofilms, ceci indique que les biofilms ont acquis déjà une certaine homogénéité entre les réplicats.

La durée d'incubation peut donc être réduite à 24 h pour les tests en microplaques.

3.1.3 INFLUENCE DE LA FIXATION DES BIOFILMS

Nous avons pu observer, lors d'essais préliminaires de croissances de biofilms en microplaques, que certaines bactéries (*Vibrio* sp. D01, *Alteromonas* sp. 1J3 et *Colwellia* sp. 4J3) forment des biofilms fins et adhèrent mal au polystyrène des microplaques. Inversement, certaines bactéries (*Paracoccus* sp. 4M6, *Vibrio* sp. D02 ou *Algibacter* sp. 1M6) forment des biofilms épais. Pour ces deux raisons, nous nous sommes intéressés à la fixation des biofilms, une fois formés, car les lavages peuvent être une étape plus violente en microplaque qu'en chambre à flux du fait du pipetage.

De plus, les biofilms subissent deux fois cette agression : avant et après coloration. Ainsi, nous avons décidé de tester une étape de fixation des biofilms formés dans les puits avec deux solvants différents : le méthanol (selon la méthode préconisée par Peeters et al. 2007) ou le formaldéhyde (à 2,5% en EDMA, selon Böckelmann et al. 2002). Cette étape intervient après les trois premiers lavages des puits avant coloration.

Les résultats obtenus, après coloration des biofilms au cristal violet, sont présentés dans la Figure 29.

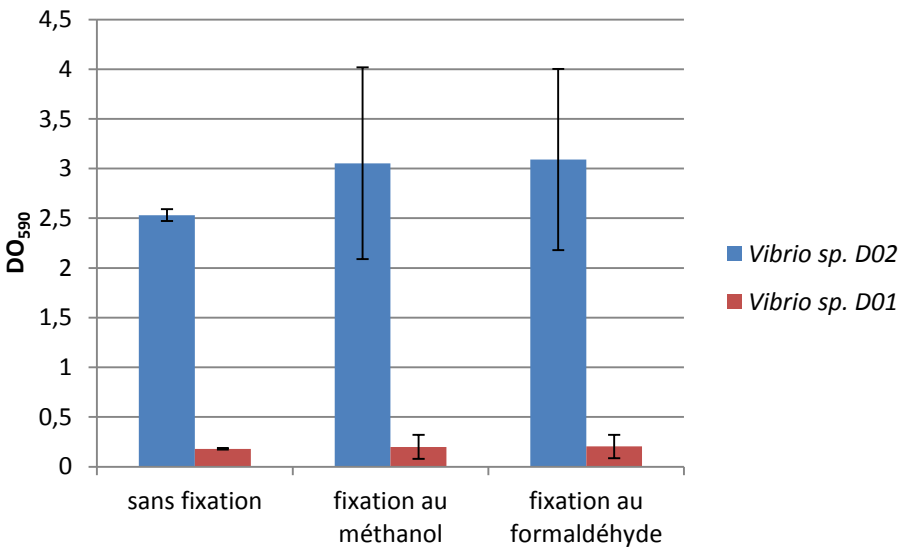


Figure 29. DO à 590 nm des biofilms colorés de Vibrio sp. D01 et D02 mesurés dans les puits de microplaque avec fixation ou non des biofilms formés avant la coloration au cristal violet

Nous observons à l'œil nu des différences significatives dans les puits entre les biofilms ayant subi une fixation et les autres, lorsque nous avons retiré le cristal violet et lavé les puits, mais avant ajout d'éthanol. En effet, nous avons pu observer que les biofilms fixés ont fait de petits amas au fond des puits, rendant la surface très hétérogène. Alors que les biofilms n'ayant pas subi de fixation se présentaient de façon homogène au fond des puits, à l'œil nu. Lors de l'ajout de l'éthanol, les amas présents dans les biofilms fixés n'ont pas relargué totalement le cristal violet même après agitation, créant des zones localisées de forte concentration en cristal violet et d'autres en déficit. De plus, les amas ont pu faire écran au faisceau du spectrophotomètre, induisant une erreur dans la lecture de la densité optique. Ces observations expliquent les forts écart-types des mesures. Les valeurs de DO_{590}, mesurées après fixation au méthanol ou au formaldéhyde, présentent toutes deux de grands écart-types. Ils sont supérieurs à 0,2 pour *Vibrio* sp. D01 et supérieurs à 0,9 pour *Vibrio* sp. D02, cela représente des variations respectives de 100 % et 60 % de la valeur moyenne. Comparativement, les écart-type calculés à partir des mesures de biofilms non fixés ne sont respectivement que de 0,01 et 0,06 soit des variations des valeurs moyennes inférieures à 10 %.

Il apparaît ainsi que la fixation des biofilms augmente de façon importante les écart-types de mesure entre chacun des réplicats. Nous avons donc choisi de ne pas ajouter d'étape de fixation et de réaliser les lavages nécessaires le plus doucement possible pour ne pas perturber les biofilms formés.

3.1.4 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CRISTAL VIOLET

La concentration en cristal violet à appliquer pour colorer les biofilms formés dans les puits des microplaques est un autre paramètre clé à prendre en compte. En effet, lorsque la concentration en cristal violet est trop faible, le marqueur peut être limitant et nous risquons de sous-estimer la biomasse formée. Le but est de rechercher à partir de quelle concentration en cristal violet nous sommes en excès de marqueur par rapport au biofilm à marquer. Nous avons donc réalisé des marquages de biofilms avec différentes concentrations d'une solution de cristal violet. La solution mère est une solution à 1% qui a été diluée avec de l'eau milliQ.

L'espèce bactérienne utilisée pour ces essais est *Vibrio* sp. D02. C'est une espèce bactérienne formant un biofilm parmi les plus épais de la collection, suffisamment épais pour permettre d'observer des variations de marquage. Les résultats obtenus, après coloration des biofilms et des puits vides au cristal violet, sont présentés dans la Figure 30.

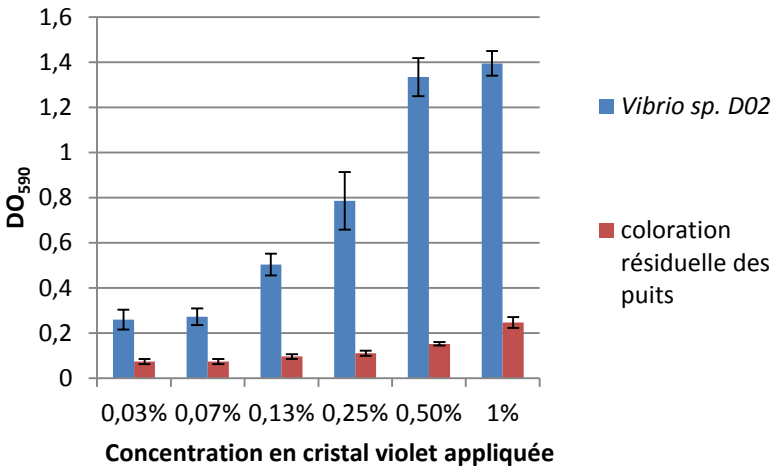


Figure 30. DO à 590 nm des biofilms colorés de Vibrio sp. D02 et colorations résiduelles mesurées dans les puits de microplaque selon la concentration en cristal violet distribuée

Nous observons une augmentation de la quantité de biomasse marquée en corrélation avec l'augmentation de la concentration en cristal violet jusqu'à atteindre un seuil à partir d'une concentration de 0,5 %. Les DO_{590} mesurées après les colorations à 0,5 % et 1 % ne sont pas significativement différentes. L'hypothèse est qu'à partir d'une concentration de 0,5 % en cristal violet, nous sommes en excès par rapport à la quantité de bactéries à marquer. L'excès de cristal violet est éliminé lors des lavages, c'est pourquoi nous observons un effet de seuil.

Par ailleurs, les mesures de DO à 590 nm du spectrophotomètre sont linéaires jusqu'à une valeur de 3. Nous avons donc choisi, avec *Vibrio* sp. D02, une espèce bactérienne formant un biofilm dont la DO_{590} est d'environ la moitié, soit 1,5. Les mêmes essais ont été réalisés avec les espèces bactériennes *Algibacter* sp. 1M6 et *Vibrio* sp. D01 qui forment respectivement des biofilms très épais et très fins. Les DO_{590} mesurées pour les biofilms d'*Algibacter* sp. 1M6 indiquent que nous sommes en excès de cristal violet à partir de 0,5 %, puis que les mesures sont au-delà de la gamme de linéarité pour la coloration avec du cristal violet à 1 %. Les DO_{590} mesurées pour les biofilms de *Vibrio* sp. D01 montrent que nous sommes en excès de colorants dès l'ajout de cristal violet à 0,1 %, cependant quelle que soit la concentration dans ce dernier cas, les mesures restent dans la gamme de linéarité du spectrophotomètre.

La concentration en cristal violet minimale à appliquer sur les biofilms est donc de 0,5 % pour une réponse optimale. De plus, le choix de cette concentration de 0,5 %, vis à vis de la concentration de 1 %, répond aussi à des exigences économiques de développement d'un test non seulement rapide, mais aussi utilisant une quantité minimale de réactifs.

3.2 PARAMETRES INFLUENÇANT LA PRODUCTION DE MOLECULES ANTIBIOFILM

Afin de se placer dans des conditions optimales pour entreprendre la purification des molécules inhibitrices produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41, nous avons déterminé dans quelles conditions de culture les deux souches produisent la plus grande quantité de ces molécules. Nous avons fait varier différents paramètres : la composition des

milieux de cultures (travaux en collaboration avec Boisset C. et Robic A., Laboratoire de Biotechnologie et Molécules Marines, Ifremer) et la durée des cultures.

Nous avons déjà observé que les surnageants de cultures liquides de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 en milieu VNSS possèdent une activité antibiofilm. Les conditions de croissance utilisées lors des travaux précédents ont servi de base aux expériences d'optimisation. L'activité antibiofilm a été quantifiée grâce au test en microplaques 96 puits développé en utilisant des espèces bactériennes sensibles : *Algibacter* sp. 1M6, *Paracoccus* sp. 4M6, *Vibrio* sp. D66 et *Vibrio* sp. D02.

3.2.1 INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE MILIEU DE CULTURE

Des cultures liquides de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 ont été réalisées dans différents milieux afin de quantifier l'activité antibiofilm produite selon la composition du milieu. Nous avons effectué les essais sur trois espèces bactériennes : *Vibrio* sp. D02, *Vibrio* sp. D66 et *Algibacter* sp. 1M6. Ces dernières ont été choisies car elles forment des biofilms moyens à épais (DO_{590} des biofilms de contrôle en microplaque de 1,5 à 3). De plus ces souches bactériennes sont très sensibles au surnageant de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (résultats présentés dans le chapitre suivant par Dheilly et al. 2010 et Klein et al. 2011).

Cinq milieux de cultures différents ont été utilisés : VNSS, VNSS additionné de glucose à 30 g/l, Infusion de cœur de bœuf (HI), HI additionné de glucose à 30 g/l et Zobell additionné de glucose à 30 g/l. Les milieux VNSS et Zobell sont des milieux classiquement utilisés pour la culture des bactéries marines, de même pour le milieu MB. Cependant le milieu MB forme des dépôts sur les surfaces qui posent des problèmes lors de la formation de biofilms. Le milieu HI a, quant à lui, été testé car c'est un milieu très riche pouvant permettre de fortes productions d'exopolymères. Des études menées sur l'effet de la concentration en certains substrats et notamment du glucose ont montré qu'un ajout de 3 % (m/v) de glucose dans le milieu de culture de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* stimulait la production d'exopolysaccharides (Petry et al. 2000). C'est pourquoi nous avons testé cette condition pour évaluer la production de molécules antibiofilm.

3.2.1.1 SURNAGEANTS DE *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6

Les résultats obtenus par les tests d'activités en microplaque avec les différents surnageants sont exprimés en pourcentage d'inhibition et sont présentés Figure 31.

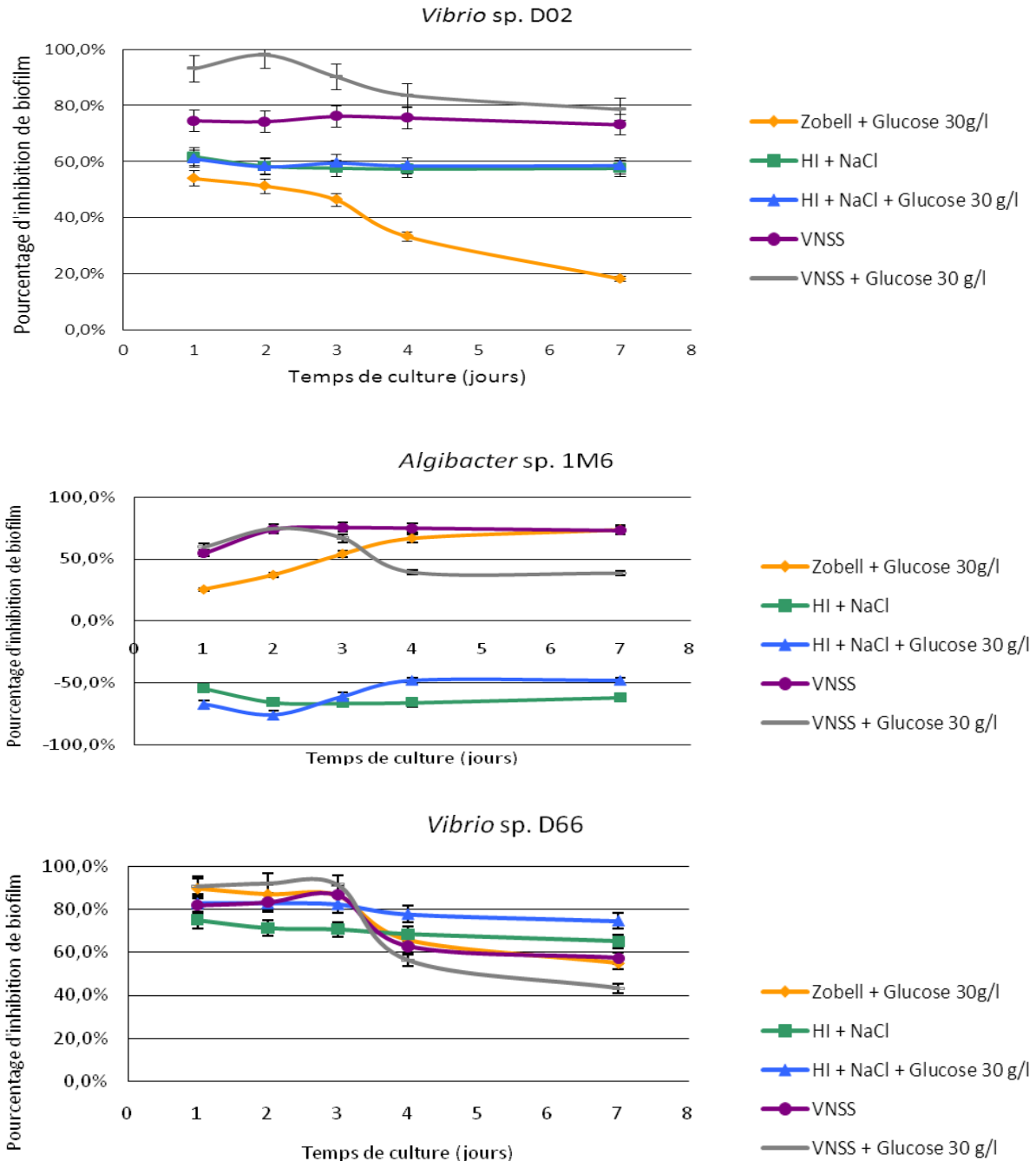


Figure 31. Activité antibiofilm des surnageants de Pseudoalteromonas sp. 3J6 mesurée en fonction des milieux de cultures ayant servi à la production de molécules actives, sur les trois espèces bactériennes sensibles. Les écart-types ont été calculés sur 6 valeurs.

Lors des essais réalisés sur *Vibrio* sp. D02, nous avons mesuré les PI les plus importants (> 80 %) pour les molécules produites en VNSS glucosé, quelle que soit la durée de culture (Figure 31). Les PI mesurés pour les molécules produites en VNSS sont compris entre 70 et 78 % et dans les trois autres milieux (Zobell glucosé, HI salé et HI salé et glucosé) les PI sont inférieurs ou égaux à 60 %. L'activité antibiofilm vis-à-vis de *Vibrio* sp. D02 tend même à diminuer avec le temps de culture pour les molécules produites dans le milieu Zobell glucosé. Bien qu'appartenant au même genre bactérien que D02, les PI mesurés lors des essais sur *Vibrio* sp. D66 sont différents (Figure 31). Nous retrouvons des PI supérieurs à 80 % pour les molécules produites en VNSS et VNSS glucosé lors des trois premiers jours de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Puis, nous ne mesurons plus que des PI d'environ 60 % à 4 et 7 jours de culture.

Enfin, les essais réalisés sur *Algibacter* sp. 1M6 révèlent une particularité, nous avons mesuré une activité pro-biofilm, avec plus de 50 % de biofilm en plus par rapport aux biofilms de contrôles réalisés, de la part des molécules produites en HI salé (avec ou sans glucose). Hormis cette spécificité, nous avons mesuré les PI les plus importants pour les molécules produites en VNSS (une moyenne de 75 % pendant les 7 jours), comme pour les essais réalisés sur *Vibrio* sp. D02. De plus, contrairement aux résultats obtenus sur les *Vibrio*, les PI mesurés pour les molécules produites en Zobell glucosé augmentent avec le temps de culture. Les PI sont alors identiques à ceux mesurés pour les molécules produites en VNSS après 7 jours de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

En général, ce sont les surnageants produits en VNSS et en VNSS glucosé qui présentent la plus forte activité. Ces surnageants présentent une forte activité sur *Vibrio* sp. D02 et *Algibacter* sp. 1M6, atteignant des PI de 75 à 95 %, au cours des 7 jours de culture. Cependant nous mesurons une diminution des PI de 80 à 40 % après 4 jours de culture en VNSS glucosé sur *Algibacter* sp. 1M6 (Figure 31). En Zobell, nous avons observé de grandes différences dans les résultats selon la souche utilisée. Par contre l'apport en glucose ne semble pas contribuer à une production plus importante en composés actifs. Enfin, dans le cas des molécules produites en HI + NaCl et en HI + NaCl et glucose, les PI mesurés sont en général inférieurs à ceux mesurés en VNSS ou VNSS glucosé alors que la production en substances exopolymériques est importante (viscosités dans les surnageants).

Une production de molécules antibiofilm dans du milieu minimum M9 a également été réalisée durant 24 h. Nous avons mesuré un PI de 58 % sur les biofilms de *Vibrio* sp. D02, de 32 % sur les biofilms d'*Algibacter* sp. 1M6 et de 86 % sur les biofilms de *Vibrio* sp. D66. L'intérêt d'une production en milieu minimum est qu'il n'y a pas d'autre source de protéines, lipides ou sucres que le glucose du milieu et les molécules sécrétées par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. La molécule active peut ainsi être plus facilement extraite et purifiée. Cependant, bien qu'une activité antibiofilm ait été mesurée, les changements phénotypiques de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 au cours de la culture posent problème. Les cellules pigmentées en rose en VNSS ont pris une pigmentation jaune vif en M9. Il est alors possible dans ce cas que les molécules actives produites dans ces deux milieux soient totalement différentes.

L'ensemble de ces résultats permet de penser que *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sécrète des composés actifs en quantité différentes selon le milieu de culture utilisé, ou des composés actifs de natures différentes. Les composés actifs produits par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 dans les différents milieux présentent des effets inhibiteurs différents sur une même souche, voire même activateurs.

Finalement nous avons retenu le milieu VNSS car avons généralement les activités les plus importantes pour les molécules produites dans ce milieu. De plus, nous savons grâce aux essais réalisés sur *Vibrio* sp. D66 que nous ne devons pas dépasser 3 jours de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pour produire des molécules actives, car au-delà nous observons une diminution d'activité.

3.2.1.2 SURNAGEANTS DE *PSEUDOALTEROMONAS* SP. D41

Les résultats obtenus par les tests d'activités en microplaque avec les différents surnageants sont exprimés en pourcentage d'inhibition et sont présentés Figure 32.

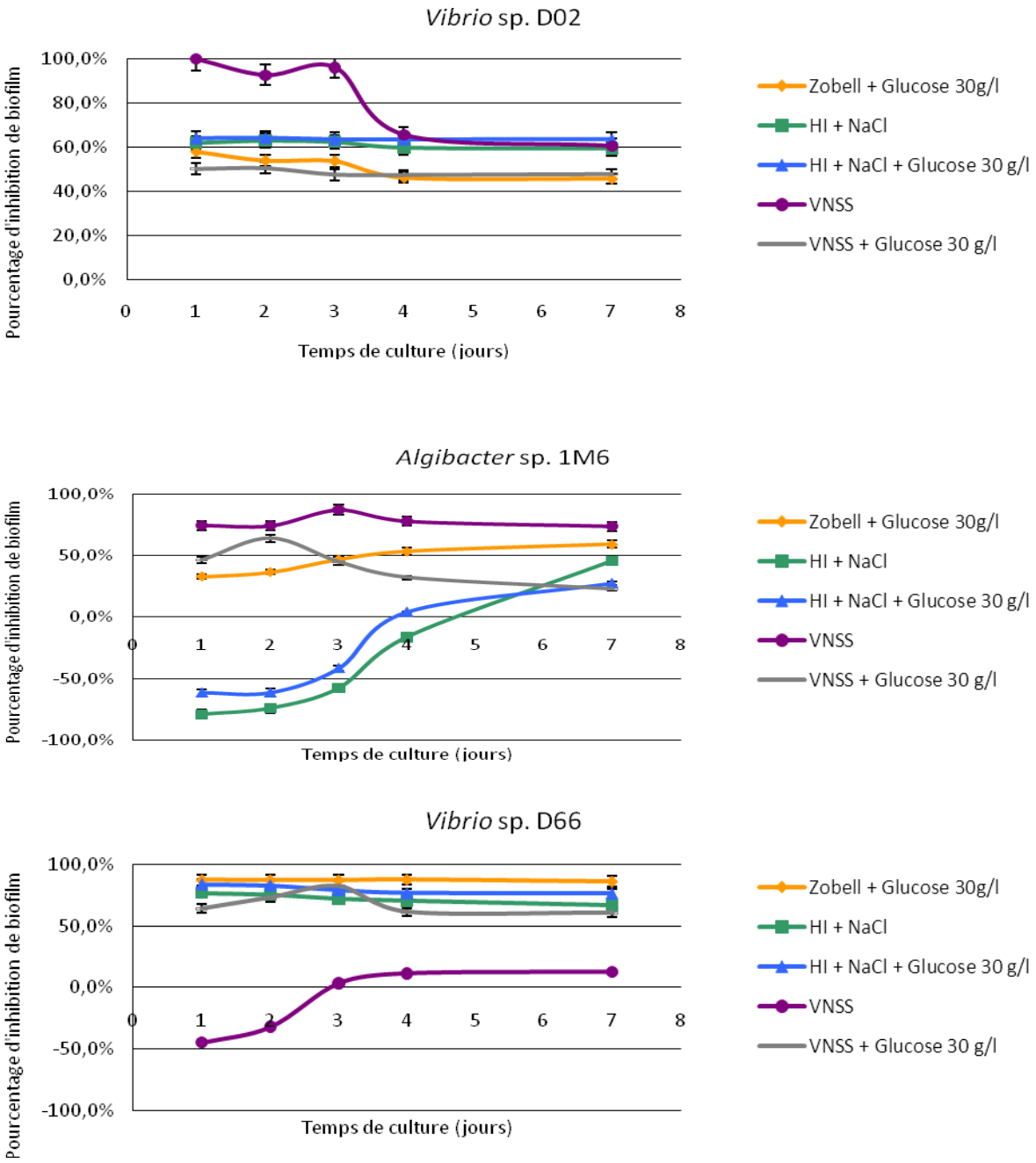


Figure 32. Activité antibiofilm des surnageants de Pseudoalteromonas sp. D41 mesurée en fonction des milieux de cultures ayant servi à la production de molécules actives sur les trois espèces bactériennes sensibles. Les écart-types ont été calculés sur 6 valeurs.

Nous observons sur la Figure 32 que *Pseudoalteromonas* sp. D41 sécrète elle aussi des composés soit de nature différente soit en concentrations différentes selon le milieu de culture utilisé. Les résultats de la Figure 28 permettent également de conclure que les

molécules antibiofilm produites par D41 semblent, elles aussi, présenter un effet espèce-dépendant.

Pour deux des souches, D02 et 1M6, ce sont les molécules antibiofilm produites en VNSS qui présentent la plus forte activité. Nous avons ainsi mesuré que ces productions sont les plus actives atteignant des PI de 95-100 % sur D02, et de 75-80 % sur 1M6 pendant les trois premiers jours. Cependant, nous avons observé des différences de réponses au contact des molécules produites dans les autres milieux de culture pour 1M6. En effet, les molécules produites en HI + NaCl montrent une activité pro-biofilm, comme précédemment avec 3J6. Nous avons mesuré jusqu'à 79 % de biofilm en plus par rapport aux contrôles. Les mêmes résultats sont obtenus avec les surnageants produits en VNSS testés sur *Vibrio* sp. D66. Cependant, nous avons observé une diminution de l'activité activatrice de la formation de biofilm pour finalement détecter une activité inhibitrice des biofilms à partir du 4e jour de culture dans ce dernier cas. Pour les essais réalisés à partir des molécules produites en Zobell glucosé et en VNSS glucosé, nous notons des PI d'un même ordre quelle que soit la souche observée soit des PI moyen sur les valeurs des 3 premiers jours de 50 à 60 % pour D02 et 1M6, 75 % pour D66. Les PI mesurés pour les molécules produites dans les milieux de culture HI + NaCl et HI + NaCl + glucose restent stables dans le temps avec les souches D02 et D66.

Par ailleurs, comme pour *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, nous avons tenté de cultiver *Pseudoalteromonas* sp. D41 en milieu minimum M9, mais sans y parvenir. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à la production éventuelle de molécules antibiofilm dans ce milieu minimum.

En conclusion, nous avons choisi de produire des molécules actives en VNSS car les activités antibiofilm les plus importantes ont généralement été mesurées dans ce milieu. De plus, grâce aux essais réalisés sur *Vibrio* sp. D02, nous avons établi que les cultures ne devaient pas dépasser 3 jours car nous avons mesuré une perte d'activité au-delà de ce temps d'incubation.

3.2.2 INFLUENCE DE LA DUREE DES CULTURES

Avec ces premiers résultats définissant un milieu de culture optimal, nous avons aussi obtenu des informations sur la durée de culture nécessaire pour obtenir un surnageant actif en VNSS. Nous avons alors recherché s'il était possible de réaliser des cultures sur une durée encore plus courte en étudiant la production de molécules actives en VNSS lors des 24 premières heures d'incubation. Le but est de connaître le moment où nous atteignons une concentration maximale en molécules antibiofilm.

Nous testons des surnageants bruts, nous ne pouvons alors pas savoir si les molécules actives continuent à se concentrer dans le milieu après avoir atteint un PI maximum, si nous avons atteint un équilibre entre production et dégradation des molécules actives ou s'il y a arrêt de synthèse. Nous avons donc réalisé des dilutions au demi des surnageants prélevés. L'inverse de la dernière dilution ayant une activité supérieure à 20 % permet de calculer l'activité (exprimée en unité arbitraire) des différents échantillons de surnageant.

3.2.2.1 SURNAGEANTS DE *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6

La courbe de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 en VNSS à 25°C, ainsi que les activités calculées pour chaque prélèvement sont présentées Figure 33.

Nous n'avons pas observé de phase de latence mais directement la phase exponentielle de croissance qui se termine environ 4 h après l'ensemencement. Puis vient la phase stationnaire à partir de 9 h de culture. Le temps de génération calculé est de 48 min à 25 °C avec un taux de croissance µ de 0,87 h^{-1} (le temps de génération était de 54 min à 20°C en VNSS pour Dheilly 2007).

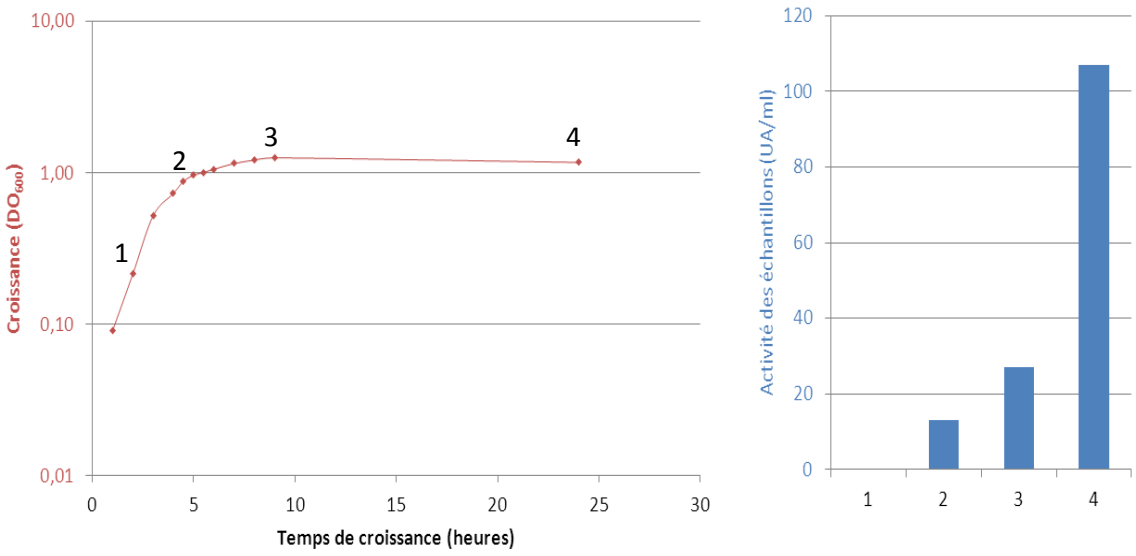


Figure 33. Courbe de croissance de Pseudoalteromonas sp. 3J6 et activité antibiofilm des fractions marquées 1, 2, 3 et 4, sur Vibrio sp. D02, en fonction du temps de production de molécule antibiofilm, sur 24 h.

Les courbes (Figures 33) montrent qu'aucune activité n'est mesurée avant 5 h de culture. Puis l'activité des surnageants prélevés augmente rapidement. Le surnageant prélevé à 9 h de culture présente une activité de 27 UA/ml, et celui prélevé à 24 h présente une activité de 107 UA/ml, soit 4 fois plus concentré. Deux hypothèses permettraient d'expliquer cette observation : soit la concentration en molécule active est trop faible pour être mesurable avant 5 h de culture, soit ces molécules ne seraient synthétisées qu'à partir de la fin de la phase exponentielle.

De plus, nous avons remarqué qu'il était indispensable, pour détecter la production de molécules actives, que la DO_{600} de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 soit comprise entre 0,9 et 1,2. Sous une DO_{600} de 0,9 nous sommes en dessous de la limite de détection de l'activité antibiofilm. Parallèlement, des cultures de DO_{600} approchant la valeur de 2 à 24 h de culture n'ont montré aucune activité antibiofilm. Dheilly, en 2007, avait montré que *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 présentait une activité protéasique. Nous pourrions supposer que ces protéases interviennent aussi dans l'autolyse ou l'apoptose bactérienne et soient partiellement inactivées dans le cas des cultures bactériennes ayant une $DO_{600} > 2$ à 24 h de culture. Ainsi cette forte augmentation de la densité bactérienne après 12 h de culture pourrait être liée à l'absence de molécule antibiofilm, potentiellement des protéases. Nous

pouvons donc nous interroger sur une interaction entre la production de ces protéases et des molécules antibiofilm. Pour résumer, une inhibition de la production de protéase induirait une augmentation anormale de la population bactérienne au cours du temps, et c'est dans ces suspensions très denses que nous ne détectons aucune activité antibiofilm.

Les surnageants utilisés pour les études ultérieures sont alors prélevés à 24 h de culture en VNSS à 25°C.

3.2.2.2 SURNAGEANTS DE *PSEUDOALTEROMONAS* SP. D41

Comme précédemment, la courbe de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. D41 en VNSS à 25°C, et les activités calculées pour chaque prélèvement sont présentés Figures 34.

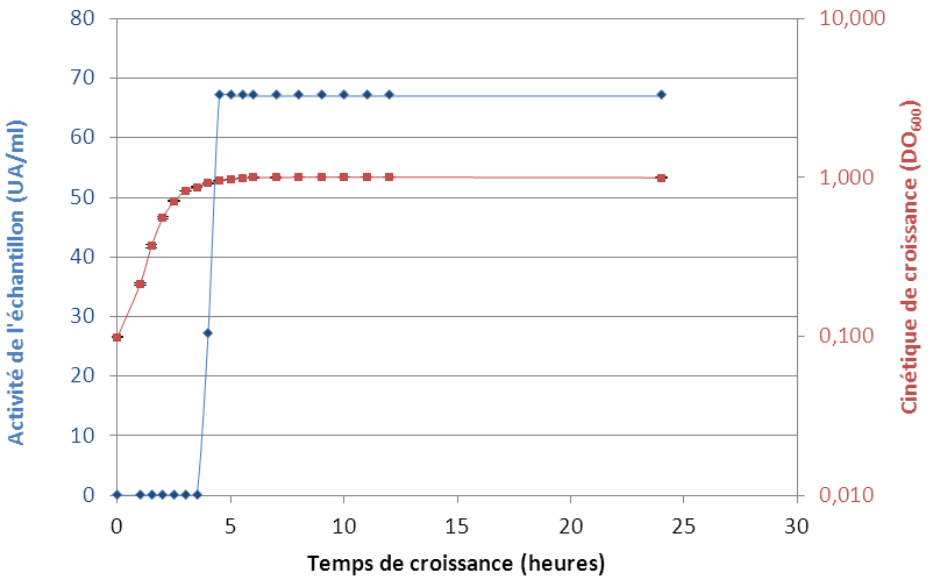


Figure 34. Courbe de croissance de Pseudoalteromonas sp. D41 et activité antibiofilm sur Vibrio sp. D02 en fonction du temps de production de molécule antibiofilm, sur 24 h.

Nous observons que la phase exponentielle de croissance pour D41 se termine environ 3,5 h après l'ensemencement (Figure 34). Puis vient la phase stationnaire de croissance à partir de 5 h de culture. Le temps de génération calculé est de 43 min à 25 °C avec un taux de croissance µ de 0,96 h^{-1} (le temps de génération était de 41 min à 20 °C en VNSS pour Dheilly

2007). Nous observons que les PI mesurés en fonction du temps de culture prennent une allure « dose-réponse ». La courbe est de type sigmoïde permettant de supposer que jusqu'à une certaine concentration en molécules actives aucune activité n'est mesurée (Figure 34). Puis l'activité des surnageants prélevés augmente rapidement à partir de 4 h de culture (Activité de 27 UA/ml) jusqu'à atteindre un seuil maximum de 67 UA/ml à 4,5 h de culture. L'activité mesurée semble se maintenir au cours du temps. Nous avons probablement un équilibre entre la sécrétion de molécules actives et leur dégradation ou leur inactivation.

Les travaux de Dheilly, en 2007, avaient montré que *Pseudoalteromonas* sp. D41 présentait aussi une activité protéasique. Il est possible que ces protéases soient responsables du maintien à une concentration constante au cours du temps des molécules antibiofilm produites par *Pseudoalteromonas* sp. D41. Nous aurions donc là un effet différent de celui décrit précédemment pour les molécules produites par la souche 3J6. Les surnageants utilisés pour les études ultérieures sont donc prélevés à 12 h de culture en VNSS à 25°C, en fin de phase exponentielle de croissance puisqu'il n'y a pas de variation de l'activité en molécules actives par la suite.

3.2.3 CONCLUSIONS

Suite aux résultats obtenus, nous avons choisi de conserver le milieu de culture VNSS pour produire des molécules antibiofilm. Ce milieu est dans deux cas sur trois celui dans lequel l'activité antibiofilm est la plus forte. Les surnageants sont prélevés après 24 h de culture pour 3J6 et 12 h pour D41. Cependant, une activité peut être maintenue sur des productions d'au moins 7 jours. Le milieu VNSS présente l'avantage, par rapport au milieu HI d'être adapté aux conditions marines (pH de 7,6 avec une salinité proche de l'eau de mer) et d'avoir une composition exacte connue. L'utilisation de ce milieu de culture VNSS permet de comparer nos résultats avec ceux de la littérature car une grande partie des études réalisées sur les bactéries marines utilisent du VNSS (Brumolle et al. 2007, Dheilly et al. 2010).

4 DESCRIPTION DE L'ACTIVITE DES COMPOSES ANTIBIOFILM PRODUITS PAR *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6 ET D41

4.1 SPECTRES D'ACTIONS DES MOLECULES ANTIBIOFILM

4.1.1 PRODUITES PAR *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6

4.1.1.1 INTRODUCTION

Travaux antérieurs

Alexandra Dheilly (2007) a découvert l'activité antibiofilm secrétée par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

La thèse d'A. Dheilly (2007) portait sur l'étude de biofilms multi-espèces de bactéries marines différentes en termes de phylogénie et de propriétés physico-chimiques (Grasland 2002 ; Grasland *et al*. 2003). Dans un premier temps, les biofilms mono-espèces formés en chambres en flux par quatre bactéries marines (*Paracoccus* sp. 4M6, *Bacillus* sp. 4J6, *Vibrio* sp. D01 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6) ont été caractérisés. Ceci a montré que *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *Paracoccus* sp. 4M6 forment des biofilms hétérogènes avec des agrégats cellulaires, alors que *Bacillus* sp. 4J6 et *Vibrio* sp. D01 forment des biofilms plus homogènes sur lames de verre. Les biofilms bi-espèces ont ensuite été étudiés. Les biofilms ont été réalisés en chambres en flux, en associant *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, qui avait pu être marquée par un gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP), avec chacune des trois autres souches. *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 était systématiquement dominante dans les biofilms bi-espèces avec *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01, représentant jusqu'à 84% et 76%, respectivement, du biovolume des biofilms. Ces observations ont révélé la capacité inhibitrice de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 vis-à-vis d'autres espèces bactériennes marines. L'hypothèse a alors été émise que ce sont des molécules sécrétées dans le milieu par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 qui induisent l'effet inhibiteur. Afin d'examiner cette hypothèse, des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01 ont été formés en présence de surnageants de cultures liquides de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}). Les biovolumes des biofilms obtenus représentaient moins de 15% des biovolumes des biofilms cultivés sans SN_{3J6}, révélant que les produits de sécrétion de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 étaient capables d'inhiber fortement le développement de biofilms de ces deux bactéries.

Enfin, les travaux antérieurs ont montré que :

- le surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}) n'a qu'un trop faible effet négatif sur les premières étapes d'adhésion de *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01 sur du verre pour expliquer son action antibiofilm ;
- les molécules antibiofilm de SN_{3J6} peuvent conditionner une lame de verre ;
- SN_{3J6} semble dépourvu d'action antibactérienne (bactéricide ou bactériostatique) contre *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01 lorsque les bactéries sont planctoniques. Par contre, une forte diminution de la viabilité des cellules a été observée dans les biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01 en présence du SN_{3J6}.

Travaux développés

Nous avons complété ces travaux antérieurs sur l'effet des molécules sécrétées par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et publié l'article ci-après. Les résultats d'A. Dheilly (2007) indiquant que SN_{3J6} est dépourvu d'action antibactérienne (bactéricide ou bactériostatique) contre des bactéries planctoniques sont particulièrement importants, puisque de nombreuses molécules antibactériennes secrétées par des bactéries (ex : bactériocines) ont déjà été décrites et que de telles molécules peuvent logiquement inhiber le développement de biofilms. Des molécules pourvues d'une action antibiofilm mais non antibactérienne sont potentiellement plus originales.

La recherche d'activité antibactérienne contre des bactéries planctoniques menée par A. Dheilly ayant donné des résultats négatifs, nous souhaitions les confirmer par des tests supplémentaires : tests d'activité antibactérienne par disques de diffusion et tests d'activité antibiofilm sur 9 souches bactériennes supplémentaires en chambre d'adhésion et en microplaque 96 puits.

De plus, l'action antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 n'avait été montrée que contre deux souches bactériennes (*Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01). Il était essentiel de définir son spectre d'action en testant son activité sur le panel le plus large possible

d'espèces bactériennes provenant des collections de bactéries marines de l'IFREMER et du LBCM (UBS). Des bactéries marines modèles bien connues (*Pseudoalteromonas tunicata* D2, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c et *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125) ont également été utilisées. Ces essais ont été réalisés en chambres en flux, avec un double marquage des bactéries permettant d'évaluer leur viabilité en présence ou non de SN_{3J6}.

Ces résultats, ainsi que ceux d'A. Dheilly sont décrits dans l'article ci-après.

4.1.1.2 MANUSCRIT

Anti-biofilm activity produced by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

Alexandra Dheilly, Emmanuelle Soum-Soutéra, Géraldine L. Klein, Alexis Bazire, Chantal Compère, Dominique Haras, and Alain Dufour

Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76:3452-3461.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, June 2010, p. 3452–3461 Vol. 76, No. 11
0099-2240/10/$12.00 doi:10.1128/AEM.02632-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6[▽]

Alexandra Dheilly,[1]‡† Emmanuelle Soum-Soutéra,[1]‡ Géraldine L. Klein,[1,2] Alexis Bazire,[1] Chantal Compère,[2] Dominique Haras,[1] and Alain Dufour[1]*

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, Université de Bretagne-Sud, UEB, Lorient, France,[1] and IFREMER, Service Interfaces et Capteurs, Plouzané, France[2]

Received 29 October 2009/Accepted 24 March 2010

Biofilm formation results in medical threats or economic losses and is therefore a major concern in a variety of domains. In two-species biofilms of marine bacteria grown under dynamic conditions, *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6 formed mixed biofilms with *Bacillus* sp. strain 4J6 but was largely predominant over *Paracoccus* sp. strain 4M6 and *Vibrio* sp. strain D01. The supernatant of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 liquid culture (SN_{3J6}) was devoid of antibacterial activity against free-living *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01 cells, but it impaired their ability to grow as single-species biofilms and led to higher percentages of nonviable cells in 48-h biofilms. Antibiofilm molecules of SN_{3J6} were able to coat the glass surfaces used to grow biofilms and reduced bacterial attachment about 2-fold, which might partly explain the biofilm formation defect but not the loss of cell viability. SN_{3J6} had a wide spectrum of activity since it affected all Gram-negative marine strains tested except other *Pseudoalteromonas* strains. Biofilm biovolumes of the sensitive strains were reduced 3- to 530-fold, and the percentages of nonviable cells were increased 3- to 225-fold. Interestingly, SN_{3J6} also impaired biofilm formation by three strains belonging to the human-pathogenic species *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli*. Such an antibiofilm activity is original and opens up a variety of applications for *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and/or its active exoproducts in biofilm prevention strategies.

Biofilms are defined as microbial communities of cells that are irreversibly attached to a substratum, to an interface, or to each other and are embedded into a matrix of extracellular polymeric substances that they have produced (8). It is now considered that most (if not all) bacteria are capable of forming biofilms and that this is their predominant bacterial lifestyle. Biofilm formation is a complex biological phenomenon and has been generally described as a temporal process involving a succession of distinct stages: a reversible and then irreversible attachment of planktonic bacteria onto a surface, the formation of microcolonies either by the clonal growth of attached cells or by the active translocation of cells across the surface, the coalescence of growing microcolonies to form a macrocolony, and cell dispersal. It should, however, be noted that this developmental model still requires further experimental validation, especially concerning the possibility of a hierarchical order of genetic pathways (26). Furthermore, Karatan and Watnick (17) pointed out that there are as many different types of biofilms as there are bacteria and that a single bacterium may even make several different types of biofilms under different environmental conditions. Biofilm formation is associated with the virulence of pathogenic bacteria, and cells included within a biofilm are generally more resistant (up to 1,000-fold) to antibiotics and disinfectants than free-living bacteria (8, 26). Biofilms are therefore a major concern in medicine and in medical environments but also in all domains where their growth constitutes a source of contamination for humans or animals (food industry, cooling towers, and water pipes, etc.) or leads to economical losses (biofouling of boats and immersed structures and material biocorrosion, etc.). The development of antibiofilm strategies is therefore of major interest and currently constitutes an important field of investigation in which environmentally friendly antibiofilm molecules or organisms are highly valuable (5, 7, 9).

Marine bacteria belonging to the genus *Pseudoalteromonas* of the class *Gammaproteobacteria* are often found in association with marine eukaryotes, and their ability to produce a variety of biological activities has attracted particular attention (2, 11, 13, 15, 28). We previously isolated marine bacteria attached to solid surfaces (glass in most cases) immersed for 3 or 6 h in the Morbihan Gulf or in the Bay of Brest, France (10, 20, 21, 27). Out of the three *Pseudoalteromonas* strains isolated, we were able to tag strain 3J6 with a green fluorescent protein (GFP)-encoding plasmid. This allowed us to investigate whether *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6 affected the biofilm growth of other marine bacterial isolates. Here, we report that strain 3J6 predominated in two-species biofilms over *Paracoccus* sp. strain 4M6 and *Vibrio* sp. strain D01. Although devoid of antibacterial activity against planktonic cells, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts impaired biofilm formation by *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01. We characterized the effects of these exoproducts on the latter strains and on other bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. Strain 3J6 was affiliated with the genus

* Corresponding author. Mailing address: LBCM, Université de Bretagne-Sud, BP 92116, 56321 Lorient Cédex, France. Phone: (33) 2-97-87-45-82. Fax: (33) 2-97-87-45-00. E-mail: alain.dufour@univ-ubs.fr.

‡ A.D. and E.S.-S. equally contributed to this work.

† Present address: AFSSA, BP53, 22440 Ploufragan, France.

▽ Published ahead of print on 2 April 2010.

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Origin or construction	Characteristic(s)[d]	Reference(s) and/or source
Strains			
Pseudoalteromonas sp. 3J6	Morbihan Gulf, France[a]	Wild-type strain; Sm^r	10
Paracoccus sp. 4M6	Morbihan Gulf[a]	Wild-type strain	10
Bacillus sp. 4J6	Morbihan gulf[a]	Wild-type strain	10
Vibrio sp. D01	Bay of Brest, France[b]	Wild-type strain	27
Algibacter sp. 1M6	Morbihan Gulf[a]	Wild-type strain; initially affiliated with the genus *Cytophaga*	10
Colwellia sp. 4J3	Morbihan Gulf[a]	Wild-type strain	10
Sulfitobacter sp. 8J6	Morbihan Gulf[a]	Wild-type strain	10
Vibrio sp. D66	Bay of Brest[b]	Wild-type strain	IFREMER collection
Alteromonas sp. 1J3	Morbihan Gulf[a]	Wild-type strain	LBCM[e] collection
Pseudoalteromonas sp. 3J3	Morbihan Gulf[a]	Wild-type strain	10
Pseudoalteromonas sp. D41	Bay of Brest[c]	Wild-type strain	20, 21, 27
Escherichia coli DH5α		*supE44 ΔlacU169*(ϕ*lacZ*ΔM15) *recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1*	Biomedal S.L., Spain
Pseudomonas aeruginosa $PAO1_{YFP}$	Wild-type PAO1 strain tagged with eYFP in a mini-Tn7 construct	Mini-Tn*7*(Gm)$P_{A1/04/03}$-*eyfp*-a; Gm^r	18
Escherichia coli $CC118_{DsRed}$	CC118(λpir) strain containing pUT-miniTn*5*(Gm)$P_{rrnB\ P1}$ DsRed	DsRed; Gm^r	T. Tolker-Nielsen
Salmonella enterica $MB1409_{HcRed}$	Wild-type MB1409 strain containing pBK-miniTn*7*(Km Sm)$P_{A1/04/03}$-HcRed-a	HcRed; Kan^r Cm^r	19, 25; G. Legendre
Plasmids			
pCJS10	*gfp*mut3 gene cloned into plasmid RSF1010	GFP; Cm^r	30
pRK2013	Helper plasmid for pCJS10 transfer	oriColE1 RK2-Mob^+ RK2-Tra^+; Kan^r	Biomedal S.L., Spain

[a] Isolated from a glass slide immersed for 3 or 6 h in the Morbihan Gulf, France.
[b] Isolated from a glass slide immersed for 6 h in the Bay of Brest, France.
[c] Isolated from a Teflon coupon immersed for 24 h in the Bay of Brest, France.
[d] Cm^r, chloramphenicol resistance; Kan^r, kanamycin resistance; Sm^r, streptomycin resistance; Gm^r, gentamicin resistance.
[e] LBCM, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, Université de Bretagne-Sud, France.

Pseudoalteromonas (10). Its 16S rRNA gene sequence (GenBank accession number FJ966949) is most closely related (95.5% identity) to that of *Pseudoalteromonas* sp. strain SM9913, which belongs to a newly discovered species (28). *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and most of the strains from marine origin that we used were isolated from the same location in the Morbihan Gulf within a 2-month period (10) and therefore shared the same natural habitat. Marine bacteria were grown in Vaatanen nine-salt solution (VNSS) (24) at 20°C with shaking (120 rpm). *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was selected, when required, with 200 μg ml^{-1} streptomycin, and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) was grown with 125 μg ml^{-1} chloramphenicol. *Escherichia coli* DH5α cells containing pCJS10 or pRK2013 were grown at 37°C with shaking (180 rpm) in Luria-Bertani (LB) broth containing 50 μg ml^{-1} chloramphenicol or kanamycin, respectively. *Pseudomonas aeruginosa* $PAO1_{YFP}$, *E. coli* $CC118_{DsRed}$, and *Salmonella enterica* $MB1409_{HcRed}$ were grown with shaking (180 rpm) at 37°C in LB medium (34) supplemented with 50 μg ml^{-1} gentamicin, 15 μg ml^{-1} gentamicin, and a mix of 50 μg ml^{-1} kanamycin and 10 μg ml^{-1} chloramphenicol, respectively.

***Pseudoalteromonas* sp. 3J6 tagging.** Chloramphenicol-resistant plasmid pCJS10 (30) carrying the *gfp*mut3 gene, which encodes a GFP (3), was introduced into *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (streptomycin resistant) by conjugation using *E. coli* DH5α(pCJS10) and *E. coli* DH5α(pRK2013) as donor and helper strains, respectively. Triparental conjugation was carried out as described previously by Rao et al. (30), and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 transconjugants were isolated on VNSS agar plates containing chloramphenicol and streptomycin.

Biofilm formation. Biofilms were grown in continuous-culture three-channel flow cells (channel dimensions, 1 by 4 by 40 mm). The system was assembled and prepared as previously described (36). The substratum was an st1 microscope coverslip (VWR International, Fontenay sous Bois, France). Channels were inoculated with bacterial cultures grown overnight, which were diluted to a final optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.25 after three washes in filtered marine water (FMW) for marine bacteria or in 0.9% NaCl for the other strains. To obtain FMW, seawater from Kernevel Harbor (Larmor Plage, France) was sterilized first by filtration through a membrane with pores of a 0.22-μm diameter and then by autoclaving at 121°C for 20 min. Bacteria were allowed to attach to the glass surface during 2 h at 20°C under static conditions. Biofilm growth was then performed under a constant flow of VNSS or LB medium (0.2 mm s^{-1}) for 48 h at 20°C.

In the case of two-species biofilms, channels were inoculated with a mixture of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and one of the other strains in a ratio leading to a similar attachment of each strain to the glass surface (i.e., similar percentages of the glass surface covered by each strain) after the 2-h adhesion step. This ratio was 1:1 for all strain couples except for *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Bacillus* sp. strain 4J6, which needed a 1:4 ratio.

To investigate the effects of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts on adhesion and biofilm formation by other bacteria, these bacteria were diluted to an OD_{600} of 0.25 in SN_{3J6}. The latter is a supernatant of a liquid culture of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 grown overnight that was sterilized by filtration through a membrane with pores with a 0.22-μm diameter. Bacteria diluted in SN_{3J6} were then inoculated in flow cell channels, and the 2-h adhesion step under static conditions followed by biofilm growth under a flow of fresh VNSS medium was performed as described above. For a better understanding of the SN_{3J6} action, we modified our procedure as follows: (i) bacteria at an OD_{600} of 0.25 were incubated with SN_{3J6} outside flow cell channels for 2 h at 20°C with shaking at 120 rpm, were washed twice in FMW, and were then inoculated into channels, or (ii) SN_{3J6} was injected without any bacterium into flow cell channels, was left for 2 h at 20°C to coat the glass surface, and the channels were then rinsed with FMW before inoculating bacteria.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analyses. Microscopic observations were performed with a TCS-SP2 system (Leica Microsystems, Germany) by using a 63× oil immersion objective. To study the attachment of each strain to the glass surface after the 2-h adhesion step, a VNSS flow (0.2 mm s^{-1}) was applied for 15 min to remove planktonic cells, and attached bacteria were observed. The glass surfaces covered by bacteria were evaluated by using Image Tool software (University of Texas Health Science Center at San Antonio). Biofilms were observed by monitoring the GFP fluorescence of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) (excitation wavelength [λ], 488 nm; emission λ, 510 nm) or after a 10-min incubation with 5 μM Syto 61 red nucleic acid stain (excitation and emission λ, 633 and 645 nm, respectively). For cell viability assays, bacteria were stained with 5 μM Syto 61 red and 0.5 μM Sytox green (excitation and emission λ, 488 and 510 nm, respectively). The fluorescences of *P. aeruginosa* $PAO1_{YFP}$, *E. coli* $CC118_{DsRed}$, and *S. enterica* $MB1409_{HcRed}$ were detected at 535, 590, and 647 nm, respectively. Images were obtained by using Leica confocal software, and biofilm stacks were analyzed with COMSTAT

TABLE 2. Quantitative PCR primers and TaqMan probes used in this study

Primer or probe	Sequence (5′→3′)[a]	Target
Primers		
3J6 F	CGAACTGGCAAACTAGAGTGTGAG	*Pseudoalteromonas* sp. 3J6
3J6 R	CCGAGGCTCCGAGCTTCTA	
D01 F	TGAAACTGGTGAACTAGAGTGCTGT	*Vibrio* sp. D01
D01 R	CTCAAGGCCACAACCTCCA	
4J6 F	CAACCGTGGAGGGTCATTG	*Bacillus* sp. 4J6
4J6 R	GCGGAAACCCTCTAACACCTT	
4M6 F	TGGAACTGCCTTTGAAACTATCAG	*Paracoccus* sp. 4M6
4M6 R	CATGCTTGCCGACGTCTG	
TaqMan probes		
AD3J6	VIC-CACTGACGCTCATGTAC-MGB-NFQ	*Pseudoalteromonas* sp. 3J6
ADD01	6-FAM-CTGACACTCAGATGCGA-MGB-NFQ	*Vibrio* sp. D01
AD4J6	6-FAM-TTCGCGCCTCAGTGTCA-MGB-NFQ	*Bacillus* sp. 4J6

[a] VIC and 6-FAM (6-carboxyfluorescein) are fluorescent dyes. MGB, minor-groove binder; NFQ, nonfluorescent quencher.

software (12). The calculated parameters were the maximal and average thicknesses of the biofilms and the biovolume, which is the volume of bacteria (in μm^3) per μm^2 of glass surface. The results are representative of at least two independent experiments from which a total of 12 to 18 image stacks were obtained.

Determination of strain proportions in two-species biofilms by qPCR. Two-species biofilms were grown as described above except that we used BST FC 81 flow cells (BioSurface Technologies, MT) with channel dimensions of 50.8 by 12.7 by 2.54 mm. These flow cells were chosen because they were easily disassembled, allowing total bacterial DNA extraction from biofilms using the DNeasy tissue kit (Qiagen, Germany). The same kit was used to extract bacterial DNA from planktonic cells for control experiments. Quantitative PCR (qPCR) was performed by using primers targeting the 16S rRNA gene sequences (Table 2). The PCR products were detected with SYBR green stain or with TaqMan probes (Table 2). Primers and TaqMan probes were custom synthesized by Eurogentec (Belgium) and Applied Biosystems (Foster City, CA), respectively. The reactions (25-μl reaction mixtures) were performed in triplicate with the 7300 real-time PCR system apparatus (Applied Biosystems). The reaction mixture contained between 0.001 and 10 ng of DNA, 300 nM each primer, and either 12.5 μl of SYBR green PCR master mix (including AmpliTaq gold DNA polymerase; Applied Biosystems) or 200 nM TaqMan probes and 12.5 μl of the TaqMan Universal PCR master mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems). The PCR conditions were 50°C for 2 min and 95°C for 10 min for polymerase activation, followed by 40 cycles at 95°C and 60°C for 15 and 60 s, respectively. ROX dye (Applied Biosystems) was used as a passive reference to normalize the non-PCR-related fluorescence variations. Each qPCR was performed in triplicate, and the standard deviations were lower than a C_T (threshold cycle) value of 0.15. Each primer pair was validated by verifying that the PCR efficiency was above 0.95 and that a single PCR product with the expected melting temperature (T_m) was obtained. The DNA of a given strain in the sample was quantified by reporting the C_T on a standard curve [C_T = f(log DNA amount)] obtained with serial dilutions of total DNA extracted from a pure culture of the corresponding strain (22). For each analysis, total DNAs were extracted from two different biofilms, and the two samples were analyzed independently.

Liquid cocultures of bacteria and population analyses. *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Vibrio* sp. D01 were each inoculated into VNSS medium at an OD_{600} of 0.25, and bacteria were grown for 24 h at 20°C with shaking. Dilutions were then plated onto VNSS agar without antibiotic (total cell count) and onto VNSS agar containing both streptomycin and chloramphenicol to select *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10). The numbers of total CFU and of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) CFU per ml allowed the calculation of the percentages of each of the two strains in a coculture. Experiments were performed three times.

Concentration of antibiofilm activity. Two hundred milliliters of SN_{3J6} was passed through a Sep-Pak Plus C_{18} cartridge (Waters Corporation, Milford, MA). The cartridge was rinsed three times with water, and the antibiofilm molecules were eluted with 50 ml of 50% acetonitrile. The solvent was evaporated by using a rotary evaporator under a vacuum at 35°C. The residues were dissolved in 2 ml of phosphate-buffered saline (8.0 g $liter^{-1}$ NaCl, 0.2 g $liter^{-1}$ KCl, 1.44 g $liter^{-1}$ Na_2HPO_4, 0.24 g $liter^{-1}$ KH_2PO_4 [pH 7.4]) and sterilized by filtration through a membrane with 0.22-μm pores. A 10^{-3} dilution of this preparation prevented *Paracoccus* sp. 4M6 biofilm formation as efficiently as undiluted SN_{3J6}, whereas a 10^{-1} dilution of SN_{3J6} displayed a significantly reduced antibiofilm activity. This showed that the antibiofilm activity was concentrated at least 100-fold after elution from the C_{18} cartridge. No antibiofilm activity was observed with a preparation resulting from the passage of VNSS culture medium on a C_{18} cartridge.

Bacteriocin-like activity tests. We used the culture supernatant diffusion method (33), in which SN_{3J6} was loaded into wells of VNSS agar plates seeded with *Vibrio* sp. D01 or *Paracoccus* sp. 4M6. The plates were incubated at 20°C for 24 to 48 h to allow the diffusion of SN_{3J6} molecules from the wells into the agar medium and the growth of *Vibrio* sp. D01 or *Paracoccus* sp. 4M6. The presence of a bacteriocin-like molecule in SN_{3J6} would lead to clear halos of bacterial growth inhibition around the wells. Alternatively, disks soaked with SN_{3J6} were placed onto the seeded agar medium instead of using wells. This disk assay was also used to test the antimicrobial activity of antibiofilm molecules, which had been concentrated as described above.

RESULTS

Single-species biofilms of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and three other marine bacteria. We first introduced GFP-encoding plasmid pCJS10 (Table 1) into *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 as described in Materials and Methods. This fluorescent tagging allowed the observation of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 biofilms by confocal laser scanning microscopy (CLSM) without further staining of the cells. Since bacteria in a biofilm are generally more antibiotic resistant than planktonic cells, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) biofilms were grown without antibiotic (liquid precultures were performed in the presence of chloramphenicol). This required that pCJS10 was stably maintained in the strain without selective pressure. Biofilms grown in a flow cell under dynamic conditions for 48 h were observed using CLSM by detecting the green fluorescence of GFP (Fig. 1A) and after staining bacteria with Syto 61 red and detecting red fluorescence. When the resulting images were overlaid, GFP-producing cells were yellow (overlay of green and red) or green, whereas GFP-free bacteria were red. Figure 1B shows very few red-stained patches of cells, indicating that the vast majority of bacteria were GFP producers and had thus retained pCJS10. This plasmid is therefore suitable for

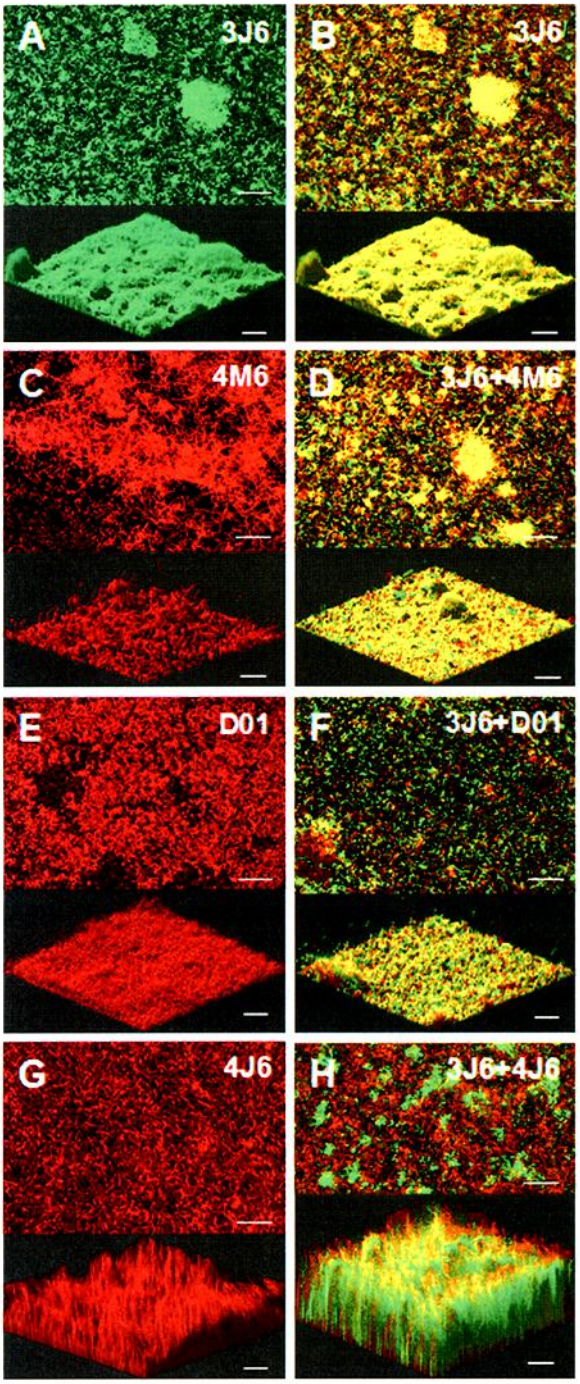


FIG. 1. CLSM images of single- and two-species biofilms. Biofilms were grown on glass surfaces at 20°C for 48 h under a flow of VNSS medium. Single-species biofilms of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) (A and B), *Paracoccus* sp. 4M6 (C), *Vibrio* sp. D01 (E), and *Bacillus* sp. 4J6 (G) are shown. The *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) biofilm was visualized by detecting only the GFP fluorescence (A) and by staining the cells with Syto 61 red and overlaying the GFP and the Syto 61 red fluorescences (B). The other single-species biofilms were stained with Syto 61 red (C, E, and G). Two-species biofilms resulted from coinoculations of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Paracoccus* sp. 4M6 (D), *Vibrio* sp. D01 (F), or *Bacillus* sp. 4J6 (H). Overlays of GFP fluorescence from *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and of Syto 61 red fluorescence from all cells of the biofilms are displayed (D, F, and H). Maximal projections in the *xy* plane (top of each panel) and three-dimensional (3D) shadow projections (bottom of each panel) are presented. Bars, 30 μm.

TABLE 3. COMSTAT analyses of single- and two-species biofilms after 48 h of growth

Biofilm	Max thickness (μm)[a]	Avg thickness (μm)[a]	Biovolume ($\mu m^3/\mu m^2$)[a]
Single species			
3J6(pCJS10)	21	4.8	2.6
4M6	68	8.2	2.6
D01	34	8.7	5.4
4J6	76	19.0	10.4
Two species			
3J6(pCJS10) + 4M6	24	2.5	2.5
3J6(pCJS10) + D01	44	5.8	4.6
3J6(pCJS10) + 4J6	92	12.0	17.6

[a] Averages of data from three independent experiments, with standard deviations lower than 10% of each value.

our study. *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) biofilms were heterogeneous, with the presence of protruding mushroom-like microcolonies, which were up to 21 μm high, whereas the average thickness of the biofilms was 4.8 μm (Fig. 1A and B and Table 3).

We failed to introduce pCJS10 and other plasmids encoding fluorescent proteins into our model strains *Paracoccus* sp. 4M6, *Vibrio* sp. D01, and *Bacillus* sp. 4J6. We nevertheless grew single-species biofilms of these strains under the same conditions as those described above and stained them with Syto 61 red prior to CLSM observation (Fig. 1C, E, and G). Each of these three strains led to thicker biofilms than those of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) (Table 3). *Paracoccus* sp. 4M6 biofilms were heterogeneous and contained cell aggregates but no mushroom-like structure (Fig. 1C). They were 1.7-fold thicker on average than *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) biofilms, while their biovolumes were identical (Table 3), indicating that cell density is lower in *Paracoccus* sp. 4M6 biofilms. Although not flat, *Vibrio* sp. D01 biofilms were less heterogeneous: they were devoid of mushroom-like structure, and cell aggregates were less obvious (Fig. 1E). Their average thickness and biovolume were 1.8- and 2-fold higher, respectively, than those of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) biofilms (Table 3). The *Bacillus* sp. 4J6 biofilms were the thickest, which led to the highest biovolume, and they displayed a hairy surface, although they contained homogeneously distributed cells (Fig. 1G and Table 3). Under our conditions, each of the four strains was therefore able to develop a single-species biofilm with a specific structure.

***Pseudoalteromonas* sp. 3J6 inhibits the development of *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01 in two-species biofilms.** The GFP tagging of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 allowed the growing of two-species biofilms with any unlabeled strain and distinguishing between the two strains by staining biofilms with Syto

TABLE 4. Quantification of each strain in two-species biofilms

Strain	Proportion of each strain (%)	
	Biofilm biovolume[a]	qPCR analyses[b]
3J6(pCJS10)-4M6 biofilms		
3J6(pCJS10)	84	89
4M6	16	11
3J6(pCJS10)-D01 biofilms		
3J6(pCJS10)	76	95
D01	24	5
3J6(pCJS10)-4J6 biofilms		
3J6(pCJS10)	35	62
4J6	65	38

[a] Biovolumes were obtained by COMSTAT analyses performed for three independent experiments, with standard deviations lower than 10% of each value.

[b] For each biofilm analysis, total DNAs were extracted from two different biofilms, and the two samples were analyzed independently, with standard deviations lower than 10% of each value.

61 red and overlaying green and red fluorescences. The coinoculation of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Bacillus* sp. 4J6 led to biofilms in which each strain was abundant: the biofilms consisted of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) aggregates (green-yellow) surrounded by *Bacillus* sp. 4J6 cells (red) (Fig. 1H). Furthermore, the biofilm thickness and biovolume were closer to those of *Bacillus* sp. 4J6 single-species biofilms than to those of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) biofilms (Table 3). In contrast, when *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) was coinoculated with either *Paracoccus* sp. 4M6 or *Vibrio* sp. D01, the resulting biofilms contained only few red cells and were similar to single-species *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) biofilms, in particular with the presence of mushroom-like structures (compare Fig. 1D and F to B). This suggested that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) was the predominant strain in these biofilms. This visual impression was confirmed by determining the biovolume of each strain within the two-species biofilms using COMSTAT software: *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) was estimated to account for 76 and 84% of the total biovolumes in mixed biofilms including *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6, respectively (Table 4). On the other hand, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) accounted for only 35% of the total biovolume in *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10)-*Bacillus* sp. 4J6 biofilms (Table 4).

To ascertain the proportion of each strain in two-species biofilms, we set up qPCR assays using primers targeting the 16S rRNA genes sequences of the four strains (Table 2). To validate the assays, total DNAs independently extracted from pure liquid cultures of the four strains were mixed in known ratios (1:1 and 9:1), and values close to these ratios had to be obtained by qPCR analyses. When studying a mix of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Paracoccus* sp. 4M6 DNAs, the corresponding primers were specific enough for each strain to be detected by using SYBR green dye. Analyses of mixes including *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) DNA and either *Vibrio* sp. D01 or *Bacillus* sp. 4J6 DNAs required the use of TaqMan probes (Table 2) to more specifically detect the amplicons resulting from each strain. Two-species biofilms were then grown, total DNAs were extracted from each biofilm, and the proportion of each DNA was determined by qPCR. These assays strengthened the above-described conclusions, confirming (i) the codevelopment of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Bacillus* sp. 4J6 in mixed biofilms, since *Bacillus* DNA represented almost 40% of total DNA, and (ii) that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) cells were largely prevailing (89 and 95% of total DNA) over *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01 cells in two-species biofilms (Table 4).

Pseudoalteromonas sp. 3J6(pCJS10) therefore inhibited the growth of *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6, but not that of *Bacillus* sp. 4J6, in two-species biofilms. This could not be correlated simply to the growth parameters of the strains: *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) displayed a doubling time of 53 min in liquid VNSS culture at 20°C, whereas doubling times of *Vibrio* sp. D01, *Paracoccus* sp. 4M6, and *Bacillus* sp. 4J6 were 55, 160, and 80 min, respectively. Under our conditions, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) was therefore unlikely to outcompete *Vibrio* sp. D01 because of faster growth. This was confirmed by liquid cocultures of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Vibrio* sp. D01: after 24 h of growth, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) accounted for about 50% of the total cultivable cell population. This furthermore indicated that the negative effect of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 on *Vibrio* sp. D01 growth occurred specifically in biofilms.

***Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts inhibit the formation of *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01 biofilms.** We examined whether the supernatants of liquid *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) cultures (SN_{3J6}) affected *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6 biofilm formation. These two strains were independently resuspended either in filtered marine water (FMW) as positive controls or in SN_{3J6}. The bacterial suspensions were introduced into flow cell chambers and incubated for 2 h at 20°C to allow bacterial attachment onto the glass surface (a control experiment in which FMW was replaced with fresh VNSS medium showed that the VNSS components of SN_{3J6} did not affect bacterial attachment). Flows of VNSS medium free of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts were then applied for 48 h to allow biofilm formation. The incubation of *Vibrio* sp. D01 or *Paracoccus* sp. 4M6 cells with SN_{3J6} strongly impaired the ability of *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01 to develop single-species biofilms (compare Fig. 2C and D to A and B): the residual biovolumes were about 14 and 5%, respectively, of the SN_{3J6}-free positive-control biovolumes (Table 5). In subsequent experiments, we attempted to identify at which level(s) SN_{3J6} is acting.

SN_{3J6} moderately affects bacterial attachment. The glass surfaces covered by bacteria were determined after a 2-h step of adhesion in the presence or absence of SN_{3J6}. The coverages of these surfaces were about 2-fold lower in the presence of SN_{3J6} (Fig. 3). However, this effect seems too mild to fully explain the subsequent inability of the attached bacteria to develop biofilms. We furthermore observed that the presence of SN_{3J6} during the attachment step did not favor the detachment of bacteria after the application of the medium flow (data not shown).

SN_{3J6} is devoid of bactericidal activity against free-living cells. We examined whether SN_{3J6} contained a bacteriocin-like inhibitory substance by using two classical methods (diffusion into agar medium from wells or disks) as described in Mate-

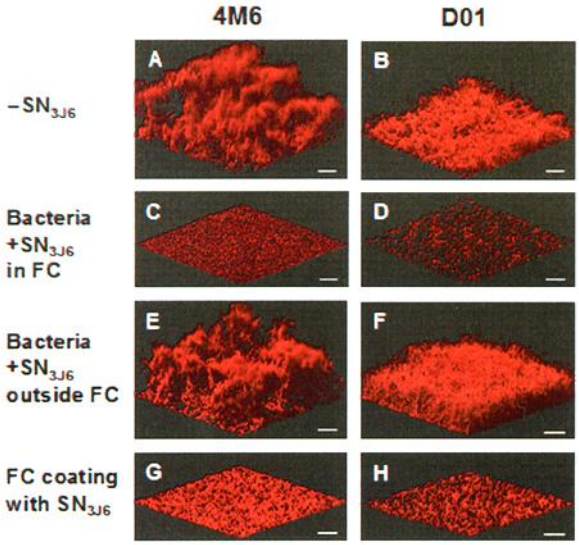


FIG. 2. Activity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 culture supernatant (SN_{3J6}) on biofilm formation by *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01. (A to D) Biofilms of *Paracoccus* sp. 4M6 (left) and *Vibrio* sp. D01 (right) were grown in flow cells (FC) for 48 h after a 2-h adhesion step in flow cells without SN_{3J6} (A and B) or in the presence of SN_{3J6} (C and D). (E to H) Alternatively, bacteria were incubated with SN_{3J6} outside the flow cell and washed prior to inoculation (E and F), or the flow cell glass coverslip was coated with SN_{3J6} and washed before inoculation of SN_{3J6}-free bacteria (G and H). Biofilms were stained with Syto 61 red. A 3D shadow projection is shown for each biofilm. Bars, 30 μm.

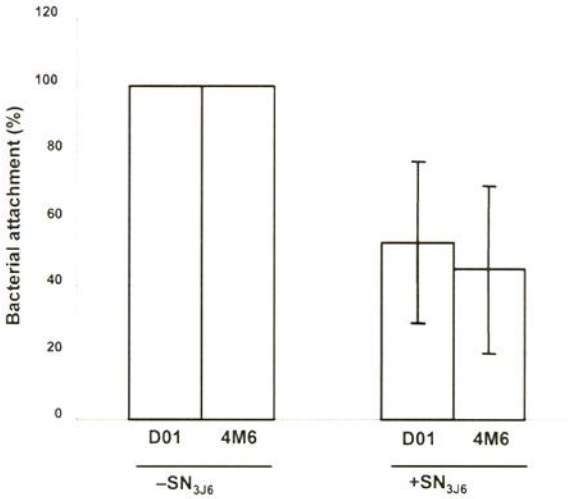


FIG. 3. Effect of SN_{3J6} on bacterial adhesion at 20°C. *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6 were incubated for 2 h under static conditions in flow cell channels in the presence or absence of SN_{3J6}. CLSM images of attached bacteria were recorded, and the glass surfaces covered by attached bacteria were calculated by using Image Tool software and normalized relative to the values obtained in the absence of SN_{3J6}, which were set to 100%. Each experiment was performed twice, and the bacterial attachment was determined for eight different sites of each glass slide. The bars indicate the standard deviations, which were too small to be visible in the absence of SN_{3J6}.

rials and Methods. We failed to observe any clear halo of inhibition around the wells or the disks, indicating that SN_{3J6} was neither bactericidal nor bacteriostatic toward *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6. Consistently, the addition of 4.5 ml of SN_{3J6} to 0.5 ml of fresh liquid 10× VNSS medium before the inoculation of *Vibrio* sp. D01 or *Paracoccus* sp. 4M6 did not prevent the growth of these two strains. After 24 h of growth, the numbers of *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6 CFU were 88 and 94%, respectively, of those of control cultures in SN_{3J6}-free VNSS. Furthermore, we used double staining with Syto 61 red (staining of all bacteria) and Sytox green (staining of only bacteria with damaged membranes, which are therefore

TABLE 5. Characteristics of single-species biofilms obtained without SN_{3J6} or in the presence of SN_{3J6} during the adhesion step

Group and strain[a]	Max thickness (μm)[b]		Biovolume ($\mu m^3/\mu m^2$)[b]		Nonviable cells (%)[b]	
	− SN_{3J6}	+ SN_{3J6}	− SN_{3J6}	+ SN_{3J6}	− SN_{3J6}	+ SN_{3J6}
1						
Algibacter sp. 1M6	44.6	7.4	15.9	0.03	0.4	89
2						
Paracoccus sp. 4M6	95.0	13.2	6.1	0.88	1.2	100
Vibrio sp. D01	45.2	16	14.2	0.68	13	78
Colwellia sp. 4J3	28.7	11.3	5.9	0.27	25	97
3						
Sulfitobacter sp. 8J6	14.4	9.0	2.0	0.66	29	8.9
Vibrio sp. D66	122	46.8	15.2	1.9	3.7	2.5
4						
Alteromonas sp. 1J3	14.5	16.9	3.2	2.9	8.5	80
5						
Pseudoalteromonas sp. 3J3	10.4	14.5	3.9	3.7	46	36
Pseudoalteromonas sp. D41	11.8	10.2	2.1	1.9	0.6	12.2

[a] Groups were defined according to the sensitivity of each strain to SN_{3J6} (see text for details).
[b] COMSTAT analyses were performed for three independent experiments, and standard deviations were lower than 10% of each value.

considered nonviable bacteria) on bacteria attached to the glass surface after a 2-h adhesion step. This showed that the presence of SN_{3J6} during this step did not decrease the percentage of viable bacteria (about 90% and 100% of viable *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6, respectively, with or without SN_{3J6}). This set of experiments indicated that the antibiofilm action of SN_{3J6} did not result from a bactericidal activity exerted during the 2-h contact between SN_{3J6} and the bacteria (adhesion step). To ascertain this conclusion, *Vibrio* sp. D01 or *Paracoccus* sp. 4M6 cells were incubated in SN_{3J6} for 2 h at 20°C and then washed and resuspended in FMW, and the cell suspensions were injected into flow cell chambers. As in previous experiments, a 2-h adhesion step was then performed, and biofilms were allowed to grow under a VNSS flow for 48 h. This led to full biofilm formation (Fig. 2E and F), showing that the incubation of bacteria with SN_{3J6} outside the flow cell chamber had no effect on the ability of the bacteria to subsequently form a biofilm. Finally, we used a C_{18} cartridge to concentrate the antibiofilm activity from SN_{3J6} at least 100-fold. This preparation also failed to display a bactericidal activity using the disk assay, invalidating the possibility that SN_{3J6} would contain a subinhibitory concentration of a bacteriocin-like molecule, which would nevertheless be responsible for the antibiofilm activity.

Glass-coating ability of antibiofilm components of SN_{3J6}. Since SN_{3J6} did not reduce cell viability during the adhesion step and only mildly affected cell attachment, it was likely to act during biofilm formation, i.e., after applying the flow of VNSS medium, although this flow is removing SN_{3J6} as well as unattached cells. This suggested that antibiofilm components of SN_{3J6} could coat the glass surface during the adhesion step. This hypothesis was tested by the incubation of SN_{3J6} for 2 h in flow cell chambers without bacteria before extensively rinsing the chambers with FMW and inoculating them with *Vibrio* sp. D01 or *Paracoccus* sp. 4M6 cells in the absence of SN_{3J6}. This impaired the biofilm formation by the two strains almost as efficiently as the presence of SN_{3J6} with the bacteria during the adhesion step (compare Fig. 2G and H to C and D). The coating of the glass surface by antibiofilm components of SN_{3J6} explains how these components can act during biofilm growth, even though SN_{3J6} was removed from the flow cell chambers after the adhesion step by the medium flow.

SN_{3J6}-dependent reduction of cell viability in biofilms. As described above, various approaches led to the conclusion that SN_{3J6} was not bactericidal toward *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6 and that its antibiofilm action was not resulting from a bactericidal activity exerted during the adhesion step. We therefore expected that SN_{3J6} would not affect the viability of cells within the subsequently obtained biofilms. We nevertheless assessed the bacterial viability in 48-h biofilms by using Syto 61 red/Sytox green double staining. Whereas control biofilms of *Paracoccus* sp. 4M6 contained only 1.2% nonviable cells, we were surprised to observe that none of the cells were viable in biofilms obtained after incubation with SN_{3J6} (Table 5). Although not as pronounced, this effect was also observed with *Vibrio* sp. D01: control biofilms contained 13% nonviable cells, while this value reached 78% when cells had been incubated with SN_{3J6} (Table 5). SN_{3J6} therefore led to a loss of cell viability occurring in a biofilm-specific manner.

SN_{3J6} antibiofilm activity against other marine bacterial isolates. We examined whether SN_{3J6} acts on a larger variety of marine bacteria. Five groups of bacteria could be distinguished (Table 5).

Group 1 contains only the most sensitive strain of the whole study, *Algibacter* sp. strain 1M6: SN_{3J6} abolished its ability to develop a biofilm covering the glass surface, and the biovolume of the dispersed cell clusters attached to the glass surface was 530-fold lower than the biovolume of control biofilms. Furthermore, SN_{3J6} treatment led to a dramatic drop of cell viability after 48 h of biofilm growth.

Group 2 includes strains strongly impaired by SN_{3J6} in their ability to form biofilms (biovolumes 6.9- to 22-fold lower) and in the viability of biofilm bacteria. This group contains *Colwellia* sp. strain 4J3 in addition to *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01.

Group 3 consists of *Vibrio* sp. D66 and *Sulfitobacter* sp. strain 8J6, the biofilm formation of which was strongly or mildly inhibited by SN_{3J6} (biovolumes 3- to 8-fold lower), while SN_{3J6} did not lead to higher percentages of nonviable cells in biofilms (the percentage of nonviable *Sulfitobacter* sp. 8J6 cells was even 3.2-fold lower in biofilms obtained after incubation with SN_{3J6}).

Group 4 is defined by *Alteromonas* sp. strain 1J3, which was unaffected in its ability to form biofilms, although incubation with SN_{3J6} resulted in a 9.4-fold-higher percentage of nonviable cells within the biofilms.

Group 5 is composed of fully nonsensitive isolates, i.e., the two *Pseudoalteromonas* sp. strains 3J3 and D41: they were essentially unaffected by SN_{3J6} in their ability to develop biofilms, and SN_{3J6} either failed to increase the percentage of nonviable cells in biofilms (3J3) or increased it to only 12% (D41).

Altogether, most of the tested isolates were affected: SN_{3J6} impaired the biofilm formation of six strains (groups 1, 2, and 3) out of nine and led to an increase in the percentages of nonviable cells from the 0.4-to-29% range to 78 to 100% in biofilms of five strains (groups 1, 2, and 4). Groups 3 and 4 showed that the antibiofilm action of SN_{3J6} and the loss of cell viability in biofilms can occur independently from each other. Interestingly, the two nonsensitive isolates (group 5) belong to the same genus as strain 3J6, *Pseudoalteromonas*. Although the number of tested strains remains small, these data suggest that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 allows the growth of *Pseudoalteromonas* in marine biofilms while impairing the biofilm development of a variety of other marine bacteria. The sensitive strains indeed displayed various taxonomic relationships with the genus *Pseudoalteromonas*: they belong to the same class and order (*Gammaproteobacteria* and *Alteromonadales* in the cases of *Alteromonas* sp. 1J3 and *Colwellia* sp. 4J3), to a different order (*Vibrionales* for *Vibrio* sp. D01 and D66) of the same class, to a different class (*Alphaproteobacteria* for *Paracoccus* sp. 4M6 and *Sulfitobacter* sp. 8J6), or even to a different superphylum (*Bacteroidetes*/*Chlorobi* group for *Algibacter* 1M6).

SN_{3J6} antibiofilm activity against human pathogens. We furthermore examined the effect of SN_{3J6} on bacteria belonging to the human pathogen species *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli*. These bacteria belong to the same class as *Pseudoalteromonas* (*Gammaproteobacteria*) but to different orders (*Pseudomonadales* for

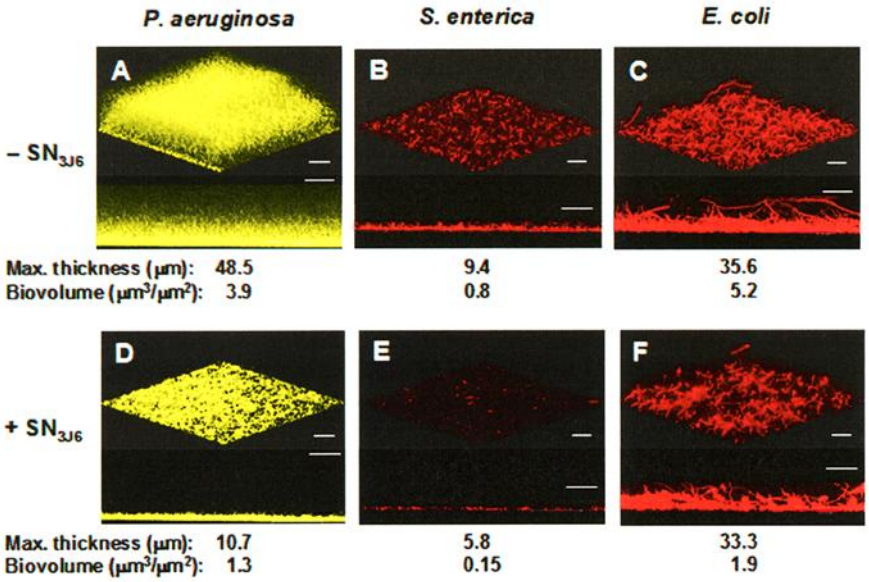


FIG. 4. Effect of SN_{3J6} on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli*. Biofilms of *P. aeruginosa* $PAO1_{YFP}$ (A and D), *Salmonella enterica* $MB1409_{HcRed}$ (B and E), and *Escherichia coli* $CC118_{DsRed}$ (C and F) were grown at 20°C for 48 h in LB broth after a 2-h adhesion step without SN_{3J6} (A, B, and C) or in the presence of SN_{3J6} (D, E, and F). The yellow (eYFP) or red (HcRed or DsRed) fluorescent protein produced by each strain was detected. A 3D shadow representation and a side-view projection are shown on the top and bottom, respectively, of each panel. For each experiment, maximal thicknesses and biovolumes were calculated from COMSTAT analyses of 12 to 18 image stacks obtained from at least two independent biofilms. Standard deviations were lower than 10% of the values. Bars, 30 μm.

Pseudomonas and *Enterobacteriales* for *Salmonella* and *Escherichia*). We used strains tagged by genes encoding a yellow fluorescent protein (enhanced yellow fluorescent protein [eYFP]) or red fluorescent protein (HcRed or DsRed) in order to visualize biofilms without the addition of fluorescent dye. Consistently with its wide spectrum of action described above, SN_{3J6} impaired the biofilm formation of all three strains: the biovolumes of *P. aeruginosa* $PAO1_{YFP}$, *S. enterica* $MB1409_{HcRed}$, and *E. coli* $CC118_{DsRed}$ biofilms were 3-, 5.3-, and 2.7-fold lower, respectively, when the adhesion step was performed in the presence of SN_{3J6} (Fig. 4). CLSM images showed that these reductions in biovolume resulted from peculiar effects on *P. aeruginosa* and *E. coli*. *P. aeruginosa* $PAO1_{YFP}$ control biofilms (about 50 μm thick) were not homogeneous with respect to the cell density: it was high in the base of the biofilms, from which it decreased progressively in the upper part (Fig. 4A). This finding suggested that cells were embedded into increasing amounts of extracellular matrix from the base to the top of the biofilms. In contrast, the biofilm resulting from incubation with SN_{3J6} was thinner (about 5-fold) but homogeneous, with a high cell density, which led to a relatively high biovolume (Fig. 4D). *P. aeruginosa* $PAO1_{YFP}$ biofilm formation was therefore more impaired by SN_{3J6} than indicated by the sole biovolume comparison. On the other hand, SN_{3J6}-resulting biofilms of *E. coli* $CC118_{DsRed}$ differed from control biofilms by their biovolumes, whereas the biofilm structures and maximal thicknesses were similar (Fig. 4C and F). The biovolume reduction in *E. coli* biofilms obtained after SN_{3J6} incubation therefore resulted from a lower cell density. In this study, this is the only example of a biovolume reduction that occurred without a lowering of the biofilm maximal thickness.

DISCUSSION

We report here an antibiofilm activity exerted by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts on a wide range of Gram-negative bacteria but not on the other tested strains of the same genus. This activity leads *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 to predominate over other bacterial isolates such as *Vibrio* sp. D01 and *Paracoccus* sp. 4M6 in two-species biofilms. Marine *Pseudoalteromonas* bacteria are known as producers of a variety of biologically active extracellular compounds, including antibacterial agents that can lead to antifouling effects (2, 11, 13, 15). The best-known example is the antibacterial protein AlpP secreted by *Pseudoalteromonas tunicata* D2 (16). AlpP provides a competitive advantage to the latter for biofilm formation in the marine environment and for the colonization of the surface of the green alga *Ulva australis* (30, 31). Consistently, AlpP producer strains seem rather widespread in Northern Europe, since *P. tunica* D2 was isolated from the surface of the tunicate *Ciona intestinalis* collected from waters off the Swedish west coast (14), and the *alpP* gene was PCR amplified from marine samples collected on *Ciona intestinalis* and on the green algae *Ulva lactuca* and *Ulvaria fusca* in the waters around Aarhus, Denmark (35). AlpP furthermore mediates cell death in mature biofilms of its own producer strain, leading to the dispersal of surviving cells within the marine environment (23). *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 is unlikely to produce AlpP since

we failed to PCR amplify any *alpP* gene fragment from *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 DNA with four different primer couples (data not shown). Furthermore, the antibiofilm molecule produced by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 presents the originality of differing from AlpP and other classical antibacterial compounds by its biofilm-specific activity: SN_{3J6} displayed no antibacterial activity against *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D01 in liquid, on agar plates, or during the adhesion step, whereas SN_{3J6} impaired biofilm formation by these two strains and, more generally, by a variety of Gram-negative bacteria. Interestingly, this antibiofilm effect was accompanied in most cases by a loss of cell viability in biofilms. We propose the two following hypotheses to explain this observation. SN_{3J6} would display a direct bactericidal activity against biofilm-included cells but not against free-living cells of the same strains. This could occur if the target of the antibacterial compound is produced (or accessible) only in biofilm cells. The antibacterial agent is unlikely to be a lytic phage released by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 that targets a biofilm-specific receptor, since we did not observe any phage-like particle in SN_{3J6} by scanning electron microscopy (data not shown). In an alternative hypothesis, SN_{3J6} would act indirectly on biofilm cells, perhaps by somehow stimulating the regulated cell death that takes place during biofilm maturation and is thought to be caused by the self-destruction (suicide) of individual cells (1). Cell death contributes to normal biofilm development by leading to the release of genomic DNA, which can be a component of the biofilm extracellular matrix, and to the dispersal of surviving cells (1, 38). Although it is obvious that the loss of cell viability could contribute to the antibiofilm action of SN_{3J6}, these two phenomena occurred independently from each other in three examples (strains of groups 3 and 4) (Table 5), which suggests that none of them is the consequence of the other one.

To our knowledge, very few antibiofilm molecules secreted by bacteria and devoid of antibacterial activity against free-living cells were previously reported. *E. coli* strains producing group II capsules release a soluble polysaccharide in their environment, preventing biofilm formation by a wide range of Gram-positive and -negative bacteria (37). This polysaccharide acts both on the initial adhesion by weakening cell surface contacts and on the subsequent biofilm formation by reducing cell-cell interactions. In another study, a lipopeptide biosurfactant from a *Bacillus circulans* strain of marine origin displayed antiadhesive properties against various bacteria, but its effect on biofilm formation was not investigated (4). This finding suggests that the reduced bacterial attachment due to SN_{3J6} could result from a polysaccharidic molecule or a biosurfactant. However, this adhesion impairment might not fully account for the subsequent biofilm formation defect and does not explain the decrease in cell viability within the biofilms. Quorum sensing (QS) contributes to the control of biofilm formation either negatively in the cases of *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* or positively in the case of *Pseudomonas aeruginosa* (17). QS inhibitors are considered antipathogenic drugs, which can be used to reduce virulence and to increase biofilm susceptibility to antimicrobial compounds and human immunity cells (32), and species-specific antibiofilm molecules (9). QS signal molecules of the homoserine lactone type were previously shown to accumulate in some marine biofilms (6), and the production of a QS inhibitor(s) by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 is a possibility. It would not, however, fully explain the antibiofilm activity of SN_{3J6}, since all SN_{3J6}-sensitive strains do not share similar QS systems: *P. aeruginosa* produces several homoserine lactones, whereas *E. coli* does not use such signaling molecules. Alternatively, the antibiofilm effects of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts could be due to a novel molecule or the complementary actions of several molecules. We are currently undertaking the purification and identification of the active molecule(s) that is required to understand its (their) mode(s) of action and to more precisely define which of the potential applications can be drawn. The latter could extend from the use of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 to prevent the biofilm formation of undesirable bacteria in aquaculture or fish farming to the use of its exoproducts in antibiofilm strategies. From this point of view, several features of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts are particularly attractive: (i) the fact that, in addition to impairing biofilm growth, they lead to biofilms containing a majority of nonviable cells and (ii) their wide spectrum of action, which does not limit their use to the marine environment. Medical applications could be imagined, since this spectrum includes human pathogens such as *P. aeruginosa*, the biofilms of which are particularly difficult to reduce during chronic infection of the lungs of cystic fibrosis patients (29).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to S. Kjelleberg (University of New South Wales, Australia), T. Tolker-Nielsen (Technical University of Denmark), and L. Herman (Institute for Agricultural and Fisheries Research, Melle, Belgium) for kindly providing plasmids and strains. We thank G. Legendre (LBCM, Université de Bretagne-Sud) for HcRed tagging of *S. enterica* MB1409.

This work was funded by the GIS Europôle Mer, the GDR 2614 Biosalissures Marines, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France (doctoral fellowship to Alexandra Dheilly), the IFREMER and the Région Bretagne, France (doctoral fellowship to Géraldine L. Klein), and European FEDER.

REFERENCES

1. **Bayles, K. W.** 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. Nat. Rev. Microbiol. **5:**721–726.
2. **Bowman, J. P.** 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. Mar. Drugs **5:**220–241.
3. **Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene **173:**33–38.
4. **Das, P., S. Mukherjee, and R. Sen.** 2009. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. Colloids Surf. B Biointerfaces **71:**183–186.
5. **Dobretsov, S., H.-U. Dahms, and P.-Y. Qian.** 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. Biofouling **22:**43–54.
6. **Dobretsov, S., M. Teplitski, and V. Paul.** 2009. Quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. Biofouling **25:**413–427.
7. **Donlan, R. M.** 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. Trends Microbiol. **17:**66–72.
8. **Donlan, R. M., and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. **15:**167–193.
9. **Estrela, A. B., M. G. Heck, and W. R. Abraham.** 2009. Novel approaches to control biofilm infections. Curr. Med. Chem. **16:**1512–1530.
10. **Grasland, B., R. Briandet, E. Quemener, T. Meylheuc, K. Vallée-Réhel, and D. Haras.** 2003. Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. Biofouling **19:**307–313.
11. **Hayashida-Soiza, G., A. Uchida, N. Mori, Y. Kuwahara, and Y. Ishida.** 2008. Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. J. Appl. Microbiol. **105:**1672–1677.
12. **Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersboll, and S. Molin.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology **146:**2395–2407.

13. **Holmström, C., and S. Kjelleberg.** 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiol. Ecol. **30:**285–293.
14. **Holmström, C., D. Rittschof, and S. Kjelleberg.** 1992. Inhibition of settlement by larvae of *Balanus amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a surface-colonizing marine bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **58:**2111–2115.
15. **Holmström, C., S. Egan, A. Franks, S. McCloy, and S. Kjelleberg.** 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS Microbiol. Ecol. **41:**47–58.
16. **James, S. G., C. Holmström, and S. Kjelleberg.** 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. Appl. Environ. Microbiol. **62:**2783–2788.
17. **Karatan, E., and P. Watnick.** 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **73:**310–347.
18. **Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jørgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Mol. Microbiol. **48:**1511–1524.
19. **Lambertsen, L., C. Sternberg, and S. Molin.** 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. Environ. Microbiol. **6:**726–732.
20. **Leroy, C., C. Delbarre, F. Ghillebaert, C. Compere, and D. Combes.** 2008. Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. J. Appl. Microbiol. **105:**791–799.
21. **Leroy, C., C. Delbarre, F. Ghillebaert, C. Compere, and D. Combes.** 2008. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. Biofouling **24:**11–22.
22. **Mackay, I. M., S. A. Bustin, J. M. Andrade, M. Kubista, and T. P. Sloots.** 2007. Quantification of microorganisms: not human, not simple, not quick, p. 133–182. *In* I. M. Mackay (ed.), Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
23. **Mai-Prochnow, A., F. Evans, D. Dalisay-Saludes, S. Stelzer, S. Egan, S. James, J. S. Webb, and S. Kjelleberg.** 2004. Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Appl. Environ. Microbiol. **70:**3232–3238.
24. **Mårdén, P., A. Tunlid, K. Malmcrona-Friberg, G. Odham, and S. Kjelleberg.** 1985. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. Arch. Microbiol. **142:**326–332.
25. **Messens, W., K. Grijspeerdt, and L. Herman.** 2006. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. Br. Poult. Sci. **47:**554–560.
26. **Monds, R. D., and G. A. O'Toole.** 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol. **17:**73–87.
27. **Pradier, C. M., C. Rubio, C. Poleunis, P. Bertrand, P. Marcus, and C. Compère.** 2005. Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. J. Phys. Chem. B **109:**9540–9549.
28. **Qin, G., L. Zhu, X. Chen, P. G. Wand, and Y. Zhang.** 2007. Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. Microbiology **153:**1566–1572.
29. **Ramsey, D. M., and D. J. Wozniak.** 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospect for management of chronic infections in cystic fibrosis. Mol. Microbiol. **56:**309–322.
30. **Rao, D., J. S. Webb, and S. Kjelleberg.** 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudomonas tunicata*. Appl. Environ. Microbiol. **71:**1729–1736.
31. **Rao, D., J. S. Webb, and S. Kjelleberg.** 2006. Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. Appl. Environ. Microbiol. **72:**5547–5555.
32. **Rasmussen, T. B., and M. Givskov.** 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int. J. Med. Microbiol. **296:**149–161.
33. **Rincé, A., A. Dufour, P. Uguen, J.-P. Le Pennec, and D. Haras.** 1997. Characterization of the lacticin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. Appl. Environ. Microbiol. **63:**4252–4260.
34. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
35. **Skovhus, T. L., C. Holmström, S. Kjelleberg, and I. Dahllöf.** 2007. Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. FEMS Microbiol. Ecol. **61:**348–361.
36. **Sternberg, C., B. B. Christensen, T. Johansen, A. Toftgaard Nielsen, J. B. Andersen, M. Givskov, and S. Molin.** 1999. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. Appl. Environ. Microbiol. **65:**4108–4117.
37. **Valle, J., S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert, and J.-M. Ghigo.** 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **103:**12558–12563.
38. **Webb, J. S., L. S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov, and S. Kjelleberg.** 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. J. Bacteriol. **185:**4585–4592.

4.1.1.3 CONCLUSION

Le spectre d'action des molécules antibiofilm produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 est étendu parmi les espèces bactériennes à Gram négatif testées (7 souches bactériennes sont sensibles sur 9 au total). Le manque d'espèces bactériennes Gram-positives dans les collections disponibles, à l'Ifremer et au LBCM, ne permet pas de conclure quant à son effet sur ce type bactérien. Des travaux complémentaires ont été réalisés au LBCM par Emmanuelle Soum-Soutéra sur des souches de laboratoire appartenant à des espèces bactériennes pathogènes et il en résulte que SN_{3J6} exerce un effet inhibiteur de la formation de biofilms des souches testées de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous avons pu démontrer que le surnageant de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 avait deux effets indépendants l'un de l'autre : une inhibition de la formation des biofilms et une perte de viabilité des cellules au sein des biofilms (ces résultats sont décrits et discutés dans le paragraphe 4.1.2 suivant). Certaines bactéries comme *Vibrio* sp. D66 ou *Alteromonas* sp. 1J3 ne subissent qu'un seul effet. Cependant d'autres bactéries comme *Algibacter* sp. 1M6 subissent une inhibition de la formation de biofilms et une réduction de la viabilité bactérienne. Nous avons alors défini des groupes selon le degré de sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis du SN_{3J6}. Ainsi, cinq groupes peuvent être distingués. Le groupe 1 comprend la souche bactérienne *Algibacter* sp. 1M6 et décrit les bactéries totalement inhibées et perdant totalement leur viabilité. Le groupe 2 regroupe les souches bactériennes dont la formation de biofilm est fortement inhibée avec une perte de viabilité bactérienne. Le groupe trois comprend les souches bactériennes dont la formation de biofilm est inhibée mais les bactéries restent viables. Le groupe quatre ne comprend pour le moment qu'une seule souche, *Alteromonas* sp. 1J3, et décrit les souches bactériennes qui ne subissent pas d'inhibition de la formation de biofilm mais qui subissent une perte de viabilité. Enfin, le groupe cinq regroupe les souches bactériennes résistantes.

Ces résultats ont ensuite été utilisés pour valider le protocole de dosage de l'activité antibiofilm en microplaque 96 puits développé dans le cadre de cette thèse, puis le dosage en microplaque a été employé pour compléter nos données sur le spectre d'action de SN_{3J6}.

4.1.2 PRODUITES PAR *PSEUDOALTEROMONAS* SP. D41

4.1.2.1 INTRODUCTION

Travaux antérieurs

L'activité antibiofilm de la deuxième souche modèle de ce travail, *Pseudoalteromonas* sp. D41, a été découverte par E. Soum-Soutéra (LBCM), en cultivant un biofilm mixte *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10)-*Pseudoalteromonas* sp. D41 afin d'examiner si cette dernière était sensible à l'activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. De façon inattendue, une prédominance de *Pseudoalteromonas* sp. D41 a été observée dans le biofilm formé. Ces travaux ont donc montré que la souche D41 pouvait elle aussi inhiber la formation de biofilms d'une autre bactérie marine.

Travaux développés

L'étude précédente a mis en évidence le pouvoir inhibiteur de *Pseudoalteromonas* sp. D41 sur *Pseudoalteromona*s sp. 3J6. Nous avons donc, par analogie avec l'action inhibitrice de la souche 3J6 qui est portée par des exo-produits, testé le surnageant de culture en VNSS de *Pseudoalteromonas* sp. D41 (SN_{D41}) à la recherche d'une activité inhibitrice de la formation de biofilms sur les espèces bactériennes *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *Paracoccus* sp. 4M6. Des suspensions bactériennes ont alors été injectées en chambres en flux en présence ou non de SN_{D41}, puis, après 2 h d'adhésion en conditions statiques et 48 h de croissance des biofilms sous un flux de milieu de culture VNSS, les biofilms ont été marqués en double coloration (Syto 61 red et Sytox green) pour évaluer la viabilité des cellules. Les résultats obtenus montrent que *Pseudoalteromonas* sp. D41 sécrète elle aussi une molécule antibiofilm dans son milieu. Nous avons alors poursuivi l'étude du SN_{D41} grâce au test développé en microplaque 96 puits, car plus rapide. Nous avons ainsi établi un spectre d'action à partir de 18 souches bactériennes marines dont 3 bien connues (*P. atlantica, P. tunicata et P. haloplanktis*) et nous avons complété nos données sur le spectre d'action de SN_{3J6}, afin de comparer les deux spectres. Ces résultats sont présentés dans le manuscrit ci-après.

Nous avons aussi réalisé des expériences visant à caractériser la nature des molécules actives produites dans le SN_{D41}, notamment par des traitements avec une protéase et des chocs thermiques. De plus, nous avons examiné la spécificité de l'activité du SN_{D41} vis-à-vis des bactéries en biofilms en testant si les molécules étaient actives contre des bactéries planctoniques, dans l'hypothèse où SN_{D41} possèderait une activité antibactérienne. Ces résultats seront développés dans les parties suivantes de la thèse, car nous nous intéressons dans ce chapitre plus spécialement au spectre d'action des molécules antibiofilm.

4.1.2.2 MANUSCRIT

The antibiofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain

Géraldine L. Klein, Emmanuelle Soum-Soutéra, Zakoua Guede, Alexis Bazire,

Chantal Compère, and Alain Dufour

Biofouling, 2011, 21(8):931-940.

Biofouling
Vol. 27, No. 8, September 2011, 931–940

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain

Géraldine L. Klein[a,b], Emmanuelle Soum-Soutéra[a], Zakoua Guede[c], Alexis Bazire[a], Chantal Compère[b]* and Alain Dufour[a]

[a]*Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, Université de Bretagne-Sud, UEB, Lorient, France;* [b]*IFREMER, Département Ressources physiques et Écosystèmes de fond de mer, Unité Recherche et Développements Technologiques, Laboratoire Interfaces et Capteurs;* [c]*IFREMER, Département Ressources physiques et Écosystèmes de fond de mer, Unité Recherche et Développements Technologiques, Laboratoire Hydrodynamique et Océano-météo, Plouzané, France*

(*Received 8 April 2011; final version received 3 August 2011*)

Bacterial biofilms occur on all submerged structures in marine environments. The authors previously reported that the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 secretes antibiofilm activity. Here, it was discovered that another *Pseudoalteromonas* sp. strain, D41, inhibited the development of strain 3J6 in mixed biofilms. Confocal laser scanning microscope observations revealed that the culture supernatant of strain D41 impaired biofilm formation of strain 3J6 and another marine bacterium. A microtiter plate assay of the antibiofilm activity was set up and validated with culture supernatants of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. This assay was used to determine the spectra of action of strains D41 and 3J6. Each culture supernatant impaired the biofilm development of 13 marine bacteria out of 18. However, differences in the spectra of action and the physical behaviours of the antibiofilm molecules suggest that the latter are not identical. They nevertheless share the originality of being devoid of antibacterial activity against planktonic bacteria.

Keywords: biofilm; *Pseudoalteromonas*; marine bacterium; antibiofilm activity; biofilm inhibition

Introduction

A biofilm is now considered as the predominant bacterial life-style (Costerton 1999). It can be described as a highly complex often multi-species community of microbial cells embedded into a self-produced matrix formed by exopolymeric substances (Allison 2002). Biofilms develop at interfaces (solid-liquid, liquid-gas) and provide cells with higher levels of resistance against chemical substances (detergents, antibiotics) and physical stresses (drying, salts) (Costerton et al. 1987).

Biofilms are relevant in a wide range of domains such as medicine and surgery (Williams et al. 1998; Page et al. 2009; Francolini and Donelli 2010) and the food industry (Habimana et al. 2010; Lequette et al. 2010). They have also been found to impair water purification systems (Sublette et al. 2006), sensors (Kerr et al. 1998), and marine and industrial equipment (Holmström et al. 2002). The optical windows used in cameras and light detectors, membranes used in chemical sensors, and diaphragms used in microphones are all limited to short deployments in the marine environment because biofilm formation degrades the characteristic properties of the interface (Mollica 1992). The critical issues associated with marine biofilms include increased operational and maintenance cost due to fouling of ships' hulls and the degradation of abiotic materials. Biofilms have been found to influence and control the settlement of invertebrate larvae and algal spores (Qian et al. 2007). The colonization of vessel hulls leads to major economic loss due to both increased fuel consumption as a consequence of increased drag and the higher frequency of dry-docking operations required. There is a clear need to develop new compounds and marine bacteria are a source of various molecules including anti-biofilm molecules, which remain largely unexplored. Marine bacteria belonging to the genus *Pseudoalteromonas* are known as producers of a number of compounds of biotechnological interest (Holmström and Kjelleberg 1999; Holmström et al. 2002). The present authors previously reported that the *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 strain, which had been isolated from glass slides immersed in the Morbihan gulf (Brittany, France) (Grasland et al. 2003), secretes an anti-biofilm activity which impairs biofilm development and/or decreases cell viability within biofilms (Dheilly et al. 2010). Except for other *Pseudoalteromonas* isolates, most of the tested Gram-negative marine bacteria were sensitive. Of particular interest, the supernatant of 3J6 liquid culture was devoid of antibacterial activity against free-living

*Corresponding author. Email: chantal.compere@ifremer.fr
The last two authors equally contributed to this work.

ISSN 0892-7014 print/ISSN 1029-2454 online
© 2011 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/08927014.2011.611878
http://www.informaworld.com

bacteria, showing that its activity was specifically directed against biofilms (Dheilly et al. 2010). Here, an attempt was made to grow mixed biofilms after coinoculating *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and another *Pseudoalteromonas* sp. strain, D41. The latter strain had been isolated from a Teflon coupon immersed in the Bay of Brest (Brittany, France) and was first studied for its particularly strong adhesion properties onto a variety of substrata (Pradier et al. 2005; Leroy et al. 2008a, 2008b). The 16S rDNA sequences of strains 3J6 and D41 (GenBank accession numbers FJ966949 and AJ555627) were previously determined (Grasland et al. 2003; Pradier et al. 2005) and display only 96% identity, indicating that the two strains do not belong to the same species. The present study reveals that strain D41 also secretes an anti-biofilm activity which impairs the development of 3J6 biofilms (whereas 3J6 is inactive against D41). A rapid microtiter plate assay for antibiofilm activities was set up, which was validated with the 3J6 culture supernatant by comparing with previous data obtained under dynamic condition in flow-cell chambers (Dheilly et al. 2010). The microtiter plate assay was then used to determine the spectrum of action of the anti-biofilm activity of D41, and to broaden knowledge of the spectrum of action of 3J6. These two action spectra are similar but not identical, which indicates that the two anti-biofilm activities rely on different molecules.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial isolates are listed in Table 1. Bacteria were grown in Väätänen Nine Salt Solution (VNSS) medium (Mårdén et al. 1985) at 20°C and 25°C with shaking. For confocal scanning laser microscope observation, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was tagged with the green fluorescent protein (GFP)-producing pCJS10 plasmid (Rao et al. 2005), and the stability of pCJS10 in the 3J6 strain had been confirmed, even in the absence of selection pressure (Dheilly et al. 2010). To ascertain the presence of pCJS10 in the bacteria, liquid precultures of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) were prepared with 125 μg ml^{-1} of chloramphenicol, but biofilms were grown without antibiotic. Artificial marine water was prepared according to the ASTM Standard D 1141-90 (1992) without metal.

Preparation of SN_{3J6} and SN_{D41}

SN_{3J6} is the supernatant of a liquid culture of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 grown overnight in VNSS at 20°C with shaking (Dheilly et al. 2010). SN_{D41} is the supernatant of a liquid culture of *Pseudoalteromonas* sp. D41 grown overnight in VNSS at 25°C with shaking, until the OD_{600} was >0.9. SN_{3J6} and SN_{D41} were sterilized by filtration through membranes with a pore diameter of 0.22 μm, and stored at -20°C until use.

Microtiter plate assay of antibiofilm activities of SN_{3J6} or SN_{D41} against marine bacteria

The microtiter plate assay was designed according to Pitts et al. (2003) with the addition of an adhesion step. The 96-well microtiter plates were made from clear polystyrene, with a U-shaped bottom (Greiner Bio-one Gmbh, BioScience, Frickenhausen, Germany). The strain against which the anti-biofilm activity was to be assayed was grown overnight in VNSS medium at 25°C. After centrifugation, the cells were resuspended at an OD_{600} of 0.25 in artificial marine water (control) or in a culture supernatant (SN_{3J6} or SN_{D41}). One hundred and fifty microliters of the resulting bacterial suspensions were loaded per well of the microtiter plate. After incubation for 2 h at 25°C without shaking to allow the bacteria to attach to the polystyrene surface (adhesion step), bacterial suspensions were pipetted away from the wells and replaced with 150 μl of fresh VNSS medium to allow attached cells to develop biofilms (growth step). After incubation for 24 h at 25°C without shaking, the medium was removed by aspiration and the wells were rinsed three times with artificial marine water. The biofilms were then stained with a 0.5% crystal violet solution in distilled water for 30 min at room temperature without shaking. The wells were rinsed with sterile artificial marine water until the wash-liquid was clear (10 times on average). The adsorbed stain was eluted from biofilms with absolute ethanol for 10 min at 25°C without shaking. Immediately after the complete solubilization of stain with ethanol, the plate was shaken for 5 s, and the OD_{590} values were determined using a plate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Vermont, USA). Each assay was replicated in six wells.

The Percentage Inhibition (PI) was calculated using the equation below, in which B, C, and S denote the average OD_{590} for blank wells (same protocol without bacteria), for controls (bacteria, no culture supernatant), and for assays (bacteria and culture supernatant).

$$\mathrm{PI} = \left[\frac{(C-B)-(C-S)}{C-B}\right] \times 100$$

Biofilm growth in flow cells

Biofilms were grown on glass slides in continuous-culture three-channel flow cells (channel dimensions,

1 by 4 by 40 mm) as previously described (Dheilly et al. 2010). Briefly, two steps were performed: a 2-h adhesion step under static condition at 20°C during which bacteria ($OD_{600} = 0.25$) in marine water were allowed to attach to the glass surface, and a biofilm growth step under a flow of VNSS medium (0.2 mm s^{-1}) for 48 h at 20°C. For two-species biofilms, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and *Pseudoalteromonas* sp. D41 were mixed in a 1:1 ratio prior to the adhesion step. To examine the effect of SN_{D41} on biofilm formation by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10), this strain was suspended in SN_{D41} at an OD_{600} of 0.25, the suspension was injected into a flow-cell channel, and the adhesion and biofilm growth steps were performed as mentioned above.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) and image analyses

Biofilms were observed by CLSM as described by Dheilly et al. (2010) using a TCS-SP2 system (Leica Microsystems, Germany). *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) cells were observed by monitoring the GFP fluorescence, whereas *Pseudoalteromonas* sp. D41 cells were stained with 5 μM Syto 61 red for 10 min prior to CLSM observation. To evaluate cell viability (live-dead staining) in single-species biofilms of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (without pCJS10) and *Paracoccus* sp. 4M6, these biofilms were stained with 5 μM Syto 61 red (labels all cells) and 0.5 μM Sytox green (labels only bacteria with damaged membranes). Images were obtained using the Leica Confocal Software and the biofilm stacks were analyzed with the softwares COMSTAT (developed in MATLAB, Heydorn et al. 2000) and COMSTAT2 (running as a plug-in on the platform independent software independent foundation Java [Heydorn et al. unpublished data]). The calculated parameters were the maximal and average thicknesses of the biofilms, and the biovolume which is the volume of bacteria in μm^3 μm^{-2} of glass surface. The values were calculated from at least two independent experiments from which a total of 12 to 18 image stacks were obtained.

Physico-chemical characterization of SN_{D41} and SN_{3J6} anti-biofilm compounds

To examine the heat sensitivity, the culture supernatants were incubated for 1 min in a water bath at 50°C and cooled on ice. For the protease treatment, proteinase K (Sigma Aldrich, St Louis, MO) was added to SN_{D41} and SN_{3J6} at a final concentration of 1 mg ml^{-1} and the reactions were incubated for 1 h at 37°C. As controls, SN_{D41} and SN_{3J6} were incubated for 1 h at 37°C without proteinase K, which did not impair the anti-biofilm activities. To test the dimethyl sulfoxide (DMSO) effect, DMSO (Fisher Scientific International, Inc., Hampton, NH) was added to the culture supernatants at various final concentrations (0.1, 1, and 10%) and the anti-biofilm activities were immediately determined.

For each of the above tests, the anti-biofilm activities of treated and untreated culture supernatants were compared using the microtiter plate assay against *Vibrio* sp. D02 and *Algibacter* sp. 1M6.

Antibacterial assays

The disc diffusion method (De Beer and Sherwood 1945) was used, in which 10 μl of crude and 100-fold concentrate (by lyophilisation) SN_{D41} were loaded onto 6 mm disc deposited beforehand on VNSS agar plates seeded with *Vibrio* sp. D02, *Paracoccus* sp. 4M6 or *Algibacter* sp. 1M6. The plates were incubated at 25°C for 48 h to allow the diffusion of SN_{D41} molecules from the disc into the agar medium and the growth of bacteria. The presence of a bactericidal compound would lead to clear halos of growth inhibition around the discs. Alternatively, *Vibrio* sp. D02, *Paracoccus* sp. 4M6 or *Algibacter* sp. 1M6 grown overnight in VNSS were inoculated into SN_{D41} at an OD_{600} of 0.25, incubated for 30 min or 2 h at 25°C or overnight at 4°C, and bacteria were centrifuged and resuspended into fresh VNSS medium. Dilutions were then plated onto VNSS agar and the number of colony forming units (CFU) was counted after growth for 48 h. Experiments were performed three times.

Statistical analyses

All tests in microtiter plates were carried out in six replicates and the results were averaged. The standard deviations (SDs) were calculated with a matricial program using Matlab software (Mathworks Inc., Natick, Massachussets, USA). The statistical significance between different experimental conditions was determined by the paired Student's *t*-test (p values of <0.05 were considered significant).

Results

Mixed Pseudoalteromonas *biofilms: inhibition of strain 3J6 by strain D41*

Pseudoalteromonas sp. 3J6 was previously shown to secrete anti-biofilm molecules which were active against all tested marine bacteria except other *Pseudoalteromonas* isolates such as the *Pseudoalteromonas* sp. strain D41 (Dheilly et al. 2010). This led to the hypothesis that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 allows the growth of *Pseudoalteromonas* in marine biofilms

while impairing the biofilm development of other marine bacteria. In order to examine the behavior of two *Pseudoalteromonas* isolates within a single biofilm, advantage was taken of the GFP tagging of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 with plasmid pCJS10 (Dheilly et al. 2010). This allowed coinoculation of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and D41 in a flow-cell chamber, and the two strains within the resulting biofilm could be distinguished by staining all bacteria with Syto 61 red and recording the red (all bacterial cells) and green (3J6[pCJS10] strain only) fluorescence. In an overlay of the two images, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) appeared yellow or green, whereas *Pseudoalteromonas* sp. D41 was red. The biofilm obtained after growth for 48 h was homogeneous (Figure 1A) with an average thickness of 2.7 μm (Table 2). It contained very few scattered green fluorescent bacteria (Figure 1A), which accounted for only 6.9% of the total biovolume (Table 2). Since it had been previously verified that pCJS10 was stably maintained in *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 without selective pressure in the biofilm culture conditions used (Dheilly et al. 2010), this indicated that the *Pseudoalteromonas* sp. D41 strain was largely predominant in a biofilm resulting from the co-inoculation of the two strains. Consistently, this biofilm was more similar to a single-strain biofilm of strain D41 (Figure 1B) than of strain 3J6 (Figure 1C). These results therefore showed that *Pseudoalteromonas* sp. D41 is able to out-compete *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 during biofilm growth. This could not be simply explained by a faster growth of D41 strain, since both strains exhibited similar doubling times (45 and 53 min for D41 and 3J6, respectively) in liquid VNSS cultures at 20°C (Dheilly et al. 2010; data not shown).

Inhibition of biofilm formation by Pseudoalteromonas *sp. D41 exoproducts*

Whether the supernatant of a liquid *Pseudoalteromonas* sp. D41 culture (SN_{D41}) could prevent the formation of biofilm by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was then examined. This strain was resuspended either in SN_{D41} or in artificial marine water as a positive control. The bacterial suspensions were introduced into flow-cell chambers and incubated for 2 h to allow bacterial attachment onto the glass surface. Flows of VNSS medium free of bacterial exoproducts were then applied for 48 h to allow biofilm formation, and biofilms were stained with Syto 61 red and 0.5 μM Sytox green (live-dead staining) to evaluate the cell viability. The presence of SN_{D41} during the adhesion step partially prevented development of the *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 biofilm (Figure 2, compare panels A and B). The average thickness and the biovolume were 7.8 and 9.3 fold lower, respectively, than in the positive control without SN_{D41} (Table 3). The live–dead staining showed that the proportion of nonviable cells was very low in both *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 biofilms (Figure 2A and B, green and yellow bacteria in the upper top and lower images, respectively),

Table 1. Strains used in this study.

Strain	Origin	Reference and/or source
Pseudoalteromonas sp. 3J6	Morbihan gulf, France[a]	Grasland et al. (2003)
Paracoccus sp. 4M6	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Bacillus sp. 4J6	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Vibrio sp. D01	Bay of Brest, France[b]	Pradier et al. (2005)
Algibacter sp. 1M6	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Colwellia sp. 4J3	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Sulfitobacter sp. 8J6	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Vibrio sp. D66	Bay of Brest[b]	IFREMER collection
Alteromonas sp. 1J3	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Pseudoalteromonas sp. 3J3	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Pseudoalteromonas sp. D41	Bay of Brest[c]	Pradier et al. (2005); Leroy et al. (2008a, 2008b)
Micrococcus sp. 5J6	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Paracoccus sp. 3M6	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Pseudoalteromonas sp. 5M6	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Vibrio sp. D02	Bay of Brest[b]	IFREMER collection
Vibrio sp. D22	Bay of Brest[b]	IFREMER collection
Alteromonas sp. 2J3	Morbihan gulf[a]	Grasland et al. (2003)
Pseudoalteromonas atlantica T6c (mucoïd form)		Yaphe (1957)
Pseudoalteromonas haloplanktis TAC125	Antarctic[e]	Médigue et al. (2005)
Pseudoalteromonas tunicata D2	Gullmarsfjorden[d]	Holmström et al. (1998), DSMZ14096

Note: [a]Isolated from a glass slide immersed for 3 or 6 h in the Morbihan gulf, France; [b]Isolated from a glass slide immersed for 6 h in the Bay of Brest, France; [c]Isolated from a Teflon coupon immersed for 24 h in the Bay of Brest, France; [d]Isolated from an adult tunicate *Ciona intestinalis* collected from a depth of 10 m in Gullmarsfjorden, Sweden; [e]Isolated from an Antarctic coastal sea water sample collected near the French Antarctic station Dumont d'Urville, Terre Adelie.

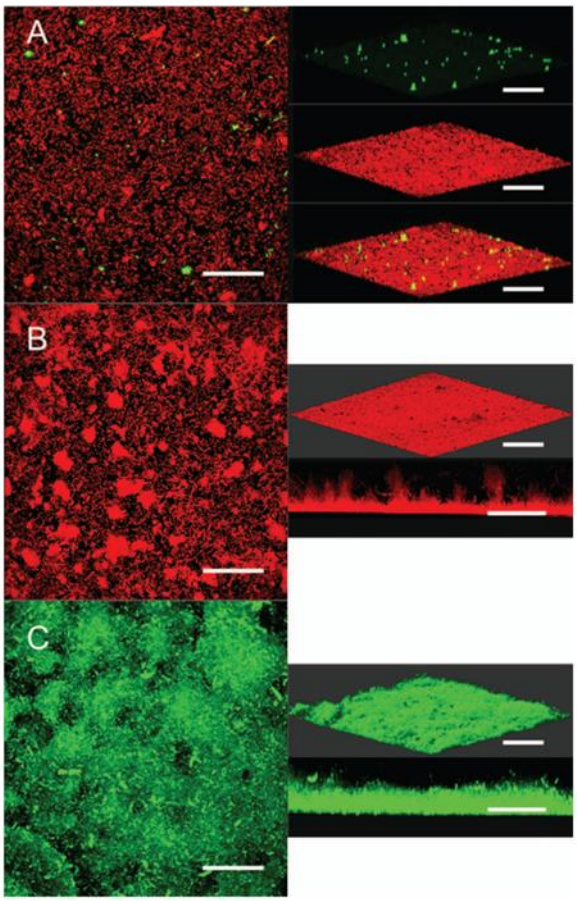


Figure 1. CLSM images of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10) and D41 biofilms grown on glass surfaces at 20°C for 48 h under a flow of VNSS medium. (A) Biofilm resulting from the co-inoculation of the two strains. Maximal projections in the *x–y* plane (left) and three-dimensional (3D) shadow projections (right) are displayed. Green (*Pseudoalteromonas* sp. 3J6[pCJS10]) and red (all cells) fluorescence are shown separately (right, top and middle, respectively) or overlaid (left and right, bottom). (B) and (C) Single-strain biofilms of *Pseudoalteromonas* sp. D41 and of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pCJS10), respectively. Maximal projections in the *x–y* plane (left), three-dimensional (3D) shadow projections (right, top) and projections in the *x–z* plane (right, bottom) are presented. The images are representative of at least two independent experiments from which a total of 12 to 18 image stacks were obtained. Bars = 50 μm.

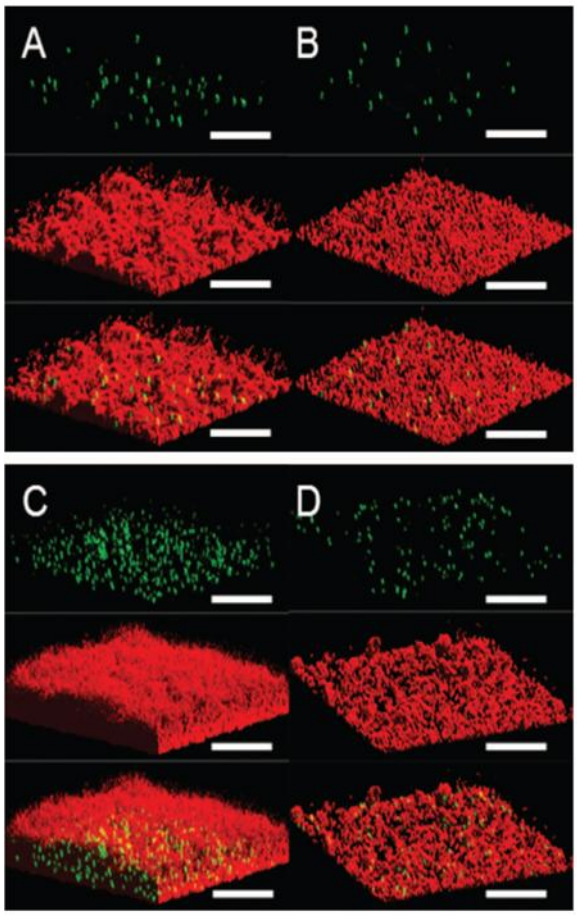


Figure 2. Effect of *Pseudoalteromonas* sp. D41 culture supernatant (SN_{D41}) on biofilm formation by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (A and B) and *Paracoccus* sp. 4M6 (C and D). Biofilms were grown in flow-cell chambers for 48 h after a 2-h adhesion step without SN_{D41} (A and C) or in the presence of SN_{D41} (B and D). Biofilms were stained with Syto 61 red (staining of all bacteria) and Sytox green (staining of nonviable cells only). 3D shadow projections are shown for each biofilm (green fluorescence at the top, red fluorescence in the middle, and green and red overlay at the bottom of each panel). Bars = 62 μm.

showing that SN_{D41} did not affect cell viability in the biofilm.

To examine whether SN_{D41} was active specifically against *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 or if its action could be broader, the same experiments were performed on another marine bacterium, *Paracoccus* sp. 4M6. This strain was chosen because it forms thick biofilms (Dheilly et al. 2010; Figure 2C and Table 3) and is highly sensitive to the anti-biofilm activity of strain 3J6 (Dheilly et al. 2010). *Paracoccus* sp. 4M6 biofilms displayed 4.3 and 3.6 fold lower average thicknesses and biovolumes, respectively, upon exposure to SN_{D41}, whereas the cell viability was not affected (Figure 2C and D; Table 3). SN_{D41} thus displayed anti-biofilm activity against both *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and *Paracoccus* sp. 4M6, showing that SN_{D41} targets various bacteria. The anti-biofilm activity was also produced by *Pseudoalteromonas* sp. D41 grown as a single-strain biofilm on the inner hydrophobic surface

of silicone tubing under a continuous flow of VNSS medium: the medium exiting from the tubing displayed a similar level of anti-biofilm activity as SN_{D41} from a liquid culture (data not shown). All the subsequent experiments were performed with anti-biofilm activities obtained from liquid culture supernatants since it was the easiest way to obtain the required quantity of anti-biofilm material.

Set up and validation of a microtiter plate assay of the anti-biofilm activity

The spectrum of action of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 culture supernatant (SN_{3J6}) was previously determined by observing its effect on the development of single-strain biofilms in flow-cell chambers (Dheilly et al. 2010). Although this method is highly informative as can be seen above, it is labor intensive and a quicker method in microtiter plates was developed. The latter method is detailed in the 'Materials and methods' section. Briefly, bacteria suspended in a culture supernatant (SN_{3J6} or SN_{D41}) were incubated for 2 h in a microtiter plate well (adhesion step), the bacterial suspension was replaced with fresh VNSS medium, and the plate was incubated for 24 h to allow attached cells to develop biofilms (growth step). These two steps were performed at 25°C without shaking. Bacteria in biofilms were then quantified after crystal violet staining (Pitts et al. 2003). The PI, taking into account blank wells (no bacterium) and positive controls (artificial marine water replacing the anti-biofilm supernatant), was calculated as described in 'Materials and methods'.

Since the anti-biofilm activity of SN_{3J6} had been previously examined against nine marine bacterial strains in flow cells (Dheilly et al. 2010), the microtiter plate assay was first performed with SN_{3J6} against the same nine strains in order to compare the two methods. They yielded consistent data for seven strains: both methods showed that SN_{3J6} impaired biofilm development of the *Algibacter*, *Paracoccus*, *Cowellia*, *Sulfitobacter*, and *Vibrio* sp. D66 isolates, with similar inhibition levels, and that SN_{3J6} had no effect (PI < 10) on biofilm formation by *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 and D41 (Table 4). However, divergent results were obtained with two strains, viz. *Vibrio* sp. D01 and *Alteromonas* sp. 1J3. Whereas biofilm formation by *Vibrio* sp. D01 was strongly inhibited by SN_{3J6} in a flow-cell, it was barely affected in microtiter plates (Table 4). Without SN_{3J6}, this strain formed biofilms up to 45 μm thick with one of the highest biovolume (14 $\mu m^3\ \mu m^{-2}$) on the hydrophilic glass slide of the flow cell chamber (Dheilly et al. 2010). By contrast, its ability to develop a biofilm on the hydrophobic polystyrene surface of the microtiter plate was very weak: the OD_{590} values after crystal violet staining of *Vibrio* sp. D01 biofilms (control wells) did not significantly differ from the OD_{590} of blank wells. The microtiter plate used was therefore not appropriate for growing *Vibrio* sp. D01 biofilms. This led to a definition of a threshold of 0.2 for the OD_{590} value after crystal violet staining of control wells, above which the assay was significant. This value was >0.2 for all the other tested strains in Table 4. Regarding *Alteromonas* sp. 1J3, flow-cell assays revealed that SN_{3J6} affected this strain in a peculiar way: it did not impair its ability to form biofilms, but it led to a much higher proportion of nonviable cells

Table 2. COMSTAT analyses of single- and two-strain biofilms after growth for 48 h in flow-cell chambers.

Biofilm	Maximal thickness (μm)[a]	Average thickness (μm)[a]	Biovolume ($\mu m^3\ \mu m^{-2}$)[a]
Single-strain			
Pseudoalteromonas sp. 3J6(pCJS10)	21	4.8	2.6
Pseudoalteromonas sp. D41	29	3.6	2
Two-strains			
Pseudoalteromonas sp. 3J6(pCJS10) + D41	12	2.7	2.9
Pseudoalteromonas sp. 3J6(pCJS10)	12	0.5	0.2
Pseudoalteromonas sp. D41	7	2.7	2.7

Note: [a]Averages of data from three independent experiments, with SDs < 10% of each value.

Table 3. COMSTAT analyses of single-strain biofilms grown in flow-cell chambers for 48 h after a 2 h adhesion step or in the presence and absence of SN_{D41}.

Biofilm	Maximal thickness (μm)[a]		Average thickness (μm)[a]		Biovolume ($\mu m^3\ \mu m^{-2}$)[a]	
	$-SN_{D41}$	$+SN_{D41}$	$-SN_{D41}$	$+SN_{D41}$	$-SN_{D41}$	$+SN_{D41}$
Pseudoalteromonas sp. 3J6	36.5	12.7	34.4	4.4	14.9	1.6
Paracoccus sp. 4M6	70.7	21.4	66.4	15.3	35.3	9.7

Note: [a]Averages of data from two independent experiments, with SDs < 10% of each value.

within the biofilms (80% *vs* 8.5% without SN_{3J6}) (Dheilly et al. 2010). With the microtiter plate assay, the development of *Alteromonas* sp. 1J3 biofilms was strongly inhibited (Table 4). Thus, both methods showed that SN_{3J6} acted against *Alteromonas* sp. 1J3, albeit at different levels.

Overall, the two methods were in excellent agreement for 7 strains, partially convergent for *Alteromonas* sp. 1J3, and the microtiter plates used were not appropriate for *Vibrio* sp. D01. This showed that the microtiter plate assay could be used with confidence, providing that the strains are able to develop a biofilm onto polystyrene.

Table 4. Comparison of flow-cell and microtiter plate assays of SN_{3J6} activity against marine bacteria.

Strain	Percentage inhibition	
	Flow cell[a]	Microtiter plate[b]
Algibacter sp. 1M6	99.8	74.6 ± 2.8
Paracoccus sp. 4M6	85.6	87.6 ± 1.3
Vibrio sp. D01	95.2	12.7 ± 4.9
Colwellia sp. 4J3	95.4	83.6 ± 1.2
Sulfitobacter sp. 8J6	67.0	40.6 ± 5.2
Vibrio sp. D66	87.5	53.1 ± 4.2
Alteromonas sp. 1J3	9.4	77.4 ± 1.8
Pseudoalteromonas sp. 3J3	5.1	0.9 ± 7.2
Pseudoalteromonas sp. D41	9.5	0.4 ± 1.8

Note: [a]Percentage inhibition was calculated from biovolume data reported in Dheilly et al. (2010) as follows: [(biovolume without SN_{3J6} − biovolume with SN_{3J6})/biovolume without SN_{3J6}] × 100. COMSTAT analyses were performed on three independent experiments, and SDs were < 10% of each biovolume value (Dheilly et al. 2010); [b]Percentages of inhibition and SDs were calculated as indicated in 'Materials and methods' from six replicates.

SN_{D41} spectrum of action

The microtiter plate assay was used to determine the SN_{D41} spectrum of action. The SN_{D41} activity was assayed against 18 strains consisting of 15 strains which were previously isolated from the coasts of Britanny (France), and three well characterized *Pseudoalteromonas* strains of various origins, viz. *P. atlantica* T6c (mucoïd form), *P. haloplanktis* TAC125, and *P. tunicata* D2 (Table 1). All these strains were able to form biofilms on the polystyrene of microtiter plates, which led to OD_{590} values >0.2 after crystal violet staining. Table 5 shows the percentages of biofilm inhibition, on the basis of which five groups of bacteria could be distinguished.

Group 1 contains the most sensitive bacteria, with a PI ranging from 68 to 90. This group contains six strains belonging to various genera, viz. *Paracoccus* sp. 4M6, *Vibrio* sp. D02, *Colwellia* sp. 4J3, *Algibacter* sp. 1M6, *Alteromonas* sp. 1J3 and *Micrococcus* sp. 5J6 (Table 5). Group 2 contains bacteria the ability of which to develop a biofilm was less strongly impaired by SN_{D41}, with PIs between 43 and 54. This group is composed of four *Pseudoalteromonas* strains, viz. the 3J6 isolate, and the *P. tunicata, P. atlantica*, and *P. haloplantis* strains (Table 5). Strains of Group 3 were weakly inhibited, since the PIs were within the 20–28 range. These strains are *Bacillus* sp. 4J6,

Table 5. SN_{D41} and SN_{3J6} spectra of action determined using the microtiter plate assay.

Group[a]	Strain	SN_{D41} (PI ± SD)	SN_{3J6} (PI ± SD)[b]
1. High inhibition level	*Paracoccus* sp. 4M6	89.4 ± 1.7	87.6 ± 1.3
	Vibrio sp. D02	84.3 ± 0.7	69.4 ± 0.3
	Colwellia sp. 4J3	80.9 ± 1.1	83.6 ± 1.2
	Algibacter sp. 1M6	80.3 ± 1.5	74.6 ± 2.8
	Alteromonas sp. 1J3	77.5 ± 1.8	77.4 ± 1.8
	Micrococcus sp. 5J6	68.7 ± 1.9	70.0 ± 2.1
2. Mild inhibition level	*Pseudoalteromonas* sp. 3J6	53.9 ± 3.3	**0.6 ± 5.1**
	P. tunicata D2	53.1 ± 9.3	47.3 ± 9.7
	P. atlantica T6c (mucoïd form)	47.7 ± 5.0	47.8 ± 6.1
	P. haloplanktis TAC125	43.5 ± 5.6	38.7 ± 5.8
3. Low inhibition level	*Bacillus* sp. 4J6	28.0 ± 7.3	30.1 ± 6.1
	Alteromonas sp. 2J3	27.6 ± 4.4	**1.6 ± 6.0**
	Sulfitobacter sp. 8J6	20.2 ± 6.1	40.6 ± 5.2
4. Non sensitive strains	*Vibrio* sp. D22	8.5 ± 8.8	**75.5 ± 4.2**
	Pseudoalteromonas sp. 3J3	5.5 ± 5.9	0.9 ± 7.2
	Paracoccus sp. 3M6	4.2 ± 6.0	−2.4 ± 4.7
	Pseudoalteromonas sp. 5M6	2.3 ± 1.5	0.8 ± 0.9
	Pseudoalteromonas sp. D41	0.2 ± 1.6	0.4 ± 1.8
5. Stimulated strain	*Vibrio* sp. D66	−21.4 ± 5.2	**53.1 ± 4.2**

Note: [a]The groups were distinguished on the basis of the percentage inhibition (PI) of biofilm formation in the presence of SN_{D41}; [b]Values in bold highlight differences between the action spectra of SN_{3J6} and SN_{D41}.

Alteromonas sp. 2J3, and *Sulfitobacter* sp. 8J6 (Table 5). Group 4 includes strains which were considered to be unaffected in their ability to form biofilms, with PIs < 10. This group is composed of *Vibrio* sp. D22, *Paracoccus* sp. 3M6, two *Pseudoalteromonas* isolates from the Brittany coasts: strains 3J3 and 5M6, and *Pseudoalteromonas* sp. D41 itself (Table 5). Finally, group 5 is defined by only one strain, *Vibrio* sp. D66. Its negative PI indicates that SN_{D41} enhanced the capability of this strain to form a biofilm (Table 5). An increase of $21.4 \pm 5.2\%$ of bacteria in biofilms which developed in wells containing SN_{D41} was measured (Student test, $p \ll 0.05$).

Altogether, most of the tested bacteria were affected. SN_{D41} impaired biofilm formation by 13 strains (Groups 1, 2 and 3) out of 18. The sensitive strains belong to various taxonomic genera. Three genera were represented by several strains. Whereas the two *Alteromonas* isolates were sensitive to SN_{D41}, the three *Vibrio* strains each displayed a different behaviour in the presence of SN_{D41} since isolates D02, D22, and D66 were strongly inhibited, unaffected, and stimulated, respectively (Table 5). The *Pseudoalteromonas* strains were either mildly inhibited (four strains defining Group 2) or unaffected (three strains including D41 itself in Group 4).

Extension of SN_{3J6} spectrum of action and comparison with SN_{D41}

The microtiter plate assay was also used to broaden knowledge of the SN_{3J6} spectrum of action and to compare it to that of SN_{D41}. Table 5 shows that 13 strains out of 18 were sensitive to SN_{3J6}. Whereas the two *Pseudoalteromonas* strains tested previously (3J3 and D41) were unaffected by SN_{3J6} (Dheilly et al. 2010), the new data revealed that *P. tunicata*, *P. atlantica*, and *P. haloplanktis* were all mildly inhibited by SN_{3J6}. SN_{D41} and SN_{3J6} had similar effects on most of the tested strains. Four strains displayed different behaviours in the presence of the two supernatants: *Vibrio* sp. D66 was stimulated by SN_{D41} and mildly inhibited by SN_{3J6}, *Vibrio* sp. D22 was unaffected by SN_{D41} and strongly inhibited by SN_{3J6}, *Alteromonas* sp. 2J3 was weakly inhibited by SN_{D41} and unaffected by SN_{3J6}, and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was mildly inhibited by SN_{D41} whereas it was unaffected by its own culture supernatant (Table 5).

Physico-chemical characteristics of SN_{D41} and SN_{3J6} anti-biofilm compounds

The above differences in their action spectra suggested that the anti-biofilm molecules present in SN_{D41} and SN_{3J6} are not identical. To further examine this hypothesis, whether these molecules retained their antibiofilm activities after submitting SN_{D41} and SN_{3J6} to various treatments was tested. The SN_{D41} and SN_{3J6} activities were both heat- and proteinase K-sensitive (Table 6), indicating that the anti-biofilm molecules are likely to be proteinaceous. Since DMSO could be used in the course of future purification procedures, adding various DMSO concentrations was tested to determine whether this could affect their activity. Table 6 shows that 0.1% of DMSO reduced about 2-fold the SN_{3J6} activity, which was completely lost at a concentration of 1%. In contrast, SN_{D41} activity was fully retained in 1% DMSO, and was only partially impaired by 10% DMSO. Finally, it was previously reported than the anti-biofilm molecules from SN_{3J6} could be retained on a Sep-Pak Plus C_{18} cartridge (Waters Corporation, Milford, MA) and eluted with 50% acetonitrile (Dheilly et al. 2010). In contrast, these authors were unable to elute active SN_{D41} antibiofilm molecules from a Sep-Pak Plus C_{18} cartridge, either with acetonitrile or with other solvents (methanol or butanol). These different behaviours strengthen the hypothesis that the anti-biofilm molecules of SN_{D41} and SN_{3J6} are not identical.

Assay of SN_{D41} antibacterial activity

SN_{3J6} has been shown to be devoid of antibacterial activity against free-living bacteria (Dheilly et al. 2010). This prompted investigation of whether it is the same for SN_{D41}. *Algibacter* sp. 1M6, *Paracoccus* sp. 4M6 and *Vibrio* sp. D02 were selected as target organisms since all three are highly sensitive to the anti-biofilm activity of SN_{D41} (Table 5). Using the disc diffusion assay, neither crude SN_{D41} nor 100-fold concentrated SN_{D41} prevented the growth of the tested bacteria (data not shown). Furthermore, liquid culture

Table 6. Effect of various treatments on the anti-biofilm activities of SN_{D41} and SN_{3J6}.

Treatment	Percentage inhibition[a]	
	SN_{D41}	SN_{3J6}
None	83.2 ± 0.7	68.0 ± 1.0
50°C, 1 min	0	0
Proteinase K, 2 h	15.0 ± 4.0	0
0.1% DMSO[b]	82.6 ± 1.0	37.0 ± 1.0
1% DMSO[b]	79.3 ± 1.5	0
10% DMSO[b]	36.3 ± 3.0	0

Note: [a]Percentages of inhibition of SN_{D41} and SN_{3J6} were determined against the *Vibrio* sp. D02 and *Algibacter* sp. 1M6 strains, respectively, using the microtiter plate assay. The values and their SDs were calculated from six replicates as described in 'Materials and methods'; [b]dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in the supernatants at the indicated final concentration.

assays were used to monitor the effect of SN_{D41} on the viability of planktonic bacteria. Incubation up to 2 h at 25°C or overnight at 4°C in SN_{D41} failed to reduce the number of cultivable bacteria (data not shown).

Discussion

It has previously been reported that the culture supernatant of the *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6 (SN_{3J6}) displays anti-biofilm activity (Dheilly et al. 2010). In the present study, it was found that the *Pseudoalteromonas* sp. isolate D41 also secretes such activity. The D41 activity was characterized, a microtiter plate assay was set up and validated by comparing with the previous CLSM observations of the SN_{3J6} effects, and the spectrum of action of SN_{D41} was determined and compared with that of SN_{3J6}. The originality highlighted regarding SN_{3J6} is its lack of antibacterial activity against free-living bacteria, making its activity specifically directed against biofilms (Dheilly et al. 2010). Similarly, SN_{D41} failed to display antibacterial activity. By contrast, most of the known anti-biofilm molecules are also antibacterial (bactericidal or bacteriostatic). This is for example the case for the antibacterial protein AlpP secreted by *P. tunicata* D2 (James et al. 1996; Rao et al. 2005, 2006). The *P. tunicata* D2 was used as a control, and both its anti-biofilm and its antibacterial activities were detected with the assays used (data not shown). Since antibacterial activities are more often searched for than anti-biofilm activities, it is possible that the latter remain under-estimated. Consistently, recent screenings of marine bacteria for anti-biofilm activities were successful (Nithya and Pandian 2010). SN_{3J6} and SN_{D41} are furthermore alike in their wide action spectra against Gram-negative bacteria, with 72% of sensitive strains for each supernatant (Table 5). The two spectra are, however, not identical, the most striking differences being the sensitivity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 to SN_{D41} but not to its own culture supernatant, the sensitivity of *Vibrio* sp. D22 to SN_{3J6} but not to SN_{D41}, and the opposite effects for SN_{3J6} and SN_{D41} on *Vibrio* sp. D66 (Table 5). SN_{3J6} and SN_{D41} were equally efficient at impairing biofilm formation by *Paracoccus* sp. 4M6 (Table 5), but CLSM observations showed that SN_{3J6} led to a residual biofilm containing 100% of nonviable cells (*vs* 1.2% in the absence of SN_{3J6}) (Dheilly et al. 2010) whereas the viability was unaffected in the residual biofilms obtained with SN_{D41} (Figure 2C and D). These differences suggest that the anti-biofilm molecules secreted by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and D41 might be related but are unlikely to be identical. This is supported by the observation that the anti-biofilm molecules from strains 3J6 and D41 displayed different behaviours in the presence of DMSO and when attempts were made to elute them from Sep-Pak Plus C_{18} cartridges. Very few natural molecules were reported to display anti-biofilm activity *vs* Gram-negative bacteria without being also antibacterial. Such molecules could be polysaccharides (Valle et al. 2006), biosurfactants (Das et al. 2009), or quorum sensing inhibitors (Rasmussen and Givskov 2006; Estrela et al. 2009). As discussed by Dheilly et al. (2010), none of these hypotheses was really consistent with the SN_{3J6} data. Their sensitivities to heat (50°C) and proteinase K indicate that the anti-biofilm molecules of both SN_{D41} and SN_{3J6} are likely to be proteinaceous. Understanding the mode of action of SN_{3J6} and SN_{D41} will require identification of the active molecules. Their purification is therefore under progress, using the microtiter plate assay to detect and quantify the anti-biofilm activities in the chromatography fractions.

Acknowledgements

This work was funded by the Axis 1 'Genomics and blue chemistry' of the GIS Europôle Mer. GLK was the recipient of a doctoral fellowship from IFREMER and the Région Bretagne, France. The authors are grateful to C Sternberg (Department of Systems Biology, Technical University of Denmark) for kindly providing the COMSTAT2 software. They also thank AC Glasgow Karls (Department of Microbiology, University of Georgia, Athens, USA) for providing *P. atlantica* T6c.

References

Allison DG. 2002. The biofilm matrix. Biofouling 19:139–150.

ASTM D1141-90. 1992. Standard specification for substitute ocean water. Pennsylvania: ASTM International. p. 449–450.

Costerton JW. 1999. Introduction to biofilm. Int J Antimicrob Agents 11:217–221.

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol 41:435–464.

Das P, Mukherjee S, Sen R. 2009. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. Colloids Surf B Biointerfaces 71:183–186.

De Beer EJ, Sherwood MB. 1945. The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances. J Bacteriol 50:459–467.

Dheilly A, Soum-Soutéra E, Klein GL, Bazire A, Compère C, Haras D, Dufour A. 2010. Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. Appl Environ Microbiol 76:3452–3461.

Estrela AB, Heck MG, Abraham WR. 2009. Novel approaches to control biofilm infections. Curr Med Chem 16:1512–1530.

Francolini I, Donelli G. 2010. Prevention of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol 59:227–238.

Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallee-Rehel K, Haras D. 2003. Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. Biofouling 19:307–313.

Habimana O, Møretrø T, Langsrud S, Vestby LK, Nesse LL, Heir E. 2010. Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. BMC Vet Res 6:48–58.

Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by novel computer program COMSTAT. Microbiology 146:2395–2407.

Holmström C, Kjelleberg S. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiol Ecol 30:285–293.

Holmström C, James S, Neilan BA, White DC, Kjelleberg S. 1998. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. Int J Syst Bacteriol 48:1205–1212.

Holmström C, Egan S, Franks A, McCloy S, Kjelleberg S. 2002. Antifouling activities by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS Microbiol Ecol 41:47–58.

James SG, Holmström C, Kjelleberg S. 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. Appl Environ Microbiol 62:2783–2788.

Kerr A, Cowling MJ, Beveridge CM, Smith MJ, Parr ACS. 1998. The early stages of marine biofouling and its effect on two types of optical sensors. Environ Int 24: 331–343.

Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C. 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. Biofouling 26:421–431.

Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D. 2008a. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. Biofouling 24:11–22.

Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D. 2008b. Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. J Appl Microbiol 105:791–799.

Mårdén P, Tunlid A, Malmcrona-Friberg A, Odham G, Kjelleberg S. 1985. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. Arch Microbiol 142:326–332.

Médigue C, Krin E, Pascal G, Barbe V, Bernsel A, Bertin PN, Cheung F, Cruveiller S, D'Amico S, Duilio A, et al. 2005. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Genome 15:1325–1335.

Mollica A. 1992. Biofilm and corrosion on active passive alloys in seawater. Int Biodeterior Biodegr 29:213–229.

Nithya C, Pandian SK. 2010. The in vitro antibiofilm activity of selected marine bacterial culture supernatants against *Vibrio* spp. Arch Microbiol 192:843–854.

Page K, Wilson M, Parkin IP. 2009. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. J Mater Chem 19:3819–3831.

Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart PS. 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. J Microbiol Meth 54:269–276.

Pradier CM, Rubio C, Poleunis C, Bertrand P, Marcus P, Compere C. 2005. Surface characterization of three marine bacterial strains by fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry,correlation with adhesion on stainless steel surfaces. J Phys Chem B 109:9540–9549.

Qian PY, Lau SCK, Dahms HU, Dobretsov S, Harder T. 2007. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. Mar Biotechnol 9:399–410.

Rao D, Webb JS, Kjelleberg S. 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Appl Environ Microbiol 71:1729–1736.

Rao D, Webb JS, Kjelleberg S. 2006. Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. Appl Environ Microbiol 72:5547–5555.

Rasmussen TB, Givskov M. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int J Med Microbiol 296:149–161.

Sublette K, Peacock A, White D, Davis G, Ogles D, Cook D, Kolhatkar R, Beckmann D, Yang X. 2006. Monitoring subsurface microbial ecology in a sulfate-amended, gasolin-contaminated aquifer. Ground Water Monit R 26:70–78.

Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, Ghigo JM. 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA 103:12558–12563.

Williams TJ, Willcox MDP, Schneider RP. 1998. Interactions of bacteria with contact lenses: the effect of soluble protein and carbohydrate on bacterial adhesion to contact lenses. Optom Vis Sci 75:266–271.

Yaphe W. 1957. The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae). Can J Microbiol 3:987–993.

4.1.2.3 CONCLUSION

Nous avons décrit un spectre d'action étendu pour *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 parmi les souches bactériennes utilisées dans les tests, notamment parmi les espèces bactériennes à Gram-négatif (13 souches sensibles sur 19 pour 3J6 et D41). Ici encore nous manquons d'espèces bactériennes à Gram-positif car c'est un type bactérien minoritaire en environnement marin. Nous pouvons remarquer que, bien qu'actifs sur un même nombre de souches, les deux surnageants montrent des différences. Quatre souches bactériennes sont concernées. Alors que SN_{3J6} est actif sur les *Vibrio* sp. D22 et D66, le SN_{D41} non. Nous observons le phénomène inverse pour les souches *Alteromonas* sp. 2J3 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 où c'est plutôt le SN_{D41} qui est actif. Nous pourrions alors suggérer que le SN_{3J6} cible plus les bactéries de genre *Vibrio*.

Nous avons pu observer que le surnageant de *Pseudoalteromonas* sp. D41 n'avait qu'un effet inhibiteur de la formation des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sans perte de viabilité dans les biofilms formés en présence du surnageant de *Pseudoalteromonas* sp. D41. De plus nous avons montré, par une perte d'activité en présence d'enzyme protéolytique, que les molécules actives produites par la souche D41 étaient au moins partiellement protéiques. Enfin, l'intérêt de ces molécules actives réside, comme pour les molécules antibiofilm produites par la souche 3J6, dans l'absence d'effet antibactérien en ayant une activité spécifiquement sur les cellules en biofilms.

4.2 EFFETS DES MOLECULES ACTIVES

Des travaux préalables ont été réalisés par Dheilly et al. (2010) afin de décrire les effets des molécules produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sur les biofilms d'autres espèces bactériennes. Ces travaux ont porté sur la recherche d'une activité antibactérienne de *Pseudoalteromonas* sp 3J6 par la co-culture de cette souche avec les souches *Vibrio* sp. D01 et *Paracoccus* sp. 4M6, suivi d'un dénombrement bactérien sur gélose. Les travaux ont également porté sur l'influence du SN_{3J6} sur l'adhésion et la viabilité des deux souches précédemment citées. Nous avons alors poursuivi ces travaux en utilisant 15 souches bactériennes supplémentaires pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus par Dheilly et al. (2010).

Ainsi, parallèlement aux descriptions des spectres d'action et de l'effet sur le développement des biofilms des molécules actives des SN_{3J6} et SN_{D41} (Dheilly et al. 2010, Klein et al. 2011), nous avons cherché à mieux connaître leurs effets sur l'adhésion bactérienne. Le but ici est de compléter les travaux réalisés sur des biofilms pour mieux comprendre à quelle étape de leur formation vont agir les molécules inhibitrices.

L'établissement d'un biofilm suit une succession de phases pouvant chacune subir une inhibition ou une activation. Ainsi, une glycoprotéine de 60 kDa, produite par la souche bactérienne *Cytophaga* sp. RB1057, inhibe l'adhésion d'une autre *Cytophaga* (Burchard et Sorogon 1998), alors que des espèces comme *Pseudoalteromonas luteoviolacea* ou *citrea* produisent des composés inhibant la croissance d'autres bactéries en biofilm (Dobretsov et al. 2006).

Nous avons donc voulu déterminer, dans cette partie, si les molécules actives agissent sur l'étape d'adhésion initiale des bactéries à la surface en inhibant l'adhésion et/ou en agissant sur la viabilité des bactéries. Nous pourrons alors mieux définir les applications possibles de ces molécules antibiofilm.

4.2.1 INFLUENCE D'UN CONDITIONNEMENT DE SURFACE

Nous savons déjà que laisser des bactéries adhérer en présence de surnageants de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}) ou D41 (SN_{D41}) conduit à l'inhibition de la formation de biofilms. L'activité antibiofilm, ou antiadhésion, présente dans les SN_{3J6} et SN_{D41} pourrait s'expliquer par le fait que les molécules actives s'adsorbent à la surface des substrats. Certaines études ont montré que l'adsorption de molécules organiques (protéines, sucres, lipides, ADN extracellulaire) induit des changements notamment dans les propriétés physico-chimiques de la surface d'adhésion (Schakenraad et Busscher 1989, Busscher et Van der Mei 1997) qui interfèrent alors avec les mécanismes d'adhésion mis en place par les bactéries (Araujo et al. 2010). Ces interactions cellules-surface sont surtout importantes dans les premiers stades de l'adhésion bactérienne (Rubio 2002).

Les travaux de Dheilly et al. (2010) montrent que le conditionnement de la surface de verre servant à l'adhésion bactérienne en chambre d'adhésion avec SN_{3J6} induit l'inhibition des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01. Ainsi, afin de compléter ces résultats et de tester le SN_{D41}, nous avons réalisé des conditionnements de la surface des puits de microplaque avec du SN_{3J6} ou du SN_{D41} avant l'ajout de suspensions bactériennes.

Deux espèces bactériennes ont été utilisées avec chacun des deux surnageants pour des essais en microplaque : *Vibrio* sp. D02 et *Paracoccus* sp. 4M6 pour les essais du SN_{3J6}, ou avec *Vibrio* sp. D02 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pour les essais du SN_{D41}. Nous avons introduit du surnageant dans les puits 2 h avant de réaliser le protocole pour conditionner les puits de microplaque. Les puits ont ensuite été lavés trois fois avec de l'EDMA et les suspensions bactériennes (toutes réalisées en EDMA) ont été introduites dans les puits conditionnés. Le protocole en microplaque est alors suivi sans autre modification.

Les résultats obtenus, après coloration des biofilms de 24 h, sont présentés dans la Figure 35 pour les essais avec le SN_{3J6} et dans la Figure 36 pour les essais avec le SN_{D41}.

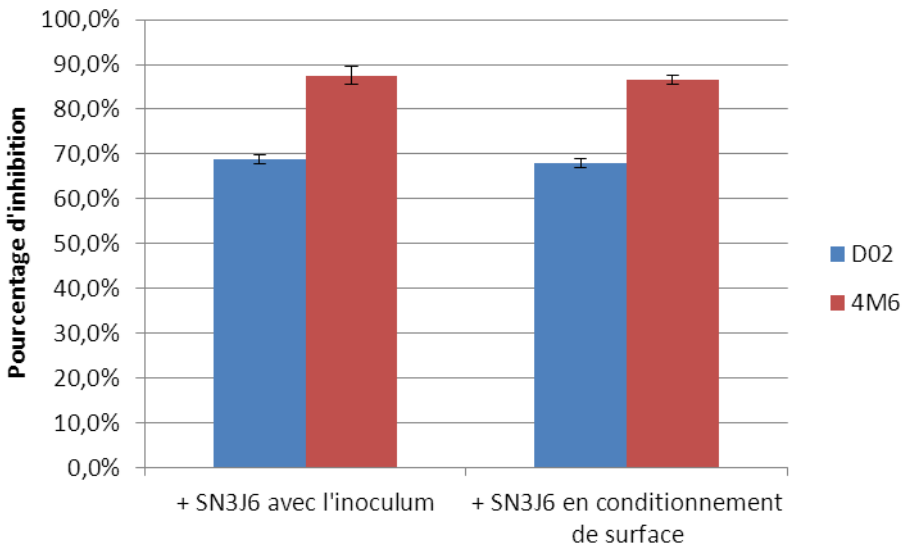


Figure 35. Pourcentages d'inhibition mesurés lorsque SN_{3J6} est introduit 2 h avant (conditionnement de surface) ou en même temps que les suspensions bactériennes de Vibrio sp. D02 et Paracoccus sp. 4M6

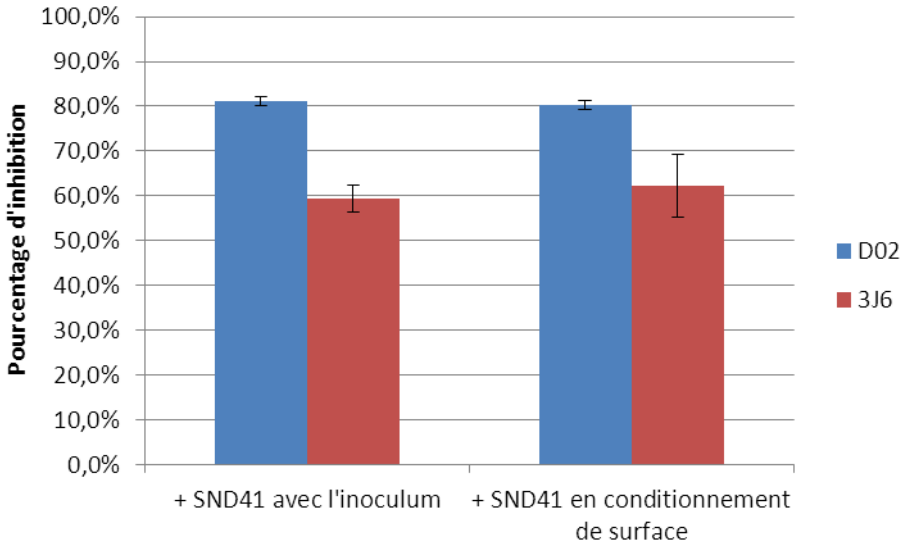


Figure 36. Pourcentages d'inhibition mesurés lorsque SN_{D41} est introduit 2 h avant (conditionnement de surface) ou en même temps que les suspensions bactériennes de Vibrio sp. D02 et Pseudoalteromonas sp. 3J6

Les résultats montrent que les pourcentages d'inhibitions des biofilms sont identiques entre un conditionnement préalable des puits et une adhésion bactérienne en présence de SN_{3J6}, ou de SN_{D41}. Quelle que soit l'espèce bactérienne considérée, nous retrouvons une activité

antibiofilm similaire. Ces résultats montrent que les molécules actives antibiofilm s'adsorbent à la surface des puits de microplaque. Ces composés pourraient ainsi induire des modifications physico-chimiques des surfaces, engendrant l'effet inhibiteur que nous cherchons à identifier.

Comme les molécules antibiofilm produites par 3J6 et D41 sont actives alors qu'elles sont présentes adsorbées sur la surface du puits, ces molécules qui inhibent la croissance des bactéries en biofilms pourraient également agir sur les toutes premières étapes d'adhésion des bactéries, avant même de former un biofilm. Certaines études ont ainsi montré, par exemple, que des souches marines produisent des molécules, dans leurs surnageants de cultures, qui inhibent la formation de biofilms de *Vibrio* spp. en inhibant l'attachement initial des bactéries à la surface (Nithya et Pandian 2010). Les étapes d'adhésions sont des phases importantes pour l'établissement d'un biofilm qui sont facilitées par la présence de flagelles ou de pili (Shi et Sun 2002). Alors si des molécules actives présentes dans un surnageant de culture hydrolysent ces structures, la première étape d'adhésion et donc la formation d'un biofilm pourraient être compromis.

4.2.2 INFLUENCE SUR L'ADHESION DES BACTERIES

Suite aux résultats obtenus après un conditionnement des surfaces des puits de microplaque, nous avons observé l'influence des molécules antibiofilm produites par 3J6 et D41 sur la première étape d'adhésion des bactéries.

Dans le cas des essais réalisés sur le SN_{3J6}, nous avons injecté des suspensions bactériennes en présence ou non de SN_{3J6} dans des chambres en flux. Après 2 h d'adhésion en statique sur la lame de verre fermant les chambres, nous avons établi un flux laminaire de milieu VNSS (0,2 ml/h) afin d'évacuer les bactéries demeurées planctoniques. Puis les bactéries restées adhérées ont été observées au microscope confocal. Des photographies ont été prises et traitées avec le logiciel « compte pixel » afin de quantifier les pourcentages de recouvrement des surfaces présentés dans la Figure 37.

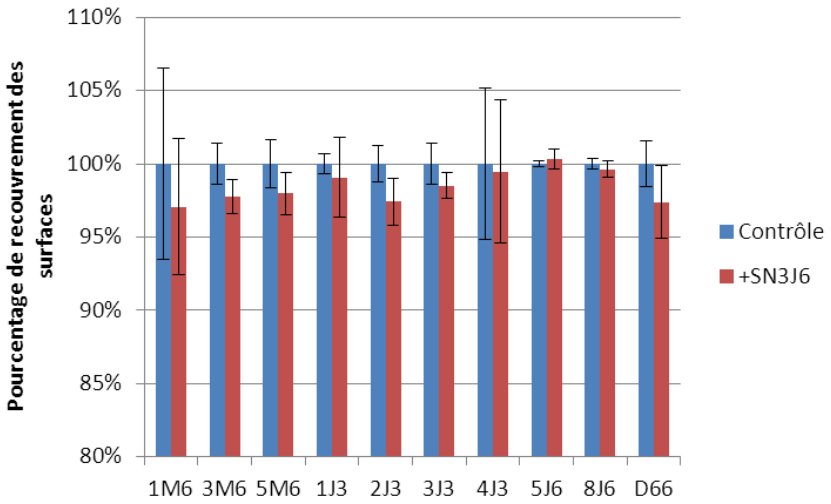


Figure 37. Effet du SN_{3J6} sur l'adhésion des cellules bactériennes sur des lames de verres, à 20°C. L'adhésion en statique des bactéries a été réalisée sans (contrôle) ou avec du SN_{3J6} pendant 2 h. Les valeurs mesurées sont normalisées par rapport aux valeurs des contrôles. Les résultats montrés sont la moyenne de quatre zones différentes sur la lame de verre.

Nous observons sur la Figure 37 qu'il n'y a aucune différence significative d'adhésion, que l'on soit en présence ou non de SN_{3J6}. Dans les travaux décris dans Dheilly et al. (2010), les essais réalisés sur *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01 ont montré des pourcentages de recouvrement deux fois moins important en présence de SN_{3J6}. Cependant les écart-types sont de ± 25 % en présence de surnageant, l'effet n'est donc pas significatif. Nous apportons ici un complément d'essai avec 10 souches supplémentaires qui montre que le SN_{3J6} n'agit pas sur l'adhésion bactérienne. Nous sommes donc en présence de composés qui inhibent spécifiquement la formation de biofilms sans empêcher l'adhésion bactérienne sur les surfaces. Ces résultats pourraient alors nous orienter vers des molécules agissant sur des composants spécifiques des voies métaboliques s'exprimant une fois les bactéries adhérées (Yebra et al. 2004).

Dans le cas des essais réalisés sur le SN_{D41} (Figure 38), nous avons observé des bactéries après 2 h d'adhésion en présence ou non de SN_{D41}. Les souches bactériennes utilisées pour ces essais sont *Alteromonas* sp. 1J3, *Algibacter* sp. 1M6, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, *Bacillus* sp. 4J6, *Paracoccus* sp. 4M6, *Micrococcus* sp. 5J6 et *Vibrio* sp. D02.

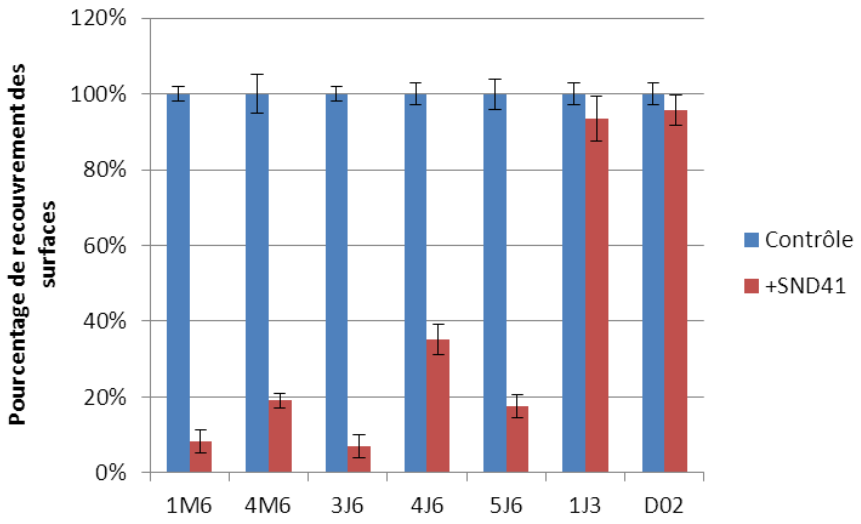


Figure 38. Effet du SN_{D41} sur l'adhésion des cellules bactériennes sur des surfaces en verre, à 20°C. L'adhésion en statique des bactéries a été réalisée sans (contrôle) ou avec du SN_{D41} pendant 2 h. Les valeurs mesurées sont normalisées par rapport aux valeurs des contrôles. Les résultats montrés sont la moyenne de trois puits différents sur la microplaque.

Nous observons, sur la Figure 38, que l'adhésion de 5 des 7 souches sensibles utilisées est significativement inhibée en présence de SN_{D41}. Les molécules antibiofilm produites par D41 pourraient inhiber l'adhésion bactérienne (et donc aussi la formation de biofilm) en modifiant les caractéristiques physico-chimiques des surfaces. Deux approches sont alors possibles : les molécules actives forment une barrière hydrophile limitant l'adhésion bactérienne (action seulement sur les interactions physiques), et/ou des chaînes polymériques orientées vers le milieu portent un motif présentant une activité biologique (antimicrobienne, enzymatique…) (Shi et al. 2000, McGuckin et al. 2011).

Dans le premier cas (avec des interactions physiques), quand une bactérie approche une surface, hydrophile ou hydrophobe, de fortes interactions peuvent développer grâce à des protéines de surfaces ou les chaînes latérales O (polysaccharidiques) des LPS des bactéries à Gram-négatif. Cependant, lorsque des molécules actives sont présentes sur la surface, celle-ci peut prendre un caractère physico-chimique différent et modifier ainsi les interactions bactérie-surface (Venkatesh 1993). De plus, les protéines de surface servant à l'adhésion des bactéries se retrouvent à une distance plus grande de la surface, du fait de la barrière physique créée par les molécules adsorbées.

Dans le second cas, les molécules adsorbées peuvent montrer des activités antimicrobiennes ou enzymatiques. Comme par exemple, la chaîne saccharidique de la mucine MUC6, qui présente un α(1-4)-N-acétylglucosamine comme monosaccharide terminal, et inhibe la synthèse des composants de la paroi de *Helicobacter pylori*, limitant sa croissance (McGuckin et al. 2011). Les molécules adsorbées aux surfaces pourraient également présenter une activité enzymatique en dégradant notamment des polysaccharides ou des protéines servant à l'adhésion des bactéries lors de la colonisation des surfaces (Kristensen et al. 2008). Ces activités enzymatiques sont intéressantes de par leur large spectre d'action et la possibilité d'actions synergiques entre plusieurs classes d'enzymes (Pettitt et al. 2004). Ainsi, lorsqu'une partie polysaccharidique est difficilement accessible à une glycosylase, l'action préalable d'une protéase ou d'une lipase permet de faciliter l'accès aux liaisons, et inversement (Kristensen et al. 2008).

Lors des essais d'adhésion, seules deux souches (*Alteromonas* sp. 1J3 et *Vibrio* sp. D02) sur 7 semblent ne subir aucun effet (Figure 38) alors que le SN_{D41} inhibe fortement leur développement en biofilm (Klein et al. 2011, Table 5). Nous pouvons supposer que ces deux souches sont moins sensibles ou plus tolérantes face à des modifications physico-chimiques ou des activités enzymatiques sur les surfaces. Les deux souches 1J3 et D02 pourraient présenter des systèmes d'adhésion leur permettant de passer outre la barrière physique ou chimique d'un conditionnement de surface. Il est également envisageable que ces deux souches subissent des modifications de régulation de leur métabolisme une fois adhérées. Ce serait ces nouvelles voies métaboliques mises en place seulement pendant la croissance en biofilms qui pourraient être inhibées par les molécules actives de D41 présentes sur la surface.

Une autre donnée importante afin de saisir le mécanisme mis en place par les molécules antibiofilm produites par 3J6 et D41 est la mesure de la mortalité bactérienne après 2 h d'adhésion. Les souches bactériennes utilisées pour ces essais sont *Alteromonas* sp. 1J3, *Algibacter* sp. 1M6, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, *Bacillus* sp. 4J6, *Paracoccus* sp. 3M6 et 4M6, *Micrococcus* sp. 5J6, *Vibrio* sp. D02, *Pseudoalteromonas atlantica* T6C, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, et *Pseudoalteromonas tunicata* D2.

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas d'influence des surnageants actifs sur la viabilité des bactéries adhérées. En effet, nous n'avons noté aucune différence entre la quantité de bactéries non viables lors d'une adhésion en EDMA et celle observée après un contact de 2 h avec le SN_{3J6}, ou le SN_{D41}. Nous confirmons ainsi des résultats de Dheilly (2007), qui avait montré que le SN_{3J6} n'avait aucun effet sur la mortalité de *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01 par rapport à une adhésion réalisée en EDMA.

4.2.3 RECHERCHE DE LA PRESENCE DE TENSIOACTIFS

Une autre caractéristique importante pour décrire l'effet des molécules antibiofilm présentes dans les SN_{3J6} et SN_{D41} est d'observer si ces composés contiennent des agents tensioactifs.

Les composés tensioactifs, comme les lipopeptides produits par *Bacillus subtilis* (Neu 1996, Raaijmakers et al. 2010) ou les cyclolipopeptides produits par *Pseudomonas fluorescens* BD5 (Janek et al. 2010), modifient la physico-chimie de surface et l'hydrophobicité du substrat ou des bactéries. D'autres études ont également montré que des lipopeptides surfactants (surfactine) de *Bacillus subtilis* agissaient comme des molécules de signal induisant la formation de la matrice extracellulaire dans les biofilms (Lopez et al. 2009). Ils ont montré que la surfactine produite par *Bacillus subtilis* entraîne une perte de potassium des cellules qui stimule l'activité de l'histidine kinase KinC, qui elle-même régule l'expression des gènes *epsA-O* et *yqxM-sipW-tasA* essentiels dans la production de la matrice. De plus, une étude de Nitschke et al. (2009) a démontré que des biosurfactants peuvent influencer l'adhésion et la formation de biofilms de *Listeria monocytogenes* et d'*Enterobacter sakazakii*. Nous avons donc cherché si les SN_{3J6} et SN_{D41} présentaient un effet surfactant.

Pour rechercher une activité de biosurfactant, nous avons déposé des gouttes de 10 µl d'eau milliQ sur une surface en polystyrène. Nous avons ensuite ajouté pour les témoins 10 µl d'eau milliQ ou 10 µl de VNSS, et pour les essais 10 µl de SN_{3J6} ou de SN_{D41}. Puis nous avons observé l'étalement des gouttes sur la surface. Si le SN_{3J6} ou le SN_{D41} possède une activité de biosurfactant, la goutte doit s'étaler et présenter un angle de contact plus aigu que le

témoin. La Figure 39 présente des photographies réalisées des gouttes à différents angles d'inclinaison.

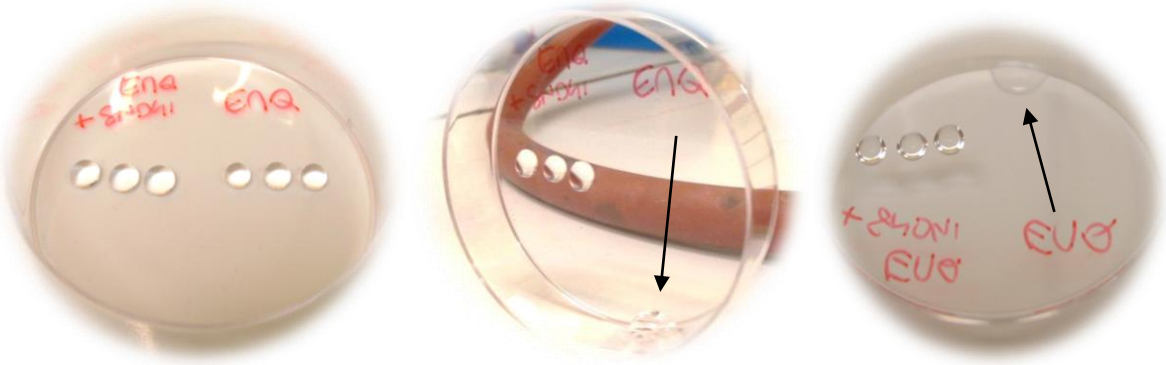


Figure 39. Photographies illustrant le comportement de gouttes de SN_{D41} et de gouttes d'eau milliQ (EMQ) à différents angles d'inclinaison (la flèche pointe l'emplacement des gouttes d'EMQ).

Après avoir observé les gouttes témoins et celles contenant les SN_{3J6} et SN_{D41}, nous n'avons pas observé d'étalement des gouttes contenant du SN_{3J6} et du SN_{D41}. Nous avons mesuré qu'un angle d'inclinaison de la surface supérieur à 30° était nécessaire pour que les forces de gravité soient supérieures aux forces d'adhésions et de frottement de la goutte d'eau milliQ et ainsi la faire glisser le long de la surface. Parallèlement, nous avons noté que les gouttes contenant du SN_{3J6} ou du SN_{D41} restaient accrochées à la surface quel que soit l'angle d'inclinaison appliqué à la surface (Figure 39).

Nous pouvons en conclure que les SN_{3J6} et SN_{D41} ne semblent pas contenir de composé tensioactif pouvant contribuer à l'effet antibiofilm observé.

4.2.4 CONCLUSIONS

Nous avons montré dans les paragraphes précédents que les molécules antibiofilm présentes dans les SN_{3J6} et SN_{D41} ont des activités originales, n'agissant que sur des bactéries adhérant aux surfaces et/ou se développant en biofilms.

L'étude de l'activité antibactérienne des SN_{3J6} et SN_{D41} a démontré l'absence d'activité bactéricide ou bactériostatique sur des bactéries planctoniques. L'activité exprimée dans les deux surnageants est donc spécifique à une voie ou un mécanisme mis en place lorsque les bactéries adhèrent à une surface et développent un biofilm. Nous avons alors étudié à quelle étape de la formation d'un biofilm les SN_{3J6} et SN_{D41} sont actifs, à savoir sur les mécanismes permettant l'adhésion et le maintien des bactéries sur le substrat ou sur les mécanismes permettant la formation de la structure 3D, la maturation et la viabilité des biofilms.

Les résultats concernant les quantités de bactéries adhérées sur la surface ou leur viabilité, ont démontré que le SN_{3J6} n'influence pas l'étape d'adhésion bactérienne. L'activité antibiofilm est essentiellement une inhibition du développement tridimentionnel des biofilms avec un effet bactéricide sur les bactéries composant les biofilms. Cependant nous devons dissocier ces deux activités car elles semblent indépendantes l'une de l'autre. Nous sommes donc en présence de composés présentant une activité antibiofilm avec des mécanismes d'actions différents. Les molécules antibiofilm du SN_{D41}, quant à elles, inhibent l'adhésion de 5 des 7 bactéries testées, ce qui implique des biofilms moins épais et moins denses après 48 h de croissance. Cependant, deux souches bactériennes ne subissent pas d'inhibition de leur adhésion mais seulement l'inhibition de la formation de biofilm.

De plus, nous avons montré que les molécules antibiofilm des SN_{3J6} et SN_{D41} créent un conditionnement des surfaces. Néanmoins, les molécules antibiofilm de SN_{3J6} adsorbées sur les surfaces ne vont que le développement des biofilms, et non les premières étapes d'adhésion. Pour les molécules du SN_{D41}, l'inhibition intervient majoritairement dès l'adhésion des bactéries. Ces molécules peuvent donc présenter des activités de dégradation des systèmes d'adhésion mis en place par les bactéries, ou créent un conditionnement limitant l'accès des protéines de surface (adhésines ou flagelle) ou des chaînes polysaccharidiques aux surfaces.

Nous sommes donc en présence d'activités originales ciblant spécifiquement les bactéries adhérées et/ou en biofilms. Le SN_{3J6} n'a d'effet que sur la formation des biofilms et non sur les étapes d'adhésions, et le SN_{D41} présente des effets sur la formation de biofilm et sur l'adhésion bactérienne. Ce type d'activité est peu décrit. Les études portent surtout la recherche d'activités antimicrobiennes (Holmstrom et Kjelleberg 1999, Qian et al. 2010),

d'inhibition des biofilms par inhibition de l'adhésion des bactéries (Thenmozhi et al. 2009) ou la recherche de molécules permettant de détruire des biofilms matures (Nithya et Pandian 2010).

Bien qu'étudiées depuis peu de temps, comparativement aux espèces bactériennes terrestres, de plus en plus de travaux montrent que les bactéries marines produisent un grand nombre de composés actifs originaux (Fenical 1993). La plupart des métabolites isolés présentent une activité antibactérienne et sont produits par des espèces bactériennes appartenant aux genres *Bacillus*, *Vibrio*, *Streptomyces*, *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas*. Par exemple *Streptomyces griseus* SS-20 produit un antibiotique, l'aplasmomycine, qui inhibe des bactéries à Gram-négatif (Hotta et al. 1980), alors qu'un autre *Steptomyces* sp. produit la bonactine qui inhibe les bactéries à Gram-positif et Gram-négatif (Schumacher et al. 2003). Des composés antibiotiques ont également été isolés à partir de bactéries appartenant à des biofilms. En effet, certaines bactéries comme *Pseudoalteromonas tunicata* D2 (Rao et al. 2005) ou *Alteromonas* sp. (Long et al. 2003) produisent des composés antibactériens qui altèrent la composition des communautés bactériennes en augmentant ou diminuant la capacité des autres bactéries à coloniser une surface. Cependant, nous avons démontré que les molécules antibiofilm produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 n'appartiennent pas à cette classe de composés puisqu'elles agissent spécifiquement sur l'adhésion des bactéries et/ou la formation de biofilms. D'autres molécules spécifiquement antibiofilm ont été isolées : une étude menée par Jiang et al. (2011) a ainsi montré que la souche *Vibrio* sp. QY101 produit un exopolysaccharide A101 qui prévient la formation de biofilms et désagrège les biofilms formés sans présenter d'activité antibactérienne. Ce composé permet d'inhiber la formation de biofilms de nombreuses espèces bactériennes pathogène comptant *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Il agit en inhibant les mécanismes d'adhésion entre les bactéries et la surface et entre les bactéries elles-mêmes.

Par ailleurs, nous pouvons supposer que les molécules antibiofilm produites par les souches 3J6 et D41 sont des composés au moins en partie peptidique ou protéique pouvant donc présenter des activités enzymatiques. Un grand nombre d'enzymes sont connues et certaines classes peuvent spécifiquement agir sur l'inhibition de la formation ou sur la dégradation de matrice extracellulaire (Kristensen et al. 2008). La matrice est en général le

« liant » permettant aux biofilms de conserver une structure et une architecture 3D complexe et solide. Certaines enzymes comme les lyases, dont fait partie l'alginase, peuvent détruire la matrice extracellulaire en éliminant les résidus alginates présents (Kristensen et al. 2008). Cependant, les cibles préférentielles restent les protéines et les polysaccharides. Ainsi les protéases et les glycosidases sont des enzymes très recherchées. Par exemple, en travaillant sur D41, Leroy (2008a) a démontré qu'une glycosylase permettait d'inhiber l'adhésion et la formation de biofilms d'un *Pseudoalteromonas* sans permettre le détachement des biofilms déjà formés. Parallèlement, en étudiant l'effet de protéases sur l'adhésion de D41, Leroy (2008b) a également montré qu'elles permettaient la désagrégation de la matrice de *Pseudoalteromonas* sp. D41. Cependant certaines structures composant les matrices comme les fibrilles amyloïdes sont résistants à la plupart des protéases (Suzuki et al. 2006).

De nombreux composés sont aussi sécrétés par les bactéries pour communiquer et interagir avec leur environnement (Neu 1996). Dheilly (2007) a démontré que *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 ne produisent pas de molécules signal de type AI-2 ou HSL, elles doivent alors utiliser d'autres systèmes de communication. Il est ainsi possible que les souches 3J6 et D41 produisent des inhibiteurs d'AHL ou d'AI-2 sans être auto-inhibées. Beaucoup de ce type de petites molécules, généralement inhibitrices du Quorum-Sensing, sont connues (Kaplan 2005, Rasmussen et al. 2005). Cependant, des études ont également montré que des molécules inhibitrices du biofilm par l'inhibition du Quorum-Sensing peuvent interrompre les communications sans pour autant inhiber l'adhésion ou la croissance bactérienne (Nithya et Pandian 2010).

Finalement, il est intéressant de constater que les molécules antibiofilm produites par la souche 3J6 semblent agir sur des voies métaboliques ou d'expression seulement quand le biofilm est en développement. En effet, suite aux observations réalisées après 2 h d'adhésion, les résultats ont montré que seule la croissance du biofilm était inhibée, laissant l'adhésion se produire normalement. Inversement, les molécules antibiofilm produites par D41 ont majoritairement inhibé l'étape d'adhésion bactérienne, mais aussi la formation de biofilms de deux souches bactériennes ayant adhéré normalement.

5 PURIFICATION DES MOLECULES ACTIVES

Pour identifier les molécules antibiofilm sécrétées par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 nous devons obtenir ces composés sous une forme la plus pure possible, c'est à dire dépourvue au maximum de contaminants.

La purification d'un composé depuis un mélange complexe consiste en sa séparation des autres constituants du milieu (protéines, acides nucléiques, lipides, sucres, etc.). Cependant une purification totale peut représenter une gageure quand nous savons, par exemple, qu'une protéine donnée peut représenter au mieux 10% ou au pire 0,001% des protéines produites par une bactérie référence. De plus, une purification doit être efficace, rapide, avec un rendement raisonnable, tout en conservant l'intégrité structurelle et donc l'activité du composé (Burgess 2008).

Une étape importante, préliminaire à la purification d'un composé inconnu comme les molécules antibiofilm produites par 3J6 et D41, est leur caractérisation du point de vue de leur stabilité à la température, au DMSO et à la protéinase K. Ces résultats sont décrits dans les articles Dheilly et al. (2010) et Klein et al. (2011) présentés précédemment dans le Chapitre 4.

Après ces études préliminaires, nous avons donc procédé à la purification des molécules produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 en préservant la fonction des molécules antibiofilm. Nous avons testé différentes méthodes présentées dans les paragraphes suivants.

5.1 MOLECULES ANTIBIOFILMS PRODUITES PAR 3J6

5.1.1 ULTRAFILTRATION

L'ultrafiltration (UF) est une méthode couramment utilisée. Elle permet de conserver l'activité des molécules sans les dégrader. Nous avons employé un système d'ultrafiltration Pellicon qui permet de séparer les composants de plusieurs litres de surnageant de culture via des membranes avec des seuils de coupure de 100 kDa et 10 kDa.

Brièvement, le module Pellicon fonctionne comme une filtration tangentielle. Cette méthode consiste à faire passer le SN_{3J6} parallèlement à la surface de la membrane filtrante. Le flux de SN_{3J6} appliqué par la pompe péristaltique alimentant le système permet aux molécules de taille inférieure au seuil de coupure de traverser la membrane, cette fraction est le perméat. Ainsi la membrane retient toutes les molécules plus grosses dans le rétentat. Cependant au cours de la filtration, la membrane subit un colmatage entraînant une perte de charge. Nous pouvons alors retrouver des molécules de taille inférieure au seuil de coupure dans le rétentat. Inversement, il est possible de retrouver des molécules de masse supérieures au seuil de coupure dans le perméat car ces molécules peuvent subir un passage forcé à cause des fortes pressions engendrées par un colmatage des pores de la membrane.

Nous avons opéré deux UF successives sur deux membranes, de seuils de coupure différents. La première séparation a fait intervenir une membrane avec un seuil de 100 kDa. Le rétentat, concentré en molécules de hauts poids moléculaires, est conservé à -20°C pour les études ultérieures d'activités. Le perméat est à nouveau ultrafiltré sur une membrane de 10 kDa. Le rétentat récupéré est conservé à -20°C sans aucun autre traitement, alors que le perméat, très dilué, est lyophilisé. La poudre obtenue est resuspendue dans de l'eau milliQ jusqu'à atteindre la conductivité de l'eau de mer (5 S/m). Nous avons testé l'activité de chacune des fractions obtenues à l'aide du test en microplaque 96 puits contre *Vibrio* sp. D02. Les résultats sont présentés Figure 40.

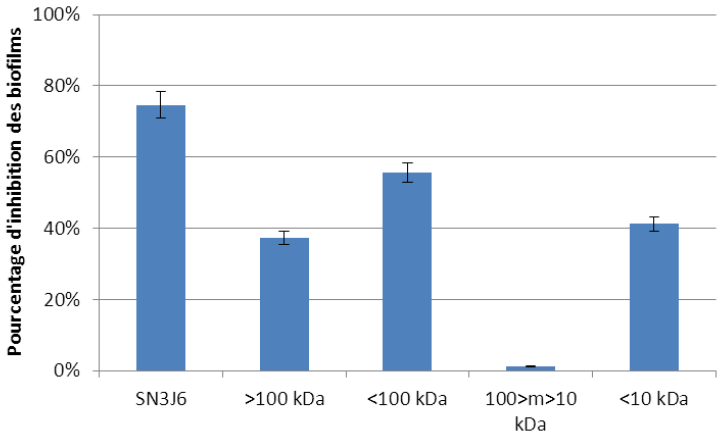


Figure 40. Activités antibiofilm de SN_{3J6} et de quatre fractions d'ultrafiltration, le rétentat (molécules > 100 kDa) et le perméat (molécules < 100 kDa) de la première UF (membrane 100 kDa) et le rétentat (molécules entre 100 et 10 kDa, 100>m>10) et le perméat (molécules < 10 kDa) de la deuxième UF réalisée à partir du perméat de la première UF.

Nous observons la présence d'une activité antibiofilm dans les rétentats (> 100 kDa) et perméats (< 100 kDa) de la première UF (membrane à seuil de coupure de 100 kDa), avec respectivement 37,4 % et 55,6 % d'activité. Néanmoins, la seconde UF réalisée sur le perméat (molécules < 100 kDa) de la première UF indique que l'activité est majoritairement portée par des molécules de taille inférieure à 10 kDa avec un pourcentage d'inhibition des biofilms de *Vibrio* sp. D02 de 41,2 %, soit presque deux fois moins d'activité que dans le surnageant brut.

Cette méthode par ultrafiltration ne permet pas de concentrer l'activité dans une seule fraction mais la divise car nous mesurons des activités antibiofilm pour des molécules de poids supérieur et inférieur à 100 kDa. De plus nous ne savons pas si l'activité mesurée dans la fraction contenant les molécules de haut poids moléculaire est due à de petites molécules n'ayant pas pu traverser la membrane à cause de colmatage de certains pores ou effectivement à des molécules de taille supérieure à 100 kDa. Nous n'avons alors pas retenu cette méthode et poursuivi avec une extraction liquide-liquide avec un solvant.

5.1.2 EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE

L'extraction liquide-liquide (ELL) est une méthode de concentration et de séparation faisant intervenir deux solvants non miscibles entre eux. Cette technique repose sur les capacités des différentes molécules présentes dans une solution (ici des surnageants de cultures bactériennes) à être solubilisées préférentiellement dans une phase aqueuse ou dans une phase organique.

Brièvement, la méthode utilisée consiste à ajouter 150 ml de solvant hydrophobe : de l'acétate d'éthyle (densité = 0,9 g/cm^3, polaire aprotique, modérément soluble dans l'eau avec un log *P* de 0,68 ; Park et Park 2000) à 150 ml de surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (rapport 1:1, *v:v*) dans une ampoule à décanter. Les molécules, à l'origine dans le surnageant (aqueux), se séparent aussi suivant leur solubilité préférentielle. Les deux phases sont récupérées séparément puis le solvant est évaporé sous vide avec un bain d'eau à 35°C. Les résidus de la phase organique ont été resuspendus dans 150 ml de

PBS. Les activités antibiofilm des molécules présentes dans les deux fractions (organique et aqueuse) ont ensuite été testées sur *Algibacter* sp. 1M6. Des séries de dilutions au demi à partir du surnageant brut et de chaque fraction d'ELL ont également été réalisées afin d'établir une concentration minimale inhibitrice de biofilm permettant de calculer l'activité des fractions de séparation avec le surnageant brut. Les résultats de séparation obtenus sont reportés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Tableau de purification de SN_{3J6} par extraction liquide-liquide

	Activité (UA/ml)	Volume (ml)	Activité totale	Quantité totale de protéines (µg)	Activité spécifique	Taux de purification	Rendement (%)
SN_{3J6}	107	150	16050	4500	3,5	1	100
Phase aqueuse	428	150	64200	4305	14,6	4	400
Phase organique	7	150	1005	147	6,8	2	6

L'activité antibiofilm est retrouvée dans la fraction correspondant à la phase aqueuse avec un pourcentage d'inhibition des biofilms d'*Algibacter* sp. 1M6 de 80,3 ± 2 %. Avec un PI supérieur au PI mesuré pour le surnageant brut (PI = 71,1 ± 1 %), cette fraction semble plus active. Nous retrouvons cette différence dans les concentrations minimales inhibitrices où il faut diluer 4 fois plus la fraction en phase aqueuse que le SN_{3J6} brut pour perdre l'activité antibiofilm. En effet, nous observons une augmentation de l'activité de la fraction aqueuse qui atteint 428 UA/ml (Unités arbitraires/ml), comparé à l'activité du surnageant brut atteignant 107 UA/ml. Cette hausse de l'activité totale de la fraction aqueuse pourrait être due à l'élimination d'un inhibiteur de l'activité antibiofilm, extrait dans la phase organique lors de la purification. De plus, ces résultats indiquent que la ou les molécules antibiofilm sont plutôt hydrophiles puisque extraites dans la phase aqueuse.

Nous observons aussi une activité antibiofilm dans la fraction organique avec un pourcentage d'inhibition des biofilms d'*Algibacter* sp. 1M6 de 45,3 ± 3 %. Cependant nous n'avons pu détecter aucune activité dans les fractions diluées. Il est probable que l'activité observée dans la fraction non diluée provienne de résidus de solvants ayant perturbé la croissance bactérienne lors du test en microplaque. L'acétate d'éthyle est un solvant couramment utilisé pour réaliser les extractions liquide-liquide. Comme c'est un solvant

organique, nous avons en majorité extrait des lipides dans cette phase ainsi que de petites molécules hydrophobes. Nous avons ainsi procédé à une élimination de contaminants qui sont susceptibles de colmater des colonnes de chromatographie.

Analyse des fractions en spectrométrie de masse

Les deux fractions (aqueuse et organique), ainsi que le SN_{3J6}, ont été analysées en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 41). Cette technique d'analyse permet de détecter la présence de nombreux composés différents en mélange selon leur masse. Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines avec les conseils de Laure Taupin. La matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique utilisée permet de détecter préférentiellement les peptides et les petites molécules. Les spectres ont été établis pour des intervalles de *m/z* de 800 à 150000. Cependant, les résultats sont présentés pour des *m/z* de 800 à 11000 car nous n'avons détecté aucun pic au-delà de cette valeur.

Dans le SN_{3J6} brut nous observons plusieurs ensembles de pics pour des *m/z* de 9738, 9406, 6440, 6380, 5024, 4868 et 4704. Nous observons également une succession de six ensembles de pics de *m/z* inférieurs à 2000 qui présentent une périodicité d'environ 200 Th (m/z de 1909, 1702, 1489, 1278 et 1073).

Dans la fraction correspondant à la phase aqueuse d'ELL, la fraction active, nous retrouvons plusieurs ensembles isotopiques de *m/z* similaires à ceux détectés dans le SN_{3J6}. Ainsi nous notons la présence de pics pour des *m/z* de 6440, 6379, 5137, 5023, 3189, 1277 et 1072. Nous observons aussi la quasi-absence de pics pour des *m/z* inférieurs à 2000. Inversement, la phase organique ne contient que ces derniers.

La ou les molécules actives correspondent probablement à un ou plusieurs pics observés dans le surnageant brut et dans la fraction aqueuse active d'ELL. Ces résultats semblent cohérents avec ceux obtenus en ultrafiltration. En effet, nous avions mesuré un PI de 41,2 % dans la fraction contenant les molécules de poids moléculaire inférieurs à 10 kDa.

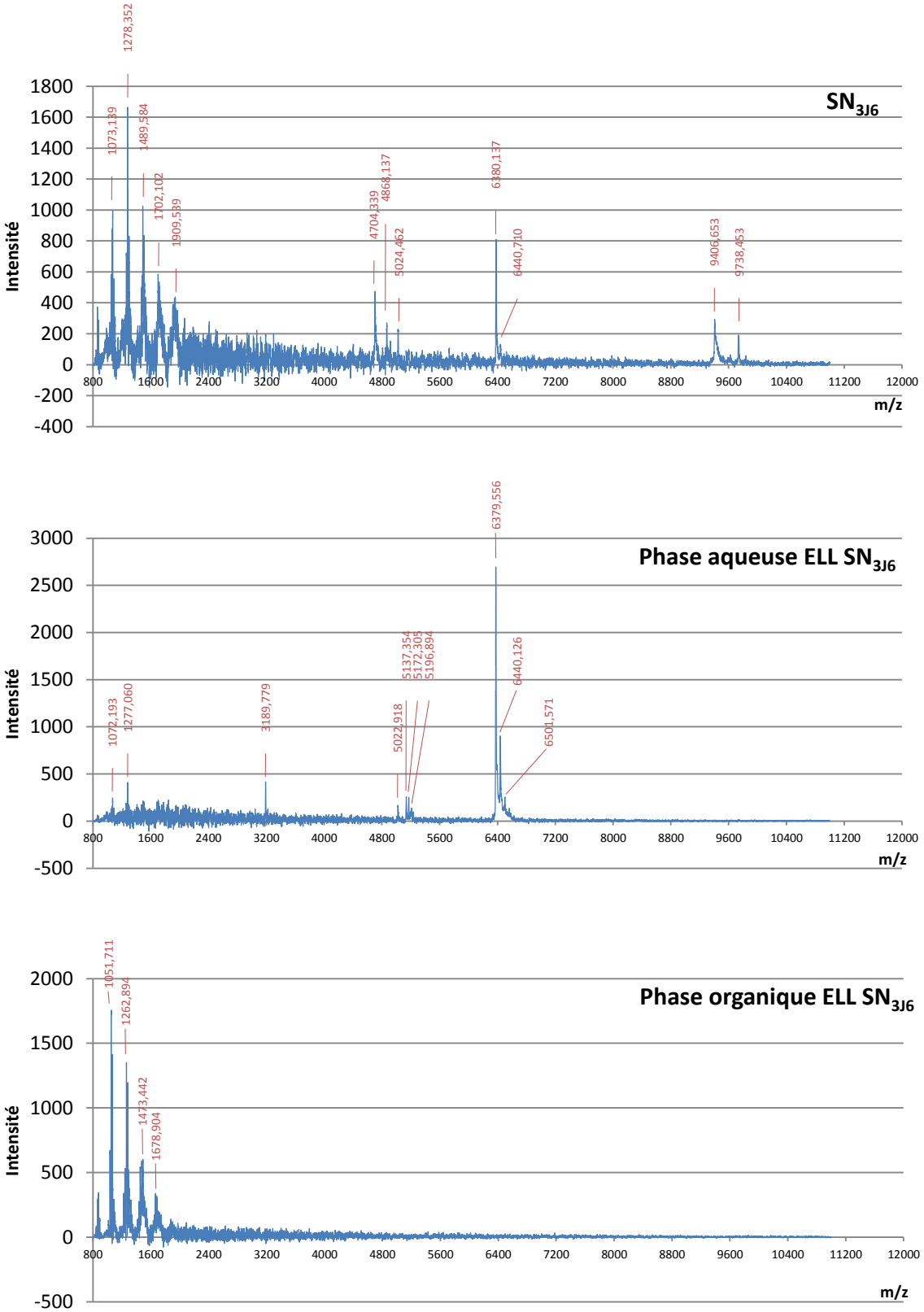


Figure 41. Analyse par spectrométrie de masse du SN_{3J6} et des deux fractions, aqueuse et organique, issues de l'ELL à l'acétate d'éthyle.

5.1.3 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE

Les molécules à activité antibiofilm ont été concentrées dans la phase aqueuse de l'ELL à l'acétate d'éthyle. Cette fraction a alors été injectée sur une colonne Sep-Pak® Plus C18 SPE manuellement à l'aide d'une seringue en conservant un débit de 5 ml/min (environ 2 gouttes par seconde sans pompe péristaltique).

La phase solide de cette colonne de chromatographie en phase inverse est très hydrophobe et apolaire ; elle est utilisée pour adsorber des molécules qui possèdent une faible hydrophobicité en solution aqueuse. La phase mobile utilisée est un mélange eau/ACN en pourcentage variable. La polarité de l'éluant est ainsi variable selon la concentration en chacun des solvants. Nous utilisons donc ici le fait que plus un composé est apolaire, plus il restera sur la phase solide et sera élué avec de forts pourcentages en ACN.

L'élution a été réalisée à l'aide d'un gradient de 5 % à 100 % d'acétonitrile (ACN) par paliers successifs. Avant de commencer l'élution, la colonne est rincée trois fois avec 10 ml d'eau milliQ. A chaque étape et palier, 10 ml d'éluat ont été collectés, puis l'ACN est évaporé sous vide dans un bain d'eau à 35°C. Les fractions ainsi obtenues sont nommées C18-ACN% en précisant le pourcentage d'ACN utilisé pour l'élution.

Les activités de toutes les fractions sont testées en microplaque 96 puits sur *Algibacter* sp. 1M6. La Figure 42 présente le profil d'élution représenté par les mesures d'absorbances des peptides et protéines à 280 nm et l'activité inhibitrice de chaque fraction.

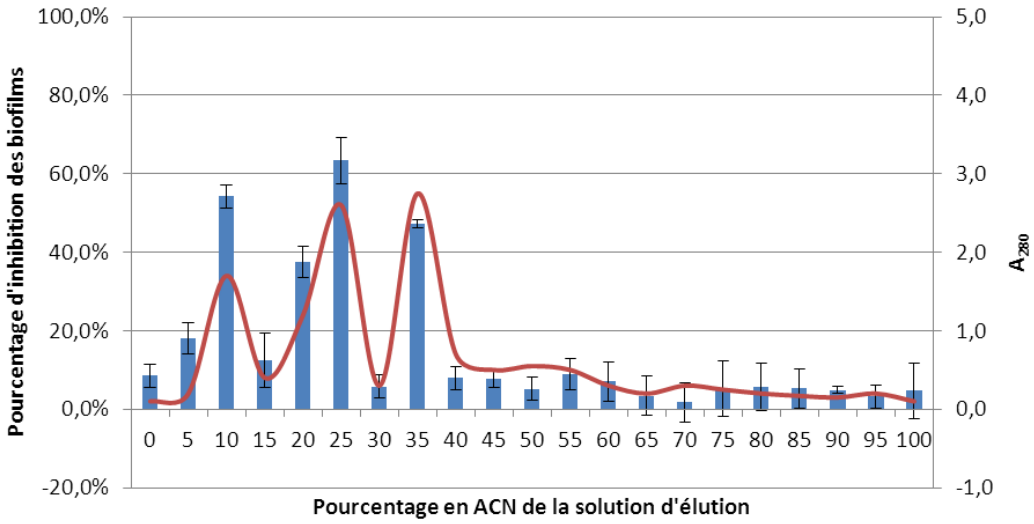


Figure 42. Séparation de la fraction aqueuse d'ELL par chromatographie en phase inverse C18. L'élution des peptides et/ou protéines et donnée par les mesures d'absorbance à 280 nm et l'activité antibiofilm de chaque fraction collectée est mesurée par le test en microplaque 96 puits.

Les trois fractions de séparation C18-ACN10, C18-ACN25 et C18-ACN35 présentent une activité antibiofilm significative avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 54,2 ± 3 %, 63,6 ± 6 % et 47,2 ± 1 %. Nous sommes donc en présence de plusieurs molécules qui présentent une activité antibiofilm détectable avec le test en microplaque. Nous observons également que l'activité est corrélée à chaque fois à une absorbance forte à 280 nm. Nous pouvons donc supposer que ces molécules sont de nature totalement ou partiellement protéique.

Des études menées sur la solubilité des acides aminés en acétonitrile (Gekko et al. 1998) permettent de déduire certaines caractéristiques biochimiques des peptides ou protéines purifiées à ce stade. Nous savons que ce sont des molécules solubles en milieux aqueux et qu'elles sont décrochées de la phase solide hydrophobe de la colonne C18 avec des pourcentages en acétonitrile inférieurs à 40 %. Or tous les peptides de moins de 5 résidus acides aminés sont solubles dans l'eau (sauf si tous ces résidus sont des acides aminés hydrophobes) selon Gekko et al. (1998). Cependant ces petits peptides ont une masse trop faible comparée aux masses détectées par MALDI-TOF. De plus, les peptides contenant plus de 50 % de résidus hydrophobes sont généralement insolubles ou partiellement solubles dans l'eau même si un quart de leurs résidus sont chargés, ce qui n'est pas le cas des

peptides séparés ici puisqu'ils sont solubles en milieu aqueux. Des études menées sur les peptides antimicrobiens (Wang et Wang 2004, Wang et al. 2009) montrent qu'ils contiennent une moyenne de 30 à 50 % d'acides aminés hydrophobes (une moyenne de 42,6 % selon la base de données à l'adresse http://aps.unmc.edu/AP/main.php). Les peptides anti microbiens sont alors élués avec 20 à 50 % d'ACN sur une colonne C18 SPE.

Nous pouvons émettre l'hypothèse, à partir de toutes ces caractéristiques, que nous sommes peut-être en présence de peptides actifs plutôt hydrophiles contenant plus de 30 % de résidus acides aminés chargés (comme Glu, Asp, His, Lys, Arg) et moins de 50 % de résidus hydrophobes (comme Ala, Ile, Leu, Val, Met, Phe, Trp) dans leur séquence. L'analyse des composés présents dans les fractions C18-ACN10, C18-ACN25 et C18-ACN35, éluées avec respectivement 10, 25 et 35 % d'ACN, a été effectuée en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 43).

L'analyse des fractions actives C18-ACN10, C18-ACN25 et C18-ACN35 révèle la présence de peptides ou de petites molécules majoritaires pouvant être liées à l'activité antibiofilm situés à des *m/z* de 5022, 5137 et 6380. Pour s'assurer de la présence de peptides, nous avons traité ces fractions avec de la protéinase K. Nous avons alors observé une perte totale de l'activité antibiofilm des trois fractions C18, ainsi que la disparition des ensembles de pics situés à des *m/z* entre 5022 et 6380. Ces résultats indiquent que les composés de ces fractions sont en partie de nature protéique.

L'étude et la purification ont été menées selon des méthodes généralement utilisées et développées pour la purification de peptides. Nous avons adapté nos protocoles à partir de plusieurs autres études (Hetru et Bulet 1997, Conlon 2007, Defer et al. 2009 et Schröder 2010). La chromatographie en phase inverse C18 est une méthode efficace avec une haute résolution notamment pour purifier des peptides antimicrobiens et des bactériocines provenant d'organismes marins (Defer et al. 2009, Haug et al. 2002) car elle permet dans un même temps de dessaler les échantillons et d'éviter ainsi des interactions de type salting-out qui provoquent la précipitation des protéines.

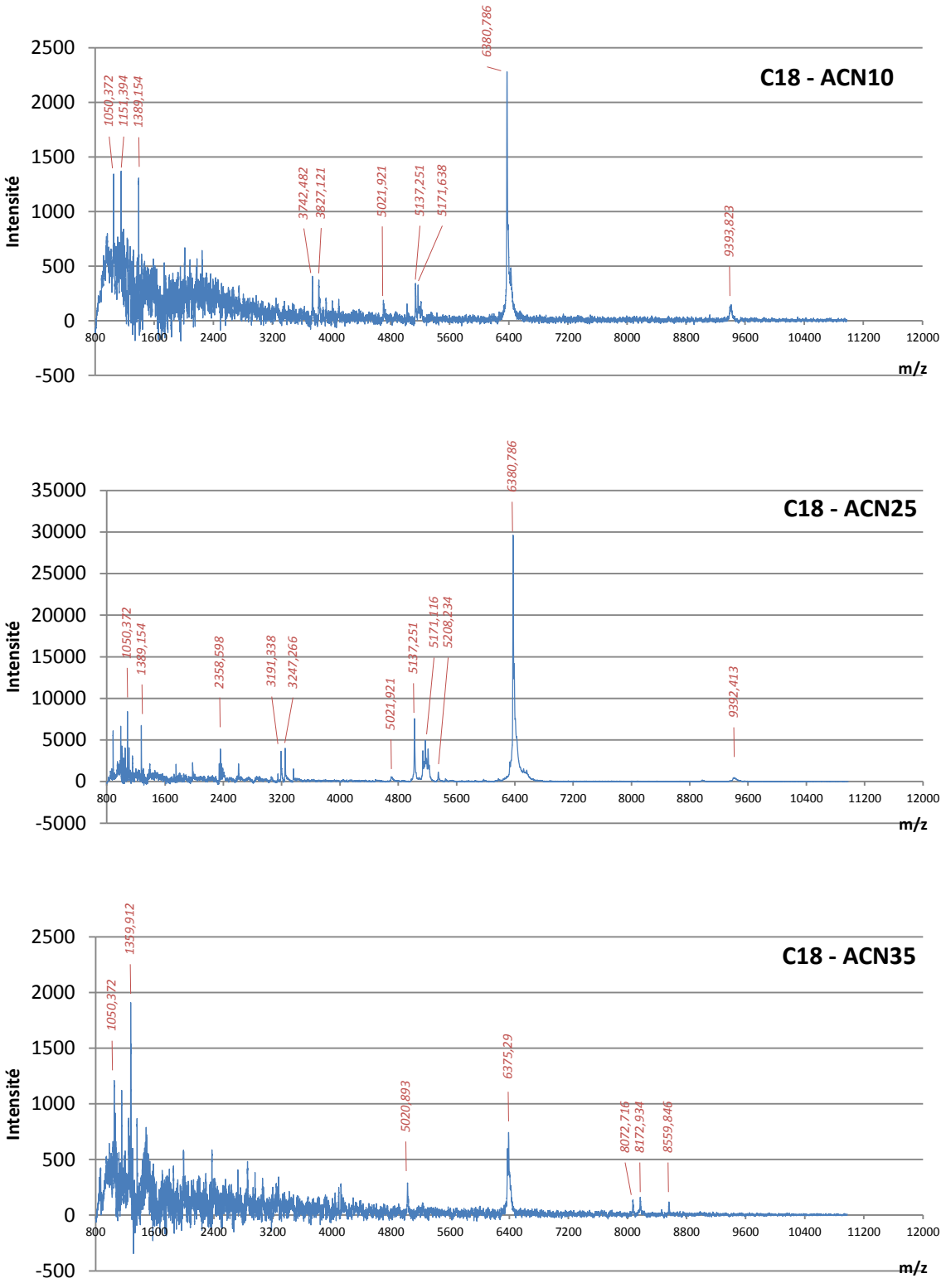


Figure 43. Analyse par spectrométrie de masse des trois fractions présentant une activité antibiofilm C18-ACN10, -ACN25 et –ACN35, issues de la séparation par chromatographie en phase inverse sur colonne C18.

Il s'avère que les molécules antibiofilm produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 présentent des caractéristiques proches des peptides antimicrobiens de par leur masse moléculaire qui est généralement comprise entre 1 et 5 kDa. De plus, les molécules antibiofilm de 3J6 semblent amphiphiles, puisqu'elles sont extraites en solutions aqueuses (Joerger 2003). Enfin, nous avons vu précédemment que ces molécules peuvent entraîner une perte de viabilité des bactéries en biofilm, ce qui est un argument supplémentaire permettant d'apparenter ces molécules à des peptides antimicrobiens. Cependant nous devons différencier les molécules inhibitrices produites par 3J6 des peptides antimicrobiens *stricto sensu* car celles-ci n'ont aucun effet sur les bactéries planctoniques, l'activité est spécifiquement antibiofilm.

La purification des fractions actives provenant de SN_{3J6} n'a pas été poursuivie par mes soins car nous avons choisi de nous concentrer sur la purification de SN_{D41}. Des expérimentations ultérieures sont nécessaires pour poursuivre la purification des molécules antibiofilm de 3J6.

Selon les protocoles établis dans la littérature et le guide de purification édité par Amersham (Protein and peptide purification, Amersham Biosciences) l'étape suivante de purification d'un peptide est une chromatographie en phase inverse en utilisant une autre matrice plutôt en C8 ou C4, ou en changeant le pH de la phase mobile.

Une autre solution serait aussi de poursuivre la purification par chromatographie d'interaction hydrophobe ou en filtration sur gel avec une colonne ciblant les peptides. Cependant cette étape n'est pas nécessaire si les composés sont assez purs et concentrés pour permettre une séparation par SDS-PAGE. Les bandes obtenues à partir du gel peuvent alors servir à séquencer les peptides.

5.2 MOLECULES ANTIBIOFILMS PRODUITES PAR D41

5.2.1 ULTRAFILTRATION

La mise en place d'une stratégie de purification des molécules antibiofilm produites par *Pseudoalteromonas* sp. D41 implique une première étape de concentration des molécules afin de diminuer les volumes à manipuler.

Nous avons réalisé comme précédemment pour SN_{3J6}, deux ultrafiltrations successives sur deux membranes, de seuils de coupure différents. La première séparation a fait intervenir une membrane avec un seuil de 100 kDa. Le rétentat, concentré en molécules de haut poids moléculaire, est conservé en l'état à -20°C pour les études d'activités. Le perméat, est à nouveau ultrafiltré sur une membrane de 10 kDa. Le rétentat récupéré est conservé sans aucun autre traitement à -20°C, alors que le perméat, très dilué, est lyophilisé. La poudre obtenue est resuspendue avec de l'eau milliQ jusqu'à obtenir la conductivité de l'eau de mer (5 S/m).

Les activités des deux rétentats et du dernier perméat ont été testées en microplaque 96 puits sur *Vibrio* sp. D02. Les résultats sont présentés Figure 44.

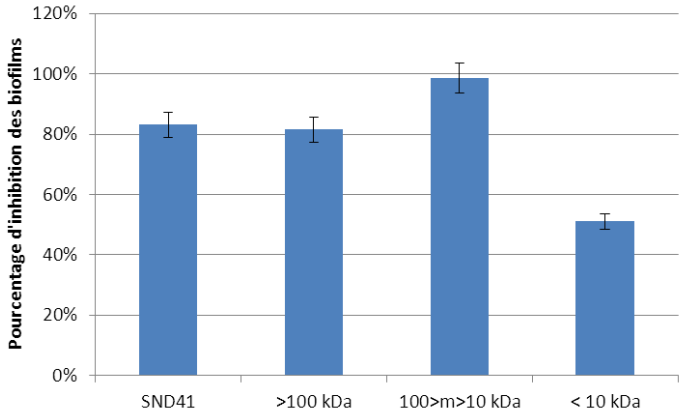


Figure 44. Activité antibiofilm de SN_{D41} et de trois fractions d'ultrafiltration, le rétentat (molécules > 100 kDa) de la première UF (membrane 100 kDa) et le rétentat (molécules entre 100 et 10 kDa, 100>m>10) et le perméat (molécules < 10 kDa) de la deuxième UF réalisée à partir du perméat de la première UF.

Nous pouvons observer que les trois fractions présentent des activités antibiofilm importante de 51,1 %, 98,7 % et 81,5 %. Nous avons donc des molécules actives de taille très diverses ou de taille si proche des seuils de coupure qu'elles se sont réparties dans les différentes fractions. En effet, le seuil de coupure n'est pas absolu et présente une incertitude de 5 à 10 % quant à la taille des molécules que les membranes peuvent retenir ou non. De plus, des molécules actives comme les enzymes peuvent aussi se lier aux membranes et compromettre la séparation (Shimizu 1985 et 2005).

Comme pour 3J6, l'utilisation de l'ultrafiltration pour concentrer les molécules actives produites par *Pseudoalteromonas* sp. D41 dans une seule fraction s'est révélée impossible. Nous avons donc choisi de commencer directement la séparation et la purification par chromatographie liquide.

5.2.2 CHROMATOGRAPHIE EN PHASE INVERSE

Le SN_{D41} a d'abord été fractionné par chromatographie en phase inverse sur une colonne SPE C18 en suivant le même protocole que pour le fractionnement du SN_{3J6}. Nous n'avons pu éluer aucune fraction active ni avec un gradient d'acétonitrile, ni avec un gradient de méthanol. Les molécules actives ont pu rester adsorbées sur la matrice hydrophobe ou ont perdu leur activité.

Nous avons donc choisi une autre stratégie, déjà éprouvée à l'Ifremer, consistant à purifier les molécules antibiofilm de SN_{D41} par chromatographie échangeuse d'anions.

5.2.3 CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUSE D'ANIONS

La chromatographie liquide échangeuse d'ions est une méthode de purification pouvant accepter un volume conséquent d'échantillon avec une grande capacité d'adsorption. Les colonnes utilisées sont des colonnes à seringue de type Hitrap car elles ne nécessitent pas

l'installation de matériel spécifique, juste une pompe péristaltique et des seringues. La chromatographie d'échange d'ions utilise les différences de charges nettes portées par les molécules à un pH et une force ionique donnée. Les molécules sont alors séparées en fonction de leur charge globale. Cette méthode, utilisée classiquement dans la plupart des protocoles de purification est efficace, résolutive, robuste et facile à mettre en œuvre (Whitford 2005). La méthode utilisée ici fait intervenir une résine de dextrans liée à un ammonium quaternaire [-O-N^+-$(CH_3)_3$], c'est un échangeur d'anions fort Hitrap Q Fast Flow.

Brièvement, 500 ml de SN_{D41} de conductivité équivalente à 0,3 M de NaCl ont été dilués 3 fois de façon à diminuer la force ionique de l'échantillon et à atteindre une conductivité équivalente à 0,1 M de NaCl. L'élution a été réalisée par un gradient de NaCl par paliers (de 0,1 à 1 M) à 1 ml/min et chaque fraction collectée a été testée pour son activité antibiofilm contre *Vibrio* sp. D02.

Le profil d'élution des protéines (en µg/ml, dosées par la méthode de Bradford) par fraction de 2 ml collectée, le gradient établi et les activités antibiofilm (testé en microplaque 96 puits sur *Vibrio* sp. D02) sont présentés Figure 45.

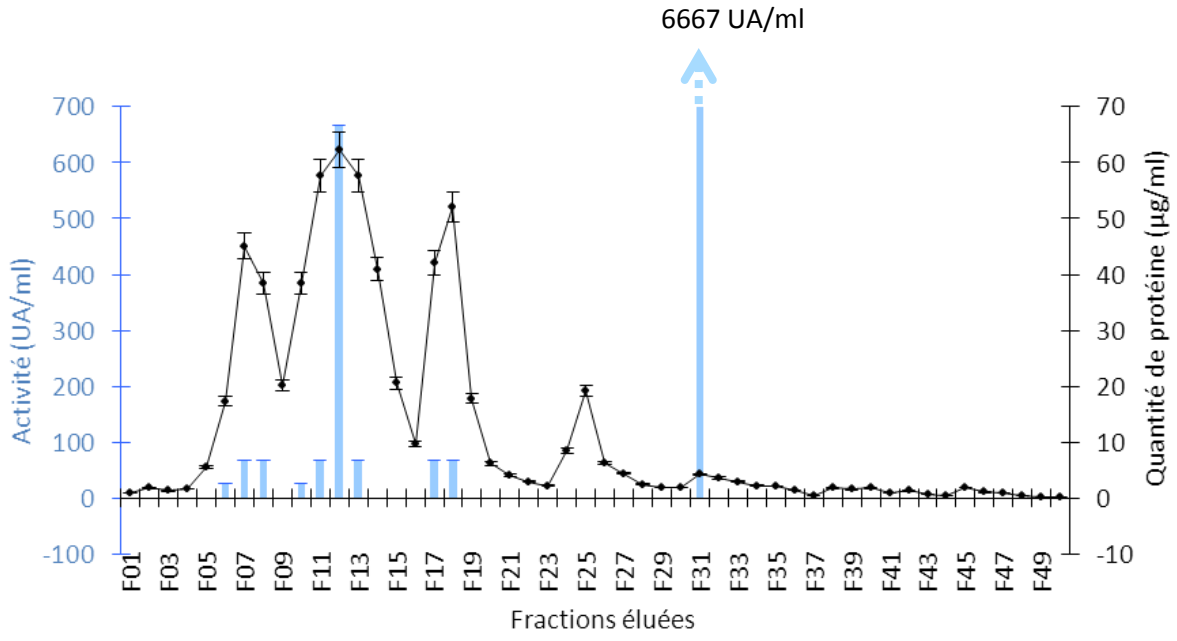


Figure 45. Séparation de SN_{D41} par chromatographie échangeuse d'anions de type Q Fast Flow. L'élution est exprimée en µg de protéines par ml (en noir) et l'activité antibiofilm de chaque fraction collectée est mesurée et présentée en pourcentage d'inhibition de biofilms de Vibrio sp. D02 (en bleu).

Nous notons que quatre ensembles distincts de fractions, élués avec des forces ioniques différentes, présentent une activité inhibitrice de la formation de biofilms. Ces ensembles sont :

- La fraction AIEX-0,3 correspondant aux fractions AIEX-F06, AIEX-F07 et AIEX-F08 éluées avec du NaCl 0,3 M dans du tampon Tris HCl 20 mM ;
- La fraction AIEX-0,4 correspondant aux fractions AIEX-F11, AIEX-F12 et AIEX-F13 éluées avec du NaCl 0,4 M dans du tampon Tris HCl 20 mM ;
- La fraction AIEX-0,5 correspondant aux fractions AIEX-F17 et AIEX-F18 éluées avec du NaCl 0,5 M dans du tampon Tris 20 mM ;
- La fraction AIEX-0,7 correspondant à la fraction AIEX-F31 éluée avec du NaCl 0,7 M dans du tampon Tris HCl 20 mM.

Par la suite, les purifications ont été réalisées avec des élutions de 10 ml de chaque concentration en NaCl afin de récupérer un maximum de molécules actives dans les fractions.

Nous observons que pour trois fractions, AIEX-0,3, -0,4 et -0,5, l'activité antibiofilm est corrélée à chaque fois à la présence de protéines, de 40 à 65 µg/ml. Nous pouvons alors supposer que ces molécules sont de nature totalement ou partiellement protéique. De plus, des dosages des sucres totaux de Dubois montrent que ces fractions contiennent une proportion de sucres non négligeable, orientant nos hypothèses de travail vers la purification d'une glycoprotéine. Par ailleurs, les activités spécifiques calculées pour les fractions actives sont égales ou supérieures à celles calculées pour le SN_{D41} (Tableau 3). Nous avons alors un enrichissement par rapport au surnageant brut de chacune de ces fractions en molécules actives.

Tableau 3. Tableau de purification de SN_{D41} par chromatographie échangeuse d'anions

	Activité (UA/ml)	Volume (ml)	Activité totale	Quantité totale de protéines (µg)	Activité spécifique	Taux de purification	Rendement (%)
SN_{D41}	67	500	33500	5000	6,7	1	100
AIEX-0,3	67	10	670	100	6,7	1	2
AIEX-0,4	667	10	6670	177	37,6	6	20
AIEX-0,5	67	10	670	94	7,1	1	2
AIEX-0,7	6667	10	66670	14	4728,3	706	199

Comme ces molécules sont éluées avec des forces ioniques différentes, nous pouvons supposer être en présence de plusieurs molécules différentes. Cependant, les forces ioniques d'élution des fractions AIEX-0,3, AIEX-0,4 et AIEX-0,5 sont très proches, il est alors possible que nous soyons en présence seulement d'une ou deux molécules différentes présentant des conformations différentes et donc une charge ionique nette de surface différente.

Le fait que la dernière fraction, AIEX-0,7, contienne 1,4 µg/ml de protéines laisse supposer que nous aurions purifié une protéine active en très faibles concentrations. Cependant, cette fraction contient aussi une concentration en sucres de 0,13 µg/ml (concentration en sucres de SN_{D41} = 0,2 µg/ml). Nous pouvons supposer alors que l'activité antibiofilm soit apportée par un ou des polysaccharides ou encore par une glycoprotéine possédant une longue chaîne polysaccharidique.

Analyses en spectroscopie optique infra-rouge (IR) à transmission

Avant toute chose, nous avions analysé le SN_{D41} en spectrométrie MALDI-TOF dans les mêmes conditions que pour le SN_{3J6}. Cependant, avec la matrice utilisée, nous avons échoué à détecter des pics entre des *m/z* de 800 à 150 000. Nous avons alors choisi de réaliser des analyses par spectroscopie IR. Cette technique nous permet de déterminer les caractéristiques des liaisons et les groupes fonctionnels des molécules présentes dans les fractions. Une illustration schématique des longueurs d'ondes d'absorbance des grands groupes fonctionnels est présentée Figure 46.

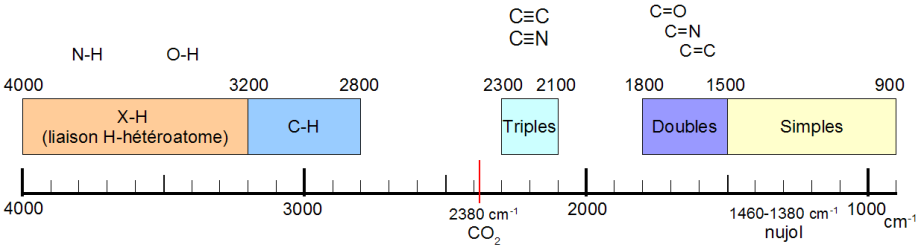


Figure 46. Localisation des principales liaisons en spectroscopie vibrationnelle Infra-rouge (illustration de David R. Kelly, wikimedia.org)

Les spectres obtenus à partir des fractions actives de séparation sont donnés sur toutes les longueurs d'onde dans la Figure 47, et entre 900 et 1800 cm^{-1} dans la Figure 48.

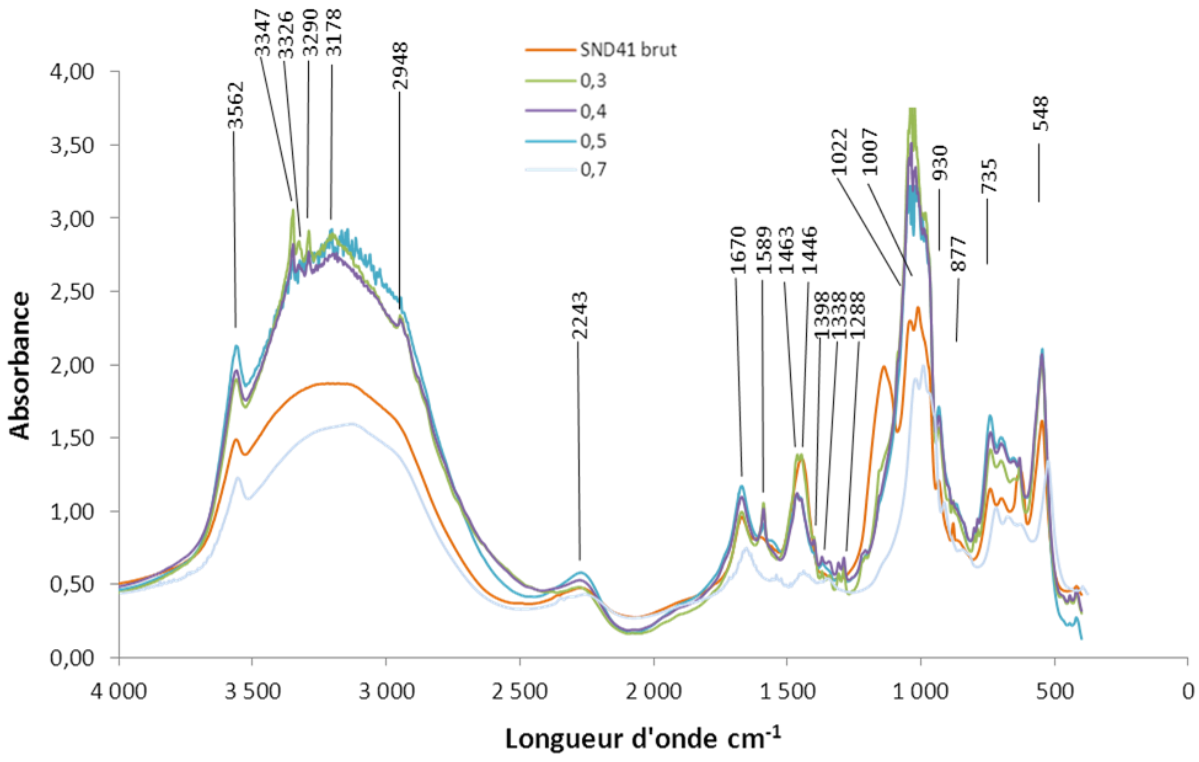


Figure 47. Spectre Infra-rouge en transmission du SN_{D41} et des fractions actives issues de la séparation par chromatographie par échange d'anions.

Les analyses ont été réalisées par transmission avec des pastilles de KBr contenant 10 % d'échantillon lyophilisé. Nous notons une forte similarité entre les spectres infra-rouge des quatre échantillons analysés. L'observation des spectres permet de confirmer que nos fractions sont encore constituées d'un mélange de protéines et de sucres, avec la présence d'autres contaminants.

Les pics d'absorbance observés dans le massif entre 2900 et 3500 cm^{-1} sont surtout liés à la présence de sucres dans les fractions. Les bandes observées entre 3178 et 3562 cm^{-1} sur la Figure 47 peuvent être attribuées aux vibrations des fonctions –OH présentes dans les composés glucidiques. De plus, nous observons une bande à 2948 cm^{-1} correspondant à la vibration des liaisons –CH. Ce type de liaison est très présent chez les sucres qui possèdent de longues chaînes carbonées et chez les lipides. Cependant nous n'avons pu observer de pics distincts. Par ailleurs nous avons noté la présence de nombreuses bandes entre 1200 et 1400 cm^{-1} qui correspondent aussi à la déformation de vibration des liaisons –OH et –CH. Nous observons également la présence d'un massif entre 1000 et 1100 cm^{-1} correspondant aux vibrations des liaisons C-O-R caractéristiques des polysaccharides.

Sur la Figure 47, la présence d'un massif à 2243 cm^{-1} peut être attribuée à la vibration des C à triple liaison. Ces C_{sp} sont caractéristiques des alcynes présents dans les hydrocarbures. Suite à des analyses Infra-rouge de pastilles de bovine serum albumine (BSA) avant et après lyophilisation, nous pouvons affirmer que la présence de tels composés dans les poudres provient d'une contamination des échantillons lors de la lyophilisation. En effet, le vide est obtenu lors de la lyophilisation par une pompe à vide à huile, il est alors possible qu'il y ait des échanges entre la pompe et la cloche où se trouvent les échantillons. Ce phénomène peut également expliquer la forte fluorescence des échantillons détectée lors d'essais d'analyses en spectroscopie Raman ; fluorescence trop importante pour permettre des analyses exploitables dans ce dernier cas. Nous devons donc éviter de lyophiliser nos échantillons pour les concentrer et utiliser plutôt une concentration par ultrafiltration en centrifugeuse sur une membrane avec un seuil de coupure de 3 kDa, le plus petit disponible. Cette méthode permet de dessaler et de réduire le volume d'échantillon de 30 à 50 fois.

En observant, Figure 47, l'intensité des pics entre 1000 et 1100 cm^{-1} (vibrations des liaisons C-O-R caractéristiques des polysaccharides) et les pics amide I et II entre 1500 cm^{-1} et

1700 cm^{-1} (Figure 48), nous pouvons noter une différence de proportions protéines/sucres entre le surnageant brut et les fractions de séparation.

Des bandes à 1670 et 1589 cm^{-1} correspondent à la vibration des fonctions amides I et II engagées dans une liaison peptidique. En effet, les amides I absorbent généralement à des longueurs d'onde vers 1650 cm^{-1}. Cette absorbance est due à l'étirement des liaisons C=O et -CN, et aux déformations des liaisons -NH dans le plan. Les amides II, quant à elles, absorbent vers 1550 cm^{-1}, cela correspond à la déformation des liaisons N-H dans le plan combiné aux élongations des liaisons C-N et C-C qui absorbent généralement entre 1515 et 1590 cm^{-1}. Ces ensembles de pics sont caractéristiques des vibrations des liaisons peptidiques. En comparant les intensités de ces pics amide I et II dans chaque fraction, nous notons qu'ils sont mieux définis et plus intenses dans les fractions AIEX-0,3, 0,4 et 0,5 que dans le SN_{D41} ou la fraction AIEX-0,7.

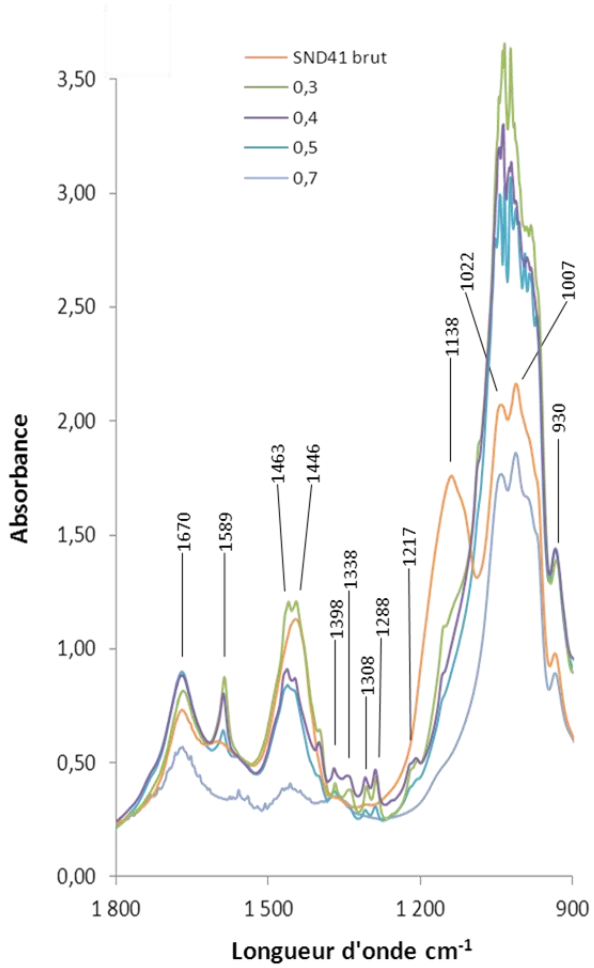


Figure 48. Spectre infra-rouge en transmission du SN_{D41} et des fractions actives issues de la séparation par chromatographie d'échange d'anions entre 900 et 1800 cm^{-1} de longueur d'onde

Dans la zone d'absorbance des amides, le pic d'absorbance détecté à 1670 cm^{-1} est plus intense dans les fractions AIEX-0,4 et AIEX-0,5 que dans le surnageant brut ou la fraction AIEX-0,3. Les différences sont aussi très marquées à 1000-1100 cm^{-1} où les pics des trois fractions de séparation ont une intensité très supérieure au surnageant brut allant jusqu'à saturer le détecteur à concentrations massiques équivalentes. Nous notons aussi la disparition dans les fractions de purification du pic à 1138 cm^{-1} présent dans le SN_{D41}.

Ces résultats confirment ceux obtenus par les dosages de Bradford et de Dubois qui montrent la présence de polysaccharides et de protéines dans les trois fractions actives AIEX-0,3, -0,4 et -0,5. Dans la fraction AIEX-0,7, les bandes amides I et II sont aussi présentes à 1662 et 1541 cm^{-1}. Néanmoins, les bandes amide I et II montrent des intensités très faibles, ce qui est cohérent avec les faibles concentrations en protéines mesurées avec la méthode de Bradford comparé aux autres fractions.

Analyse par électrophorèse : SDS-PAGE

Les profils protéiques de chaque fraction ont été analysés par électrophorèse sur gel à gradient de polyacrylamide de 4 à 20 % en conditions dénaturantes. La Figure 49 confirme les résultats d'IR et montre que les fractions de purification par chromatographie échangeuse d'anions sont encore des mélanges complexes de protéines. De plus, l'électrophorèse est dénaturante donc les bandes peuvent autant correspondre à des protéines ou à des peptides entiers qu'à des sous-unités protéiques.

Brièvement, chaque fraction de séparation par chromatographie d'échange d'anions est concentrée 50X par ultrafiltration en centrifugeuse sur une membrane de 3 kDa. Quelques microlitres sont prélevés de façon à pouvoir déposer 15 µg de protéine dans chaque puits pour être séparés par électrophorèse.

Nous observons que la fraction AIEX-0,7 est la moins concentrée en protéines des quatre fractions actives. Des bandes colorées au bleu de Coomassie étaient visibles mais très claires et sont mal ressorties lors du scan du gel même en accentuant le contraste. Cette fraction avait une absorbance à 280 nm faible et contenait 0,13 µg/ml de sucres. Cette répartition est

confirmée par l'électrophorèse qui ne montre qu'une faible coloration. Cette fraction est donc très peu concentrée en protéines mais néanmoins très active.

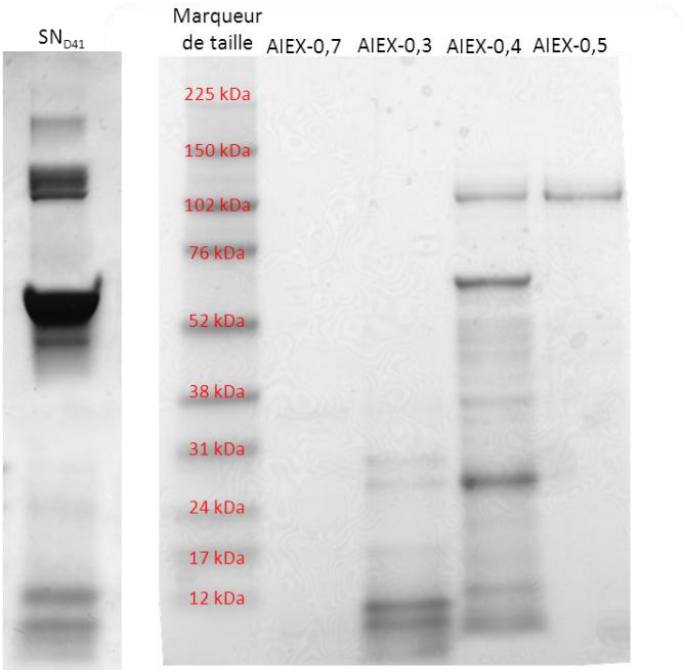


Figure 49. Gel de polyacrylamide (4-20 %) après électrophorèse en conditions dénaturantes et en présence de SDS des 4 fractions de séparation (AIEX-0,3, AIEX-0,4, AIEX-0,5 et AIEX-0,7) du SN$_{D41}$ par chromatographie d'échange d'anions, coloré au bleu de Coomassie.

Dans la fraction AIEX-0,3, nous observons majoritairement des bandes inférieures à 30 kDa. La fraction contient donc majoritairement de petites protéines. La fraction AIEX-0,4 montre une grande quantité de bandes, dont cinq apparaissent comme majoritaires dans l'échantillon. Ces bandes sont dues à des protéines de poids moléculaire de 102 kDa, 60 kDa, 27 kDa, 13 kDa et 6 kDa. Nous notons que la bande à 102 kDa est présente dans deux des trois fractions actives à dominante protéique. La dernière fraction est la fraction AIEX-0,5, la coloration des protéines séparées à partir de cette fraction ne fait apparaître qu'une seule bande prédominante à environ 102 kDa. Néanmoins, une autre électrophorèse, dont le gel a été coloré au nitrate d'argent (méthode plus sensible mais destructive), fait apparaître faiblement quelques bandes inférieures à 60 kDa le long de la piste de migration.

5.2.4 CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL

La colonne Superdex200 10/300 GL utilisée pour poursuivre la purification des molécules présentes dans les fractions AIEX-0,3, -0,4, -0,5 et 0,7 sépare leurs composants selon leur poids moléculaire entre 10 et 600 kDa. Nous avons choisi cette colonne car nous avons observé une grande variété de poids moléculaire allant de 6 à plus de 100 kDa dans nos échantillons. Sa résolution permet d'isoler des molécules avec une incertitude de 10 kDa.

Brièvement, 500 µl de chaque fraction de séparation par chromatographie d'échange d'anions ont été injectés sur une colonne Superdex200. Les composants des fractions sont élués avec du tampon PBS par fraction de 500 µl et l'absorbance est mesurée à 280 nm tout au long de l'élution. Nous avons ensuite testé l'activité des fractions collectées en microplaque sur *Vibrio* sp. D02.

Nous avons aussi calibré la colonne de filtration sur gel avec des protéines de poids moléculaires (PM) connus afin de pouvoir établir une corrélation entre le volume de rétention (Vret) et le PM des molécules. Les molécules utilisées sont : BSA (67 kDa), cytochrome C (13,6 kda), anhydrase carbonique (30 kDa), aprotinine (6,5 kDa) et alcool déshydrogénase (149,5 kDa). La courbe de calibration (logarithme du poids moléculaire en fonction du volume de rétention) permet d'établir une équation de corrélation entre poids moléculaires et volumes d'élutions (Eq 2) possédant un R^2 de 0,9976.

Cette équation de type polynomiale d'ordre 3 permet de calculer les logarithmes des poids moléculaire des composés séparés par la colonne de filtration sur gel. Puis l'Eq 3 permet de retrouver les poids moléculaires des composés.

Eq 2 $\quad Log(PM) = -0.0038\ Vret^3 + 0{,}1791 Vret^2 - 3{,}0244 Vret + 22{,}548$

Eq 3 $\quad PM = 10^{Log(PM)}$

Les spectres d'absorbance à 280 nm et les pourcentages d'inhibition mesurés dans chaque fraction de séparation sont présentés individuellement dans les Figures 50 à 53.

Dans la fraction AIEX-0,3 (Figure 50), nous n'observons que trois pics d'absorbance significatifs dénotant la présence de protéines. Ils correspondent à des masses de 10 kDa, 40 kDa et environ 300 kDa. Cependant les intensités d'absorbance sont relativement faibles ne dépassant pas 15 UA. Ce profil d'élution confirme les observations réalisées sur les gels d'électrophorèse qui montrent principalement des bandes inférieures à 40 kDa. Cependant, les tests d'inhibition de biofilms de *Vibrio* sp. D02 n'ont pas permis de mesurer une activité dans aucune des fractions. Nous pouvons supposer que les activités étaient trop diluées dans les fractions de séparation pour permettre de les détecter ou que les protéines ont été dénaturées. Il est également possible que l'activité antibiofilm soit due à l'action complémentaire de deux protéines différentes.

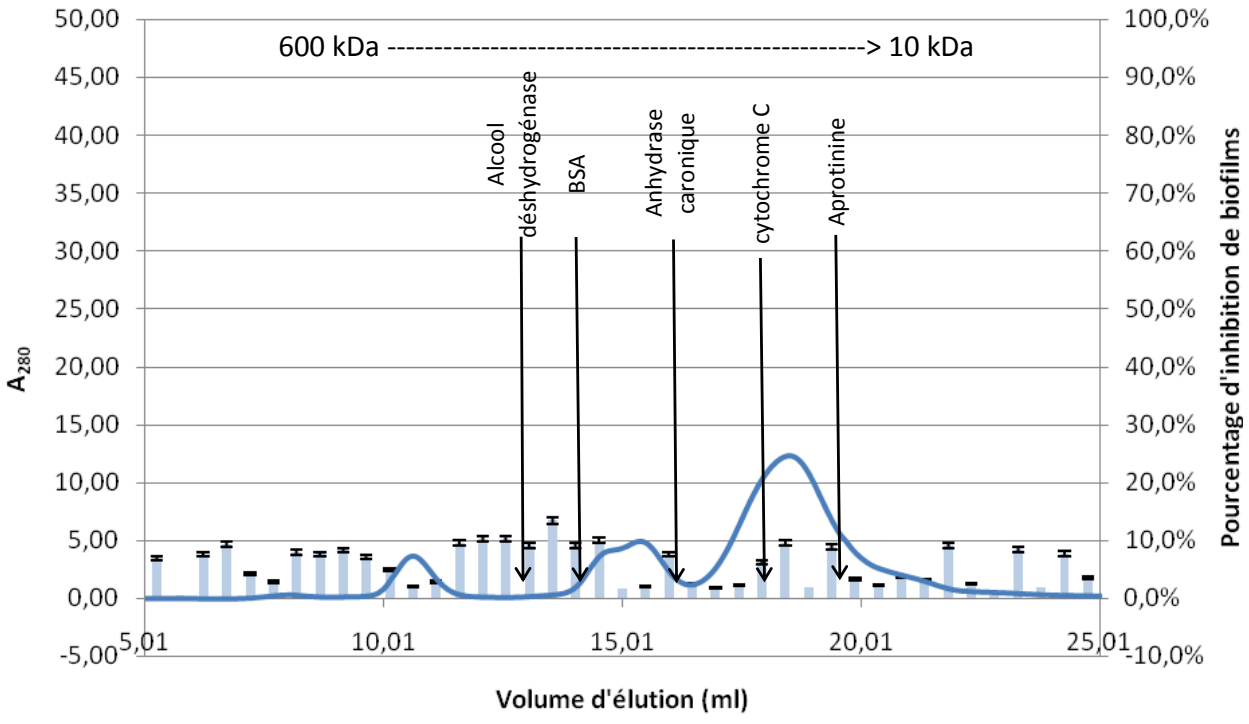


Figure 50. Séparation de AIEX-0,3 par chromatographie de filtration sur gel sur colonne Superdex200 10/300 GL. L'élution est présentée en absorbance à 280 nm (trait plein) et l'activité antibiofilm de chaque fraction collectée est mesurée et présentée en pourcentage d'inhibition de biofilms de Vibrio sp. D02 (en histogramme).

Le profil d'élution de la fraction AIEX-0,4 (Figure 51), présente 5 pics d'absorbance à 280 nm montrant la présence de protéines. Ils correspondent à des masses inférieure à 20 kDa, puis des masses d'environ 35 kDa, 80 kDa, 120 kDa, 350 kDa et à des molécules de PM supérieure à 600 kDa (seuil de coupure de la colonne). Les intensités d'absorbance ne dépassent pas 10 unités pour les protéines supérieures à 40 kDa. Cependant, nous avons mesuré une forte absorbance à 280 nm (37 unités) pour des protéines de 10 à 20 kDa. Ce profil d'élution est assez similaire aux observations réalisées sur les gels d'électrophorèse qui montraient de nombreuses bandes inférieures à 20 kDa et une bande à 110 kDa environ. Cependant, alors que les gels d'électrophorèse indiquaient la présence de protéines d'environ 27 kDa, nous ne retrouvons sur le profil d'élution qu'une faible absorbance à 280 nm correspondant à un Vret de 15,3 ml (proche du Vret de l'anhydrase carbonique).

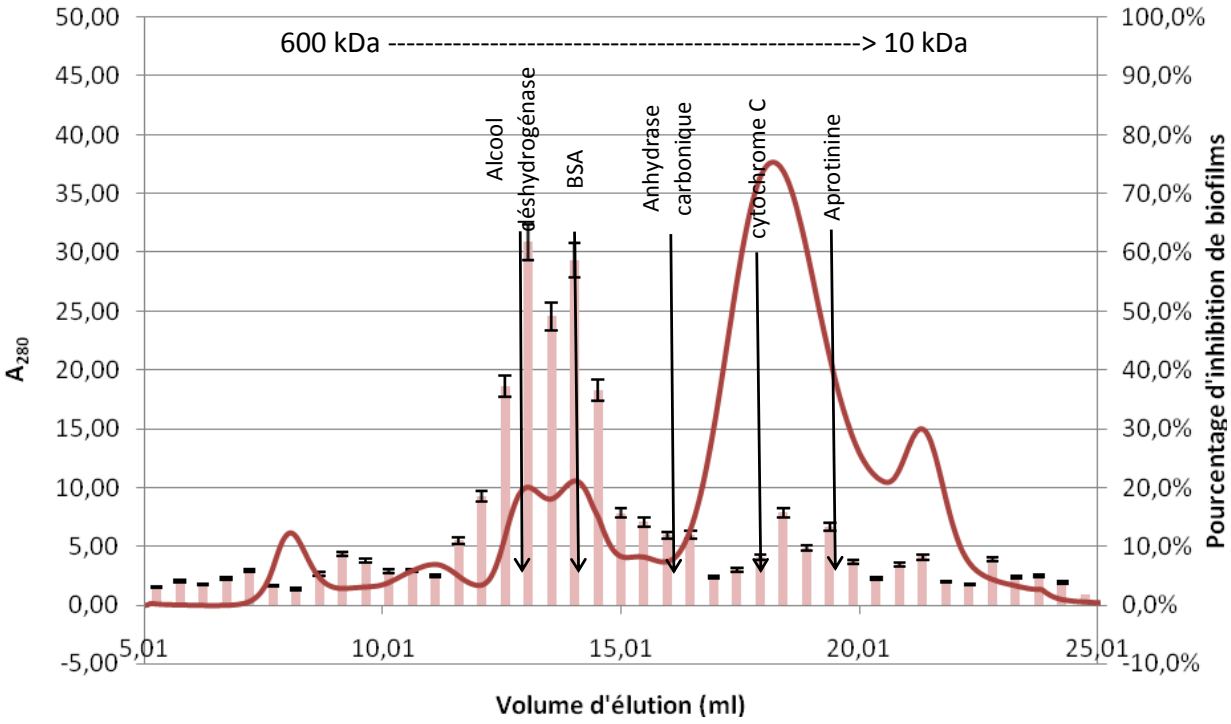


Figure 51. Séparation de AIEX-0,4 par chromatographie de filtration sur gel sur colonne Superdex200 10/300 GL. L'élution est présentée en absorbance à 280 nm (trait plein) et l'activité antibiofilm de chaque fraction collectée est mesurée et présentée en pourcentage d'inhibition de biofilms de Vibrio sp. D02 (en histogramme).

Les essais pour évaluer l'activité inhibitrice des fractions ont été réalisés sur *Vibrio* sp. D02. La comparaison du profil d'élution avec les activités mesurées permet de lier l'activité inhibitrice de cette fraction AIEX-0,4 à deux protéines (ou deux variants d'une même protéine) de poids moléculaire entre 80 et 120 kDa. Les 5 fractions présentant une activité inhibitrice (PI > 30 %) sont alors regroupées et concentrées par centrifugation sur une membrane de 3 kDa (8000 g, 2 h, 4°C) pour analyse par SDS-PAGE. Cette fraction ainsi préparée est alors nommée AIEX-0,4GF.

Dans la fraction AIEX-0,5 (Figure 52), nous observons trois pics d'absorbance à 280 nm montrant la présence de protéines. Ils correspondent à des masses inférieure à 10 kDa, 95 kDa, et à des molécules ou des agrégats de PM égal ou supérieur à 600 kDa (seuil de coupure de la colonne). Les intensités d'absorbance sont entre 10 et 15 unités pour les protéines de 10 et 95 kDa, mais nous observons une forte absorbance, à 42 unités pour les protéines de PM égal ou supérieur à 600 kDa. Ce spectre confirme les observations réalisées sur les gels d'électrophorèse qui montraient une seule bande intense à environ 100 kDa lors des colorations au bleu de Coomassie. Les autres protéines de poids moléculaire inférieur à 60 kDa n'ont été détectées qu'après des colorations au nitrate d'argent. Les tests d'inhibition menés sur *Vibrio* sp. D02 ont permis de mesurer une activité et de la localiser dans les fractions correspondant à des protéines, ou des conjugués, présentant un PM d'environ 90 à 110 kDa. Nous notons une correspondance avec la fraction AIEX-0,4 qui présentait aussi une activité antibiofilm pour cette gamme de poids moléculaire. Les 5 fractions présentant une activité inhibitrice (PI > 30 %) sont alors regroupées et concentrées par centrifugation sur une membrane de 3 kDa (8000 g, 2 h, 4°C) pour être analysées par SDS-PAGE. Cette fraction ainsi préparée est alors nommée AIEX-0,5GF.

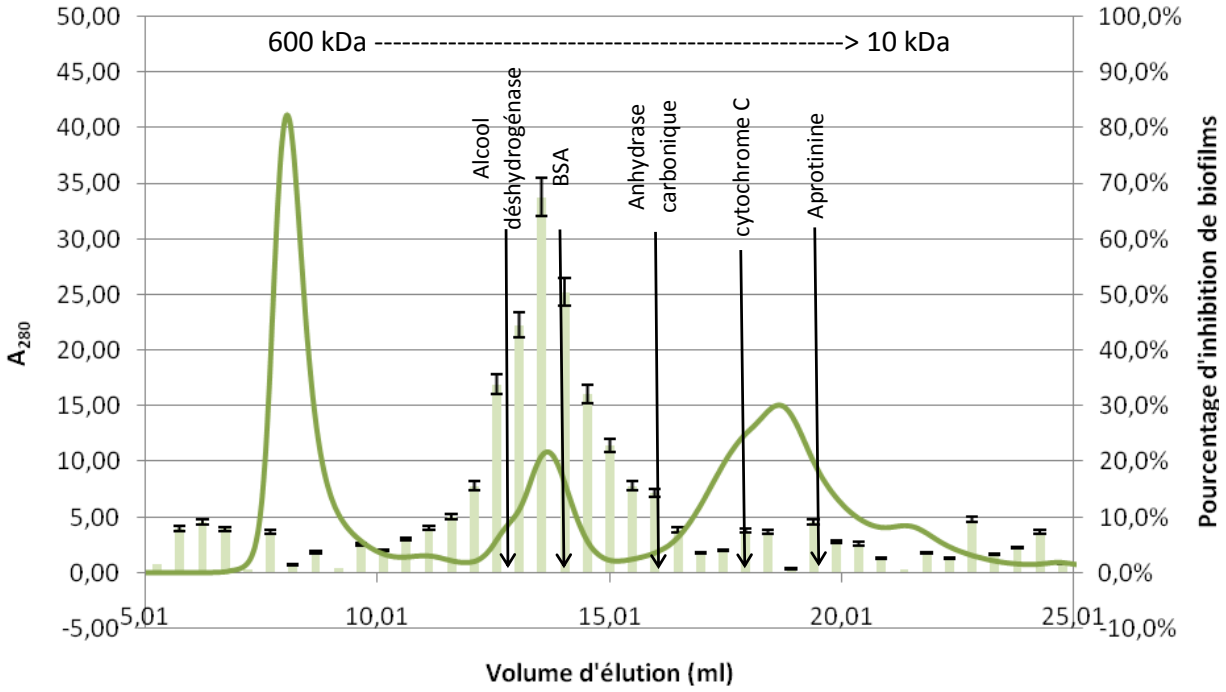


Figure 52. Séparation de AIEX-0,5 par chromatographie de filtration sur gel sur colonne Superdex200 10/300 GL. L'élution est présentée en absorbance à 280 nm (trait plein) et l'activité antibiofilm de chaque fraction collectée est mesurée et présentée en pourcentage d'inhibition de biofilms de Vibrio sp. D02 (en histogramme).

Dans la fraction AIEX-0,7 (Figure 53), nous n'observons que deux pics d'absorbance montrant la présence de protéines. Ils correspondent à des PM inférieurs à 20 kDa et à des molécules de taille supérieure à 600 kDa (seuil de coupure de la colonne). Les intensités d'absorbance sont faibles et inférieures à 10 unités pour les deux pics. Ce spectre confirme en partie les observations réalisées sur les gels d'électrophorèse, à savoir que nous n'avons probablement pas une concentration assez élevée en protéines pour être détectée par des colorations de gels au bleu de Coomassie. Les tests d'inhibition de biofilms de *Vibrio* sp. D02 ont permis de mesurer une activité et de la localiser dans les fractions éluées entre 8 et 10 ml. Ces volumes correspondent à des molécules de haut poids moléculaire, supérieur à 350 kDa. L'activité ne semble pas due majoritairement à une protéine. L'hypothèse est que nous sommes en présence de polysaccharides, de protéines polymériques ou d'hétéroprotéines présentant une activité antibiofilm. Cette hypothèse peut être vérifiée en électrophorèse, grâce à une double coloration, des protéines au bleu de Coomassie et des résidus glucidiques au réactif de Schiff.

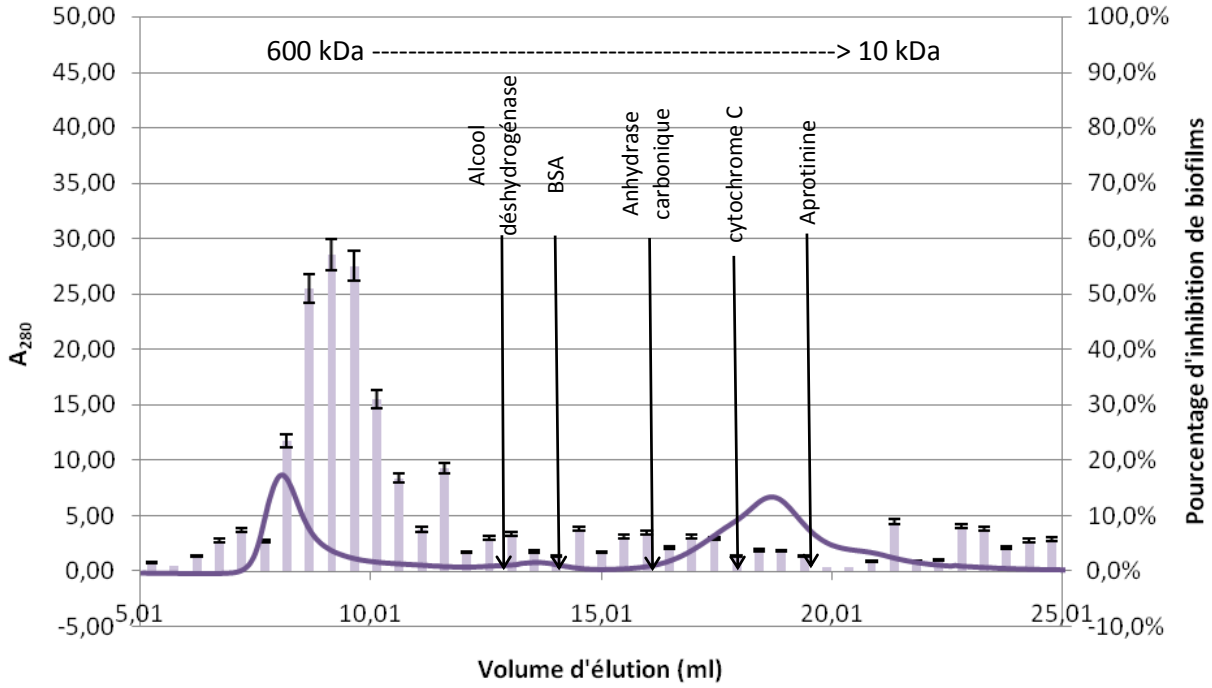


Figure 53. Séparation de AIEX-0,7 par chromatographie de filtration sur gel sur colonne Superdex200 10/300 GL. L'élution est présentée en absorbance à 280 nm (trait plein) et l'activité antibiofilm de chaque fraction collectée est mesurée et présentée en pourcentage d'inhibition de biofilms de Vibrio sp. D02 (en histogramme).

Analyses en électrophorèse : SDS-PAGE

A la suite des purifications, les fractions AIEX-0,4GF et AIEX-0,5GF ont été analysées sur gel à gradient de polyacrylamide de 4 à 20 % en conditions dénaturantes. La Figure 54 montre un bilan de ce qu'apportent les deux étapes de purification. Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie puis scannés.

Les deux étapes de purification nous ont permis d'isoler une protéine de poids moléculaire entre 90 et 110 kDa dans les deux fractions de séparation présentées Figure 52. Comme ce sont deux fractions adjacentes avec des forces ioniques assez proches lors de la première purification, il est probable que nous soyons en présence d'une même protéine.

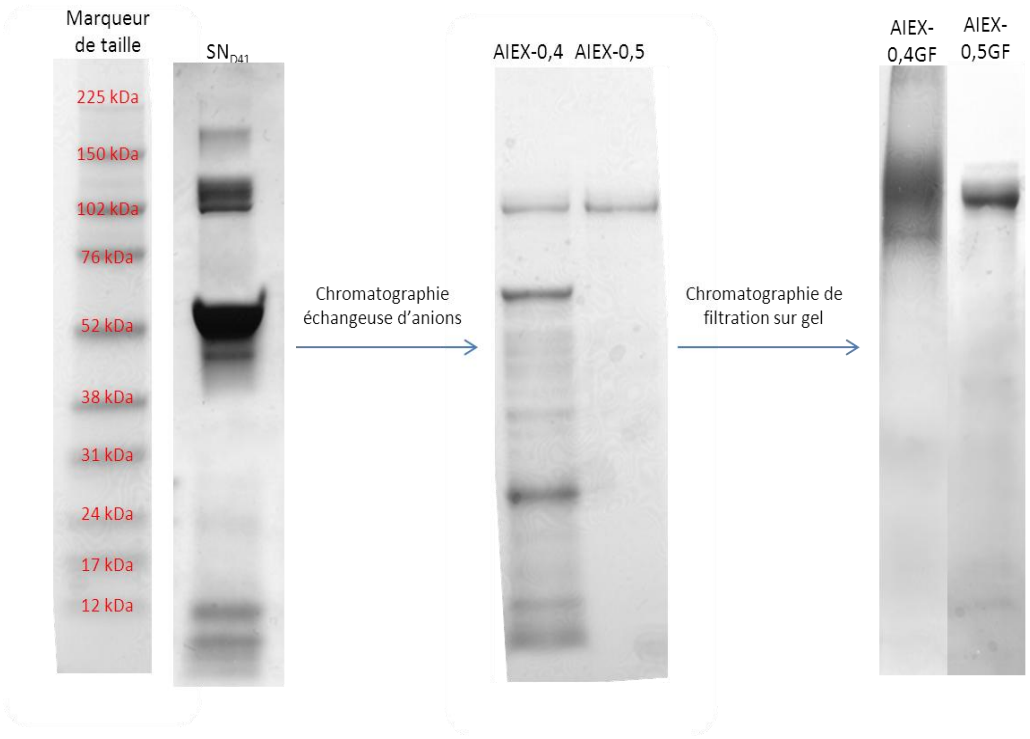


Figure 54. Gel d'électrophorèse (4-20 %) en conditions dénaturantes et en présence de SDS du SN_{D41} et de fractions de séparation par chromatographie échangeuse d'anions AIEX-0,4 et AIEX-0,5 et par chromatographie en filtration sur gel AIEX-0,4GF et AIEX-0,5GF, révélé au bleu de Coomassie. Le marqueur de poids moléculaire est placé à gauche.

Les gels ont été colorés au bleu de Coomassie pour pouvoir exciser les bandes protéiques et réaliser un séquençage.

Les bandes ont été individuellement conditionnées en acide acétique à 3 % et séquencées par spectrométrie de masse Orbitrap en collaboration avec Fanny Gaillard (Station Biologique de Roscoff). Après digestion à la trypsine, un séquençage *de novo* des fragments a été réalisé. Plusieurs séquences peptidiques ont été obtenues et l'identification des protéines est en cours d'analyse.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les biofilms bactériens représentent une des étapes pionnières dans l'établissement des salissures marines, suivie par la colonisation des algues et des organismes supérieurs, ou dans l'installation de maladies chroniques difficilement soignable. L'enjeu majeur, aujourd'hui, est d'empêcher l'établissement des biofilms en agissant sur les primo-colonisateurs des surfaces. Ainsi, le développement de nouveaux moyens de lutte non toxiques pour l'environnement ou les tissus est essentiel et nécessite la compréhension des toutes premières étapes de formation des biofilms. Deux souches du genre *Pseudoalteromonas*, D41 et 3J6, ont été sélectionnées pour leur propriété d'inhibition de formation de biofilm sur certaines espèces bactériennes.

Cette thèse a pour objectifs de décrire et de purifier des molécules antibiofilm secrétées par les souches *Pseudoalteromonas* sp. D41 et 3J6. Afin d'y répondre, mon travail s'est effectué selon trois axes : (i) optimiser les conditions de production des molécules inhibitrices, (ii) décrire leur spectre d'action et leurs effets sur différentes étapes de l'établissement des biofilms et (iii) purifier les molécules actives.

Dans un premier temps, nous avons développé un test en microplaque 96 puits permettant une évaluation rapide du potentiel d'inhibition sur les premières étapes d'adhésion et/ou sur la croissance du biofilm des molécules sécrétées par 3J6 et D41 (des surnageants et des fractions de purification). De plus, ce test en microplaque permet de doser l'activité antibiofilm d'un grand nombre d'échantillon, notamment lors des étapes de purification, en 24 h. Grâce à cet essai en microplaque, nous avons pu tester l'influence des conditions de culture sur la production de molécules antibiofilm par 3J6 et D41. Nous avons fait varier : la composition des milieux de culture, avec ou sans apport supplémentaire en glucose, et la durée des cultures. Cette étude, réalisée contre trois souches (*Vibrio* sp. D02, D66 et *Algibacter* sp. 1M6), a montré que 3J6 et D41 produisait des molécules actives (inhibitrices ou activatrices) dans tous les milieux de cultures testés, avec des effets différents en fonction des souches utilisées lors des tests. De manière générale, il est ressorti que le milieu VNSS semble le plus approprié pour permettre la production de molécules antibiofilm. C'est avec les molécules actives produites dans ce milieu de culture que nous avons mesuré les inhibitions les plus fortes sur les souches D02 et 1M6 (PI moyens de 75 % avec du surnageant

de 3J6 et 80 % avec du surnageant de D41), comparé aux molécules produites en Zobell ou en infusion de cœur de bœuf. Nous avons cependant observé que le surnageant de D41 produit en VNSS avait une activité pro-biofilm vis-à-vis de la souche D66, ce qui n'est pas le cas avec du surnageant de 3J6.

Par ailleurs, nous avons noté que l'activité inhibitrice des surnageants produits en VNSS était détectable à partir de la fin de phase exponentielle de croissance de 3J6 et D41 (à partir respectivement de 5 et 4 h de culture avec une DO_{600} d'ensemencement de 0,1). Pour 3J6, l'activité du surnageant continue d'augmenter au cours de l'incubation. Alors que chez D41, l'activité se maintient au cours de l'incubation jusqu'à 3 jours puis diminue. Les molécules inhibitrices produites par D41 semblent plus rapidement dégradées que celles produites par 3J6. Finalement, nous avons choisi de cultiver 3J6 et D41 en VNSS. Le surnageant de 3J6 est prélevé après 24 h de culture, et le surnageant de D41 est prélevé après seulement 12 h de culture.

Dans un second temps, nous avons étudié l'action des molécules inhibitrices sur 19 souches bactériennes différentes. Nous avons d'abord établi un spectre d'action pour chacun des surnageants actifs. Des essais réalisés en chambres d'adhésion et en microplaques montrent tous deux que les molécules inhibitrices sécrétées par 3J6 et D41 possèdent un large spectre d'action (13 souches bactériennes inhibées sur 19 testées), mais différent pour chacune des deux bactéries productrices. De plus, ces molécules, sécrétées par des bactéries marines, n'ont pas une action limitée à l'environnement marin. Ces molécules ont également inhibé la formation de biofilm de trois espèces bactériennes comprenant des souches pathogènes : *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'effet inhibiteur est très souche-dépendant, cependant, certaines bactéries de la classe des Protéobactéries (genres *Pseudoalteromonas* et *Alteromonas*) semblent être plus résistantes aux molécules sécrétées par 3J6 et D41, elles-mêmes appartenant à cette classe. Ces molécules sont aussi toutes deux originales car elles ne sont actives que sur la formation de biofilms d'autres espèces bactériennes. En effet, la recherche d'activité antibactérienne sur des bactéries planctoniques ou par la technique des disques de diffusion sur gélose n'a produit aucun effet sur la croissance des trois bactéries testées (*Paracoccus* sp. 4M6, *Vibrio* sp. D01 et *Algibacter* sp. 1M6) avec du surnageant brut comme avec du surnageant concentré x100.

Quelques travaux de la littérature font état de bactéries produisant des composés spécifiquement antibiofilm. Ce sont souvent soit des molécules modifiant les propriétés physico-chimiques des surfaces, soit des molécules présentant aussi une activité antibactérienne. Ainsi des polymères hydrophiles comme l'acide hyaluronique (Cassinelli et al. 2000) ou la poly-N-vinylpirrolidone (Boelens et al. 2000) permettent de réduire l'adhésion de *Staphylococcus epidermidis*. De même, une surface conditionnée avec de l'héparine montre une charge plutôt négative réduisant ainsi les interactions avec les fibronectines ; ce qui réduit la colonisation bactérienne des surfaces (Abdelkefi et al. 2007). En recherchant des molécules inhibant les biofilms, Rao et al. (2005) ont aussi mis en évidence chez *Pseudoalteromonas tunicata* D2 une protéine, AlpP, qui réduit la formation de biofilms des autres bactéries par son activité antibactérienne.

Précédemment, Dheilly (2007) n'a pu amplifier de gène codant pour AlpP chez 3J6 et D41, nous avons alors recherché si ces bactéries inhibaient la formation d'autres souches bactériennes en modifiant la physico-chimie des surfaces avec des molécules inhibitrices. Cependant, les molécules inhibitrices produites par 3J6 n'ont montré aucun effet ni sur l'adhésion d'autres bactéries ni sur la viabilité des bactéries adhérées, alors que leur croissance en biofilm était par la suite inhibée et/ou leur viabilité réduite. Les essais réalisés sur les molécules inhibitrices produites par D41 ont montré, quant à eux, que ces molécules peuvent agir en réduisant l'adhésion des bactéries sur les surfaces. Cependant, l'adhésion de certaines bactéries n'est pas affectée alors que leur croissance en biofilm l'est. De plus, contrairement aux molécules produites par 3J6, les molécules inhibitrices de D41 n'agissent pas sur la viabilité des bactéries en biofilm, mais seulement sur leur capacité à adhérer et/ou à croître en biofilm.

Dans une troisième partie, nous avons cherché à identifier la ou les molécules inhibitrices de la formation de biofilm produites par 3J6 et par D41. Nous avons commencé par évaluer la stabilité des molécules actives à la température et leur sensibilité à la protéinase K. Nous avons montré que les molécules antibiofilm contenues dans les surnageants de 3J6 et D41 étaient sensibles à la chaleur (50°C). A l'inverse, pour le stockage des molécules actives à basse température, nous avons conservé leur activité sur au moins 2 ans et demi à des températures inférieures à -20°C. Une perte progressive d'activité n'a été mesurée que pour des surnageants conservés à 4°C après 1 mois de conservation. En présence de protéinase K,

nous avons montré que les molécules produites par 3J6 et D41 perdaient totalement leur activité inhibitrice (PI < 20 %). Nous confirmons alors que les molécules inhibitrices de 3J6 et D41 sont de nature au moins partiellement protéique. De plus, nous pouvons supposer que la partie protéique est essentielle à l'activité puisque celle-ci disparaît lorsque qu'il y a dégradation avec une protéase.

Les molécules antibiofilm produites par 3J6 restent dans la phase aqueuse lors de l'ajout d'acétate d'éthyle. Cette phase aqueuse a alors été soumise à une chromatographie en phase inverse sur une colonne C18. Nous avons détecté une activité antibiofilm dans trois fractions différentes éluées avec 10, 25 et 35 % d'acétonitrile. Ces fractions présentent aussi de fortes absorbances à 280 nm suggérant la présence de peptides ou de protéines. Le traitement à la protéinase K de ces fractions a provoqué la perte de l'activité antibiofilm détectée, ce qui confirme la nature peptidique ou protéique des molécules actives. L'analyse de ces fractions en spectrométrie de masse a permis de corréler l'activité antibiofilm avec la présence de pics pour des *m/z* de 5022 et 6080 car ce sont ceux qui disparaissent en même temps que l'activité. Nous pouvons ainsi confirmer que l'activité antibiofilm du surnageant de 3J6 provient de peptides d'environ 5000 à 6000 Da.

Concernant les molécules antibiofilm produites par D41, nous avons été incapables de les séparer par chromatographie en phase inverse sur colonne C18. Nous avons alors changé de stratégie et choisi de commencer la purification par chromatographie échangeuse d'anions. Nous avons ainsi réussi à obtenir quatre fractions différentes (AIEX-0,3, -0,4, -0,5 et -0,7) présentant une activité antibiofilm dont trois sont associées à de fortes concentrations en protéines. La quatrième fraction (AIEX-0,7) contient une faible concentration en protéines et beaucoup de polysaccharides. Nous avons alors poursuivi la purification de chaque fraction par des chromatographies en gel filtrations (GF200 10/300 GL). Lors des tests d'activités, nous avons pu associer une activité antibiofilm avec une ou plusieurs molécules de poids moléculaire d'environ 100 kDa, à partir des fractions AIEX-0,4 et 0,5. Nous avons ensuite réalisé des SDS-PAGE. Les gels ont bien présenté une bande à environ 100 kDa, celle-ci a été excisée de la piste et séquencée.

Ainsi, en perspective à ce travail de description de l'effet antibiofilm et de purification des molécules sécrétées par 3J6 et D41, nous pouvons envisager plusieurs pistes d'études.

La première piste serait d'élargir le spectre d'action de ces molécules en testant notamment plus de bactéries à Gram-positif ou de bactéries pathogènes. En effet, le panel bactérien testé contenait une grande majorité de bactéries à Gram-négatif, or les bactéries à Gram-positif sont majoritaires dans les biofilms de la plaque dentaire par exemple. Nous pourrions ainsi élargir les domaines d'applications potentiels des molécules antibiofilm découvertes.

La deuxième perspective serait de poursuivre la purification des fractions présentant une activité antibiofilm. Pour les molécules produites par 3J6, la purification pourrait être réalisée par chromatographie d'interaction hydrophobe. En commençant avec une phase stationnaire greffée en phényle et une phase mobile de force ionique très élevée, les molécules seront séparées selon leur hydrophobicité en diminuant la force ionique lors de l'élution. Les fractions récoltées seront testées en microplaque et celles présentant une activité antibiofilm seront séparées par SDS-PAGE pour pouvoir exciser et séquencer la ou les bandes présentes pour l'identifier. Il serait alors intéressant d'obtenir le génome de 3J6 pour pouvoir identifier le gène codant pour l'activité antibiofilm. Pour les molécules produites par D41, le séquençage permet d'identifier la (les) molécule(s) portant l'activité antibiofilm. Par la suite, le clonage du gène codant pour l'activité dans *Escherichia coli* permettra de produire la molécule active plus facilement et en plus grande quantité.

Puis, une troisième perspective serait d'approfondir notre compréhension de l'effet des molécules antibiofilm produites par 3J6 et D41. D'un point de vue physico-chimique, nous avons montré que ces molécules conditionnent les surfaces, il serait alors intéressant de réaliser des analyses de surfaces afin de déterminer quels paramètres se trouvent modifiés (hydrophobicité, charges, pH de surface, …). Ensuite, d'un point de vue moléculaire, plusieurs approches peuvent être développées pour étudier le mécanisme d'action des molécules inhibitrices. A partir de molécules partiellement purifiées, nous pourrions observer l'effet de différents inhibiteurs (protéases, lipases, glycosidases, DNases, …). Nous pourrions également cribler des banques de mutants de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Escherichia coli* afin de rechercher des mutants insensibles aux SN_{3J6} et/ou SN_{D41}. L'identification des gènes inactivés chez les mutants insensibles permettrait de déduire le

mode d'action des molécules antibiofilm et leurs cibles moléculaires. Une autre approche serait encore de caractériser le protéome et/ou le transcriptome de bactéries sensibles en présence ou non de molécules inhibitrices afin d'observer l'impact de ces molécules sur les bactéries.

En conclusion, ces travaux ont permis d'apporter une contribution à l'étude des biofilms bactériens et à leur inhibition. La perspective d'utilisation des molécules antibiofilm produites par 3J6 et D41 sera de les incorporer dans des peintures antisalissure. Deux procédés sont envisageables : l'encapsulation ou le greffage sur des microbilles ou directement sur les surfaces. Le défi est de pouvoir conserver l'activité des molécules dans des environnements plutôt hostiles comme l'est le milieu marin. L'utilisation de telles molécules dans des revêtements de surface est, à ce jour, difficile principalement en raison des coûts de productions. En effet, en utilisant les souches productrices originales 3J6 et D41, nous ne produisons que quelques mg/L de molécules antibiofilm. Il serait possible de faire produire ces molécules par Escherichia coli, mais cela demandera encore beaucoup de mises au point. Nous pourrions aussi valoriser ces molécules d'origine marines dans le domaine médical car les applications demandent des quantités moins importantes que dans l'industrie et permet des coûts de production plus élevés. Ces molécules antibiofilm pourraient alors être greffées sur les surfaces des prothèses ou des cathéters.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelkefi A, Achour W, Ben OT, Ladeb S, Torjman L, Lakhal A, Ben HA, Hsairi M, Ben AA. 2007. Use of heparin-coated central venous lines to prevent catheter-related bloodstream infection. Journal of Supportive Oncology, 5, pp 273-278.

Araujo EA, de Andrade NJ, Mendes da Silva LH, de Carvalho AF, de Sa Silva CA, Ramos AM. 2010. Control of Microbial Adhesion as a Strategy for Food and Bioprocess Technology. Food and Bioprocess Technology, 3:3, pp 321-332.

ASTM D1141-90. 1992. Standard Specification for Substitute Ocean Water, pp 449-450.

Banks KM, Bryers JD. 1992. Deposition of bacterial cells onto glass and biofilm surfaces. Biofouling, 6, pp 81–86.

Barbieri E, Paster BJ, Hughes D, Zurek L, Moser DP, Teske A, Sogin ML. 2001. Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessoty nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda: Loliginidae). Environmental Microbiology, 3, pp 151-167.

Bassler BL. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology, 2:6, pp 582-587.

Becker P, Hufnagle W, Peters G, Hermann M. 2001. Detection of different gene expression in biofilm forming versus planktonik populations of Staphyloccocus aureus using microrepresentational-difference analysis. Applied and Environmental Microbiology, 6, pp 2958-2965.

Bellon-Fontaine MN, Cerf O. 1991. Mécanismes d'adhésion des micro-organismes aux surfaces : Facteurs influant l'adhésion. Cahier Scientifique et Technique, IAA, pp 13-17.

Beloin C, Houry A, Froment M, Ghigo JM, Henry N. 2008. A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. Plos Biology, 6:7, pp 1549-1558.

Bjarnsholt T, Jensen P, Burmolle M, Hentzer M, Haagensen JAJ, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Hoiby N, Givskov M. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxyde and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent. Microbiology, 151:2, pp 373 -383.

Blenkinsopp SA, Costerton JW. 1991. Understanding bacterial biofilms. Trends in biotechnology, 9:4, pp 138-143.

Böckelmann U, Manz W, Neu TR, Szewzyk U. 2002. Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent in situ hybridization and lectin-bindin-analysis. Journal of Microbiology Methods, 49, pp 75-78.

Boelens JJ, Tan WF, Dankert J, Zaat SA. 2000. Antibacterial activity of antibiotic-soaked polyvinylpyrrolidone-grafted silicon elastomer hydrocephalus shunts. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 45, pp 221-224.

Bourion F. 1995. Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono-et bimicrobiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua*. Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire, Massy, France.

Bosgiraud C. 2003. Microbiologie générale et Sante. Edition ESKA.

Bowman JP. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacteria genus Pseudoalteromonas. Marine Drugs, 5, pp 220-241.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72:1-2, pp 248-254.

Brading MG, Boyle J, Lappin-Scott HM. 1995. Biofilm formation in laminar-flow using Pseudomonas fluorescent EX101. Journal of Industrial Microbiology, 15:4, pp 297-304.

Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. Trends in Microbiology, 13, pp 20-26.

Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R. 2011. The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. PLoS One, 6:1.

Brint JM, Ohman DE. 1995. Synthesis of multiple exoproducts in Pseudomonas aeruginosa is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulatrors in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. Journal of Bacteriology, 177:24, pp 7155-7163.

Brown, R. 1866. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. In The miscellaneous botanical works of Robert Brown: Volume 1, Eds. Bennett J, Hardwicke R, London.

Burchard RP, Sorogon ML. 1998. A gliding bacterium strain inhibits adhesion and motility of another gliding bacterium strain in a marine biofilm. Applied and Environmental Microbiology, 64:10, pp 4079-4083.

Burgess RR. 2008. Protein Purification. In Proteomics of the Nervous System, Eds Nothwang HG and Pfeiffer SE, Wiley-VCH Verlag GmbH, Chapter 1, pp 1-18.

Burmolle M, Hansen LH, Sorensen SJ. 2007. Establishment and Early Succession of a Multispecies Biofilm Composed of Soil Bacteria. Microbial Ecology, 54:2, pp 352-362.

Bussher HJ, van der Mei HC. 1997. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Advances in Dental Research, 11, pp 24-32.

Cassinelli C, Morra M, Pavesio A, Renier D. 2000. Evaluation of interfacial properties of hyaluronan coated poly((methylmethacrylate) intraocular lenses. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 11, pp 967-977.

Castonguay MH, Van der Schaaf S, Koester W, Krooneman J, Van der Meer W, Harmsen H, Landini P.2006. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. Research in Microbiology, 157:5, pp 471-478.

Centers for Disease Control and Prevention Public Health Reports. 2007. Healthcare-associated infections and deaths in U.S. In Hospitals, Eds Monina Klevens R, Mars–Avril, 1.

Characklis WG, Cooksey KE. 1983. Biofilms and microbial fouling. Advances in Applied Microbiology, 29, pp 93-138.

Characklis WG. 1989. Microbial biofouling control. In Biofilms, Eds Characklis WG and Marshall KC, Willey, New-York. 15, pp 585-631.

Characklis WG, Turakhia MH, Zelver N. 1990. Transport and interfacial transfer phenomena. In Biofilms, Eds Characklis WG and Marshall KC, Willey, New-York, pp 316–340.

Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infection and Immunity, 37, pp 318-326.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology, 22, pp 996–1006.

Claisse D, Alzieu C. 1993. Copper contamination as a result of antifouling paint reggulations. Marine Pollution Bulletin, 26:7, pp 395-397.

Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt D, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. Veterinary Microbiology, 121:1-2, pp 1-17.

Cochran WL, Suh SJ, McFeters GA, McFeters GA, Stewart PS. 2000. Role of RpoS and AlgT in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide and monochloramine. Journal of Applied Microbiology, 88:3, pp 546-553.

Compère C, Bellon-Fontaine MN, Bertrand P, Costa D, Marcus P, Poleunis C, Pradier CM, Rondot B, Walls MG. 2001. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. Biofouling, 17:2, pp 129-145.

Conlon JM. 2007. Purification of naturally occurring peptides by reversed-phase HPLC. Nature Protocols, 2:1, pp191-197.

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. 1978. How bacteria stick. Scientific American, 238:1, pp 86-95.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial Biofilms. Annual Review of Microbiology, 49, pp 711-745.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999a. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284, pp 1318-1322.

Costerton JW. 1999b. Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents, 11:3-4, pp 217-221.

Courfort C, Derlon N, Ochoa-Chaves J, Liné A, Paul E. 2007. Cohesion and detachment in biofilm systems for different electron acceptor and donors. Water Science and Technology, 55:8, pp 421-428.

de Nys R, Steinberg PD, Willemsen P, Dworjanyn SA, Gabelish CL, King RJ. 1995. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. Biofouling, 8, pp 259-271.

Dalisay DS, Webb JS, Scheffel A, Svenson C, James S, Holmstrom C, Egan S, Kjelleberg S. 2006. A mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA)-like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva australis*. Microbiology, 152, pp 2875-2883.

Davies G. 2000. Physiological events in biofilm formation. In Community Structure and Co-operation in Biofilms, Eds Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M, Society for General Microbiology Symposia, pp 37-52.

Decho AW. 2010. Overview of biopolymer-induced mineralization: what goes on in biofilms? Ecological Engineering, 36:2, pp 137-144.

Defer D, Bourgougnon N, Fleury Y. 2009. Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. Aquaculture, 293:1-2, pp 1-7.

Degn P, Zimmermann W. 2001. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida Antarctica*. Biotechnology and Bioengineering, 74:6, pp 483-491.

Derjaguin B, Landau L. 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. Acta Physico-Chemica URSS, 14, pp 633.

Derlon N, Massé A, Escudié R, Bernet N, Paul E. 2008. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. Water Research, 42, pp 2102-2110.

Dhanasekaran D, Thajuddin N, Rashmi M, Deepika TL, Gunasekaran M. 2009. Screening of biofouling activity in marine bacterial isolate from ship hull. International Journal of Environmental Science and Technology, 6:2, pp 197-202.

Dheilly A. 2007. Biofilms bactériens marins multi-espèces : mise en évidence d'un effet antagoniste. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne-Sud, Lorient, France.

Dheilly A, Soum-Soutera E, Klein GL, Bazire A, Compère C, Haras D, Dufour A.2010. Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6. Applied and Environmental Microbiology, 76:11, pp 3452-3461.

Dickson JS, Daniels EK. 1991. Attachment of Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes to glass as affected by surface film thickness, cell density, and bacterial motility. Journal of Industrial Microbiology, 8, pp 281-284.

Dobretsov S, Dahms HU, Qian PY. 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. Biofouling, 22:1, pp 43-54.

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiological Reviews, 15, pp 167-193.

Egan S, Holmstrom C, Kjelleberg S. 2001. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of marine alga. International Journal of Systematic Bacteriology, 51, pp 1499-1504.

Egan S, Holmstrom c, Kjelleberg S. 2002. Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. Environmental Microbiology, 4, pp 433-442.

Faille C, Jullien C, Fontaine F, Bellon-Fontaine MN, Slomianny C, Benezech T. 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. Canadian Journal of Microbiology, 48:8, pp 728-738.

Fenical W. 1993. Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chemical Reviews, 93, pp 1673-1683.

Filloux A, Vallet I. 2003. Biofilm: positioning and organisation of bacterial communities. Medecine Sciences, 19:1, pp 77-83.

Flemming CA, Palmer RJ, Arrage AA, Van der Mei HC, White DC. 1999. Cell surface physico chemistry alters biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide mutants. Biofouling, 13:3, pp 213-231.

Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells." Journal of Bacteriology, 189, pp 7945-7947.

Fletcher M. 1976. Physicochemical aspects of marine bacterial attachment to solid-surfaces. Journal of Applied Bacteriology, 41:3, pp R17-R17.

Francolini I, Donell G. 2010. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology, pp 1-12.

Fusetani N. 2004. Biofouling and antifouling. Natural Product Reports, 21:1, pp 94-104.

Gauthier MJ, Munro PM, Breittmayer VA. 1989. Influence of prior growth-conditions on low nutrient response of Escherichia coli in seawater. Canadian Journal of Microbiology, 35:3, pp 379-383.

Gauthier MJ. 1976. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology, 26, pp 459-466.

Gauthier MJ, Flatau GN. 1976. Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. Canadian Journal of Microbiology, 22, pp 1612-1619.

Gauthier MJ. 1977. *Alteromonas citrea*, a new Gram-negative, yellow-pigmented species from seawater. International Journal of Systematic Bacteriology, 27, pp 349-354.

Gauthier MJ, Breittmayer VA. 1979. A new antibiotic-producing bacterium from seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 29, pp 366-372.

Gekko K, Ohmae E, Kameyama K, Takagi T. 1998. Acetonitrile-protein interactions: amino acid solubility and preferential solvation. Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology, 1387:1-2, pp 195-205.

Ghigo JM. 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature, 412:6845, pp 442-445.

Gibbons RU, van Houte J. 1975. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annual Review of Microbiology, 29, pp 19-44.

Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ, Rickard AH, Whyte FW. 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. Advances in Microbial Physiology, 46, pp 203-256.

Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S, Tolker-Nielsen T. 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. Environmental Microbiology, 7:6, pp 894-906.

Goller C, Romeo T. 2008. Environmental influences on biofilm development. Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunoligy, 322, pp 37-66.

Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallee-Rehel K, Haras D. 2003. Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-attached Marine Bacteria. Biofouling, 19:5, pp307-313.

Guezennec J, Mittelmann MW, Bullen J, White DC, Crolet JL. 1992. Stabilization of licalised corrosion on carbon steel by sulphate-reducing bacteria. UK corrosion, pp 92.

Haglund AL, Tornblom E, Bostrom B, Tranvik L. 2002. Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm. Microbial Ecology, 43:2, pp 232-241.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology, 2:2, pp 95-108.

Haug T, Kjuul AK, Stensvag K, Sandsdalen E, Styrvold OB. 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. Fish & Shellfish Immunology, 12, pp 371-385.

Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Molecular Microbiology, 20:5, pp 1083-1091.

Hetru C, Bulet P. 1997. Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. Methods in molecular biology, 78, pp 35-49.

Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by novel computer program COMSTAT. Microbiology, 146, pp 2395-2407.

Holmstrom C, James S, Egan S, Kjelleberg S. 1996. Inhibition of common fouling organisms by marine bacterial isolates with special reference to the role of pigmented bacteria. Biofouling, 10, pp 251-259.

Holmström C, James S, Neilan BA, White DC, Kjelleberg S. 1998. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, pp 1205-1212.

Holmstrom C, Kjelleberg S. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce active extracellular agents. FEMS Microbiology Ecology, 30 pp 285-293.

Holmstrom C, Egan S, Franks A, McCloy S, Kjelleberg S. 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS Microbiology Ecology, 41:1, pp 47-58.

Hotta K, Saito N, Okami Y. 1980. Studies on new aminoglycoside antibiotics, istamycins, from an actinomycete isolated from a marine environment, the use of plasmid profiles in screening antibiotic-producing streptomycetes. Journal of Antibiotics, 33, pp 1502-1509.

Huang YB, Wang WH, Peng A. 2000. Accumulation of Cu(II) and Pb(II) by biofilms grown on particulate in aquatic systems. Journal of Environmental Science and Health, Part A – Toxic/Hazardous substances and environmental engineering, 35:4, pp575-592.

Irie Y, Parsek MR. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322, pp 67- 84.

James SG, Holmstrom C, Kjelleberg S. 1996. Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. Applied and Environmental Microbiology, 62, pp 2783-2788.

Janek T, Łukaszewicz M, Rezanka T, Krasowska A. 2010. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. Bioresource Technology, 101:15, pp 6118-6123.

Jeong DK, Frank JF. 1994. Growth of Listeria monocytogenes at 10 degrees C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. Journal of Food Protection, 57, pp 576-586.

Jeyasekaran G, Karunasagar I, Karunasagar I. 2000. Effects of sanitizers on Listeria biofilm on contact surfaces. Asian Fisheries Science, 13, pp. 209-213.

Jiang P, Li J, Han F, Duan G, Lu X, Gu Y, Yu W. 2011. Antibiofilm Activity of an Exopolysaccharide from Marine Bacterium *Vibrio* sp. QY101. PLoS One, 6:4, pp 18514.

Joerger RD. 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poultry Science, 82, pp 640-647.

Jones GL, Muller CT, O'Reilly M, Stickler DJ. 2006. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57:2, pp 266-272.

Jouenne T. 2008. Biofilms bactériens. Techniques de l'Ingénieur, Bioprocédés, base documentaire. Techniques-ingénieur.fr

Kaplan JB. 2005. Methods for the treatment and opinion prevention of bacterial biofilms. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 15:8, pp 955-965.

Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Analytical Chemistry, 60:20, pp 2299–2301.

Klausen M, Aaes-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, 50:1, pp 61-68.

Klein GL, Soum-Soutera E, Guede Z, Bazire A, Compère C, Dufour A. 2011. The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. Biofouling, 27:8, pp 931-940.

Kolter R, Greenberg EP. 2006. Microbial sciences - The superficial life of microbes. Nature, 441 :7091, pp 300-302.

Kon-ya K, Schimidzu N, Otaki N, Yokoyama A, Adachi K, Miki W. 1995. Inhibitory effects of bacterial ubiquinones on the settling of the barnacle, *Balanus amphitrite*. Experientia, 51, pp 153–155.

Korber DR, Lawrence JR, Lappin-Scott HM, Costerton JW. 1995. Growth of microorganisms on surfaces, p. 15-45. In Microbial biofilms, Plant and microbial biotechnology research series: 5, Eds Lappin-Scott HM, Costerton JW, University Press, Cambridge, UK.

Kristensen JB, Meyer RL, Laursen BS, Shipovskov S, Besenbacher F, Poulsen CH. 2008. Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. Biotechnology Advances, 26, pp 471-481.

Kuchma SL, Connolly JP, O'Toole GA. 2005. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, 187:4, pp 1441-1454.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 227, pp 680-685.

Lahaye E. 2006. Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne-Sud, Lorient, France.

Langumier M, Sabot R, Sablé S, Jeannin M, Dheilly A, Lanneluc I, Refait P. 2010. Corrosion marine des aciers : rôle des interactions rouille verte sulfatée/bactéries sulfato-réductrices. Matériaux et Techniques, 98:1, pp 81-90.

Lasa I, Penades JR. 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. Research in Microbiology, 157, pp 99-107.

Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN. 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. Nature Reviews Microbiology, 2, pp 581-592.

Lee WC, de Beer D. 1995. Oxygen and pH microprofiles above corroding mild-steel covered with a biofilm. Biofouling, 8:4, pp 273-280.

Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. Journal of Immunology, 175:11, pp 7512-7518.

Lejeune P. 2003. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. Trends in Microbiology, 11:4, pp 179-184.

Lemon KP, Earl AM, Vlamakis HC, aguilar C, Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322, pp 1-16.

Lemos ML, Toranzo AE, Barja JL. 1985. Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. Microbiology and Ecology, 11, pp 149-163.

Leroy C. 2006. Lutte contre les sallissures marines : approche par procédés enzymatiques. Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.

Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D. 2008a. Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. Journal of Applied Microbiology, 105:3, pp 791-799.

Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D. 2008b. Effect of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. Biofouling, 24:1, pp 11-22.

Lewis K. 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322, pp 107-131.

Li ZS, Clarke AJ, Beveridge TJ. 1996. A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: Subcellular distribution, potential role in cell growth and division, and secretion in surface membrane vesicles. Journal of Bacteriology, 178:9, pp 2479-2488.

Li X, Dobretsov S, Xu Y, Xiao X, Hung OS, Qian PY. 2006. Antifouling diketopiperazines produced by a deep-sea bacterium, *Streptomyces fungicidicus*. Biofouling, 22:3, pp 201-208.

Loesche WJ. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiological Reviews, 50:4, pp 353-80.

Long RA, Qureshi A, Faulkner DJ, Azam F. 2003. 2-n-pentyl-4-quinolinol produced by a marine *Alteromonas* sp. and its potential ecological and biogeochemical roles. Applied and Environment Microbiology, 69, pp 568-576.

Lopez D, Fischbach MA, Chu F, Losick R, Kolter R. 2009. Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 106:1, pp 1091-6490.

Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R. 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: Purification and structural analysis. Journal of Bacteriology, 178:1, pp 175-183.

Mah TF, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, 9:1, pp 34-39.

Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. Nature, 426:6964, pp 306-310.

Mai-Prochnow A, Evans F, Dalisay-Saludes D, Stelzer S, Egan S, James S, Webb JS, Kjelleberg S. 2004. Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Applied and Environmental Microbiology, 70:6, pp 3232-3238.

Mårdén P, Tunlid A, Malmcrona-Friberg A, Odham G, Kjelleberg S. 1985. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. Archives of Microbiology, 142, pp 326-332.

Marshall KC. 1986. Adsorption and adhesion processes in microbial-growth at interfaces. Advances in Colloid and Interface Science, 25:1, pp 59-86.

Martinez LR, Casadevall A. 2007. *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Applied and Environmental Microbiology, 73:14, pp 4592- 4601.

May T, Ito A, Okabe S. 2009. Induction of Multidrug Resistance Mechanism in Escherichia coli Biofilms by Interplay between Tetracycline and Ampicillin Resistance Genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53:11, pp 4628-4639.

McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. Focus on Mucosal Microbiology, 9, pp 265-278.

McLean RJC, Bates CL, Barnes MB, McGowin CL, Aron GM. 2004. Methods of studying biofilms Microbial Biofilms, ASM Press.

Médigue C, Krin E, Pascal G, Barbe V, Bernsel A, Bertin PN, Cheung F, Cruveiller S, D'Amico S, Duilio A, Fang G, Feller G, Ho C, Mangenot S, Marino G, Nilsson J, Parrilli E, Rocha EP, Rouy Z, Sekowska A, Tutino ML, Vallenet D, von Heijne G, Danchin A. 2005. Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Genome, 15, pp 1325-1335.

Miloud R, Mireille L. 1995. Application of mechanical waves induced by piezofilms to marine fouling protection of oceanographic sensors. Smart Materials and Structure, 4, pp 195–201.

Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ, Sauer K. 2006. Bd1A, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology, 188:21, pp 7335-7343.

Neu TR. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. Microbiology Reviews, 60, pp 151–166.

Nithya C, Pandian SK. 2010. The invitro activity of selected marine bacterial culture supernatant against Vibrio spp. Archives of Microbiology, 192, pp 843-854.

Nitschke M, Araujo LV, Costa SGVAO, Pires RC, Zeraik AE, Fernandes ACLB. 2009. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. Letters in Applied Microbiology, 49, pp 241-247.

O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Molecular Microbiology, 30:2, pp 295-304.

Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Ogihara H, Kosono S, Yoneda S, Watanabe H, Morinaga Y, Uematsu H, Senpuku H. 2011. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. Applied and Environmental Microbiology, 77:5, pp 1572-1580.

Olguin-Uribe G, Abou-Mansour E, Boulanger A, De´bard H, Franscisco C, Combaut G. 1997. 6-Bromoindole-3-carbalde hyde, from an *Acinetobacter* sp. bacterium associated with the ascidian *Stomozoa murrayi*. Journal of Chemical Ecology, 23, pp 2507-2521.

Otto M. 2008. Staphylococcal biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322, pp 207-228.

Palmer RJ, Kazmerzak K, Hansen MC, Kolenbrander PE. 2001. Mutualism versus independence: Strategies of mixed-species oral biofilms in vitro using saliva as the sole nutrient source. Infection and Immunity, 69:9, pp5794-5804.

Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T. 2008. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. Cytometry, 75A, pp 90-103.

Paquin JL, Block JC, Haudidier K, Hartemann P, Colin F, Miazga J, Levi Y. 1992. Effet du chlore sur la colonisation bactérienne d'un réseau expérimental de distribution d'eau. Journal of Water Science, 5:3, pp 399-414.

Park YS, Park SJ. 2000. Determination and prediction of octanol/water partition coefficients and air-water partition coefficients for environmental toxic chemicals. Hwahak Kongop Taehak Reviews, 11:7, pp 773-779.

Parkar SG, Flint SH, Palmer JS, brooks JD. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. Journal of Applied Microbiology, 90:6, pp 901-908.

Parsek MR, Greenberg EP. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in Microbiology, 13:1, pp 27-33.

Paul V, Puglisi M, Ritson-Williams R. 2006. Marine chemical ecology. Natural Products Reports, 23, pp 153-180.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. 2007. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods, 72: 2, pp 157-165.

Percival SL, Bowler PG. 2004. Biofilms and their potential role in wound healing. Wounds, 16, pp 234-240.

Petry S, Furlan S, Crepeau MJ, Cerning J, Desmazeaud M. 2000. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium, Applied and Environmental Microbiology, 66:8, pp 3427–3431.

Pettitt ME, Henry SL, Callow ME, Callow JA, Clare AS. 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 perminuta*. Biofouling, 20:6, pp 299-311.

Pitts B, Hamilton MA, Zelver N, Stewart PS. 2003. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. Journal of Microbiological Methods, 54:2, pp 269-276.

Pradier CM, Rubio C, Poleunis C, Bertrand P, Marcus P, Compère C. 2005. Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. Journal of Physical Chemistry, 109:19, pp 9540-9549.

Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology, 30:2, pp 285-293.

Prigent-Combaret C, Lejeune P. 1999. Monitoring gene expression in biofilms. Biofilms, Methods in Enzymology, 310, pp 56-79.

Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology,181:19, pp 5993-6002.

Qian PY, Xu Y, Fusetani N. 2010. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. Biofouling, 26:2, pp 223-234.

Queck SY, Weitere M, Moreno AM, Rice SA, Kjelleberg S. 2006. The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. Environmental Microbiology, 8:6, pp 1017-1025.

Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiology Reviews, 34:6, pp 1037-1062.

Rammler DH, Zaffaroni A. 1967. Biological implications of DMSO based on a review of its chemical properties. Annals of the New York Academy of Sciences, 114:1, pp 13-23.

Ramsey DM, Wozniak DJ. 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. Molecular Microbiology, 56:2, pp 309-322.

Rao D, Webb JS, Kjelleberg S. 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. Applied and Environmental Microbiology, 71:4, pp 1729-1736.

Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps R, Christensen KB, Jensen PO, Andersen JB, Koch B, Larsen TO, Hentzer M, Eberl L, Hoiby N, Givskov M. 2005. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. Microbiology, 151:5, pp 1325-1340.

Rice SA, Givskov M, Steinberg P, Kjelleberg S. 1999. Bacterial signals and antagonists: the interaction between bacteria and higher organisms. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 1:1, pp 23-31.

Rodriguez SJ, Bishop PL. 2007. Three-dimensional quantification of soil biofilms using image analysis. Environmental Engineering Science, 24:1, pp 96-103.

Rosenberg M, Judes H, Weiss E. 1983. Cell-surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms *in situ*. Infection and immunity, 42:2, pp 831-834.

Rubio C. 2002. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prevention. Thèse de doctorat de l'Université Paris 6, France.

Russel PB Kline J, Yoder MC, Polin RA. 1987. Staphylococcal adherence to polyvinyl chloride and heparin-bonded polyurethane is species dependant and enhanced by fibronectin. Journal of Clinical Microbiology, 25, pp 1083-1087.

Sanford EB, Rittscho D. 1984. An investigation of low frequency sound waves as a means of inhibiting barnacle settlement. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 79, pp 149–154.

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. Journal of Bacteriology, 184:4, pp 1140-1154.

Sauer K, Culen MC, Rickard AH, Zeef LAH, Davies DG, Gilbert P. 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. Journal of Bacteriology, 186:21, pp 7312-7326.

Schakenraad JM, Busscher HJ. 1989. Cell-polymer interactions: The influence of protein adsorption. Colloids and surfaces B: Biointerface. 42, pp 331-343.

Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV. 1983. Epidemic Listeriosis – Evidence for transmission by food. New England Journal of Medicine, 308:4, pp 203-206.

Schröder JM. 2010. Purification of antimicrobial peptides from human skin. Methods in Molecular Biology, 618, pp 15-30.

Schumacher RW, Talmage SC, Miller SA, Sarris KE, Davidson BS, Goldberg A. 2003. Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium. Journal of Natural Products, 66:9, pp 1291-1293.

Seghal Kiran G, Anto T, Selvin J, Sabarathnam B, Lipton AP. 2010. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. Bioresource technology, 101:7, pp 2389-2396.

Shi W, Sun H. 2002. Type IV pilus-dependant motility and its possible role in bacterial pathogenesis. Infection and Immunity, 70, pp 1-4.

Shi L, Ardehali R, Caldwell KD, Valint P. 2000. Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 17, pp 229-239.

Shimizu Y. 1985. Bioactive marine natural products, with emphasis on handling of water-soluble compounds. Journal of Natural Products, 48, pp 223-235.

Shimizu Y, Li B. 2005. Purification of water-soluble natural products, Methods in biotechnology. Natural Products Isolation, 20, pp 415-437.

Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. 2009. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. Water Research, 43:1, pp 229-237.

Singh PK, Parsek MR, Greenberg ET, Welsh MJ. 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature, 417, pp 552-555.

Sissons CH, Yakub S. 2000. Suppression of urease levels in Streptococcus salivarius by cysteine, related compounds and by sulfide. Oral Microbiology and Immunology, 15:5, pp 317-324.

Speers JGS, Gilmour A. 1985. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. Journal of Applied Bacteriology, 59, pp 325-332.

Spormann AM. 2008. Physiology of microbes in biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322, pp 17-36.

Steinberger RE, Holden PA. 2005. Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 71, pp 5404-5410.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods. 40:2, pp 175-179.

Stewart PS, Costerton JW. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. LANCET, 358:9276, pp 135-138.

Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. Nature Reviews Microbiology, 6:3, pp 199-210.

Stoodley P, Boyle JD, Dodds I, Lappin-Scott HM. 1997. Consensus model of biofilm structure. In Biofilms: community interactions and control, Eds Wimpenny JWT, Gilbert PS, Lappin-Scott HM, Jones M, Cardiff, United-Kingdom, pp 1-9.

Suci PA, Tyler BJ. 2003. A method for discrimination of subpopulations of *Candida albicans* biofilm cells that exhibit relative levels of phenotypic resistance to chlorhexidine. Journal of Microbiological Methods, 53:3, pp 313-325.

Surman SB, Walker JT, Goddard DT, Morton LHG, Keevil CW, Weaver W, Skinner A, Hanson K, Caldwell D, Kurtz J. 1996. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. Journal of Microbiological Methods, 25:1, pp 57-70.

Sutherland IW. 2001. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology, 9:5, pp 222-227.

Suzuki Y, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K. 2006. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. Journal of Bioscience and Bioengineering, 102:2, pp 73-81.

Thar R, Kuhl M. 2005. Complex pattern formation of marine gradient bacteria explained by a simple computer model. FEMS Microbiology Letters, 246:1, pp 75-79.

Thenmozhi R, Nithyanand P, Rathna J, Pandian SK. 2009. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 57:3, pp 284-294.

Thomas KV, Brooks S. 2010. The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. Biofouling, 26:1, pp 73-88.

Thormann KM, Duttler SA, Saville R, Hyodo M, Shukla S, Hayakawa Y, Spormann AM. 2006. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR- 1 biofilms by cyclic- di- GMP. Journal of Bacteriology, 188:7, pp 2681-2691.

Tolker-Nielsen T, Molin S. 2000. Spatial organization of microbial biofilm communities. Microbiological Ecology, 40, pp 75-84.

Tomlin KL, Malott RJ, Ramage G, Storey DG, Sokol PA, Ceri H. 2005. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 71:9, pp 5208- 5218.

Townsin RL, Anderson CD. 2009. Fouling control coatings using low surface energy, foul release technology. Advances in marine antifouling coatings and technologies, pp 693–708.

Vadillo-Rodriguèz V, Bussher HJ, Van der mei HC, de Vries J, Norde W. 2005. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 41:1, pp33-41.

Van Houdt R, Michiels CW. 2005. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. Research in Microbiology, 156:5-6, pp 626-633.

Van Lossdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schroa G, Zehnder AJB. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. Applied and Environmental Microbiology, 53, pp 1893-1897.

Venkatesh S. 1993. Characterization of polymer-mucin bioadhesive systems. University of Minnesota, USA.

Verran J, Whitehead KA. 2006. Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. Food and Bioproducts Processing, 84:C4, pp 260-264.

Verwey EJW, Overbeek JThG. 1948. Theory of the stability of lyophobic colloids, Elsevier, Amsterdam.

Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: Involvement of a new ompR allele that increases curli expression. Journal of Bacteriology, 180:9, pp 2442-2449.

Wahl M. 1989. Marine epibiosis, Fouling and antifouling – some basic aspects. Marine Ecology – Progress Series, 58:1-2, pp 175-189.

Wang MS, Palmer LB, Schwartz JD, Razatos A. 2004. Evaluating protein attraction and adhesion to biomaterials with the atomic force microscope. Langmuir, 20:18, pp 7753-7759.

Wang Z, Wang G. 2004. APD: the Antimicrobial Peptide Database. Nucleic Acids Research, 32, pp D590-D592.

Wang G, Li X, Wang Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. Nucleic Acids Research, 37, pp D933-D937.

Wanner O, Bauchrowitz M. 2006. Les biofilms sont omniprésents. EAWAG News, 60:f, pp 4-7.

Weiss Nielsen M, Sternberg C, Molin S, Regenberg B. 2011. Pseudomonas aeruginosa and Saccharomyces cerevisiae biofilm in flow cells. Journal of visualized experiments: JoVE, 47.

Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science, 295:5559, pp 1487-1487.

Whitford M. 2005. Proteins, structure and fonctions. Eds John Willey and sons, Willey, UK. 9, pp 326-333.

Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming HC. 2001. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. In Methods in Enzymology, Microbial growth in biofilms, PT A: Developmental and molecular biological aspects, Eds Doyle RJ, Elsevier Academic press Inc, USA, 336, pp 302-314.

Yaphe W. 1957. The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae). Canadian Journal of Microbiology, 3, pp 987-93.

Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K. 2004. Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. Progress in Organic Coatings, 50:2, pp 75-104.

Zegeye A, Huguet L, Abdelmoula M, Carteret C, Mullet M, Jorand F. 2007. Biogenic hydroxysulfate green rust, a potential electron acceptor for SRB activity. Geochimica et Cosmochimica Acta, 71:22, pp 5450-5462.

Zobell CE. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriological Reviews, 10, pp 1-49.