



ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par :
Florence BRIAN-JAISSON

pour obtenir le grade de Docteur en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Microbiologie / Biochimie

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION
DES EXOPOLYMÈRES DE BIOFILMS DE
BACTÉRIES MARINES**

Soutenue le 6 février 2014

Direction :

M. BLACHE Yves

Co-encadrement :

Mme ORTALO-MAGNE Annick

Mme MOLMERET Maëlle

Mme GUENTAS Linda

MEMBRES DU JURY :

M. P. MICHAUD, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

M. J. FRENEY, Professeur, Faculté de pharmacie de Lyon

Mme S. COLLIEC-JOUAULT, Directeur de recherches, IFREMER, Nantes

Mme A. ORTALO-MAGNE, Maître de Conférences, Université de Toulon

Mme M. MOLMERET, Maître de Conférences, Université de Toulon

M. Y. BLACHE, Professeur, Université de Toulon

Rapporteur

Rapporteur

Président

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Ce doctorat a été réalisé au laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin (MAPIEM) de l'université de Toulon.

Je tiens en premier lieu à remercier le directeur du laboratoire, André Margaillan, pour m'avoir accueilli dans le laboratoire MAPIEM.

Je remercie Yves Blache pour avoir accepté la direction de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury ; M. Michaud et M. Freney qui ont bien voulu être rapporteurs et Mme Collic-Jouault pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie M. Armougom de l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes à Marseille pour son aide pour les arbres phylogénétiques. Je remercie également à M. Cérantola de l'université de Brest pour son aide pour les analyses en RMN.

Merci à mes encadrantes, Annick, Maëlle et Linda pour leurs aides, leur disponibilité et pour avoir mis à ma disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce projet. Et plus particulièrement un grand merci à Annick pour son immense disponibilité, son dynamisme, son écoute, sa gentillesse et qui m'a aidé du début jusqu'à la fin.

Je remercie Gérald pour son aide pour l'LC-MS et Jean-Francois pour les tests d'adhésion.

Mes remerciements s'adressent également à l'équipe du SIM et plus particulièrement à Jean-Michel pour son aide et ses conseils pour la CPG-SM et la RMN.

Merci à Ahmad pour tout son travail sur la partie AFM (et ce n'est pas fini !) et pour sa bonne humeur. Je remercie aussi Bernard Fache pour son aide au MEB.

Je remercie les stagiaires qui m'ont aidé et plus particulièrement Vincent Stenger et William Dufey qui furent formidables. Je n'oublie pas Benoit et Felix pour leur bonne humeur.

Merci à François-Xavier pour les pauses badminton/initiation au tennis !!

Je n'oublierai pas tous les très bons moments passés avec les filles de notre bureau de choc (Ahlem, Perrine, Mireille et Cynthia). Les soirées libanaises et laser quest, etc.... Les pauses volley et les pauses goûter. Toutes les sorties et restaurants avec Marlène, Sandra, Madeleine, Aurore, Claire, Lydia, Walid, Denis, etc.... Merci à tous.

Un grand merci à tous mes proches et plus particulièrement à mes parents qui me soutiennent et m'encouragent. Merci à Denis d'être présent à mes côtés et de partager ma vie.

A ma grand-mère Luce,

Liste des communications

Article

Florence Brian-Jaisson, Annick Ortalo-Magné, Linda Guentas-Dombrowsky, Fabrice Armougom, Yves Blache, Maëlle Molmeret (2013) Identification of bacterial strains isolated from Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microbial Ecology*. DOI : 10.1007/s00248-013-0342-9 (sous presse).

Communications orales

Florence Brian-Jaisson, Annick Ortalo-Magné, Maëlle Molmeret, Linda Dombrowsky et Yves Blache. « Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines: Recherche de molécules *antifouling* ». Congrès Graine d'Adhésion, 2012, Toulon, France.

Florence Brian-Jaisson, Maëlle Molmeret, Annick Ortalo-Magné, Linda Dombrowsky, et Yves Blache. « Identification et caractérisation de souches bactériennes isolées de biofilms en Méditerranée ». Workshop *Biofouling & Antifouling*, 2012, Toulon, France.

Florence Brian-Jaisson, Annick Ortalo-Magné, Maëlle Molmeret, Linda Dombrowsky et Yves Blache. « *Biofouling* et substances naturelles marines ». Forum biotechnologie de l'école ESIL, 2011, Marseille, France.

Perrine Van Overtvelt, Florence Brian-Jaisson, Mireille Armande Aye, Annick Ortalo-Magné, Yves Blache and Maëlle Molmeret. « Which marine bacterial model to study adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces? ». Workshop GenOcean, 2013, Banyuls, France.

Communications par affiche

Florence Brian-Jaisson, Maëlle Molmeret, Annick Ortalo-Magné, Linda Dombrowsky, et Yves Blache. « Caractérisation de souches bactériennes isolées de biofilms marins de la Méditerranée ». Workshop *Biofouling & Antifouling*, 2012, Toulon, France

Florence Brian-Jaisson, Annick Ortalo-Magné, Maëlle Molmeret, Linda Dombrowsky and Yves Blache. « Characterization of bacterial strains isolated from marine biofilms and study of their EPS ». International congress Biofilm, 2012, Paris, France.

Florence Brian-Jaisson, Annick Ortalo-Magné, Maëlle Molmeret, Linda Dombrowsky and Yves Blache. « Extracellular polymeric substances from a marine biofilm forming strain, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. Characterization of exopolysaccharides and antibiofilm activity ». International polysaccharide conférence EPNOE, 2013, Nice, France.

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	microscopie à force atomique
AHL	<i>N</i> -Acyl Homosérine Lactone
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
ARISA	<i>Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ASW	<i>Artificial Sea Water</i> (eau de mer artificielle)
BFRT [®]	<i>BioFilm Ring Test</i> [®]
BSA	albumine de sérum bovin
CER	résine échangeuse de cations
COSY	<i>COrelated SpectroscopY</i>
CPG-SM	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DGGE	électrophorèse sur gel en gradient dénaturant
EPS	substances polymériques extracellulaires
HPSEC	chromatographie d'exclusion stérique haute performance
IR-TF	Infra-Rouge à Transformée de Fourier
LC-MS	chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
MA	<i>Marine Agar</i>
MATS	test d'adhésion microbienne aux solvants
MB	<i>Marine Broth</i>
MBG	<i>Marine Broth</i> complémenté avec 3 % de glucose
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MHDP	Méta-HydroxyDiPhényl
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction en chaîne par polymérase
PGG	Poly-Glutamyl-Glutamate
PVDF	polyfluorure de vinylidène
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rpm	révolution par minute
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SS	<i>Sea Salt</i>
TBT	tributylétain
TFA	acide trifluoroacétique
tRFLP	<i>terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
UFC	Unité Formant une Colonie
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VBNC	viables mais non cultivables
VNSS	<i>Vaätanen Nine Salt Solution</i>

Abréviations des sucres

Ara	Arabinose
Fru	Fructose
Fuc	Fucose
Gal	Galactose

GalA	Acide galacturonique
GalN	Galactosamine
GalNAc	N-acétylgalactosamine
Glc	Glucose
GlcA	Acide glucuronique
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acétylglucosamine
Man	Mannose
Rha	Rhamnose
Rib	Ribose
Xyl	Xylose

Table des illustrations – Figures

Figure 1. Photos de stromatolites	4
Figure 2. Images de biofilm	4
Figure 3. Les six étapes de la formation d'un biofilm (Characklis, 1990)	9
Figure 4. Relation angle de contact/hydrophobicité de surface.....	12
Figure 5. Courbe de croissance bactérienne.	15
Figure 6. Echelle de pH reliée à quelques environnements (Rubio, 2002).	16
Figure 7. Intérieur d'une machine à laver le linge (à gauche) et un clapet de bonde de lavabo (à droite) recouverts de <i>biofouling</i>	18
Figure 8. <i>Biofouling</i> sur des coques de navire.....	19
Figure 9. Schéma de la formation du <i>biofouling</i> sur une surface (Haras, 2005)	19
Figure 10. Représentation schématique de la matrice extracellulaire d'un biofilm (a et b)	25
Figure 11. Photos de colonies mucoïdes	38
Figure 12. Principe du <i>BioFilm Ring Test</i> [®]	40
Figure 13. Photos de microplaques de BFRT [®] après aimantation	40
Figure 14. Protocole d'extraction et de purification des EPS à partir d'une culture bactérienne (Nicolaus <i>et al.</i> , 2002)	45
Figure 15. Protocole d'extraction de Liang <i>et al.</i> (2010)	46
Figure 16. Etapes effectuées pour le dénombrement bactérien	69
Figure 17. Emplacement des amorces utilisées sur le gène de l'ARNr 16S.....	70
Figure 18. Représentation schématique du swimming.....	71
Figure 19. Représentation schématique du swarming	72
Figure 20. Représentation schématique du twitching.....	72
Figure 21. Principe du <i>BioFilm Ring Test</i> [®]	75
Figure 22. Représentation d'un biofilm bactérien (en orange) sur un support (en bleu).....	78
Figure 23. Protocole d'extraction des EPS utilisant une résine échangeuse de cations (Dowex [®] Marathon [®] C de forme sodium)	79
Figure 24. Protocole d'extraction des EPS à la soude (NaOH 0,1 M).	80
Figure 25. Protocole de partage des EPS.	81
Figure 26. Protocole d'isolement et de séparation des polysaccharides des fractions EPS-FI-inter et EPS-FI-aq	81
Figure 27. Représentation de la mise en place de l'expérience de précipitation à l'alcool des polymères	82
Figure 28. Réactions du dosage colorimétrique des sucres totaux avec la méthode au phénol-acide sulfurique.	84
Figure 29. Réactions du dosage colorimétrique des acides uroniques avec la méthode au MHDP	86
Figure 30. Réaction de méthanolyse	90
Figure 31. Courbes de croissance de TC4, TC5 et de TC7 à TC15	115
Figure 32. Mesure de l'adhésion des souches bactériennes en microplaque.....	117
Figure 33. Cinétique de formation de biofilm dans 3 milieux de cultures (MB, MBG et VNSS) pour les souches TC5, TC8, TC9, TC11, TC12, TC13, TC14 et TC15	124
Figure 34. Production de biofilm en milieu liquide dans des boîtes de Petri	129
Figure 35. Protocole d'extraction des EPS libérées dans le milieu (EPS-sol) et des EPS faiblement liées (EPS-fl).....	130
Figure 36. Biofilm de TC14	131
Figure 37. Protocole d'extraction des EPS fortement liées aux bactéries (EPS-FI). Ce protocole est basé sur l'utilisation d'une résine échangeuse d'ion (Dowex [®]).....	133
Figure 38. Masses (mg) des EPS-sol, EPS-fl et EPS-FL pour TC5, TC9 et TC15 obtenues avec le protocole d'extraction avec une résine échangeuse de cations, pour 10 boîtes de Petri pour chaque souche bactérienne... ..	134
Figure 39. Protocole d'extraction des EPS fortement liées aux bactéries (EPS-FI). Ce protocole est basé sur l'utilisation d'une solution NaOH 0,1 M	137
Figure 40. Masse (en mg) d'EPS-FI extraites avec le protocole utilisant la soude (NaOH) en comparaison avec la résine échangeuse de cations (Dowex [®]).....	138
Figure 41. Masse (en mg) des 3 types d'EPS extraites pour 6 souches cultivées dans 10 boîtes de Petri.....	139
Figure 42. Chromatogramme en phase gazeuse des EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI de TC14 hydrolysées et triméthylsilylés.....	146
Figure 43. Chromatogramme en phase gazeuse du milieu MB dialysé puis hydrolysé et triméthylsilylés.....	147
Figure 44. Image du biofilm de <i>P. ulvae</i> TC14 au MEB.....	154
Figure 45. Spectres Infra-Rouge des EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI isolées de biofilms de de <i>P. ulvae</i> TC14	157

Figure 46. Protocole d'isolement et de fractionnement des exopolysaccharides	159
Figure 47. Pourcentages relatifs (masse/masse EPS) de la phase organique, de l'interphase et de la phase aqueuse des EPS-sol, des EPS-fl et des EPS-Fl.	160
Figure 48. Chromatogrammes (CPG-SM) des dérivés triméthylsilylés des produits d'hydrolyse acide des EPS-Fl, POL-Fl-aq et POL-Fl-inter	161
Figure 49. Courbe d'étalonnage établie avec des standards de pullulanes	163
Figure 50. Profils HPSEC des échantillons POL-sol-aq, POL-fl-aq, POL-fl-inter, POL-Fl-aq et POL-Fl-inter	164
Figure 51. Pourcentages massiques de chaque fraction après analyse en chromatographie échangeuse d'ions de l'échantillon POL-Fl-inter.....	165
Figure 52. Profils HPSEC des fractions de chromatographie échangeuse d'anions de POL-Fl-inter en comparaison avec le profil de l'échantillon global	167
Figure 53. Spectres RMN- ¹ H de l'échantillon POL-Fl-inter et des fractions issues de l'analyse par chromatographie échangeuse d'ions de cet échantillon	169
Figure 54. Spectre RMN- ¹ H de l'échantillon POL-Fl-inter 0 M.....	169
Figure 55. Structure et RMN- ¹ H (dans D ₂ O) d'un poly-glutamyl-glutamate (PGG) (Van <i>et al.</i> , 2010).....	170
Figure 56. Spectre RMN- ¹ H de l'échantillon POL-Fl-inter 0,8 M.....	170
Figure 57. Spectre COSY ¹ H- ¹ H de l'échantillon POL-Fl-inter 0,8 M.....	171
Figure 58. Pourcentages massiques de chaque fraction après analyse en chromatographie échangeuse d'ions de l'échantillon POL-Fl-aq	172
Figure 59. Profils HPSEC des fractions de chromatographie échangeuse d'anions de POL-Fl-aq en comparaison avec le profil de l'échantillon global.....	173
Figure 60. Spectres RMN- ¹ H de l'échantillon POL-Fl-aq et des fractions issues de la chromatographie échangeuse d'ions de cet échantillon	174
Figure 61. Spectre RMN- ¹ H de l'échantillon POL-Fl-aq 0,4 M	176
Figure 62. Spectre Infra-Rouge de l'échantillon POL-Fl-aq.....	177
Figure 63. Profils HPSEC des fractions 0 M (A), 0,4 M (B) et 0,8 M (C) de la phase aqueuse et de l'interphase de l'échantillon POL-Fl	179
Figure 64. Spectres RMN- ¹ H des fractions 0 M (A), 0,4 M (B) et 0,8 M (C) des échantillons POL-Fl-aq et POL-Fl-inter.	180
Figure 65. Images AFM (topographie et contraste de phase) du substrat silicium Si utilisé avant le dépôt d'exopolymères.....	181
Figure 66. Images AFM (topographie et contraste de phase à deux échelles différentes) de POL-Fl-inter 0 M à 10 µg/mL sur une surface Si	182
Figure 67. Images AFM (topographie et contraste de phase à deux échelles différentes) de POL-Fl-aq 0,4 M à 10 µg/L sur une surface Si	183
Figure 68. Chromatogrammes (CPG-SM) des dérivés triméthylsilylés des produits d'hydrolyse acide des EPS-TFl et EPS-TFl-inter	184
Figure 69. Profil HPSEC de l'échantillon Pol-TFl-inter	185
Figure 70. Résultats du BFRT [®] (photographie du fond des puits) après 48 h d'incubation et aimantation.....	187
Figure 71. Test antibiofilm de six échantillons sur 5 souches de bactéries marines	189
Figure 72. Structure chimique de la violacéine	191
Figure 73. Analyse de la phase organique des EPS par HPLC-SM	192
Figure 74. Suivi de l'absorbance à 600 nm au cours du temps d'une culture planctonique de <i>P. ulvae</i> TC14 en Erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de milieu.	193
Figure 75. Pourcentages relatifs (masse/masse EPS) de la phase organique, de l'interphase et de la phase aqueuse des EPS-sol, des EPS-Fl et des EPS-TFl.....	194
Figure 76. Chromatogrammes CPG-SM des dérivés triméthylsilylés des produits d'hydrolyse acide des EPS-sol, EPS-Fl et EPS-TFl	195
Figure 77. Profils HPSEC des échantillons POL-sol-aq issus de cultures planctoniques (Pl) ou en biofilm (Bf). Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction	196
Figure 78. Profils HPSEC des échantillons POL-Fl-aq issus de cultures planctoniques (Pl) ou en biofilm (Bf). Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.	197
Figure 79. Profils HPSEC des échantillons POL-Fl-inter issus de cultures planctoniques (Pl) ou en biofilm (Bf). Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.....	197
Figure 80. Pourcentages massiques obtenus pour chaque fraction après analyse en chromatographie échangeuse d'ions de l'échantillon Pol-Fl-inter Pl	198
Figure 81. Profils HPSEC des fractions de chromatographie échangeuse d'anions de POL-Fl-inter Pl en comparaison avec le profil de l'échantillon global	199
Figure 82. Spectres RMN- ¹ H des fractions de chromatographie échangeuse d'ions de POL-Fl-inter Pl en comparaison avec le profil de l'échantillon global	200

Table des illustrations – Tableaux

Tableau 1. Interactions possibles entre les exopolymères de la matrice du biofilm (Siegert, 1999).....	25
Tableau 2. Conditions extrêmes dans lesquelles des biofilms bactériens ont été observés d’après la revue de Siegert en 1999 (Siegert, 1999).....	26
Tableau 3. Composition des EPS (Flemming et Wingender, 2001a).....	28
Tableau 4. Polysaccharides de bactéries marines.....	33
Tableau 5. Composition des exopolysaccharides bactériens (Nichols <i>et al.</i> , 2005b).....	34
Tableau 6. Relation structure/fonction des EPS selon Flemming <i>et al.</i> , 2007 (Flemming <i>et al.</i> , 2007).....	35
Tableau 7. Méthodes d’extraction des EPS (Sheng <i>et al.</i> , 2010 ; Lembre <i>et al.</i> , 2012).....	46
Tableau 8. Composés bioactifs isolés de certaines espèces du genre <i>Pseudoalteromonas</i> (Bowman, 2007)	59
Tableau 9. Conditions d’isolement des souches bactériennes étudiées.....	60
Tableau 10. Composition chimique du milieu de culture VNSS	66
Tableau 11. Composition chimique du milieu de culture MB	67
Tableau 12. Composition chimique du <i>Sea Salt</i>	67
Tableau 13. Nom, séquence et référence des amorces utilisées pour l’identification des souches bactériennes ..	70
Tableau 14. Couples des souches bactériennes utilisés pour l’hybridation ADN-ADN	71
Tableau 15. Gamme des concentrations en glucose utilisée pour la courbe d’étalonnage.....	84
Tableau 16. Gamme des concentrations en BSA utilisée pour la courbe d’étalonnage	85
Tableau 17. Composition des solutions utilisées pour préparer la solution de Lowry	85
Tableau 18. Gamme des concentrations en acide glucuronique utilisée pour la courbe d’étalonnage.....	86
Tableau 19. Composition des solutions utilisées pour le dosage des acides uroniques	87
Tableau 20. Temps de génération (T _g) et taux de croissance (μ_{max}) des souches étudiées	116
Tableau 21. Taxonomie des 7 genres bactériens étudiés.....	119
Tableau 22. Masses en mg récupérées lors de l’isolement des EPS-sol et des EPS-fl pour les 8 souches pré-sélectionnées	131
Tableau 23. Pourcentages de protéines, glucides et acides nucléiques obtenus pour EPS-fl et EPS-FI de TC5, TC9 et TC15	135
Tableau 24. Quantités d’EPS (EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI)/mg de biofilm pour les 6 souches étudiées	141
Tableau 25. Pourcentage de glucides et de protéines dans les EPS-sol et dans le milieu MB	142
Tableau 26. Pourcentage de glucides, acides uroniques, protéines, lipides et acides nucléiques dans les EPS-fl des 6 souches bactériennes.....	143
Tableau 27. Pourcentage de glucides, acides uroniques, protéines, lipides et acides nucléiques dans les EPS-FI des 6 souches bactériennes.....	144
Tableau 28. Composition en monosaccharides des EPS isolés.....	145
Tableau 29. Quantité d’EPS (mg/mg de biofilm)	155
Tableau 30. Pourcentages massiques des glucides, acides uroniques, protéines, lipides et acides nucléiques dans les EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI.	156
Tableau 31. Quantité d’EPS-sol/-FI/-TFI obtenus à partir d’une culture planctonique de <i>P. ulvae</i> TC14 (48 h)194	

Sommaire

Rermerciements.....	III
Liste des communications	V
Liste des abréviations	VII
Table des illustrations – Figures.....	IX
Table des illustrations – Tableaux.....	XI
Sommaire	XIII

Introduction générale..... 1

1. Etude bibliographique 7

1.1. Biofilm en environnement marin et communauté microbienne 9

1.1.1. Biofilm : Mécanisme de formation.....	9
1.1.1.1. Mise en place d'un biofilm.....	9
1.1.1.2. Physiologie des bactéries et régulation du biofilm.....	14
1.1.2. Biofilm et <i>biofouling</i> en milieu marin	18
1.1.2.1. Formation du <i>biofouling</i>	18
1.1.2.2. Diversité des bactéries dans les biofilms marins.....	19
1.1.2.3. Bactéries isolées de biofilms marins	22

1.2. La matrice du biofilm 24

1.2.1. Composition de la matrice du biofilm	24
1.2.2. Les Substances Polymériques Extracellulaires (EPS)	25
1.2.2.1. Types d'EPS.....	25
1.2.2.2. Rôles des EPS et bénéfices de la vie en biofilm.....	26
1.2.2.3. Nature des EPS.....	28
1.2.3. Extraction et caractérisation des EPS	37
1.2.3.1. <i>Screening</i> des souches productrices d'EPS.....	38
1.2.3.2. Production des exopolysaccharides.....	41
1.2.3.3. Méthodes d'extraction des EPS.....	43

1.3. Stratégies *antifouling*..... 48

1.3.1. Moyens de lutte.....	48
1.3.1.1. Anciens moyens	48
1.3.1.2. Les nouvelles stratégies.....	48
1.3.1.2.1. Les surfaces ou les revêtements antibiofilm/ <i>antifouling</i>	49
1.3.1.2.2. Les molécules antibiofilm/ <i>antifouling</i>	49
1.3.1.2.2.1. Les molécules inhibitrices non toxiques ciblant les métabolites secondaires et les réseaux de communication entre organismes.....	49
1.3.1.2.2.2. Les molécules inhibitrices non toxiques anti-adhésives..	50
1.3.1.3. Les polysaccharides, candidats potentiels ?.....	51
1.3.1.3.1. Intérêts des polysaccharides.....	51
1.3.1.3.2. Effets antibactériens de polysaccharides	54
1.3.1.3.3. Effets sur le macro- <i>fouling</i> de polysaccharides	56
1.3.2. Intérêts des bactéries du genre <i>Pseudoalteromonas</i>	57

1.4. Bactéries étudiées dans le cadre de la thèse..... 60

2. Matériels & méthodes.....	63
2.1. Culture des souches bactériennes.....	65
2.1.1. Souches bactériennes	65
2.1.2. Milieux de culture	65
2.1.3. Conservation des souches bactériennes	68
2.1.4. Conditions de culture	68
2.2. Caractérisation des souches bactériennes	68
2.2.1. Courbes de croissance et dénombrements des bactéries.....	68
2.2.2. Etats frais	69
2.2.3. Taxonomie	69
2.2.3.1. PCR	69
2.2.3.2. Hybridation ADN-ADN	70
2.2.4. Coloration de Gram	71
2.2.5. Mobilités	71
2.2.5.1. <i>Swimming</i>	71
2.2.5.2. <i>Swarming</i>	72
2.2.5.3. <i>Twitching</i>	72
2.2.6. Galeries API.....	73
2.2.7. Potentiel zêta.....	73
2.2.8. Test d'adhésion microbienne aux solvants (MATS)	74
2.2.9. Formation de biofilm : <i>BioFilm Ring Test</i> [®] (BFRT [®]).....	74
2.2.10. Tests d'adhésion en microplaque au cristal violet.....	76
2.2.11. Microscopie Electronique à Balayage (MEB).....	77
2.3. Extraction des exopolymères et isolement des polysaccharides des biofilms	77
2.3.1. Cultures pour l'extraction d'EPS	77
2.3.1.1. Cultures en biofilm	77
2.3.1.2. Cultures planctoniques	78
2.3.2. Protocole d'extraction des exopolymères : résine échangeuse de cations.....	78
2.3.3. Protocole d'extraction des exopolymères : solution NaOH 0,1 M.....	80
2.3.4. Isolement des exopolysaccharides	81
2.3.4.1. Partage chloroforme/méthanol/eau.....	81
2.3.4.2. Précipitation à l'alcool éthylique des polymères.....	82
2.3.4.3. Digestion enzymatique des protéines	83
2.3.5. Chromatographie échangeuse d'ions	83
2.4. Méthodes de caractérisation des exopolymères.....	83
2.4.1. Dosages colorimétriques.....	83
2.4.1.1. Dosage des sucres.....	83
2.4.1.2. Dosage des protéines	85
2.4.1.3. Dosage des acides uroniques	86
2.4.2. Dosage des acides nucléiques	87
2.4.3. Contrôle de la lyse cellulaire : dosage de l'ATP	87
2.4.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	87
2.4.5. Chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC)	88
2.4.6. Analyse des EPS pour leur composition en sucres simples par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).....	89
2.4.6.1. Hydrolyse acide des polysaccharides	89
2.4.6.2. Méthanolyse	89
2.4.6.3. Dérivatisation des monosaccharides pour analyse en CPG-SM	90
2.4.7. Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF)	91
2.4.8. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	91

2.4.9. Microscopie à Force Atomique (AFM)	92
2.5. Test antibiofilm.....	92
3. Identification des souches bactériennes isolées de la mer Méditerranée . 93	
3.1. Introduction	95
3.2. Article	95
3.3. Données accessibles sur le site du journal.....	113
3.4. Résultats complémentaires	114
3.4.1. Croissance bactérienne	114
3.4.2. Capacité d'adhésion des souches bactériennes.....	116
3.5. Conclusion.....	117
4. Sélection de souches bactériennes productrices de substances polymériques extracellulaires (EPS)	121
4.1. Introduction	123
4.2. Mise au point d'un protocole de production de biofilm	123
4.2.1. Effet du temps d'incubation.....	124
4.2.2. Effet du milieu de culture	126
4.2.3. Effet du temps d'incubation et du milieu de culture pour la souche TC5	127
4.3. Mise au point du protocole d'extraction des EPS solubles (EPS-sol) et des EPS faiblement liées aux bactéries (EPS-fl)	128
4.4. Etablissement d'un protocole d'extraction des EPS fortement liées aux bactéries (EPS-FI)	132
4.4.1. Protocole avec résine échangeuse de cations (CER)	132
4.4.2. Protocole d'extraction à la soude.....	136
4.5. Première sélection des souches bactériennes	138
4.6. Etude des EPS des six souches sélectionnées	139
4.6.1. Masses d'EPS et rendement.....	139
4.6.2. Composition des EPS.....	141
4.6.3. Composition en monosaccharides	144
4.7. Deuxième sélection des souches bactériennes	147
4.8. Conclusion.....	148
5. Caractérisation des EPS de la souche <i>Pseudoalteromonas ulvae</i> TC14 et étude de leur activité antibiofilm	151
5.1. Introduction	153
5.2. Etude globale des EPS-sol, EPS-fl et des EPS-FI.....	155
5.3. Principe d'isolement des exopolysaccharides	158
5.4. Analyse des EPS de nature polysaccharidique	160
5.4.1. Composition en monosaccharides	160
5.4.2. Comparaison des profils de masses moléculaires des EPS-sol/-fl/-FI.....	162
5.4.3. Analyse des POL-FI par chromatographie échangeuse d'ions	165
5.4.3.1. Analyse de l'échantillon POL-FI-inter	165
5.4.3.2. Analyse de l'échantillon POL-FI-aq.....	171
5.4.3.3. Comparaison entre les échantillons POL-FI-inter et POL-FI-aq.....	177
5.4.4. Analyse des polysaccharides par microscopie à force atomique (AFM).....	180
5.4.5. Analyse des EPS très fortement liées	183
5.4.6. Activité antibiofilm des EPS isolées.....	185
5.5. Analyse de l'extrait organique de <i>Pseudoalteromonas ulvae</i> TC14	190

5.6. Analyse des EPS d'une culture planctonique de <i>P. ulvae</i> TC14	192
5.7. Conclusion.....	200
Conclusions & perspectives	205
Références bibliographiques	213

Introduction générale

Au XVII^{ème} siècle, Antonie Van Leeuwenhoek fut le premier à observer au microscope des micro-organismes issus d'un biofilm prélevé sur la surface de ses dents. Il les nomma « animalcules ». Plus tard, en 1940, Heukelekian et Heller développèrent la notion « d'effet de bouteille », résultant de la constatation que la présence d'un substrat solide comme une bouteille en verre, permettait aux micro-organismes de se fixer dessus puis d'augmenter leur croissance et leur activité métabolique (Heukelekian et Heller, 1940). Trois ans plus tard, Zobell observa en milieu marin que la quantité de bactéries fixées sur un substrat solide était supérieure à la quantité de bactéries libres dans le milieu liquide (Zobell, 1943). En 1969, Jones mit en évidence la présence d'une matrice saccharidique en colorant au rouge de ruthénium et au tétr oxyde d'osmium des filtres de stations d'épuration (Jones *et al.*, 1969). C'est dans les années 1970, sous l'impulsion de Characklis puis de Costerton, que l'étude des biofilms a réellement pris son essor. En 1973, Characklis démontra que la matrice d'exopolymères donne aux biofilms une résistance aux désinfectants puis, en 1978, Costerton développa la notion de biofilm (Costerton *et al.*, 1978). Depuis, les études sur les biofilms ne cessent de se développer, que ce soit dans le domaine médical ou industriel.

La compréhension de la formation et du développement d'un biofilm présente un intérêt considérable car, dans l'environnement naturel, la majorité des bactéries est organisée en biofilm (Costerton *et al.*, 1995 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Haras, 2005 ; Flemming et Wingender, 2010). On parle d'état sessile lorsque les bactéries adhèrent à une surface et/ou entre elles et d'état planctonique lorsque les bactéries sont sous forme libre. Ce mode de vie communautaire repose sur la présence d'une matrice extracellulaire entourant les micro-organismes et donnant une intégrité structurelle et fonctionnelle à l'ensemble du biofilm (Wingender *et al.*, 1999). Il représente un mode de vie très ancien qui semble être apparu il y a 3,25 milliards d'années sous forme de stromatolites (Figure 1) (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). On retrouve des biofilms bactériens sur diverses surfaces biotiques ou abiotiques (appareils médicaux, plaque dentaire, racine de plante ...).

Schématiquement, les biofilms peuvent être décrits comme des systèmes microbiens dynamiques et structurés en forme de piliers séparés par des pores dans lesquels l'eau transporte les nutriments et peut ainsi atteindre le cœur du biofilm (Figure 2) (Costerton *et al.*, 1995). L'architecture peut varier et s'éloigner de cette représentation car plusieurs facteurs ont une influence sur l'architecture du biofilm comme les conditions hydrodynamiques, les contraintes de cisaillement, la concentration en nutriments, le type de

micro-organisme, leur mobilité, la communication intercellulaire mais aussi la composition de la matrice (Flemming et Wingender, 2010).



Figure 1. Photos de stromatolites. A gauche : stromatolithes dans la réserve naturelle de Hemelin Pool (Australie), http://www.treknature.com/gallery/Oceania/Australia/West/Western_Australia/Hamelin_Pool/photo35059.htm. A droite : stromatolites à Shark Bay (Australie), <http://svtmarcq.e-monsite.com/pages/de-l-atmosphere-primitive-a-l-atmosphere-actuelle-spe.html>.

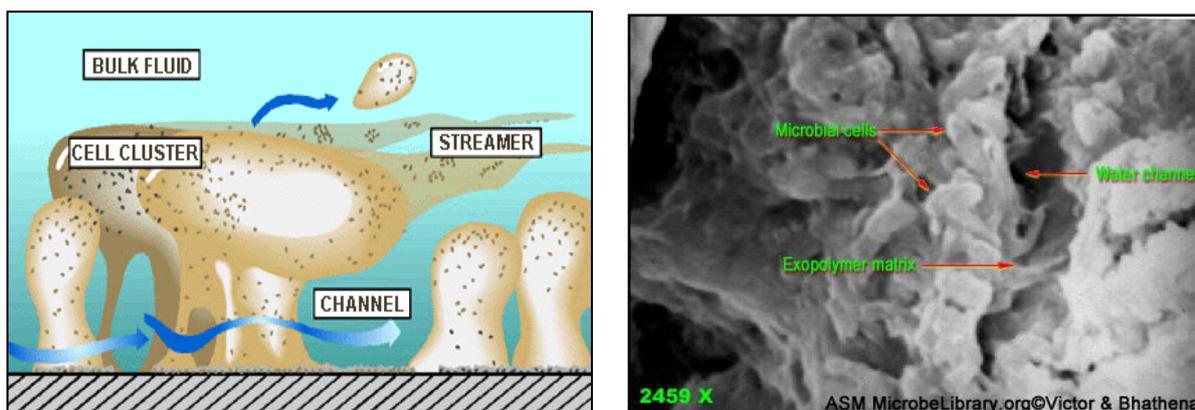


Figure 2. Images de biofilm. A gauche : représentation schématique d'un biofilm bactérien (P. Dirckx, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman), à droite : micrographie électronique à balayage d'un biofilm dans une conduite d'eau (<http://lib.jiangnan.edu.cn/asm/520-Introduce.htm>).

La matrice joue en réalité un rôle important dans l'architecture tridimensionnelle du biofilm (Flemming et Wingender, 2010). Elle constitue l'environnement immédiat des micro-organismes qui la construisent. Un biofilm est formé d'une matrice abondante et fortement hydratée qui contient des exopolymères (polysaccharides, protéines, acides nucléiques, lipides) (Haras, 2005 ; Flemming et Wingender, 2010 ; Hori et Matsumoto, 2010).

L'Homme est très souvent confronté à la formation de biofilm. Dans certains cas, il réussit à en exploiter les potentiels intéressants en matière d'épuration et de bioremédiation. Dans d'autres cas, il est malheureusement confronté aux nombreux problèmes liés aux biofilms tant dans le domaine médical que dans les domaines industriels et maritimes pour lesquels la lutte contre le *biofouling* est un enjeu capital. Toute surface biotique ou abiotique immergée dans le milieu marin subit en effet une colonisation par des organismes marins

(micro- et macro-organismes) ; c'est le phénomène de *biofouling*. Ce processus est à l'origine de nombreux problèmes pour les activités humaines liées au milieu marin, à la fois au niveau économique et au niveau écologique. Ainsi le *biofouling* se retrouve sur les coques des bateaux, mais aussi sur de très nombreuses structures telles les pipelines, les installations liées à l'aquaculture, les structures portuaires ou encore toutes sortes de matériels scientifiques immergés. Dans le cas des navires, l'augmentation de la biomasse due au *biofouling* entraîne une augmentation de la rugosité de la surface et donc des forces de friction du navire lors de son déplacement dans l'eau ainsi qu'une surcharge. Cela provoque une réduction de la vitesse et donc un accroissement de la consommation en carburant. Enfin les coques des navires peuvent être le vecteur d'une dissémination des organismes, notamment d'espèces invasives pouvant perturber profondément certains écosystèmes dont l'équilibre est fragile.

Dans cette étude, il s'agit d'identifier des souches bactériennes isolées de supports immergés en Mer Méditerranée et de les caractériser phénotypiquement par diverses approches. Leur capacité à former un biofilm *in vitro* a été évaluée dans différentes conditions avec une attention particulière portée sur leurs capacités à produire une matrice polymérique abondante riche en polysaccharides; l'objectif étant d'isoler des exopolysaccharides originaux à activité antifouling. Treize souches ont ainsi fait l'objet d'analyses phylogénétiques et d'une caractérisation phénotypique. Sept genres et douze espèces différentes ont été identifiés au sein desquelles deux isolats peuvent être affiliés à une nouvelle espèce, nommée *Persicivirga mediterranea*. Ce genre n'a jamais été décrit en Mer Méditerranée jusqu'à présent. L'extraction des EPS de chaque souche cultivée en biofilm a permis de déterminer leur composition générale en glucides, protéines, acides nucléiques et lipides. Une souche, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14, se distingue par sa capacité à produire des exopolysaccharides en quantité importante. Il s'agit essentiellement de polymères du glucose dont les analyses chromatographiques et spectroscopiques ont révélé la diversité de taille ($M_w \sim 1 - 4000$ kDa), de charge (neutre ou anionique) et de fonction associée (lactate ou acétate). Les fractions d'EPS enrichies en polysaccharides inhibent la formation de biofilm par d'autres souches marines. Ces derniers sont également synthétisés par les bactéries en culture planctonique mais en proportions très différentes.

1. Etude bibliographique

1.1. Biofilm en environnement marin et communauté microbienne

1.1.1. Biofilm : Mécanisme de formation

1.1.1.1. Mise en place d'un biofilm

La formation d'un biofilm a été plusieurs fois décrite dans la littérature mais le déroulement garde encore des zones d'incertitudes (Filloux et Vallet, 2003 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Il est admis que la formation d'un biofilm peut être décomposée en 6 étapes (Figure 3).

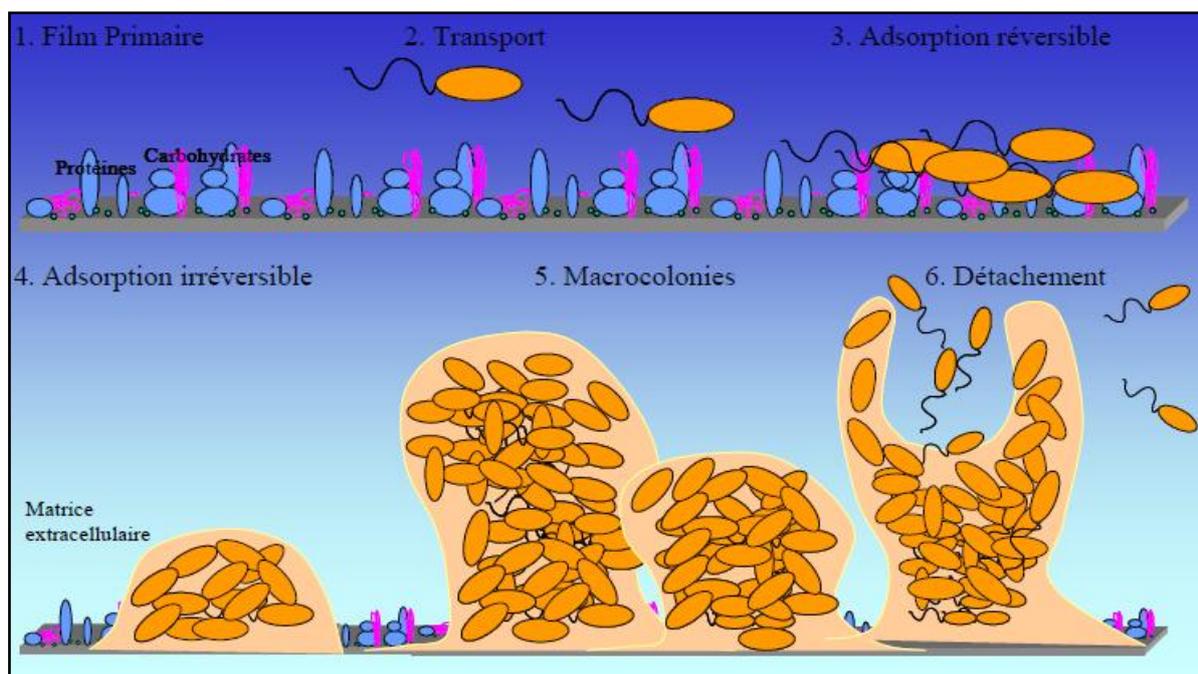


Figure 3. Les six étapes de la formation d'un biofilm (Characklis, 1990).

Film primaire

Tout commence, dans le cas d'une surface immergée, par l'absorption de macromolécules sur cette surface. Il se forme ainsi un film conditionnant composé de protéines (Compère *et al.*, 2001), de sucres, de lipides (Loeb et Neihof, 1975) mais aussi de matière minérale (Vu *et al.*, 2009). Ce phénomène est rapide. Pour le quantifier, Loeb et Neihof ont mesuré $0,8 \text{ mg/m}^2$ de matière organique sur de l'acier inoxydable après 15 minutes d'immersion dans l'eau de mer (Loeb et Neihof, 1975). Les molécules adsorbées représentent une source de nutriments non négligeable pour les bactéries favorisant ainsi leur chimiotactisme.

Transport et mobilité des bactéries

L'étape suivante correspond au transport des bactéries vers une surface. Celle-ci dépend de plusieurs facteurs, dont les caractéristiques des bactéries, la nature du milieu (viscosité, force ionique ... (Bunt *et al.*, 1995 ; Pelletier *et al.*, 1997 ; Briandet *et al.*, 1999)) et le mouvement du milieu (flux, mouvement brownien). Certaines bactéries sont pourvues d'appendices (pili et flagelles) leur permettant de se déplacer. Les flagelles sont longs (15 à 20 μm), minces et composés de trois parties ; le filament qui est la partie visible et qui a une forme cylindrique creuse composée de *flagelline*, le crochet où se fixe le filament et enfin le corpuscule basal qui ancre la structure dans la paroi cellulaire et la membrane plasmique. Certaines espèces bactériennes (*Vibrio parahaemolyticus* ou *Rhodospirillum centenum*) expriment en plus de leurs flagelles polaires, des flagelles secondaires latéraux dont l'expression est induite seulement à proximité d'une surface (Merino *et al.*, 2006). Les pili sont généralement présents chez les bactéries à Gram négatif. Cet appendice est filiforme, plus court, plus droit et plus mince que les flagelles. Il est également formé d'une machinerie protéique complexe traversant les 2 membranes bactériennes, permettant la polymérisation de la sous-unité protéique principale pour l'assemblage du pilus, la *piline*. Les pili permettent aux bactéries de se fixer à une surface et dans certains cas, de se mouvoir à proximité de la surface.

Chez les bactéries mobiles, on rencontre plusieurs types de mobilité, tels que le *swimming*, le *swarming*, le *twitching* ou le *gliding*. Ces différents types de mobilité peuvent être distingués par des conditions de culture différentes (hydratation du milieu décroissante avec une augmentation de la quantité d'agar ajouté). Le *swimming* est dû à la présence de flagelle(s) et a lieu en milieu liquide ou semi-solide. Dans ces conditions, les cellules nagent individuellement et de manière aléatoire. Le *swarming* est une alternative à la nage. Il consiste en un déplacement en petits groupes de bactéries de manière organisée sur une surface solide et humide. L'essaimage nécessite une transformation morphologique des bactéries qui s'allongent et présentent de très nombreux flagelles. Ces modifications leur permettent de coloniser rapidement de nouvelles surfaces. Ce mode de déplacement est souvent couplé avec la production, par les bactéries, de polysaccharides et de surfactants (Verstraeten *et al.*, 2008). Le *twitching* est lié à la présence de pili de type IV qui, en se rétractant, peuvent participer à la mobilité en permettant aux bactéries de se mouvoir par petits groupes en glissant sur une surface solide. Le *gliding* permet aux bactéries de glisser sur une surface sans utiliser de flagelles. Ce processus est encore peu compris. Le mécanisme mis en place pour ce type de

mobilité diffère selon l'espèce. Ainsi, il apparaît que certaines espèces peuvent utiliser leurs pili de type IV, tandis que pour d'autres espèces, les pili ne sont pas utilisés lors du *gliding* (McBride, 2001). L'espèce *Myxococcus xanthus* combine deux types de *gliding* ; *social-motility* et *adventurous-motility*. Ce dernier est dû à un système de rotation du cytosquelette, tandis que le *social-motility* est dû à l'utilisation des pili de type IV (Nan *et al.*, 2011). Les bactéries utilisant le *gliding* sécrètent souvent des EPS (McBride, 2001). Il existe d'autres types de mobilité moins connus comme le *darting* ou le *sliding* (Henrichsen, 1972).

Adhésion

Les étapes suivantes successives impliquent l'adhésion dite « réversible » puis « irréversible ». Le film conditionnant modifiant la nature physico-chimique de la surface, facilite l'adhésion de bactéries à la surface via des liaisons faibles. De plus, ce film peut être une source de nutriments pour les bactéries nouvellement attachées. A cette étape, l'adhésion est réversible, de faibles forces mécaniques pouvant détacher les bactéries. Les interactions entre les bactéries et le substrat se font pour des distances globalement inférieures à 50 nm. La théorie DLVO (issue de la physique des colloïdes) décrit l'équilibre entre les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques, le caractère donneur/accepteur d'électrons des bactéries et le mouvement brownien. L'adhésion est dépendante du pH et des forces ioniques du milieu.

La caractérisation physico-chimique de la surface des bactéries peut donner des informations pour comprendre les interactions entre la surface et les bactéries lors de l'adhésion initiale. Plusieurs techniques de caractérisation de la surface de matériaux ont été adaptées à l'étude des bactéries. Ainsi le test d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) permet de déterminer le caractère hydrophobe/hydrophile et le caractère acido-basique des souches bactériennes. Cette méthode a été mise au point par Bellon-Fontaine *et al.* en 1996 puis modifiée par Grasland *et al.* en 2003 (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996 ; Grasland *et al.*, 2003). Elle repose sur l'affinité des bactéries pour des solvants polaires (généralement le chloroforme et l'acétate d'éthyle) et apolaires (le décane et l'hexadécane, 2 solvants couramment choisis).

La mesure de l'angle de contact est une autre technique permettant de déterminer l'hydrophobicité de la surface des bactéries (Grasland *et al.*, 2003). Cette méthode consiste à mesurer l'angle (θ) que fait une goutte de solvant avec la surface des cellules. L'hydrophobicité est proportionnelle à l'angle formé (Figure 4).

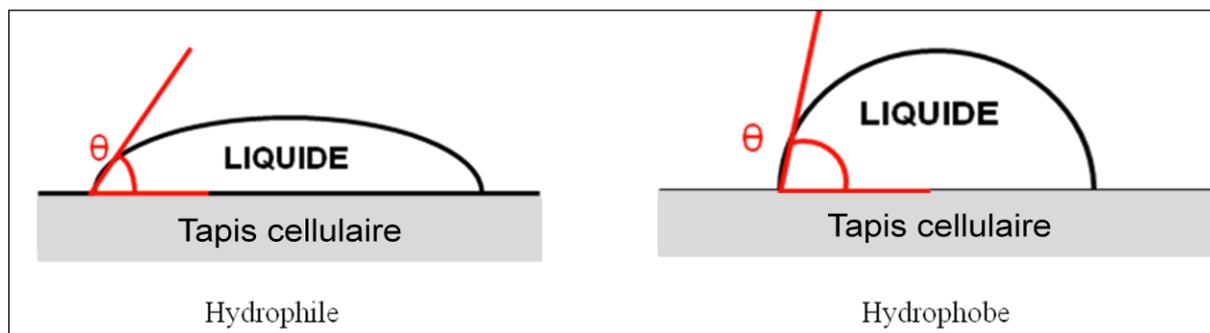


Figure 4. Relation angle de contact/hydrophobicité de surface.

La zétamétrie est une technique permettant, entre autres, d'évaluer la charge nette de surface des bactéries (potentiel ζ). De plus, la mesure de la mobilité des bactéries à différents pH sous un champ électrique permet de déterminer le point isoélectrique des bactéries. L'adhésion bactérienne dépend également des forces électrostatiques (Bos *et al.*, 1999). La force induite par les interactions électrostatiques d'une bactérie et de la surface est directement liée aux structures de surface et à la force ionique du milieu, cette force est évaluée par la mesure du potentiel ζ . En 1988, Satou *et al.* ont établi le rôle déterminant du potentiel ζ dans l'adhésion de *S. mutans*, alors qu'il n'a aucune influence sur l'adhésion de *S. sanguis* (Satou *et al.*, 1988). Weerkamp *et al.* ont étudié l'adhérence de différentes espèces bactériennes (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *Actinomyces viscosus* et *A. odontolyticus*) sur l'émail et la dentine humaine en fonction des potentiels ζ de chacune des surfaces (Weerkamp *et al.*, 1988). Ils concluent que la diminution de la force ionique du milieu induit une augmentation des charges des surfaces en jeu et une diminution de l'adhésion bactérienne. En 1997, une étude de Busscher *et al.* a montré que l'adhésion cellulaire (*Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Candida*) sur des surfaces de silicone recouvertes de salive dépend du potentiel ζ des deux types de surface en jeu et qu'elle est plus importante lorsque les potentiels ζ des différentes surfaces sont plus élevés (Busscher *et al.*, 1997).

Lors de l'adhésion irréversible, les liaisons entre les bactéries et le support sont covalentes, ce qui permet aux bactéries d'adhérer de manière plus forte à la surface. Ce changement de nature des liaisons est dû à la synthèse, par les bactéries, de molécules pouvant être impliquées dans l'adhésion telles que les *pilines* nécessaires à la formation des pili de type IV (Watnick et Kolter, 1999) et à la production d'une matrice extracellulaire qui commence lors du passage de l'état planctonique à l'état sessile de ces micro-organismes. Dans certains cas, ces modifications phénotypiques peuvent aussi impliquer la perte des flagelles qui ne seraient plus nécessaires une fois la bactérie adhérente à son support. Ces

flagelles seraient de nouveau produits au moment de la dispersion du biofilm (Sauer et Camper, 2001 ; Haras, 2005). Chez *P. aeruginosa* l'expression de gènes impliqués dans la formation de pili ainsi que dans la mobilité du flagelle est indispensable à la formation du biofilm (O'Toole et Kolter, 1998 ; Vallet *et al.*, 2001). Au sein d'un biofilm mature, l'expression des gènes codant les sous-unités structurales des pili diminue chez les bactéries, ce qui démontre que le rôle de ces appendices se limite aux premières étapes de l'adhésion (Whiteley *et al.*, 2001). Les modes de mobilité bactérienne décrits au paragraphe précédent impliquant notamment les pili sont intrinsèquement liés à l'adhésion irréversible. Il a été montré par exemple que la souche *P. aeruginosa* PA14 au contact d'une surface, glisse par *swarming* ce qui favoriserait son adhésion irréversible (Caiazza *et al.*, 2007).

Maturation du biofilm

Lors de la maturation du biofilm, les bactéries continuent de produire de la matrice extracellulaire qui va devenir leur environnement dynamique. La croissance en biofilm est différente d'une croissance planctonique. En fonction de leur localisation dans le biofilm, les bactéries présentent des caractères phénotypiques hétérogènes, en particulier par rapport à leur physiologie. Ainsi, il a été montré que la croissance en biofilm provoque l'émergence de sous-populations bactériennes présentant une croissance très lente ou un état métabolique qualifié de dormant. Les bactéries se regroupent en micro- puis macro-colonies qui grossissent. A un certain stade de développement, le biofilm devient visible sous la forme d'un film recouvrant la surface sur laquelle il s'est formé.

Il est important de souligner que le biofilm est une structure hétérogène qui est due à plusieurs facteurs liés les uns aux autres (Stewart et Franklin, 2008). La composition et l'architecture de la matrice varient, créant ainsi au sein même du biofilm des micro-domaines aux caractéristiques physico-chimiques propres (Flemming et Wingender, 2010). On peut ainsi observer une carence en nutriments dans certaines zones centrales du biofilm, ainsi qu'une raréfaction de l'oxygène à la base du biofilm ce qui crée des zones où se développent des micro-organismes anaérobies comme les bactéries sulfato-réductrices. Selon leurs localisations dans le biofilm, les bactéries ont donc un métabolisme très différent. Par exemple, on a constaté une différence de l'expression des protéines de surface, de la résistance aux antibiotiques, de l'utilisation des nutriments et de l'expression de facteurs de virulence entre bactéries d'un même biofilm (Bagge *et al.*, 2004 ; Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Lenz *et al.*, 2008). Pour terminer, les facteurs exogènes et endogènes remodelent

constamment les biofilms créant une hétérogénéité cette fois ci temporelle (Tolker-Nielsen et Molin, 2000).

Détachement

La dernière étape de ce cycle de développement du biofilm peut s'effectuer passivement (via l'action du flux ou des forces de cisaillement) ou activement. La libération active des bactéries d'un biofilm est induite par un stress dû à des changements environnementaux (variation de la concentration en aliments, modification du pH ou limitation en oxygène, etc...(Gjermansen *et al.*, 2005). Certaines bactéries vont détruire la matrice qui les entoure pour se séparer du biofilm et se retrouver ainsi libérées dans le milieu, repassant à l'état planctonique (réinduction flagellaire, changement des propriétés de surface, etc...) et pouvant ainsi coloniser de nouvelles surfaces. Les enzymes dégradant les EPS (comme l'alginate lyase de *P. aeruginosa*) contribuent elles aussi au détachement des bactéries de la matrice (Kostakioti *et al.*, 2013).

L'essaimage du biofilm nécessite donc une transformation morphologique des bactéries impliquant la formation de flagelles leur permettant de coloniser rapidement de nouvelles surfaces.

1.1.1.2. Physiologie des bactéries et régulation du biofilm

Les bactéries présentent des états physiologiques différents selon qu'elles sont encore en phase planctonique ou dans les différentes phases de développement du biofilm décrites ci-dessus. Cela se traduit par une hétérogénéité dans la composition et l'architecture du biofilm. Les phases de croissance bactérienne en mode planctonique sont relativement bien connues. La caractérisation de ces phases, spécifiques à chaque espèce voire isolat bactérien est indispensable à la compréhension des différents phénotypes ou modifications métaboliques des bactéries, qui sont induits à chaque transition de phase.

La croissance des bactéries planctoniques

Les bactéries se multiplient par scissiparité qui se traduit par une croissance exponentielle de la population s'exprimant par la formule suivante :

$$n_t = n_o \times 2^{\mu t}$$

n_t représente le nombre de bactéries dans une population donnée au temps t , n_0 le nombre de bactéries dans la même population au moment de la première détermination et μ le taux de croissance, c'est à dire le nombre de doublements par unité de temps.

La mesure de la croissance bactérienne peut être effectuée selon plusieurs critères dont la turbidimétrie (mesure de l'absorbance d'une suspension bactérienne), le poids sec, le dénombrement des bactéries viables cultivables (UFC) ou le dénombrement de bactéries totales. Il est possible de tracer une courbe de croissance qui indique le développement synchronisé des bactéries en fonction du temps (Figure 5).

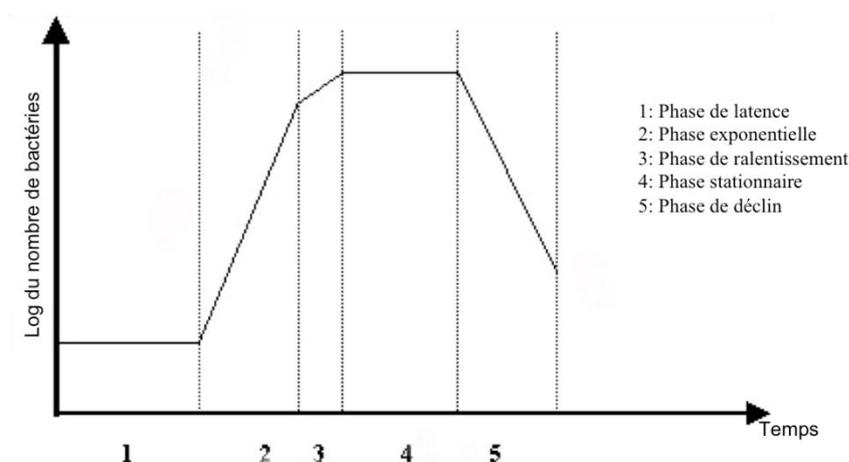


Figure 5. Courbe de croissance bactérienne.

La courbe de croissance comporte 5 phases plus ou moins longues selon les souches bactériennes. (1) Lors de la phase de latence, le nombre de bactéries n'augmente quasiment pas car les cellules ne se divisent pas. C'est une période d'adaptation des bactéries à l'environnement. (2) La phase exponentielle est le moment pendant lequel les bactéries se divisent de façon exponentielle. C'est dans cette phase que le taux de croissance des bactéries est déterminé. (3) Pendant la phase de ralentissement le taux de croissance est plus faible. (4) La phase stationnaire reflète souvent un équilibre entre la multiplication et la mort cellulaire, la population se stabilise. Pour une grande partie des espèces bactériennes, ce moment de la croissance est propice à la production de molécules telles que les EPS ou les composés toxiques. (5) la phase de déclin est due à l'épuisement en nutriments et l'accumulation des déchets. Le nombre de bactéries qui meurent dépasse le nombre de nouvelles bactéries issues de la division cellulaire.

Plusieurs facteurs influencent la croissance bactérienne, comme l'apport en nutriments. La présence de certains composés est essentielle pour la croissance bactérienne et

ceux-ci doivent donc être présents dans le milieu de culture comme de l'eau, des sources de carbone, d'azote, de phosphore et de soufre. La présence de dioxygène est indispensable pour les bactéries aérobies.

Les facteurs physico-chimiques tels que la température, le pH ou la pression osmotique jouent eux aussi un rôle capital. Les bactéries sont classées dans quatre grands groupes selon leur température de croissance : les psychrophiles (-10°C à 20°C), les mésophiles (10°C à 45°C), les thermophiles (55°C à 65°C) et les hyperthermophiles (80°C à 110°C).

La plupart des bactéries se développe à pH neutre, mais certains micro-organismes ont besoin d'un milieu acide (bactéries acidophiles) ou d'un milieu basique (bactéries alcalophiles) pour se développer (Figure 6).

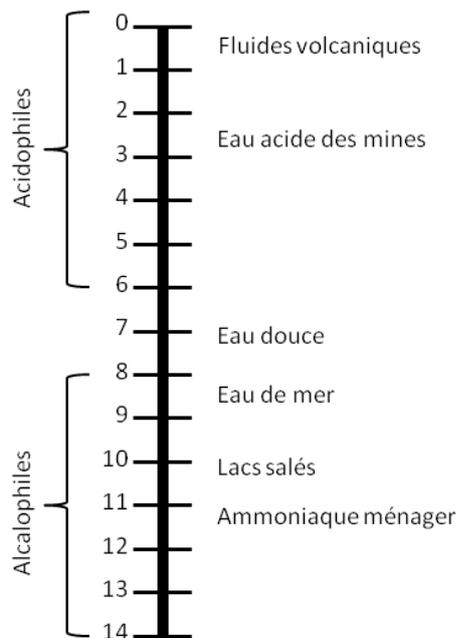


Figure 6. Echelle de pH reliée à quelques environnements (Rubio, 2002).

Enfin, la pression osmotique joue un rôle important. Les bactéries peuvent là aussi être classées :

Les bactéries non-halophiles : pas besoin de NaCl pour leur croissance.

Les bactéries halophiles : besoin de 0,1 % de NaCl.

Les bactéries halophiles modérées : besoin de 2 à 20 % de NaCl.

Les bactéries halophiles extrêmes : besoin de 5 à 36 % de NaCl.

Dans l'environnement, les bactéries ont rarement la possibilité de se retrouver en conditions optimales de croissance telles qu'elles peuvent l'être en laboratoire. Elles sont en

réalité la plupart du temps associées à des substrats biotiques ou abiotiques (tissus, surfaces, particules en suspension) et se développent en biofilm, leur procurant une niche de développement et une protection contre les conditions adverses de l'environnement.

Le développement des bactéries en biofilm

Au sein du biofilm, la croissance bactérienne est plus complexe. En plus des changements liés à la production de polysaccharides et d'appendices extracellulaires, les bactéries subissent bien d'autres modifications phénotypiques après leur adsorption à une surface. Certains auteurs ont suggéré que les bactéries subissent une série de modifications au cours du temps. Les activités métaboliques des bactéries associées au processus de diffusion impliquent l'existence d'un gradient de concentration de nutriments, d'oxygène, de molécules signaux et de déchets bactériens à l'intérieur du biofilm. Les bactéries doivent donc s'adapter à des microconditions chimiques locales, qui peuvent évoluer spatialement et temporellement (Stewart et Franklin, 2008). Ceci résulte en une hétérogénéité au niveau de l'état physiologique des bactéries au sein d'un même biofilm (certaines se multiplient tandis que d'autres sont dans un état de dormance ...).

De plus, les bactéries possèdent différents mécanismes permettant de réguler la formation du biofilm en répondant à des métabolites présents dans leur milieu. Un des mécanismes les mieux décrits est celui du *Quorum Sensing*, utilisé par une grande variété de bactéries pour coordonner l'expression de gènes en fonction de la densité cellulaire. Le *Quorum Sensing* est impliqué dans de multiples fonctions cellulaires, telle que la bioluminescence, la virulence, la résistance aux antibiotiques, et la formation du biofilm (Li et Nair, 2012). Certaines espèces bactériennes telles que *P. aeruginosa* sont en effet capables de synchroniser leurs comportements dans le biofilm grâce à l'émission et perception de petits signaux intercellulaires appelés autoinducteurs (Sakuragi et Kolter, 2007). Chez les bactéries à Gram négatif, le mode de communication le plus connu repose sur les *N*-acyl homosérine lactone (AHL). Le premier mécanisme de *Quorum Sensing* identifié dans les années 1970 fut celui d'une bactérie marine bioluminescente appelée *Vibrio fischeri*. La découverte des *N*-acyl homosérine lactones du *Quorum Sensing* a par la suite ouvert un nouveau champ d'investigation pour le développement de nouveaux antimicrobiens moins toxiques inhibant ce mécanisme. Une meilleure compréhension de ces signaux et de leurs modes d'action pourrait permettre de trouver des moyens d'interférer sur la formation de biofilm bactérien.

1.1.2. Biofilm et *biofouling* en milieu marin

1.1.2.1. Formation du *biofouling*

On appelle *biofouling* (ou bio-salissure) toute croissance non désirée d'organismes (micro- et macro-organismes) vivants sur une surface. Ce phénomène se produit sur toutes les surfaces présentes dans un milieu humide. Les domaines d'activités confrontés à ce phénomène sont nombreux tels que le secteur médical (les biofilms présents sur les lentilles de contact, l'émail des dents, les prothèses, les instruments médicaux, etc...), et quasi tous les secteurs industriels (de l'industrie papetière à l'industrie agroalimentaire) doivent faire face à ce problème puisque la plupart sont confrontées à minima à des systèmes de circulation d'eau (systèmes de refroidissement, échangeurs de chaleur, etc...). Le secteur maritime n'échappe évidemment pas à cette problématique. En fait, toutes les surfaces immergées ou en atmosphère humide se heurtent à ce problème (Figure 7).

Le *biofouling* dans le secteur marin est donc un mélange de micro-organismes (bactéries, protozoaires, champignons, etc...) (Flemming et Wingender, 2010) et de macro-organismes (moules, balanes, macro-algues, etc...).



Figure 7. Intérieur d'une machine à laver le linge (à gauche) et un clapet de bonde de lavabo (à droite) recouverts de *biofouling*.

Ce phénomène est particulièrement problématique pour les structures immergées dans l'eau de mer (câbles, plate-forme pétrolière, bateaux, etc...), puisqu'il peut perturber, endommager les appareils de mesures scientifiques (capteurs ou caméras), alourdir un équipement ou un bâtiment marin (navires, bouées, etc...). Les navires (commerciaux, de compétition, les ferrys, les paquebots et les navires de guerre) sont donc eux aussi confrontés à ce problème (Figure 8). L'accumulation de *biofouling* sous la ligne de flottaison provoque une diminution de la vitesse du bateau et par conséquent une augmentation de la consommation de carburant, un coût de maintenance élevé et une diminution de la durée de vie des navires (notamment du fait de la biocorrosion).



Figure 8. *Biofouling* sur des coques de navire. Le macro-*fouling* est visible, des algues brunes et des moules sont fixées sous la ligne de flottaison (Yebra *et al.*, 2004).

La colonisation de ces surfaces est très rapide. En quelques secondes les macromolécules se fixent sur la surface, puis quelques minutes plus tard les premières bactéries adhèrent de façon irréversible au support. Au bout de quelques jours, voire en quelques heures selon l'environnement, le biofilm bactérien se forme (*micro-fouling*). Enfin après quelques jours/mois, des macro-organismes (mollusques, algues, éponges, bryozoaires, balanes, etc...) attirés par le potentiel nutritionnel du biofilm bactérien, se fixent sur la surface et forment le macro-*fouling* (Figure 9).

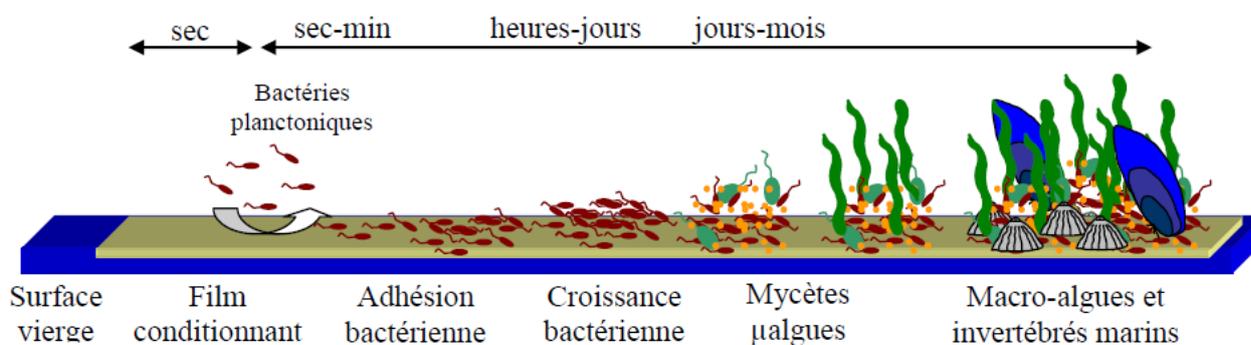


Figure 9. Schéma de la formation du *biofouling* sur une surface (Haras, 2005).

1.1.2.2. Diversité des bactéries dans les biofilms marins

L'identification des bactéries repose sur le séquençage complet et l'analyse phylogénétique du gène de l'ARNr 16S, mais aussi sur la caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et métabolique des bactéries isolées. Ces techniques d'identification des souches bactériennes passent par la mise en culture d'isolats bactériens, ne représentant que moins de 1 % de la population bactérienne potentiellement présente dans l'environnement.

L'isolement et la culture des bactéries représentent un frein technique pour l'évaluation de la diversité bactérienne dans un environnement défini : (i) les bactéries de l'environnement ont probablement des besoins nutritionnels bien spécifiques avec des paramètres de croissance très précis (pH, pression, température ...) non encore identifiés ou difficiles à mettre en œuvre. Par conséquent, la plupart des milieux mêmes non sélectifs ne sont pas adaptés à la culture de ces micro-organismes. (ii) les bactéries peuvent être sous différents états en fonction des conditions de l'environnement dans lequel elles se trouvent, tels que la quiescence, la dormance, ou l'état VBNC (« viables mais non cultivables ») qui ne sont pas encore suffisamment étudiés pour connaître leur degré d'interrelation et les conditions permettant de sortir ou d'entrer dans ces états.

Ainsi, seule une petite partie de la communauté bactérienne au sein des biofilms marins peut être identifiée, ce qui provoque un biais dans l'analyse de la biodiversité des communautés bactériennes des biofilms marins. Récemment, l'étude de cette diversité a beaucoup progressé, avec l'utilisation de techniques permettant d'avoir une « image » globale de la diversité microbienne au sein d'échantillons environnementaux. Dans la majorité des cas, ces études sont effectuées à partir de l'ADN de l'ensemble des populations bactériennes présentes dans l'échantillon étudié. Après l'avènement des techniques électrophorétiques d'empreintes moléculaires (par exemple la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), l'ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) ou le tRFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*)) correspondant à une analyse du polymorphisme de fragments génomiques des bactéries, elles sont aujourd'hui basées sur l'analyse des séquences de petits segments du gène de l'ARNr 16S bactériens. Le séquençage de ces segments de l'ARNr 16S, peut se faire soit avec une étape d'amplification préalable par PCR et/ou clonage, soit le plus courant de nos jours, les échantillons (ARNr 16S) peuvent être directement séquencés grâce aux techniques de séquençage nouvelle génération (NGS pour *Next Generation Sequencing*) capable de séquencer des ADN à partir de matrices multiples et en parallèle. Parmi les NGS, le pyroséquençage 454 par exemple a été largement utilisé ces dernières années pour l'analyse métagénomique d'échantillons environnementaux marins du fait de sa capacité à produire des séquences un peu plus longues. Cependant, la résolution taxonomique basée sur des séquences courtes du gène de l'ARNr 16S n'est pas suffisante pour délimiter des taxons à l'échelle de l'espèce ou de la souche (Shokralla *et al.*, 2012 ; Kim *et al.*, 2013).

L'examen de la bibliographie montre que comme dans d'autres environnements, la très grande majorité de bactéries marines sont des bactéries à Gram négatif. Un grand nombre

de genres bactériens ont été identifiés dans les biofilms marins. Plusieurs études traitent plus particulièrement des premières bactéries adhérentes à des surfaces immergées dans l'eau de mer à différents endroits sur le globe (océan Atlantique, océan Pacifique ou la mer de Chine par exemple). Dans ces études, les bactéries sont généralement récupérées à partir de sédiments, de roches ou d'organismes eucaryotes (Patel *et al.*, 2003 ; Raguénès *et al.*, 2004 ; Skovhus *et al.*, 2007 ; Nithya *et al.*, 2010 ; Teasdale *et al.*, 2011) mais les études portant sur des bactéries isolées de surfaces artificielles immergées sont plus rares (Dang et Lovell, 2000 ; Dang et Lovell, 2002 ; Grasland *et al.*, 2003 ; Bermont-Bouis *et al.*, 2007 ; Dang *et al.*, 2008 ; Boudaud *et al.*, 2009).

Il semble que les α -*Proteobacteria* et les γ -*Proteobacteria* sont les deux groupes les plus abondants (Hagström *et al.*, 2002 ; Jones *et al.*, 2007 ; Polymenakou *et al.*, 2009). Des études menées dans l'océan Pacifique confirment ces résultats, les communautés bactériennes issues de biofilms jeunes sont principalement composées soit de γ -*Proteobacteria* incluant les *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas*, ou soit d' α -*Proteobacteria* comme *Roseobacter* (Dang et Lovell, 2000 ; Dang *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2008). D'autres études réalisées en Antarctique montrent également une dominance des groupes α -*Proteobacteria* et γ -*Proteobacteria* (Webster et Chisholm, 2010). Certaines études ont tenté de déterminer comment ces groupes se succèdent dans le temps. Pour Lee *et al.*, durant les neuf premières heures d'immersion de coupons d'acryl et de verre dans la baie de Sacheon en Corée du Sud, le biofilm est principalement constitué de γ -*Proteobacteria*. Puis, après douze heures d'immersion, la dominance change au profit des α -*Proteobacteria* faisant de cette classe les seconds colonisateurs du biofilm (Lee *et al.*, 2008). En revanche, pour Dang *et al.* en 2008, le genre *Roseobacter* appartenant au α -*Proteobacteria* est pionnier dans l'adhésion aux plaques de verre, Plexiglas et PVC immergées près de Qingdao (ou Tsingtao) sur les côtes chinoises à 24h et à 72h (Dang *et al.*, 2008). La comparaison de ces résultats, qui n'ont pas été réalisés par des approches de séquençage haut débit NGS, reste difficile du fait des différents paramètres utilisés dans ces études tels que le temps, la profondeur, le lieu de l'immersion, le type de supports immergés, les techniques de séquençage ou de profilage utilisées,... qui peuvent influencer potentiellement le résultat. En effet, d'autres études montrent que les communautés évoluent au court du temps, avec des clades apparaissant et se développant au fur et à mesure du développement du biofilm, et sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la température de l'eau, ou la richesse du milieu (Dang et Lovell, 2000 ; Lau *et al.*, 2005 ; Webster et Negri, 2006 ; Jones *et al.*, 2007 ; Chiu *et al.*, 2008 ; Dang *et al.*, 2008 ; Lee *et al.*, 2008 ; Hong Chun *et al.*, 2010). Ce champ d'investigation reste donc

ouvert à bien d'autres études en intégrant les nouvelles approches de séquençage haut débit NGS.

En Méditerranée, peu d'études ont été faites sur des bactéries isolées d'organismes eucaryotes (Hentschel *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2006 ; Heindl *et al.*, 2010) et encore moins sur les communautés bactériennes isolées de surface inertes immergées (Vandecandelaere *et al.*, 2008 ; Gartner *et al.*, 2011 ; Bellou *et al.*, 2012). Globalement on y retrouve les mêmes groupes bactériens que dans les océans et les autres mers, les α -*Proteobacteria* et les γ -*Proteobacteria* sont prédominantes (Polymenakou *et al.*, 2009). De même on y retrouve des *Bacteroidetes* (dont le genre *Polaribacter*) et les genres *Halobacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* et *Alteromonas* (Hentschel *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2006 ; Gonzalez *et al.*, 2008 ; Vandecandelaere *et al.*, 2008 ; Heindl *et al.*, 2010 ; Gartner *et al.*, 2011 ; Elifantz *et al.*, 2013).

1.1.2.3. Bactéries isolées de biofilms marins

Plusieurs techniques permettent d'étudier la taxonomie de bactéries isolées. La méthode la plus courante est l'amplification par PCR universelle du gène entier de l'ARN du 16S pour ensuite séquencer les amplicons. La comparaison des séquences obtenues avec celles de bases de données (NCBI ou RDP) permet d'identifier le genre, voire l'espèce des bactéries étudiées. Le séquençage de l'ADNr du 16S permet donc une identification des souches bactériennes. Cependant, il peut avoir un faible pouvoir résolutif pour certaines espèces bactériennes, qui possèdent déjà un grand nombre d'isolats identifiés et présentent par exemple une similarité entre elles supérieure à 99,5 %. Dans ce cas, il faut soit séquencer les séquences intergéniques 16S-23S, soit d'autres gènes tels que les gènes *gyrB* (gyrase) ou *rpoB* (ARN polymérase) pour avoir plus de variabilité de séquence (Almeida et Araujo, 2013). De plus, l'identification repose sur la qualité et la quantité des séquences d'ADN 16S déposées dans les banques de données. Pour que deux souches soient considérées de la même espèce, il faut obtenir au moins 97 % d'homologie dans les séquences mais de nouveaux critères ont été plus récemment proposés, suggérant un pourcentage d'homologie plus important (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Une comparaison par hybridation ADN-ADN, de la séquence génomique avec celle d'une souche la plus proche peut permettre de confirmer les résultats obtenus par PCR. Cette technique est fondée sur l'hypothèse que si deux bactéries sont apparentées, une bonne partie des séquences nucléotidiques du génome est semblable et doit atteindre à l'échelle du génome au minimum 70 % d'hybridation (Goris *et al.*, 2007).

Les séquences d'ADN peuvent être alignées entre elles, permettant ensuite de créer des arbres phylogénétiques (par exemple avec le logiciel MEGA) qui montrent les relations de parenté entre les espèces bactériennes. Les nœuds de l'arbre représentent les ancêtres communs de ses descendants. Plusieurs méthodes existent pour créer des arbres. L'UPGMA est une méthode basée sur les similarités entre les paires de séquences. Aujourd'hui, elle est souvent délaissée au profit du *neighbor joining* qui est plus adapté aux études phylogéniques moléculaires. La spécificité du *neighbor joining* est qu'elle tient compte des différences de vitesse d'évolution entre les différentes branches de l'arbre phylogénétique. D'autres méthodes existent, comme celle du maximum de parcimonie. Enfin, toutes ces méthodes doivent être complétées par un *bootstrapping* permettant d'estimer la robustesse de chaque nœud des branches de l'arbre. Le principe est de créer un grand nombre de jeux de données par ré-échantillonnage numérique à partir du jeu de données initial et ensuite de construire un arbre phylogénétique pour chaque jeu de données simulé en utilisant l'une des méthodes de reconstruction phylogénétique. Chaque regroupement possède un pourcentage qui indique la proportion d'arbres issus des tirages qui le représentent. L'objectif de ce ré-échantillonnage de données est de vérifier que dans plus de 700 cas sur 1000, l'embranchement à chaque nœud de l'arbre est correct, c'est à dire conforme à l'embranchement original.

L'intérêt d'avoir des bactéries isolées et identifiées est que l'on peut les étudier plus précisément et définir des modèles d'étude. Les modèles sont relativement nombreux dans le domaine médical et agroalimentaire et ont permis de comprendre leur fonctionnement à l'échelle populationnelle, cellulaire ou moléculaire. Certains de ces modèles sont également pertinents dans des études environnementales (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*,...), mais plus rares sont ceux qui proviennent du domaine marin et sont étudiés dans des conditions proches de cet environnement particulier (*Vibrio*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*...). Certains ont pu aider à mettre en évidence des mécanismes précis et parfois spécifique comme la bioluminescence (Nealson et Hastings, 1979), mais aussi des composés sécrétés avec des propriétés pouvant être utiles à l'homme dans divers domaines d'activités. Dans notre cas, ce sont les biofilms développés par certaines bactéries marines qui font l'objet de notre étude en particulier la composition en exopolysaccharides de leur matrice qui présenteraient une activité antibiofilm.

1.2. La matrice du biofilm

1.2.1. Composition de la matrice du biofilm

La matrice des biofilms est généralement constituée d'eau, de bactéries (2-5 %), et de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Flemming et Wingender, 2001a). L'eau est un élément très important de la matrice car elle représente entre 50 % et 95 % du biofilm (Siegert, 1999 ; Donlan et Costerton, 2002). Les EPS représentent 60 % à 98 % de la masse sèche (Siegert, 1999 ; Flemming et Wingender, 2010) et sont un mélange complexe de polymères à hauts poids moléculaires (> 10 kDa) produits par les cellules essentiellement, la lyse cellulaire ou l'hydrolyse de composés et adsorbés sur le support (Wu et Xi, 2009). Ces exopolymères sont constitués de 40-95 % de polysaccharides, 1-60 % de protéines, 1-10 % d'acides nucléiques et 1-40 % de lipides (Flemming et Wingender, 2001b).

Il est à noter que dans certaines publications, le même sigle EPS est utilisé pour désigner les exopolysaccharides d'où une confusion possible entre les EPS en tant que substances polymériques extracellulaires et les exopolysaccharides parmi ces substances. Nous utiliserons ici le sigle EPS pour désigner uniquement les substances polymériques extracellulaires dans leur ensemble.

Si la matrice offre une cohésion au biofilm, jouant un rôle d'échafaudage pour le maintien de la structure, c'est que plusieurs types d'interactions entre les exopolymères permettent cette cohésion ; les plus importantes étant les liaisons hydrogènes, les interactions électrostatiques et les interactions de Van der Waals (Siegert, 1999 ; Flemming et Wingender, 2010 ; Hori et Matsumoto, 2010) (Figure 10 et Tableau 1).

Ces interactions physico-chimiques faibles s'additionnent et deviennent suffisamment fortes afin de maintenir l'unité du biofilm. Plus les exopolymères sont longs et chargés, plus ces forces auront de l'importance (Flemming et Wingender, 2010) mais elles ne sont pas les seules à assurer l'unité et la stabilité du biofilm, la présence de flagelles, *fimbriae* ou pili jouant un rôle (Flemming et Wingender, 2010).

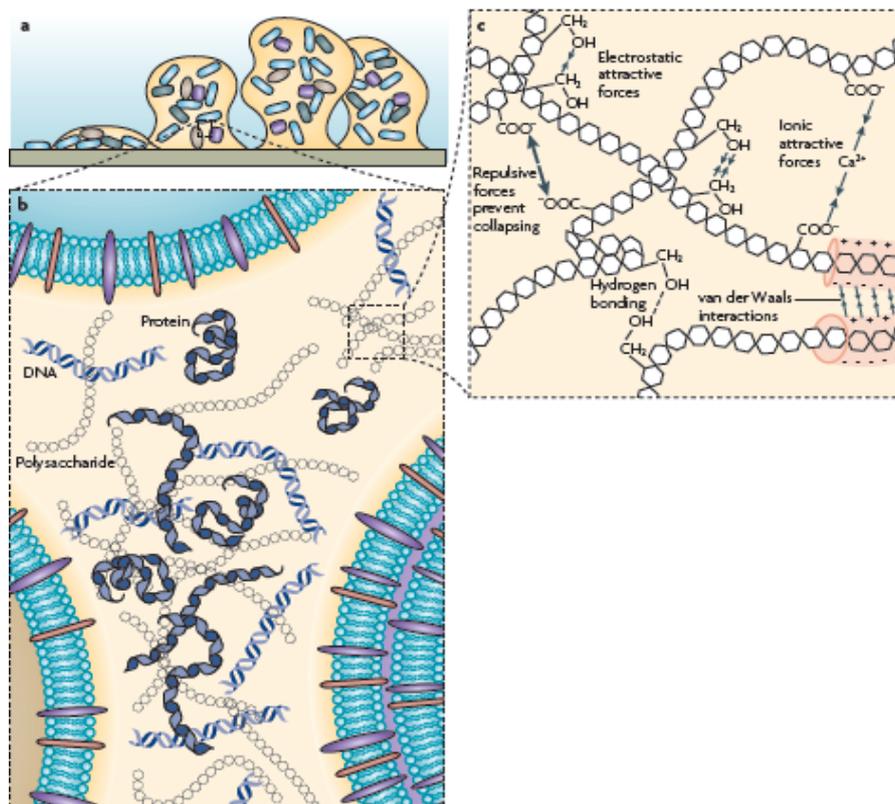


Figure 10. Représentation schématique de la matrice extracellulaire d'un biofilm (a et b). Les types de liaisons entre les différents exopolymères sont représentés sur le schéma (c) (Flemming et Wingender, 2010).

Interactions	Effets	Exemples
Liaisons hydrogènes	Formation d'un hydrogel	Groupes -OH des polysaccharides et protéines
Interactions électrostatiques	Ponts entre ions, dipôles induits	Groupes -COO ⁻ , phosphates, sulfates, etc...
Interactions de Van Der Waals	Formation de micelles et de membranes	Lipides, lipoprotéines, lipopolysaccharides

Tableau 1. Interactions possibles entre les exopolymères de la matrice du biofilm (Siegert, 1999).

1.2.2. Les Substances Polymériques Extracellulaires (EPS)

1.2.2.1. Types d'EPS

Plusieurs types d'EPS ont été décrits selon leur interaction avec la paroi bactérienne. On distingue les EPS qui entourent étroitement les bactéries, appelées capsule (généralement de nature polysaccharidique) et fortement liées, et les EPS dispersées, nommées *slime* et faiblement liées qui forme une couche diffuse (Sutherland, 1982 ; Decho, 1990 ; Hori et Matsumoto, 2010). Le terme glycocalyx est quant à lui généralement employé pour désigner la couche de polysaccharides liée à la surface des bactéries.

1.2.2.2. Rôles des EPS et bénéfices de la vie en biofilm

La production d'EPS permet de créer un environnement immédiat stable et protecteur pour les bactéries. Une matrice exopolymérique peut être, par exemple, produite en réponse à un stress osmotique ou thermique ou par une carence en source d'azote, de phosphore, de soufre ou de potassium (Nichols *et al.*, 2005b). Le Tableau 2 énumère quelques exemples de milieux dans lesquels des biofilms ont été observés. Ceci montre bien l'incroyable capacité des biofilms à s'adapter à des environnements extrêmes.

Gamme de température : De -12°C à plus de 120 °C	(Stetter <i>et al.</i> , 1986 ; Nichols <i>et al.</i> , 2005a)
Gamme de pH : De 1,3 (<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>) à plus de 9 (<i>Desulforudis audaxviator</i>)	(Amaro <i>et al.</i> , 1991)
Exposition aux rayonnements : Biofilms sur feuille protectrice de quartz de lampe UV Biofilms sur matériaux radioactifs	(Suess et Lessel, 1977 ; Kreft <i>et al.</i> , 1986)
Biocides : Biofilms sur tubes de désinfectants Avec [Chlore] > 2 mg/L	(Characklis, 1990)

Tableau 2. Conditions extrêmes dans lesquelles des biofilms bactériens ont été observés d'après la revue de Siegert en 1999 (Siegert, 1999).

Les EPS sont essentielles à la survie des bactéries et à leur adaptation à l'environnement (Decho, 1990). Les rôles des EPS pourraient être énoncés en quelques mots-clés comme adhésion, agrégation, cohésion, protection, nutrition. Plus précisément, ils peuvent se résumer de la façon suivante :

- Permettre de tamponner les variations physico-chimiques du milieu naturel (Haras, 2005),
- Protéger les bactéries contre la dessiccation, les biocides, les radiations UV, la prédation par des protozoaires, les surfactants, les anticorps et les antibiotiques (Stewart et William Costerton, 2001 ; Flemming et Wingender, 2010),
- Capturer des minéraux essentiels et des nutriments en partie grâce à leur nature ionique. Les EPS permettent de séquestrer des composés organiques dissous dans la mer (Flemming et Wingender, 2010), ce qui favorise l'apport en nutriments nécessaires à la croissance bactérienne (Costerton *et al.*, 1981),
- Fixer les polluants (matières organiques ou métaux lourds) (Costerton *et al.*, 1981 ; Decho, 1990),

- Permettre l'adhésion irréversible des bactéries sur une surface biotique ou abiotique,
- Permettre d'immobiliser les bactéries, de les rapprocher et de les faire adhérer entre elles, facilitant les interactions intercellulaires (*Quorum Sensing*) (Decho, 1990 ; Flemming et Wingender, 2010),
- Tamponner le milieu, ce qui permet aux exo-enzymes excrétées par les bactéries de pouvoir être fonctionnelles (Decho, 1990),
- Apporter un effet cryo-protecteur pour les souches bactériennes vivant par exemple dans les glaces de l'Antarctique (Nichols *et al.*, 2005a),
- Permettre le transfert horizontal d'ADN entre bactéries d'espèces différentes (Flemming et Wingender, 2010),
- Dans certains cas, devenir une source de nutriments mais ce processus est lent et plusieurs enzymes sont nécessaires (Flemming et Wingender, 2010),
- Donner une cohésion à l'ensemble de la matrice du biofilm.

Ce dernier point a fait l'objet de nombreuses publications au cours des dernières décennies parmi lesquelles on citera les travaux de Danese *et al.* qui ont montré qu'une souche mutante d'*Escherichia coli*, pour laquelle les gènes impliqués dans la synthèse d'EPS (acide colanique) ont été désactivés, ne développe pas une architecture complexe tri-dimensionnelle du biofilm. Cependant, dans ce cas, l'attachement des cellules mutées aux surfaces n'est pas affecté (Danese *et al.*, 2000). Au contraire, le rôle important des EPS aux premiers stades de l'adhésion a été montré chez d'autres souches bactériennes. Leroy, en 2008, met en évidence que la souche *Pseudoalteromonas* sp. D41 produit des EPS contenant majoritairement des protéines. Un traitement à la protéase empêchant l'adhésion des bactéries sur une surface, montre l'importance des EPS dans les mécanismes de l'adhésion (Leroy *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont d'autre part mis en évidence le rôle protecteur des EPS. Ainsi, en 2007, une étude a montré qu'un polysaccharide d'une espèce de *Pseudoalteromonas* permet à la bactérie de se protéger contre le froid (Qin *et al.*, 2007). Kachlany *et al.* ont montré que les EPS produites par *Pseudomonas putida* sont capables de fixer les métaux (Kachlany *et al.*, 2001). Un dernier exemple, en 2005, des chercheurs ont prouvé la capacité des polysaccharides produits par *Enterobacter cloacae*, à chélater des métaux lourds (cadmium, cuivre et cobalt) (Iyer *et al.*, 2005b).

1.2.2.3. Nature des EPS

Dans cette partie, nous décrivons succinctement les constituants majoritaires des EPS : les protéines, les acides nucléiques, les lipides puis les polysaccharides (Tableau 3).

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

Tableau 3. Composition des EPS (Flemming et Wingender, 2001b).

Il faut noter que la nature des EPS garde encore des zones d'ombre car beaucoup de constituants de la matrice sont difficiles à isoler et à analyser. De plus, leur composition varie énormément selon plusieurs paramètres (type de support et de micro-organismes, âge du biofilm et environnement, comme les nutriments disponibles ou la température) (Vu *et al.*, 2009). Pour ces raisons, Flemming a désigné les EPS comme étant la « matière noire » des biofilms (Flemming et Wingender, 2010).

Les protéines enzymatiques

Une multitude d'enzymes peuvent être présentes dans la matrice des biofilms, elles permettent de dégrader des molécules du biofilm. Ce processus est important lors de la dernière étape de la formation du biofilm (cf. partie 1.2.) lorsque les bactéries sont libérées pour coloniser d'autres niches écologiques. Certaines de ces enzymes ont un intérêt commercial pour leur capacité à « nettoyer » les sédiments et l'eau. Par exemple, elles peuvent être utilisées pour le traitement des eaux usées, car elles sont capables de dégrader les substances organiques ou les polymères de plastique (téréphtalates) présents dans l'eau (Flemming et Wingender, 2010).

Les protéines non enzymatiques

On compte aussi des protéines non enzymatiques parmi les EPS, elles sont notamment impliquées dans la formation et la stabilisation de la matrice extracellulaire. Par exemple, la protéine extracellulaire TasA de *Bacillus subtilis* associée à un polysaccharide permet de garder l'intégrité structurale du biofilm (Branda *et al.*, 2006). Chez une autre espèce,

Streptococcus mutans, espèce pathogène provoquant des caries dentaires, le biofilm renferme des protéines extracellulaires se liant aux glucanes et jouant ainsi un rôle essentiel dans l'organisation structurale du biofilm (Lynch *et al.*, 2007). Enfin, les protéines sécrétées appartenant à la famille des lectines sont impliquées dans la formation et la stabilisation du réseau polysaccharidique et constituent un lien entre la surface bactérienne et les exopolysaccharides.

L'ADN

On trouve de l'ADN extracellulaire parmi les EPS. Des questions se posent sur l'origine et le rôle de cet ADN. Il peut provenir de la lyse cellulaire ou alors d'une sécrétion active par des bactéries vivantes lors du développement du biofilm. Chez certaines espèces, il peut représenter un composé majeur de la matrice et jouer ainsi un rôle important (Flemming et Wingender, 2001b ; Spoering et Gilmore, 2006). Les biofilms de *S. aureus* et de *P. aeruginosa* contiennent par exemple beaucoup d'ADN extracellulaire (Steinberger et Holden, 2005 ; Izano *et al.*, 2008).

L'ADN extracellulaire peut jouer un rôle dans l'architecture du biofilm. Ceci a été mis en évidence pour une souche du genre *Rhodovulum* dont la matrice est constituée de polysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire. Cependant, alors qu'un traitement à la DNase provoque une déstructuration du biofilm, un traitement enzymatique contre les polysaccharides et les protéines n'a dans ce cas aucun effet (Watanabe *et al.*, 1998). L'ADN extracellulaire peut avoir d'autres fonctions comme favoriser l'adhésion ou l'agrégation des bactéries (Das *et al.*, 2010). C'est le cas de *Bacillus cereus* qui est capable d'utiliser l'ADN extracellulaire comme adhésine (Vilain *et al.*, 2009). L'ADN peut aussi avoir un rôle de protection (chargé négativement, il protège les bactéries contre des biocides cationiques), il est aussi une source de nutriments et permet les échanges horizontaux de gènes entre bactéries du biofilm (Molin et Tolker-Nielsen, 2003). Enfin, il a été rapporté que l'ADN extracellulaire peut aussi avoir une fonction antimicrobienne en causant la lyse cellulaire (Mulcahy *et al.*, 2008). En 2005, Steinberger *et al.* ont étudié l'ADN extracellulaire de quatre espèces bactériennes, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Rhodococcus erythropolis* et *Variovarax paradoxus* montrant une production d'ADN extracellulaire dépendante des espèces. Ils ont trouvé que les deux premières espèces produisent plus d'ADN extracellulaire par rapport aux deux autres espèces et que dans le biofilm de *P. aeruginosa*, l'ADN extracellulaire est identique à l'ADN cellulaire (Steinberger et Holden, 2005).

Les lipides

Les lipides sont des constituants de la matrice dont la présence est souvent mentionnée parmi les exopolymères. Ils jouent un rôle important dans les propriétés hydrophobes des EPS et peuvent contribuer à l'adhésion du biofilm sur une surface (Conrad *et al.*, 2003 ; Flemming et Wingender, 2010). Peu de travaux de caractérisation ont été effectués sur ces composés. Parmi les composés identifiés, nous citerons des lipopolysaccharides (LPS), constituants de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, des glycolipides comme les rhamnolipides, biosurfactants produits par *P. aeruginosa*, jouant un rôle dans l'établissement et la maintenance des biofilms (Davey *et al.*, 2003 ; Boles *et al.*, 2005). Un autre lipide extracellulaire aux propriétés biosurfactrices, la serrawettine, peptidolipide synthétisé par *Serratia marcescens*, a été mis en évidence par Matsuyama *et al.* (Matsuyama et Nakagawa, 1996).

Les exopolysaccharides

Les polysaccharides extracellulaires sont classés en deux grands groupes ; les polysaccharides capsulaires et les exopolysaccharides. La distinction entre les 2 se fait lors de l'extraction des polysaccharides d'une culture bactérienne en milieu liquide. Après centrifugation de la culture, les polysaccharides se retrouvant dans le culot bactérien sont désignés capsulaires, tandis que ceux récupérés dans le surnageant sont des exopolysaccharides. Cependant lorsque l'on étudie plutôt des cultures en biofilm, cette distinction n'est pas facile car beaucoup de polysaccharides extracellulaires produits en biofilm sont insolubles et donc difficilement séparables des bactéries. Ceci complique d'autant plus la caractérisation de leurs structures chimiques (Branda *et al.*, 2005 ; Poli *et al.*, 2010).

Composition des exopolysaccharides

Les exopolysaccharides sont très souvent abondants dans les biofilms bactériens puisqu'ils représentent généralement entre 40 % et 95 % des EPS (Flemming et Wingender, 2001b). Ce terme d'exopolysaccharides est pour la première fois utilisé par Sutherland en 1972 pour décrire un groupe complexe de polymères de monosaccharides de hauts poids moléculaires (1×10^5 à 3×10^5 Da) (Sutherland, 1977) produits par des bactéries (Sutherland *et*

al., 1972). Ces molécules ont un caractère hydrophile et sont fortement hydratées du fait de la présence de groupements hydroxyles (Nichols *et al.*, 2005b). La longue chaîne de résidus de monosaccharides peut être linéaire ou ramifiée ; la plupart des exopolysaccharides sont linéaires (Poli *et al.*, 2010). Les oses les plus couramment retrouvés dans la composition des exopolysaccharides de bactéries marines sont le D-Arabinose, le D-Ribose, le D-Xylose pour les pentoses et le D-Glucose, D-Galactose, D-Mannose, D-Allose, le L-Rhamnose et le L-Fucose pour les hexoses (Haras, 2005 ; Poli *et al.*, 2010).

Il existe deux grands groupes de polysaccharides : les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Les premiers sont constitués d'un seul type de résidu saccharidique répété plusieurs fois. Les glucanes, dont font partie le dextrane et le pullulane, en sont un exemple, ils ne contiennent qu'un seul type de monosaccharide, le glucose.

La cellulose fait aussi partie des glucanes (résidus glucose liés en β (1-4)). Beaucoup d'espèces bactériennes sont capables de synthétiser cet homopolymère, comme *Gluconacetobacter xylinus* ou *Agrobacterium tumefaciens* (Flemming et Wingender, 2010). Malgré la présence d'un seul type de monosaccharide commun, ces polymères peuvent présenter des différences rhéologiques dues aux différents types de liaisons entre les oses et la présence ou non de ramifications.

Les hétéropolysaccharides sont quant à eux composés de résidus saccharidiques variés organisés en unités répétitives. Comme pour les homopolysaccharides, la chaîne principale peut être ramifiée ou linéaire. La plupart des polysaccharides produits par les bactéries sont des hétéropolysaccharides formés de 2 à 4 types de monosaccharides constituant des groupes de 2 à 10 résidus par unité de répétition (Decho, 1990 ; Poli *et al.*, 2010). Beaucoup de bactéries sont capables de synthétiser des hétéropolysaccharides, comme l'espèce *Xanthomonas campestris* qui produit le xanthane, hétéropolysaccharide de glucose, de mannose, d'acide glucuronique et d'acide pyruvique.

Le Tableau 4 propose une liste d'exopolysaccharides synthétisés par des bactéries marines. Un certain nombre de ces polysaccharides ont fait l'objet d'études de structure, de propriétés ou d'activités.

Chapitre 1. Etude bibliographique

Souche productrice	Composition	Masse	Propriété/ activité	Lieux	Références
<i>Pseudomonas</i> sp. NCMB 2021	Polysaccharide A: Glc, Gal, GlcA et GalA. Polysaccharide B: GlcNAc, acide 2-keto-3-deoxyoctulosonique, 6-deoxyhexose et groupe O-acétyl	10 ⁵ - 10 ⁶ Da			(Christensen <i>et al.</i> , 1985)
<i>Pseudomonas</i> sp. S9	Glc, GlcNAc, GalNAc			Océan Arctique	(Wrangstadh <i>et al.</i> , 1986 ; Szewzyk <i>et al.</i> , 1991)
<i>Ateromonas</i> sp. HYD1545	Glc, Gal, GalA, GlcA et 4,6-O-(1-carboxyethylidène)-galactose. Sulfates et pyruvates		Fixe les métaux lourds et inhibe les 1 ^{ères} étapes du <i>biofouling</i>	Source hydrothermale (dorsale est-Pacifique)	(Vincent <i>et al.</i> , 1994 ; Guezennec <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ateromonas macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> ST716	Glc, Man, Gal, GlcA et GalA. Sulfates et pyruvates.		Traitement des eaux usées, traitement de maladies du cœur, réparation des os et activité <i>antifouling</i>	Source hydrothermale (dorsale est-Pacifique)	(Raguénès <i>et al.</i> , 1996 ; Loaëc <i>et al.</i> , 1997 ; Loaëc <i>et al.</i> , 1998 ; Rougeaux <i>et al.</i> , 1998 ; Zanchetta et Guezennec, 2001 ; Guezennec <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ateromonas macleodii</i> subsp. <i>fijiensis</i> HYD657	Glc, Gal, Fuc, Rha, Man, GlcA et GalA. Sulfates, lactates et pyruvates	1,6 MDa	Cosmétique, inhibe les 1 ^{ères} étapes du <i>biofouling</i>	Source hydrothermale (dorsale est-Pacifique)	(Cambon-Bonavita <i>et al.</i> , 2002 ; Guezennec <i>et al.</i> , 2012 ; Le Costaouëc <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ateromonas infernus</i> 785	Glc, Gal, GlcA et GalA. Sulfates	> 1,5 MDa	Anticoagulant	Source hydrothermale (bassin de Guaymas)	(Colliec Jouault <i>et al.</i> , 2001)
<i>Ateromonas</i> sp. 1644)	Glc, Gal, GlcA, GalA et 3-O-[(R)-1-carboxyéthyl]-D-acide glucuronique			Source hydrothermale (dorsale est-Pacifique, bassin nord-fidjien)	(Bozzi <i>et al.</i> , 1996 ; Dubreucq <i>et al.</i> , 1996 ; Samain <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i> SBT033	Glc, Gal, Man, Xyl, Rib et Rha			Côte est de l'Inde	(Saravanan et Jayachandran, 2008 ; Saravanan <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pseudoalteromonas arabiensis</i> sp. k53				Océan indien	(Matsuyama <i>et al.</i> , 2013)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CAM025	Glc, Gal, Ara, Fuc et a. uroniques. Acétyles	5,7 MDa	Cryoprotection et fixation de métaux	Océan Antarctique	(Mancuso Nichols <i>et al.</i> , 2004 ; Nichols <i>et al.</i> , 2005a)
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	composé polyanionique de haut poids moléculaire		Activité antitumorale, inhibe les cellules T, la prolifération des lymphocytes et activité contre la malaria.		(Bowman, 2007)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. GY768	Glc, Gal, Man et acides uroniques. Sulfates, pyruvates et acétates.		Traitement des eaux usées	Fond marin profond à Guaymas	(Rougeaux <i>et al.</i> , 1996)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. HYD 721	Glc, Gal, Man, Rha et GlcA	870 kDa		Source hydrothermale (dorsale est-Pacifique, bassin nord-fidjien)	(Rougeaux <i>et al.</i> , 1999a)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM9913	Glc (α-(1,6)) majoritaire. Acétyles et éthoxyles	40 kDa	Cryoprotection	Source hydrothermale des fonds océaniques	(Qin <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CAM036	Glc, Man, Ara, GalA, GalNAc. Sulfates, acétyles et succinyles	4,6 MDa	Fixe le fer	Océan Antarctique	(Mancuso Nichols <i>et al.</i> , 2004 ; Hassler <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AM	Glc		Activité antivirale et activité fibrinolytique	Mer rouge	(Al-Nahas <i>et al.</i> , 2011)
<i>Pseudoalteromonas antarctica</i> NF3					(Bozal <i>et al.</i> , 1997 ; Poli <i>et al.</i> , 2010)
<i>Vibrio</i> sp. et une α-Proteobacteria		> 100 kDa	Empêche la fixation de <i>H. elegans</i> et <i>B. neritina</i>		(Dobretsov <i>et al.</i> , 2006)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Glc, Gal, Man et GlcN	> 200 kDa	Activité <i>antifouling</i>		(Dobretsov <i>et al.</i> , 2006)
<i>Vibrio campbellii</i> (1) et <i>Vibrio fortis</i> (2)	(1): Glc, Gal, Man, Rha et Ara. (2): Gal, Man et Ara	(1): 2,4 MDa. (2): 2,2 MDa	Emulsifiant	Côte indienne (Diu)	(Kavita <i>et al.</i> , 2013)
<i>Vibrio neocaledonicus</i> sp. nov NC 470	Sucre neutre, N-acétyl-hexosamines et acide uronique	672 kDa	Fixe les métaux lourds	Nouvelle-calédonie (baie St-Vincent)	(Chalkiadakis <i>et al.</i> , 2013)

Chapitre 1. Etude bibliographique

<i>Vibrio diabolicus</i> HE800	Acide uronique, GlcNAc et GalNAc	800 kDa	Aide à la cicatrisation osseuse et activité <i>antifouling</i>	Source hydrothermale des fonds océaniques (dorsale est-Pacifique)	(Raguénès <i>et al.</i> , 1997 ; Rougeaux <i>et al.</i> , 1999b ; Zanchetta <i>et al.</i> , 2003 ; Guezennec <i>et al.</i> , 2012)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Glc, Gal, Man, Ara et acide uronique		Emulsifiant	Côte indienne (Diu)	(Kavita <i>et al.</i> , 2011)
<i>Vibrio vulnificus</i>	Glc, Gal, Xyl, GlcN et GalN		Effet <i>antifouling</i>		(Kim <i>et al.</i> , 2011)
<i>Vibrio</i> sp. QY101	Rha, GlcA, GalA et GlcN	546 kDa	Activité antibiofilm		(Jiang <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus</i> sp. 4001	Glc, Gal, Man et ManN	380 kDa		Source hydrothermale (Italie)	(Nicolaus <i>et al.</i> , 2002)
<i>Bacillus thermodenitrificans</i> B3-72	Glc et Man	90 kDa	Antivirale et immunomodulateur	Source hydrothermale peu profonde (Italie)	(Arena <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus licheniformis</i>	α -D-galactopyranosyl-(1-2)-glycérol-phosphate	1,8 MDa	Antibiofilm	Sicile	(Sayem <i>et al.</i> , 2011)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	Glc, Fuc, GlcA et GlcNAc				(Urai <i>et al.</i> , 2007)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> S-2	Glc, Gal, Man et GlcA	2 MDa	Bioremédiation (pétrole)		(Iwabuchi <i>et al.</i> , 2002 ; Urai <i>et al.</i> , 2006)
<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> subsp. <i>Payriae</i>	Sucre neutre et acide uronique. Acétates et sulfates	3 MDa	Fixe métaux (cuivre et ions ferreux)	Atoll polynésien	(Moppert <i>et al.</i> , 2009)
<i>Streptococcus phocae</i>	Gal, Ara et Fru	280 kDa	Antioxydant et antibiofilm		(Kanmani <i>et al.</i> , 2011)
<i>Thermococcus litoralis</i>	Man	41 kDa		Source hydrothermale marine peu profonde	(Rinker et Kelly, 1996)
<i>Geobacillus</i> sp. 4004	EPS1 et EPS2: Glc, Gal et Man. EPS3: Gal, Man, Ara et GlcN	EPS3: 1 MDa	Application pharmaceutique	Source chaude marine (Italie)	(Schiano Moriello <i>et al.</i> , 2003 ; Poli <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus licheniformis</i> B3-15	Man		Activité antivirale	Source chaude marine (Italie)	(Maugeri <i>et al.</i> , 2002 ; Arena <i>et al.</i> , 2006)
<i>Halomonas marina</i>			Empêche la fixation de <i>B. amphitrite</i>		(Dobretsov <i>et al.</i> , 2006)
<i>Halomonas alkaliantarctica</i> CRSS	Glc, Fru, GlcN et GalN			Antarctique	(Poli <i>et al.</i> , 2004 ; Poli <i>et al.</i> , 2007)
<i>Flavobacterium uliginosum</i> MP-55	Glc, Man et Fuc	1 MDa	Activité antitumorale	Japon (baie Odawa)	(Umezana <i>et al.</i> , 1983)
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> BK6	Glc, Ara et Man	2,1 MDa	Emulsifiant et activité antibiofilm	Coté indienne (Sikka)	(Kavita <i>et al.</i> , 2014)
<i>Hahella chejuensis</i> 96CJ10356	Glc, Gal, Xyl et Rib	2 MDa	Biosurfactant	Corée	(Ko <i>et al.</i> , 2000 ; Lee <i>et al.</i> , 2001)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Sucres neutres et acides uroniques		Emulsifiant	Côte ouest de l'Inde	(Iyer <i>et al.</i> , 2006)
Souches CAM005, CAM030, CAM006, CAM003, CAM015, CAM023, CAM064 et CAM090	Sucre neutre et acide uronique. Sulfate	0,1 à 5,7 MDa		Antarctique	(Nichols <i>et al.</i> , 2005a)
	PS 3a24: Glc, Gal et Man. PS 3a35: Glc, Gal, Man et Rha. Pyruvate			Canada (Halifax)	(Boyle et Reade, 1983)
<i>Glaciecola chathamensis</i> S18K6 et <i>Glaciecola chathamensis</i> S18K5				Océan Pacifique	(Matsuyama <i>et al.</i> , 2006)
<i>Colwellia psychrerythraea</i> 34H			Cryoprotection	Océan Arctique	(Marx <i>et al.</i> , 2009)
<i>Halofarax mediterranei</i>	\rightarrow 4)- β -D-GlcpNAcA-(1 \rightarrow 6)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAcA-3-O-SO ₃ --(1 \rightarrow		Bioremédiation (pétrole)	Mer Méditerranée	(Anton <i>et al.</i> , 1988 ; Parolis <i>et al.</i> , 1996)

Tableau 4. Polysaccharides de bactéries marines.

On peut remarquer la présence de groupes fonctionnels dans beaucoup d'exopolysaccharides isolés de bactéries marines. On trouve des groupements organiques comme des acétates ou pyruvates et des substituants inorganiques comme des phosphates ou sulfates (Nichols *et al.*, 2005b). Dans sa revue, Mancuso Nichols a établi une liste des composants saccharidiques ou autres des exopolysaccharides bactériens (Tableau 5) (Nichols *et al.*, 2005b).

Type	Composé	Exemple	Type de liaison
Sucres	Pentoses	D-Arabinose	
		D-Ribose	
		D-Xylose	
	Hexoses	D-Glucose	
		D-Mannose	
		D-Galactose	
		D-Allose	
		L-Rhamnose	
		L-Fucose	
	Sucres aminés	D-Glucosamine	
		D-Galactosamine	
	Acides uroniques	Acide Glucuronique	
		Acide Galacturonique	
Autres	Acide acétique		O-Acyl, N-Acyl
	Acide succinique		O-Acyl
	Acide pyruvique		Acétal
	Acide phosphorique		Ester, Diester
	Acide sulfurique		Ester

Tableau 5. Composition des exopolysaccharides bactériens (Nichols *et al.*, 2005b).

Relation structure/fonction

Le Tableau 6 regroupe les relations structure/fonction que l'on peut trouver avec les EPS. Si l'on considère les polysaccharides en particulier, leurs propriétés physico-chimiques sont directement liées à leur structure, qui est elle-même liée aux modes de liaison des monosaccharides et à la présence de composés autres que des oses.

Nature des EPS	Rôle dans les biofilms
Polysaccharides neutres amyloïdes	Structuration
Polysaccharides chargés ou hydrophobes	Echange d'ions et sorption
Enzymes extracellulaires	Dégradation des polymères
Acides nucléiques et lectines	Information génétique, structure, reconnaissance, spécificité
Divers polymères	Source de C, N, P

Tableau 6. Relation structure/fonction des EPS selon Flemming *et al.* (Flemming *et al.*, 2007).

En effet, les liaisons entre les résidus osidiques et la présence de ramifications influencent la conformation des polysaccharides et jouent donc sur les propriétés physiques des polymères. Un squelette rigide est dû à des liaisons de type β (1-4) ou β (1-3) ; par contre la présence de liaisons de type α (1-2) ou α (1-6) donne plus de flexibilité aux polymères (Sutherland, 2001a ; Poli *et al.*, 2010). Le xanthane (liaisons β (1-4) pour la chaîne principale, avec un fort pouvoir épaississant, utilisé comme additif alimentaire) et le dextrane (squelette fait d'enchaînements α (1-6) avec des ramifications en (1-2), (1-3) ou (1-4) utilisé, entre autres, pour la fabrication de larmes artificielles) en sont de bons exemples.

La présence de ramifications provoque un désordre (interactions moins fortes entre les polymères) et augmente la solubilité du polysaccharide dans l'eau. Ainsi, le xanthane qui possède un squelette de cellulose sur lequel se fixent des chaînes latérales, est décrit comme un dérivé soluble de la cellulose (Kumar *et al.*, 2007).

Les polysaccharides des bactéries marines contiennent souvent des sucres modifiés comme les acides uroniques qui donnent des charges négatives et des propriétés acides aux polymères au pH de l'eau de mer (pH environ de 8) (Nichols *et al.*, 2005b). Decho, en 1990, a relaté dans sa revue qu'entre 20 % et 50 % des polysaccharides produits par les bactéries marines contiennent des acides uroniques (Decho, 1990).

La présence de groupes fonctionnels joue également un rôle important car ils confèrent des propriétés physico-chimiques spécifiques aux polysaccharides qui les portent.

Le taux de présence et le type de groupements fonctionnels affectent la structure à laquelle sont liées directement les caractéristiques physico-chimiques du polymère (Decho, 1990). Ces composés non saccharidiques peuvent apporter des charges négatives aux polysaccharides.

Si l'on s'intéresse au rôle des exopolysaccharides dans la formation des biofilms, les exemples décrits ci-après montrent qu'ils ont une fonction importante.

Ainsi Watnick et Kolter ont mis en évidence que les exopolysaccharides synthétisés par *Vibrio cholerae* sont impliqués dans l'architecture tridimensionnelle du biofilm (Watnick et Kolter, 1999). Fong *et al.* sont arrivés aux mêmes conclusions quelques années plus tard. Ils montrent, par mutation du cluster *vps*, que le polysaccharide VPS, un composé majeur de la matrice de *Vibrio cholerae*, est essentiel au développement tridimensionnel du biofilm de cette souche (Fong *et al.*, 2010).

En 1987, Allison et Sutherland ont observé que les polysaccharides sont impliqués dans la formation du biofilm de deux souches bactériennes à Gram négatif d'eau douce mais pas dans les premières étapes d'adhésion de ces mêmes bactéries (Allison et Sutherland, 1987). Johansen *et al.*, en 1997, ont étudié les biofilms de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. fluorescens* et *P. aeruginosa*. Ils mettent en évidence que le traitement des biofilms avec des enzymes capables d'hydrolyser les polysaccharides, permet d'éliminer le biofilm sur de l'acier ou sur un substrat en polypropylène, ceci sans tuer les bactéries (Johansen *et al.*, 1997).

Le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* est l'un des plus étudiés. Les souches mucoïdes de cette espèce produisent des alginates (polysaccharides composés d'acides uroniques non ramifiés, β -D-mannuronate et α -L-guluronate liés en (1-4)). Ces polysaccharides sont impliqués dans la formation du biofilm. Leur présence n'est pas essentielle mais ils ont un effet notable sur l'architecture du biofilm. L'acétylation des alginates influence l'agrégation des bactéries en micro-colonies et donne une structure hétérogène au biofilm. Un mutant produisant des alginates non acétylés donne un biofilm beaucoup moins hétérogène et des colonies non mucoïdes (Tielen *et al.*, 2005). Les groupements acétyles augmentent les propriétés d'adhésion et de cohésion des EPS et ont donc un effet sur l'architecture des biofilms (Flemming et Wingender, 2010).

Il a été aussi démontré que l'architecture tridimensionnelle du biofilm peut être fortement gouvernée par les interactions entre les EPS anioniques et les cations multivalents présents dans le milieu (Nichols *et al.*, 2005b). Ainsi des interactions ioniques s'établissent grâce à des cations divalents comme les ions Ca^{2+} entre les polymères d'alginate de *P. aeruginosa*, provoquant la formation d'un biofilm épais et compact (Körstgens *et al.*, 2001). D'autres exemples étayent ces résultats. Par exemple en 2003, Kierek et Watnick ont montré que l'architecture du biofilm de *Vibrio cholerae* dépend de la présence de Ca^{2+} . Ces ions interagissent avec les polysaccharides présents dans le biofilm de cette souche et permettent d'en stabiliser la structure. Si les ions Ca^{2+} sont éliminés du milieu, alors le biofilm se désintègre (Kierek et Watnick, 2003). D'autre part, Boyle et Reade en 1983 ont mis en

évidence que la présence de calcium et de magnésium augmente, à faible pH, la viscosité des polysaccharides produits par deux souches de bactéries marines (Boyle et Reade, 1983).

Dans le cas de polysaccharides polyanioniques, la répulsion entre les charges négatives leur confère une certaine viscosité (qui joue sur la densité du biofilm) ou leur permet de fixer des cations métalliques dilués dans le milieu (Brown et Lester, 1982). Par exemple, les acides uroniques ont une bonne affinité avec les ions métalliques (Decho, 1990).

Aspect taxonomique

La taxonomie des bactéries ne donne pas d'indication sur la nature des polysaccharides produits. Beaucoup d'exemples montrent que deux souches proches taxonomiquement ne produisent pas forcément des EPS de composition semblable. Par exemple, plusieurs souches de la même espèce isolées au même endroit et cultivées dans les mêmes conditions, peuvent ne pas produire les mêmes types de polysaccharides, la composition et les propriétés physico-chimiques des polysaccharides variant d'une souche à l'autre (Nichols *et al.*, 2005b). Ainsi, plusieurs souches de l'espèce *Streptococcus thermophilus* produisent des hétéropolysaccharides composés de monomères différents et de masses moléculaires différentes (Flemming et Wingender, 2010). Globalement, si l'on se focalise sur les exopolysaccharides isolés de souches de bactéries marines, leurs compositions chimiques et leurs propriétés physico-chimiques varient beaucoup (Sutherland, 2001a).

Parallèlement, d'autres études ont montré que des souches d'espèces différentes isolées au même endroit peuvent produire des polysaccharides très similaires (Rougeaux *et al.*, 1996). Ceci pourrait être dû au fait que la synthèse de ces EPS est liée à une adaptation des espèces à un environnement identique et que ces souches se protègent de la même façon.

1.2.3. Extraction et caractérisation des EPS

Cette partie est consacrée aux nombreuses méthodes d'extraction et de caractérisation des EPS. Nous verrons la première étape qui est le *screening* des souches productrices d'EPS, ensuite les étapes de production et d'extraction des EPS pour enfin terminer avec leur caractérisation.

1.2.3.1. *Screening* des souches productrices d'EPS

Plusieurs méthodes simples et rapides existent pour déterminer la capacité d'une souche bactérienne à produire des EPS. L'observation du phénotype des colonies cultivées sur boîte de Petri donne déjà une information. Les souches productrices d'EPS forment des colonies brillantes, bombées et visqueuses ; on dit alors qu'elles ont un phénotype mucoïde (Dupont, 1998). L'une des caractéristiques de ce phénotype est que lorsque l'on touche et étire la colonie avec un cure-dent, celle-ci forme un long filament (Figure 11). Cependant cette expérience n'est pas toujours fiable, certaines souches ne synthétisant pas d'EPS sur un milieu solide mais seulement dans un milieu liquide et dans des conditions bien définies.

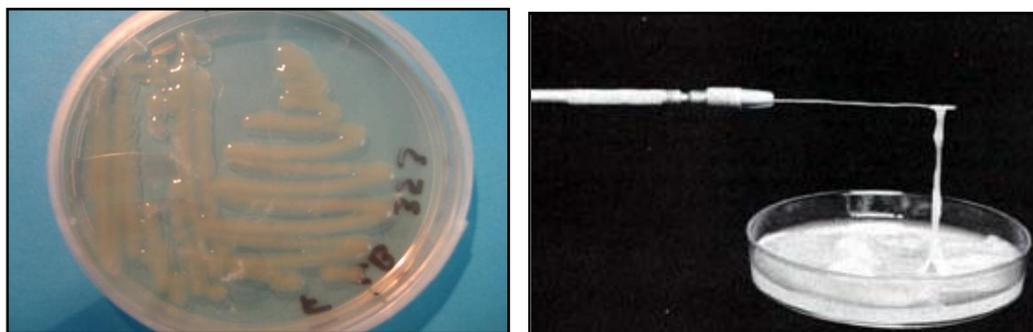


Figure 11. Photos de colonies mucoïdes. A gauche : colonies bactériennes ayant un aspect mucoïde. A droite : filament formé au contact d'un cure-dent avec une colonie bactérienne mucoïde (Becking, 1981).

Nicolaus *et al.* ont isolé et sélectionné des souches productrices d'EPS en les cultivant sur des milieux gélosés supplémentés avec différents sucres. Ils ont constaté que l'ajout de certains sucres comme le tréhalose, le saccharose, le cellobiose ou le galactose permettait d'obtenir des colonies mucoïdes produisant beaucoup d'EPS (Nicolaus *et al.*, 2002). D'autres équipes de chercheurs utilisent aussi cette méthode, comme Chalkiadakis qui, dans son étude de 2013, a sélectionné des souches bactériennes productrices d'EPS selon leur phénotype mucoïde après 2 jours de culture sur milieu Zobell gélosé supplémenté de 3 % de glucose (Chalkiadakis *et al.*, 2013). Ortega-Morales *et al.* ont eux aussi utilisé un milieu enrichi avec 3 % de glucose pour trier les bactéries productrices, des bactéries non productrices (Ortega-Morales *et al.*, 2007).

Il existe d'autres expériences de *screening* simples basées sur l'utilisation de colorants cationiques comme le rouge de ruthénium couplé au tétraxide d'osmium ou le bleu alcian qui ont tous deux une bonne affinité pour les polysaccharides anioniques (Donlan et Costerton, 2002). Stingle *et al.* ont incorporé le rouge de ruthénium dans le milieu gélosé ce qui donne une couleur rose aux boîtes de Petri. Les colonies non mucoïdes apparaissent rouges car le

colorant, visible, s'est fixé au peptidoglycane de la paroi bactérienne. En revanche, les colonies productrices d'EPS restent blanches car la matrice cache la couleur rouge de la paroi cellulaire. C'est ainsi que Stinglee sélectionne les souches productrices d'EPS (Stinglee *et al.*, 1996).

D'autres méthodes existent comme celles basées sur les propriétés rhéologiques des EPS, comme la mesure de la viscosité qui permet dans certains cas de suivre la production d'EPS d'une culture en milieu liquide (Poli *et al.*, 2010).

Les tests réalisés en microplaques sont depuis quelques dizaines d'années largement utilisés en laboratoire, permettant un gain de temps considérable en autorisant de tester plusieurs dizaines de souches en même temps avec un protocole très simple. Depuis quelques années, ils peuvent même être robotisés pour des criblages haut-débit. Les tests les plus courants utilisent des colorants capables de colorer le biofilm. Le plus utilisé est le cristal violet qui permet de quantifier le biofilm par mesure de la densité optique à 570 nm. Le cristal violet colore les bactéries et la matrice du biofilm. D'autres colorants sont utilisés comme la safranine ou encore le bleu de méthylène (Donlan et Costerton, 2002 ; Roberts *et al.*, 2002). Le bleu 1,9 diméthyl-méthylène peut également être utilisé pour quantifier la formation de biofilm, car il se lie aux polysaccharides sulfatés potentiellement présents dans la matrice (Peeters *et al.*, 2008). Pour toutes ces techniques énumérées, la mesure d'absorbance des colorants utilisés se fait par spectrophotométrie.

En parallèle de l'utilisation de ces colorants, le marquage par des fluorochromes (SYTO 9, SYTO 61, DAPI ...) est de nos jours également utilisé. Certaines de ces molécules ne se fixent qu'aux bactéries, d'autres, plus rares, peuvent se fixer à certains composants présents dans la matrice extracellulaire (tel que le Sypro pour les protéines ...). A ce jour, ces fluorochromes sont généralement utilisés pour des tests de capacité d'adhésion de souches bactériennes (Leroy *et al.*, 2007).

D'autres types de méthodes sont quant à elles basées sur l'incorporation d'un radiotracteur comme la [¹⁴C] leucine ou la [³H] thymidine. Comme pour les tests utilisant des fluorochromes, les résultats donnent des informations quantitatives sur les bactéries donc sur les capacités d'adhésion des cellules et non de production de biofilm. Vesterlund *et al.* en 2005 ont comparé plusieurs tests de mesure d'adhésion bactérienne par marquage cellulaire dont le marquage radioactif, la coloration au cristal violet et celle au DAPI. Ils en concluent que le marquage radioactif est la plus sensible de ces trois méthodes (Vesterlund *et al.*, 2005).

Depuis peu, une nouvelle méthode basée cette fois-ci sur la mobilité de microbilles magnétiques au sein de la matrice d'un biofilm est commercialisée sous le nom de *BioFilm*

Ring Test[®] (BFRT[®]) (Chavant *et al.*, 2007). Cette méthode permet de quantifier et de suivre la formation de biofilm en microplaque. Plus précisément, le principe de ce test repose sur la mesure de la mobilité de microbilles magnétiques, ajoutées lors de l'inoculation des bactéries dans les microplaques dédiées à cet essai, lorsque celles-ci sont soumises à une aimantation aux différents temps d'incubation. En absence de formation de biofilm, les microbilles sous l'influence du champ magnétique, migrent au centre du puits et forment un spot foncé (Figure 12 et 13). Par contre, si la culture bactérienne forme un biofilm, les microbilles sont piégées dans la matrice extracellulaire et ne peuvent pas migrer au centre du puits. Il n'y a donc pas de formation de spot. Dans le cas d'un biofilm intermédiaire, la migration des microbilles est réduite ce qui atténue la formation du spot et seul un halo est visible. La quantification du biofilm se fait après le scan des microplaques et l'analyse des images de chaque puits, qui grâce à un algorithme, permet l'évaluation de la quantité de biofilm formé sous forme d'un ΔBFI . Si celui-ci est inférieur à 2, cela indique l'absence de formation de biofilm (présence de spot). Entre 2 et 20, cela correspond à la formation d'un biofilm intermédiaire (présence d'un halo). Enfin si le ΔBFI est supérieur à 20, cela indique la présence d'un biofilm mature (pas de spot).

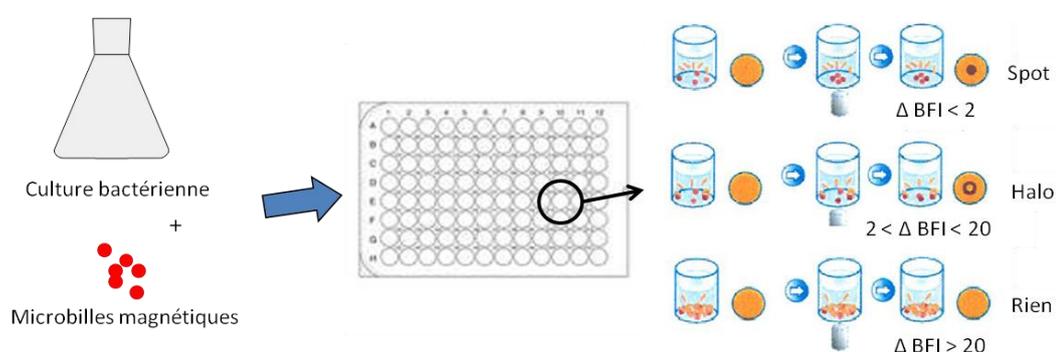


Figure 12. Principe du *BioFilm Ring Test*[®].



Figure 13. Photos de microplaques de BFRT[®] après aimantation. A gauche : spots visibles au centre des puits, à droite : dans certains puits, le biofilm formé empêche le regroupement des microbilles en spot.

Plusieurs publications ont comparé les différentes méthodes proposées en microplaques. Ainsi en 2010, Nagant *et al.* font partie des premiers à comparer l'utilisation du cristal violet à celle du BFRT[®] (Nagant *et al.*, 2010). Ils en ont conclu que le cristal violet permet une bonne étude des biofilms matures alors que le BFRT[®] paraît être plus approprié pour l'étude des premières heures de formation du biofilm. Les auteurs précisent que le BFRT[®] est une méthode rapide et facile, pouvant être une bonne alternative au cristal violet. Il faut toutefois modérer cette appréciation car le BFRT[®] reste une méthode bien plus coûteuse. Liesse *et al.* ont comparé eux aussi le cristal violet au BFRT[®] et ont considéré que les deux méthodes étaient complémentaires (Liesse Iyamba *et al.*, 2011). En 2012, une étude sur l'adhésion de *Staphylococcus aureus* aboutit globalement aux mêmes conclusions ; le BFRT[®] doit être privilégié pour l'étude des premières étapes de formation du biofilm contrairement au cristal violet et il existe une bonne corrélation entre les deux méthodes (Liesse Iyamba *et al.*, 2012). Enfin, une dernière étude de 2013 donne là aussi les mêmes conclusions. Les auteurs mettent l'accent sur les problèmes liés à l'utilisation du cristal violet, ce test étant difficile à utiliser et à standardiser car le nombre et les conditions de lavages, la durée de coloration et les concentrations en colorant varient énormément selon les publications (Crémet *et al.*, 2013).

1.2.3.2. Production des exopolysaccharides

L'étape suivante dans le cadre d'une étude de caractérisation des exopolysaccharides de la matrice du biofilm est la recherche de conditions de culture des souches bactériennes facilitant la production d'EPS. L'augmentation du rendement peut être obtenue de différentes manières. Ainsi l'amélioration de la synthèse d'EPS passe par l'optimisation des conditions de culture (Dobretsov *et al.*, 2006). Une méthode fréquente est l'apport plus important d'une source de carbone, comme un sucre. La complémentation étant variable mais généralement d'environ 3 % (Decho, 1990 ; Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2005c ; Poli *et al.*, 2010). Ainsi, par exemple, Chalkiadakis *et al.* ont extrait des EPS du biofilm de la souche *Vibrio neocaledonicus*, en la cultivant dans un milieu minimum Zobell enrichi en glucose (3 %) (Chalkiadakis *et al.*, 2013). Le type de sucre disponible dans le milieu a également son importance, par exemple la souche *Hahella chejuensis* isolée de sédiments marins en Corée, produit plus d'EPS dans un milieu contenant du saccharose comme seul apport glucidique (Ko *et al.*, 2000).

D'autres méthodes peuvent être efficaces comme réaliser des cultures sur plusieurs semaines avec un changement de milieu tous les deux jours pour permettre aux bactéries d'être toujours approvisionnées en nutriments, comme c'était le cas pour l'étude d'Andersson *et al* (Andersson *et al.*, 2011). Dans certains articles, les auteurs ont mis au point empiriquement des milieux capables d'induire la synthèse d'exopolymères (Bernadsky et Rosenberg, 1992). Enfin, des milieux carencés induisent un stress aux bactéries qui peuvent répondre en produisant une forte quantité d'exopolymères pour se protéger (Wrangstadh *et al.*, 1990 ; Poli *et al.*, 2010). Ainsi, certaines souches bactériennes synthétisent en laboratoire des EPS quand la source d'azote, de phosphate, de soufre et de potassium est limitée (Decho, 1990 ; Sutherland, 2001b). D'autres paramètres chimiques sont à prendre en compte comme le pH. Les conditions physiques du milieu jouent elles aussi un rôle important, comme la température d'incubation, l'oxygénation ou la durée de culture. Ainsi Lee *et al.* ont mis en évidence que la production d'exopolysaccharides par la souche *Hahella chejuensis* augmente avec l'aération du milieu (Lee *et al.*, 2001). D'autres études ont montré que l'utilisation de détergents de type Tween[®] 40, Tween[®] 80 ou Triton X100 améliore la concentration en oxygène du milieu et fait ainsi augmenter la production d'exopolysaccharides (Morin, 1998). Ces paramètres physico-chimiques peuvent aussi dans certains cas n'avoir aucun impact sur la quantité d'exopolymères produits (Williams et Wimpenny, 1978). Les conditions de culture peuvent n'affecter que le poids moléculaire, la conformation ou le ratio de chaque monosaccharide sans pour autant changer la composition en monosaccharides des exopolysaccharides (Nichols *et al.*, 2005b).

L'étude menée par Mancuso Nichols *et al.* en 2005 a montré l'impact de la température sur la production d'EPS par des bactéries marines du genre *Pseudoalteromonas* isolées de l'Antarctique. Des cultures en *batch* réalisées à -2°C, 10°C et 20°C montrent que pour les deux températures les plus faibles, on obtient trente fois plus d'EPS qu'à 20°C. La composition est elle aussi influencée par la température car, toujours pour les deux plus faibles températures, la quantité d'acides uroniques est beaucoup plus importante. Ces caractéristiques permettraient aux bactéries de se protéger contre le froid (rôle cryoprotecteur des exopolysaccharides) (Nichols *et al.*, 2005a).

En 2002, des chercheurs ont montré l'influence des conditions de culture sur la production de polysaccharides chez *Bacillus licheniformis*. L'ajout d'éthanol permet d'augmenter le rendement, tandis que l'ajout de sucres (saccharose, fructose ou glucose) n'a aucun effet (Larpin *et al.*, 2002). L'espèce *E. coli* montre elle aussi une sensibilité aux

conditions de culture puisque la concentration en glucose et le type d'agitation des cultures jouent sur la production de biofilm (Moreira *et al.*, 2013).

Globalement, il est donc difficile d'étudier la production d'EPS par les bactéries car la qualité et la quantité d'EPS dépendent non seulement des souches étudiées mais aussi des conditions de culture.

Un dernier point important doit être souligné, la production d'EPS varie au cours de la phase de croissance des bactéries. La majorité des bactéries synthétisent leurs EPS pendant la phase stationnaire (Decho, 1990 ; Manca *et al.*, 1996 ; Poli *et al.*, 2010). Par exemple, la souche du genre *Alteromonas* isolée de cheminées hydrothermales par Samain *et al.* (1997) commence à synthétiser des EPS essentiellement en début de phase stationnaire (Samain *et al.*, 1997). Il est admis que pendant la phase exponentielle, les bactéries utilisent leur énergie pour se multiplier, tandis qu'en phase stationnaire, elles l'utilisent pour synthétiser des EPS ou des métabolites secondaires. Il y a toutefois des exceptions à la règle, comme le montre la souche *Alteromonas antarctica* MF₃ qui synthétise ses EPS majoritairement en phase exponentielle (Bozal *et al.*, 1994) ou la souche *Bacillus licheniformis* isolée de cidre français qui présente un rendement maximal de production d'exopolysaccharides pendant la phase exponentielle en milieu MRS quelle que soit la source de carbone ajoutée (trois sucres testés) (Larpin *et al.*, 2002).

Pour les souches bactériennes capables de synthétiser des EPS pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire, il est intéressant de constater que les EPS produites pendant ces deux phases peuvent avoir des compositions complètement différentes. Christensen *et al.* (1985) ont montré en effet qu'une souche marine *Pseudomonas* sp. produit différents exopolysaccharides au cours de ces deux phases de croissance (Christensen *et al.*, 1985). Le premier produit (phase exponentielle) forme un gel dense et contient du glucose, du galactose, de l'acide glucuronique et de l'acide galacturonique. Le second polysaccharide, quant à lui, contient de la N-acétyl-glucosamine, de l'acide 2-keto-3-désoxy-octulosonique et des 6-désoxyhexoses. Il forme une solution aqueuse peu et visqueuse. Plusieurs autres études montrent des résultats similaires ; l'une des causes pourrait être le changement de la composition du milieu au cours de la croissance cellulaire (Decho, 1990).

1.2.3.3. Méthodes d'extraction des EPS

Les objectifs principaux de l'étape d'extraction des EPS sont d'en récupérer la plus grande quantité sans en modifier la composition et sans lyser les cellules bactériennes.

La nature des EPS récoltées dépend fortement de la méthode d'extraction utilisée. Il faut prendre en compte que la composition des EPS est spécifique de chaque souche bactérienne et chaque type d'EPS, c'est-à-dire, protéines, polysaccharides par exemple, et parmi les polysaccharides, les neutres ou les polyanioniques, requiert une méthode d'extraction qui lui est propre dans un but d'optimisation de la quantité obtenue. Un autre problème se rajoute, les EPS peuvent être fermement attachées à la surface des bactéries. Ceci ne facilite pas l'étape d'extraction, d'autant plus que le protocole utilisé doit rester suffisamment doux pour ne pas endommager les cellules et ainsi contaminer les EPS avec des polymères intracellulaires. A ce sujet, il existe plusieurs tests permettant de déterminer leur présence suite à une lyse cellulaire, par exemple le dosage de l'enzyme intracellulaire glucose-6-phosphate déshydrogénase ou le dosage de l'ATP. Ces deux molécules étant intracellulaires, leur présence significative dans les échantillons d'EPS révélerait une contamination par des polymères intracellulaires. L'ADN, quant à lui, ne peut pas être un bon témoin de lyse puisqu'il peut être présent naturellement dans la matrice extracellulaire mais son accumulation dans l'échantillon extrait peut être un bon indice. Des méthodes plus directes, comme l'observation au microscope ou l'utilisation du kit *Live/Dead*, sont aussi de bons moyens de contrôle. Une protection des cellules contre la lyse est parfois recherchée par l'utilisation de formaldéhyde ou de glutaraldéhyde (Azeredo *et al.*, 2003).

Concernant les méthodes d'extraction des EPS, il n'existe donc pas de méthode universelle mais certaines, physiques ou chimiques sont couramment utilisées, comme la centrifugation, la filtration, le chauffage, la sonication ou le traitement avec un agent complexant (EDTA) ou une résine échangeuse d'ions (Dowex[®]). Dans d'autres travaux, l'extraction des EPS se fait par élévation du pH (utilisation de soude avec ou sans ajout de formaldéhyde) ou diminution du pH (utilisation d'acide sulfurique), ou encore par un aldéhyde seul (formaldéhyde ou glutaraldéhyde) ou l'utilisation d'enzymes de dégradation. La combinaison de méthodes physique et chimique est également exploitée (Domínguez *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2010a ; Donot *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2012).

La Figure 14 représente un protocole d'extraction relativement simple utilisé par Nicolaus *et al.* et qui comprend des étapes d'extraction et d'isolement des EPS couramment utilisées (Nicolaus *et al.*, 2002). Le protocole commence par une centrifugation de la culture bactérienne ce qui permet de séparer une bonne partie des EPS des bactéries. On retrouve aussi une étape de précipitation des EPS à l'alcool qui permet de récupérer prioritairement les polysaccharides provoquant une sous-estimation des autres composés des EPS. On remarque la présence d'une étape de dialyse qui a, elle aussi, toute son importance car elle permet

d'éliminer les petites solutés, ce qui est primordial lors de l'isolement d'EPS de souches marines vivant dans des milieux de culture très riches en sels. Ces derniers peuvent en effet perturber les étapes ultérieures de caractérisation des EPS, comme les dosages colorimétriques ou les analyses en chromatographie.

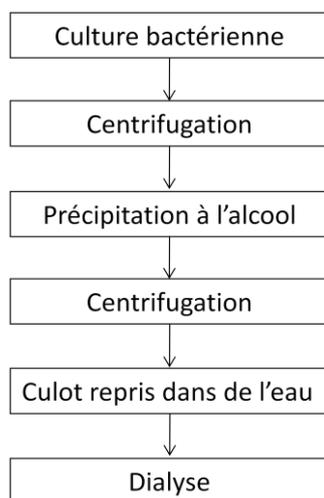


Figure 14. Protocole d'extraction et de purification des EPS à partir d'une culture bactérienne (Nicolaus *et al.*, 2002).

Dans la littérature, parmi les nombreux protocoles d'extraction et d'isolement d'EPS décrits (sans doute un par publication sur le sujet), beaucoup permettent de séparer les EPS selon leurs affinités/liens avec les bactéries, comme les EPS solubles présentes dans le milieu donc non liées, les EPS faiblement liées aux parois bactériennes facilement décrochées par des traitements doux ou les EPS fortement liées aux bactéries nécessitant des méthodes spécifiques d'extraction (Flemming et Wingender, 2010). Ainsi, Liang *et al.* (Figure 15 en exemple) ou Dominguez *et al.*, ont proposé un protocole permettant de séparer ces trois types d'EPS (Domínguez *et al.*, 2010 ; Liang *et al.*, 2010).

Les EPS solubles ou faiblement liées peuvent être isolées par des méthodes physiques simples comme la centrifugation à basse vitesse (classiquement inférieure à 10 000 g). Par contre, il faut généralement utiliser des méthodes chimiques (seules ou combinées à des méthodes physiques) pour pouvoir extraire les EPS fortement liées (Lembre *et al.*, 2012). Il s'agit alors de disperser les constituants de la matrice en rompant les interactions physico-chimiques impliquées dans leur association (Flemming, 2011). Ainsi, les liaisons ioniques peuvent être rompues avec un agent complexant (EDTA) ou une résine échangeuse de cations (Dowex®). Les méthodes d'extraction utilisant ces agents chimiques permettent en effet d'éliminer les cations bivalents (Ca^{2+} et Mg^{2+} essentiellement) impliqués dans les interactions ioniques entre EPS chargées (polysaccharides polyanioniques, protéines).

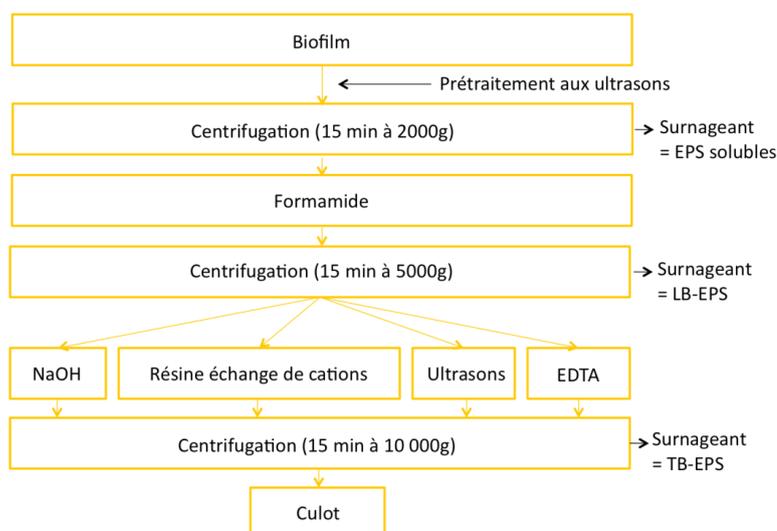


Figure 15. Protocole d'extraction de Liang *et al.* (2010). LB- EPS : EPS faiblement liées aux bactéries. TB-EPS : EPS fortement liées aux bactéries (Nicolaus *et al.*, 2002 ; Liang *et al.*, 2010).

Le Tableau 7 regroupe différentes méthodes utilisées pour extraire les EPS de bactéries. Tous ces exemples illustrent bien leur diversité en lien avec la diversité de composition des EPS et l'absence d'une technique unique efficace garantissant l'obtention d'exopolymères qualitativement non modifiés et quantitativement suffisants. Ces méthodes physiques et chimiques peuvent être utilisées dans un même protocole d'extraction.

	Méthodes	Références
Méthode physique	Sonication	(Liang <i>et al.</i> , 2010 ; Pan <i>et al.</i> , 2010a ; Sun <i>et al.</i> , 2012)
	Sonication/centrifugation	(Ras <i>et al.</i> , 2011)
	Centrifugation haute vitesse	(Nicolaus <i>et al.</i> , 2002 ; Pan <i>et al.</i> , 2010a ; Leathers et Bischoff, 2011)
	Chauffage	(Sun <i>et al.</i> , 2012)
	Résine échangeuse d'ions	(Frolund <i>et al.</i> , 1996 ; Park et Novak, 2007 ; Takahashi <i>et al.</i> , 2009 ; Domínguez <i>et al.</i> , 2010 ; Liang <i>et al.</i> , 2010 ; Pierre <i>et al.</i> , 2010 ; Zuriaga-Agustí <i>et al.</i> , 2013)
Méthode chimique	Traitement alcalin	(Brown et Lester, 1980 ; Liang <i>et al.</i> , 2010) (Pellicer-Nàcher <i>et al.</i> , 2013)
	Formaldéhyde/traitement alcalin	(Sheng <i>et al.</i> , 2005 ; D'Abzac <i>et al.</i> , 2010 ; Andersson <i>et al.</i> , 2011)
	EDTA	(Brown et Lester, 1980 ; Liang <i>et al.</i> , 2010 ; Sun <i>et al.</i> , 2012)
	NaCl	(Aguilera <i>et al.</i> , 2008 ; Lin <i>et al.</i> , 2011)
	Traitement acide	(Sun <i>et al.</i> , 2012 ; Pellicer-Nàcher <i>et al.</i> , 2013)
	Extraction à l'éthanol	(Gong <i>et al.</i> , 2009 ; Lin <i>et al.</i> , 2011)
	Glutaraldéhyde	(Azeredo <i>et al.</i> , 2003 ; Sun <i>et al.</i> , 2012)
	Extraction enzymatique	(Leathers et Côté, 2008 ; Leathers et Bischoff, 2011)
	Tween	(Ras <i>et al.</i> , 2011 ; Caudan <i>et al.</i> , 2012)

Tableau 7. Méthodes d'extraction des EPS (Sheng *et al.*, 2010 ; Lembre *et al.*, 2012).

Un grand nombre d'études a porté sur l'analyse de l'effet de différents protocoles d'extraction, comme le montrent les exemples suivants. Sun *et al.* (2012) ont testé six méthodes d'extraction d'EPS (ultrasons, chauffage, formaldéhyde+NaOH, H₂SO₄, glutaraldéhyde et EDTA) sur la souche *Bacillus megaterium* TF10 (Sun *et al.*, 2012). Pour départager les protocoles, ils ont mesuré la quantité d'EPS obtenues, leur composition, leurs propriétés de floculation comme reflet de leur dispersion et la lyse cellulaire. Le protocole à l'EDTA apparaît être alors le plus adéquat. En 2005, une étude de Sheng *et al.* sur *Rhodopseudomonas acidophila* avait abouti aux mêmes conclusions (Sheng *et al.*, 2005). En revanche, d'autres travaux sur des boues granuleuses ont pu montrer cette fois-ci que le traitement au formaldéhyde+NaOH est le plus efficace en terme de rendement d'extraction avec une composition en EPS toutefois différente selon le mode d'extraction (neuf testés dans cette étude) (D'Abzac *et al.*, 2010). Dominguez *et al.* ont montré quant à eux que l'utilisation d'une résine échangeuse de cations (CER) est la plus appropriée pour extraire le plus d'EPS (Domínguez *et al.*, 2010). Même si généralement les protocoles chimiques permettent de récupérer plus d'EPS que les protocoles physiques, les agents chimiques utilisés peuvent contaminer les échantillons et/ou modifier les propriétés biochimiques des EPS (Comte *et al.*, 2006). Aussi, beaucoup d'études s'intéressent, en plus du rendement d'extraction, à la nature des EPS extraites. Elles montrent que les différents protocoles donnent des résultats plus ou moins variés reflétant la diversité de composition et d'association des EPS dans les échantillons traités (Brown et Lester, 1980 ; Decho, 1990 ; Domínguez *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2010a ; Pierre *et al.*, 2010 ; Sheng *et al.*, 2010 ; Andersson *et al.*, 2011 ; Ras *et al.*, 2011 ; Donot *et al.*, 2012).

Pour conclure, on constate que l'extraction des EPS est généralement longue et fastidieuse. Le rendement et la nature des EPS extraites dépendent pleinement de la méthode utilisée. Afin d'obtenir un échantillon d'EPS suffisant en terme de quantité en vue des étapes ultérieures de caractérisation, ceci tout en préservant l'intégrité des cellules, il est nécessaire de combiner plusieurs techniques physiques et chimiques. Dans le cas d'une extraction ciblant spécifiquement l'isolement d'exopolysaccharides, des étapes ultérieures de digestion enzymatique ou de séparation peuvent être utilisées pour éliminer les protéines, l'ADN et les lipides en présence parmi les EPS.

1.3. Stratégies *antifouling*

1.3.1. Moyens de lutte

1.3.1.1. Anciens moyens

Depuis plusieurs siècles, les hommes mettent au point des revêtements antisalissures ou *antifouling* pour protéger divers supports contre cette forme de colonisation. Ainsi les Phéniciens, Egyptiens et Romains fixaient des plaques de cuivre et de plomb sur la coque de leurs navires pour les protéger de la colonisation par des organismes vivants (Woods Hole Oceanographic Institution et Ships, 1952). Plus tard au début du XX^{ème} siècle se sont développées des peintures à base d'oxyde de cuivre ou de composés organomercuriels, organoarséniés, organohalogénés et organosulfurés. Du fait de leur forte persistance dans l'environnement, le plomb, le mercure et l'arsenic furent interdits dans certains pays (Bennett, 1996). A partir des années 1960, les agents les plus utilisés dans les peintures *antifouling* étaient des biocides très actifs comme les oxydes de cuivre et les composés organostanniques du type tributylétain (TBT). Certes très efficace mais malheureusement très toxique pour l'écosystème marin, le TBT fut progressivement interdit, en France dès 1982 pour être finalement complètement prohibé dans le monde en 2008.

1.3.1.2. Les nouvelles stratégies

De nos jours, le secteur marin amorce une profonde mutation liée à l'évolution de la réglementation (directive européenne 199/13 du 11 mars 1999, décret n° 2001-97 du 1^{er} février 2001 et directives 2002/62 du 9 juillet 2002) ; les peintures *antifouling* doivent obéir à plusieurs exigences dont les suivantes : être peu coûteuses et efficaces tout en contenant un agent actif ayant une vitesse de dégradation rapide, ne s'accumulant pas dans les organismes et non toxique envers l'écosystème. Aujourd'hui, peu de peintures remplissent pleinement toutes les conditions requises. De ce fait, de nouvelles stratégies pour lutter contre le *biofouling* marins sont en cours d'étude. Dans les paragraphes suivants, nous allons aborder les principales stratégies antibiofilm vis-à-vis de surfaces inertes potentiellement immergées dans l'eau de mer. Ces stratégies qui ne sont étudiées pour l'instant qu'à l'échelle du biofilm, pourraient être combinées afin de potentialiser des éventuelles stratégies *antifouling*, plus complexes à mettre en œuvre.

1.3.1.2.1. Les surfaces ou les revêtements antibiofilm/*antifouling*

Les coques de bateaux sont recouvertes de revêtements peinture de diverses compositions avec diverses propriétés. Il existe différentes possibilités dans la conception de ces revêtements. Il peut s'agir de revêtements sans biocide/molécule inhibitrice qui miment le tégument d'animaux marins comme celui des requins ou des dauphins. Ces revêtements sont plus hydrophobes, limitant la fixation de micro-organismes sur la surface ou comme les *Foul Release Coating* (FRC) permettant un relargage aisé du *fouling* après la mise en mouvement du bâtiment. D'autres types de revêtements incluent les surfaces hydrolysables permettant le relargage contrôlé de molécules inhibitrices comme les SPC (*Self Polishing Coatings*) (Lejars *et al.*, 2012).

1.3.1.2.2. Les molécules antibiofilm/*antifouling*

La difficulté est de trouver des solutions (molécules) *antifouling* ne touchant pas à la viabilité des organismes et/ou avec une diffusion limitée dans l'espace de manière à limiter l'impact sur l'environnement. Des molécules greffées/immobilisées aux revêtements pourraient être une stratégie limitant l'action de la molécule au niveau de la surface des coques de bateaux. Les molécules relarguées par les revêtements dans l'environnement ont l'avantage, elles, de ne pas immobiliser la molécule mais elles pourraient perdre rapidement leur activité ou bien s'accumuler dans l'environnement si elles sont très stables. Dans tous les cas, il s'agit de trouver le juste équilibre entre activité/toxicité et stabilité/biodégradation de ces molécules. Certaines de ces molécules pourraient être celles citées ci-dessous.

1.3.1.2.2.1. Les molécules inhibitrices non toxiques ciblant les métabolites secondaires et les réseaux de communication entre organismes

Les stratégies ciblant les systèmes de régulation/communication interbactérienne (comme le *Quorum Sensing*) pourraient permettre de limiter le développement du biofilm primaire et favoriser la déstructuration du biofilm. La littérature est abondante sur la recherche de molécules inhibant le *Quorum Sensing*. Par exemple, la bactérie marine *Halobacillus Salinus* (Gram positif) sécrète des métabolites secondaires qui inhibent le *Quorum Sensing* des bactéries à Gram négatif (Teasdale *et al.*, 2009). De plus l'inhibition du *Quorum Sensing* peut se faire par inhibition compétitive avec des antagonistes synthétiques

ou naturels ou par *Quenching* enzymatique grâce à des acylhomosérine lactonase (Dong *et al.*, 2001). Plusieurs enzymes « *Quenching* » et inhibiteurs ont été mis au jour à partir de cellules procaryotes et eucaryotes (Dong et Zhang, 2005). D'autres méthodes d'inhibition du *Quorum Sensing* existent, comme la méthode « *AHL trapping* » qui correspond à l'inclusion des AHL à l'intérieur de cyclodextrines. Les AHL sont ainsi piégés, ce qui bloque ainsi le système de communication (Kato *et al.*, 2006).

Ces métabolites peuvent aussi provenir d'autres organismes, peu épiphytés tels que les algues, les gorgones...qui ont la possibilité de limiter la colonisation de leur surface (Viano *et al.*, 2009 ; Pénez *et al.*, 2011 ; Othmani *et al.*, 2013). Celles-ci peuvent être produites par les organismes eucaryotes animaux ou végétaux ou par des bactéries vivant à la surface de leurs hôtes. Ces composés ont des actions ciblant certaines étapes du *biofouling*, comme la formation du biofilm, la fixation de larves ou des spores d'algues, etc...(Dobretsov *et al.*, 2006)

1.3.1.2.2.2. Les molécules inhibitrices non toxiques anti-adhésives

Différentes stratégies anti-adhésives sont à l'œuvre notamment celles ciblant par exemple les protéines membranaires de bactéries (adhésines), dont certaines sont situées au niveau de leurs appendices extracellulaires. Des molécules inhibitrices ont déjà été identifiées comme efficaces contre les biofilms, telles que les pellicides ou les curlicides empêchant la formation des pili ou des curli des bactéries, qui sont les premiers appendices venant au contact d'une surface, tout en maintenant la bactérie viable. Ces petites molécules inhibitrices peuvent être des peptidomimétiques (ou des glycomimétiques, certaines adhésines s'associant à une large gamme de glycoprotéines) pouvant donc soit empêcher la formation des appendices bactériens et/ou inhiber l'adhésion des protéines de surfaces et la cohésion du biofilm (Klemm *et al.*, 2010).

Parmi les molécules antiadhésives, nous allons nous intéresser plus particulièrement dans la partie suivante, aux propriétés des polysaccharides de bactéries marines comme potentiels candidats antibiofilm.

1.3.1.3. Les polysaccharides, candidats potentiels ?

1.3.1.3.1. Intérêts des polysaccharides

Les polysaccharides occupent depuis longtemps une place importante pour diverses applications de notre vie quotidienne. Il y a en effet une forte demande en polymères naturels hydrosolubles biodégradables provoquant un engouement pour les polysaccharides d'origine bactérienne en particulier (Kumar *et al.*, 2007). Plusieurs raisons l'expliquent dont les propriétés physico-chimiques uniques de ces polysaccharides comme leur stabilité dans une large gamme de température et de pH. Sous l'effet de ces agents physiques et chimiques, les polysaccharides vont se disperser plus ou moins facilement dans l'eau augmentant la viscosité du milieu et aboutissant parfois à la formation d'un gel.

Beaucoup d'applications exploitent les propriétés rhéologiques des polysaccharides (épaississants, gélifiants, émulsifiants, etc...). Ce marché précédemment monopolisé par les polysaccharides d'origine végétale (pectines, alginates, agar, etc...) a évolué depuis les années 1970 avec l'exploitation croissante de polysaccharides d'origine bactérienne. Ces derniers peuvent avoir des propriétés similaires à ceux produits par des organismes eucaryotes déjà utilisés à des fins commerciales. En voici deux exemples, le premier est la gomme de gellane produite par *Pseudomonas elodea* qui est utilisée comme gélifiant (E418) dans l'agro-alimentaire en substitution de l'agar. Le second exemple est la cellulose synthétisée par plusieurs espèces bactériennes comme *Acetobacter xylinum*. La production de polysaccharides par des bactéries comporte plusieurs avantages. Premièrement, elle est globalement plus simple que celle des polysaccharides d'origine végétale, car il est plus facile de cultiver à grande échelle en conditions contrôlées les micro-organismes (culture en fermenteur) et de récupérer ensuite les polysaccharides (à condition toutefois qu'ils soient exocellulaires). Deuxièmement, les bactéries peuvent être génétiquement modifiées pour accroître leur rendement de production. Troisièmement, presque chaque souche bactérienne produit un polysaccharide spécifique ce qui augmente la diversité des structures et donc des propriétés potentiellement intéressantes des polysaccharides et ainsi les chances de découvrir de nouveaux polymères d'intérêt. Cependant la production de polysaccharides par des bactéries reste chère, ainsi comparé aux polysaccharides d'origine végétale, le nombre de polysaccharides d'origine bactérienne commercialisés est faible. Leur avenir n'est pas de prendre la place des polysaccharides d'origine végétale mais plutôt d'être utilisé pour leurs propriétés originales.

Ci-dessous est proposée une liste non exhaustive des propriétés de polysaccharides d'origine bactérienne, certains étant déjà commercialisés, avec un regard particulier sur les bactéries comme organismes sources.

Propriété rhéologique

La diversité de structure des polysaccharides biosynthétisés est responsable d'une diversité dans leurs comportements rhéologiques. Ces propriétés sont largement exploitées dans les domaines agro-alimentaire et médical pour obtenir des textures et structurations des produits finis très différentes. D'autres domaines sont concernés comme la cosmétique, les peintures ou les teintures.

- **Domaine agro-alimentaire**

Dans ce domaine, quelques polysaccharides bactériens sont commercialisés depuis longtemps. Par exemple, le xanthane produit par *Xanthomonas campestris* est utilisé comme additif alimentaire sous le code d'E415. Comme décrit plus haut, la gomme gellane est également employée comme épaississant sous le nom d'E418. Ils sont tous deux très utilisés pour structurer et stabiliser différents aliments (sauce, glaces, crèmes...).

- **Domaine médical**

Dans ce domaine, des polysaccharides sont utilisés pour l'encapsulation dans le but d'un relargage contrôlé de médicaments ou pour former des nanoparticules utilisées en temps qu'agent de contraste pour l'IRM. Ainsi l'agent AMI-25 commercialisé depuis 1995 sous le nom de d'Endorem[®] contient des particules d'oxyde de fer enrobées dans une couche de dextrane (pour augmenter la furtivité immunitaire). Leur propriété épaississante est aussi exploitée pour la production de plasma et de larmes artificielles (cas du dextrane, synthétisé par *Leuconostoc mesenteroides*).

Propriété médicale

En plus des utilisations citées ci-dessus, les polysaccharides sont exploités pour leurs activités biologiques, par exemple dans la préparation de vaccins afin d'éviter d'utiliser des extraits cellulaires pouvant provoquer des effets secondaires. Il a été aussi montré que certains polysaccharides ont des propriétés biologiques anticoagulantes. Ainsi *Alteromonas infernus*,

isolée d'une cheminée hydrothermale, relargue des exopolysaccharides dans le surnageant de culture (en milieu enrichi en glucose notamment) qui subissent une dépolymérisation et une sulfatation permettant d'obtenir une fraction de bas poids moléculaire ayant un effet anticoagulant. Ces molécules sont moins actives que l'héparine non fractionnée et que l'héparine de bas poids moléculaire. Ceci s'avère être un avantage car elles permettraient de diminuer le risque d'hémorragie lors de leur utilisation en milieu médical (Colliec Jouault *et al.*, 2001).

D'autres polysaccharides ont montré une action cicatrisante au niveau de l'os comme celui synthétisé par l'espèce *Vibrio diabolicus*, isolé de l'annélide *Alvinella pompejana* vivant près des cheminées hydrothermales dans l'océan Pacifique (Tableau 4) (Zanchetta *et al.*, 2003).

Des études ont montré que des polysaccharides ont, quant à eux, des propriétés antivirales comme celui de la souche *Pseudomonas* sp. WAK-1, isolée de l'algue brune *Undaria pinnatifida*, qui synthétise un polysaccharide sulfaté actif contre le virus de l'herpès HSV-1 (Matsuda *et al.*, 1999).

Enfin certains polysaccharides ont montré des pouvoirs de stimulation du système immunitaire ou de suppression de tumeurs cancéreuses (Sutherland, 2001b). La souche thermotolérante de *Bacillus licheniformis* en est un bon exemple ; isolée des sources chaudes peu profondes d'une île volcanique italienne, elle synthétise un polysaccharide EPS1 ayant une activité antivirale et immunomodulatrice (Sutherland, 2001b ; Arena *et al.*, 2006 ; Satpute *et al.*, 2010). Enfin, Matsuda *et al.* (2003) ont étudié la capacité cytotoxique contre des cellules cancéreuses, de polysaccharides synthétisés par la souche marine *Pseudomonas* sp. WAK-1 (Matsuda *et al.*, 2003).

Agents réducteurs de traînées hydrodynamiques

Dans le domaine maritime, la recherche d'agents réducteurs de traînées hydrodynamiques est un enjeu important car ils permettent notamment de réduire les pertes de vitesse dues à la résistance de la coque des navires dans l'eau. Ainsi plusieurs études ont permis d'identifier des polysaccharides bactériens capables de réduire les traînées hydrodynamiques. Rares exemples, Bernadsky *et al.* ont isolé des souches bactériennes de la famille *Micrococcaceae* et du genre *Pseudomonas* de la peau d'un poisson (*Fistularia commersonii*), qui ont la capacité de synthétiser des exopolymères (14-24 % de protéines et 38-75 % de polysaccharides) réduisant les traînées hydrodynamiques (Bernadsky et

Rosenberg, 1992). Sar et Rosenberg ont isolé de la peau de barracuda plusieurs souches bactériennes dont une nommée NS-31 qui produit un polymère PS-6 capable de diminuer les frictions jusqu'à 22 %. Ce polymère contient des glucides (Sar et Rosenberg, 1989).

Tensioactifs et émulsifiants

Les micro-organismes synthétisent dans certains cas des tensioactifs et émulsifiants dans le milieu de culture pour faciliter la solubilisation de composés hydrophobes et les rendre accessibles sous forme de nutriments (Olivera *et al.*, 2003 ; Satpute *et al.*, 2010). De plus, beaucoup de tensioactifs et d'émulsifiants ont été isolés de micro-organismes marins vivant dans des sites contaminés par du pétrole ou de l'essence, leur rôle étant de protéger les micro-organismes contre ces pollutions. Ces molécules peuvent être excrétées dans le milieu ou rester à la surface des bactéries (Satpute *et al.*, 2010). Les propriétés émulsifiantes des exopolymères EPS 71a produits par la souche bactérienne marine *Enterobacter cloacae* ont été étudiées par Iyer *et al.* (Iyer *et al.*, 2006). Ces polymères ont une action émulsifiante comparable ou même supérieure à celle de polysaccharides commercialisés comme le xanthane. La capacité d'EPS 71a à former une émulsion stable peut être attribuée à la présence et à la nature de protéines (EPS 71a contient 45 % de sucres, 18,75 % de protéines, 7 % de sulfates et 9,23 % d'acides uroniques). Autre exemple, la souche *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 isolée de la Méditerranée produit un liposaccharide polyanionique extracellulaire, l'émulsane, surfactant exploité commercialement dans le domaine de la cosmétique pour la préparation de crèmes. Cette molécule polyphile est un polymère de trisaccharides lié à des acides gras de façon covalente (Satpute *et al.*, 2010).

Enfin comme dernier exemple, Kavita *et al.* ont décrit en 2011 un polysaccharide synthétisé par la bactérie marine *Vibrio parahaemolyticus* qui s'avère avoir une bonne activité émulsifiante (Kavita *et al.*, 2011).

1.3.1.3.2. Effets antibactériens de polysaccharides

Les bactéries sont une source potentiellement très intéressante de composés *antifouling*. Mais pour le moment, une faible proportion de bactéries ont été criblées et peu de polysaccharides actifs ont été isolés et identifiés (Dobretsov *et al.*, 2006 ; Qian *et al.*, 2007). Les paragraphes suivants traitent des différents types de composés et plus particulièrement de polysaccharides actuellement découverts avec une activité antibactérienne reconnue.

Si l'on compare avec les bactéries non marines, peu d'études ont été menées sur les bactéries marines capables de synthétiser des antibiotiques et encore moins sur des polysaccharides marins antibactériens. Dans l'environnement naturel, les bactéries sont en permanence en compétition pour survivre. De ce point de vue, la capacité d'inhiber la formation de biofilm par d'autres souches bactériennes est très utilisée pour évincer les concurrentes. Ce n'est qu'en 1966 qu'a été isolé pour la première fois un antibiotique synthétisé par une bactérie marine du genre *Alteromonas* sp. prélevée de la plante marine *Thalassia* sp. (Fenical, 1993). Depuis, d'autres molécules ont été mises à jour comme le montrent les exemples suivants.

En 2011 Waturangi *et al.* ont isolé, de sédiments marins, trois souches de bactéries (*Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Exiguobacterium* sp. et *Vibrio gallicus*) exprimant une activité antibiofilm sur l'espèce *V. cholerae* (Waturangi *et al.*, 2011). Dans la même année, Bernbom *et al.* ont isolé des côtes danoises, 110 souches de bactéries marines ayant une activité anti-*Vibrio* (Bernbom *et al.*, 2011). Enfin sur 104 souches bactériennes isolées du port de Sydney, 10 présentent une activité antimicrobienne (Wilson *et al.*, 2010 ; Wilson *et al.*, 2011).

Dans l'ensemble, les composés mis à jour sont rarement des polysaccharides. Parmi ces derniers, on trouve un polysaccharide synthétisé par *E. coli* qui inhibe la formation des biofilms d'une large gamme de bactéries à Gram positif et négatif. Il induit un changement physico-chimique de la surface empêchant l'adhésion des bactéries. De plus, il réduit l'agrégation entre bactéries et inhibe les interactions entre cellules (Valle *et al.*, 2006).

Peu après, l'année 2011 fut propice à la découverte de polysaccharides actifs puisque Kanmani *et al.* ont extrait un nouveau polysaccharide de la souche marine *Streptococcus phocae* contenant de l'arabinose, du fructose et du galactose (Kanmani *et al.*, 2011). Son poids moléculaire a été estimé à 280 kDa et l'équipe a mis en évidence son activité antibiofilm (testé sur *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*). Le polysaccharide A101, isolé dans la même année, du surnageant de culture de la souche bactérienne *Vibrio* sp. QY101, inhibe la production de biofilm et perturbe les biofilms déjà établis de bactéries à Gram positif et négatif (Jiang *et al.*, 2011). Sa particularité est de n'avoir aucun effet sur la croissance bactérienne ; il n'empêche que les interactions entre bactérie/surface et interbactériennes. Son poids moléculaire est de 546 kDa et il contient de l'acide galacturonique, de l'acide glucuronique, du rhamnose et de la glucosamine. Toujours en 2011, Sayern *et al.* ont isolé un exopolysaccharide produit par *Bacillus licheniformis* (vivant en association avec *Spongia*

officinalis) ayant une activité antibiofilm sur des bactéries pathogènes et non pathogènes sans avoir d'effet cytotoxique (Sayem *et al.*, 2011).

La possibilité récente d'explorer des milieux inconnus et difficiles d'accès (sources d'eau chaude, fumeurs noirs, iceberg...) a permis de découvrir de nouvelles espèces bactériennes produisant des molécules extrêmement intéressantes. C'est depuis les années 1970 que les organismes extrêmophiles sont devenus très prisés pour leurs molécules originales. Ces habitats peu explorés ouvrent de nouvelles voies de découvertes entre autres dans les EPS qui apparaissent être fort utiles pour la survie en milieux extrêmes (rôle de protection) (Nichols *et al.*, 2005b ; Poli *et al.*, 2010).

Parmi les EPS, certains polysaccharides isolés ont une action *antifouling* reconnue comme le montre l'exemple suivant. Guezennec *et al.* en 2012 ont isolé des exopolysaccharides de bactéries marines issues de différents écosystèmes marins extrêmes (*Alteromonas* sp., *Pseudomonas* sp. et *Vibrio* sp.). Ces polymères sont capables d'inhiber les premières étapes du *biofouling* sans être cytotoxiques (Guezennec *et al.*, 2012).

1.3.1.3.3. Effets sur le macro-*fouling* de polysaccharides

La production de molécules antilarvaires est assez répandue dans le monde marin (Wieczorek et Todd, 1998). Maki *et al.* ont montré que 8 souches bactériennes (*Pseudomonas atlantica*, *Vibrio fluvialis*, *V. alginolyticus*, *P. perfectomarina*, *V. campbelli*, *V. vulnificus*, *A. macleodii* et *Halomonas marina*) inhibent la fixation des larves de balanes *Balanus amphitrite* (Maki *et al.*, 1988).

En 2004, une équipe de chercheurs a isolé un polysaccharide de plus de 100 kDa capable d'inhiber la fixation de *H. elegans* et de *Bugula neritina*. Celui-ci est synthétisé par deux souches de bactéries marines isolées de coraux, l'une du genre *Vibrio* et l'autre de la classe des α -Protéobacteriaes (Dobretsov et Qian, 2004).

Enfin, des molécules ayant une action ciblant cette fois la fixation d'algues unicellulaires ont été découvertes. Par exemple, une étude conduite en 2005 sur des EPS produites par une bactérie du genre *Pseudoalteromonas* sp., et libérées dans le milieu de culture, montre qu'elles permettent de diminuer la capacité des diatomées *Amphora coffeaeformis* et *Navicula* sp. à se fixer et à se mouvoir (Wigglesworth-Cooksey et Cooksey, 2005). Cette activité serait due à la présence dans le milieu d'une lectine capable de lier les polymères extracellulaires des diatomées impliqués dans leur adhésion et leur mobilité.

1.3.2. Intérêts des bactéries du genre *Pseudoalteromonas*

Le genre *Pseudoalteromonas* fait partie du faible nombre de groupes phylogénétiques de bactéries marines étudiés pour leurs activités *antifouling*. Celui-ci est très représenté dans l'environnement marin, comme le montrent plusieurs études ayant isolé des bactéries du genre *Pseudoalteromonas* d'eau de mer, sédiments et banquise (Skovhus *et al.*, 2007). De plus ce groupe contient, d'après la littérature, une forte proportion de bactéries productrices de molécules actives. Skovhus *et al.* ont regroupé, dans le genre *Pseudoalteromonas*, les bactéries ayant une activité *antifouling* au sein du sous-groupe *antifouling* (Skovhus *et al.*, 2007).

Ce genre a été décrit par Gauthier *et al.* en 1995 (Gauthier *et al.*, 1995). Les membres de ce groupe faisaient partie, avant sa création, du genre *Alteromonas*, qui fut taxonomiquement réorganisé en deux groupes distincts : *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas*. Les caractéristiques du genre *Pseudoalteromonas* ont été inventoriées dans la 2^{ème} édition du *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Globalement les bactéries regroupées dans ce groupe sont à Gram négatif, ont une forme de bâtonnet, sont strictement aérobies, ont un métabolisme chimio-hétérotrophe et ont besoin de Na⁺ pour croître. Il est intéressant de noter que le genre *Pseudoalteromonas* est divisé en deux grands groupes, l'un contenant des espèces non pigmentées et l'autre n'incluant que des espèces pigmentées.

Beaucoup d'espèces de *Pseudoalteromonas* produisent des substances à activité *antifouling* comme le confirme le Tableau 8 (Bowman, 2007). On peut remarquer que pour le moment, peu de polysaccharides ont été isolés de bactéries du genre *Pseudoalteromonas*.

Les espèces *P. tunicata*, *P. aurantia*, *P. rubra* et *P. luteoviolacea* ont été particulièrement étudiées. Celles-ci ont été isolées de tuniciers, d'éponges ou d'algues et ont toutes une activité *antifouling* (Gauthier et Flatau, 1976 ; Gauthier et Breittmayer, 1979 ; Holmström *et al.*, 1998 ; Egan *et al.*, 2001 ; Egan *et al.*, 2002). La souche *P. tunicata* synthétise plusieurs molécules actives, comme une protéine appelée AlpP qui a une activité antibactérienne. On retrouve aussi un composé thermolabile actif contre les algues, un pigment jaune actif contre les champignons et enfin des petites molécules actives contre les protistes et les diatomées (James *et al.*, 1996 ; Egan *et al.*, 2001 ; Franks *et al.*, 2005). Les souches *P. aurantia*, *P. rubra* et *P. luteoviolacea* produisent quant à elles des molécules de hauts poids moléculaires inhibant la respiration bactérienne. Il est intéressant de constater que *P. rubra* produit une molécule polyanionique qui réagit à l'antrone et qui a une activité antimicrobienne. Cette macromolécule pourrait être un polysaccharide (Gauthier, 1976b ;

Gauthier, 1976a). L'espèce *P. citrea* apparaît elle aussi avoir une action antibactérienne en synthétisant une molécule polyanionique (Gauthier, 1977).

Bien d'autres découvertes ont été faites sur les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, en voici une liste non exhaustive.

Holmström en 2002 a isolé dix espèces du genre *Pseudoalteromonas* et testé leurs activités sur des larves d'invertébrés, des spores d'algues, des bactéries et des champignons. Une grande partie des espèces testées produisent des composés actifs (par exemple *P. tunicata*, *P. luteoviolacea* et *P. rubra*) ; seules 2 espèces n'ont aucune activité (*P. nigrifaciens* et *P. haloplanktis*) (Holmström *et al.*, 2002). En 2011, Klein *et al.* ont isolé deux bactéries marines, *Pseudoalteromonas* sp. D41 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, qui se sont révélées être très intéressantes pour leurs capacités d'inhibition de la formation de biofilm d'espèces bactériennes (Klein *et al.*, 2011). En 2010, Dheilly *et al.* ont mis en évidence l'activité antibactérienne du surnageant de culture de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (Dheilly *et al.*, 2010), cette souche ayant été isolée d'une surface de verre immergée 6 h dans de l'eau de mer du golf du Morbihan (Grasland *et al.*, 2003). Des chercheurs ont montré que *Pseudoalteromonas haloplanktis*, isolé d'une éclosure de pétoncles, a une activité antibactérienne (Hayashida-Soiza *et al.*, 2008). Enfin comme dernier exemple, Lemos en 1985 étudia l'activité antibactérienne de trente huit bactéries isolées d'algues vertes ou brunes, il est intéressant de noter que toutes appartenaient au genre *Pseudoalteromonas* (Lemos *et al.*, 1985). Il apparaît clairement que le genre *Pseudoalteromonas* regroupe un grand nombre d'espèces productrices de composés actifs (antilarvaire, antibactérien, antialgue ou antifongique).

Dans ce genre, l'espèce *P. ulvae* paraît être prometteuse ; plusieurs publications décrivent le potentiel *antifouling* de cette espèce. Egan *et al.* ont découvert la capacité de deux souches de cette espèce, UL12^T et UL13 isolées de la surface de l'algue marine *Ulva lactuca*, à inhiber la fixation des larves de *Balanus amphitrite* et à inhiber la germination des spores d'algues vertes (*U. lactuca*) et d'algues rouges (*polysiphonia*) (Egan *et al.*, 2000). En 2011, une nouvelle étude particulièrement intéressante montre que cette souche est capable d'empêcher l'adhésion de la souche *Pseudoalteromonas* sp. S91 sur une surface en acier (Bernbom *et al.*, 2011). Enfin en 2007, Skovhus a étudié la distribution, l'abondance et la diversité du genre *Pseudoalteromonas* dans des échantillons marins. Il détermina que l'espèce *P. ulvae* fait partie du sous-groupe *antifouling* (Skovhus *et al.*, 2007).

Espèce	Pigment	Source	Composé bioactif	Activités
<i>P. agarivorans</i>	-	Eau de mer et ascidies	-	Dégradation de polysaccharides d'algues
<i>P. aurantia</i>	+ (pigment jaune)	Eau de mer et surface de <i>Ulva lactuca</i>	Composé inconnu	Activité antimicrobienne et inhibition de la fixation de larves d'invertébrés
<i>P. citrea</i>	+ (pigment jaune et mélanine)	Eau de mer, ascidies, éponges et moules	Composé inconnu	Inhibition de la fixation de larves d'invertébrés et cytotoxicité contre les oursins. Dégradation des polysaccharides d'algues
<i>P. denitrificans</i>	+ (pigment rouge)	Eau de mer	Molécule de haut poids moléculaire polyanionique et autre composé	Activité antitumorale, inhibition de la prolifération de lymphocytes, activité antipaludisme et stimulation de la fixation des oursins <i>Heliocidaris erythrogramma</i>
<i>P. issachenkonii</i>	-	Algue marine	Isatine et composé brun-rouge inconnu	Activité antifongique et activité hémolytique
<i>P. luteoviolacea</i>	+ (pigments violet et jaune)	Eau de mer et algue marine	Protéine, molécule bromée	Activité antibactérienne, inhibition de la fixation des spores d'algue, cytotoxicité contre les oursins <i>Strongylocentrotus intermedius</i> et stimulation de la fixation de <i>Heliocidaris erythrogramma</i>
<i>P. rubra</i>	+ (pigment rouge)	Eau de mer	Molécule de haut poids moléculaire polyanionique et autre composé	Activité antimicrobienne, activité antitumorale, inhibition de la prolifération des lymphocytes et activité antipaludisme
<i>P. ruthenica</i>	+ (pigment orange pâle)	Fruits de mer	Composé inconnu	Activité antimicrobienne
<i>P. tetraodonis</i>	-	Poisson globe	Tétradotoxine	Neurotoxine
<i>P. tunicata</i>	+ (pigments vert, violet et jaune)	Algue marine et tuniciers	Pigment violet, protéine AlpP et autres composés	Activité antifongique, antialgue, antimicrobienne, inhibition de la fixation de larves d'invertébrés et des spores d'algue.
<i>P. ulvae</i>	+ (pigments violet ou vert)	Algue marine	Substance inconnue	Inhibition de la fixation de larves d'invertébrés, la germination et la fixation de spores d'algue et activité hémolytique

Tableau 8. Composés bioactifs isolés de certaines espèces du genre *Pseudoalteromonas* (Bowman, 2007).

1.4. Bactéries étudiées dans le cadre de la thèse

Treize souches ont été isolées de la Méditerranée dans la rade de Toulon (Tableau 9) à partir de plaques de polystyrène, de silicone ou de silicone fluoré immergées dans l'eau de mer. La première campagne s'est déroulée en février 2008 au lieu dit Le Mourillon et s'inscrit dans le cadre de la thèse soutenue par Mercedes Camps en 2011 (Camps, 2011). Les plaques ont été immergées 6 heures puis les bactéries ayant adhéré ont été récupérées. Dix souches ont ainsi été isolées mais deux souches n'ont pas pu être cultivées *a posteriori* (TC2 et TC3). Une partie de ces souches a été partiellement identifiée et caractérisée (Camps, 2011). La deuxième campagne d'isolement de bactéries a débuté en juin 2010 à partir de plaques en silicone fluoré immergées 24 heures dans le port militaire de Toulon. Cinq souches ont pu ainsi être isolées (TC11 à TC15). Toutes les plaques récupérées lors de ces 2 campagnes ont été immergées à 1 m de profondeur.

Souches	Date d'immersion	Lieux d'immersion	Temps d'immersion (h)	Type de surface
TC1	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Polystyrène
TC4	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Polystyrène
TC5	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13
TC6	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13
TC7	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13
TC8	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13
TC9	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13
TC10	13/02/2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13
TC11	10/06/2010	Port militaire de Toulon	24	Silicone fluoré ELP08/55554/13
TC12	10/06/2010	Port militaire de Toulon	24	Silicone fluoré ELP08/55554/13
TC13	10/06/2010	Port militaire de Toulon	24	Silicone fluoré ELP08/55554/13
TC14	10/06/2010	Port militaire de Toulon	24	Silicone fluoré ELP08/55554/13
TC15	10/06/2010	Port militaire de Toulon	24	Silicone fluoré ELP08/55554/1

Tableau 9. Conditions d'isolement des souches bactériennes étudiées.

C'est dans ce contexte que j'ai démarré mon travail de thèse. Selon la littérature, on peut constater la grande diversité des espèces bactériennes colonisant, dès les premières heures, les surfaces immergées en milieu marin. Il est intéressant de constater que les bactéries des biofilms marins produisent fréquemment des composés actifs et originaux,

notamment les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* qui synthétisent, comme le montrent de nombreuses études, des inhibiteurs actifs contre d'autres bactéries et contre des macro-organismes.

Dans ce cadre, a été entrepris un travail pluridisciplinaire dont les objectifs étaient les suivants :

Dans un premiers temps, les présents travaux ont visé à identifier et caractériser les souches bactériennes isolées de la Méditerranée permettant ainsi d'accroître nos connaissances sur les bactéries marines méditerranéennes. Pour ce faire, une étude taxonomique et une caractérisation physiologique, biochimique et physico-chimique de chaque souche ont été menées.

Dans un deuxième temps, l'objectif fut de caractériser les EPS produites par certaines de ces souches bactériennes. Ceci sous-entend la mise au point d'un protocole de production de biofilm applicable à l'ensemble des souches. Un protocole permettant d'extraire les EPS des biofilms formés, sans lyser les bactéries, a dû lui aussi être mis au point. Les résultats des analyses effectuées donnent un aperçu de la composition des EPS synthétisées par les bactéries isolées de la Méditerranée.

Enfin, dans un troisième temps, après plusieurs étapes de sélection des souches, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 fut choisie pour une étude approfondie de ses EPS et plus particulièrement de la fraction polysaccharidique. Dans le cadre de la recherche de composés *antifouling*, l'activité des EPS de cette souche a été évaluée sur la formation de biofilm d'autres espèces de bactéries marines. Cette étude fait écho à celles déjà publiées sur les capacités *antifouling* de cette espèce comme l'étude menée par Bernbom *et al.* en 2001 montrant qu'elle est capable d'empêcher l'adhésion de la souche *Pseudoalteromonas* sp. S91 sur une surface en acier. La particularité de *P. ulvae* est de prévenir l'adhésion sans avoir un effet biocide contrairement à l'espèce *P. piscicida*. Ces deux espèces utiliseraient donc des mécanismes différents. Les auteurs proposent comme hypothèse que les composés actifs sont d'origine exopolysaccharidique (Bernbom *et al.*, 2011).

2. Matériels & méthodes

2.1. Culture des souches bactériennes marines

2.1.1. Souches bactériennes

Plusieurs souches bactériennes d'origine marine ont été utilisées lors de cette étude. Excepté la souche 4M6 fournie par le laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines de Lorient (LBCM), toutes proviennent de la collection du laboratoire MAPIEM. Le code d'appellation de ces souches contient les lettres TC pour « *Toulon Collection* » et un numéro allant de 1 à 15 (Tableau 9 dans la partie 1.4.).

2.1.2. Milieux de culture

Quatre milieux spécifiques aux bactéries marines ont pu être utilisés dans le cadre de la thèse.

Le milieu *Marine Agar* (MA), qui est un milieu solide riche, a été utilisé pour les isolements par quadrant à partir des cryotubes. Le milieu utilisé, pour les pré-cultures et les cultures en milieu liquide, a été un milieu complexe le *Vaätanen Nine Salt Solution* (VNSS). Le milieu utilisé pour la production d'EPS a été le *Marine Broth* (MB) qui est un milieu liquide riche. Un quatrième milieu, l'*Artificial Sea Water* (ASW) a été utilisé pour maintenir les bactéries vivantes tout en empêchant leur croissance. L'ASW, que l'on nomme aussi *Sea Salt* (SS), est un milieu minimum.

- *Vaätanen Nine Salt Solution* (VNSS)

Ce milieu est le seul à être préparé entièrement au laboratoire. La composition de ce milieu est décrite dans le Tableau 10. Avant utilisation, il a été stérilisé à l'autoclave (20 min à 121°C, 1 bar). Après stérilisation son pH était de 7,6. Ce milieu est spécifique aux bactéries marines. L'ensemble des pré-cultures et cultures a été réalisé dans ce milieu, sauf pour les souches TC1 et TC6 (pour lesquelles nous utilisons le milieu MB).

Produit	Concentration (g/L)
NaCl	17,600
Na ₂ SO ₄	1,470
NaHCO ₃	0,008
KCl	0,250
KBr	0,040
MgCl ₂ .6 H ₂ O	1,870
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,410
SrCl ₂ .6 H ₂ O	0,010
H ₃ BO ₃	0,010
Peptone	1,000
Extrait de levure	0,500
Glucose	0,500
Amidon soluble	0,500
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,010
Na ₂ HPO ₄	0,010

Tableau 10. Composition chimique du milieu de culture VNSS.

- *Marine Broth* (MB) et *Marine Agar* (MA)

Le MB (Becton, Dickson and company, Le Pont de Claix, France) est aussi un milieu spécifique aux bactéries marines. Sa préparation est délicate car après autoclavage le mélange reste trouble et un important dépôt se forme. Il faut le filtrer sur 0,45 µm (PVDF de marque Millipore, Molsheim, France) puis sur 0,2 µm (PVDF, Millipore) avant utilisation, pour obtenir une solution limpide. Son pH est de 7,6. Cette méthode de préparation modifie certes la composition du milieu et nous empêche de la connaître exactement au démarrage des cultures mais elle reste constante.

Le MA (Becton, Dickson and company) est un milieu gélosé spécifique aux bactéries marines. Sa composition chimique est identique à celle du MB excepté la concentration de MgCl₂ qui est plus importante (8,8 g/L au lieu de 5,9 g/L) et l'ajout d'agar (15 g/L) pour rendre le milieu solide. Ce milieu a été stérilisé à l'autoclave puis coulé dans des boîtes de Petri. La composition du MB est détaillée dans le Tableau 11.

Produit	Concentration (g/L)
Peptone	5,0000
Extrait de levure	1,0000
NaCl	19,4500
Na ₂ SO ₄	3,2400
Na ₂ CO ₃	0,1600
KCl	0,5500
KBr	0,0800
MgCl ₂	5,9000
CaCl ₂	1,8000
SrCl ₂	0,0340
H ₃ BO ₃	0,0220
C ₆ H ₅ FeO ₇	0,1000
NaF	0,0024
(NH ₄)NO ₃	0,0016
Na ₂ HPO ₄	0,0080
Na ₂ SiO ₃	0,0040

Tableau 11. Composition chimique du milieu de culture MB.

- *Artificial Sea Water* (ASW)

L'ASW correspond à la solution aqueuse de *Sea Salt* (Sigma Aldrich, St Quentin, France) à une concentration de 36 g/L. Après stérilisation, le milieu a été filtré (0,45 µm, PVDF, Millipore) pour le rendre complètement limpide. Ce milieu contient les éléments décrits dans le Tableau 12.

Produit	Concentration (mg/L)
Cl	19290,00
Na	10780,00
SO ₄	2660,00
Mg	1320,00
K	420,00
Ca	400,00
HCO ₃	200,00
Br	56,00
Sr	8,80
B	5,60
F	1,00
I	0,24
Li	0,30
Élément trace	0,50

Tableau 12. Composition chimique du *Sea Salt* (Sigma Aldrich).

2.1.3. Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes ont été conservées au laboratoire à - 80°C dans des cryotubes contenant 40 % de liquide cryoprotecteur (glycérol).

2.1.4. Conditions de culture

A partir des cryotubes stockés à -80 °C, des étalements sur milieu MA dans des boîtes de Petri ont été effectués. Chaque culture sur milieu gélosé a été conservée jusqu'à 2 semaines à 20°C. Les précultures ont été réalisées dans des flacons en verre de 30 mL à partir d'une colonie prélevée sur boîte avec une öse stérile et resuspendue dans 5 mL de VNSS. Elles ont été incubées toute la nuit à 20°C sous agitation (120 rpm) pour permettre, le lendemain, le démarrage des cultures. Pour cela, des milieux (10 mL de VNSS en flacons de 60 mL) ont été inoculés de manière à obtenir une absorbance initiale à 600 nm de 0,1. Les cultures ont alors été incubées à 20°C sous agitation (120 rpm) jusqu'à atteindre la phase stationnaire. Toutes les précultures et cultures mentionnées ci-dessous ont été préparées selon ces conditions, excepté pour les parties 2.1 et 3.1.

2.2. Caractérisation des souches bactériennes

2.2.1. Courbes de croissance et dénombrements des bactéries

Pour chaque souche marine de la collection du laboratoire MAPIEM, la croissance bactérienne était suivie au cours du temps par mesure de l'absorbance à 600 nm et par dénombrement des bactéries (UFC/mL) (excepté les souches TC1 et TC6 qui forment, en milieu liquide, d'importants agrégats difficile à disloquer).

Pour cette expérience, les cultures ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu VNSS. Les mesures ont été faites toutes les heures. Ainsi, 1 mL de culture a été collecté et mélangé à une solution de Tween[®] 80 à 0,001 % (v/v) et de pyrophosphate de sodium à 0,2 % (v/v) de façon à disloquer les agrégats bactériens, permettant de mesurer la turbidité et de recenser les UFC. Plusieurs dilutions en cascade au 1/10^{ème} ont été faites dans une microplaque (Figure 16) puis 10 µL de chacune de ces dilutions ont été déposés sur milieu gélosé MA en boîtes de Petri. Après une nuit d'incubation à 20°C, les colonies (UFC) ont été comptées. Ces mesures ont été répétées trois fois avec des cultures indépendantes.

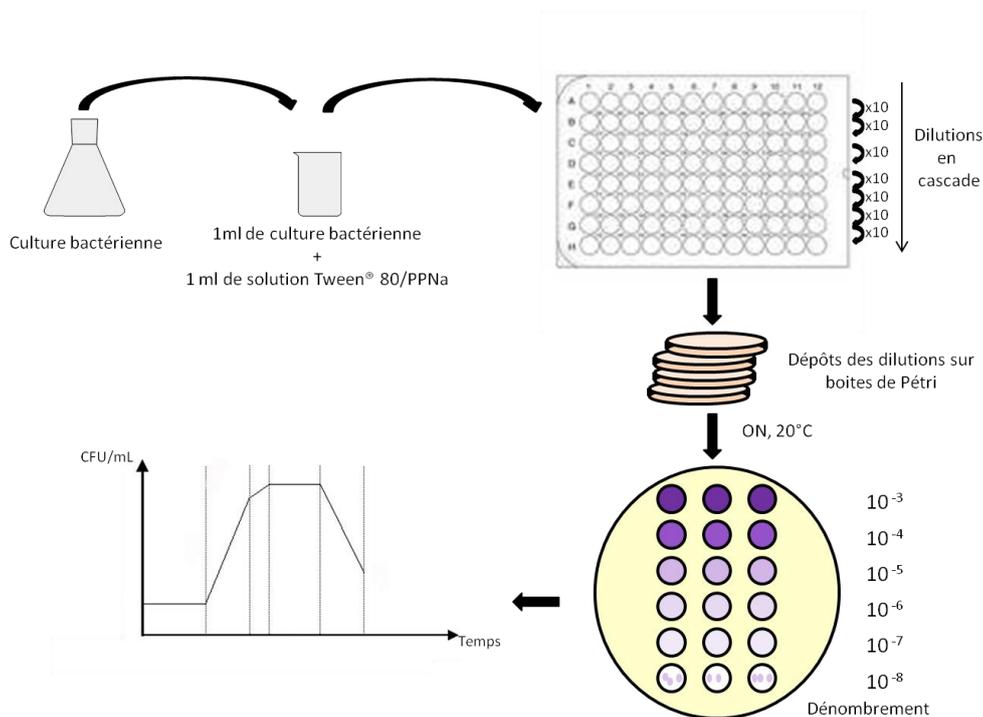


Figure 16. Etapes effectuées pour le dénombrement bactérien.

2.2.2. Etats frais

A partir d'une culture en début de phase stationnaire, un prélèvement de 10 μ L de la suspension bactérienne a été déposé entre lame et lamelle puis directement observé au microscope optique avec un grossissement de 400.

2.2.3. Taxonomie

2.2.3.1. PCR

La première étape consiste à extraire l'ADN génomique de chaque souche bactérienne marine de la souchothèque de Toulon. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit *DNeasy Blood and Tissue* de QIAGEN (Courtaboeuf, France). Dans une deuxième étape, il s'agissait d'amplifier les gènes de l'ARNr 16S en utilisant 3 types d'amorces, soit des amorces universelles, soit des amorces spécifiques du genre *Shewanella* ou encore des amorces spécifiques du genre *Pseudoalteromonas*. La liste et les positions des amorces sur la séquence du gène de l'ARNr 16S sont présentées respectivement dans le Tableau 13 et la Figure 17. Les gènes de l'ARNr 16S des souches bactériennes ont été amplifiés par PCR en utilisant une solution de réaction contenant 1 μ M de chaque amorce, 10-60 ng d'échantillon d'ADN, 1,25 U de *HotStar HiFidelity DNA polymerase* (QIAGEN) et 5 μ L de tampon de la polymérase ; le volume final étant de 25 μ L pour chaque tube PCR. Une réaction sans ADN a servi de

contrôle négatif. Les réactions de PCR ont été réalisées avec un thermocycleur Thermal Cycler TC 5000 (TECHNE, Roissy, France) en suivant les conditions suivantes : dénaturation initiale de 5 min à 95°C puis 35 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 56°C et 1 min à 72°C. Le cycle se terminant avec une extension finale de 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont ensuite été analysés via une électrophorèse en gel d'agarose. Ce gel contiennait 1 % (m/v) d'agarose et 0,5 µg/mL de BET dans du tampon TAE 1X (pH 8). Dans chaque puits, 8 µL d'échantillon et 2 µL de bleu de bromophénol ont été déposés. Un marqueur de taille (Gel pilot 1 kb Plus Ladder DNA molecular Weight Markers de QIAGEN) a également été déposé dans l'un des puits pour estimer la taille des fragments obtenus. La migration du gel a été faite à 100 V pendant 1 h. La révélation des gels s'est effectuée sous lampe UV (Avegene, Slite 140). Enfin, les produits de PCR ont été séquencés par l'entreprise GATC Biotech (Constance, Allemagne).

Amorce	Sequence (5'→3')	Référence
Eub341F	CCT-ACG-GGA-GGC-AGC-AG	(Skovhus <i>et al.</i> , 2007)
Univ907RC	CCG-TCA-ATT-CCT-TTG-AGT-TT	(Skovhus <i>et al.</i> , 2007)
Psalt815R	CCA-GCT-TCT-AGT-AGA-CAT-CGT-T	(Skovhus <i>et al.</i> , 2007)
She211F	CGC-GAT-TGG-ATG-AAC-CTA-G	(Todorova et Costello, 2006)
She1259R	GGC-TTT-GCA-ACC-CTC-TGT-A	(Todorova et Costello, 2006)
fd1	AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
rP2	ACG-GCT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
800R	CTA-CCA-GGG-TAT-CTA-AT	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
800F	ATT-AGA-TAC-CCT-GGT-AG	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
1050R	CAC-GAG-CTG-ACG-ACA	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)
536F	CAG-CAG-CCG-CGG-TAA-TAC	(Thomas <i>et al.</i> , 2007)

Tableau 13. Noms, séquences et références des amorces utilisées pour l'identification des souches bactériennes.

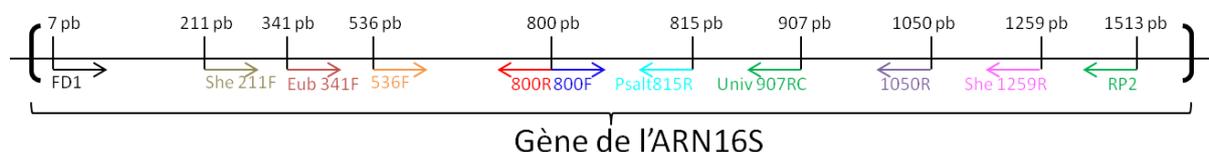


Figure 17. Emplacement des amorces utilisées sur le gène de l'ARNr 16S.

2.2.3.2. Hybridation ADN-ADN

Pour chaque souche, 3 g de biomasse humide ont été repris dans une solution d'isopropanol/eau (1:1, v/v) puis envoyés dans des tubes à centrifuger de 50 mL à l'institut DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* à Brunswick en Allemagne) pour une analyse d'hybridation ADN-ADN. Le Tableau 14 montre les couples de souches choisis pour l'hybridation de leur ADN génomique.

Souches du laboratoire testées	Souches commerciales utilisées pour l'hybridation
TC5	<i>Polaribacter dokdonensis</i> DSM 17204 ^T
TC6	<i>Agarivorans albus</i>
TC9	<i>Shewanella surugensis</i> DSM 17177 ^T
TC10	<i>Shewanella japonica</i> DSM 15915 ^T

Tableau 14. Couples des souches bactériennes utilisés pour l'hybridation ADN-ADN.

2.2.4. Coloration de Gram

Il existe deux grands groupes de bactéries basés sur les différences structurales de la paroi cellulaire. La coloration de Gram permet de distinguer ces deux groupes.

Une goutte de culture bactérienne a été séchée puis fixée sur une lame de verre. Les bactéries ont été ensuite colorées au cristal violet et contre colorées à la safranine. Enfin, la lame a été observée au microscope avec un grossissement de 400.

2.2.5. Mobilités

Chez les bactéries mobiles, au moins trois types de mobilité existent et peuvent être distinguées par des conditions de culture différentes (Henrichsen, 1972).

2.2.5.1. *Swimming*

Ce type de mobilité est dû à la présence de flagelle(s) et a lieu en milieu liquide ou semi-solide. Dans ces conditions, les cellules nagent individuellement et de manière aléatoire (Figure 18).

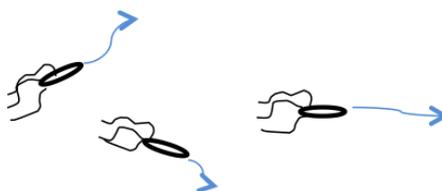


Figure 18. Représentation schématique du swimming. Les bactéries nagent librement dans le milieu liquide grâce à leurs flagelles.

Une culture bactérienne a été réalisée dans 10 mL de milieu VNSS liquide à 20°C sous agitation (120 rpm) pour atteindre la phase stationnaire. Sur un milieu VNSS rendu semi-solide par l'ajout de 0,3 % (m/v) d'agar, une goutte de 5 µL de la culture bactérienne en début de phase stationnaire a été déposée. Les boîtes ont été ensuite incubées à 20°C en conditions statiques. L'observation et la mesure du diamètre des halos formés par les bactéries mobiles

ont été faites après 48 h d'incubation. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2.2.5.2. *Swarming*

Ce mode de mobilité est une alternative à la nage. Il consiste en un déplacement en petits groupes de bactéries de manière organisée sur une surface solide et humide (Figure 19). L'essaimage nécessite une transformation morphologique des bactéries qui s'allongent et présentent de très nombreux flagelles. Ces modifications leur permettent de coloniser rapidement de nouvelles surfaces. Ce mode de déplacement est souvent couplé avec la production, par les bactéries, d'EPS (biosurfactant) (Verstraeten *et al.*, 2008).

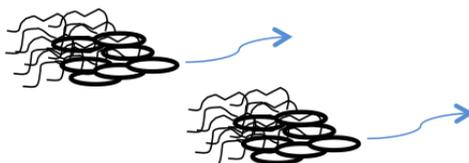


Figure 19. Représentation schématique du swarming. Les bactéries hyperflagellées se déplacent en petits groupes.

Une culture bactérienne a été réalisée dans 10 mL de VNSS à 20°C sous agitation (120 rpm) pour atteindre la phase stationnaire. Sur un milieu VNSS solide contenant 0,5 % (m/v) d'agar, une goutte de 5 μ L de la culture bactérienne en début de phase stationnaire a été déposée. Les boîtes ont été incubées à 20°C en conditions statiques. L'observation et la mesure du diamètre des halos formés ont été faites à 48 h. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2.2.5.3. *Twitching*

Ce mode de mobilité est lié à la présence de pili de type IV qui en se rétractant, peuvent participer à la mobilité en permettant aux bactéries de se mouvoir par glissade en petits groupes sur une surface solide (Figure 20).



Figure 20. Représentation schématique du twitching. Les bactéries se déplacent par glissade en petits groupes sur une surface solide.

Une culture bactérienne a été réalisée dans 10 mL de milieu VNSS liquide à 20°C sous agitation (120 rpm) pour atteindre la phase stationnaire. Un milieu VNSS solide contenant 1,5 % (m/v) d'agar a été percé par un cône préalablement trempé dans la culture bactérienne. Les boîtes ont été incubées à 20°C. L'observation et la mesure du diamètre des halos formés ont été faites à 48 h. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2.2.6. Galeries API

Pour chaque souche de la collection de Toulon, trois types de galeries API ont été utilisées, la galerie API 20 NE, la galerie API ZYM et la galerie API 50 CH (bioMérieux, Lyon, France). Ces galeries permettent respectivement d'étudier le métabolisme général des souches bactériennes, de faire une rapide étude de leurs capacités enzymatiques ou de déterminer leur capacité à fermenter 49 sucres différents.

Les expériences se sont déroulées suivant les protocoles proposés par bioMérieux pour chaque type de Galerie API, excepté la température d'incubation qui était de 20°C. L'inoculation des galeries a été faite avec des cultures bactériennes post-exponentielles.

2.2.7. Potentiel Zêta

Le potentiel ζ a été mesuré afin d'évaluer la charge nette de surface des bactéries. Le protocole utilisé est celui décrit par Grasland *et al.* (Grasland *et al.*, 2003), cependant certaines modifications ont été apportées. Les cultures bactériennes en début de phase stationnaire ont été centrifugées 10 min à 10 000 g (Sigma 3-30k), puis rincées 2 fois avec une solution de NaCl à 1,5 mM et enfin reprises dans cette solution de NaCl pour obtenir une concentration finale de bactéries de 10^5 UFC/mL. La faible osmolarité de la solution de NaCl utilisée permet de diminuer les interférences entre le champ électrique et la présence d'ions. Le pH est ajusté à 7,5. Les mesures ont été faites sur 800 μ L de solution bactérienne à 20°C sous un potentiel électrique de 120 V avec un zétamètre Zetasizer Nanos-ZS de la marque MALVERN instruments (Eguilles, France). L'indice de réfraction était de 1,5 (spécifique aux solutions bactériennes). Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2.2.8. Test d'adhésion microbienne aux solvants (MATS)

Le MATS permet de déterminer le caractère hydrophobe/hydrophile et le caractère acido-basique des souches bactériennes. Cette méthode a été mise au point par Bellon-Fontaine *et al.* (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996) puis modifiée par Grasland *et al.* (Grasland *et al.*, 2003). Elle repose sur l'affinité des bactéries pour les solvants suivants : le chloroforme, solvant monopolaire acide, l'acétate d'éthyle, solvant monopolaire basique, et le décane et l'hexadécane, deux solvants apolaires. La différence d'affinité des bactéries à l'égard du chloroforme et de l'hexadécane nous informe sur le caractère donneur d'électrons des bactéries. La différence d'affinité à l'égard de l'acétate d'éthyle et du décane nous renseigne quant à elle sur le caractère accepteur d'électrons des bactéries. Enfin, la différence d'affinité des bactéries entre un solvant polaire et un solvant apolaire permet de connaître leur caractère hydrophile/hydrophobe. Ces différentes affinités sont exprimées en termes de pourcentages d'adhésion aux solvants. Le pourcentage de l'adhésion microbienne pour chaque solvant est estimé grâce au calcul suivant :

$$1 - \left[\frac{A_1}{A_0} \right] \times 100 = \% \text{ d'adhésion}$$

Pour réaliser cette manipulation, les cultures bactériennes en début de phase stationnaire ont été centrifugées 10 min à 4000 g puis lavées 2 fois avec une solution de NaCl à 36 g/L et resuspendues dans la solution de NaCl pour obtenir une absorbance à 400 nm, finale, de 0,8 (A_0). Puis 2,4 mL de cette suspension bactérienne ont été mélangés par vortex à 0,4 mL de chaque solvant. Les tubes ont été laissés au repos 15 min à température ambiante pour permettre la séparation des 2 phases. L'absorbance à 400 nm (A_1) de la phase aqueuse est mesurée. Chaque expérience a été répétée 3 fois indépendamment.

2.2.9. Formation de biofilm : *BioFilm Ring Test*[®] (BFRT[®])

Cette méthode a été développée par Biofilm Control[®] (Clermont-Ferrand, France) et a été décrite par Chavant *et al.* (Chavant *et al.*, 2007). Brièvement, le test est basé sur la mobilité de microbilles paramagnétiques inertes inoculées avec une culture bactérienne (Figure 21). La solution bactérienne mélangée aux microbilles est déposée dans les puits d'une microplaque puis après un certain temps d'incubation, la microplaque est placée sur une plaque aimantée. En absence de formation de biofilm, les microbilles, sous l'influence du

champ magnétique, vont migrer au centre du puits et former un spot foncé visible à l'œil nu. Au contraire, si la culture bactérienne a formé un biofilm, les billes vont être piégées dans la matrice extracellulaire et ne pourront pas migrer au centre du puits lors de l'aimantation, il n'y aura donc pas de spot visible correspondant aux microbilles. Dans le cas d'un biofilm intermédiaire, la migration des microbilles sera réduite, ce qui atténue la formation du spot et seul un halo sera visible. L'analyse des résultats et l'acquisition des images des puits avant et après aimantation se fait via un scanner d'image et le logiciel BFC Elements®.

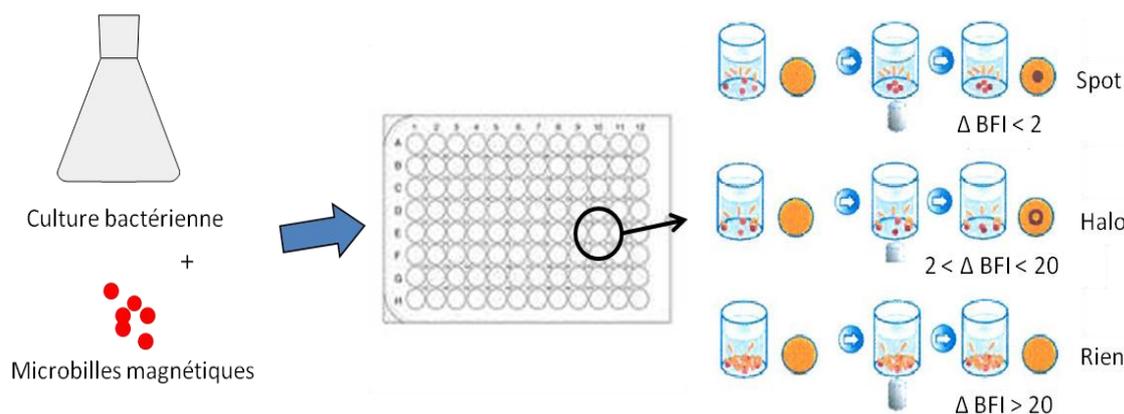


Figure 21. Principe du *BioFilm Ring Test*®.

Le protocole proposé par Biofilm Control® a été modifié ; 0,004 % de Tween® 20 ont été ajoutés à la suspension bactérienne (voir ci-après) ce qui permet d'éviter les interactions entre les microbilles et les sels des milieux de cultures des bactéries marines.

L'absorbance à 600 nm d'une culture bactérienne en début de phase stationnaire a été ajustée à 1 puis la culture a été diluée au 1/250^{ème} dans du milieu contenant 0,004 % (v/v) de Tween® 20 et 10 µL/mL de solution de microbilles (TON006N) vendues spécifiquement pour ce test. Ensuite, 200 µL de cette suspension ont été déposés dans les puits de barrettes spécifiques puis incubés 24 h, 48 h ou 72 h à 20°C, sans agitation. Les résultats ont été exprimés en Index de Formation de Biofilm (Δ BFI).

$$\Delta \text{ BFI} = \text{BFI témoin} - \text{BFI échantillon}$$

Si le Δ BFI est inférieur à 2, il n'y a pas de formation de biofilm. Entre 2 et 20, le biofilm est en développement. Enfin lorsque le Δ BFI est supérieur à 20, le biofilm est totalement formé. Chaque expérience a été réalisée trois fois dans les mêmes conditions et ceci trois fois indépendamment. Les expériences ont été faites avec trois milieux différents, le MB, le VNSS et le MB supplémenté avec 3 % de glucose. Le milieu seul (sans bactéries) a servi de témoin pour le test.

2.2.10. Test d'adhésion en microplaque au cristal violet

Plusieurs tests en microplaque ont été mis au point, dont celui très répandu à base de cristal violet (Vesterlund *et al.*, 2005 ; Nagant *et al.*, 2010 ; Camps, 2011 ; Crémet *et al.*, 2013). Cette méthode utilise la spectrophotométrie pour mesurer la capacité des souches bactériennes à adhérer à une surface et/ou à former un biofilm dans les puits des microplaques. Le cristal violet colore les bactéries et la matrice des biofilms (Hannig *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2010b ; Pantanella *et al.*, 2013).

Dans cette étude, le cristal violet a été utilisé de manière à déterminer la capacité des souches isolées de la rade de Toulon à adhérer sur du polystyrène (matériau des microplaques servant au test). Pour ce faire, les tests ont été réalisés après 24 h d'incubation dans du ASW afin de maintenir les bactéries vivantes tout en empêchant leur croissance.

Le protocole est donc le suivant : les cultures bactériennes en début de phase stationnaire ont été centrifugées 10 min à 4000 g puis le culot bactérien a été repris dans de l'ASW pour obtenir une absorbance à 600 nm de 0,4. Des microplaques de 96 puits, en polystyrène transparent, ont étéensemencées avec cette solution bactérienne. Les puits témoins ont été, quant à eux, remplis par de l'ASW stérile. Après 24 h d'incubation à 20°C sous agitation (120 rpm), les puits ont été rincés trois fois avec une solution de NaCl (36 g/L) pour enlever les bactéries non adhérentes au support puis séchés dans une enceinte à 50°C pendant 30 min pour permettre la fixation des bactéries (Rivas *et al.*, 2007). L'étape suivante a été l'introduction dans chaque puits d'une solution de cristal violet à 0,01 % dans de l'eau (m/v). Après 15 min d'attente, la solution de cristal violet a été éliminée des puits qui ont été ensuite rincés avec la solution de NaCl pour enlever le colorant en excès puis séchés 10 min à température ambiante. Le cristal violet qui a pénétré dans les bactéries a été remis en solution par l'ajout de 200 µL d'éthanol à 95 % dans chaque puits, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de lecture avec le spectrophotomètre (Rivas *et al.*, 2007). Après 10 min d'attente sous agitation (120 rpm), le contenu de chaque puits a été transvasé dans une nouvelle microplaque transparente puis l'absorbance est lue à 595 nm avec le lecteur de microplaques INFINIT 200 (TECAN, Lyon, France). Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2.2.11. Microscope Electronique à Balayage (MEB)

Etant donné que nous n'avions pas accès à un appareil capable de déshydrater totalement les échantillons au point critique, nous avons utilisé un protocole permettant de se soustraire à cette étape.

Le protocole selon Andersson été utilisé pour préparer les biofilms de la souche TC14 (Andersson *et al.*, 2009). La culture en biofilm est telle qu'elle est décrite dans la partie 2.3.1.1. Le biofilm à l'interface air/liquide a été récupéré sur une lame de verre tout en gardant son intégrité. Après trois rinçages au NaCl à 0,9 %, le biofilm a été fixé 20 min dans une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 3 % (v/v). Le biofilm a été immergé ensuite 30 min dans une solution aqueuse de tétr oxyde d'osmium (OsO_4) à 4 % puis séché progressivement en étant trempé dans un gradient d'éthanol (30 %, 66 % puis 95 %, 10 min chacun). Enfin le biofilm a été lavé avec de l'hexamethyldisilazane. Une partie du biofilm a été posé sur un support en aluminium puis métallisé à l'or. Toutes les images ont été enregistrées à 3 kV avec un microscope SUPRA 40VB de Zeiss.

2.3. Extraction des exopolymères et isolement des polysaccharides des biofilms

2.3.1. Cultures pour l'extraction d'EPS

2.3.1.1. Cultures en biofilm

Nous avons mis au point un protocole de culture des bactéries en biofilm dans des boîtes de Petri en milieu MB liquide. A partir d'une culture en début de phase stationnaire, 10 mL de milieu culture ayant une absorbance à 600 nm de 0,1 ont étéensemencés dans chaque boîte de Petri. Les boîtes ont été entreposées à 20°C pendant 72 h. A 48 h d'incubation, 10 mL de milieu MB frais ont été rajoutés dans chaque boîte de Petri et à 72 h, les cultures ont été récoltées suivant le protocole d'extraction. A chaque expérience, le nombre de boîtes de Petri a varié entre 10 et 100. Les deux protocoles d'extraction décrits après permettent de récupérer 3 types d'exopolymères : les EPS solubles (EPS-sol), les EPS faiblement liées (EPS-fl) et les EPS fortement liées (EPS-FI) (Figure 22).

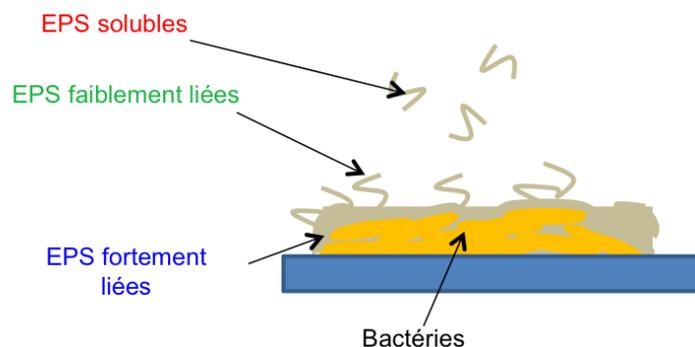


Figure 22. Représentation d'un biofilm bactérien (en orange) sur un support (en bleu). Trois types d'EPS sont différenciés, les EPS solubles libérées dans le milieu, les EPS faiblement liées au biofilm et les EPS fortement liées aux bactéries.

2.3.1.2. Cultures planctoniques

A la différence de la culture en biofilm, les bactéries ont été ici cultivées dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu MB. L'incubation a duré 48 h sous agitation (120 rpm) à 20°C.

2.3.2. Protocole d'extraction des exopolymères : résine échangeuse de cations

Le protocole mis au point pour l'extraction des EPS est décrit dans la Figure 23. Il a pour objectif l'obtention d'un maximum d'EPS (en masse) par déstructuration de la matrice du biofilm en préservant l'intégrité des bactéries. Pour cela, le choix de l'action d'une résine échangeuse de cations (Dowex[®] Marathon[®] C – Forme Na⁺) suivie d'une action physique (centrifugation à grande vitesse) a été fait. Le protocole a été appliqué aux souches TC9 et TC5 et TC15. Il a été réalisé à partir de 10 et de 100 boîtes de Petri de cultures en biofilm obtenues après 72 h d'incubation en milieu MB (10 mL/boîte) à 20°C avec ajout de 10 mL de milieu frais à 48 h (20 mL/boîte au final). Il s'agit d'opérer de façon à isoler trois types d'EPS, les EPS solubles libérées dans le milieu, les EPS faiblement liées et les EPS fortement liées au sein du biofilm.

Tout commence par la séparation du biofilm adhérant au fond des boîtes de Petri et du milieu de culture en présence. Concernant le milieu, après avoir été débarrassé de la majorité des bactéries surnageantes par centrifugation (4000 g, 40 min à 4°C), ce dernier a été filtré sur 0,22 µm pour éliminer les bactéries résiduelles. Une étape de dialyse du surnageant (seuil de coupure : 6000 - 8000 Da ; 3 jours ; 4°C) a ensuite été réalisée afin d'éliminer les sels et petites molécules contenus dans le milieu. L'échantillon dialysé obtenu a alors été lyophilisé puis pesé. Il correspond aux **EPS solubles (EPS-sol)**. En parallèle de ce traitement, 5 mL de

tampon PBS ont été déposés dans les boîtes de Petri. Avec un râteau, le biofilm recouvrant le fond des boîtes de Petri a été gratté. Les biofilms repris dans le tampon PBS ont été rassemblés puis centrifugés (4000g, 40 min à 4°C) pour isoler dans le surnageant les **EPS faiblement liées (EPS-fl)**. Ces solutions d'EPS-fl dans du PBS ont été filtrées sur 0,22 µm puis dialysées (6000 – 8000 Da). Le reste du biofilm, quant à lui, a subi une extraction avec de la résine Dowex® Marathon® C de forme Na⁺ (4 g/g de biofilm humide /100 mL PBS) sous agitation à 600 rpm à 4°C pendant 1 h. L'extrait a été centrifugé (12000 g, 1 min à 4°C) afin de récupérer, dans le surnageant, les EPS fortement liées alors décrochées. Deux centrifugations successives (15000 g, 1 h à 4°C) ont été réalisées, à l'issue desquelles le surnageant obtenu a été filtré puis dialysé pour obtenir les **EPS fortement liées (EPS-FI)**. Les échantillons lyophilisés ont été pesés puis stockés à -20°C.

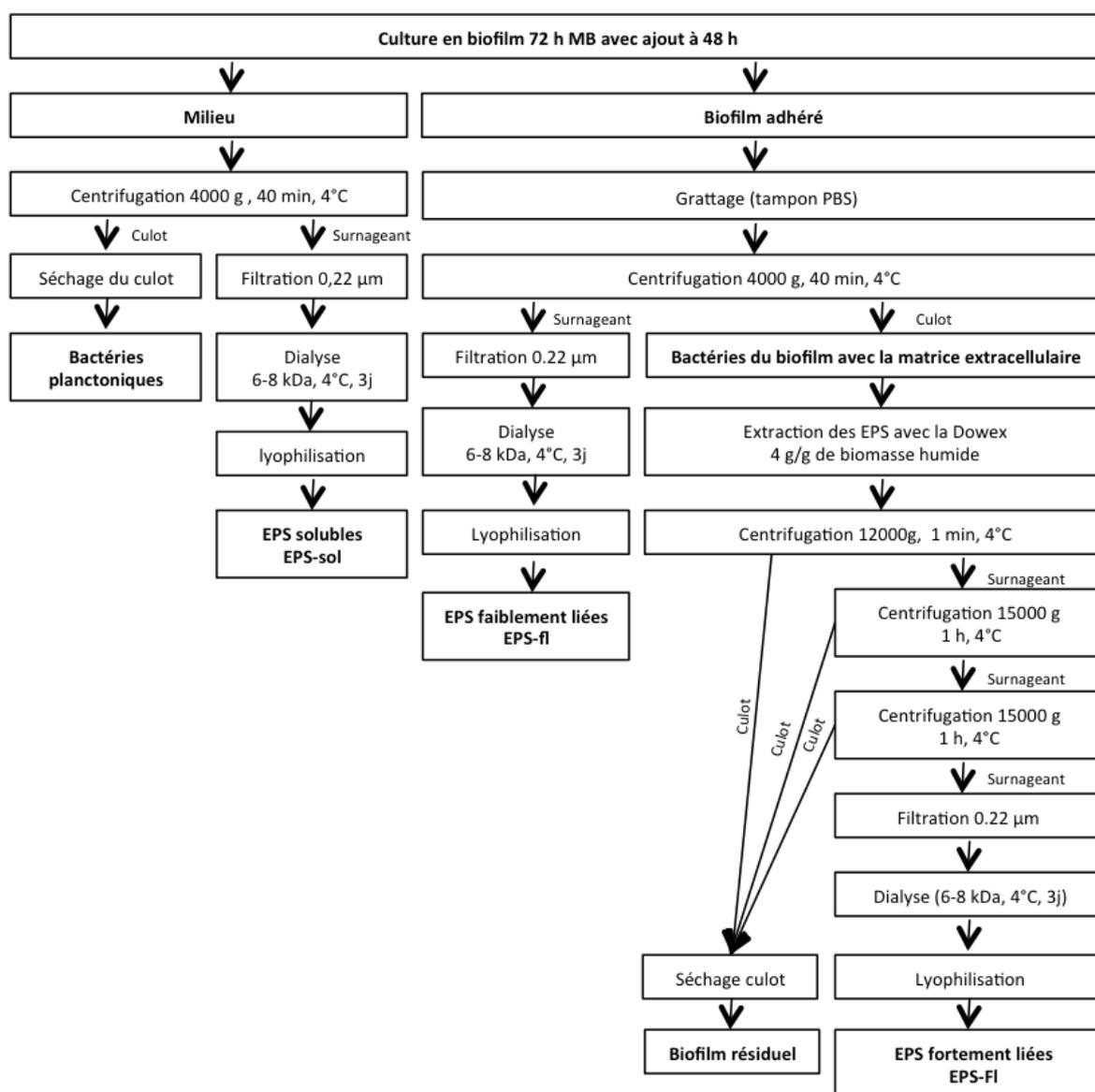


Figure 23. Protocole d'extraction des EPS utilisant une résine échangeuse de cations (Dowex® Marathon® C de forme sodium).

2.3.3. Protocole d'extraction des exopolymères : solution NaOH 0,1 M

Il a été réalisé à partir de cultures en biofilm obtenues après 72 h de croissance bactérienne, dans des boîtes de Petri (10, 40 ou 50 boîtes), en mode statique, en milieu MB (10 mL/boîte), à 20°C avec ajout de 10 mL de milieu frais à 48 h (20 mL/boîte au final).

Les cultures ont été traitées selon la méthode illustrée dans la Figure 24. Le mode d'obtention des EPS-sol et EPS-fl est identique à celui de la méthode décrite précédemment (voir ci-dessus ; partie 2.3.2). Dans ce second protocole d'extraction d'EPS-FI, les biofilms grattés au fond des boîtes ont été rassemblés dans un Erlenmeyer pour subir un traitement doux à la soude (NaOH 0,1 M ; 10 mL/10 boîtes de biofilm récolté) pendant 4 h à 37°C, sous agitation (120 rpm), dans le but de déstructurer la matrice et d'isoler ainsi les exopolymères. Après neutralisation à l'acide acétique, les échantillons ont été lyophilisés puis stockés à -20°C.

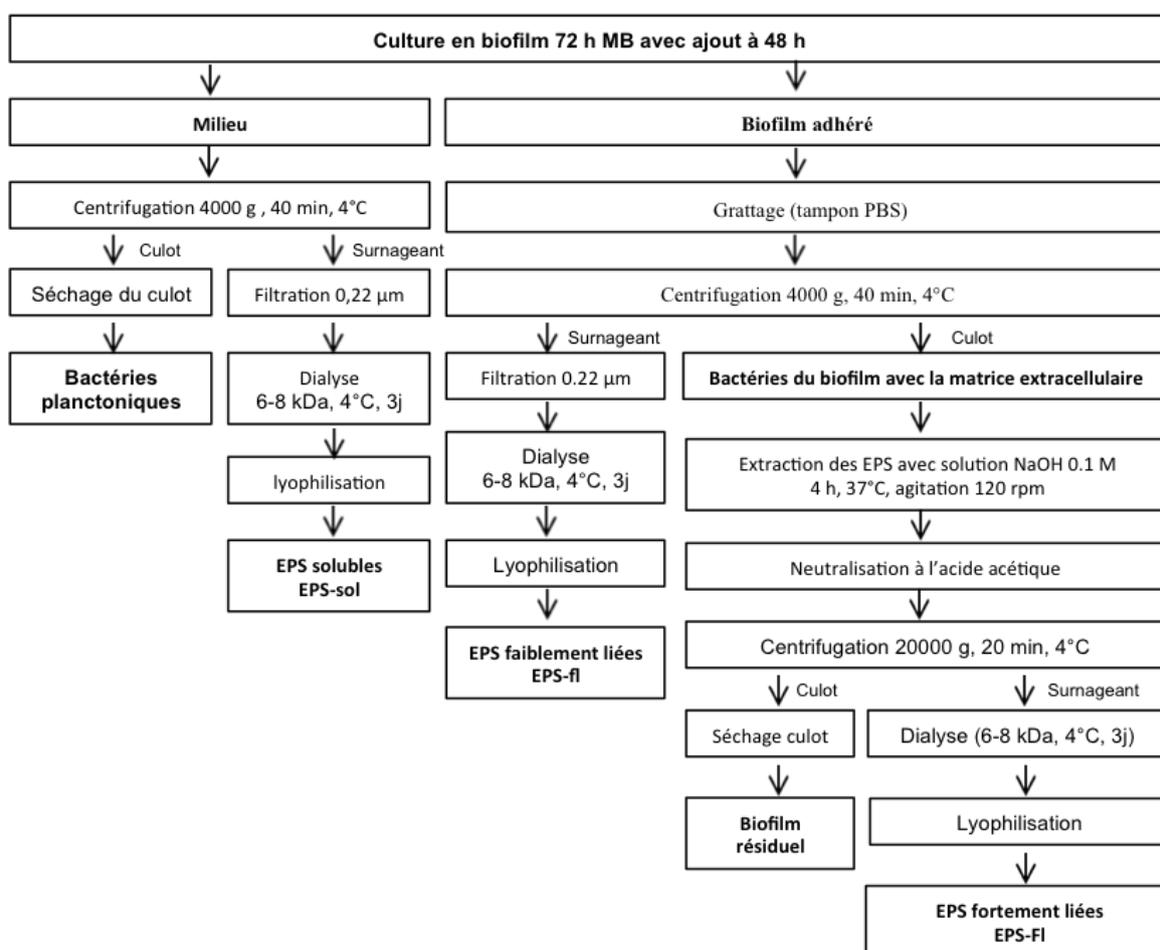


Figure 24. Protocole d'extraction des EPS à la soude (NaOH 0,1 M).

Dans le cas de certaines cultures en biofilm de la souche TC14, une étape supplémentaire d'extraction d'EPS a été réalisée, le biofilm résiduel après action de la soude

étant encore consistant. Il s'agit d'une méthode physique avec agitation du biofilm résiduel avec des billes de verre, qui fait suite à l'extraction chimique à la soude.

Les conditions sont les suivantes : des billes de diamètre 4-6 mm ont été ajoutées au biofilm résiduel dans un Erlenmeyer (5 g de billes/g de biofilm récolté) le tout étant alors agité 3 min à la main.

2.3.4. Isolement des exopolysaccharides

Les étapes d'isolement des polysaccharides sont détaillées dans les Figures 25 et 26. Elles concernent les trois types d'échantillons, EPS solubles, EPS faiblement liées et EPS fortement liées.

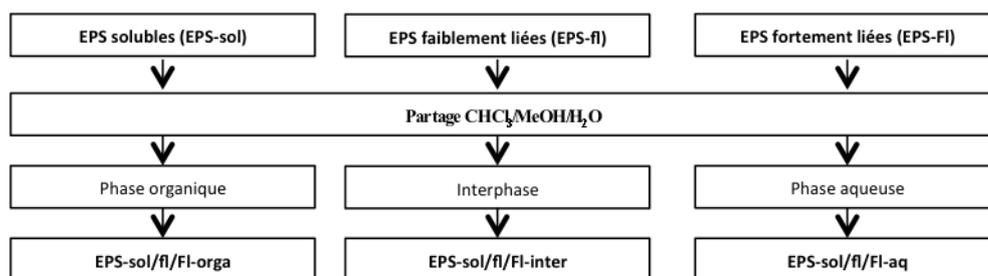


Figure 25. Protocole de partage des EPS.

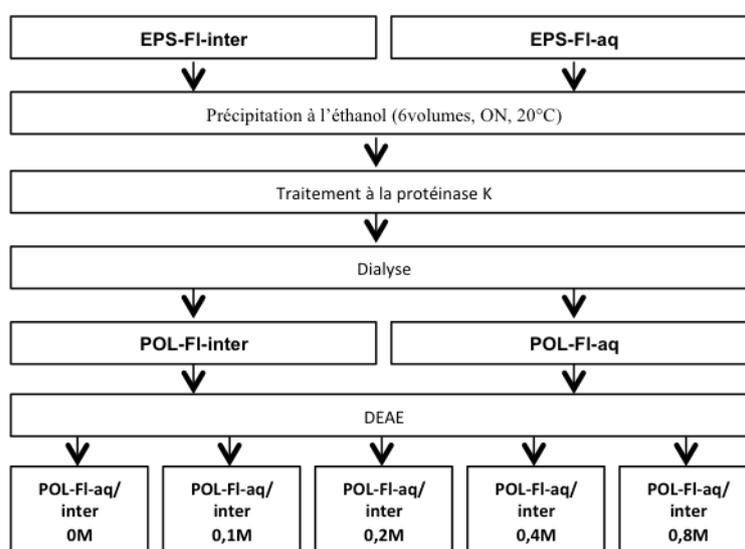


Figure 26. Protocole d'isolement et de séparation des polysaccharides des fractions EPS-FI-inter et EPS-FI-aq.

2.3.4.1. Partage chloroforme/ méthanol/ eau

La première étape d'isolement des exopolysaccharides est un partage $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:4:3, v/v/v) du matériel récolté selon une méthode modifiée utilisée à l'origine pour l'extraction des composés lipidiques (Bligh et Dyer, 1959).

Pour cela, 8 mL d'échantillon d'EPS en solution aqueuse ont été mélangés avec 10 mL de chloroforme et 20 mL de méthanol dans une ampoule à décanter. Après 1 heure de repos de cette solution monophasique, 5 mL de chloroforme et 5 mL d'eau ont été ajoutés de façon à séparer les composés lipidiques, présents dans la phase organique, des composés protéiques et polysaccharidiques présents dans la phase aqueuse. Alors que cette séparation en deux phases est immédiate, une interphase se forme également lorsque l'ensemble est laissé au repos toute la nuit. Chacune des trois phases (organique, interphase et aqueuse) a été collectée, concentrée à l'évaporateur rotatif et pesée à sec. Ce partage a permis de séparer les EPS totaux en **EPS-orga**, **EPS-inter** et **EPS-aq** qui se retrouvent respectivement dans la phase lipidique, dans l'interphase et dans la phase aqueuse. Les échantillons EPS-inter et EPS-aq contiennent tous les deux des protéines et des polysaccharides.

2.3.4.2. Précipitation à l'alcool éthylique des polymères

Les échantillons EPS-aq et EPS-inter ont été remis séparément en suspension dans l'eau. Six volumes d'éthanol (à 90 %) froid ont été ajoutés goutte à goutte, sous agitation (Figure 27). Les échantillons ont été laissés toute la nuit à -20°C . Dans ces conditions, les polymères précipitent en formant des filaments blancs. Après une centrifugation de 30 min à 20000 g, les culots contenant les polymères précipités ont été récupérés.

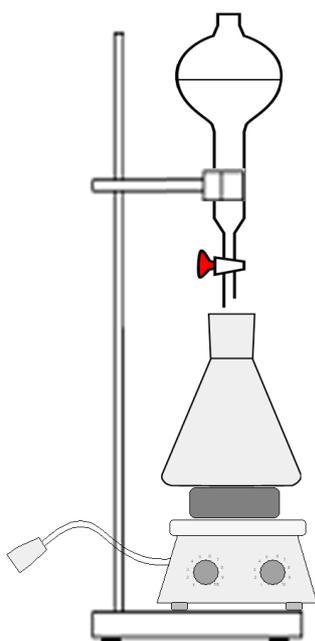


Figure 27. Représentation de la mise en place de l'expérience de précipitation à l'alcool des polymères. L'alcool froid dans l'ampoule à décanter, tombe goutte à goutte dans l'Erlenmeyer où se trouve l'échantillon, qui est sous agitation.

2.3.4.3. Digestion enzymatique des protéines

Les polymères précipités ont été traités à la protéinase K de *Tritirachium album* (Sigma-Aldrich). Cette enzyme est une endopeptidase coupant les liaisons peptidiques au niveau des acides aminés aromatiques et aliphatiques. Les digestions ont été réalisées sur toute une nuit à 37°C sous agitation. La concentration d'enzymes utilisée pour chaque réaction a été calculée en prenant en compte qu'1 U de protéinase K est nécessaire pour dégrader 181 µg de protéines et que 30 U correspondent à 1 mg de protéinase K (information donnée par le fournisseur). Cette étape a pu être répétée deux fois.

2.3.5. Chromatographie échangeuse d'ions

Les échantillons EPS-aq et EPS-inter déprotéinisés ont été analysés par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne (9 cm x 3 cm) de DEAE-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). Le tampon utilisé était une solution de NH₄Cl 0,01 M. L'élution s'est effectuée avec des solutions de NH₄Cl 0,01 M contenant des concentrations croissantes en NaCl (0 M ; 0,1 M ; 0,2 M ; 0,4 M ; 0,8 M et 1 M). Le suivi de l'élution a été fait avec une détection UV à 254 nm mais l'absorption n'étant pas toujours suffisante, un regroupement des fractions a été fait avant tout selon la force ionique d'élution. Le débit de la phase mobile était de 2 mL/min. Les composés élués avec une concentration nulle en NaCl sont neutres ; ceux qui nécessitent une concentration supérieure ou égale à 0,1 M NaCl devraient être de nouveau analysés sur la même colonne afin de confirmer leur caractère acide. Les différentes fractions ont été dialysées contre de l'eau distillée pendant 3 jours à 4°C afin d'éliminer les sels puis lyophilisées et pesées. Le pourcentage d'EPS potentiellement acides présents dans les échantillons analysés a pu être estimé.

2.4. Méthodes de caractérisation des exopolymères

2.4.1. Dosages colorimétriques

2.4.1.1. Dosage des sucres

Pour le dosage des sucres totaux, il existe trois méthodes principales : la méthode au phénol-acide sulfurique (Dubois *et al.*, 1956), la méthode à l'antrone (Dreywood, 1946) et la méthode à l'orcinol (Tillmans et Philippi, 1929 ; Rilmington, 1931).

Dans cette étude, c'est la méthode au phénol-acide sulfurique qui a été choisie. Cette méthode permet d'effectuer un dosage global des oses (aldoses, cétooses mais aussi acides uroniques). L'acide sulfurique provoque l'hydrolyse des liaisons osidiques et une déshydratation des monosaccharides libérés pour donner des dérivés furfural et des dérivés d'acide 5-formylfuroïque réagissant avec le phénol ce qui forme un complexe orange (Figure 28).

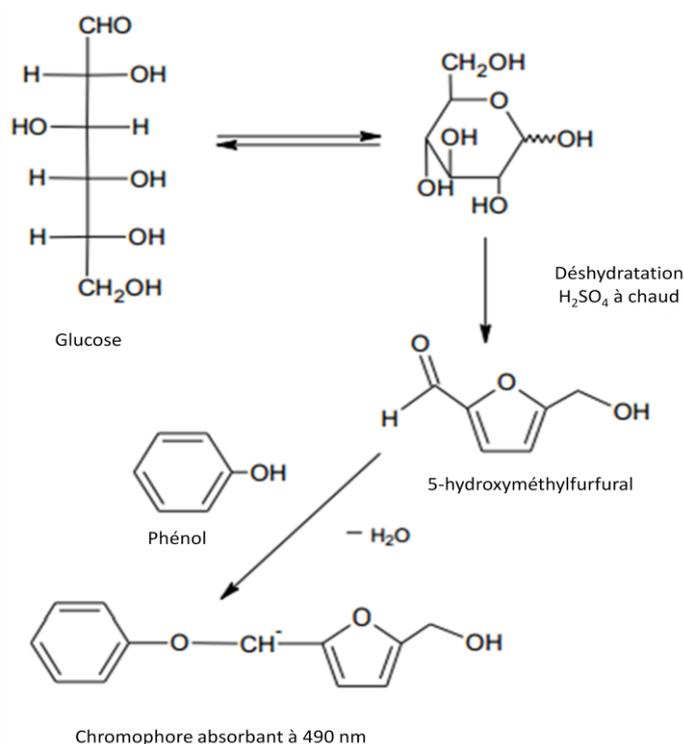


Figure 28. Réactions du dosage colorimétrique des sucres totaux avec la méthode au phénol-acide sulfurique.

Le pourcentage en sucres a été mesuré en utilisant des solutions de glucose à différentes concentrations pour réaliser la courbe d'étalonnage (Dubois *et al.*, 1956) (Tableau 15). Cette méthode permet d'effectuer un dosage global des oses (aldoses, cétooses mais aussi acides uroniques). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en sucres.

Concentration (µg/mL)	0	5	10	20	40	50
Glc (1mg/mL)	0 µL	1 µL	2 µL	4 µL	8 µL	10 µL
Eau	200 µL	199 µL	198 µL	196 µL	182 µL	190 µL

Tableau 15. Gamme des concentrations en glucose utilisées pour la courbe d'étalonnage.

Dans des tubes à hémolyse, 200 µL de solution d'échantillon à doser à 1 mg/mL ont été mélangés avec 200 µL de solution phénol à 5 %. Sans toucher les parois des tubes, 1 mL d'acide sulfurique à 95 % a été ajouté. Après 10 min de repos, les solutions ont été mélangées

par vortex. Une coloration orange se forme après 30 min de repos. L'absorbance a été mesurée à 490 nm.

2.4.1.2. Dosage des protéines

Il existe plusieurs méthodes de dosages colorimétriques des protéines, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients (méthode de Biuret, méthode de Kjeldahl, méthode à l'acide bicinchoninique, méthode de Lowry, méthode de Bradford, etc...). Les 3 méthodes les plus couramment utilisées pour doser des échantillons d'EPS sont la méthode de Bradford, la méthode à l'acide bicinchoninique et la méthode de Lowry. C'est cette dernière que nous avons utilisée dans cette étude (Lowry *et al.*, 1951). Elle est basée sur la méthode de Biuret. Le réactif de cuivre est toujours utilisé mais l'originalité tient dans l'utilisation d'un second réactif, le réactif de Folin-Ciocalteu qui permet de réduire les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) donnant un complexe bleu foncé. Les avantages de cette méthode résident dans sa sensibilité accrue par rapport à la méthode de Biuret et dans la suppression des interférences avec les détergents et les lipides. Quelques inconvénients subsistent, comme de possibles interférences avec des composés dans le milieu et son manque de rapidité.

La gamme d'étalonnage s'est effectuée avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) (Tableau 16).

Concentration (µg/mL)	0	20	40	65	80	100
BSA (1 mg/mL)	0 µL	10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	50 µL
Eau	500 µL	490 µL	480 µL	470 µL	460 µL	450 µL

Tableau 16. Gamme des concentrations en BSA utilisées pour la courbe d'étalonnage.

Dans des tubes à hémolyse, 500 µL de solution d'échantillon à doser à 1 mg/mL ont été mélangés à 700 µL de solution de Lowry (Solution A + Solution B + Solution C, 100:1:1 (v/v/v), Tableau 17). Après une incubation de 20 min à l'obscurité à température ambiante, 100 µL de réactif de Folin Ciocalteu ont été ajoutés. Après agitation puis incubation 30 min à l'obscurité à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 750 nm.

Solution	Composition (dans 500 mL d'eau osmosée)
A	2,86 g de NaOH + 14,31 g de Na ₂ CO ₃
B	7,1 g CuSO ₄ .5(H ₂ O)
C	2,85 g tartrate de sodium dihydraté

Tableau 17. Composition des solutions utilisées pour préparer la solution de Lowry.

2.4.1.3. Dosage des acides uroniques

Le dosage des acides uroniques peut se faire avec différentes méthodes, dont les deux plus courantes sont la méthode au méta-hydroxydiphényl (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973) et la méthode au carbazole (Bitter et Muir, 1962). La concentration en acides uroniques dans cette étude a été mesurée par le dosage colorimétrique au méta-hydroxydiphényl (MHDP). Dans cette méthode, les acides uroniques, sous l'action de l'acide sulfurique, subissent une déshydratation qui aboutit à la formation de dérivés d'acide 5-formylfuroïque qui réagissent ensuite avec le MHDP. Le produit ainsi obtenu développe une coloration rose (Figure 29). La présence de borate diminue les interférences dues aux sucres neutres qui, en présence d'acide sulfurique, se colorent en jaune-brun.

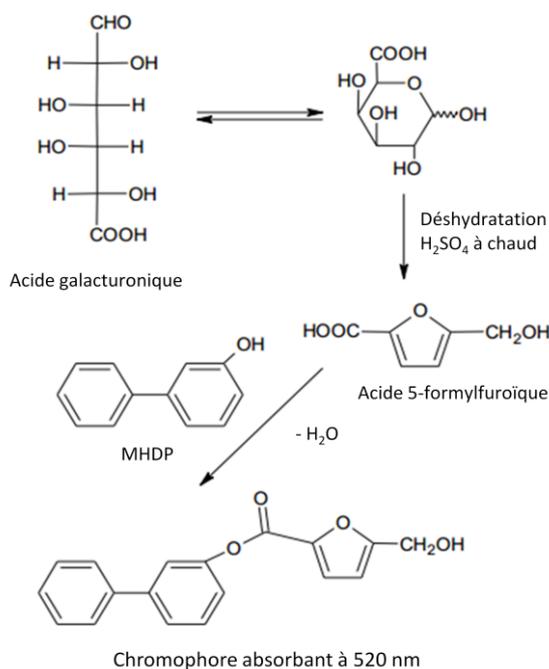


Figure 29. Réactions du dosage colorimétrique des acides uroniques avec la méthode au MHDP.

La gamme d'étalonnage s'est effectuée avec une solution d'acide glucuronique (Tableau 18).

Concentration (µg/mL)	0	5	10	20	40	50
GlcA (1mg/mL)	0 µL	1 µL	2 µL	4 µL	8 µL	10 µL
Eau	200 µL	199 µL	198 µL	196 µL	182 µL	190 µL

Tableau 18. Gamme des concentrations en acide glucuronique utilisées pour la courbe d'étalonnage.

Dans des tubes à hémolyse, 200 µL de solution d'échantillon à doser à 1 mg/mL ont été mélangés avec 1,2 mL de solution de tétraborate de sodium (Tableau 19). Après agitation,

les tubes ont été placés 10 min à 90°C dans un bain marie avant d'être refroidis dans un bain de glace puis 20 µL de solution de MHDP ont été ajoutés. Après agitation, les tubes ont été laissés au repos 30 min à l'obscurité. Enfin l'absorbance a été mesurée à 520 nm.

Solution	Composition
Solution de tétraborate de sodium	12,5 mM de tétraborate de sodium dans de l'acide sulfurique 95 %
Solution de MHDP à 0,15 %	0,15 % de MHDP dans une solution de NaOH 0,5 %

Tableau 19. Composition des solutions utilisées pour le dosage des acides uroniques.

2.4.2. Dosage des acides nucléiques

Ce dosage a permis de déterminer le pourcentage d'acides nucléiques dans les échantillons d'EPS. A partir de 200 µL de solution d'échantillon à 1 mg/mL, les acides nucléiques ont été récupérés grâce au kit *DNeasy Blood & Tissue* (Invitrogen). La quantité d'ADN ainsi extrait a été déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm.

2.4.3. Contrôle de la lyse cellulaire : dosage de l'ATP

Un contrôle de la lyse cellulaire à différentes étapes du protocole d'extraction des EPS a permis de surveiller une possible contamination des échantillons par des composés intracellulaires. Pour effectuer ce contrôle, l'ATP a été dosé dans les échantillons grâce au kit *ATP-determination* d'Invitrogen. Les mesures ont été faites sur les échantillons EPS-sol, EPS-fl et EPS-Fl ainsi que sur les culots (biofilm restant après extraction des EPS). Des bactéries lysées par sonication (puissance de 50 W pendant 3 minutes) (Vibracell 72446 de Bioblock scientific) ont joué le rôle de témoin positif pour la quantité d'ATP libéré.

2.4.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les échantillons ont été analysés avec un système chromatographique Elite Lachrom (VWR-Hitachi) composé d'une pompe quaternaire (L-2130) équipée d'un dégazeur en ligne, d'un passeur d'échantillons (L-2200) disposant d'un système d'injection à volume variable (10 µL dans notre cas), et d'un four à colonne (L-2300) dont la température a été fixée à 30°C. Les séparations ont été réalisées en phase inverse sur une colonne analytique (Phenomenex, Gemini C6-Phenyl, 5 µm, 250 x 3 mm) à un débit de 0,5 mL/min. L'élution a été effectuée en utilisant une programmation binaire d'eau et d'acétonitrile (acidifiés avec 0,1 % d'acide formique) qui suit la séquence suivante : (i) palier isocratique initial de 5 min avec

10 % d'acétonitrile dans l'eau (v/v), (ii) gradient linéaire conduisant de 10 % à 100 % d'acétonitrile en 30 min, (iii) palier isocratique final de 20 min avec 100 % d'acétonitrile, (iv) retour aux conditions initiales (1 min) et équilibrage de la colonne (9 min).

Le système chromatographique est équipé d'une triple détection :

- 1) Un spectromètre de masse (Bruker, Esquire 6000) à ionisation par électro-nébulisation (ESI) équipé d'une trappe à ions (IT). Les conditions opératoires ont été les suivantes : température de séchage : 350°C, voltage du capillaire : 4000 V, pression du nébuliseur : 3,45 bars, gaz de séchage : hélium à un débit de 12 L/min, trappe à ions en mode *Full scan* de m/z 50 à 1200 avec un temps maximum de remplissage de 200 ms.
- 2) Un détecteur UV-Visible à barrettes de photodiodes (VWR-Hitachi, L-2455) dans le domaine spectral 190-700 nm.
- 3) Un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL, Eurosep, Chromachem) dont la température de nébulisation a été fixée à 30°C et celle d'évaporation à 50°C. La pression en gaz de séchage (N₂) était de 1,5 bars.

2.4.5. Chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC)

Afin d'estimer la diversité et la taille des constituants présents dans les différents échantillons d'EPS analysés, un profil chromatographique a été réalisé par HPSEC.

Les échantillons ont été injectés dans deux colonnes en série, OHpak SB-804 HQ et OHpak SB-805 HQ (8 mm x 300 mm chacune) (Shodex, New York, Etats-Unis) maintenues à une température constante de 30°C et précédées d'une colonne de garde OHpak SB-G (6 mm x 50 mm). Le tampon d'élution utilisé était une solution de NaNO₃ 0,01 N supplémenté avec 0,02 % d'azoture de sodium pour éviter toute contamination microbologique du système. Le volume d'injection était de 100 µL et le débit de 0,5 mL/min lors des injections avec les deux colonnes en série ou de 0,7 mL/min pour les premières analyses effectuées avec la colonne OHpak SB-804 HQ seule. Une double détection nous a permis de suivre en même temps l'Indice de Réfraction (RI) et la réponse en UV à 280 nm des composés élués.

Il est à noter qu'une courbe de calibration a été préalablement effectuée avec une gamme de pullulanes dont les masses moléculaires vont de 180 Da à 788 000 Da proposée dans le *Polysaccharide Calibration Kit SAC-10* (Polymer Laboratories, Amherst, Etats-Unis). Pour des masses supérieures et la détermination du volume mort, un polyéthylène glycol de masse 7 000 000 Da a été injecté.

2.4.6. Analyse des EPS pour leur composition en sucres simples par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM)

Il s'agissait d'identifier les oses présents dans les échantillons d'EPS et d'estimer leur pourcentage relatif par chromatographie en phase gazeuse. La colonne utilisée était une colonne Zebron Inferno ZB-1HT (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) et le gaz vecteur, l'hélium. Le programme utilisé a débuté à une température de 100°C pour atteindre 250°C avec un gradient de température de 3°C/min. La température de l'injecteur était de 250°C et le détecteur était à 300°C. La détection s'est faite en mode impact électronique.

2.4.6.1. Hydrolyse acide des polysaccharides

Les échantillons d'EPS étudiés ont tous subi une hydrolyse acide par l'acide trifluoroacétique (TFA) 4N. La réaction rompt les liaisons glycosidiques et libère les monosaccharides composant les polymères en présence.

Pour ce faire, 200 µL de solution d'échantillon à 1 mg/mL mélangés à 50 µL d'érythritol à 1 mg/mL (témoin interne) ont été déposés dans un tube à vis puis 1-2 mL de TFA 4N ont été ajoutés. Après avoir refermé hermétiquement les tubes, les échantillons ont été placés dans un bain sec à 100°C pendant 4 h. La réaction a été arrêtée par séchage du mélange sous azote. Avant leur analyse en CPG-SM, les monosaccharides ainsi obtenus ont été dérivatisés pour être rendus volatils (voir partie 4.7.3.).

2.4.6.2. Méthanolyse

En parallèle de l'hydrolyse au TFA, les monosaccharides des EPS ont été identifiés sous forme de méthylglycosides N-acétylés et O-triméthylsilylés selon la méthode de Kamerling *et al.* modifiée par Montreuil *et al.* (Kamerling *et al.*, 1975 ; Montreuil *et al.*, 1986). Pour cela, les EPS ont été soumis à une méthanolyse avec une solution méthanolique d'acide chlorhydrique 3 M qui libère quantitativement les monosaccharides y compris les acides uroniques mais dans ce cas, les oses libérés sont sous forme de méthylglycosides (Figure 30).

Pour ce faire, 200 µL de solution d'échantillon à 1 mg/mL mélangés à 50 µL d'érythritol à 1 mg/mL (témoin interne) ont été déposés dans un tube à vis puis le mélange a été évaporé sous azote. Ensuite 500 µL de solution d'acide chlorhydrique méthanolique 3 M

ont été ajoutés. Les tubes ont été fermés hermétiquement puis placés 4 h à 100°C. Pour arrêter la réaction, le mélange a été amené à sec par co-évaporations successives (au nombre de 3) avec du méthanol anhydre sous jet d'azote.

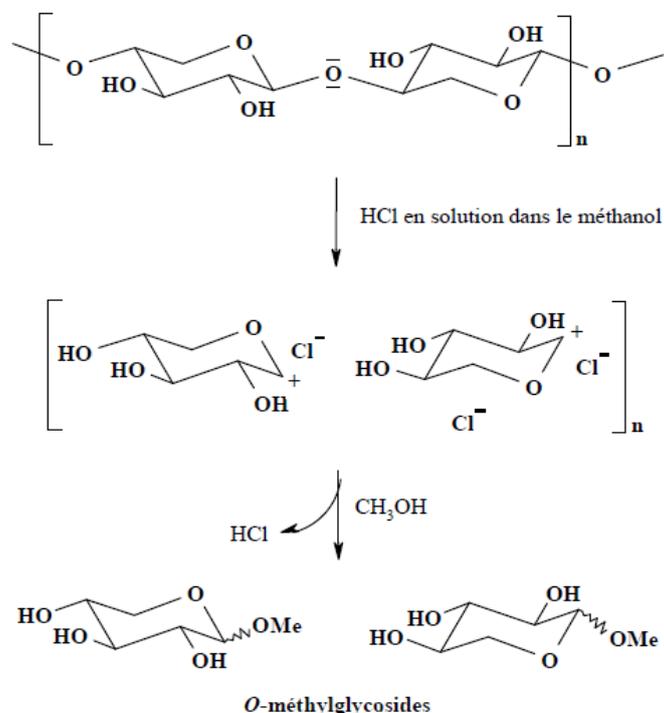


Figure 30. Réaction de méthanolyse.

2.4.6.3. Dérivatisation des monosaccharides pour analyse en CPG-SM

Après hydrolyse acide ou méthanolyse des polysaccharides, les monosaccharides obtenus ont été dérivatisés, respectivement par triméthylsilylation ou par acétylation suivie d'une triméthylsilylation. Ces traitements permettent de transformer les échantillons en dérivés volatiles analysables en CPG-SM.

- Acétylation :

Des sucres aminés pouvant être présents dans le méthanolysat des EPS étudiées, une acétylation a d'abord été effectuée après la réaction de méthanolyse.

Dans chaque tube, 200 μ L de pyridine anhydre puis 200 μ L d'anhydrique acétique ont été ajoutés. Les tubes ont été fermés hermétiquement et laissés à température ambiante toute la nuit à l'obscurité. Les solutions ont été alors séchées sous jet d'azote puis lavées trois fois avec de la pyridine avant d'être soumises à une triméthylsilylation.

- Triméthylsililation :

Cette dérivatisation intervient immédiatement après l'hydrolyse des EPS ou après l'acétylation des méthylglycosides. Elle se déroule selon le protocole suivant :

Huit gouttes de pyridine ont été introduites dans le tube des échantillons de monosaccharides séchés, puis, dans l'ordre, 4 gouttes d'hexaméthylsilazane et 2 gouttes de triméthylchlorosilane ont été ajoutées. Après 15 min de réaction à température ambiante, le mélange a été évaporé sous jet d'azote jusqu'à être juste sec. Les échantillons ont alors été repris dans 200 μ L de cyclohexane puis 1 μ L de chaque échantillon a été injecté en CPG-SM.

Les dérivés triméthylsilylés de plusieurs sucres standards (désoxyribose, ribulose, arabinose, ribose, fucose, rhamnose, xylose, fructose, mannose, allose, galactose, sorbose, glucose, acide galacturonique, mannitol, acide glucuronique et glucosamine) ont été analysés en CPG-SM pour déterminer leurs temps de rétention et leur coefficient de réponse dans nos conditions d'analyse, avec l'érythritol comme témoin interne.

2.4.7. Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF)

Dans le cas des EPS-aq et -inter issues du partage $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ des EPS totaux, 2 mg d'échantillon ont été mélangés et broyés finement avec 200 mg de KBr déshydraté. Ce mélange a été ensuite compacté 5 min à 200 bars pour obtenir une pastille. Les mesures ont été faites entre 4000 et 400 cm^{-1} en accumulant 200 scans et en ayant soustrait le bruit de fond. L'appareil utilisé était un appareil FT-IR Nexus de Thermo Nicolet.

Dans le cas des EPS-orga, une goutte d'échantillon dissous dans du chloroforme a été déposée au centre d'une pastille de KBr, séchée puis recouverte d'une seconde pastille de KBr. Les spectres ont été enregistrés après accumulation de 16 scans. Les mesures ont été faites entre 4000 et 400 cm^{-1} et une soustraction du bruit de fond a été réalisée.

2.4.8. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'ensemble des expériences de RMN- ^1H a été réalisé à l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 400 MHz. Le chloroforme deutéré (CDCl_3) a été utilisé comme solvant pour l'analyse des phases organiques et l'eau lourde (D_2O) pour dissoudre les composés des phases aqueuses ou interphases issues du partage $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:4:3, v/v/v) des EPS. Les spectres RMN ont été calibrés en utilisant le signal de l'eau (4,79 ppm) ou plus souvent par ajout de TMS (TétraMéthylSilane). L'acquisition s'est effectuée à 25°C sauf analyses spécifiques

d'échantillons peu solubles ou entraînant une trop forte viscosité réalisée alors à 70°C. La faible concentration en sucres dans les échantillons d'EPS totaux et la faible quantité des échantillons de polysaccharides isolés ont imposé un nombre de scans importants (minimum 150) pour tous les spectres RMN-¹H.

Pour certains échantillons, des échanges protoniques ont été effectués avec des cycles d'ajout de D₂O et lyophilisation du mélange pour terminer par un ajout de D₂O avant l'analyse en RMN. Ceci permet de diminuer, sur les spectres, l'intensité du pic de l'H₂O.

2.4.9. Microscope à Force Atomique (AFM)

Les échantillons d'EPS observés en AFM ont été préparés en solution aqueuse à une concentration initiale de 1 mg/mL. A partir de cette solution mère, des dilutions ont été effectuées de façon à préparer des solutions à 100 à 10 µg/mL. Un échantillon de 5 µL de ces solutions diluées a été déposé sur un support de silicium. Après séchage à température ambiante dans une boîte de Petri, il a été observé en modes *tapping* (intermittent) avec un microscope Nanoscope V de Bruker. La fréquence de résonance était comprise entre 130 et 250 kHz et la constante de raideur était de 48 N/m.

2.5. Test antibiofilm

Ces tests ont été faits avec le kit BFRT[®] (voir la partie 2.9.). Le milieu de culture était le MB. Pour chaque souche bactérienne testée, des échantillons d'EPS totaux ou de polysaccharides partiellement purifiés ont été ajoutés dans les puits à une concentration finale de 250 µg/mL. Les échantillons testés ont été ajoutés dans les puits en même temps que la culture bactérienne. Le temps d'incubation était de 48 h. Chaque expérience a été effectuée en triplicat et 3 réplicats biologiques ont été analysés. Plusieurs témoins ont été réalisés : le milieu stérile, les composés seuls dans le milieu et les cultures bactériennes sans ajout de composés.

Chapitre 3

Identification des souches bactériennes isolées de la mer Méditerranée

3.1. Introduction

Des travaux effectués au laboratoire MAPIEM par Mercedes Camps (Camps, 2011) et Linda Guentas ont permis d'isoler 13 souches bactériennes de biofilms récoltés sur des surfaces inertes immergées dans la rade de Toulon (Tableau 9). Ce chapitre traite de : (i) leur identification par analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S, hybridation ADN/ADN et étude morphologique (aspect, forme, coloration Gram, pigmentation des colonies); (ii) leur étude physiologique (courbe de croissance, mobilité); (iii) leur caractérisation physico-chimique (MATS, potentiel ζ), (iv), une évaluation de leur capacité à former *in vitro* un biofilm et à adhérer à une surface en polystyrène. Ces résultats sont détaillés dans l'article ci-dessous et dans la partie 3.4.

3.2. Article

Identification of Bacterial Strains Isolated from the Mediterranean Sea Exhibiting Different Abilities of Biofilm Formation

Florence Brian-Jaisson · Annick Ortalo-Magné ·
Linda Guentas-Dombrowsky · Fabrice Armougom ·
Yves Blache · Maëlle Molmeret

Received: 26 August 2013 / Accepted: 2 December 2013
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract The Mediterranean Sea has rarely been investigated for the characterization of marine bacteria as compared to other marine environments such as the Atlantic or Pacific Ocean. Bacteria recovered from inert surfaces are poorly studied in these environments, when it has been shown that the community structure of attached bacteria can be dissimilar from that of planktonic bacteria present in the water column. The objectives of this study were to identify and characterize marine bacteria isolated from biofilms developed on inert surfaces immersed in the Mediterranean Sea and to evaluate their capacity to form a biofilm *in vitro*. Here, 13 marine bacterial strains have been isolated from different supports immersed in seawater in the Bay

of Toulon (France). Phylogenetic analysis and different biological and physico-chemical properties have been investigated. Among the 13 strains recovered, 8 different genera and 12 different species were identified including 2 isolates of a novel bacterial species that we named *Persicivirga mediterranea* and whose genus had never been isolated from the Mediterranean Sea. *Shewanella* sp. and *Pseudoalteromonas* sp. were the most preponderant genera recovered in our conditions. The phenotypical characterization revealed that one isolate belonging to the *Polaribacter* genus differed from all the other ones by its hydrophobic properties and poor ability to form biofilms *in vitro*. Identifying and characterizing species isolated from seawater including from Mediterranean ecosystems could be helpful for example, to understand some aspects of bacterial biodiversity and to further study the mechanisms of biofilm (and biofouling) development in conditions approaching those of the marine environment.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00248-013-0342-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Brian-Jaisson · A. Ortalo-Magné · L. Guentas-Dombrowsky ·
Y. Blache · M. Molmeret (✉)
MAPIEM EA 4323, Université de Toulon, 83957 La Garde Cedex,
France
e-mail: molmeret@univ-tln.fr

M. Molmeret
e-mail: maellemolmeret@hotmail.com

F. Brian-Jaisson
e-mail: brianjai@univ-tln.fr

A. Ortalo-Magné
e-mail: ortalo@univ-tln.fr

L. Guentas-Dombrowsky
e-mail: linda.dombrowsky@univ-tln.fr

Y. Blache
e-mail: blache@univ-tln.fr

F. Armougom
Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales
émergentes, Aix-Marseille Université, 13284 Marseille, France
e-mail: fabrice.armougom@univmed.fr

Introduction

In aquatic ecosystems, the majority of bacteria live attached to inert or living surfaces and form communities called biofilms [1–4]. Biofilms provide a more favourable niche with concentrated nutrients and increasing tolerance to stress, biocides and predators. The matrix of biofilm contains up to 97 % water [5] and polymeric compounds such as polysaccharides, proteins and nucleic acids [6]. In a marine environment, biofilm formed on immersed surfaces influences the subsequent formation of micro- and macro-fouling comprising larger organisms such as algae and barnacles [7, 8]. This leads to serious environmental and economical drawbacks for marine industries, for example decreasing hydrodynamic efficiency of ships and increasing weight of appliances deployed in seawater and material malfunctions [9].

Previous studies reported the identification and characterization of bacteria from marine biofilms whether they had developed on biotic or abiotic surfaces [10–12]. Analysis of communities using metagenomic studies performed on DNA directly isolated from biofilms allows the assessment of global diversity present in this environment but makes precise identification (species level) difficult and further characterization impossible [13–17]. The Mediterranean Sea has been rarely investigated for characterization of biofilm-isolated bacteria [18–20] in particular from inert surfaces. The Mediterranean Basin has been suggested as a hot spot for deep sea and coastal marine biodiversity [21]. Knowledge relative to species identified in the Mediterranean ecosystems should be helpful to understand species displacement and invasion or development of biofilm/fouling on surfaces.

This study aimed at the characterization of marine bacteria isolated from biofilms developed on inert surfaces immersed in the Mediterranean Sea as well as the evaluation of their capacity to form a biofilm in vitro. Here, 13 marine bacterial strains have been isolated from different supports immersed in seawater in the bay of Toulon (France) [22]. These strains have been identified and characterized regarding different biological and physico-chemical properties. Among the 13 strains, 8 different genera and 12 different species were recovered including 2 strains from a novel bacterial species named *Persicivirga mediterranea*, whose genus had never been isolated from the Mediterranean Sea. *Shewanella* sp. and *Pseudoalteromonas* sp. were isolated more than once on different substrata. Following phenotypical characterization, one isolate belonging to the *Polaribacter* genus differed from

all the other ones by its hydrophobic properties and poor ability to form biofilm in vitro.

Materials and Methods

Bacterial Strains and Growth Conditions

Bacterial strains were isolated from the Mediterranean Sea (bay of Toulon, France, 43°06'23"N–5°57'17"E) in 2008 and 2010 [22, 23]. The *Paracoccus* 4M6 strain was used as a control [24]. The bacterial strains used in this study (TC for Toulon Collection) are listed in Table 1. Three marine media were used to cultivate bacteria: Vaatanen nine salt solution (VNSS), marine agar (MA) and marine broth (MB) (BD®, Franklin Lakes, NJ, USA). For growth curves and phenotypical assays, the strains were grown in VNSS medium at 20 °C in a rotary shaker (120 rpm), except for the TC1 and TC6 strains, which were only able to grow in MA or MB medium (at 20 °C, 120 rpm). All strains were stored at –80 °C in 25 % glycerol medium until use.

Amplification and Sequencing of 16S rRNA Genes

Genomic DNA was extracted with the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). The 16S rRNA genes were amplified by PCR using universal primers [14], specific primers for *Shewanella* genus [25] and specific primers for *Pseudoalteromonas* genus [14]. The localisation of primers within the 16S rDNA sequence is shown in Fig. 1 and the primers are listed in Table 2. PCR amplifications were performed using

Table 1 Isolation of bacterial strains. For each strain, information about isolation conditions are presented: date of isolation, locality, duration and depth of immersion and substratum of isolation

Strains	Date of isolation	Locality of plate's immersion	Duration of immersion (h)	Substratum of isolation	Depth of immersion (m)
TC1	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Polystyrene	1
TC4	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Polystyrene	1
TC5	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13	1
TC6	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13	1
TC7	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13	1
TC8	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13	1
TC9	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13	1
TC10	13 February 2008	Mourillon (Toulon)	6	Silicone ELP08/55554/13	1
TC11	10 June 2010	Military Harbor of Toulon	24	Fluorinated silicone ELP08/55554/13	1
TC12	10 June 2010	Military Harbor of Toulon	24	Fluorinated silicone ELP08/55554/13	1
TC13	10 June 2010	Military Harbor of Toulon	24	Fluorinated silicone ELP08/55554/13	1
TC14	10 June 2010	Military Harbor of Toulon	24	Fluorinated silicone ELP08/55554/13	1
TC15	10 June 2010	Military Harbor of Toulon	24	Fluorinated silicone ELP08/5555/1	1

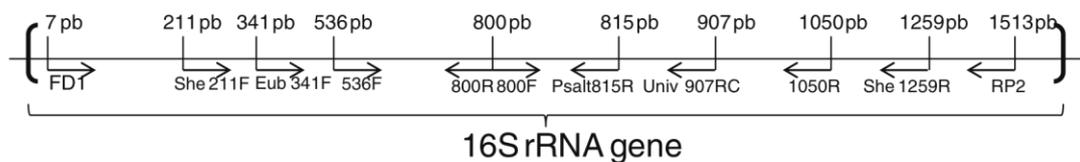


Fig. 1 Localisation of all primers used in PCR amplification of the 16S rRNA sequence. Brackets represent the beginning and the end of gene

reaction mixtures containing 1 μ M of each primer, 10–60 ng of DNA, 1.25 U of HotStar HiFidelity DNA polymerase (QIAGEN) and HotStar HiFidelity PCR buffer (QIAGEN, containing dNTPs). Reactions without DNA were used as negative control. PCR reactions were performed using a Thermal Cycler TC 5000 (TECHNE, Chelmsford, England) under the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles consisting of 95 °C for 15 s, 56 °C for 1 min and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. Amplified PCR products were analysed by electrophoresis on 1 % (w/v) agarose in 1 \times TAE (pH 8). Gel pilot 1 kb Plus Ladder DNA molecular Weight Markers (QIAGEN) was used as the molecular weight standard. PCR products were sequenced by GATC Biotech (Konstanz, Germany).

Phylogenetic Analysis

The sequenced PCR products were trimmed for low base quality and assembled using the CLCgenomic workbench5 software. The assembled 16S rRNA sequences were searched for sequence similarities using the Blastn algorithm against the reference 16S ribosomal RNA database of the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and of RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>). The best blast hits were selected

Table 2 Sequences of primers used in PCR amplifications. Eub341F, Univ907RC, fD1, rP2, 800R, 800F, 1050R and 536F are universal primers. Psalt815R is a primer specific of the *Pseudoalteromonas* genus. She211F and She1259R are specific of the *Shewanella* genus

Primer name	Sequence (5'→3')	References
Eub341F	CCT-ACG-GGA-GGC-AGC-AG	[14]
Univ907RC	CCG-TCA-ATT-CCT-TTG-AGT-TT	[14]
Psalt815R	CCA-GCT-TCT-AGT-AGA-CAT-CGT-T	[14]
She211F	CGC-GAT-TGG-ATG-AAC-CTA-G	[25]
She1259R	GGC-TTT-GCA-ACC-CTC-TGT-A	[25]
fD1	AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG	[83]
rP2	ACG-GCT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT	[83]
800R	CTA-CCA-GGG-TAT-CTA-AT	[83]
800F	ATT-AGA-TAC-CCT-GGT-AG	[83]
1050R	CAC-GAG-CTG-ACG-ACA	[83]
536F	CAG-CAG-CCG-CGG-TAA-TAC	[83]

and retrieved for multiple sequence alignment with the assembled 16S rRNA sequence using Muscle software version 3.6 [26]. The multiple sequence alignments were manually edited and curated when necessary with the sequencing chromatograms. Finally, the phylogenetic tree was inferred using MEGA version 5 with the neighbor-joining algorithm, bootstrap re-sampling and the Kimura 2 correction for nucleic acid [27, 28].

DNA–DNA Hybridization

These experiments were subcontracted by Leibniz-Institut DSMZ GmbH (Braunschweig, Germany). Cells were disrupted by using a Constant Systems TS 0.75 KW (IUL Instruments, Germany) and the DNA in the crude lysate was purified by chromatography on hydroxyapatite as described by Cashion et al. [29].

DNA–DNA hybridization was carried out on *Polaribacter* sp. strain TC5, *Agarivorans* sp. strain TC6, *Shewanella* sp. strain TC9 and *Shewanella* sp. strain TC10 against *Polaribacter dokdonensis* DSM 17204^T, *Agarivorans albus* LMG21761, *Shewanella surugensis* DSM 17177^T and *Shewanella japonica* DSM 15915^T, respectively, as described by De Ley et al. under consideration of the modifications described by Huss et al. using a model Cary 100 Bio UV/VIS spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6 \times 6 multicell changer and a temperature controller with in situ temperature probe (Varian) [30, 31].

Bacterial Growth

Colonies on VNSS plates were suspended in 5 mL of VNSS medium. Two of them, TC1 and TC6, were not able to grow homogeneously in liquid media (due to the presence of flocculates even in the presence of Tween), which prevented us from establishing normal growth curves. They have been thus removed for the phenotypical studies involving the determination of the post-exponential growth phase. All the other bacterial strains were grown at 20 °C under shaking conditions (120 rpm) overnight. From this subculture, cells were resuspended in VNSS medium at 0.1 of absorbance ($A_{600\text{ nm}}$) and kinetics were performed at 20 °C under shaking conditions (120 rpm). For each bacterial strain, the medium turbidity was measured at 600 nm using a Thermo Scientific GENESYS 20 spectrophotometer

(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the concentration in CFU per milliliter was evaluated every hour. For the bacteria that formed flocs in medium, homogenization was performed using Tween 80 at 0.001 % (w/v) and PPNa 0.2 % (v/v). For CFU numeration, serial dilutions were made in microplates and 10 µL of each dilution was deposited on MA Petri dishes. Each measurement was repeated three times from independent cultures.

Physiological and Biochemical Characterizations

Bacteria in post-exponential growth phase were used to establish their morphological and biochemical properties including Gram coloration, direct observation by optic microscopy and API 20 NE, API ZYM and API 50 CH/B tests (bioMérieux, Craponne, France).

Motility

Strain motility was analysed by optic microscopy at post-exponential phase (Table 3). Swimming, swarming and twitching motilities were evaluated on VNSS medium with agar 0.3 % (w/v), 0.5 % (w/v) and 1.5 % (w/v), respectively [32]. For swimming and swarming assays, 5 µL of bacterial culture was deposited with a sterile tip on the agar surface. For twitching assay, the center of the agar surface was pierced with a tip dipped in the bacterial culture. The plates were incubated at 20 °C for

Table 3 Gram staining, colony colour, beginning of stationary phase and motility of each bacterial strain. For growth curve, each measurement was repeated three times with three independent cultures in VNSS medium at 20 °C (120 rpm). Optical microscopy was used to determine motility at the post-exponential phase

Strains	Gram	Colony colour	Beginning of stationary phase (h)	Motility
TC1	+	Pale orange	ND	ND
TC4	-	Orange	11	Non-motile
TC5	-	Yellow	12	Non-motile
TC6	-	Beige	ND	ND
TC7	-	Orange	10	Non-motile
TC8	-	Beige	7	Motile
TC9	-	White	7	Motile
TC10	-	Salmon beige	7	Motile
TC11	-	Beige	5	Motile
TC12	-	White	12	Motile
TC13	-	Yellow	20	Motile
TC14	-	Purple	11	Motile
TC15	-	White	7	Motile

ND no data

48 h. Each measurement was repeated three times with independent cultures.

Microbial Adhesion to Solvents (MATS)

The protocol was described by Bellon-Fontaine et al. [33] and revisited by Grasland et al. [10]. Bacteria were harvested in stationary phase by centrifugation at 6,000 rpm for 10 min, washed twice and resuspended in 1.5 mM NaCl to an OD_{400 nm} of 0.8 (A₀). Then, 2.4 mL of this suspension was added to 0.4 mL of a solvent and vortex-mixed for 1 min. To allow complete phase separation, mixtures were incubated for 15 min at room temperature. The absorbance at 400 nm of the aqueous phase was measured (A₁). Four solvents were used: chloroform, ethyl acetate, hexadecane and decane. The percentage of microbial adhesion to each solvent was calculated as $(1 - (A_1/A_0)) \times 100$. Each measurement was performed in triplicates and repeated three times.

Zeta Potential Measurement

Zeta potential was used to determine the cell surface net charge of bacteria [34–36]. The following protocol was described by Grasland et al. [10] with some modifications. For each strain, a stationary phase culture (in VNSS medium) was centrifuged 10 min at 6,000 rpm, washed twice and resuspended in 1.5 mM NaCl solution. The lower NaCl molarity was used to prevent the interference between the electrical field and the presence of ions [37]. The final concentration of bacteria was 1×10^5 CFU/mL. The pH was adjusted at pH 7.5. Measurements were performed at 20 °C and under an electric field of 120 V (Zeta sizer Nanos-ZS MALVERN instruments). Each measurement was repeated three times with three independent cultures.

Biofilm Ring Test®

The protocol was described by Chavant et al. [38]. Briefly, this test developed by Biofilm Control is based on mobility of magnetic microbeads inoculated in post-exponential bacterial suspension. Post-exponential bacteria, prepared by diluting 1/250 bacterial suspension of $A_{600\text{ nm}}=1$ in VNSS, MB or MBG (MB with 3 % glucose) media supplemented with 0.004 % (w/v) of Tween 20, were inoculated with the beads (TON006N) in 96-well microplates. Following incubation for 0, 24, 48 and 72 h, biofilm formation was evaluated for each strain, after magnetisation, scan of the microplates and analysis of the data by the Biofilm Element software. Results were expressed as Biofilm Formation Index, ΔBFI (BFI control–BFI sample). Each experiment was performed three times in triplicates.

Statistical Analysis

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis of the motility and biofilm formation results. Data were analysed using one-way and two-way ANOVA and treatment effects were separated using Bonferroni and Turkey's multiple comparison post hoc tests. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Nucleotide Sequence Accession Numbers

The nucleotide sequence data reported in the present study were deposited in the GenBank nucleotide sequence database under the accession numbers KF472180 to KF472192 for the 16S rRNA sequences of TC1 to TC15.

Results

Bacterial Isolation and Phylogenetic Analysis

All strains were isolated from different substrata immersed in the bay of Toulon (Mourillon and Military Harbor), France (Table 1). Colonies presented different shapes and colours on VNSS plates (Table 3). The majority of strains generated non-mucoid colonies (except for TC9). The colony colour of TC6, TC8 and TC11 strains was rather beige than white, TC10 going more toward the salmon colour. Only three strains had

white colonies (TC9, TC12 and TC15). TC14 colonies were violet. TC1, TC4, TC5, TC7 and TC13 strains produced orange, pale orange or yellow colonies.

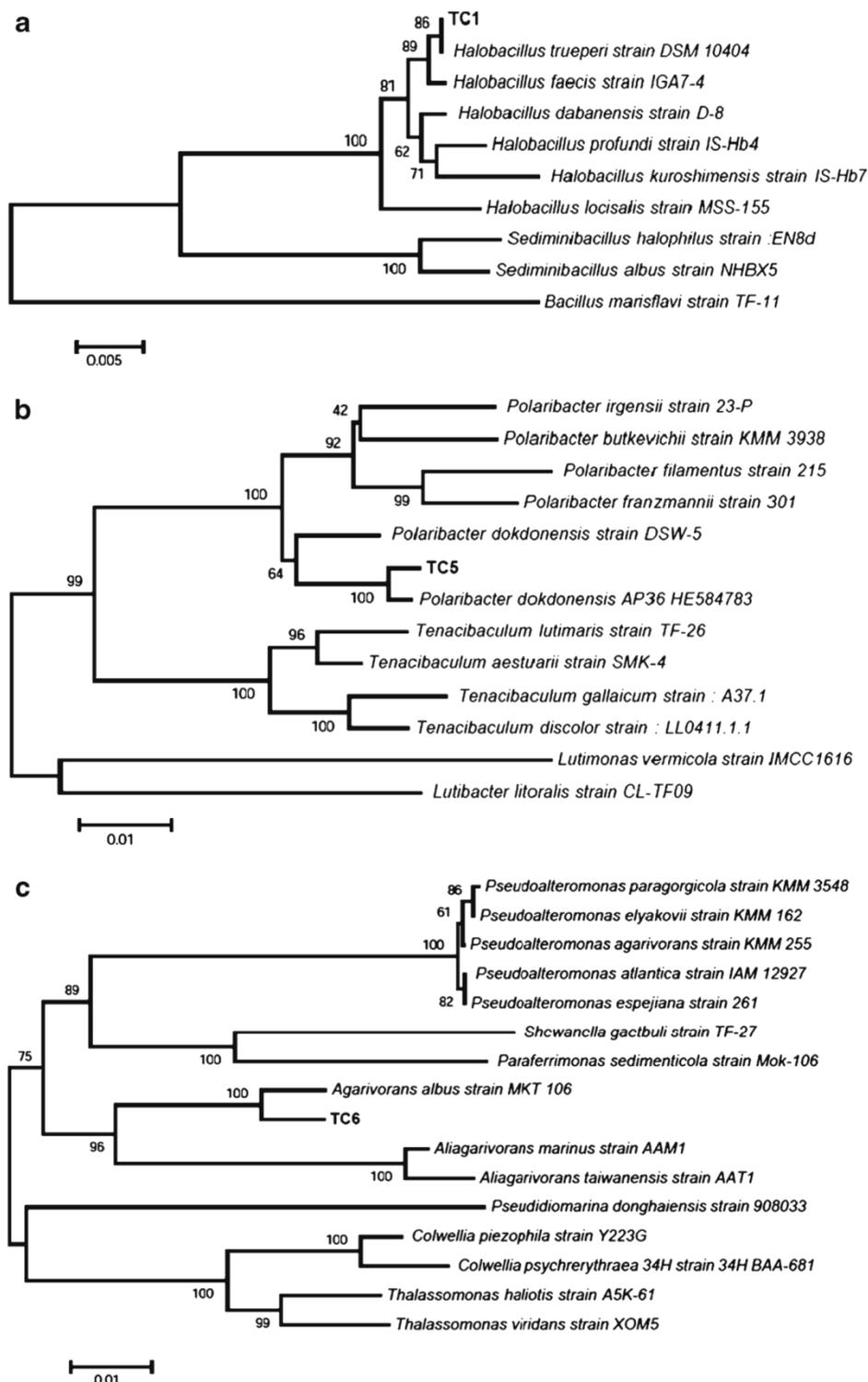
The bacteria have been identified using 16S gene alignments against the NCBI and RDP databases, 16S phylogenetic reconstructions and DNA–DNA hybridizations which have been performed on a few strains according to their 16S alignment results. The phylogenetic analysis shows that among the Proteobacteria phylum, the γ -Proteobacteria class was recovered predominantly with four genera, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Agarivorans* and *Shewanella*. The two other classes of bacteria isolated were the Bacilli class belonging to the Firmicutes phylum and the Flavobacteria class from the Bacteroidetes phylum (Table 4). From the 16S rRNA sequence analysis, TC1, TC12, TC8, TC13, TC14 and TC15 strains had a percentage of identity above 98.70 %, as recommended by some authors to ascertain their identification [39, 40]. TC1 was the only member of *Halobacillus trueperi* species (99.7 % identity) of the Bacilli class and TC12 belonged to *Alteromonas genovensis* (99.65 % identity). Both of these affiliations were in accordance with the phylogenetic tree reconstructed in Figs. 2a and 3b (Table 4). TC8, TC13, TC14 and TC15 belonged to the *Pseudoalteromonas* genus and their closest matches were *Pseudoalteromonas lipolytica*, *Pseudoalteromonas citrea*, *Pseudoalteromonas ulvae* and *Pseudoalteromonas tetraodonis* with 100, 99.63, 98.82 and 99.36 % identity, respectively (Table 4 and Fig. 4b). The results were in accordance with the reconstruction of the phylogenetic tree for strains TC8 and TC14 (Fig. 4b). The position for TC13 and TC15 strains in terms of evolution was

Table 4 Taxonomic affiliation based on the 16S rRNA alignment for each strain. TC1 belonged to the phylum of the Firmicutes and Bacilli, Bacillales, *Bacillaceae* class and subgroups. TC4, TC5 and TC7 belonged to the Bacteroidetes, Flavobacteria, Flavobacteriales and *Flavobacteriaceae*; all the others belonged to the Proteobacteria, γ -

Proteobacteria and *Alteromonadales*, with TC6 and TC12 being an *Alteromonadaceae*; TC8, TC13, TC14 and TC15 belonging to the *Pseudoalteromonadaceae*; and TC9, TC10 and TC11 to the *Shewanellaceae*. Alignments were performed against NCIB and RDP databases

Name	Length	Score	% identity	% coverage	Taxonomic best alignment hits	Putative designation
TC1	1,373	2,684.6	99.71	99.8	<i>Halobacillus trueperi</i> strain DSM 10404	<i>Halobacillus trueperi</i> TC1
TC4	1,484	2,399.14	95.77	98.7	<i>Persicivirga dokdonensis</i> DSW-6 strain DSW-6	<i>Persicivirga (Nonlabens) mediterranea</i> TC4
TC5	1,434	2,524.03	97.60	98.7	<i>Polaribacter dokdonensis</i> strain DSW-5	<i>Polaribacter</i> sp. TC5
TC6	1,399	2,573.59	98.48	98.5	<i>Agarivorans albus</i> strain MKT 106	<i>Agarivorans</i> sp. TC6
TC7	1,376	2,252.45	96.15	98.2	<i>Persicivirga dokdonensis</i> DSW-6 strain DSW-6	<i>Persicivirga (Nonlabens) mediterranea</i> TC7
TC8	1,386	2,560	100	100	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> strain K-W45	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8
TC9	1,106	2,002.67	97.83	100	<i>Shewanella surigensis</i> strain c959	<i>Shewanella</i> sp. TC9
TC10	1,141	2,089.89	98.70	100	<i>Shewanella japonica</i> strain KMM 3299	<i>Shewanella</i> sp. TC10
TC11	1,130	2,240.55	100.00	100.0	<i>Shewanella pneumatophori</i> strain SCRC-2738	<i>Shewanella</i> sp. TC11
TC12	1,444	2,825.35	99.65	99.9	<i>Alteromonas genovensis</i> strain LMG 24078	<i>Alteromonas genovensis</i> TC12
TC13	1,398	2,631.08	99.63	96.8	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> strain CERBOM CH10	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TC13
TC14	1,394	2,563.68	98.82	97.2	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i> strain UL12	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i> TC14
TC15	1,412	2,728.21	99.36	100	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> strain IAM 14160	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. TC15

Fig. 2 Distance matrix tree based on the sequence alignment of the 16S rDNA genes of the *Halobacillus* (a), *Polaribacter* (b) and *Agarivorans* (c) genera and other closely related bacteria. Distances were calculated according to the algorithm Kimura 2 and trees were constructed by the neighbour-joining method. *Bacillus* sp. (a), *Lutibacter* sp. (b) and *Thalassomonas* sp. and *Colwellia* sp. (c) were chosen as outgroups for trees a, b and c, respectively. Bootstrap values (500 replicates) are indicated at branching points. Bars represent 0.005 (a) and 0.01 (b, c) substitutions per nucleotide position



not very clear, being very close to other strains, which was in correlation with the blast results, where several strains presented identical percentage of identity and/or score (data not shown). Therefore, we believe that the species name of TC13

and TC15 could not be ascertained in contrast with the ones of TC1, TC12, TC8 and TC14 (Table 4).

In the case of the strains TC4 and TC7, the percentages of identity with their closest matches were 95.77 and 96.15 %,

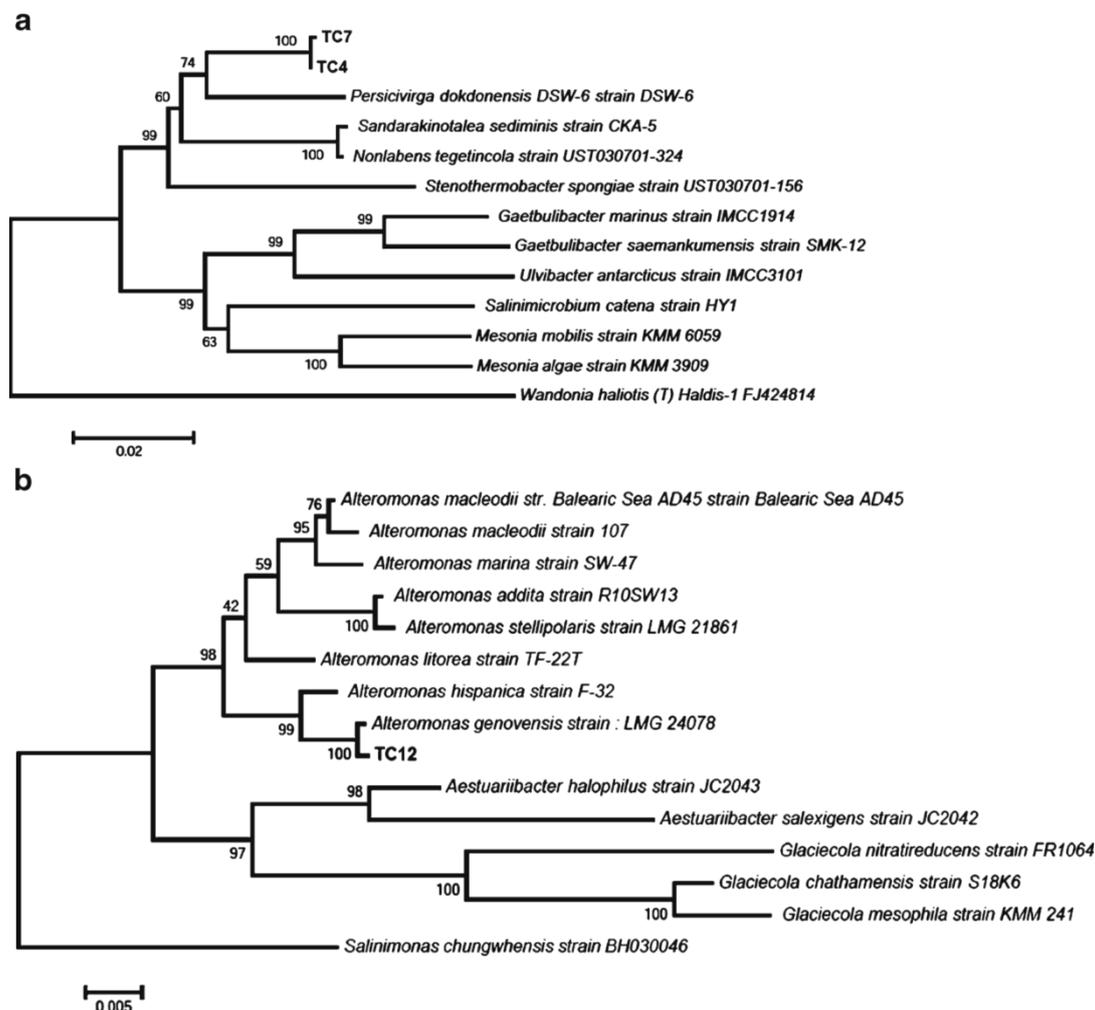


Fig. 3 Distance matrix tree based on the sequence alignment of the 16S rDNA genes of the *Persicivirga* (*Nonlabens*) (a) and *Alteromonas* (b) genera and other closely related bacteria. Distances were calculated according to the algorithm Kimura 2 and trees were constructed by the

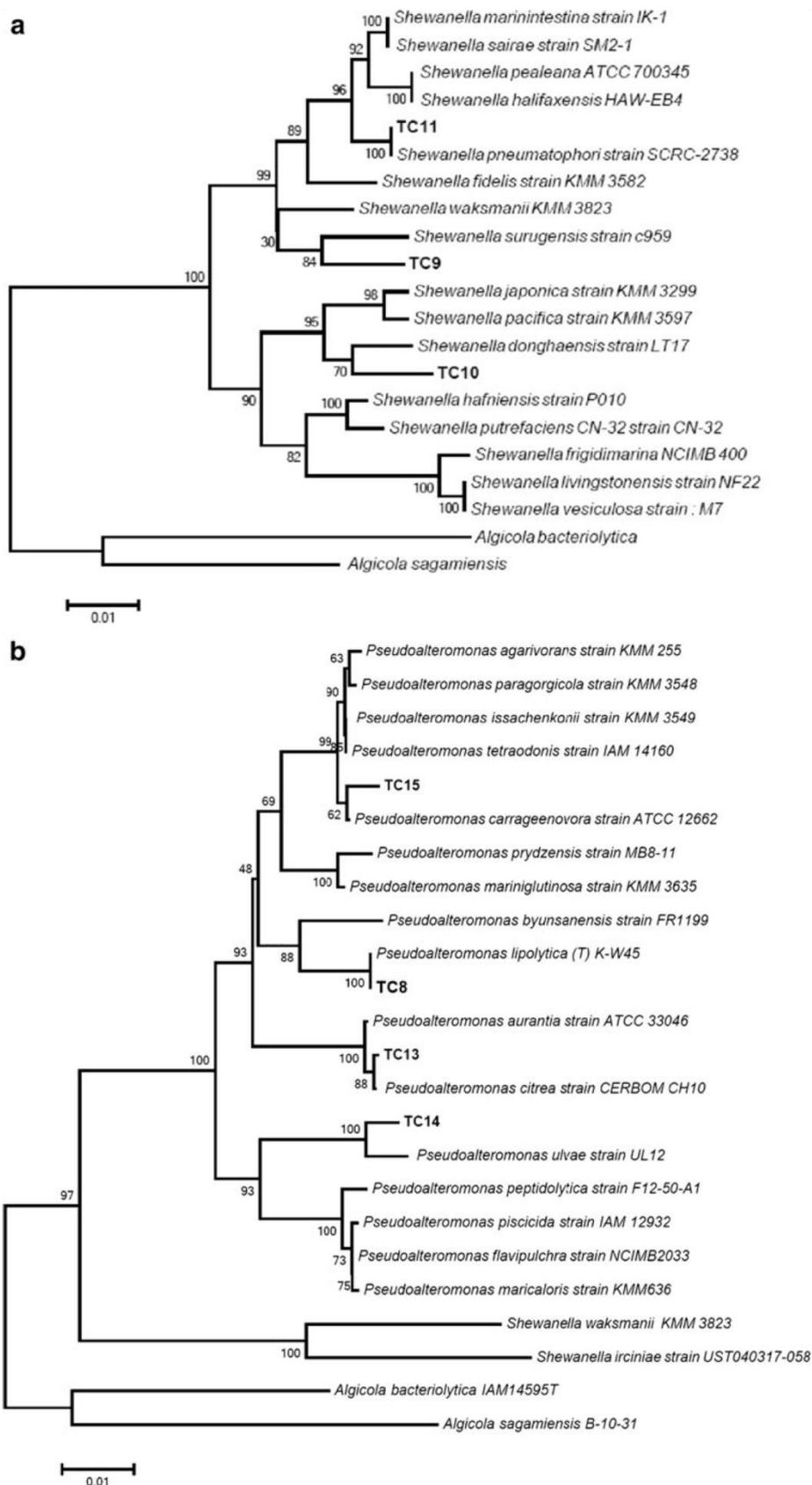
neighbour-joining method. *Wandonia* sp. (a) and *Salinimonas* sp. (b) were chosen as outgroups for trees a and b, respectively. Bootstrap values (500 replicates) are indicated at branching points. Bars represent 0.02 (a) and 0.005 (b) substitutions per nucleotide position

respectively, which was below the admitted minimum cutoff of 97 % for the definition of a species. TC4 and TC7, whose closest match belonged to the *Persicivirga dokdonensis* species, are probably part of the genus *Persicivirga*, which has been recently renamed *Nonlabens* by Yi et al. [41]. Their position in the phylogenetic tree (Table 4, Fig. 3a) among the *Persicivirga* and *Nonlabens* strains confirmed their affiliation to this genus and strongly suggested that they are members of a new species. The alignment of TC4 and TC7 sequences against each other showed a 99.60 % identity on 1,376 pb (data not shown). Therefore, TC4 and TC7 belonged most probably to the same new species for which we propose the name of *Persicivirga* (*Nonlabens*) *mediterranea*.

Identification of the following strains, TC5, TC6, TC9 and TC10, could not be confirmed at the species level as their percentage of identity was between 97.60 and 98.70 %. TC5

was clustered with the *P. dokdonensis* species (97.6 % identity), while TC6 was close to the member of *A. albus* (98.48 % identity). For both, the result of the sequence alignment in the NCBI and RDP web sites matched the results found in the phylogenetic trees (Table 4 and Fig. 2b, c), and the result of the blast showed a gap in the percentage of identity between the closest strain, i.e. *P. dokdonensis* or *A. albus* and the following hits (data not shown). However, DNA–DNA hybridization results (data not shown) suggested that both TC5 and TC6 did not belong to their closest matches. Regarding TC9 and TC10, which were affiliated to the *Shewanella* genus, the percentages of identity with their closest matches, i.e. 97.83 % for TC9 with *S. surugensis* and 98.70 % for TC10 with *S. japonica*, suggested that we cannot conclude on their affiliation at the species level. DNA–DNA hybridization (data not shown) performed

Fig. 4 Distance matrix tree based on the sequence alignment of the 16S rDNA genes of the *Shewanella* (a) and *Pseudoalteromonas* (b) genera and other closely related bacteria. Distances were calculated according to the algorithm Kimura 2 and trees were constructed by the neighbour-joining method. *Algicola* sp. was chosen as outgroups for trees a and b. Bootstrap values (500 replicates) are indicated at branching points. Bars represent 0.01 (a, b) substitutions per nucleotide position



on TC9 and TC10 with *S. surugensis* and *S. japonica*, respectively, indicated that they did not belong to their respective matching species. Like for TC11, another *Shewanella* strain, which had 100 % identity with *Shewanella pneumatophori*, the sequences recovered were too short to ascertain their species affiliation.

Taken together, among the 13 strains recovered, 3 belonged to the *Shewanella* genus and 4 to the *Pseudoalteromonas* genus. None of the species of *Shewanella* could be ascertained while only two (TC8 and TC14) out of four *Pseudoalteromonas* appeared to belong to the species of their closest alignment hits. We identified two other strains at the species level, TC1 and TC12 belonging to *H. trueperi* and *A. genovensis*, respectively. At last, we believe that TC4 and TC7 were two strains from a novel species of the *Persicivirga* (*Nonlabens*) genus, that we named *P. mediterranea*.

Physiological and Biochemical Characterizations

Except TC1 and TC6, which flocculated in liquid media even in the presence of Tween and therefore could not be studied further, all the other strains were grown in VNSS medium at 20 °C under shaking conditions (120 rpm) before performing phenotypical characterization. Growth kinetics were performed in order to determine the different growth phases. For each strain, growth curves described by absorbance and CFU per milliliter determination (data not shown) allowed the estimation of the beginning of the post-exponential phase necessary for all the other phenotypical tests (Table 3). As expected, the studied isolates presented different growth curves and incubation times necessary to reach post-exponential phase. TC4 and TC7, which belonged to the same species, grew with similar rates (Table 3). The group of strains belonging to the *Shewanella* genus showed also similar growth rates. In contrast, strains belonging to the *Pseudoalteromonas* genus required very different times to reach the post-exponential phase.

Gram staining, morphological observation by optic microscopy, API 20 NE, API ZYM and API 50 CH tests were performed to establish morphological, physiological and biochemical properties of the isolated bacterial strains. Except TC1, strains were negative for the Gram coloration (Table 3). For all strains, bacteria were small rod-shaped. API 20 NE, API ZYM and API 50 CH assays were used to determine metabolic activities, such as enzymatic activities, fermentation and utilization of sugars (Tables S1 and S2). The three types of API tests showed dissimilar patterns for all strains except between TC4 and TC7, which strongly suggested that they belonged to the same species. In contrast with all the other strains, TC5 was able to ferment five sugars: L-arabinose, methyl- α -D-mannopyranoside, cellobiose, saccharose and trehalose.

Motility

Motility of all strains, except TC1 and TC6, was first evaluated by optical microscopy. Only TC4, TC5 and TC7 appeared non-motile under a microscope, while the others were all mostly mobile (Table 3). Swarming, twitching and swimming were also assessed (Fig. 5). The 4M6 strain, a marine *Paracoccus* strain, was used as control [10]. This strain preferentially used swimming (up to 28 mm) to move, while it was able to swarm in weak proportion (up to 6 mm) and it did not move by twitching (0 mm) [42]. In the swimming test performed in this study, 4M6 was able to move further away (8.5 cm), while the test had been done in the same conditions (Fig. 5a). Similar behaviors were observed for the swarming and twitching assays (Fig. 5b, c). Migrations by swimming for all the isolates were significantly lower than the one obtained with 4M6 ($p < 0.05$). The results also showed that TC4, TC5 and TC7 were the poorest swimmers along with TC9 and TC12. The isolates, which progressed the most on the plates, TC8, TC10 and TC11, belonging to either the *Pseudoalteromonas* or the *Shewanella* genus, were only able to swim half the distance than did 4M6. Overall, TC8, TC10 and TC11, but also TC13, TC14 and TC15 strains were able to swim, however, in a lesser extent than 4M6. For the swarming motility, TC8, TC9, TC11 and TC15 migrations were not significantly different from 4M6. All the other strains showed a significantly lower ability to swarm ($p < 0.05$). Overall, as did 4M6, they had a weak ability to move by swarming. At last, as was 4M6, the strains were poor twitchers, their displacement being not significantly different from 4M6 (around 0.2 cm), except from TC15 (up to 0.5 cm). While TC15 migration was not significantly different from 4M6, it appeared significantly different from TC4, TC5, TC7, TC8, TC9 and TC13, as their displacement was even lower (0.12 cm) ($p < 0.05$).

Taken together, these results showed that most of the strains were able to swim on a small area, compared to 4M6, with TC4, TC5 and TC7 being the least efficient of all. Their ability to swarm remained overall similar or less important than that of 4M6, in particular for TC4, TC5 and TC7. Their twitching ability was overall statistically similar than that of 4M6. Compared to TC15 which twitched a little better than 4M6, the strains TC4, TC5, TC7 and TC9 were the least efficient in this mode of migration.

Microbial Adhesion to Solvents (MATS)

The test of microbial adhesion to solvents implies the utilization of solvents which are acid (chloroform) or basic (ethyl acetate), apolar (decane and hexadecane) or monopolar (chloroform and ethyl acetate) solvents. Therefore, bacterial adhesion to solvents allows the determination of the hydrophobic/hydrophilic and electron donor/electron acceptor character of bacterial strains [10, 33].

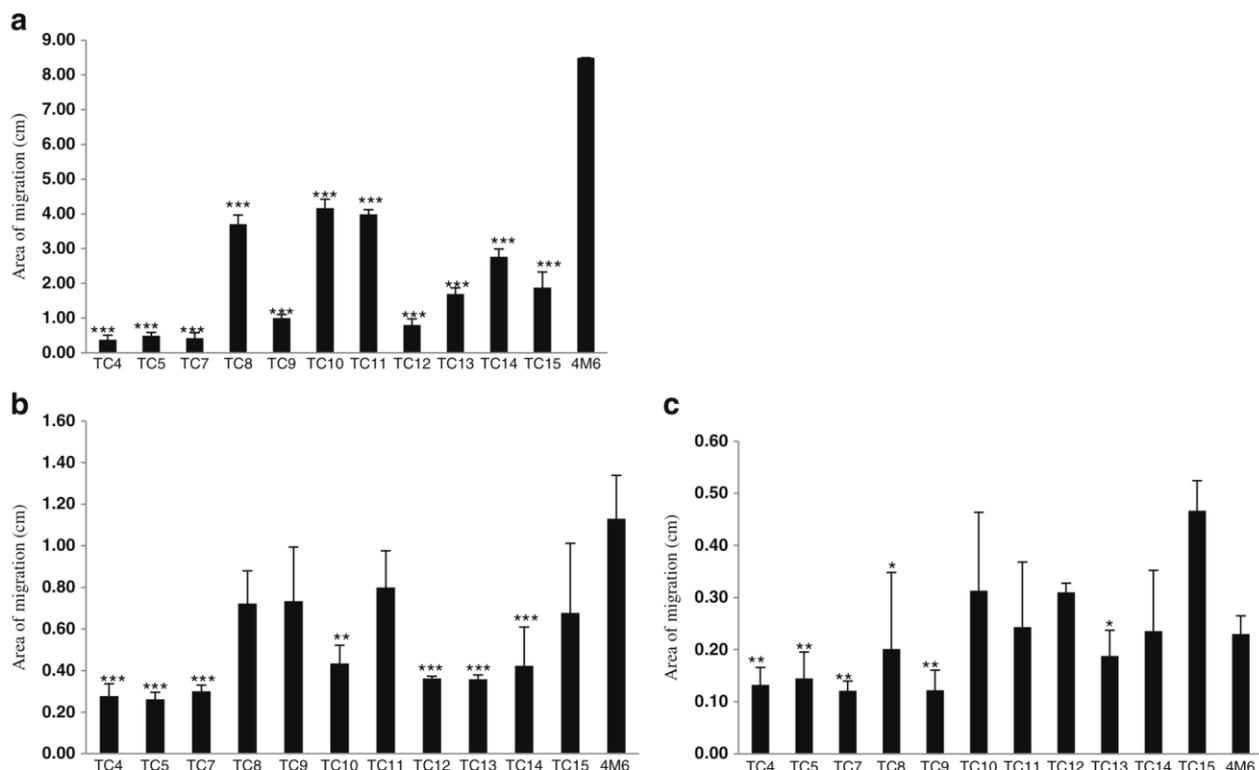


Fig. 5 Motility assays. Motility was measured for each bacterial strain on agarose plates. Cells were inoculated with a tip from an overnight culture. Agarose plates were incubated for 48 h at 20 °C. For swimming motility (a), bacteria were spotted on VNSS medium with 0.3 % agar; swarming motility (b) was analyzed on VNSS medium with 0.5 % agar; twitching motility (c) was evaluated on VNSS medium with 1.5 % agar. The area of

migration corresponds to the circular area diameters of the bacterial growth. Each measurement was repeated three times with three independent cultures. For statistical analyses, migration of each strain was compared to that of 4M6 in a and b and to 4M6 (not shown as non statistical difference with each strain was found) and TC15 migrations (as marked by the stars) in c

The higher affinity displayed by both bacteria for chloroform, an acidic solvent, is due to the basic or electron-donating property of bacterial cells, and conversely, their lower affinity for a basic solvent is due to a very weak acidic or electron-accepting property.

Based on this comparison, bacterial adhesion to acid solvents shows the electron donor properties of the cells while adhesion to basic solvents determines the electron acceptor properties of the bacteria. Thus, most of the bacteria possessed rather an electron donor character except TC9 (did not express any electron donor or electron acceptor properties), TC10, TC13 and TC15 (Fig. 6).

Regarding the adhesion to monopolar versus apolar solvents, most of the strains, except TC5, adhered weakly (<25–30 %) to apolar solvents compared to the polar ones, suggesting that these strains are rather hydrophilic. Therefore, TC5 was the only strain expressing an adhesion to non-polar solvents superior to 50 % for at least one of the apolar solvents, suggesting that it presented hydrophobic properties [10, 33]. In conclusion, the majority of bacteria had hydrophilic character; only TC5 presented a more hydrophobic character.

Zeta Potential

Zeta potential allows the determination of the bacterial cell surface net charge. All studied bacterial strains had a negative zeta potential ranging from -29.96 to -46.42 mV (Table S3), indicating a negative net electrostatic charge on their surfaces. The different values attested the variability in the composition of each bacterial surface depending on the strains.

Biofilm Ring Test

Kinetics of biofilm formation were performed at 0, 24, 48 and 72 h using the Biofilm Ring Test in VNSS medium. Results can be displayed as pictures (Fig. 7a) or expressed as biofilm formation index (Δ BFI) as shown in Fig. 7b [38]. The majority of bacterial strains were able to form a biofilm. TC8, TC9, TC11, TC12, TC13, TC14 and TC15 formed a biofilm within 24 h with a Δ BFI above 15, which is considered as a mature biofilm. TC4 and TC7 also formed a biofilm within 24 h but the Δ BFI was comprised between 10 and 17, during the 72 h period. The slowest strains were TC10, as its biofilm was

Marine Bacteria Isolated from Biofilms

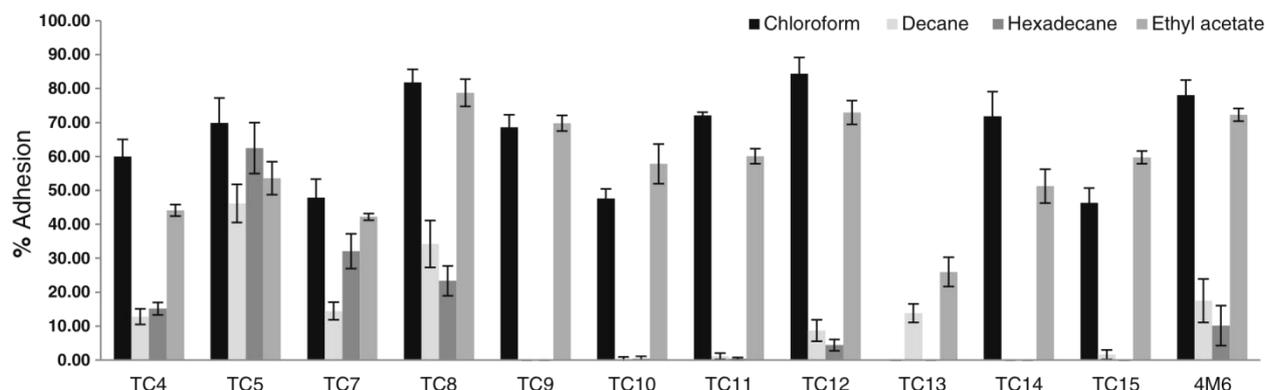


Fig. 6 Microbial adhesion of solvents (MATS). Adhesion percentage of each bacterial strains suspended in 1.5 mM NaCl solution to different solvents (chloroform, decane, hexadecane and ethyl acetate). Bars represent the standard deviation obtained from the three independent measures.

Differences of adhesion percentages between these solvents reflect the electron donating or accepting and the hydrophobicity character of the bacterial surface

formed ($p < 0.05$) at 48 h, and TC5 which formed almost no biofilm, even at 72 h ($\Delta BFI < 2$ corresponding to “no biofilm”). When the same experiment was performed comparing

the VNSS, MB or MBG media on the strains presenting the lowest (TC5) or the highest (TC8, TC9, TC11, TC12, TC13, TC14 and TC15) biofilm formation capacity, we observed a

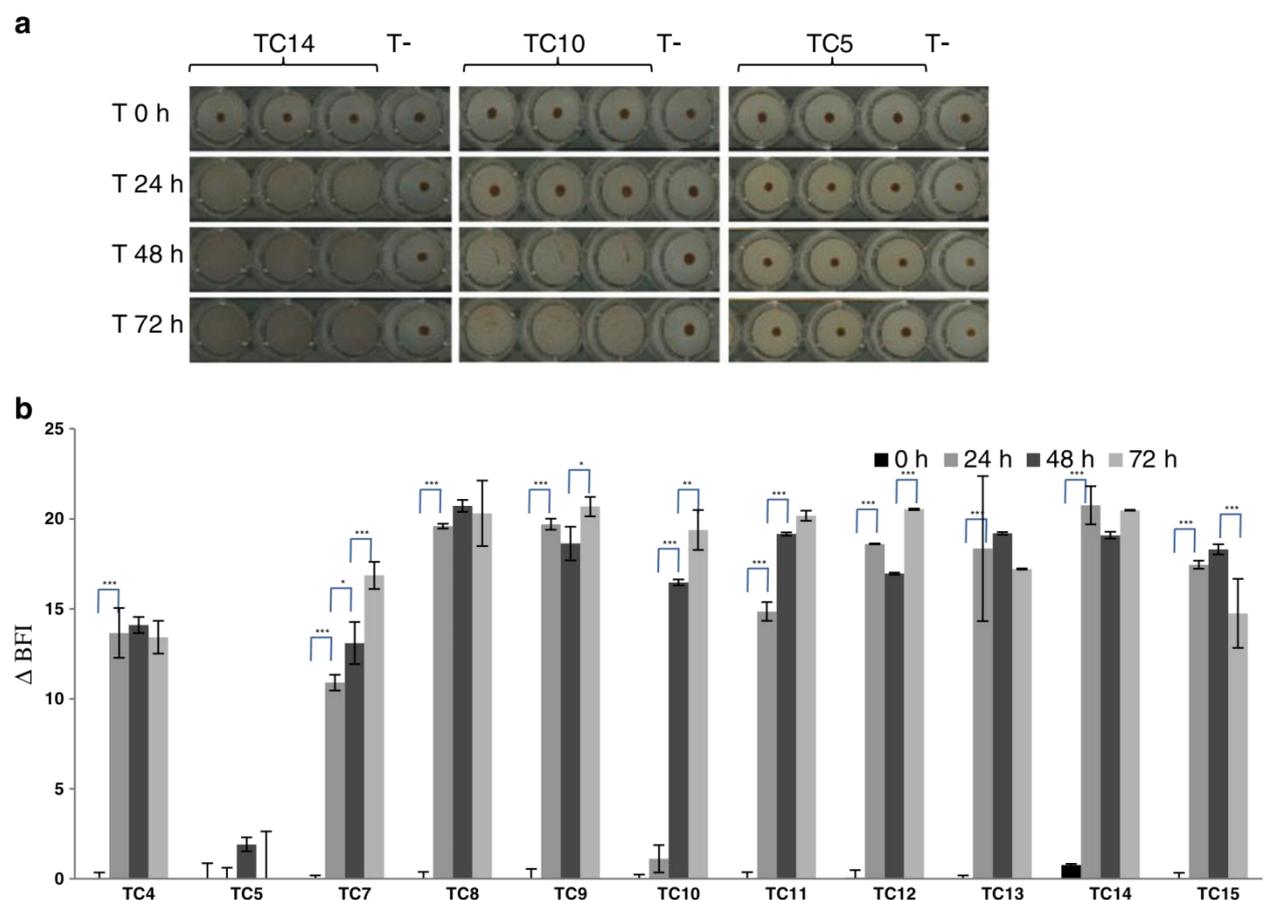


Fig. 7 Kinetic of biofilm formation of each strain on microplates measured with the BioFilm Ring Test® after different incubation times (0, 24, 48 and 72 h). Photographs of biofilms formed on polystyrene microplates of TC14, TC10 and TC5 strains after different times of incubation (0, 24,

48 and 72 h) are shown in **a** using the Biofilm Ring Test® reader. Results expressed as ΔBFI (BFI control - BFI sample) are presented in the graph in **b**. Each experiment was performed three times. VNSS medium was used for each bacterial strain. T- negative control (medium only)

similar trend. TC5 was still the least able to form a biofilm, never reaching a Δ BFI above 15 in all tested conditions (Fig. 8). Some of the strains such as TC8 and TC11 took up to 72 h to form a substantial biofilm in MB or MBG compared to VNSS. Some strains such as TC14 were inhibited in their ability to form a biofilm when glucose was added to MB. In conclusion, the majority of bacteria were able to form a substantial biofilm in at least one of the selected conditions, except TC5.

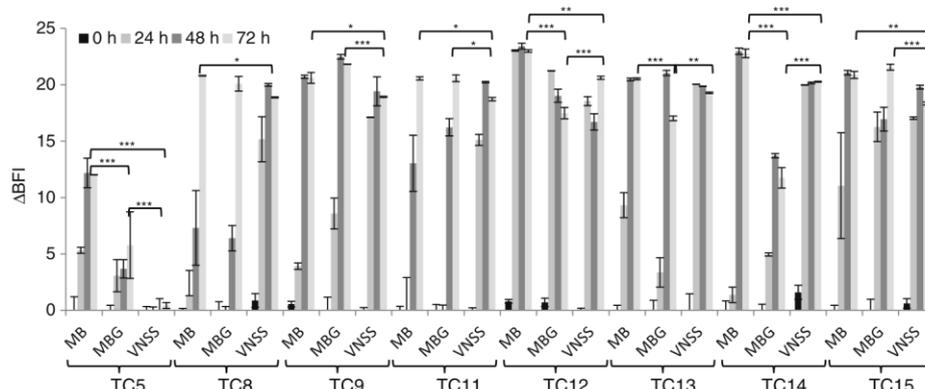
Discussion

This present study reports the identification and characterization of 13 strains of bacteria from marine biofilms developed on surfaces immersed in the Mediterranean Sea. The phylogenetic study revealed that most of the isolated bacteria belong to the class of γ -Proteobacteria except TC5, TC4 and TC7, which are part of the phylum of the Bacteroidetes and the class of Flavobacteria, and TC1 which belongs to the phylum of the Firmicutes and the class of Bacilli. Based on the 16S RNA gene sequencing and phylogenetic analysis as well as DNA–DNA hybridization performed for some bacteria, we believe that we have identified at the species level, the strains, TC1, TC12, TC8 and TC14 [39, 40], which belong to *H. trueperi*, *A. genovensis*, *P. lipolytica* and *P. ulvae*, respectively, with a corresponding position in their phylogenetic tree [43–45]. Most of the phenotypical properties defined by API galleries and pigmentation of the colonies fitted with the published description of the closest type strains, except for the presence of cystine arylamidase, trypsin and lipase for TC12, the utilization of sugars for TC8, and maltose for TC14. While different conditions of growth were used for TC12 and TC8, which can provide different results in terms of phenotypes [44], the same growth conditions have been used for TC14 [45]. In a study describing phenotypical diversity of *Pseudomonas citrea*, even when grown in the same conditions, the authors highlighted variabilities in the physiological and

biochemical characteristics of the strains [46]. Our results show the TC13, a yellow-coloured strain whose closest match was *P. citrea* according to its high percentage of identity in the 16S sequence (99.63 %), also displays some variability in the phenotypical traits such as oxidase activity and fructose utilization [46]. As shown by the phylogenetic tree (Fig. 4a) and the blast of the 16S sequence (data not shown), one ATCC strain of *P. aurantia* was also very close, preventing us from drawing any conclusion regarding TC13 species. Similarly, despite a very high percentage of identity, TC15 cannot be clearly affiliated to *P. tetradonis*. The number of matching strains with a high percentage of identity was important (above 99 % identity, data not shown) and the phylogenetic tree showed that TC15 position was not clearly stated (weak bootstraps). In addition, the phenotypical description of different subspecies close to *P. tetradonis* reveals that they can display very different phenotypical characteristics [47]. Therefore, we cannot assign a species name to TC13 and TC15.

For some strains whose percentage of identity were between 97.60 and 98.70 %, i.e. TC5, TC6, TC9 and TC10, we chose to perform DNA–DNA hybridization. It has been shown that a sequence identity cutoff of 98.7–99 % correlates with DNA–DNA hybridization and is recommended for species discrimination [39, 40, 48, 49]. The difficulties in performing DNA–DNA hybridization other than in specialized laboratories and the fact that DNA–DNA re-association analysis remains time consuming, expensive and technically challenging at the genome level make it difficult to use systematically on all the recovered strains [40, 50]. This analysis confirmed that these isolates do not belong to the closest type strains species found with the 16S gene sequence alignment. Thus, TC5, TC6, TC9 and TC10 most probably belong to other species. These results are in accordance with the very different phenotypical descriptions of the strains, including pigmentations of the colonies, which did not correlate with the description made for the closest 16S alignment matches [51]. For TC6, the next strains in the list of matching strains for 16S alignment are positioned further down in contrast with TC9

Fig. 8 Kinetic of biofilm formation of each strain on microplates measured with the BioFilm Ring Test® after different incubation times and using three different marine media VNSS, MB and MBG. Results expressed as Δ BFI (BFI control–BFI sample) are presented in the graph in. Each experiment was performed three times in triplicates



and TC10, whose sequences are also very close to *Shewanella waksmanii* and *Shewanella donghaensis* or *Shewanella pacifica*, respectively, suggesting that TC6 may belong to a new species. The short 16S sequences such as the one of TC10 probably partly explain that we cannot give more precise information on its identification. Therefore, we can conclude that TC5, TC6, TC9 and TC10 do not belong to their closest matches in 16S analysis.

In the case of TC11, the sequence was short but the percentage of identity with *S. pneumatophori* 16S sequence was high (100 %) and the following candidates were further positioned in terms of percentage of identity in the 16S sequence. The bootstraps in the phylogenetical tree were quite high. The beige colour (with slight salmon glints) of the colonies appeared close to the one described as slightly pinkish coloured for *S. pneumatophori*. Despite that different conditions have been used for growth, biochemical characterization is in accordance with the ones of *S. pneumatophori* except for gelatin and esculin utilization [52]. We believe therefore that TC11 could belong to *S. pneumatophori*. However, other external primers should be used in PCR amplification in order to increase the length of the sequenced 16S gene and verify this affiliation.

Both TC4 and TC7 most probably belong to a novel species named *P. (Nonlabens) mediterranea* [41] as only 95.77 and 96.16 % of identity were respectively found with *P. dokdonensis* DSW-6 [48, 49]. Moreover, most of the phenotypical characteristics regarding the API galleries, motility assays or colonies aspects, which are similar to both strains, matched the description of the strain made by Nedashkovskaya et al., for example, the peach-coloured colonies, the non-motility of the rods, the presence of esterase (C4), leucine and valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and oxidase (Figs. S2) [53]. The results obtained for the presence of esterase and relative to their growth curves were not strictly identical but very close to each other. As previously stated, strains can present different features regarding metabolism in particular when they are coming from different environments or growing in different conditions [54].

Data dealing with marine bacteria coming from in situ formed biofilm are scarce. Some bacteria have been recovered from mats [55], sediments [56], rocks or organisms [11, 12, 14, 57, 58], but more rarely from inert artificial surfaces. Few articles relate the identification or community structure characterization of strains isolated from immersed coupons [10, 13, 16, 17, 59–61]. In addition, strains have been rarely isolated from inert surfaces immersed in the Mediterranean Sea [62, 63]. In our study, among the strains that are closely related to the recovered strains, only *Alteromonas genovenis* was isolated from a biofilm grown on an artificial surface and was also collected from the Mediterranean Sea [44].

Isolated strains, which can be subjected to further physiological, molecular, cellular or other characterizations allowing

understanding of mechanisms involved in particular phenotypes, are usually selected on media on the basis of colonies morphological aspects, providing an important bias in assessing relative diversity, while allowing more precise strains identification. Among the recovered bacteria in our study, all isolated strains are Gram-negative (except TC1) and the γ -Proteobacteria class is predominant. The *Shewanella* and *Pseudoalteromonas* genera are the two main isolated genera in our conditions. Using metagenomic approaches, α -Proteobacteria and γ -Proteobacteria phyla have been shown to be the most abundant groups of prokaryotes in the marine environment of the Mediterranean Sea [64–66]. Previous studies have indicated that the community of early biofilm in the Pacific Ocean is mainly composed of γ -Proteobacteria such as *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* or α -Proteobacteria such as *Roseobacter* [16, 17, 59, 67] with a predominance of γ -Proteobacteria as the early settling population. Bacteroidetes are also present but their relative abundance varies more in function of the studies [16, 17, 59, 66–68]. Similar results have been found in the Mediterranean Sea [69]. *Halobacillus*, *Persicivirga*, *Polaribacter*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella* and *Alteromonas* genera can be found from different parts of the world including the Pacific, Atlantic and Polar Oceans [16, 46, 59, 70–73]. The genera *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Halobacillus*, *Polaribacter* and *Alteromonas* have already been found in the Mediterranean Sea [18–20, 44, 54, 62, 74, 75], while to our knowledge *Persicivirga (Nonlabens)* have not yet been described from this enclosed sea.

For each bacterial strain, physiological, biochemical, physico-chemical and other phenotypical properties were studied. The *Polaribacter* sp. TC5 strain differed from the other strains on several aspects. First of all, TC5 is the only strain able to ferment the five following sugars, L-arabinose, methyl- α -D-mannopyranoside, cellobiose, saccharose and trehalose, as performed in our conditions, setting apart esculin, which showed various results in the API 20 NE and API 50 CH galleries. This discordance could mainly be due to the fact that experimental conditions (growth conditions) were different from the manufacturer's instructions or from articles describing type strains, as marine bacteria are not widely used with these tests, making the comparisons very difficult.

Second, TC5 was part of the worse movers of the Toulon Collection. Bacterial motility is an important factor in the colonization of surfaces by bacteria as motility can facilitate their attachment. Flagellar mobility, characterized by the swimming and the swarming mode, allows approaching the surface, whereas type IV pili motility, associated with the twitching mode (pilus extension and retraction), is involved in microcolony formation and surface colonization [76]. Swarming bacteria are also capable of swimming although for some bacteria, different types of flagella are used. Most of our isolated bacteria were motile but poor swimmers as

compared to the control marine bacterium, the *Paracoccus* 4M6 strain [10]. Among our isolates, some were better twitchers than the control 4M6 such as TC10 (*Shewanella* sp.), TC12 (*Alteromonas* sp.) and TC15 (*Pseudoalteromonas* sp.) confirming that bacteria displaying twitching motility are also phylogenetically diversified [76]. Among the worst movers, TC5, along with TC4 and TC7, all members of Bacteroidetes phylum, were the poorest swimmers, swarmers and twitchers. It would have been interesting to evaluate for these strains another motility mode, called gliding, which is a characteristic of many members of the Bacteroidetes phylum and does not obligatorily involve type IV pili. During gliding, cells attached to the surface, rotate at one pole in place, and require specific proteins within focal-adhesion complexes [76, 77]. *Flavobacterium johnsoniae*-like or *Myroides odoratus* isolates, belonging to the Bacteroidetes phylum, does not harbour conventional external appendices such as fimbriae, pili or flagella while they have been found in various biofilm structures [78, 79].

Third, TC5 showed more hydrophobic properties than the other strains. *F. johnsoniae*-like or *M. odoratus* isolates revealed however a hydrophilic nature using bacterial adherence to hydrocarbons (BATH) assay, displayed various levels of adherence and autoaggregation capacities, but showed most of the time stronger biofilm structures. In our study, biofilm formation as measured by the Biofilm Ring Test[®] appeared also overall less important for the more hydrophobic strain. Regarding adhesion ability, which was not studied here, and despite the general rule in which capacity of adhesion increases with higher hydrophobicity, a number of studies have shown contradictory results associated to either a hydrophobic or hydrophilic surface [78]. The hydrophobic/hydrophilic surface properties of bacteria are not univocal and depend on the various experimental conditions. Other interactions between bacteria and surfaces are solicited which overcome this physico-chemical reversible interaction. Bacteria can synthesise exopolymers with various physico-chemical properties, as well as expose external appendices that allow their stronger fixation on surfaces. It is also interesting to note that the hydrophobicity properties can vary among strains of the same species [78]. For example, *Shewanella* strains have been found displaying various degrees of hydrophobicity or electron-donating/accepting characteristics, while they all presented electronegative properties at their surface, as shown by zeta potential measurement, similar to other studies dealing with *Pseudoalteromonas* strains [80, 81]. Grasland et al. described cell surface properties of 4M6 as well as strains of *Pseudoalteromonas* and *Alteromonas* which were hydrophilic and presented an electron-donating character [10]. In this study, strains of *Paracoccus* sp. presented very different patterns in terms of hydrophilicity and electron-donating/accepting characters. Similar results were obtained among members of Bacteroidetes phylum such as *Cytophaga* strains. To our knowledge, information relative to the net

surface charges, which is often found negative for the majority of bacteria [82], the hydrophobicity or electron-donating/accepting properties of *Polaribacter*, *Persicivirga*, *Halobacillus* and *Agarivorans* strains are not available in the literature. Therefore, our study represents the first description of this sort for these genera.

At last, and as said above, using the Biofilm Ring Test[®] [38], we showed that TC5 formed little or no biofilm in vitro in our conditions compared to all other strains, even when using different marine media. This strain may have the capacity to form a substantial biofilm in different conditions (nutritional, microbial environment...) than the ones used in this study. It is interesting to note that strains with the lowest ability to move by swimming, swarming and twitching, i.e. TC5, TC4 and TC7 are the strains that form less biofilm overall, in particular TC5. As said above, the two other members of the Bacteroidetes phylum TC4 and TC7 of *Persicivirga* genus have also a weaker ability to form a biofilm in vitro on polystyrene. This did not prevent their isolation from a polystyrene substratum. Correlations between in situ formed biofilm and in vitro monospecies formed biofilm are difficult to make, as parameters such as environmental factors and potential antagonist or synergistic behaviors of microbes present in the marine ecosystem may strongly influence bacterial activities. In order to understand some of these aspects, specific optimal conditions for growth and biofilm formation could be studied for each strain, to understand which parameters play an important role in biofilm formation.

This study provides comparative taxonomical, physiological, biochemical and physico-chemical analysis of strains isolated from the Mediterranean Sea. Studies on marine biofilms isolated in the Mediterranean Sea are rare. This study provides new insights on bacteria present in marine biofilms isolated from inert surfaces in the Mediterranean Sea. New genus and species of bacteria have been identified in this environment, in particular two strains of a novel species named *P. mediterranea*. Some of their biological traits, which have not yet been characterized, have been described in this study. For instance, some strains showed different phenotypical characteristics, in terms of hydrophobicity, motility and biofilm formation abilities, in particular TC5, a *Polaribacter* strain. Future directions could include the analysis of their biofilm composition in terms of matrix components and the understanding of what makes these strains different in terms of motility, adhesion and biofilm formation (parameters, gene/protein expression...), allowing the development of a subsequent fouling.

Acknowledgments This work was supported by the Université de Toulon Research BQR funding. F. Brian-Jaisson is the recipient of a French PACA Region doctoral fellowship. We wish to thank V. Stenger, a Master student, for his contribution to this work. We also thank the Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines of the Université de Bretagne-Sud, France for sending us the *Paracoccus* 4M6 strain.

References

1. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49–79
2. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49:711–745
3. Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182:2675–2679
4. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187–209
5. Zhang X, Bishop PL, Kupferle MJ (1998) Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* 37:345–348
6. Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3–9
7. Dobretsov S (2010) Marine biofilms. In: Durr S, Thomason JC (eds) *Biofouling*. Blackwell, Oxford, pp 123–136
8. Terlizzi A, Faimali M (2010) Fouling on artificial substrata. In: Durr S, Thomason JC (eds) *Biofouling*. Blackwell, Oxford, pp 170–185
9. Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K (2004) Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* 50:75–104
10. 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
11. Patel P, Callow ME, Joint I, Callow JA (2003) Specificity in the settlement—modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environ Microbiol* 5:338–349
12. Salaun S, La Barre S, Dos Santos-Goncalvez M, Potin P, Haras D, Bazire A (2012) Influence of exudates of the kelp *Laminaria digitata* on biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes. *Microb Ecol* 64:359–369
13. Dang H, Lovell CR (2002) Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 68:496–504
14. Skovhus TL, Holmstrom C, Kjelleberg S, Dahllöf I (2007) Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. *FEMS Microbiol Ecol* 61:348–361
15. Stin OC, Carnahan A, Singh R, Powell J, Furuno JP, Dorsey A, Silbergeld E, Williams HN, Morris JG (2003) Characterization of microbial communities from coastal waters using microarrays. *Environ Monit Assess* 81:327–336
16. Dang H, Li T, Chen M, Huang G (2008) Cross-ocean distribution of *Rhodobacterales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl Environ Microbiol* 74:52–60
17. Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH (2008) Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol* 46:174–182
18. Lee OO, Lau SCK, Tsoi MMY, Li X, Plakhotnikova I, Dobretsov S, Wu MCS, Wong P-K, Weinbauer M, Qian P-Y (2006) *Shewanella irciniae* sp. nov., a novel member of the family *Shewanellaceae*, isolated from the marine sponge *Ircinia dendroides* in the Bay of Villefranche, Mediterranean Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2871–2877
19. Heindl H, Wiese J, Thiel V, Imhoff JF (2010) Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats. *Syst Appl Microbiol* 33:94–104
20. Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gemert C, Hacker J (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol* 35:305–312
21. Danovaro R, Company JB, Corinaldesi C, D'Onghia G, Galil B, Gambi C, Gooday AJ, Lampadariou N, Luna GM, Morigi C, Olu K, Polymenakou P, Ramirez-Llodra E, Sabbatini A, Sarda F, Sibuet M, Tselepidis A (2010) Deep-sea biodiversity in the Mediterranean Sea: the known, the unknown, and the unknowable. *PLoS One* 5: e11832
22. Camps M, Briand J-F, Guentas-Dombrowsky L, Culioli G, Bazire A, Blache Y (2011) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Mar Pollut Bull* 62:1032–1040
23. Briand JF, Djeridi I, Jamet D, Coupe S, Bressy C, Molmeret M, Le Berre B, Rimet F, Bouchez A, Blache Y (2012) Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling* 28:453–463
24. 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 3 J6. *Appl Environ Microbiol* 76:3452–3461
25. Todorova SG, Costello AM (2006) Design of *Shewanella*-specific 16S rRNA primers and application to analysis of *Shewanella* in a minerotrophic wetland. *Environ Microbiol* 8:426–432
26. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
27. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
28. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
29. Cashion P, Holder-Franklin MA, McCully J, Franklin M (1977) A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* 81:461–466
30. De Ley J, Cattoir H, Reynaerts A (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* 12:133–142
31. Huss VA, Festl H, Schleifer KH (1983) Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst Appl Microbiol* 4:184–192
32. Rashid MH, Kornberg A (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4885–4890
33. Bellon-Fontaine MN, Rault J, van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloid Surf B* 7:47–53
34. Cuperus PL, van der Mei HC, Reid G, Bruce AW, Khoury AH, Rouxhet PG, Busscher HJ (1993) Physicochemical surface characteristics of urogenital and poultry lactobacilli. *J Colloid Interface Sci* 156:319–324
35. Bouttier S, Han KG, Ntsama C, Bellon-Fontaine MN, Fourmat J (1994) Role of electrostatic interactions in the adhesion of *Pseudomonas fragi* and *Brochothrix thermosphacta* to meat. *Colloid Surf B* 2:57–65
36. Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P, Bellon-Fontaine MN (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol* 63:1725–1731
37. Kosmulski M, Rosenholm JB (2004) High ionic strength electrokinetics. *Adv Colloid Interface* 112:93–107
38. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hebraud M, Bernardi T (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods* 68:605–612
39. Clarridge JE 3rd (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17:840–862

40. Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, pp. 152–155
41. Yi H, Chun J (2012) Unification of the genera *Nonlabens*, *Persicivirga*, *Sandarakinotalea* and *Stenothermobacter* into a single emended genus, *Nonlabens*, and description of *Nonlabens agnitus* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 35:150–155
42. Dheilly A (2007) Biofilms bactériens marins multi-espèces : mise en évidence d'un effet antagoniste. PhD thesis, Université de Bretagne-Sud, France
43. Rivadeneyra MA, Parraga J, Delgado R, Ramos-Cormenzana A, Delgado G (2004) Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbiol Ecol* 48:39–46
44. Vandecastelaere I, Nercesson O, Segaert E, Achouak W, Mollica A, Faimali M, De Vos P, Vandamme P (2008) *Alteromonas genovensis* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm and emended description of *Alteromonas macleodii* Baumann et al. 1972 (Approved Lists 1980). *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2589–2596
45. Egan S, Holmström C, Kjelleberg S (2001) *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1499–1504
46. Ivanova EP, Kiprianova EA, Mikhailov VV, Levanova GF, Garagulya AD, Gorshkova NM, Vysotskii MV, Nicolau DV, Yumoto N, Taguchi T, Yoshikawa S (1998) Phenotypic diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from different marine habitats and emendation of the description. *Int J Syst Bacteriol* 48:247–256
47. Ivanova EP, Romanenko LA, Matte MH, Matte GR, Lysenko AM, Simidu U, Kita-Tsakamoto K, Sawabe T, Vysotskii MV, Frolova GM, Mikhailov V, Christen R, Colwell RR (2001) Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1071–1078
48. Schlaberg R, Simmon KE, Fisher MA (2012) A systematic approach for discovering novel, clinically relevant bacteria. *Emerg Infect Dis* 18:422–430
49. Tindall BJ, Rossello-Mora R, Busse HJ, Ludwig W, Kampfer P (2010) Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:249–266
50. Janda JM, Abbott SL (2002) Bacterial identification for publication: when is enough enough? *J Clin Microbiol* 40:1887–1891
51. Yoon J-H, Kang S-J, Oh T-K (2006) *Polaribacter dokdonensis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1251–1255
52. Hirota K, Nodasaka Y, Orikasa Y, Okuyama H, Yumoto I (2005) *Shewanella pneumatophori* sp. nov., an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium isolated from the intestines of Pacific mackerel (*Pneumatophorus japonicus*). *Int J Syst Evol Microbiol* 55:2355–2359
53. Nedashkovskaya OI, Kwon KK, Kim S-J (2009) Reclassification of *Donghaeana dokdonensis* Yoon et al. 2006 as *Persicivirga dokdonensis* comb. nov. and emended descriptions of the genus *Persicivirga* and of *Persicivirga xylanidelens* O'Sullivan et al. 2006. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:824–827
54. Ivanova EP, Bakunina IY, Nedashkovskaya OI, Gorshkova NM, Alexeeva YV, Zelepuga EA, Zvaygintseva TN, Nicolau DV, Mikhailov VV (2003) Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachenkonii*, and *P. nigrifaciens*. *Curr Microbiol* 46:6–10
55. Raguene G, Moppert X, Richert L, Ratiskol J, Payri C, Costa B, Guezennec J (2004) A novel exopolymer-producing bacterium, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae*, isolated from a "kopara" mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *Curr Microbiol* 49:145–151
56. Nithya C, Begum MF, Pandian SK (2010) Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:341–358
57. Tujula NA, Crocetti GR, Burke C, Thomas T, Holmstrom C, Kjelleberg S (2010) Variability and abundance of the epiphytic bacterial community associated with a green marine *Ulveacean* alga. *ISME J* 4:301–311
58. Teasdale ME, Donovan KA, Forscher-Dancause SR, Rowley DC (2011) Gram-positive marine bacteria as a potential resource for the discovery of quorum sensing inhibitors. *Mar Biotechnol (N Y)* 13:722–732
59. Dang H, Lovell CR (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66:467–475
60. Bermont-Bouis D, Janvier M, Grimont PA, Dupont I, Vallaeyts T (2007) Both sulfate-reducing bacteria and Enterobacteriaceae take part in marine biocorrosion of carbon steel. *J Appl Microbiol* 102:161–168
61. Boudaud N, Coton M, Coton E, Pineau S, Travert J, Amiel C (2010) Biodiversity analysis by polyphasic study of marine bacteria associated with biocorrosion phenomena. *J Appl Microbiol* 109:166–179
62. Gartner A, Blumel M, Wiese J, Imhoff JF (2011) Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. *Anton Leeuw* 100:421–435
63. Bellou N, Papathanassiou E, Dobretsov S, Lykousis V, Colijn F (2012) The effect of substratum type, orientation and depth on the development of bacterial deep-sea biofilm communities grown on artificial substrata deployed in the Eastern Mediterranean. *Biofouling* 28:199–213
64. Hagström Å, Pommier T, Rohwer F, Simu K, Stolte W, Svensson D, Zweifel UL (2002) Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl Environ Microbiol* 68:3628–3633
65. Polymenakou PN, Lampadariou N, Mandalakis M, Tselepidis A (2009) Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea. *Syst Appl Microbiol* 32:17–26
66. Jones P, Cottrell M, Kirchman D, Dexter S (2007) Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* 53:153–162
67. Lee JK, Kwon K-K, Cho KH, Kim HW, Park JH, Lee HK (2003) Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *J Microbiol Methods* 41:183–188
68. Webster NS, Negri AP (2006) Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces. *Environ Microbiol* 8:1177–1190
69. Elifantz H, Horn G, Ayon M, Cohen Y, Minz D (2013) *Rhodobacteraceae* are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol Ecol* 85:348–357
70. Nichols CM, Lardiere SG, Bowman JP, Nichols PD, Gibson JAE, Guezennec J (2005) Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb Ecol* 49:578–589
71. Bozal N, Montes MJ, Tudela E, Jimenez F, Guinea J (2002) *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:195–205
72. Gentile G, Bonasera V, Amico C, Giuliano L, Yakimov MM (2003) *Shewanella* sp. GA-22, a psychrophilic hydrocarbonoclastic antarctic bacterium producing polyunsaturated fatty acids. *J Appl Microbiol* 95:1124–1133
73. Junge K, Imhoff F, Staley T, Deming W (2002) Phylogenetic diversity of numerically important Arctic Sea-ice bacteria cultured at subzero temperature. *Microb Ecol* 43:315–328
74. Gonzalez JM, Fernandez-Gomez B, Fernandez-Guerra A, Gomez-Consamau L, Sanchez O, Coll-Llado M, Del Campo J, Escudero L,

- Rodriguez-Martinez R, Alonso-Saez L, Latasa M, Paulsen I, Nedashkovskaya O, Lekunberri I, Pinhassi J, Pedros-Alio C (2008) Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (Flavobacteria). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8724–8729
75. Gomez-Consarnau L, Gonzalez JM, Coll-Llado M, Gourdon P, Pascher T, Neutze R, Pedros-Alio C, Pinhassi J (2007) Light stimulates growth of proteorhodopsin-containing marine Flavobacteria. *Nature* 445:210–213
76. Jarrell KF, McBride MJ (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6:466–476
77. Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8:634–644
78. Basson A, Flemming LA, Chenia HY (2008) Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microb Ecol* 55:1–14
79. Jacobs A, Chenia HY (2009) Biofilm-forming capacity, surface hydrophobicity and aggregation characteristics of *Myroides odoratus* isolated from South African *Oreochromis mossambicus* fish. *J Appl Microbiol* 107:1957–1966
80. Caccavo F, Schamberger PC, Keiding K, Nielsen PH (1997) Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* to amorphous Fe(III) oxide. *Appl Environ Microbiol* 63:3837–3843
81. Korenevsky A, Beveridge TJ (2007) The surface physicochemistry and adhesiveness of *Shewanella* are affected by their surface polysaccharides. *Microbiology* 153:1872–1883
82. Rouxhet P, Mozes N (1990) Physical-chemistry of the interface between attached microorganisms and their support. *Water Sci Technol* 22:1–16
83. Thomas V, Casson N, Greub G (2007) New *Afipia* and *Bosea* strains isolated from various water sources by amoebal co-culture. *Syst Appl Microbiol* 30:572–579

3.3. Données accessibles sur le site du journal

	TC4	TC5	TC7	TC8	TC9	TC10	TC11	TC12	TC13	TC14	TC15
Alcaline phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	Int	+	+
Esterase (C4)	Int	int	Int	Int	int	Int	Int	int	-	-	int
Lipase esterase	Int	int	Int	Int	int	Int	Int	int	-	-	int
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+	Int	Int	+	-	+	int
Valine arylamidase	+	+	+	Int	int	-	-	int	-	-	-
Cystine arylamidase	Int	-	Int	-	-	-	-	-	-	-	-
Trypsine	-	+	-	-	int	-	-	-	-	Int	int
α -chymotrypsine	-	-	-	+	-	+	Int	-	-	Int	-
Acid phosphatase	+	+	+	+	+	Int	+	int	-	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	int	+	+	+	Int	Int	+	Int	Int	int
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -glucosidase	-	-	-	-	int	-	-	-	-	-	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-	-	-	+	+	-	Int	-	-	Int	+
α -mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table S1. Results of the API ZYM gallery. This assay allows the determination of enzymatic activities of strains in the culture medium +:strong enzymatic activity. Int: intermediate enzymatic activity. -: weak or no enzymatic activity.

API 20NE	TC 4	TC 5	TC 7	TC 8	TC 9	TC 10	TC 11	TC 12	TC 13	TC 14	TC 15
Nitrate reduction to nitrite	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
β -galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Oxidase	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Hydrolysis of:											
Esculin	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
API 50 CH	TC 4	TC 5	TC 7	TC 8	TC 9	TC 10	TC 11	TC 12	TC 13	TC 14	TC 15
L arabinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Methyl-D-mannoside	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	+	-	-	+	w	-	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table S2. Results of API 20NE and API 50CH tests. For all strains, in API 50 CH and API 20 NE tests, only differences are shown, the majority of the results being negative. In the API 20 NE, the indole production, the fermentation of glucose, urease and the assimilation of glucose, arabinose, mannose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate, caprate, adipate, malate, citrate and phenyl-acetate were negative. In the API 50CH test, fermentation of the 40 others sugars was negative for all strains.+: positive reaction. Int: weakly positive reaction. -: negative reaction.

Strains	ζ potential (mV)
TC4	-40,44 ± 0.6
TC5	-38,14 ± 1.3
TC7	-39,71 ± 0.2
TC8	-46,42 ± 0.9
TC9	-41,52 ± 1.6
TC10	-44,60 ± 1.8
TC11	-42,31 ± 0.4
TC12	-40,69 ± 0.6
TC13	-29,96 ± 3.6
TC14	-37,43 ± 2.5
TC15	-43,33 ± 1.5
4M6	-43,16 ± 0.8

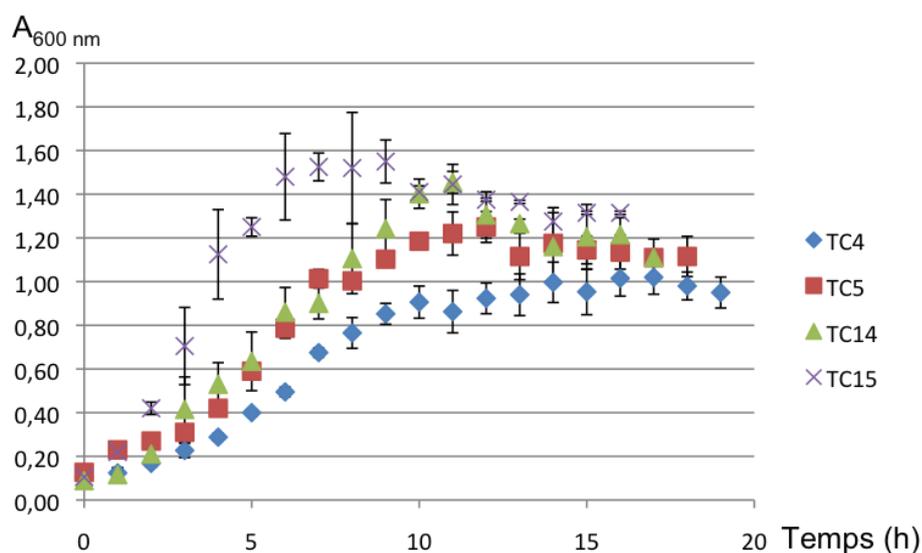
Table S3. Zeta potential measurements of each strain in 1.5mM NaCl solution at pH 7.5. Each measurement was repeated three times with three independent cultures.

3.4. Résultats complémentaires

Les données suivantes n'apparaissent pas dans l'article mais viennent compléter l'étude précédente.

3.4.1. Croissance bactérienne

L'étude des courbes de croissance à 20°C montre que chaque souche possède une cinétique de croissance particulière (Figure 31). Les 11 courbes de croissance sont présentées sur 4 graphiques pour plus de lisibilité.



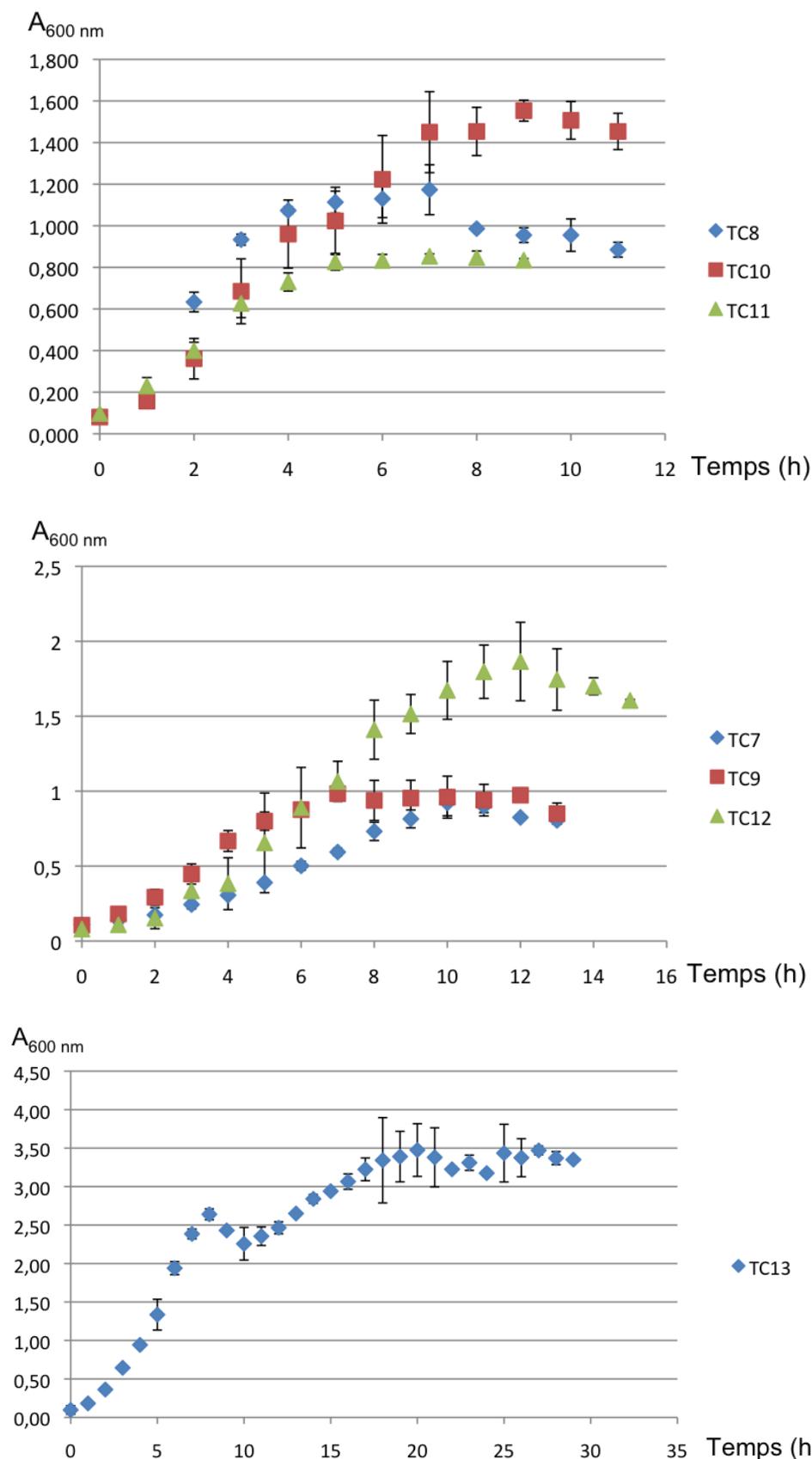


Figure 31. Courbes de croissance de TC4, TC5 et de TC7 à TC15 faites à 20°C, dans 50 mL de milieu contenu dans des Erlenmeyers de 250 mL et sous agitation (210 rpm). Les conditions de cultures sont identiques pour les 11 cultures sauf pour la souche TC13 qui est cultivée dans le milieu MB et non le VNSS.

Ces courbes peuvent être théoriquement découpées en 5 phases, la phase de latence (peu visible, probablement très courte), la phase exponentielle, la phase de ralentissement, la phase stationnaire et la phase de mortalité. La majorité des courbes de croissance des souches TC suit ce découpage. Cependant certaines phases telles que la phase de latence (par exemple pour TC11) ou la phase stationnaire (par exemple pour TC12) sont parfois très courtes, voire inexistantes. Le taux de croissance maximum (μ_{\max}) ainsi que le temps de génération (T_g) ont été déterminés au niveau de la phase exponentielle lorsque les bactéries sont en division maximale (Tableau 20). Ces deux facteurs sont caractéristiques d'une souche, d'un milieu nutritif et des conditions générales de croissance (température, agitation, volume de culture, etc...). Le μ_{\max} correspond à la pente de la tangente de la courbe $f(t) = \ln(A)$ au niveau de la phase exponentielle. Le T_g qui correspond au temps nécessaire pour que la population double, se mesure de la façon suivante : $T_g = \ln(2)/\mu_{\max}$.

Dans nos conditions de cultures, les souches TC15, TC10 et TC14 possèdent les temps de génération les plus courts (respectivement 47, 60 et 67 min), indiquant une phase de croissance assez rapide. Les souches TC12, TC11, TC9, TC5, TC4 et TC7 ont des T_g modérés, voir longs (respectivement 73, 88, 97, 147, 150 et 172 min). La souche TC8 a le temps de génération le plus long ; cette souche met presque 5 h pour doubler sa population. La souche TC13 ne croît pas en VNSS, sa courbe a donc été faite en milieu MB. Entre 9 et 10 h de culture, le taux de croissance de TC13 est négatif, ce qui exprime un arrêt de la croissance puis celle-ci reprend jusqu'à 20 h de culture mais le taux de croissance, μ_{\max} est plus faible ($0,135 \text{ min}^{-1}$, $T_g = 420 \text{ min}$), la croissance étant moins rapide. Ce phénomène pourrait être interprété comme un phénomène de diauxie dû à l'utilisation séquentielle des sources de carbone qui créent des périodes de transition métabolique se traduisant par un arrêt de la croissance.

Souches	TC4	TC5	TC7	TC8	TC9	TC10	TC11	TC12	TC13	TC14	TC15
T_g (min)	150	147	172	269	97	60	88	73	141	67	47
μ_{\max} (h^{-1})	0,278	0,282	0,241	0,154	0,425	0,693	0,474	0,568	0,295	0,618	0,888

Tableau 20. Temps de génération (T_g) et taux de croissance (μ_{\max}) des souches étudiées.

3.4.2. Capacité d'adhésion des souches bactériennes

La capacité à adhérer pour les 11 souches a été mesurée avec le test au cristal violet. Ce dernier est un colorant se fixant aux bactéries. Les bactéries ont été incubées dans de

l'ASW permettant à l'adhésion de se réaliser tout en empêchant la production de matrice extracellulaire. Les résultats sont donnés en ratio permettant de s'affranchir de la coloration non spécifique de la surface des puits des microplaques par le cristal violet. La Figure 32 donne les résultats d'adhésion obtenus avec une coloration au cristal violet. Nous admettons arbitrairement qu'une souche adhère lorsque le ratio est supérieur à 2, ce qui veut dire que l'absorbance est 2 fois supérieure par rapport aux puits témoins (ASW sans bactéries). Le ratio de 2 correspond donc au seuil de sensibilité de détection. Trois souches sont au-dessus de ce seuil ; TC8, TC11 et TC14. Pour les autres souches, le ratio est d'environ 1 ce qui veut dire que l'absorbance lue est identique dans les puits témoins et dans les puits contenant les bactéries.

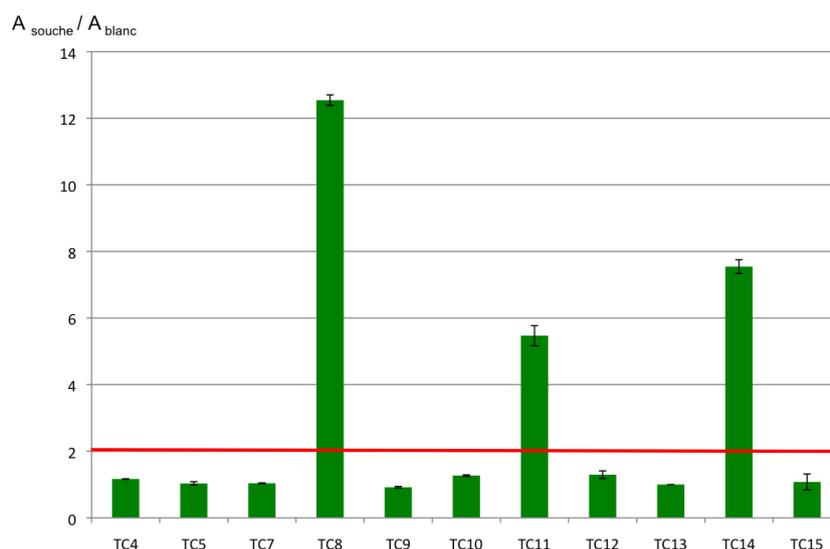


Figure 32. Mesure de l'adhésion des souches bactériennes en microplaque. Les bactéries adhérentes sont colorées avec une solution de 0,01 % de cristal violet. Les résultats sont exprimés en ratio de l'absorbance des souches sur l'absorbance du témoin.

Il semblerait donc que TC8, TC11 et TC14 aient une capacité d'adhésion supérieure aux autres souches testées. Ces 3 souches sont capables d'adhérer tandis que les souches TC4, TC5, TC7, TC9, TC10, TC12, TC13 et TC15 n'adhèrent pas ou très peu au polystyrène.

3.5. Conclusion

Les souches bactériennes récupérées des surfaces inertes immergées dans la rade de Toulon, ont été identifiées puis caractérisées, ainsi plusieurs expérimentations ont été faites, leurs courbes de croissance, le MATS, le calcul du potentiel ζ , leurs mobilités et leur capacité à adhérer et à former un biofilm sur une surface en polystyrène. L'identification des souches a été faite par comparaison des séquences de l'ADN 16S aux banques de données et par

hybridation ADN/ADN. Ces résultats ont pu être complétés par l'utilisation de galeries API, la pigmentation et la morphologie des bactéries. Il est intéressant de constater que les souches isolées regroupent 7 genres différents. Les genres fréquemment isolés des biofilm marins, tels que *Halobacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas* et *Shewanella*, sont majoritairement présents dans notre étude. Une nouvelle espèce, *Persicivirga mediterranea* (TC7 et TC4) a été isolée pour la première fois en Méditerranée dans cette étude. Comme pour la majorité des bactéries marines, l'ensemble des souches isolées est à Gram négatif (excepté la souche TC1).

Les treize souches font partie de 7 genres différents (voir chapitre 3) ; *Halobacillus*, *Polaribacter*, *Agarivorans*, *Pseudoalteromonas*, *Persicivirga*, *Shewanella* et *Alteromonas* (Tableau 21).

Le genre *Halobacillus* réunit des bactéries à Gram positif, aérobies, hétérotrophes, halophiles, capables de former des endospores, mobiles, pigmentées (orange) et ayant une forme de bâtonnet ou de sphère. La plupart des espèces issue de ce genre est capable de pousser entre 10 et 43°C (la température optimale est d'environ 35°C). Certaines espèces ont été isolées d'un lac hypersalé aux Etats-Unis (Utah) (Spring *et al.*, 1996).

Le genre *Polaribacter* regroupe des bactéries marines à Gram négatif, aérobies et anaérobies, psychrophiles, non mobiles et dont certaines espèces possèdent des vacuoles de gaz. Les bactéries peuvent avoir une forme filamenteuse ou de bâtonnets incurvés. Les colonies sont pigmentées (orange, saumon ou rose). La plupart des espèces de ce genre pousse entre 4 et 20°C. Ce genre a été pour la première fois isolé des océans Antartique et Arctique (Gosink *et al.*, 1998).

Le genre *Agarivorans* rassemble des bactéries marines à Gram négatif, aérobies, en forme de bâtonnet, mobiles (flagelle polaire), mésophiles, halophiles, capables d'hydrolyser l'agar. Les colonies sont pigmentées (blanc ou rose) ou non. Certaines espèces ont été isolées d'organismes marins (Kurahashi et Yokota, 2004).

Le genre *Pseudoalteromonas* regroupe des bactéries marines à Gram négatif, aérobies, mobiles et ayant une forme de bâtonnet. La plupart des espèces de ce genre pousse entre 10 et 37°C (température optimale entre 25 et 30°C). La description de ce genre est détaillée dans la partie 1.3.2.

Le genre *Persicivirga* rassemble des bactéries à Gram négatif, aérobies, ayant la forme de bâtonnet et capables de croître entre 4 et 35°C (température optimale entre 20 et 30°C). Les colonies sont de couleur orange. Certaines espèces de ce genre ont été isolées de fèces de mollusques (*Aplysia punctata*) (Barbeyron *et al.*, 2011).

Le genre *Shewanella* regroupe des bactéries marines à Gram négatif, anaérobies facultative, mobiles (flagelle polaire) et ayant une forme de bâtonnet. Les colonies peuvent être pigmentées ou non. La plupart des espèces issue de ce genre pousse entre 4 et 20°C. Certaines des espèces sont des pathogènes opportunistes provoquant des infections cutanéomuqueuses (*S. putrefaciens* et *S. algae*) (Bozal *et al.*, 2002).

Enfin le genre *Alteromonas* réunit des bactéries marines à Gram négatif, aerobies et ayant une forme de bâtonnet incurvé. Les bactéries sont mobiles (flagelle polaire) et selon l'espèce, les colonies peuvent être pigmentées ou non. Certaines des espèces sont capables de synthétiser des antibiotiques. Toutes les espèces de ce genre sont capables de pousser à 20°C (Gauthier *et al.*, 1995)

Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Halobacillus</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Polaribacter</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Agarivorans</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	<i>Pseudoalteromonas</i>
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Persicivirga</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Shewanellaceae</i>	<i>Shewanella</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Alteromonadales</i>	<i>Alteromonadaceae</i>	<i>Alteromonas</i>

Tableau 21. Taxonomie des 7 genres bactériens étudiés.

Le test d'adhésion montre que les souches TC4, TC5, TC7, TC9, TC10, TC12, TC13 et TC15 ont un niveau d'adhésion au polystyrène très faible voire nul, alors que les souches TC8, TC11 et TC14 présentent un niveau d'adhésion plus élevé dans ces conditions, suggérant que ces souches sont capables d'adhérer à une surface en polystyrène.

Il est intéressant de constater que les 3 souches produisant le moins de biofilm (TC4, TC5 et TC7) sont des souches dépourvues de mobilité et ne sont pas ou faiblement capables d'adhérer et de former un biofilm sur une surface en polystyrène. La mobilité est un facteur important pour la colonisation de surfaces par les bactéries. Une étude d'O'Toole et Kolter a montré qu'un mutant de *Pseudomonas aeruginosa* non mobile, ayant un flagelle incomplet, était incapable de former une couche de cellules sur une surface en PVC, contrairement à la souche sauvage mobile. Cette déficience de la souche mutante pourrait être due à son incapacité à se déplacer vers la surface (O'Toole et Kolter, 1998). Pour les auteurs de cette étude le rôle des flagelles n'est pas complètement clair, les flagelles permettent le déplacement des bactéries vers la surface et/ou ils jouent un rôle plus direct en adhérant à la

surface. Ce dernier point fait l'œuvre de plusieurs publications (Lawrence *et al.*, 1987 ; Moens et Vanderleyden, 1996 ; Garrett *et al.*, 2008).

Le test d'adhésion montre que TC8, TC11 et TC14 sont les seules à être capables à adhérer efficacement à une surface en polystyrène. Si nous comparons ces données avec celles du BFRT[®], les 3 souches capables d'adhérer sont par ailleurs capables de former un biofilm. Par contre plusieurs souches obtiennent des Δ BFI élevés tandis qu'elles n'adhèrent pas ou peu à une surface en polystyrène (TC9, TC10, TC12, TC13 et TC15). A la vue de ces résultats il n'est pas possible de faire un lien entre la capacité d'adhésion et celle à former un biofilm. Les résultats de BFRT[®] et d'adhésion dépendent de plusieurs conditions expérimentales. Certaines études ont montré qu'une faible adhésion des bactéries sur la surface peut être un avantage car elle permet une colonisation rapide de la surface (Anderson *et al.*, 2007). Nous pouvons émettre en hypothèse que les souches TC9, TC10, TC12, TC13 et TC15 adhèrent faiblement peut être pour faciliter la colonisation de la surface.

Enfin, le test BFRT[®] dans 3 milieux de culture différents (VNSS, MB et MBG) exposé dans la Figure 8 de l'article ci-dessus sera traité plus en détail dans le chapitre suivant, partie 4.2.

Chapitre 4
Sélection de souches bactériennes
productrices de substances
polymériques extracellulaires (EPS)

4.1. Introduction

A partir des résultats du chapitre précédent, nous avons pré-sélectionné 8 souches sur les critères suivants : (i) la diversité taxonomique ; en effet, sur les 8 souches, 4 font partie du genre *Pseudoalteromonas* (TC8, TC13, TC14 et TC15), 2 du genre *Shewanella* (TC9 et TC11), une du genre *Alteromonas* (TC12) et une du genre *Polaribacter* (TC5). Cette diversité taxonomique peut nous apporter une diversité au niveau de la composition des EPS produites par ces souches. (ii) la capacité à former un biofilm. (iii) un critère supplémentaire a été pris en compte pour notre sélection à savoir la capacité de certaines souches (TC8, TC11 et TC14) à adhérer à une surface en polystyrène.

Il faut noter que les 2 derniers critères de sélection ne se sont pas appliqués à la souche TC5 qui présente un faible Δ BFI et qui n'adhère peu ou pas à une surface en polystyrène. Pourtant cette souche apparaît intéressante de par le simple fait qu'elle est différente des autres souches isolées dans cette étude. En effet, elle est la seule représentante du genre *Polaribacter*, à avoir un caractère hydrophobe, à ne pas adhérer significativement au polystyrène et à avoir un faible Δ BFI.

Ce chapitre est consacré à l'extraction et à la caractérisation des EPS produites par les 8 souches pré-sélectionnées. Ceci passe, dans un premier temps, par la mise au point des conditions de production de biofilm et dans un deuxième temps par la mise au point d'un protocole d'extraction des EPS. L'analyse de ces dernières nous permettra d'affiner la sélection des souches bactériennes qui se fera selon 2 critères ; le premier sera basé sur la quantité de matrice extraite et le deuxième sera basé sur la proportion des glucides dans les EPS et sur leur composition plus ou moins complexe en monosaccharides.

4.2. Mise au point d'un protocole de production de biofilm

Dans la mise au point d'un protocole de production de biofilm, la durée d'incubation étant importante, il faut trouver une durée qui permet une production suffisante d'EPS tout en évitant une mortalité trop importante des bactéries qui, en se lysant, contamineraient les EPS avec des composés intracellulaires.

De plus, la composition du milieu de culture joue elle aussi un rôle primordial sur la quantité d'EPS produites mais aussi sur la composition des EPS. L'ajout de sucre dans le milieu de culture est fréquent pour améliorer la production d'exopolysaccharides (Decho,

1990 ; Nicolaus *et al.*, 2002 ; Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Ortega-Morales *et al.*, 2007 ; Poli *et al.*, 2010 ; Chalkiadakis *et al.*, 2013).

Dans cette étude, les mesures de formation du biofilm ont donc été réalisées à 4 durées d'incubation différentes, 0 h, 24 h, 48 h et 72 h, et 3 milieux de culture ont été testés, le VNSS, le MB et le MB supplémenté avec 3 % de glucose (MBG). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 33. Le graphique présente, pour chaque souche bactérienne, l'indice de formation de biofilm, ΔBFI ($BFI_{\text{contrôle}} - BFI_{\text{culture}}$), en fonction de la durée d'incubation et du milieu de culture. Un faible indice (< 2) indique une complète mobilité des billes et donc une absence ou une très faible formation de biofilm alors qu'une valeur importante (> 20) correspond à une immobilisation des billes par la matrice d'exopolymères secrétés par les bactéries sessiles. Il est important de noter que les résultats obtenus avec le BFRT[®] ne donnent directement qu'une information sur la mobilité de microbilles dans les cultures. Cette mobilité peut être altérée par plusieurs paramètres comme la quantité de matrice produite (facteur recherché ici), mais également la composition de cette dernière qui intervient entre autre sur la viscosité par exemple.

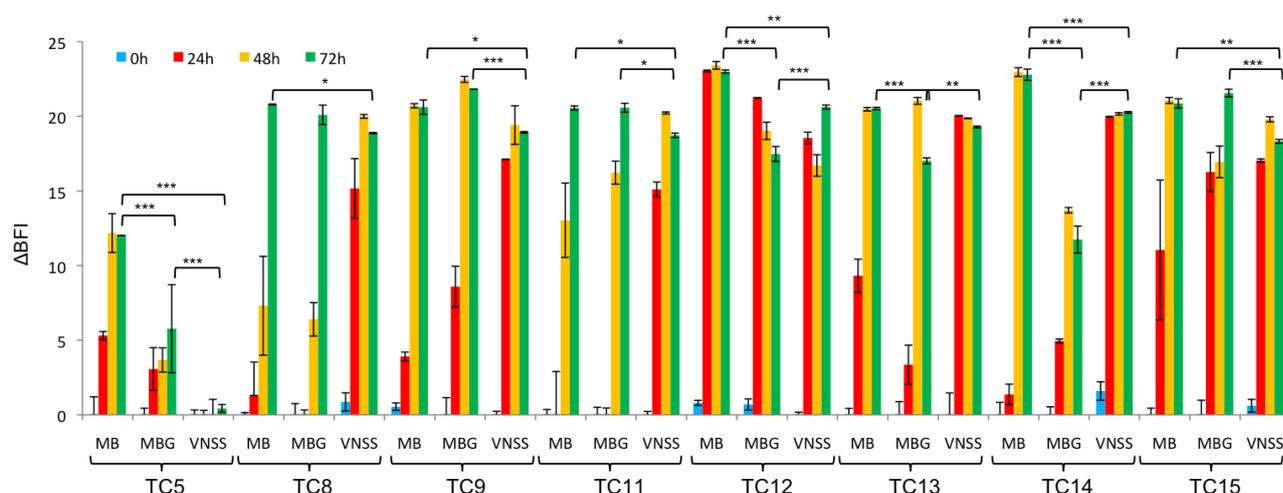


Figure 33. Cinétique de formation de biofilm en conditions statiques à 20°C dans 3 milieux de cultures (MB, MBG et VNSS) pour les souches TC5, TC8, TC9, TC11, TC12, TC13, TC14 et TC15. Les résultats sont obtenus avec le BFRT[®]. MBG : milieu de culture MB supplémenté avec 3 % de glucose. L'étude statistique ne porte que sur les valeurs obtenues à 72 heures.

4.2.1. Effet du temps d'incubation

Lorsque l'on observe la formation du biofilm au cours du temps, il est important de commencer avec un inoculum de départ qui soit suffisamment faible pour que l'on puisse observer une progression. Pour toutes les souches, le ΔBFI est inférieur à 2 à t0 (Figure 33) ce qui permet de s'assurer que l'inoculum de départ ne perturbe pas la mobilité des microbilles

magnétiques ajoutées au milieu. Le BFI augmente pour toutes les souches et dans tous les milieux, excepté pour TC5 en VNSS. Ce cas particulier sera traité dans le paragraphe 4.2.3.

Après 24 heures d'incubation, TC8 dans le MBG, TC11 dans le MB et le MBG et TC14 dans le MB ont encore un Δ BFI inférieur à 2, ce qui indique l'absence de formation de biofilm. Dans les autres cas, l'indice Δ BFI est supérieur à 2 ce qui traduit la présence d'un biofilm en élaboration (la migration des microbilles au centre du puits sous l'effet de l'aimantation est partiellement bloquée). Pour les souches TC12 dans le MB et le MBG et TC13 et TC14 toutes deux dans le VNSS, le Δ BFI atteint déjà la valeur de 20, un Δ BFI de 15 ayant été précédemment défini comme correspondant à un biofilm mature (Chavant *et al.*, 2007). Ces résultats soulignent donc la présence d'un biofilm déjà bien formé pour ces 3 souches dès 24 heures de culture.

Après 48 heures d'incubation, nous constatons pour toutes les souches (excepté TC5), que la formation de biofilm est égale ou supérieure à celle obtenue à 24 h. Ainsi TC11 dans le MB ou dans le MBG ne forme pas de biofilm à 24 h (Δ BFI < 2), par contre à 48 h l'indice Δ BFI est supérieur à 10 exprimant le début de la production de biofilm (les microbilles sont partiellement bloquées). Le maximum de production d'EPS semble être obtenu dès 24 h d'incubation pour TC12 dans le MB et le MBG, TC13 dans le VNSS et TC14 dans le VNSS. Les souches TC8 et TC11 dans le VNSS, la souche TC9 quelque soit le milieu, les souches TC13 et TC14 dans le MB et le MBG et la souche TC15 dans le MB et le VNSS atteignent leur Δ BFI le plus élevé à 48 h.

A 72 heures d'incubation, toutes les souches bactériennes donnent un Δ BFI supérieur à 17 ce qui traduit la complète immobilisation des microbilles due aux bactéries sessiles formant un biofilm, quelque soit le milieu de culture parmi les 3 testés (Chavant *et al.*, 2007). Il est intéressant de constater que le Δ BFI peut diminuer significativement après avoir atteint un maximum, par exemple après 24 h pour la souche TC12 ou après 48 h pour TC13 toutes deux dans le MBG, traduisant soit une dégradation du biofilm, soit un changement des propriétés physico-chimiques des EPS, ce qui permettrait aux microbilles de se mouvoir plus facilement.

En conclusion, exceptée TC5, chaque souche produit un biofilm mature en microplaques de polystyrène après 72 h d'incubation à 20°C en conditions statiques, bien que certaines ne nécessitent seulement que 24 h de culture comme TC12 (dans le MB et le MBG), TC13 ou TC14 (toutes deux dans le VNSS).

Au vue de ces résultats, nous avons opté pour une durée d'incubation de 72 h permettant à toutes les souches d'atteindre un Δ BFI supérieur à 17.

Nous n'avons pas testé des durées d'incubation plus longues étant donné que les Δ BFI obtenus à 72 h sont proches du Δ BFI maximal mesurable par le BFRT[®]. Il est probable que pour certaines bactéries, la formation de biofilm pourrait régresser après 72 h d'incubation. Ceci est peut être déjà le cas pour les souches TC12 et TC13 dans le milieu MB complémenté en glucose dès 24 heures (48 h pour la souche TC13). L'étude plus spécifique de l'effet du milieu de culture fait l'objet de la partie suivante.

4.2.2. Effet du milieu de culture

On constate, pour une souche donnée, des différences de Δ BFI selon le milieu de culture. Par exemple avec TC14 à 24 h, nous obtenons des Δ BFI au minimum 3 fois supérieur dans le milieu VNSS par rapport aux milieux MB ou MBG. Ces différences obtenues pourraient être dues au fait que, selon le milieu de culture, les bactéries produisent plus ou moins de matrice et/ou que ce soit la composition de la matrice qui varie. Il est intéressant de noter que pour toutes les souches sauf TC12, le Δ BFI à 24 h est plus élevé pour le milieu VNSS que pour les milieux MB et MBG. Cette observation n'est plus valable à 48 et 72 h. Il est possible que le VNSS soit responsable d'une activation plus rapide de la production d'EPS par les bactéries, probablement du fait de sa composition spécifique par rapport aux 2 autres milieux. Il pourrait être intéressant de déterminer quels facteurs induisent la formation de biofilm dans le VNSS en omettant un à un chacun des composants du milieu.

Ceci ne se vérifie pas pour la souche TC12 qui, à 24 h, a un Δ BFI plus élevé dans les milieux MB et MBG comparativement au milieu VNSS.

Maintenant, si nous comparons les résultats obtenus à 24 h, entre les milieux MB et MBG, nous observons que l'ajout de 3 % de glucose permet d'obtenir plus rapidement un Δ BFI élevé pour les souches TC9 et TC14 uniquement. Par conséquent, ces résultats montrent que la réponse en terme de formation du biofilm est souche-spécifique et peut varier même au sein d'un même genre (par exemple TC14 et TC13 font partie du même genre, *Pseudoalteromonas*, mais pour TC14 l'ajout de glucose dans le milieu MB permet d'obtenir plus rapidement un Δ BFI élevé, ce qui n'est pas le cas pour TC13).

Nous avons par la suite porté notre attention sur les résultats obtenus à 72 h d'incubation comme indiqué ci-dessus. Aussi, les mesures à 72 h ont fait l'objet d'une analyse statistique par le logiciel GraphPad PRISM. Les données ont été analysées avec le test

ANOVA (analyse de la variance) à 2 facteurs. Le niveau statistique de significativité a été fixé à $p < 0,05$. Ainsi, pour la souche TC8, les résultats obtenus avec les milieux MBG et VNSS ne sont pas significativement différents ; il en est de même pour les résultats obtenus avec les milieux MB et MBG. En revanche, le Δ BFI mesuré en MB est significativement plus élevé que celui obtenu en VNSS. TC9 et TC11 donnent des résultats similaires ; le Δ BFI dans les milieux MB et MBG ne sont pas différents mais dans les deux cas, ces résultats sont plus élevés, significativement, par rapport à ceux obtenus en VNSS. Pour les souches TC12 et TC14, les Δ BFI sont différents pour les 3 milieux avec un Δ BFI le plus élevé dans le milieu MB. Pour la souche TC13, il n'y a pas de différences significatives entre les Δ BFI mesurés en MB et en VNSS. Par contre, le milieu MBG donne un Δ BFI inférieur à celui obtenu pour les 2 autres milieux. Enfin pour la souche TC15, le Δ BFI en VNSS est significativement plus faible que celui dans les milieux MB et MBG qui sont tous deux identiques.

On remarque donc, outre l'illustration de la diversité de comportement des souches toutes issues du même milieu marin dans des conditions de culture définies, que pour l'ensemble des souches étudiées, le milieu MB permet toujours d'obtenir à 72 h les Δ BFI les plus élevés (certes parfois comparables avec l'un des 2 autres milieux). Il est intéressant de noter que l'ajout de 3 % de glucose, souvent utilisé pour détecter les souches productrices de matrice exopolymérique, n'a pas d'effet significatif dans cette étude. Nous pouvons en conclure que ces souches ne sont pas sensibles à la complémentation en glucose pour la production d'EPS (sauf TC9 et TC14 à 24 h).

4.2.3. Effet du temps d'incubation et du milieu de culture pour la souche TC5

Comme décrit dans le chapitre 3, l'indice Δ BFI de la souche TC5 cultivée dans le VNSS, quelle que soit la durée d'incubation, ne dépasse pas 2, ceci pouvant traduire une absence de production de biofilm dans ces conditions. Il est intéressant de constater que dans les milieux MB et MBG, cette souche présente, à partir de 24 h, des Δ BFI supérieurs à 2 même si ceux-ci ne dépassent pas 15 y compris à 72 h. Ceci signifierait que cette souche ne forme pas de biofilm dit « mature » dans les milieux utilisés. Nous pouvons observer des résultats significativement différents pour les 3 milieux, le MB étant celui qui donne des Δ BFI les plus élevés.

Par conséquent, les conditions choisies pour la mise au point du protocole d'extraction des EPS sont donc ; 72 h d'incubation en milieu MB.

4.3. Mise au point du protocole d'extraction des EPS solubles (EPS-sol) et des EPS faiblement liés aux bactéries (EPS-fl)

La comparaison de l'ensemble des publications relatant l'extraction et l'étude des EPS montre l'existence d'une multitude de protocoles (Comte *et al.*, 2006 ; Aguilera *et al.*, 2008 ; D'Abzac *et al.*, 2010 ; Domínguez *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2010a ; Ras *et al.*, 2011 ; Caudan *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2012 ; Zuriaga-Agustí *et al.*, 2013). La quantité et la composition des EPS extraites dépendent de la méthode utilisée et inversement un même protocole ne donnera pas les mêmes rendements selon le type de biofilm étudié. Il n'existe donc pas de protocole universel. Deux principaux types de méthodes sont utilisées, (i) les méthodes chimiques avec l'utilisation d'agent chélateur (EDTA), d'agent fixateur (glutaraldéhyde), de surfactant (tween[®]), d'acide (HCl), de base forte (NaOH en présence ou non de formaldéhyde) ou de sels (NaCl) ; (ii) les méthodes physiques, parmi lesquelles, la sonication, la centrifugation, le chauffage ou l'utilisation d'une résine échangeuse de cations. Ces dernières sont généralement plus douces, ce qui permet de garder l'intégrité des bactéries, mais en contre partie leur rendement est par conséquent souvent plus faible. A l'inverse, les méthodes chimiques permettent d'obtenir des rendements intéressants mais ce sont des méthodes plutôt agressives qui détériorent facilement les parois cellulaires et peuvent modifier chimiquement la composition des EPS (Liu et Fang, 2002 ; Comte *et al.*, 2006 ; D'Abzac *et al.*, 2010). Ces 2 types de méthodes peuvent être utilisés séparément ou de manière combinée (Caudan *et al.*, 2012).

Quelle que soit la méthode choisie, celle-ci doit permettre d'atteindre 4 buts importants (Xu *et al.*, 2009) :

- ⇒ Déstructurer le biofilm et faciliter la dissociation des exopolymères de la matrice,
- ⇒ Conserver le plus possible l'intégrité des cellules,
- ⇒ Donner un bon rendement d'extraction des EPS,
- ⇒ Ne pas modifier chimiquement la composition des EPS et ne pas les dénaturer.

La plupart des protocoles d'extraction permettent de séparer les EPS selon leurs liens avec les bactéries au sein du biofilm : les EPS solubles qui sont libres dans le milieu de culture, les EPS faiblement liés et les EPS fortement liés pour lesquels le protocole d'extraction est plus complexe que celui permettant d'isoler les EPS solubles et les EPS faiblement liés (Liang *et al.*, 2010 ; Aires *et al.*, 2011 ; Pellicer-Nàcher *et al.*, 2013). Ces dernières sont en effet plus faciles à séparer des cellules et des méthodes physiques

(centrifugation ou sonication) suffisent pour les isoler. Les EPS qui sont fortement liées aux bactéries sont, quant à elles, plus difficiles à isoler ; il faut généralement utiliser des méthodes chimiques pour pouvoir les extraire (Lembre *et al.*, 2012).

Dans cette étude, les 8 souches pré-sélectionnées ont été mises en culture pour former un biofilm dans des boîtes de Petri (10 boîtes/souche) dans les conditions pré-établies (milieu MB, culture de 72 h à 20°C sans agitation) (Figure 34).



Figure 34. Production de biofilm en milieu liquide dans des boîtes de Petri. A gauche : culture de TC11 à t_0 , juste après l'ensemencement des boîtes. A droite : culture de TC11 après 72 h d'incubation.

Pour éviter une mortalité potentielle des bactéries, du milieu frais a été ajouté dans chaque boîte de Petri après 48 h d'incubation. Quelques publications décrivent un mode de production de biofilm similaire. Par exemple Harvey *et al.* ont cultivé des bactéries en biofilm dans des petites boîtes de Petri pendant 14 jours (Harvey *et al.*, 2007), Andersson *et al.* ont placé des pièces de polystyrène dans des tubes de 50 mL contenant 10 mL de culture bactérienne, l'incubation a duré entre 7 et 20 jours avec un changement de milieu toutes les 48 heures (Andersson *et al.*, 2009 ; Andersson *et al.*, 2011).

Dans notre expérience, à la fin de la culture, les biofilms ont été récupérés selon le protocole décrit dans la Figure 35. Ce protocole permet de séparer et d'isoler les EPS libérées dans le milieu (EPS-sol), les EPS faiblement liées (EPS-fl) et le reste du biofilm (bactéries entourées des EPS fortement liées, les EPS-FI). Ce dernier n'a pas été traité dans ce protocole ; il a seulement été pesé. L'isolement des EPS-sol et l'extraction des EPS-fl sont basés sur une méthode physique douce, la centrifugation à basse vitesse (4000 g pendant 40 min).

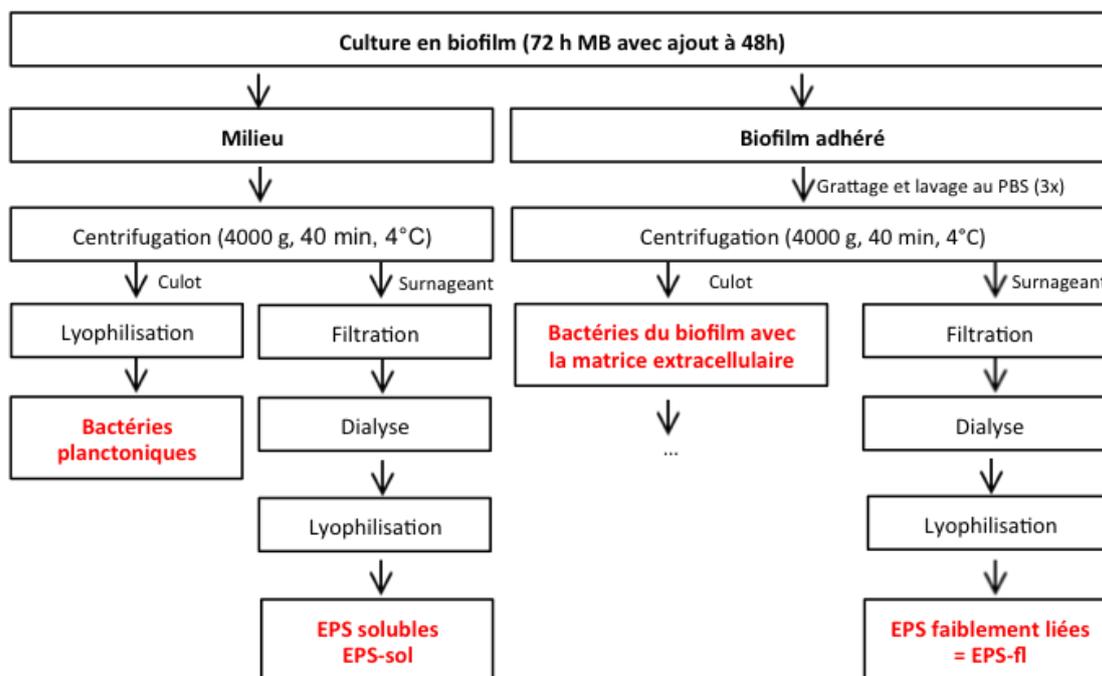


Figure 35. Protocole d'extraction des EPS libérées dans le milieu (EPS-sol) et des EPS faiblement liées (EPS-fl).

Le milieu de culture a été dans un premier temps séparé du biofilm adhérent au fond des boîtes de Petri. Celui-ci a subi une centrifugation pour séparer les bactéries du surnageant. Ce dernier a été filtré pour éliminer toutes bactéries résiduelles puis dialysé pour ne garder que les molécules de poids moléculaire supérieur à 6000-8000 Da que l'on nomme EPS-sol. Les bactéries planctoniques d'un côté et les EPS-sol d'un autre côté, ont été lyophilisées pour déterminer leur masse sèche.

En parallèle, le biofilm formé sur la surface des boîtes de Petri a été récupéré à l'aide d'un grattoir puis centrifugé (4000g, 40 min). Cette technique douce permet ainsi d'isoler les EPS faiblement liées aux bactéries du reste du biofilm. Après une étape de filtration (pour éliminer les bactéries résiduelles) et une étape de dialyse (pour éliminer les petits solutés et des petits polymères), les EPS-fl ont finalement été lyophilisées puis pesées. Le reste du biofilm, contenant les bactéries et les EPS-Fl, a été lui aussi lyophilisé avant d'être pesé. Les masses mesurées sont regroupées dans le Tableau 22.

Souches	Masse bactéries planctoniques	Masse bactéries sessiles + EPS-FI	Masse EPS-sol	Masse EPS-fl	BFRT (Δ BFI)
TC5	230	20	37	6,7	14,3
TC8	70	70	27	23	20,88
TC9	140	30	39	18	21,36
TC11	110	70	34	3,6	20,86
TC12	130	80	47	1	22,25
TC14	70	240	21	55	21,14
TC15	180	110	26	9	21,25

Tableau 22. Masses en mg récupérées lors de l'isolement des EPS-sol et des EPS-fl pour les 8 souches pré-sélectionnées. Ces masses sont obtenues pour des cultures en biofilm dans 10 boîtes de Petri. Pour comparaison, les indices Δ BFI sont rappelés dans la colonne de droite. Pas de données pour la souche TC13.

Il est intéressant de noter que la masse de bactéries planctoniques récoltées est plus importante que celle du biofilm (bactéries sessiles associées aux EPS-FI) pour toutes les souches sauf pour TC8 et TC14. Nous pouvons en conclure pour 5 souches sur les 7 étudiées ici, que malgré un Δ BFI élevé, la majorité des bactéries de la culture se trouvent hors du biofilm. Une hypothèse possible est que les masses obtenues pour les bactéries sessiles avec EPS-FI représentent surtout les masses des EPS-FI. La présence de ces EPS-FI permettrait de comprendre les indices Δ BFI élevés obtenus avec le BFRT[®].

On peut constater que pour TC14, nous obtenons, en masses, 3 fois plus de bactéries sessiles associées aux EPS-FI que de bactéries planctoniques. Ce résultat pouvait être prévisible du fait que cette souche produit à l'interface air/liquide un film violet observable à l'œil nu dans les boîtes de Petri. Les images de MEB montrent que ce film est constitué de bactéries dans une gaine de matrice formant un film (EPS-FI) (Figure 36). La photo de la boîte de Petri montre que le milieu de culture autour du voile est limpide confirmant le faible nombre de bactéries planctoniques.

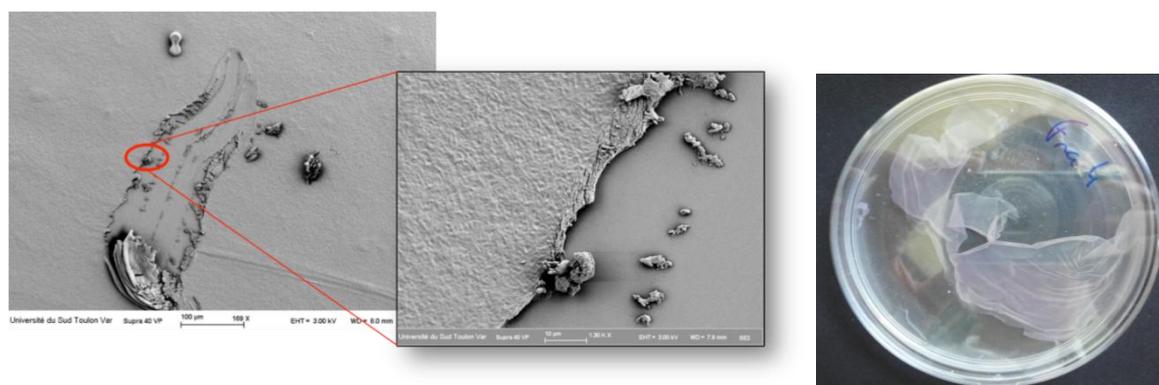


Figure 36. Biofilm de TC14. A gauche : image (MEB) du voile de TC14. Au centre de la photo, le voile a été déchiré. Le zoom permet d'apercevoir la zone de déchirement. A droite : Film violet produit par la souche TC14. Ici, le voile occupant initialement toute la surface de la boîte de Petri a été déchiré.

Pour les souches TC8 et TC15, le biofilm est moins spectaculaire car nous ne retrouvons pas de film à l'interface air/liquide, elles forment un film très fin translucide adhérent au fond des boîtes de Petri.

TC5 est la souche ayant la plus faible masse de biofilm (bactéries sessiles + EPS-Fl) et la masse la plus importante de bactéries planctoniques. Ces résultats confirment les résultats obtenus avec le BFRT[®] indiquant que cette souche produit peu de biofilm dans nos conditions de travail.

Si l'on compare maintenant les résultats obtenus pour les masses d'EPS-sol et d'EPS-fl, nous constatons que la masse des EPS faiblement liées est très inférieure (pour 5 souches) ou proche (pour 2 souches) de celle des EPS excrétées dans le milieu (EPS-sol), tandis que pour la souche TC14, deux fois plus d'EPS-fl sont récoltés par rapport à la masse d'EPS-sol mesurée. Cette souche produit très majoritairement un film d'EPS liées aux bactéries (EPS-fl et EPS-Fl).

4.4. Etablissement d'un protocole d'extraction des EPS fortement liées aux bactéries (EPS-Fl)

4.4.1. Protocole avec résine échangeuse de cations (CER)

Pour cette étude, nous avons opté pour un protocole basé sur une méthode physique utilisant une résine échangeuse de cations (CER). Cette méthode est souvent utilisée en raison de sa capacité à détruire la cohésion de la matrice tout en préservant l'intégrité des cellules (Frolund *et al.*, 1996 ; Takahashi *et al.*, 2009 ; Domínguez *et al.*, 2010 ; Pierre *et al.*, 2010 ; Flemming, 2011). Elle permet en effet de rompre les interactions ioniques en retirant les cations bivalents interagissant avec les groupements chargés négativement de macromolécules et permettant ainsi le maintien de la cohésion de la matrice. L'extraction des EPS a été réalisée par une série de centrifugations (Frolund *et al.*, 1996 ; Flemming, 2011). Frölund *et al.* ont montré que, sur des boues activées, le ratio protéines/glucides était de l'ordre de 3,9 à 5,1 selon le temps d'extraction et que cette méthode permettait de limiter la lyse des cellules (Frolund *et al.*, 1996). Domínguez *et al.* ont comparé plusieurs méthodes et ont montré que la résine échangeuse de cations est la plus appropriée en termes de rendements d'extraction (Domínguez *et al.*, 2010). Dans le même esprit, Takahashi *et al.* ont observé que l'extraction CER permet une très faible lyse cellulaire (Takahashi *et al.*, 2009). Dans le même temps, d'autres publications ont tempéré ces résultats en montrant que dans certaines

conditions la résine échangeuse de cations ne donne pas les meilleurs rendements d'EPS mais permet tout de même de récupérer préférentiellement les polysaccharides (Aguilera *et al.*, 2008 ; D'Abzac *et al.*, 2010).

La Figure 37 décrit les étapes du protocole d'extraction des EPS-FI, dans lequel la résine échangeuse de cations a été utilisée. Une série de centrifugations et de rinçages a permis de séparer le surnageant, contenant la matrice désunie, des bactéries et de la résine. Les surnageants ont été rassemblés pour être filtrés en vue d'éliminer les bactéries résiduelles (et la résine) puis dialysés pour exclure les molécules de faibles poids moléculaires. Nous avons obtenu ainsi des EPS fortement liés.

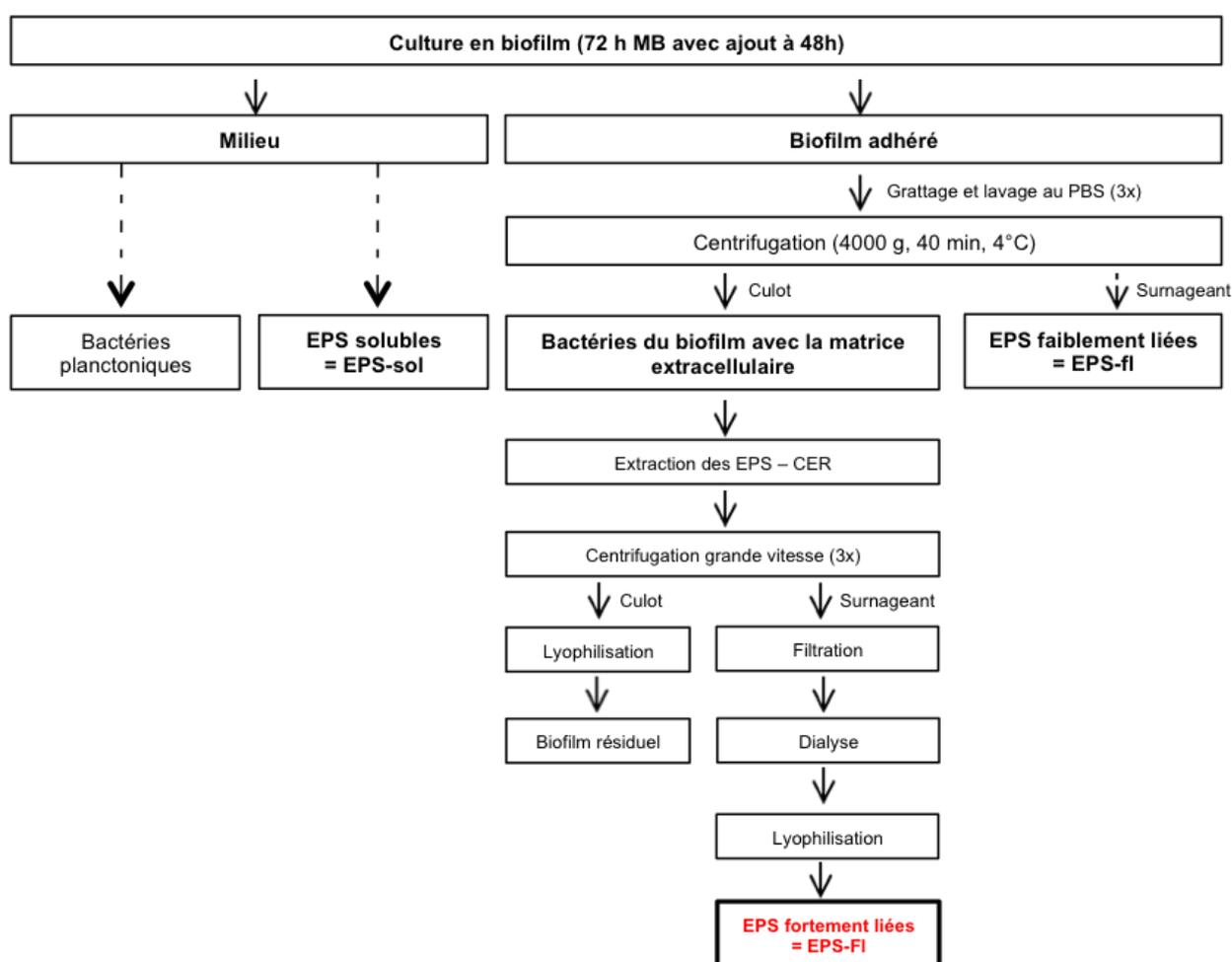


Figure 37. Protocole d'extraction des EPS fortement liés aux bactéries (EPS-FI). Ce protocole est basé sur l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions (Dowex®).

Ce protocole a été testé sur 3 souches, TC5, TC9 et TC15, ce qui nous a permis d'avoir des résultats d'extraction pour 3 genres bactériens différents (*Polaribacter*, *Shewanella* et *Pseudoalteromonas*).

Les masses des 3 types d'EPS extraits pour chaque souche sont regroupées dans la Figure 38.

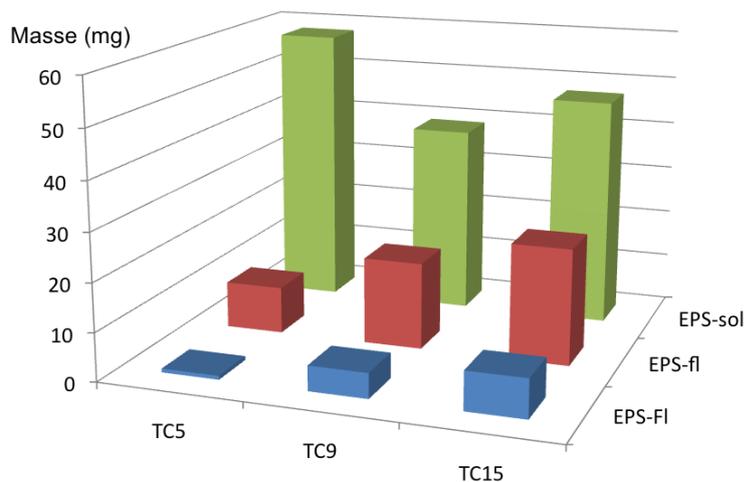


Figure 38. Masses (mg) des EPS-sol, EPS-fl et EPS-FL pour TC5, TC9 et TC15 obtenues avec le protocole d'extraction avec une résine échangeuse de cations, pour 10 boîtes de Petri pour chaque souche bactérienne.

Quelle que soit la souche, les EPS-sol sont toujours majoritaires et les EPS-FL sont quant à eux toujours en très faible quantité (moins de 10 mg pour 10 boîtes de Petri de culture bactérienne en biofilm). Soit ces 3 souches produisent naturellement, dans nos conditions de culture, plus d'EPS solubles que d'EPS liées, soit un biais est introduit dans nos résultats dû au faible rendement obtenu avec la résine échangeuse de cations.

Etant données les faibles masses obtenues, nous pouvons considérer que le protocole d'extraction avec la résine échangeuse de cations ne permet de récupérer, dans nos conditions, qu'une faible partie de la matrice exopolymérique. Liu *et al.* ont fait le même constat en comparant l'efficacité de divers traitements du biofilm (Liu et Fang, 2002).

Toutefois, si l'on s'intéresse plus précisément aux différents résultats obtenus pour les 3 souches cultivées dans les mêmes conditions, nous constatons que la souche TC5 produit plus d'EPS-sol que TC9 et TC15 et inversement pour les EPS-FL. Ces résultats peuvent être confrontés à ceux obtenus avec le BFRT[®]. D'une part, TC5 a un faible Δ BFI, et d'autre part, TC9 et TC15 ont un Δ BFI supérieur à 21. Pour la souche TC5, l'ensemble des résultats paraissent concordants, cette souche produit surtout des EPS-sol ce qui altérerait peu la mobilité des microbilles du BFRT[®] et maintiendrait une surface des bactéries plutôt hydrophobe. Les souches TC9 et TC15 qui ont des Δ BFI élevés, produisent plus d'EPS-FL que la souche TC5. Pourtant, les masses d'EPS-FL obtenues restent tout de même faibles. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées ; l'extraction avec la résine échangeuse de cations ne permet de récupérer qu'une partie réduite des EPS-FL présents en réalité dans le biofilm en quantité importante, comme envisagé ci-dessus (si l'on compare avec les résultats du Tableau

22 nous constatons que les masses d'EPS-FI obtenues avec la CER sont très inférieures aux masses de bactéries sessiles + EPS-FI) ou alors, lors du BFRT[®], c'est la composition plutôt que la quantité de matrice qui pourrait jouer un rôle prépondérant sur la mobilité des microbilles jusqu'à permettre d'obtenir des Δ BFI élevés sans qu'il n'y ait pour autant une production importante d'EPS-FI.

Nous avons poursuivi l'étude de ces EPS en évaluant le pourcentage de protéines, glucides et acides nucléiques dans chaque extrait afin d'en connaître globalement la composition (Tableau 23).

Souches	Types d'EPS	Protéines ^a	Glucides ^b	Acides nucléiques ^c
TC5	EPS-fl	7-9	2-4	2-4
	EPS-FI	5-7	17-19	7-9
TC9	EPS-fl	6-8	3-5	1-3
	EPS-FI	2-4	6-8	12-14
TC15	EPS-fl	4-6	1-3	6-8
	EPS-FI	21-23	6-8	14-16

Tableau 23. Pourcentages de protéines, glucides et acides nucléiques obtenus pour EPS-fl et EPS-FI de TC5, TC9 et TC15. ^a: méthode de Lowry, ^b: méthode au phénol-acide sulfurique et ^c: méthode au méta-hydroxydiphényl.

Pour les 3 souches, la somme des pourcentages de protéines, de glucides et d'acides nucléiques est inférieure à 100 %, en partie du fait de la très forte hydratation des échantillons pesés avant les dosages et dont les masses sont par conséquent surestimées (abaissant ainsi les valeurs des pourcentages des éléments dosés). La composition de plus de la moitié des échantillons n'est pas déterminée et il est peu probable que dans les 3 cas, les lipides représentent une part si importante des EPS. Les glucides sont globalement minoritaires (sauf pour TC5), tandis que les acides nucléiques sont bien présents, en particulier dans les EPS-FI. Nous pouvons alors nous demander si cela ne reflèterait pas une lyse cellulaire due au protocole d'extraction ou si ces 3 souches produisent effectivement autant d'ADN extracellulaire. Les protéines sont largement majoritaires dans les EPS-FI de TC15.

Plusieurs points montrent que ce protocole utilisant une résine échangeuse de cations ne paraît pas être adapté à notre étude. Les masses d'EPS-FI obtenues sont faibles et le pourcentage de glucides est très faible dans tous les échantillons et souvent inférieur à celui des protéines et des acides nucléiques. Enfin, le protocole est long et fastidieux.

4.4.2. Protocole d'extraction à la soude

Nous avons choisi, comme alternative à la résine échangeuse de cations, une méthode chimique afin d'obtenir de meilleurs rendements. Notre choix s'est orienté vers une extraction par une solution de NaOH à 0,1 M pour déstructurer la cohésion de la matrice et solubiliser ainsi les EPS. La plupart des protocoles décrits dans la littérature utilisant la soude, l'associe à du formaldéhyde dans un but de protéger les cellules de la lyse (Liu et Fang, 2002 ; Comte *et al.*, 2006 ; D'Abzac *et al.*, 2010 ; Domínguez *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2010a ; Sun *et al.*, 2012) mais certaines études utilisent le NaOH seul (Xu *et al.*, 2009 ; Aires *et al.*, 2011 ; Dogsa *et al.*, 2013). Nous avons opté pour une faible concentration en soude (10 fois moins concentrée que dans la plupart des travaux publiés) permettant ainsi de se préserver d'une potentielle lyse cellulaire sans pour autant ajouter du formaldéhyde qui pourrait modifier chimiquement les échantillons. Certaines publications ont montré qu'une méthode à base de soude comme agent chimique d'extraction des EPS permet de récupérer préférentiellement des protéines et non des polysaccharides (Brown et Lester, 1980 ; Xu *et al.*, 2009 ; Pan *et al.*, 2010a) tandis que d'autres présentent au contraire une extraction de près de 4 fois plus de polysaccharides que de protéines (Sun *et al.*, 2012). Comme toutes les méthodes d'extraction décrites, les résultats dépendent avant tout des biofilms traités. Dans le cas de l'utilisation de la soude, plusieurs avantages sont à noter :

- ⇒ Xu *et al.* ont montré qu'une solution NaOH 0,5 M lyse moins les cellules que 3 % de NaCl ou 2 % d'EDTA (Xu *et al.*, 2009). D'autres études ont montré qu'une solution de NaOH 0,1 M ne provoque pas de lyse significative (Seviour *et al.*, 2010 ; Seviour *et al.*, 2012 ; Dogsa *et al.*, 2013).
- ⇒ Une solution NaOH 0,1 M augmente la charge des EPS ce qui augmente leur solubilité permettant de désintégrer la matrice du biofilm. Cette méthode est souvent utilisée pour isoler les EPS des boues activées (Dogsa *et al.*, 2013).
- ⇒ Plusieurs publications ont montré que la méthode au formaldéhyde + NaOH 1 M est plus efficace en termes de rendements d'extraction par rapport à d'autres méthodes comme les ultrasons, l'utilisation d'EDTA ou la résine échangeuse de cations (Liu et Fang, 2002 ; D'Abzac *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2010a ; Sun *et al.*, 2012).

Le protocole mis au point est décrit Figure 39.

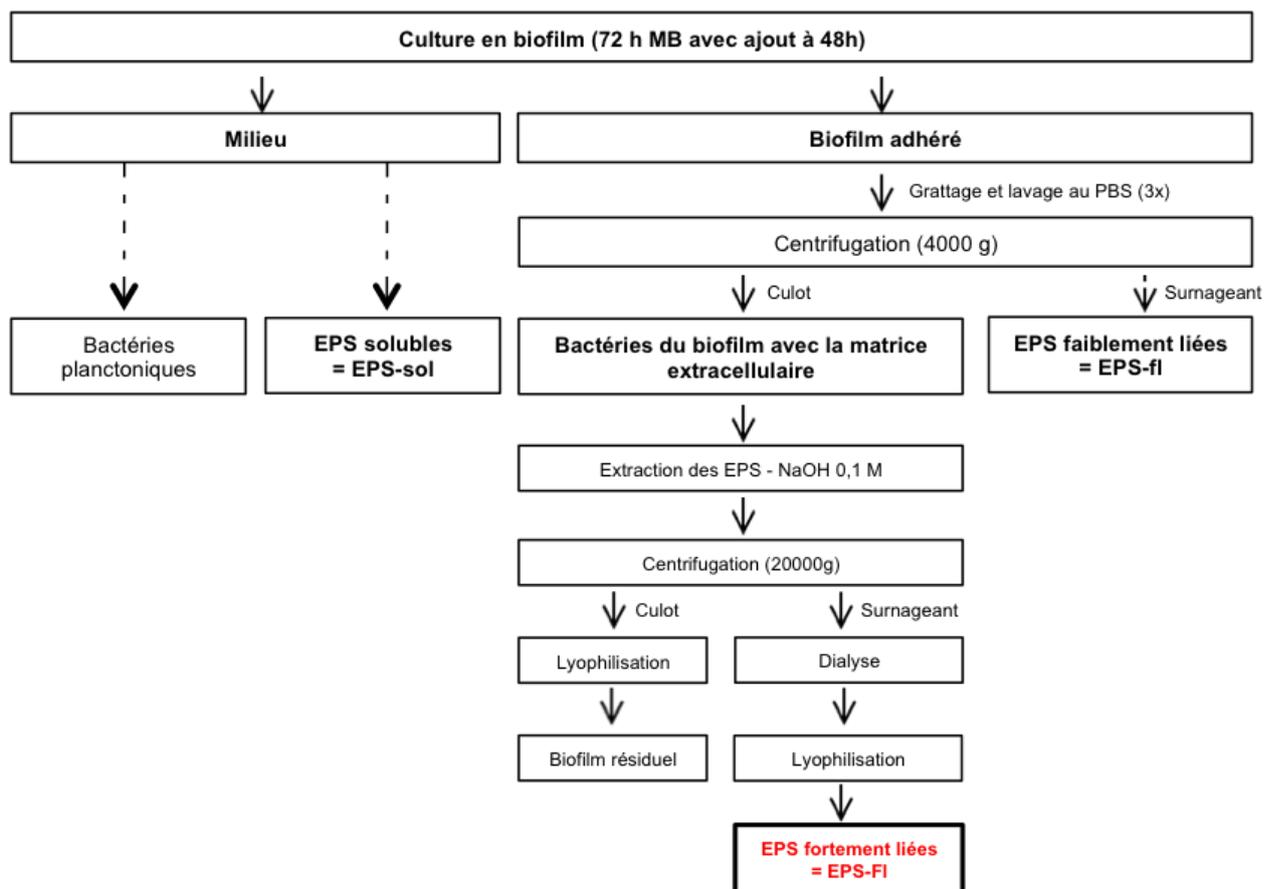


Figure 39. Protocole d'extraction des EPS fortement liées aux bactéries (EPS-FI). Ce protocole est basé sur l'utilisation d'une solution NaOH 0,1 M.

En résumé, les bactéries du biofilm entourées de leur matrice extracellulaire ont été mélangées à une solution de soude à 0,1 M pendant 4 heures sous agitation à 37°C. La solution a été ensuite centrifugée à grande vitesse pour séparer la matrice des bactéries. Le surnageant contenant les exopolymères extraits (EPS fortement liées ou EPS-FI) a été dialysé puis lyophilisé. Le culot bactérien (biofilm résiduel) a lui aussi été séché.

Les masses obtenues pour les EPS-FI avec les deux protocoles (CER et NaOH 0,1 M) à partir de biofilms des 3 souches TC5, TC9 et TC15 sont exposées dans la Figure 40. Nous constatons, pour TC5 et TC15, un rendement bien plus important sous l'effet de la soude par rapport à la résine. Ainsi pour TC5, environ 10 fois plus d'EPS-FI sont extraites avec le protocole à la soude. Pour TC15, nous quadruplons la quantité d'EPS-FI récupérées. Pour TC9, les quantités extraites sont similaires quelque soit le protocole utilisé.

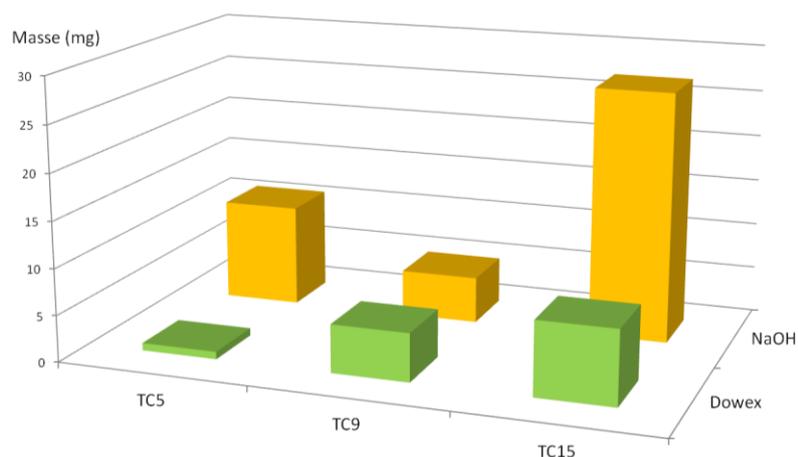


Figure 40. Masse (en mg) d'EPS-FI extraites avec le protocole utilisant la soude (NaOH) en comparaison avec la résine échangeuse de cations (Dowex[®]). Pour chaque souche, le test a été fait sur des cultures en biofilm dans 10 boîtes de Petri.

Plusieurs conclusions s'imposent. L'efficacité des protocoles d'extraction dépend effectivement de la souche bactérienne. Les biofilms sont plus ou moins bien déstructurés selon les agents utilisés du fait de la diversité de la nature des EPS produites et des interactions qu'elles établissent. Par exemple, le biofilm de TC9 est tout aussi « sensible » aux 2 méthodes appliquées tandis que les exopolymères de TC5 et TC15 se détachent bien mieux avec le protocole utilisant la soude. Ainsi, pour 2 souches sur 3, le protocole à la soude permet d'obtenir des meilleurs rendements d'extraction. Il sera donc choisi pour la suite de l'étude. De plus, il est moins long et moins fastidieux à mettre en œuvre, ce qui est un avantage non négligeable. Nous pouvons remarquer ici que la souche TC5, qui semblait ne pas produire de matrice exopolymérique au vu des résultats du BFRT[®] et de la quantité d'EPS-fl et -FI extraites avec la CER, donne un résultat inattendu après action de la soude sur le biofilm formé.

4.5. Première sélection des souches bactériennes

Sur les 8 souches pré-sélectionnées, seules TC8, TC9, TC12, TC14 et TC15 ont été retenues. La souche TC11 n'a pas été sélectionnée en raison de la faible quantité d'EPS-fl récupérées (voir Tableau 22). Une sixième souche, TC5, a été gardée pour ces caractéristiques atypiques.

4.6. Etude des EPS des six souches sélectionnées

4.6.1. Masses des EPS et rendement

Nous avons utilisé le protocole à la soude (voir Figure 39) pour extraire les EPS-FI des 6 souches sélectionnées (TC5, TC8, TC9, TC12, TC14 et TC15). Les résultats obtenus sont regroupés dans la Figure 41.

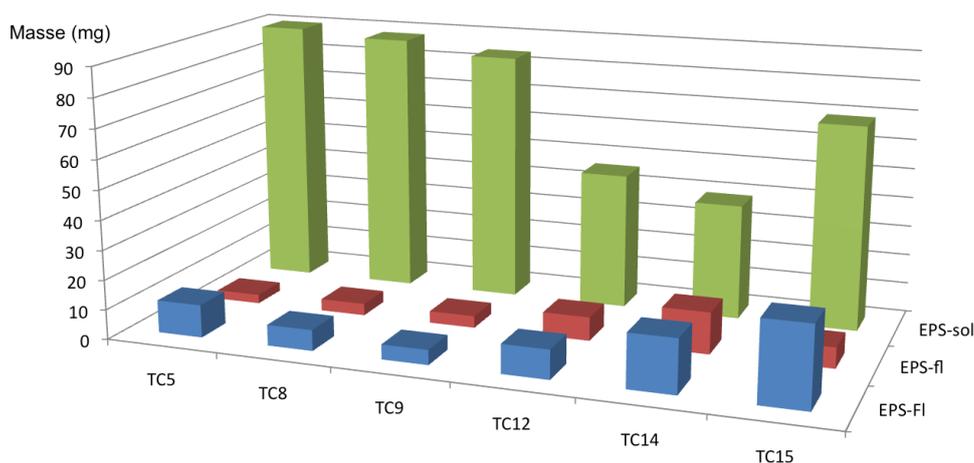


Figure 41. Masse (en mg) des 3 types d'EPS extraites pour 6 souches cultivées dans 10 boîtes de Petri.

Plusieurs points intéressants sont à souligner :

- ⇒ Pour toutes les souches, les EPS-sol sont majoritaires. TC14 est la souche ayant la plus faible proportion en EPS-sol. Ce résultat est corroboré par l'observation d'un film violet dense lors de la culture et d'un milieu très clair.
- ⇒ Pour toutes les souches, les quantités d'EPS-fl restent assez faibles (inférieures à 20 mg).
- ⇒ TC14 et TC15 sont les 2 souches produisant le plus d'EPS-FI.
- ⇒ On retrouve, en complément de la Figure 40, avec ici les 3 types d'EPS et en comparaison avec plus de souches, que la souche TC5 produit, malgré son faible Δ BFI, plus d'EPS-FI que TC8, TC9 et TC12 qui ont pourtant un Δ BFI élevé. Ce paradoxe pourrait être dû à la composition des EPS qui influencerait la mobilité des microbilles magnétiques ; une matrice visqueuse même peu abondante pouvant empêcher la migration des billes au centre du puits sous l'effet de l'aimantation alors que dans une matrice, même relativement abondante comme dans le biofilm de TC5, la mobilité des microbilles peut être facilitée par la nature chimique des EPS.

Le BFRT[®] serait donc représentatif de la quantité de biofilm formé par une souche mais également de la nature des EPS entraînant une viscosité/densité différentielle des

biofilms. Ainsi TC5, TC8, TC9 et TC12 formeraient un biofilm, mais la composition très différente des matrices produites fait que les microbilles se comportent différemment sous aimantation et donnent des Δ BFI variés.

Si l'on compare les résultats obtenus dans le Tableau 22 et la Figure 41 pour TC5, ils montrent, du fait de la faible masse de bactéries sessiles + EPS-FI, que les EPS-FI ont facilement été extraites avec la soude et indiquent que peu de bactéries seraient présentes dans le biofilm adhérent à la surface (11 mg des 20 mg représentent les EPS-FI). Le biofilm de TC5 apparaît donc relativement abondant en EPS mais bien moins que TC14 ou TC15. En effet, la souche TC14 par exemple, fournit une quantité supérieure d'EPS-FI et nous pouvons remarquer, avec l'efficacité partielle du traitement à la soude lors de l'extraction, la proportion encore très importante, par rapport aux autres souches, de biofilm résiduel, donc une réserve potentielle d'EPS-FI en plus d'une densité bactérienne certainement importante dans le biofilm (seuls 18 mg d'EPS-FI ont été extraits des 240 mg représentant les bactéries sessiles + les EPS-FI). Dans le cas de TC9, la proportion de bactéries sessiles et les quantités d'EPS-fl et d'EPS-FI sont très faibles. Ces résultats sont en contradiction avec celui du BFRT[®]. Cette souche semble donc produire très peu de biofilm (peu de matrice et peu de bactéries sessiles) mais la composition de la matrice pourrait suffire à perturber fortement la mobilité des microbilles donnant un Δ BFI élevé. Les quantités obtenues pour les 3 types d'EPS ont été calculées (Tableau 24).

Enfin, les quantités en EPS-sol sont supérieures à celles des EPS-fl et EPS-FI, quelle que soit la souche bactérienne. Ces fortes quantités pourraient être expliquées par la présence, dans les échantillons d'EPS-sol, de composés issus du milieu de culture malgré l'étape de dialyse ayant permis d'éliminer au moins l'essentiel des composés de petites tailles (< 6-8 kDa). Si l'on compare les résultats obtenus entre les EPS-fl et les EPS-FI pour chaque souche, nous pouvons constater que la quantité en EPS-FI est toujours supérieure à celle des EPS-fl, ce qui n'est pas surprenant et témoigne des fortes interactions entre les polymères de la matrice des biofilms ici étudiés.

Souche bactérienne	Type d'EPS	Quantité (mg/mg de biofilm)
TC5	EPS-sol	4,74
	EPS-fl	0,16
	EPS-FI	0,58
TC8	EPS-sol	4,00
	EPS-fl	0,18
	EPS-FI	0,32
TC9	EPS-sol	5,25
	EPS-fl	0,25
	EPS-FI	0,31
TC12	EPS-sol	1,36
	EPS-fl	0,24
	EPS-FI	0,29
TC14	EPS-sol	0,32
	EPS-fl	0,11
	EPS-FI	0,14
TC15	EPS-sol	1,03
	EPS-fl	0,10
	EPS-FI	0,40

Tableau 24. Quantités d'EPS (EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI)/mg de biofilm pour les 6 souches étudiées. Exemple de calcul : quantité d'EPS-FI (mg/mg de biofilm) = masse EPS-FI extraites/(masse EPS-FI + masse EPS-fl + masse biofilm résiduel).

4.6.2. Composition des EPS

La composition globale en protéines, glucides, acides nucléiques, acides uroniques et en lipides des EPS isolées pour ces 6 souches a été déterminée, par des techniques de dosages spécifiques ou, pour les lipides, par mesure de la masse de la phase organique obtenue après partage des EPS (voir Chapitre 5 – Figure 46). Pour les EPS-sol (Tableau 25), seuls les pourcentages relatifs en glucides et en protéines ont été déterminés.

Souches	Glucides	Protéines
TC5	6,1	5,7
TC8	5,2	6,8
TC9	9,1	6,9
TC12	8,9	6,9
TC14	13,3	5,8
TC15	5,7	4
Milieu MB	2	6,3

Tableau 25. Pourcentage de glucides et de protéines dans les EPS-sol et dans le milieu MB. Dosage des glucides : méthode au phénol-acide sulfurique et dosage colorimétrique des protéines : méthode de Lowry.

Parmi toutes les EPS-sol étudiées, seules celles de la souche TC14 contiennent majoritairement des glucides. Ces EPS étant isolées du milieu de culture, l'étude du milieu MB dans lequel les cultures ont été réalisées a été effectuée et montre qu'il contient majoritairement des protéines. Cette forte proportion se comprend par la composition du milieu à base de peptone et d'extrait de levure. La faible quantité de glucides dans le milieu de culture (la seule source de glucides dans ce milieu est l'extrait de levure qui en contient environ 6 % (m/m) avec une proportion 1:1 de glucose et de mannose) prouve que l'essentiel des glucides retrouvés dans les EPS-sol ont bien été synthétisés par les souches bactériennes et appartiennent à des composés relargués ou sécrétés.

On remarque, à la lecture de ces résultats (Tableau 25) et des résultats suivants (Tableaux 26 et 27) à quel point les pourcentages estimés sont très en dessous certainement de la réalité étant donnée que leur somme reste très loin du total de 100 %. On connaît la difficulté d'appréciation des résultats de dosages colorimétriques dépendants de la composition des constituants dosés. Cependant, de tels écarts peuvent s'expliquer par deux autres facteurs. Il s'agit avant tout de la forte hydratation des échantillons pesés à l'air ambiant à laquelle peut s'ajouter la présence de sels (non éliminés complètement au cours de l'étape de dialyse). Ces deux facteurs augmentent la masse totale de l'échantillon lors de sa pesée par rapport à la masse réelle d'EPS qu'ils contiennent, ce qui a pour effet de diminuer les pourcentages des différents constituants. Aussi, avons-nous considéré ces résultats comme indicatifs de la présence plus ou moins importante de tel ou tel constituant mais nous nous garderons dans le cas présent d'affirmer qu'un échantillon d'EPS contient par exemple 2 fois plus de glucides que de protéines.

Les résultats obtenus pour les EPS-fl sont regroupés dans le Tableau 26.

Souches	Glucides	A. uroniques	Protéines	Lipides	A. nucléiques
TC5	4,5	1,7	6,5	14,28	0,2
TC8	19,2	0,5	8,7	16,7	0,2
TC9	6,8	2,1	7	12,5	1,4
TC12	6	3	5,3	11,11	0,15
TC14	10	1	2,6	7,46	0,05
TC15	2,1	0,2	1,4	13,33	0,2

Tableau 26. Pourcentage de glucides, acides uroniques, protéines, lipides et acides nucléiques dans les EPS-fl des 6 souches bactériennes. Dosage des glucides : méthode au phénol-acide sulfurique, dosage colorimétrique des acides uroniques : méthode au méta-hydroxydiphényl et dosage colorimétrique des protéines : méthode de Lowry. Le pourcentage des lipides a été déterminé après partage chloroforme/méthanol/eau (voir Figure 46). Les acides nucléiques ont été mesurés grâce le kit *DNeasy Blood & Tissue* (Invitrogen).

Nous pouvons observer plusieurs points :

- ⇒ Les glucides sont majoritaires par rapport aux protéines pour TC8 et pour TC14, comme pour les EPS-sol. La balance pour les EPS des autres souches reste plutôt équilibrée entre les glucides et les protéines. TC14 est la souche dont les EPS-fl contiennent relativement le plus de glucides parmi les 6 souches sélectionnées.
- ⇒ Pour les 6 souches, les acides nucléiques sont en faible quantité (les étapes de rinçage du biofilm et de centrifugation ne lysaient pas les bactéries).
- ⇒ Parmi les glucides, nous retrouvons très peu d'acides uroniques. Nous pouvons en conclure que la majorité des glucides sont neutres.
- ⇒ Les pourcentages en lipides sont assez conséquents pour toutes les souches. Nous pouvons toutefois remarquer, alors que l'estimation de la quantité de glucides et de protéines repose sur des méthodes de dosages colorimétriques qui, selon le protocole appliqué donnent déjà des résultats quelque peu variables, le pourcentage de lipides correspond au pourcentage massique de la phase organique obtenue après partage des EPS (voir chapitre 5 – Figure 46) et ne peut donc être strictement comparé.

Enfin, le Tableau 27 regroupe les résultats obtenus pour les EPS-Fl.

Souches	Glucides	A. uroniques	Protéines	Lipides	A. nucléiques
TC5	6,6	2,3	8,8	50	0,14
TC8	12,3	0,6	4,2	33,33	0,7
TC9	4,4	2,7	6,4	28,57	0,6
TC12	12,6	8,4	5,7	10	0,25
TC14	15,8	1,57	7	6,1	0,26
TC15	3	0,6	4,8	10	0,27

Tableau 27. Pourcentage de glucides, acides uroniques, protéines, lipides et acides nucléiques dans les EPS-FI des 6 souches bactériennes. Dosage des glucides : méthode au phénol-acide sulfurique, dosage colorimétrique des acides uroniques : méthode au méta-hydroxydiphényl et dosage colorimétrique des protéines : méthode de Lowry. Le pourcentage des lipides a été déterminé après partage chloroforme/méthanol/eau (Figure 46). Les acides nucléiques ont été mesurés grâce le kit *DNeasy Blood & Tissue* (Invitrogen).

Nous pouvons constater que :

- ⇒ Les glucides sont majoritaires pour les souches TC12 et à nouveau TC14.
- ⇒ Les lipides sont les composés majoritaires pour TC5 et TC8. Ces résultats confirment ceux obtenus avec le test MATS qui indiquaient respectivement pour TC5 et TC8, un caractère hydrophobe et un caractère moyennement hydrophobe (voir Figure 6 de l'article dans le chapitre 3).
- ⇒ Les acides nucléiques sont en faible quantité, voire en quantité négligeable, ce qui permet de poser 2 conclusions. Premièrement, ces souches ne produisent pas ou peu d'ADN extracellulaire (à moins qu'il ne soit à l'état soluble dans le milieu de culture – non quantifié - faute d'interaction avec les autres EPS) et deuxièmement, ce résultat témoigne de l'absence de lyse cellulaire lors de l'extraction des EPS. Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus avec la résine échangeuse de cations (voir Tableau 23), nous pouvons nous demander si les pourcentages plus importants en acides nucléiques, ne seraient pas dus à la perte d'intégrité, d'une partie au moins des cellules, lors de l'utilisation de la résine.
- ⇒ Les acides uroniques sont toujours peu présents.
- ⇒ Il est intéressant de constater que la composition des EPS-fl et des EPS-FI est différente. TC14 reste la souche présentant les EPS les plus riches en glucides.

4.6.3. Composition en monosaccharides

Nous avons pu voir que les glucides représentent une part importante des EPS-fl et des EPS-FI, plus particulièrement pour les souches TC8, TC12 et TC14. Nous avons donc décidé

d'étudier la composition en monosaccharides de ces EPS en particulier mais plus généralement des 3 types d'EPS (-sol, -fl et -Fl) des 6 souches sélectionnées. Cette étude a été faite par analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats obtenus après hydrolyse acide des échantillons suivie d'une dérivatisation (triméthylsilylation) des monosaccharides libérés sont répertoriés dans le Tableau 28.

Souches	EPS-sol	EPS-fl	EPS-Fl
TC5	Man+Gal	Glc+Man+Gal	Man
TC8	Glc+Man+Gal	Man	Ribose
TC9	Glc+Man+Gal	Glc	Ribose
TC12	NI	NI	Man+Gal
TC14	Glc+Man+NI	Glc+Man+ NI	Glc+ NI
TC15	Glc+Man+Gal	ND	Glc

Tableau 28. Composition en monosaccharides des EPS isolées. Les monosaccharides présents en quantité significative sont indiqués en gras (\geq à 10 % des échantillons hydrolysés). NI : non identifié. ND : non détecté.

Quatre sucres principaux dominant dans les EPS des 6 souches, le glucose, le mannose, le galactose et le ribose. Nous pouvons nous apercevoir que la composition glucidique des EPS-sol est plus complexe que celle des EPS-fl qui sont eux-mêmes plus complexes que les EPS-Fl.

La souche TC14 se démarque en produisant très majoritairement un sucre unique, le glucose, pour les 3 types d'EPS et plus particulièrement pour les EPS-Fl, où seul le glucose est présent sur le chromatogramme (Figure 42).

Ici l'érythritol joue une double fonction en tant que témoin interne. Il permet de déterminer les temps de rétention relatifs des monosaccharides et faciliter ainsi leur identification (en comparaison avec des témoins et en plus du spectre de masse). De plus, la quantité d'érythritol injectée étant connue, cela permet d'estimer la quantité de monosaccharides dans l'échantillon analysé, les coefficients de réponse de chaque sucre témoin ayant été préalablement déterminés.

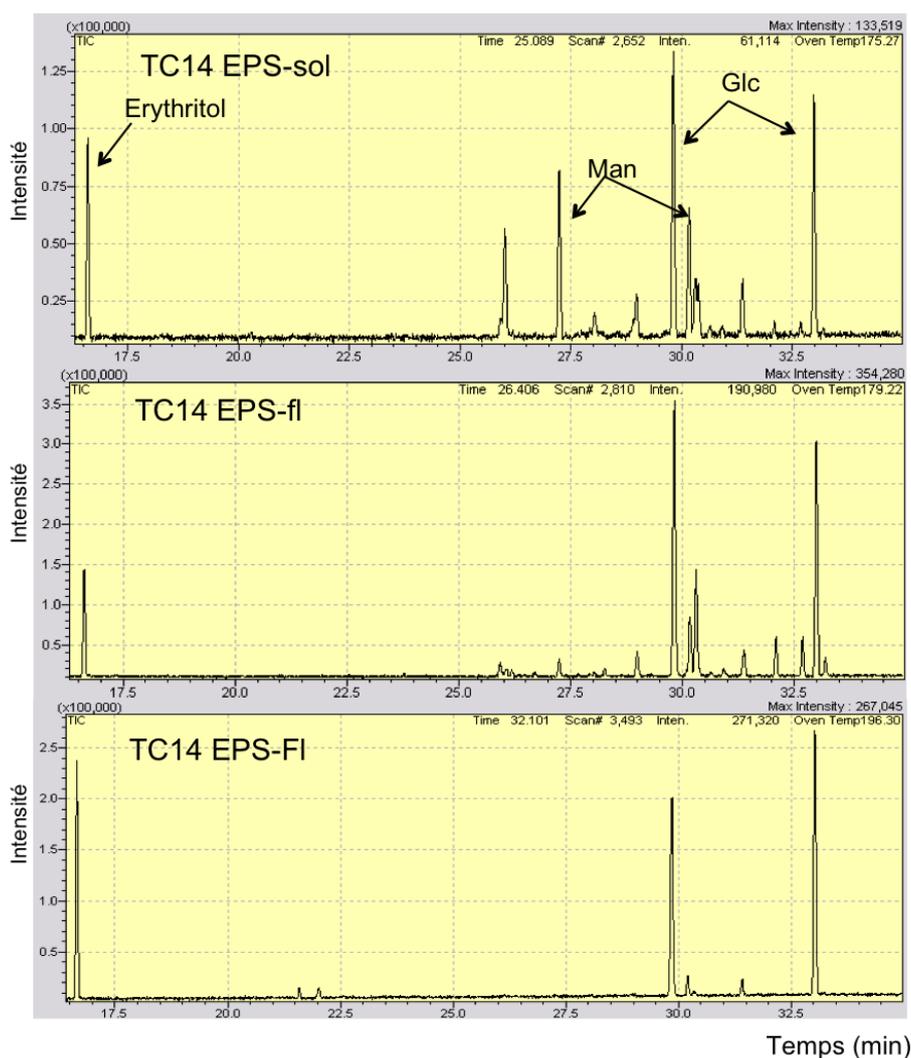


Figure 42. Chromatogramme en phase gazeuse des EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI de TC14 hydrolysées et triméthylsilylés. Température du four : 100 à 280°C (3°C/min). Erythritol : témoin interne. Glc : glucose. Man : mannose. Les abscisses correspondent à la durée d'acquisition (en min).

Pour TC9 et TC15, les faibles intensités des pics des monosaccharides (résultats non montrés) confirment bien les résultats obtenus avec les dosages colorimétriques des glucides totaux. Pour TC14, si l'on compare les 3 chromatogrammes, nous remarquons une diminution du nombre de pics lorsque l'on passe des EPS-sol (majoritairement du glucose et du mannose) aux EPS-fl puis enfin aux EPS-FI, pour lesquels les 2 pics du glucose sont quasiment seuls.

Parallèlement aux analyses des échantillons d'EPS, le milieu MB, a lui aussi été injecté après hydrolyse des composés restant après dialyse (Figure 43).

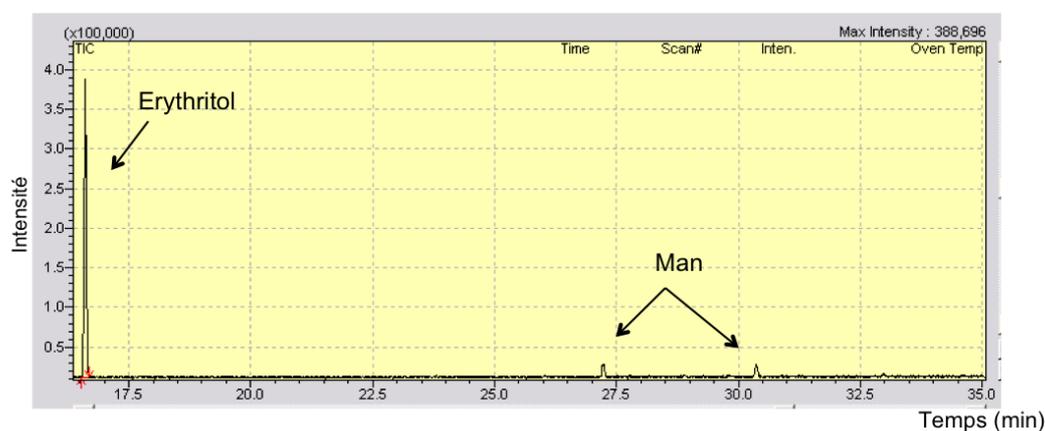


Figure 43. Chromatogramme en phase gazeuse du milieu MB dialysé puis hydrolysé et triméthylsilylé. Température du four : 100 à 280°C (3°C/min). Erythritol : témoin interne. Man : mannose. Les abscisses correspondent à la durée d'acquisition (en min).

Nous avons déjà déterminé que ce milieu contient plus de protéines que de glucides et que ces derniers sont en faible quantité (~ 2 %). L'étude de la composition en monosaccharides de ce milieu fait ressortir la présence de mannose uniquement en très faible quantité (~ 0,4 %). Ceci nous permet d'affirmer que le glucose présent dans les échantillons est bien d'origine bactérienne.

4.7. Deuxième sélection des souches bactériennes

Les critères de sélection sont cette fois basés sur la quantité de polysaccharides présents dans les EPS isolées et leur composition en monosaccharides. Nous avons vu que les EPS-FI contiennent les pourcentages les plus élevés de glucides et plus particulièrement les EPS-FI des souches TC8, TC12 et TC14. De plus, il est intéressant de constater, pour cette dernière souche, que la composition en monosaccharides est simple puisque le glucose est très largement majoritaire voire unique. Nous pouvons donc nous attendre à la présence d'un ou de glucane(s), la diversité n'étant pas dans la composition en monosaccharides mais cette fois ci dans la longueur de chaîne et la nature des liaisons osidiques. A partir de ces résultats, TC14 apparaît être la souche répondant à nos critères de sélection : capacité à synthétiser des exopolysaccharides en quantité suffisante, peu variés et potentiellement simples structurellement (dans un objectif d'étudier leur relation structure/activité). De plus, son affiliation à l'espèce *Pseudoalteromonas ulvae*, en fait une candidate intéressante car plusieurs publications montrent le potentiel *antifouling* de cette espèce. Ainsi Egan *et al.* en 2000 ont découvert la capacité de 2 souches de cette espèce, UL12^T et UL13 isolées de la surface de l'algue marine *Ulva lactuca*, à inhiber la fixation de larves de *Balanus amphitrite* et à inhiber la germination de spores d'algues vertes (*U. lactuca*) et d'algues rouges

(*Polysiphonia*) (Egan *et al.*, 2000). En 2011, une autre étude a montré que *P. ulvae* est capable d'empêcher l'adhésion de la souche *Pseudoalteromonas* sp. S91 sur une surface en acier (Bernbom *et al.*, 2011). Enfin en 2007, Skovhus a étudié la distribution, l'abondance et la diversité du genre *Pseudoalteromonas* dans des échantillons marins. Il détermine que l'espèce *P. ulvae* fait partie du sous-groupe *antifouling* (Skovhus *et al.*, 2007). Cette souche fera l'objet de l'étude décrite dans le chapitre suivant.

4.8. Conclusion

Plusieurs points ont été abordés dans ce chapitre ; l'étude des biofilms de bactéries marines avec la mise au point de protocoles de culture et d'isolement des EPS de ces biofilms selon leurs forces de cohésion et enfin leur caractérisation afin de sélectionner une souche productrice d'exopolysaccharides pour la suite de notre étude.

Un protocole de culture en biofilm a été établi, les biofilms sont produits dans des boîtes de Petri contenant 20 mL finaux de milieu MB. L'incubation est de 72 h en conditions statiques avec, à 48 h, un ajout de 10 mL de milieu pour éviter la mort des bactéries. Les conditions de ce protocole ont été déterminées grâce aux résultats obtenus avec le BFRT[®] en comparant l'effet de certains paramètres (milieu, durée) sur la production de biofilm.

Deux protocoles d'extraction ont été testés, l'un utilisant une méthode physique, la résine échangeuse de cations (Dowex[®]) et l'autre utilisant une méthode chimique, une solution de soude à 0,1 M. Le premier protocole paraît être trop doux pour permettre de récupérer suffisamment d'EPS et plus particulièrement d'exopolysaccharides dans le cas des souches testées (TC5, TC9 et TC15). Nous avons donc testé une méthode chimique (solution de soude) qui est généralement plus efficace en terme de rendement mais qui peut plus facilement lyser les cellules. Une faible concentration de soude (0,1 M) nous permet d'éviter d'endommager les cellules ; les faibles pourcentages d'acides nucléiques mesurés dans nos échantillons d'EPS vont dans ce sens. Le traitement à la soude nous a permis de récupérer jusqu'à 10 fois plus d'EPS. De plus, il est moins long et moins fastidieux, ce qui est un avantage non négligeable. Le protocole à la soude a donc été validé.

Le protocole d'extraction permet de séparer 3 types d'EPS, les EPS solubles libres dans le milieu de culture, les EPS faiblement liées aux bactéries et les EPS fortement liées aux bactéries.

L'étude de la formation de biofilm par les 8 souches bactériennes montre que toutes sont capables, dans nos conditions, de produire un biofilm. Certains résultats sont cependant

contradictoires entre le BFRT[®] et la quantité d'EPS extraites. Ce paradoxe pourrait être dû à la composition des EPS (il y a une relation entre composition et propriétés physico-chimiques des EPS) qui influencerait la mobilité des microbilles magnétiques du BFRT[®]. Ce test serait donc sensible à la composition des EPS, en plus de la quantité de biofilm produit. Ainsi TC5, TC8, TC9 et TC12 produirait un biofilm, mais la nature variée des EPS de leur matrice fait que les microbilles ont des mobilités différentes se répercutant sur les valeurs de Δ BFI mesurées.

Les étapes de sélection des souches ont été basées en premier lieu, sur les résultats du BFRT[®], puis sur les masses d'EPS extraites et la proportion et composition de la fraction glucidique de ces EPS.

Les EPS-FI de TC8, TC12 et TC14 contiennent majoritairement des glucides. Les monosaccharides identifiés pour ces 3 souches sont le glucose, le mannose et le galactose. TC14 se distingue en formant un biofilm dense, sous forme de voile violet à l'interface air/liquide. Celui-ci contient majoritairement un sucre unique, du glucose. Cette souche a fait l'objet d'une étude plus approfondie de ses EPS, en particulier des exopolysaccharides, étude décrite dans le chapitre suivant.

Enfin TC5 présente un intérêt d'étude par son caractère hydrophobe déterminé avec le test MATS et confirmé par la forte teneur en lipides de ses EPS-FI. Dans nos conditions de culture (milieu MB, 72 h), cette souche produit un biofilm modéré dont la matrice se détache facilement avec un traitement à la soude.

Chapitre 5
Caractérisation des EPS de la souche
Pseudoalteromonas ulvae TC14 et
étude de leur activité antibiofilm

5.1. Introduction

Le genre *Pseudoalteromonas* est couramment décrit dans le milieu marin. Plusieurs études sur ce genre ont montré qu'il regroupe plusieurs souches capables de synthétiser des composés bioactifs (Tableau 8). Ces composés sont de natures diverses (petites molécules bromées, protéines, polysaccharides ...).

Plusieurs exopolysaccharides de bactéries appartenant à ce genre ont été isolés et caractérisés. La majorité des souches productrices sont issues de milieux dits extrêmes, tels que les sources hydrothermales au niveau des dorsales océaniques où ont été isolées les souches *Pseudoalteromonas* sp. GY768, HYD721 et SM9913 (Rougeaux *et al.*, 1996 ; Qin *et al.*, 2007), ou tels que des milieux très froids comme l'Océan Antarctique où ont été isolées les souches *Pseudoalteromonas* sp. CAM025 et CAM036 (Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2005a ; Hassler *et al.*, 2011). La très grande majorité des exopolysaccharides décrits sont des hétéropolysaccharides contenant le plus souvent du glucose, du galactose et du mannose (Wrangstadh *et al.*, 1986 ; Szewzyk *et al.*, 1991 ; Rougeaux *et al.*, 1999a ; Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2005a ; Qin *et al.*, 2007 ; Saravanan et Jayachandran, 2008 ; Saravanan *et al.*, 2008 ; Al-Nahas *et al.*, 2011 ; Hassler *et al.*, 2011). D'autres sucres comme le xylose, le ribose, le rhamnose, l'arabinose et le fucose sont présents dans certains de ces exopolysaccharides (c'est le cas pour les exopolysaccharides synthétisés par *Pseudoalteromonas* sp. GY768, HYD721, CAM025, CAM036 et SBT033) (Rougeaux *et al.*, 1996 ; Rougeaux *et al.*, 1999a ; Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2005a ; Saravanan et Jayachandran, 2008 ; Saravanan *et al.*, 2008 ; Hassler *et al.*, 2011). Les acides uroniques sont très présents notamment dans les exopolysaccharides de *Pseudoalteromonas* sp. CAM025, GY768 et CAM036 (Rougeaux *et al.*, 1996 ; Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2005a ; Hassler *et al.*, 2011). De plus, les polymères peuvent comporter des groupes sulfate, pyruvate, acétate, etc... (*Pseudoalteromonas* sp. CAM025, GY768, SM9913, CAM036) (Rougeaux *et al.*, 1996 ; Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2005a ; Qin *et al.*, 2007 ; Hassler *et al.*, 2011). Nous remarquons dans le Tableau 4 que seul un exopolysaccharide est un homopolysaccharide. Il s'agit d'un glucane synthétisé par la souche *Pseudoalteromonas* sp. AM qui a été isolée de la mer Rouge (Al-Nahas *et al.*, 2011). La souche *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 produit quant à elle un exopolysaccharide contenant majoritairement du glucose (Qin *et al.*, 2007).

La gamme de taille des exopolysaccharides produits par des bactéries marines est assez large. Cela va de 5 700 000 Da, pour la souche *Pseudoalteromonas* sp. CAM025, à

40 000 Da pour la souche *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. Nous constatons dans le Tableau 4 que certains de ces exopolysaccharides présentent une activité biologique, par exemple celui synthétisé par *P. denitrificans* a une action antitumorale et antipaludique. L'exopolysaccharide produit par la souche *Pseudoalteromonas* sp. AM a entre autres une action antivirale. Ceux de *Pseudoalteromonas* sp. CAM025 et CAM036 ont la capacité de fixer des métaux. Enfin ceux de *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 et CAM025 ont, quant à eux, un effet cryoprotecteur (pour les références, voir Tableau 4).

A ce jour, à notre connaissance, aucun exopolysaccharide de bactérie marine du genre *Pseudoalteromonas* n'a été décrit comme ayant une activité *antifouling*. L'espèce *P. ulvae* pourrait être une candidate idéale pour isoler des composés présentant ce type d'activité, plusieurs publications ayant décrit le potentiel *antifouling* de cette espèce (Egan *et al.*, 2000 ; Skovhus *et al.*, 2007 ; Bernbom *et al.*, 2011 ; Bernbom *et al.*, 2013).

Ce dernier chapitre sera donc consacré à l'étude du biofilm de la souche *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 en vue de caractériser ses EPS, et plus particulièrement les fractions polysaccharidiques des EPS isolées, et d'étudier leur activité antibiofilm. En parallèle, une étude des EPS produites en culture planctonique a été menée afin d'identifier de possibles différences avec la composition des EPS issues de cultures en biofilm. Avant de débiter, rappelons que cette souche s'organise, dans des boîtes de Petri en polystyrène en milieu MB liquide, en biofilm dense en produisant une matrice d'exopolymères conséquente. Aussi, son Δ BFI est élevé, selon le BFRT[®], et la masse d'EPS pouvant être isolées par mg de biofilm est relativement importante. TC14 a montré une production d'EPS contenant une quantité non négligeable de glucides, plus particulièrement de glucose. Le biofilm de cette souche est caractéristique avec sa forme de voile (violet) à l'interface air/liquide. Les images au MEB de ce film permettent d'observer les EPS liées entourant les bactéries (Figure 44).

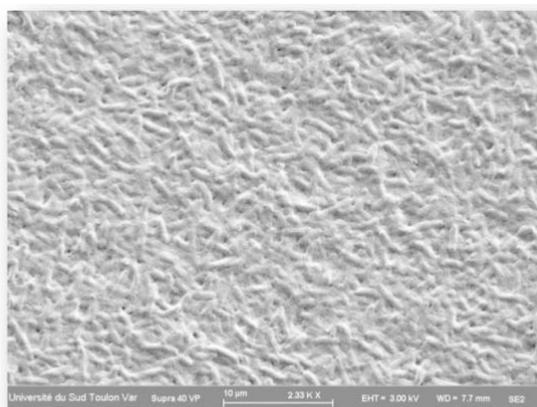


Figure 44. Image du biofilm de *P. ulvae* TC14 au MEB.

5.2. Etude globale des EPS-sol, EPS-fl et des EPS-FI

Quatre cultures en biofilm de la souche *P. ulvae* TC14 ont été réalisées. Ces cultures ont été faites dans les mêmes conditions mais séparément dans le temps (ce sont donc des réplicats). Le volume des cultures a augmenté au fil des expériences. De 10 boîtes de Petri pour la première culture (correspondant à 200 mL de milieu), le nombre de boîtes est passé à 40 pour les 2^{ème} et 3^{ème} cultures (correspondant à 800 mL de milieu), puis à 50 boîtes de Petri pour la dernière expérience (soit 1 L de milieu). L'extraction des EPS-FI a été faite avec la soude à 0,1 M, ce qui a permis, en suivant le protocole présenté Figure 39, de récupérer les EPS solubles (EPS-sol), les EPS faiblement liées (EPS-fl) et les EPS fortement liées (EPS-FI). La valeur moyenne de la quantité d'EPS (/mg de biofilm) obtenue pour les 4 cultures est exposée dans le Tableau 29. Les EPS-sol étaient présentes dans le milieu de culture en quantité relativement importante par rapport aux EPS liées. Etant donnée la densité du biofilm formé, ceci pourrait être dû en partie au fait que l'échantillon appelé EPS-sol pourrait contenir des composés issus du milieu de culture en plus des EPS synthétisées par les bactéries, le traitement de cet échantillon n'ayant fait l'objet que d'une filtration (sur 0,2 µm) et d'une dialyse (seuil de coupure, 6000-8000 Da).

Type d'EPS	Quantité (mg/mg de biofilm)
EPS-sol	0,48 ± 0,033
EPS-fl	0,10 ± 0,005
EPS-FI	0,44 ± 0,076

Tableau 29. Quantité d'EPS (mg/mg de biofilm). Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne et à la variance sur 4 expériences.

Pour chaque expérience, la composition globale des EPS a été déterminée. Le Tableau 30 rassemble les pourcentages massiques (moyenne des 4 expériences) obtenus à partir des dosages des glucides, des acides uroniques, des protéines, et des acides nucléiques ; la quantité de lipides étant estimée après pesée de la phase organique résultant d'un partage chloroforme/méthanol/eau des EPS (Figure 46). Si l'on compare les compositions globales des trois types d'EPS, nous constatons qu'elles sont assez proches ; les glucides sont majoritaires (entre 10 et 15 %) et très peu d'acides uroniques ont été dosés, la quasi-totalité (ou totalité) des glucides dosés sont donc neutres. Les protéines et les lipides sont minoritaires (entre 2 et 7 %). Les acides nucléiques sont, quant à eux, presque inexistantes. Deux conclusions peuvent être tirées de cette dernière observation ; *P. ulvae* TC14 ne produit pas

particulièrement d'ADN extracellulaire et ce faible pourcentage d'acides nucléiques nous permet de penser qu'il n'y a pas eu de lyse cellulaire lors de l'extraction des EPS. Ainsi ces dernières n'ont pas été contaminées par des polymères intracellulaires. Enfin, un point important est à souligner, nous pouvons constater que la nature de seulement 30 % des EPS a pu être déterminée. Cette erreur d'appréciation des quantités relatives de chaque constituant pourrait être due à une sous-estimation de certains constituants par les dosages colorimétriques (les références utilisées pour établir les gammes d'étalonnage jouent un rôle important en corrélation avec la nature exacte des composés dosés) et/ou à la présence de sels piégés dans les échantillons, malgré la dialyse effectuée au préalable. Elle est surtout due à la forte hydratation des échantillons dont la pesée a été effectuée à l'air ambiant et donc largement sur-estimée par rapport à la masse d'EPS sèches qu'ils contiennent. De plus, on notera dans la suite de l'étude une substitution des exopolysaccharides par des groupements lactates ou acétates, qui viennent augmenter la masse des exopolymères sans être pris en compte dans le pourcentage de glucides déterminé par dosage colorimétrique. Le manque d'information sur la présence éventuelle de sucres aminés, étant donné que leur dosage spécifique n'a pas été réalisé dans cette étude, ne devrait pas poser de problème, ceci ayant été contourné par l'analyse en CPG-SM des dérivés triméthylsilylés (ou per-acétylés) des produits d'hydrolyse acide (ou de méthanolyse) de nos échantillons, analyse qui a révélé l'absence de tels monosaccharides en comparaison avec les sucres témoins GlcN, GalN, GlcNAc et GalNAc.

Type d'EPS	Glucides	A. uroniques	Protéines	Lipides	A. nucléiques
EPS-sol	13,3	0,2	5,8	4,6	0
EPS-fl	10	1	2,6	1,6	< 0,1
EPS-FI	15,8	1,6	7	6,1	0,3

Tableau 30. Pourcentages massiques des glucides, acides uroniques, protéines, lipides et acides nucléiques dans les EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI. Les résultats présentés correspondent à la moyenne des dosages faits en triplicat, sur 4 expériences. Seul le pourcentage de lipides dans les EPS-sol a été fait sur une seule expérience et celui dans les EPS-fl sur 4 expériences.

Nous avons vu que le faible pourcentage en acides nucléiques dans les 3 types d'EPS est un gage du maintien de l'intégrité cellulaire pendant l'extraction, mais pour s'assurer qu'aucun produit de lyse n'a contaminé les EPS isolées, nous avons en parallèle dosé un autre témoin de la lyse cellulaire, à savoir l'ATP. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit *ATP determination* d'Invitrogen. Les dosages ont été réalisés sur un échantillon d'EPS-sol, un échantillon d'EPS-fl et sur 4 échantillons d'EPS-FI. Nous trouvons 0,01 % d'ATP dans les

EPS-sol, 0,05 % dans les EPS-fl et 0,88 % dans les EPS-FI (le témoin est un culot bactérien qui a subi une étape de sonication pour lyser au moins partiellement les cellules, 9 % d'ATP a été dosé dans ce témoin). Ces résultats indiquent bien que l'intégrité des cellules a été préservée lors des extractions des EPS.

L'analyse Infra-Rouge (IR-TF) des trois types d'EPS a permis de révéler la présence de groupes fonctionnels caractéristiques en accord avec les résultats obtenus par dosages colorimétriques (Figure 45). Nous constatons en effet, pour les 3 types d'EPS, la présence d'une large bande intense, autour de 3300 cm^{-1} caractéristique des groupements hydroxyyles. De faibles bandes de vibrations de valence des liaisons C-H entre 2800 et 3000 cm^{-1} et autour de 1456 cm^{-1} concernent les CH_2 aliphatiques des sucres (Iyer *et al.*, 2005a), des protéines et lipides. Les bandes caractéristiques des liaisons peptidiques des protéines sont visibles, comme les deux bandes à 1652 cm^{-1} et 1540 cm^{-1} (resp. amide I et amide II). Ces mêmes bandes pourraient spécifier la présence d'osamines N-acétylées (Chalkiadakis *et al.*, 2013) mais aucun monosaccharide de ce type (GlcNAc ou GalNAc) n'a été identifié en CPG-SM à la différence des protéines dosées. D'autre part, l'absence d'épaulement autour de 1730 cm^{-1} sur la forte bande à 1652 cm^{-1} vient corroborer le faible dosage d'acides uroniques dans les échantillons d'EPS analysés (Kumar *et al.*, 2003 ; Chalkiadakis *et al.*, 2013). Les bandes entre 900 et 1200 cm^{-1} , présentes dans les trois échantillons, sont caractéristiques de structures polysaccharidiques (vibrations des liaisons C-O-C, C-O-H) (Schmitt et Flemming, 1998).

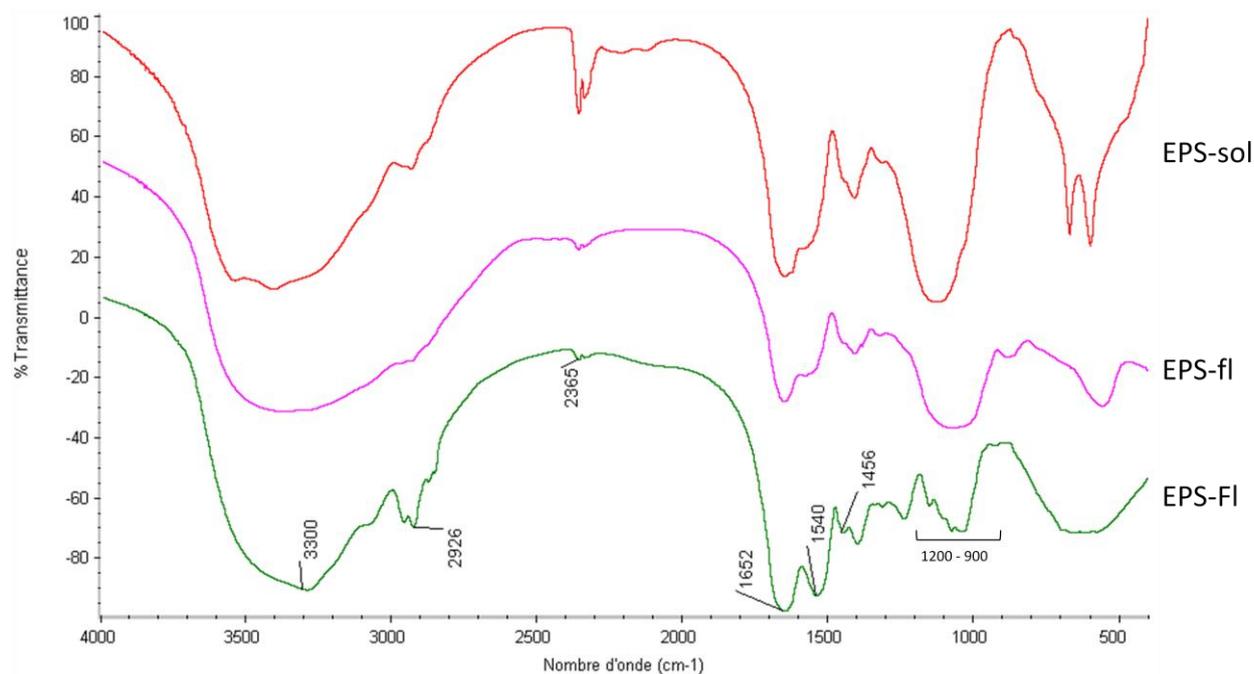


Figure 45. Spectres Infra-Rouge des EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI isolées de biofilms de de *P. ulvae* TC14.

5.3. Principe d'isolement des exopolysaccharides

Dans le but d'isoler les exopolysaccharides présents dans les EPS, nous avons mis en place une succession d'étapes d'enrichissement des fractions en polysaccharides (Figure 46). La première étape a été un partage chloroforme/méthanol/eau (3:4:3, v/v/v) correspondant à une méthode modifiée de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959), permettant de séparer les composés lipidiques (phase organique), des composés polaires comme les protéines et les exopolysaccharides (qui se retrouvent dans la phase aqueuse ou à former une interphase). L'interphase obtenue lors du partage des EPS contient des polymères ayant une solubilité moindre comparée à celle des polymères présents dans la phase aqueuse. Ceci peut être dû, par exemple, à une taille très importante ou à une structure spécifique empêchant les polymères de se solubiliser correctement dans la phase aqueuse. Les nouveaux échantillons ainsi obtenus à partir des EPS-sol/-fl/-Fl soumis au partage chloroforme/méthanol/eau ont été nommés EPS-sol/-fl/-Fl-aq ou -inter selon leur positionnement dans la phase aqueuse (aq) ou l'interphase (inter) respectivement.

La deuxième étape, une précipitation à l'alcool, n'a concerné que l'interphase et la phase aqueuse préalablement concentrées. L'ajout de 6 volumes d'éthanol à 90 % maintenu à 4°C a permis, dans notre cas, la précipitation des polymères (protéines et polysaccharides). L'analyse en CPG-SM des dérivés triméthylsilylés des produits d'hydrolyse acide des surnageants récupérés après centrifugation, rassemblés et séchés a permis de s'assurer de l'absence de matériel de nature saccharidique non précipité. Les polymères récupérés par centrifugation ont été traités avec la protéinase K de *Tritirachium album* afin d'éliminer, par digestion enzymatique, les protéines. Les très faibles quantités d'acides nucléiques dosées dans l'ensemble des échantillons permettent de s'affranchir d'une étape de digestion à la DNase. Les échantillons sont, à cette étape, fortement enrichis en exopolysaccharides ; nous les nommerons donc POL-sol/-fl/-Fl-aq ou -inter, pour polysaccharides solubles, faiblement liés au biofilm ou fortement liés au biofilm, respectivement obtenus à partir des échantillons d'EPS-sol-aq ou -inter, EPS-fl-aq ou -inter et EPS-Fl-aq ou -inter.

Enfin, la dernière étape a été une analyse par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne de DEAE-Sephacose Fast Flow des différentes fractions d'exopolysaccharides. L'élution s'est effectuée avec des concentrations croissantes de NaCl (0 M ; 0,1 M ; 0,2 M ; 0,4 M ; 0,8 M et 1 M), permettant d'obtenir 5 fractions (POL-sol/-fl/-Fl-aq ou inter 0 M à 0,8 M), l'élution avec la solution à 1 M NaCl correspondant à une étape de lavage de la colonne. L'augmentation de la force ionique de la phase mobile a permis de séparer les

exopolysaccharides selon leur caractère neutre (élution à 0 M NaCl) ou anionique/acide. L'élution n'étant pas certaine à chaque étape du gradient (retard d'élution possible selon les volumes de phase mobile utilisés par rapport à la charge de la colonne, dans nos conditions de débit rapide), certains composés peuvent être élués à une concentration en sels supérieure à leur niveau de charges. Les profils d'élution doivent donc être examinés en lien avec d'autres résultats d'analyses permettant de juger de la différence de composition des différentes fractions obtenues. L'ensemble de ces étapes est illustré dans la Figure 46.

Tous les échantillons ont été analysés en RMN-¹H dans D₂O dès que les quantités de produit le permettaient. En revanche, il n'a jamais été possible d'obtenir un spectre RMN-¹³C analysable malgré une longue accumulation (à 400 MHz).

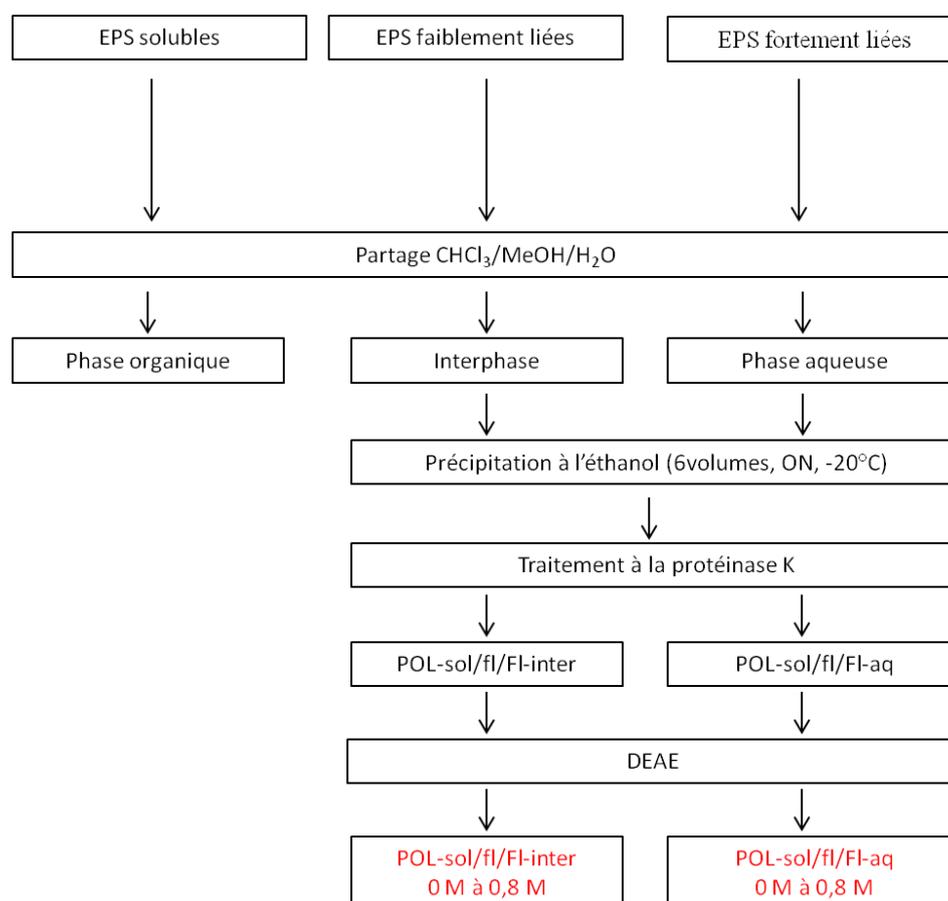


Figure 46. Protocole d'isolement et de fractionnement des exopolysaccharides.

Les résultats obtenus après l'étape de partage chloroforme/méthanol/eau (3:4:3, v/v/v) des 3 types d'EPS sont présentés dans la Figure 47. Nous constatons, pour l'ensemble des EPS, que la proportion (en masse) de la phase organique est faible. C'est cette proportion qui nous a permis d'estimer le pourcentage de lipides dans nos échantillons d'EPS (voir Tableau

30). En partant des EPS libérées dans le milieu (EPS-sol), jusqu'au cœur du biofilm (EPS-FI), il apparaît que la proportion de composés formant l'interphase devient de plus en plus importante (~ 11 % dans les EPS-sol, 25 % dans les EPS-fl et 69 % dans les EPS-FI) et inversement pour les composés solubles dans la phase aqueuse (~ 80 % dans les EPS-sol, 69 % dans les EPS-fl et 26 % dans les EPS-FI). Ainsi, la solubilité des EPS diminue lorsque l'on va vers le cœur de biofilm, les EPS les plus solubles étant plus facilement libérées dans le milieu au cours de la culture.

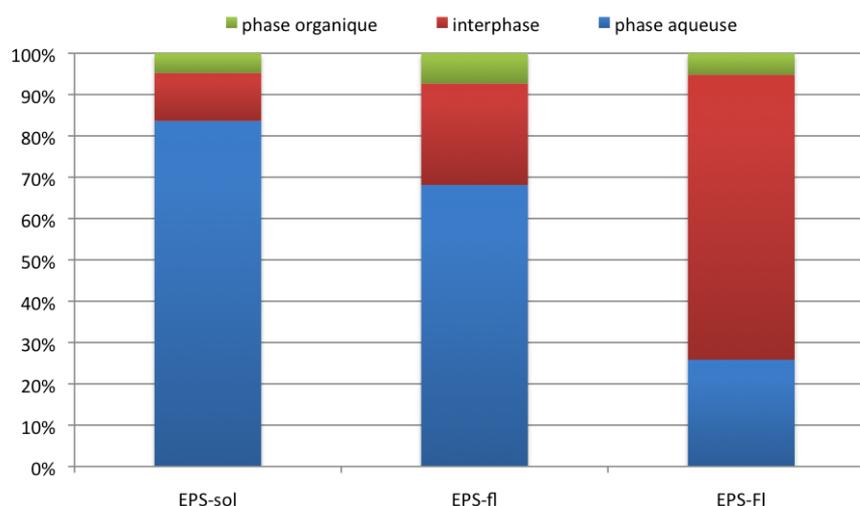


Figure 47. Pourcentages relatifs (masse/masse EPS) de la phase organique, de l'interphase et de la phase aqueuse des EPS-sol, des EPS-fl et des EPS-FI.

5.4. Analyse des EPS de nature polysaccharidique

5.4.1. Composition en monosaccharides

Dans le chapitre précédent, la composition en monosaccharides des EPS-sol, EPS-fl et EPS-FI a fait l'objet d'une description (voir Figure 42). Les EPS-sol et EPS-fl contiennent majoritairement du glucose et du mannose tandis que les EPS-FI ne contiennent que du glucose. Les échantillons riches en exopolysaccharides (POL-FI-aq et POL-FI-inter) ont été analysés en CPG-SM après hydrolyse acide et triméthylsilylation (Figure 48) et les chromatogrammes sont ici comparés avec celui de l'échantillon d'origine (EPS-FI). Les 2 pics du glucose sont majoritairement présents dans les 3 échantillons. La présence d'un témoin interne, l'érythritol, nous a permis d'estimer la quantité de glucose dans chaque extrait. Nous obtenons ainsi, 12 % de glucose dans les EPS-FI, 11 % dans POL-FI-aq et 44 % dans POL-FI-inter. Ces résultats ont été confirmés par le dosage colorimétrique des sucres totaux réalisé en parallèle. Ce dernier indique, en effet, que les EPS-FI, POL-FI-aq et les POL-FI-inter contiennent respectivement 13 %, 16 % et 39 % de sucres. Nous pouvons donc constater que

l'ensemble des étapes d'isolement des exopolysaccharides a bien permis d'enrichir les échantillons en sucres puisque d'un échantillon d'EPS contenant 12 % de glucose, nous obtenons deux échantillons (POL) ayant respectivement 11 % et 44 % de glucose.

L'analyse en CPG-SM des produits de méthanolyse de ces échantillons confirme la présence de glucose mais la présence d'acides uroniques n'a pas été mise en évidence, en accord avec les faibles quantités préalablement dosées dans les EPS-FI.

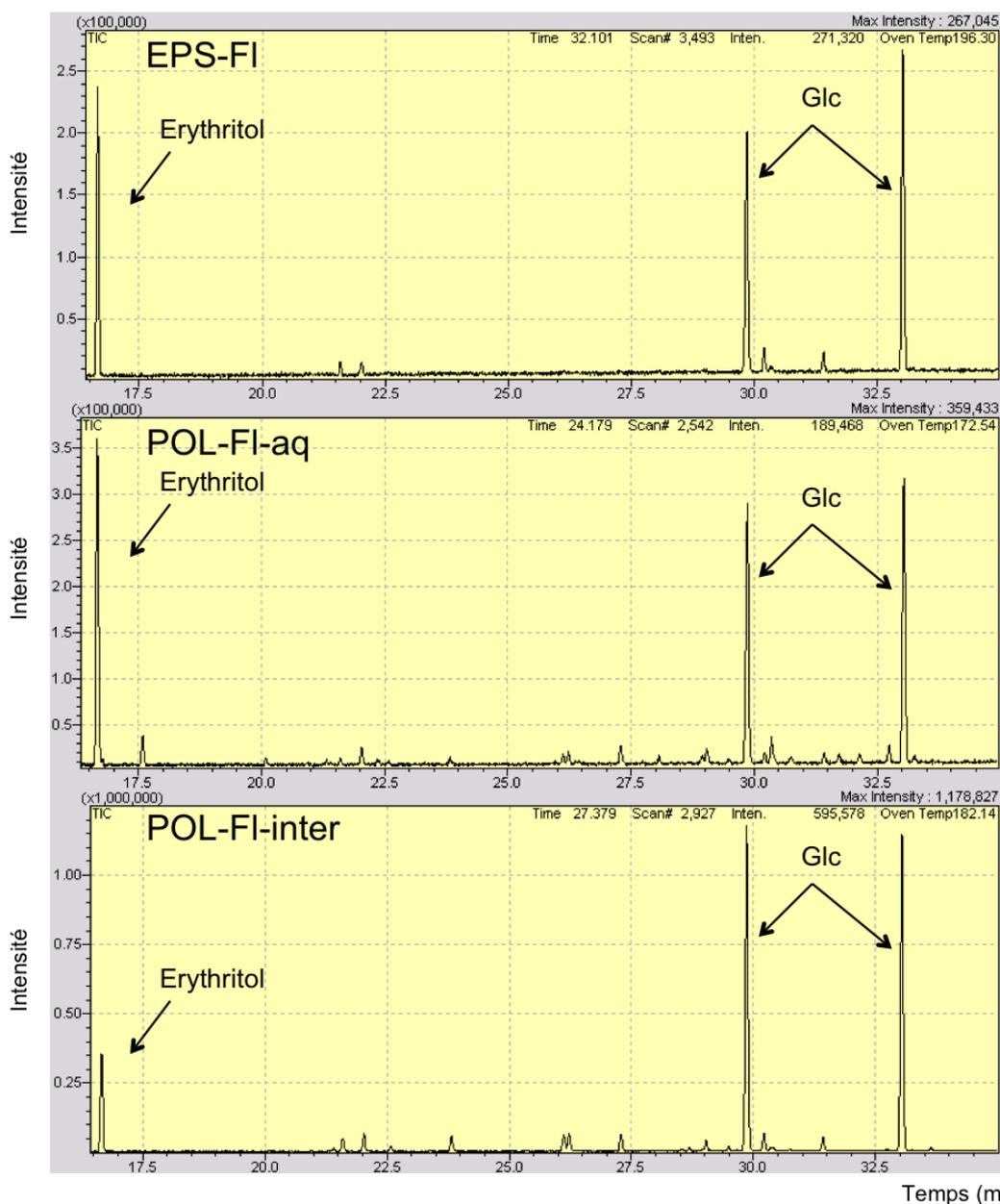


Figure 48. Chromatogrammes (CPG-SM) des dérivés triméthylsilylés des produits d'hydrolyse acide des EPS-FI, POL-FI-aq et POL-FI-inter. Température du four : 100 à 280°C (3°C/min). Erythritol : témoin interne. Glc : Glucose. Les abscisses correspondent à la durée d'acquisition (en min).

5.4.2. Comparaison des profils de masses moléculaires des EPS-sol/-fl/-FI

L'étape suivante a consisté à déterminer la distribution des masses moléculaires des polymères (M_w considérées supérieures à 10 kDa uniquement) présents dans les différents échantillons d'EPS ou d'exopolysaccharides (POL). Pour ce faire, chaque échantillon a été analysé par HPSEC au travers de 2 colonnes analytiques Shodex en série, OHpak SB-804 HQ (limite d'exclusion des pullulanes : 1 MDa) et OHpak SB-805 HQ (limite d'exclusion des pullulanes : 4 MDa) précédées d'une colonne de garde SB-G. Le temps d'acquisition a été de 44 min pour chaque analyse, il a été suivi de l'élution des sels de la phase mobile (non visibles sur les chromatogrammes). Le volume mort ou d'exclusion totale pour cet ensemble de colonnes est de 12,5 mL (équivalent à un temps de rétention de 25 min pour tous les composés de masses moléculaires moyennes supérieures à 4 MDa). Le volume total est de 22,5 mL.

Les masses moléculaires moyennes des polymères sont estimées, pour toutes les analyses effectuées, à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des standards de pullulanes (Figure 49). Nous pouvons ainsi classer les polymères selon trois catégories de tailles (indiquées sur l'échelle, partie supérieure des chromatogrammes). Entre 28 min (14 mL) et 45 min (22,5 mL) sont élués les composés de moins de 1 million de Dalton. Entre 28 min (14 mL) et 26 min (13 mL), sortent les composés de M_w compris entre 1 et 2 millions de Dalton. Enfin, les composés ayant un volume de rétention inférieur à 26 min (13 mL) et supérieur à 25 min (12,5 mL) sont inclus et ont donc une masse moléculaire moyenne de plus de 2 millions de Dalton mais inférieure à 4 millions de Da (exclusion totale).

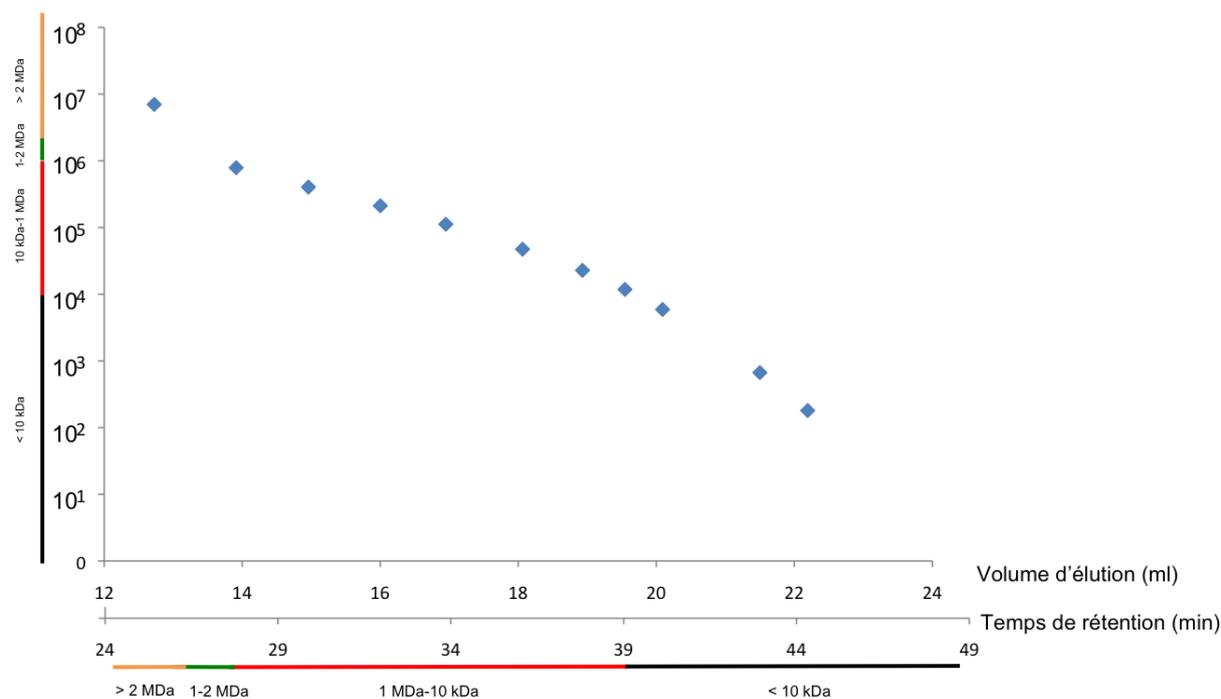


Figure 49. Courbe d'étalonnage établi avec des standards de pullulanes.

Pour les cinq échantillons analysés dans la Figure 47, les chromatogrammes présentent plusieurs pics larges, se chevauchant pour certains du fait de la dispersité des polymères; ces échantillons ont donc une composition complexe regroupant plusieurs constituants de tailles variées. Nous pouvons observer dans l'ensemble des échantillons, la présence de très petits composés ayant une masse moléculaire moyenne égale ou inférieure à 7 kDa (temps de rétention supérieur à 39 min), composés qui n'ont pas été éliminés lors des étapes de dialyse (seuil de coupure 6000-8000 Da). Nous constatons, tous échantillons confondus, qu'il y a au moins 4 polymères ayant des masses moléculaires supérieures à 10 kDa (voir repères des 4 barres colorées - Figure 50), chacun pouvant se retrouver dans plusieurs échantillons. Les échantillons POL-FI-aq et POL-FI-inter sont les deux échantillons les plus complexes avec une gamme de tailles de polymères plus étendue pour les constituants de la phase aqueuse (POL-FI-aq).

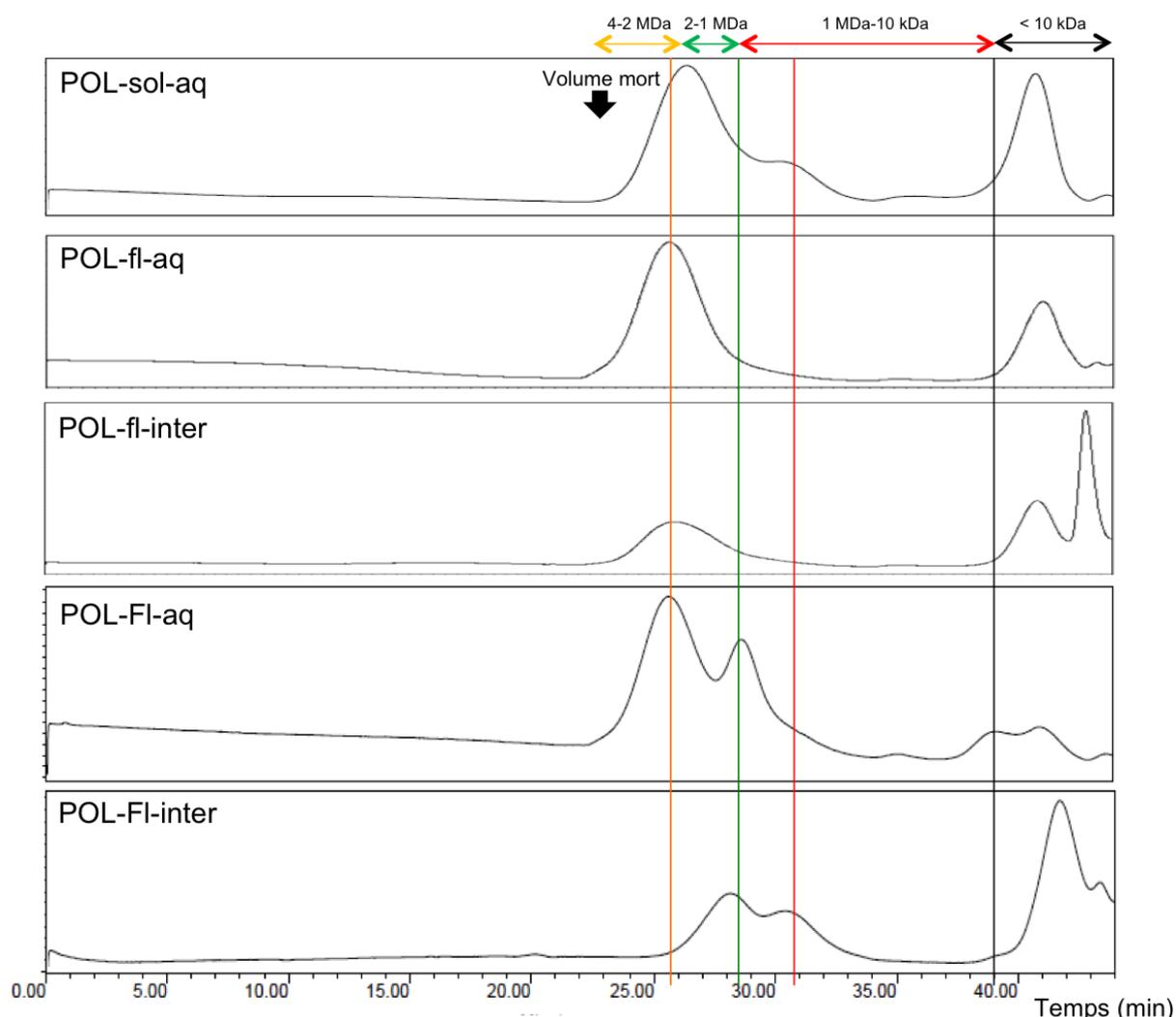


Figure 50. Profils HPSEC des échantillons POL-sol-aq, POL-fl-aq, POL-fl-inter, POL-FI-aq et POL-FI-inter. Détection: indice de réfraction (en ordonnées). POL-sol-inter n'ont pas pu être analysés par manque de quantité suffisante d'échantillon. Le pic des sels, au-delà de 44 minutes, n'est pas visible.

Pour POL-fl, si l'on s'intéresse aux composés de masse moléculaire moyenne supérieure à 10 kDa (repère noir), la phase aqueuse et l'interphase ont des profils HPSEC similaires et pourraient ainsi contenir un même polymère de M_w comprise entre 2 et 4 MDa. Par contre, la proportion de ce polymère soluble est plus importante dans la phase aqueuse, du fait de l'intensité du pic et sachant que toutes les analyses ont été effectuées à partir de solutions de même concentration (m/v). S'il s'agit du même composé dans la phase aqueuse (POL-fl-aq) et l'interphase (POL-fl-inter), il est certainement à la limite de la solubilité en phase aqueuse dans nos conditions de partage et forme donc aussi une interphase lors du partage des EPS. Il est intéressant de constater que POL-fl et POL-sol contiennent des polymères de tailles différentes et en proportions différentes (leur nature n'étant pas appréciable ici). Le même polymère de plus grande masse moléculaire (2-4 MDa) pourrait se retrouver parmi les EPS solubles, faiblement et fortement liés (dans la phase aqueuse).

De cette analyse par HPSEC, nous pouvons donc en conclure que les polysaccharides libérés dans le milieu, faiblement attachés aux bactéries ou fortement liés aux bactéries se répartissent différemment dans les 3 échantillons. Nous relevons 3 gammes de tailles de polymères pour les masses moléculaires moyennes supérieures à 10 kDa (M_w 2-4 MDa; 1-2 MDa et ~ 500 kDa).

5.4.3. Analyse des POL-FI par chromatographie échangeuse d'ions

Les échantillons d'EPS, après digestion à la protéinase K suivie d'une dialyse, ont été analysés par chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-Sepharose Fast Flow afin de fractionner les exopolysaccharides selon leurs charges éventuelles. L'élution s'est effectuée avec des concentrations croissantes en NaCl (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 M) permettant d'obtenir 5 fractions. La fraction 0 M contient les polysaccharides neutres tandis que les fractions éluées à partir de 0,1 M NaCl sont susceptibles de contenir des polysaccharides anioniques.

5.4.3.1. Analyse de l'échantillon POL-FI-inter

La répartition des différentes fractions issues de l'analyse en chromatographie échangeuse d'ions de l'échantillon POL-FI-inter se fait comme indiqué dans la Figure 51. Nous remarquons que 26 % des composés de POL-FI-inter sont élués dans la fraction 0,4 M et 33 % dans la fraction 0,8 M. Ces composés sont chargés négativement. Au moins 15 % environ des composés de POL-FI-inter sont neutres (fraction 0 M, notée par la suite POL-FI-inter 0 M).

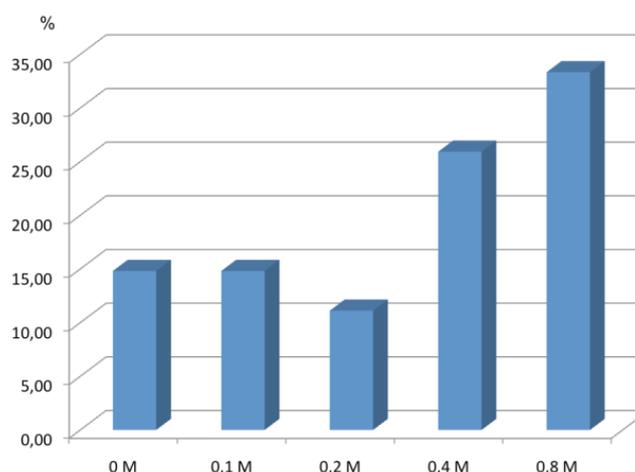


Figure 51. Pourcentages massiques de chaque fraction après analyse en chromatographie échangeuse d'ions de l'échantillon POL-FI-inter.

Les 5 fractions (0 à 0,8 M) de l'échantillon POL-FI-inter ont été ensuite analysées par HPSEC (Figure 52). Les fractions 0 M, 0,1 M et 0,2 M donnent des profils simples et similaires avec un pic unique symétrique de polymères de masse moléculaire moyenne entre 1 et 2 MDa. Ces trois fractions pourraient être composées d'un même exopolysaccharide neutre dont l'élution a été retardée ou insuffisante (volume de phase mobile trop faible) et s'est faite essentiellement à 0,1 M NaCl. Les fractions 0,1 M et 0,2 M contiennent en plus des composés de très faibles masses moléculaires. La fraction 0,4 M est plus complexe et comme la fraction 0,2 M, elle ne contient pas de polymères majeurs. La fraction 0,8 M pourrait en revanche être intéressante, Nous retrouvons principalement un composé d'environ 500 kDa qui sort sous la forme d'un pic unique et symétrique. Ce dernier, visible dans l'échantillon de départ EPS-FI-inter ne se retrouve que dans cette fraction éluée à 0,8 M NaCl et correspondrait donc à un composé polyanionique.

En résumé, dans l'échantillon POL-FI-inter, les composés neutres (élus de 0 M à 0,2 M) sont majoritaires (~ 40 % de l'échantillon total (m/m) par rapport aux 25 % élus à 0,4 M ou 35 % à 0,8 M), ce qui signifie qu'un composé neutre d'environ 1 MDa (ou plusieurs de masses proches) serait majoritaire. Si l'on regarde le profil HPSEC de l'échantillon global avant fractionnement en chromatographie d'échange d'ions, le pic correspondant à ce(s) composé(s) a une surface supérieure à celle du pic correspondant au(x) second(s) composé(s) important(s) (35 % de l'échantillon total) élué(s) à 0,8 M et de masse moléculaire moyenne de l'ordre de 500 kDa. Ces 2 fractions POL-FI-inter 0 M et 0,8 M seront analysées avec un plus grand intérêt en CPG-SM et RMN-¹H.

L'ensemble des fractions a été analysé en CPG-SM pour déterminer leur composition en monosaccharides. Il apparaît que toutes les fractions contiennent du glucose sauf la fraction 0,8 M pour laquelle aucun monosaccharide n'a été trouvé.

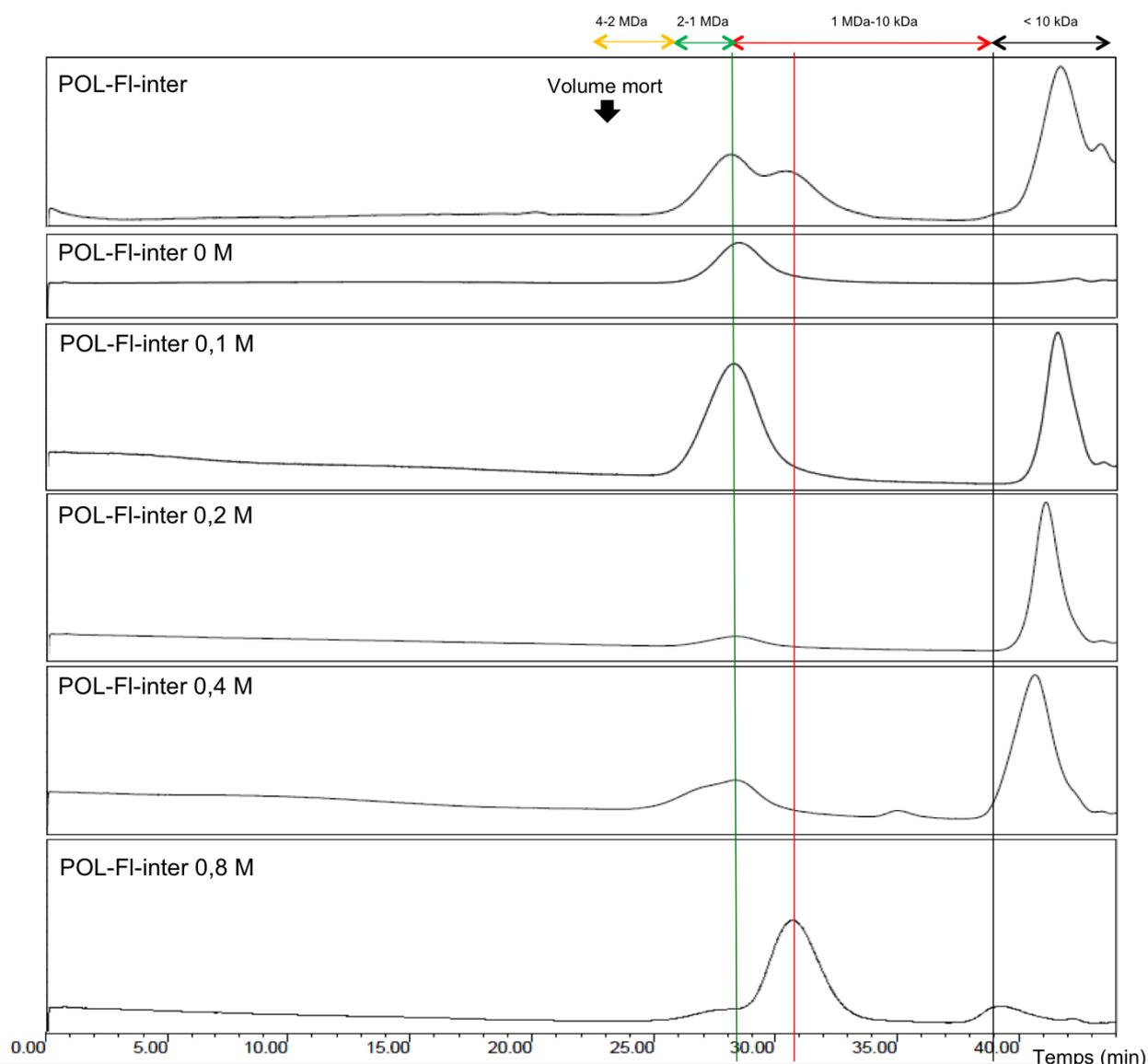


Figure 52. Profils HPSEC des fractions de chromatographie échangeuse d'anions de POL-FI-inter en comparaison avec le profil de l'échantillon global. Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.

L'échantillon POL-FL-inter (avant chromatographie échangeuse d'ions) et les 5 fractions obtenues après chromatographie échangeuse d'ions ont été analysés comparativement en RMN-¹H (Figure 53). On reconnaît bien, en particulier sur le spectre de la fraction 0 M (Figures 53 et 54), la signature d'un polysaccharide avec l'enveloppe des protons du cycle (H-2 – H-6') entre 3,4 et 4,3 ppm et la présence d'un signal, unique ici mais large, dans la zone des protons anomériques, à 5,4 ppm. On reconnaît d'autre part, sur le spectre, des signaux indiquant la présence de lactates (doublet à 1,32 ppm (3H) et quadruplet à 4,11 ppm (1H) ; J 6,9 Hz) qui viendrait substituer les exopolysaccharides de cette fraction. Ces résultats ne suffisent pas à progresser dans la détermination structurale du polymère. Tout d'abord, le signal à 5,4 ppm peut certes être attribué à la résonance de protons anomériques en position équatoriale et permettre de déduire une anomérie α des glucoses (seuls

monosaccharides en présence) mais des signaux de H-1 de β -D-Glcp peuvent être masqués par le pic de l'eau (HOD) aussi bien que ceux de protons du cycle déblindés par la présence d'un lactate lié au même carbone. La fraction POL-Fl-inter 0 M pourrait donc être composée d'un seul polysaccharide de type glucane, substitué par des lactates, d'environ 1 MDa et de structure relativement simple. L'absence d'acidité de ce polymère laisse supposer une liaison ester de l'acide lactique sur des résidus de glucose plutôt qu'une liaison éther comme cela a pu être décrit (Jansson *et al.*, 1984 ; Pillon *et al.*, 2010). Le spectre COSY ^1H - ^1H de la fraction 0 M (non montré ici) confirme le couplage entre les ^1H du doublet à 1,32 ppm ($\text{CH}_3\text{-CH(OH)-C(=O)O-}$) et le ^1H du quadruplet à 4,11 ppm ($\text{CH}_3\text{-CH(OH)-C(=O)O-}$) des groupements lactates liés aux polysaccharides. Il n'est cependant pas possible de poursuivre plus avant l'analyse structurale, notamment de définir la position de ces groupements.

La fraction 0,4 M présente un spectre plus complexe avec toujours la présence de signaux caractéristiques de protons glucidiques mais également l'apparition de signaux autour de 2 ppm attribuables à des groupements acétates. Les signaux des lactates sont encore visibles mais de faible intensité, du fait certainement de l'éluion résiduelle, dans cette fraction, du glucane neutre précédemment décrit porteur de ces groupements. Cette hypothèse est envisageable en comparant les profils HPSEC des deux fractions POL-Fl-inter 0 M et 0,4 M.

Dans la fraction 0,8 M nous ne retrouvons pas les signaux caractéristiques des polysaccharides. Les spectres RMN- ^1H et COSY- ^1H - ^1H sont en accord avec la structure d'un polyglutamate (PGG ; Figures 55 à 57), aussi bien dans l'allure des pics (larges) que dans leurs déplacements chimiques avec $\delta \text{CH}\alpha$ et $\text{CH}\alpha'$ à 4,35 et 4,19 ppm, $\delta \text{CH}_2\beta$ et $\text{CH}_2\beta'$ à 2,14 et 1,95 ppm du fait de la non-équivalence chimique des protons de ces CH_2 isochrones toutefois, $\delta \text{CH}_2\gamma$ et $\text{CH}_2\gamma'$ à 2,38 ppm, leur intégration (1H α , 1H α' , 4H γ et γ' , 4H β et β' —Figure 56) et leurs couplages (Figure 57) (Shih et Van, 2001 ; Shih *et al.*, 2005 ; Morikawa *et al.*, 2006). Le ratio 1:1 des signaux à δ 4,35 et 4,19 ppm indique la liaison d'un groupement glutamyl sur chaque glutamate de la chaîne polymérique. La structure de ce composé explique son éluion de la colonne de chromatographie échangeuse d'ions à une force ionique élevée (à 0,8 M NaCl).

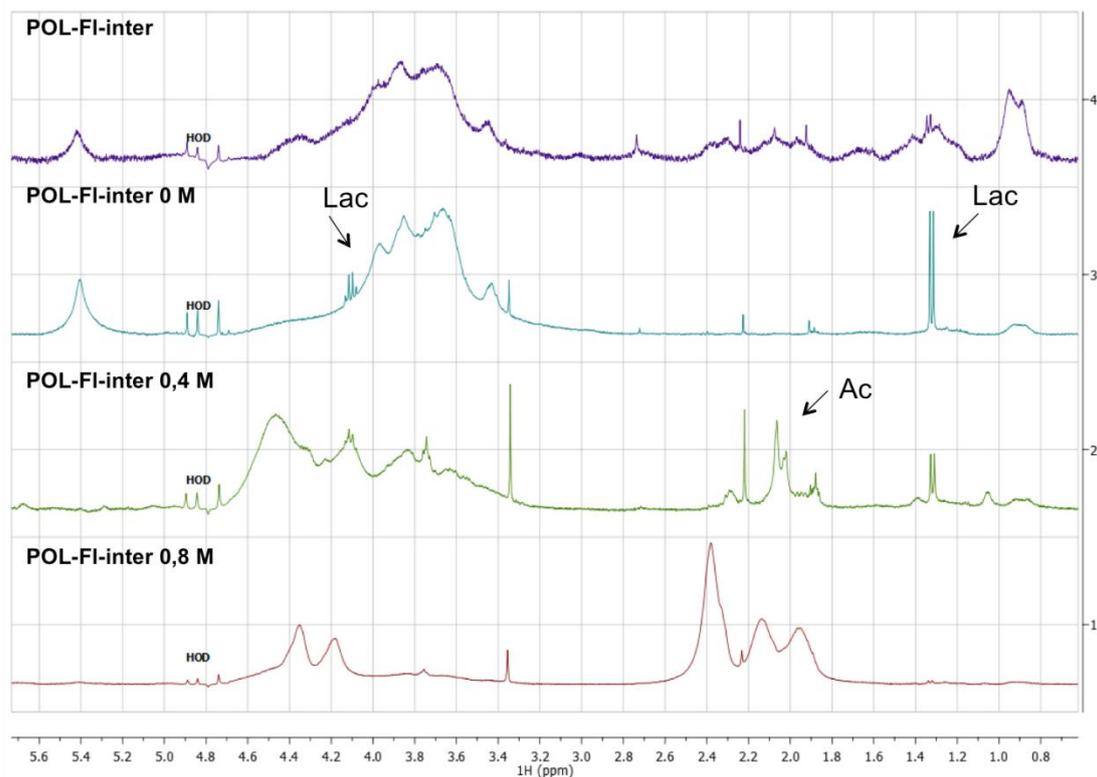


Figure 53. Spectres RMN- ^1H de l'échantillon POL-FI-inter et des fractions issues de l'analyse par chromatographie échangeuse d'ions de cet échantillon. Lac : lactate. Ac : acétate.

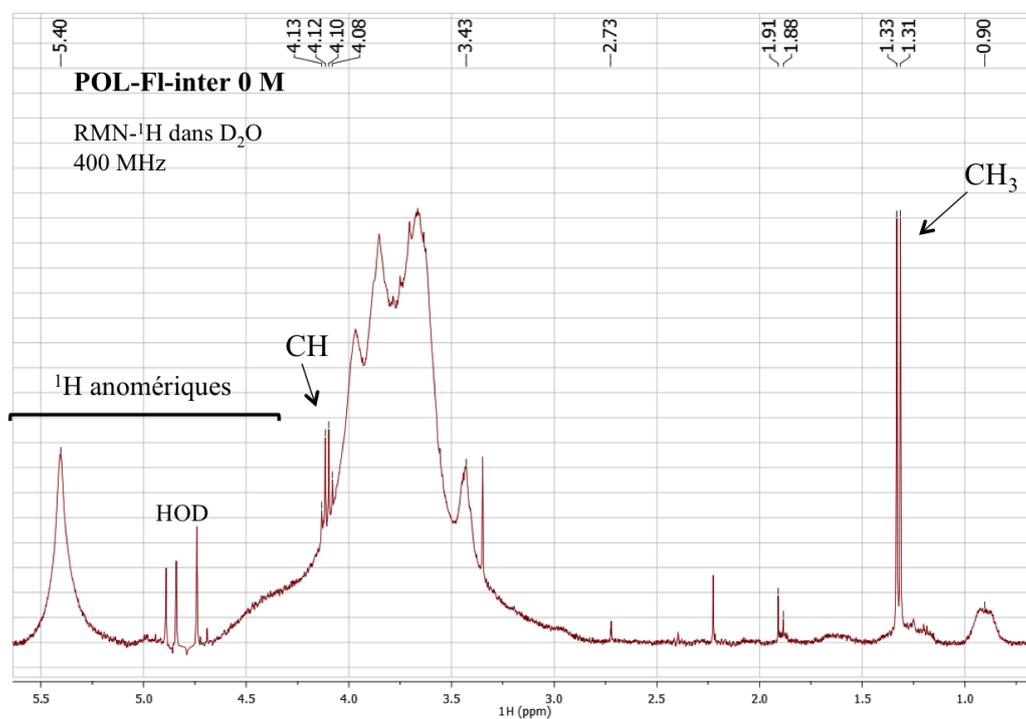


Figure 54. Spectre RMN- ^1H de l'échantillon POL-FI-inter 0 M.

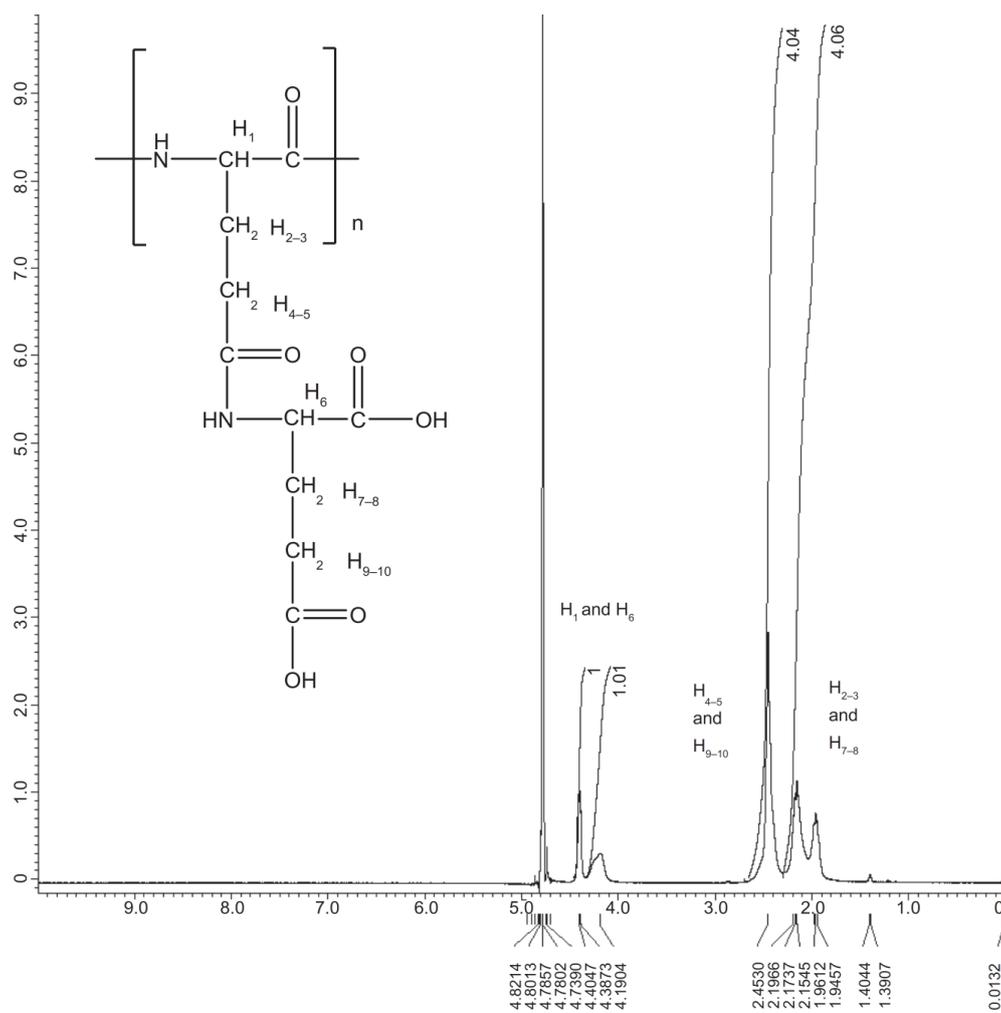


Figure 55. Structure et RMN- ^1H (dans D_2O) d'un poly-glutamyl-glutamate (PGG) (Van *et al.*, 2010).

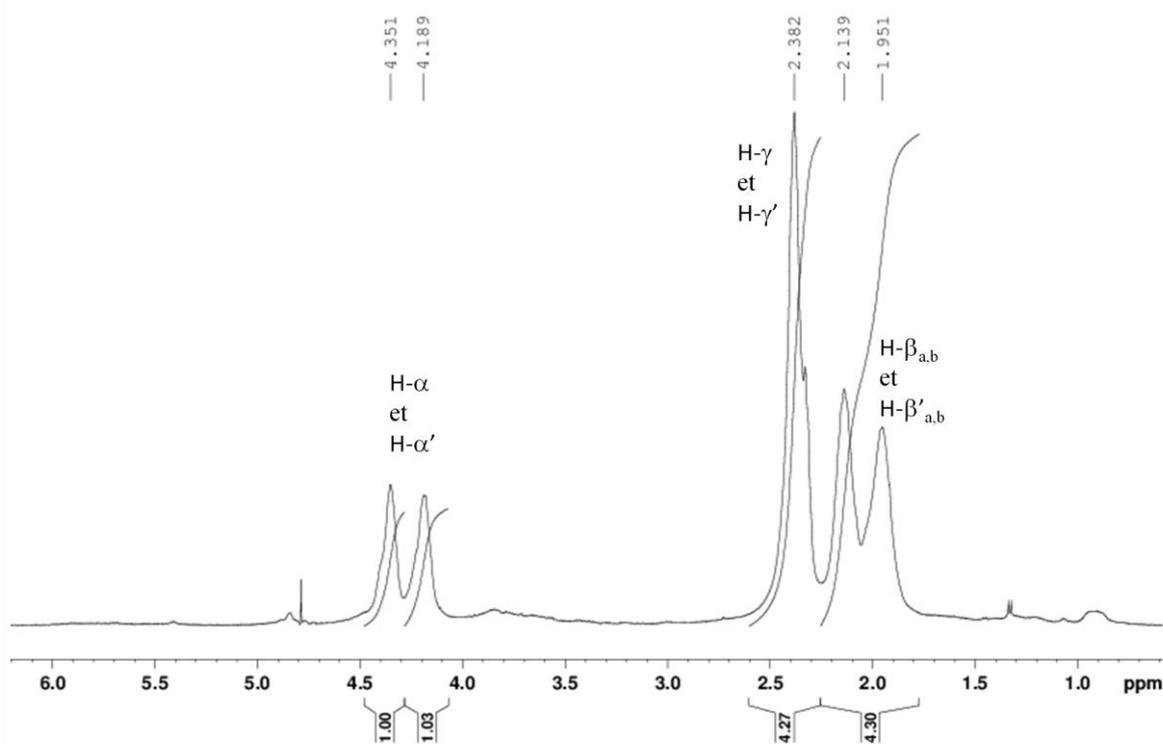


Figure 56. Spectre RMN- ^1H de l'échantillon POL-F1-inter 0,8 M (D_2O ; 500 MHz).

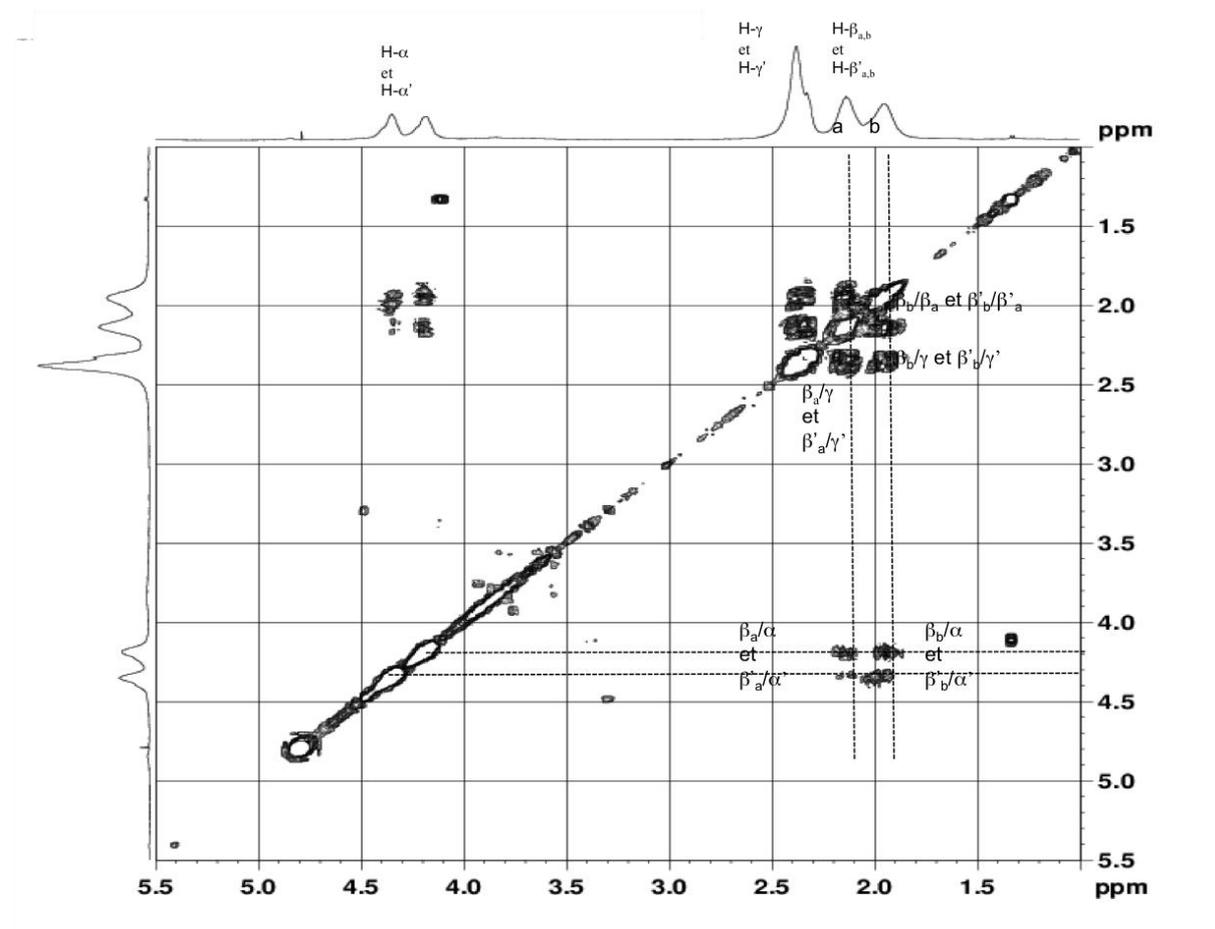


Figure 57. Spectre COSY ^1H - ^1H de l'échantillon POL-FI-inter 0,8 M (D_2O ; 500 MHz).

On peut donc conclure que dans l'échantillon POL-FI-inter sont présents au moins 2 composés différents majoritaires :

- Glucanes neutres substitués par des lactates d'environ 1 MDa.
- Poly-glutamyl-glutamates (anioniques) d'environ 500 kDa.

5.4.3.2. Analyse de l'échantillon POL-FI-aq

La très grande majorité des composés de l'échantillon POL-FI-aq ont été élués dans la fraction 0,4 M lors de l'analyse de l'échantillon en chromatographie d'échange d'ions (environ 68 % de la masse totale récupérée) (Figure 58). Nous pouvons donc en conclure que la grande majorité des composés présents dans l'échantillon POL-FI-aq est anionique. Seul environ 10 % des composés sont élués avant (neutres ou faiblement chargés, de la fraction 0 M à la fraction 0,2 M). La fraction 0,8 M correspond à 14 % de la masse de l'échantillon.

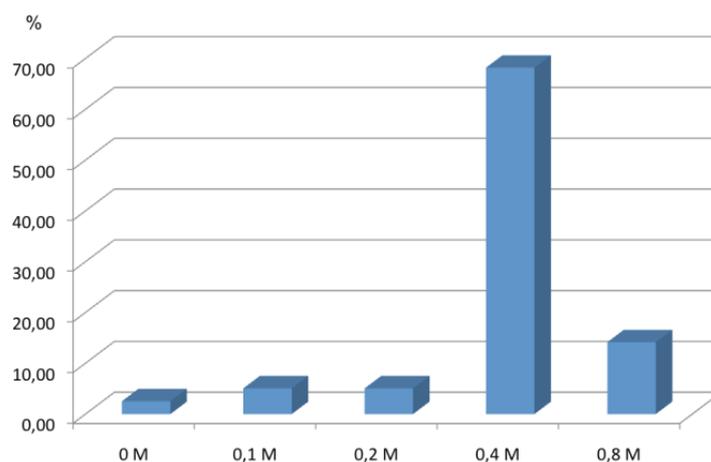


Figure 58. Pourcentages massiques de chaque fraction après analyse en chromatographie échangeuse d'ions de l'échantillon POL-FI-aq.

Les 5 fractions (de 0 à 0,8 M) de l'échantillon POL-FI-aq ont été ensuite analysées par HPSEC (Figure 59). Les fractions 0 M, 0,1 M et 0,2 M sortent sous la forme d'un pic large et contiennent au moins un polymère de masse moléculaire moyenne comprise entre 1 et 2 MDa. Les fractions 0,4 M et 0,8 M sont toutes deux complexes. La fraction 0,8 M contient en très faible quantité une variété de polymères et ne présente donc pas d'intérêt particulier. Au contraire, la fraction 0,4 M contient majoritairement des polymères, les uns de M_w comprise entre 2 et 4 MDa, les autres entre 1 et 2 MDa et, dans une moindre mesure, au moins un composé de M_w de l'ordre de 50 kDa. Le profil chromatographique de cette fraction ressemble fortement à celui de l'échantillon total d'origine, ce qui pouvait être attendu, la fraction 0,4 M étant majoritaire (Figure 58). En effet, les plus gros polymères se retrouvent dans les deux cas comme composés majeurs élués aux mêmes temps de rétention. Nous verrons d'ailleurs que les deux spectres RMN- ^1H , celui de la fraction élue à 0,4 M et celui de l'échantillon dont elle est issue, sont tout à fait similaires. Le composé élué en premier (2-4 MDa) ne se retrouve pas dans les fractions précédant la fraction 0,4 M ce qui indique son caractère anionique. Le composé de masse moléculaire moyenne comprise entre 1 et 2 MDa, présent dans toutes les fractions, pourrait être un seul et même composé qui commence à être élué dans la fraction 0 M puis est presque entièrement élué dans la fraction 0,1 M. Il pourrait rester dans les fractions 0,2 M, 0,4 M et 0,8 M une élution résiduelle de ce polymère. Ce composé serait alors neutre. Cette hypothèse de composé identique est d'autant plus probable que les spectres RMN- ^1H réalisés sur chacune des fractions sont très similaires pour les 3 fractions de 0 M à 0,2 M (Figure 60).

Dans l'échantillon POL-FI-aq, la fraction 0,4 M est majoritaire, ce qui veut dire que dans cet échantillon le composé anionique (M_w entre 2 et 4 MDa) serait majoritaire.

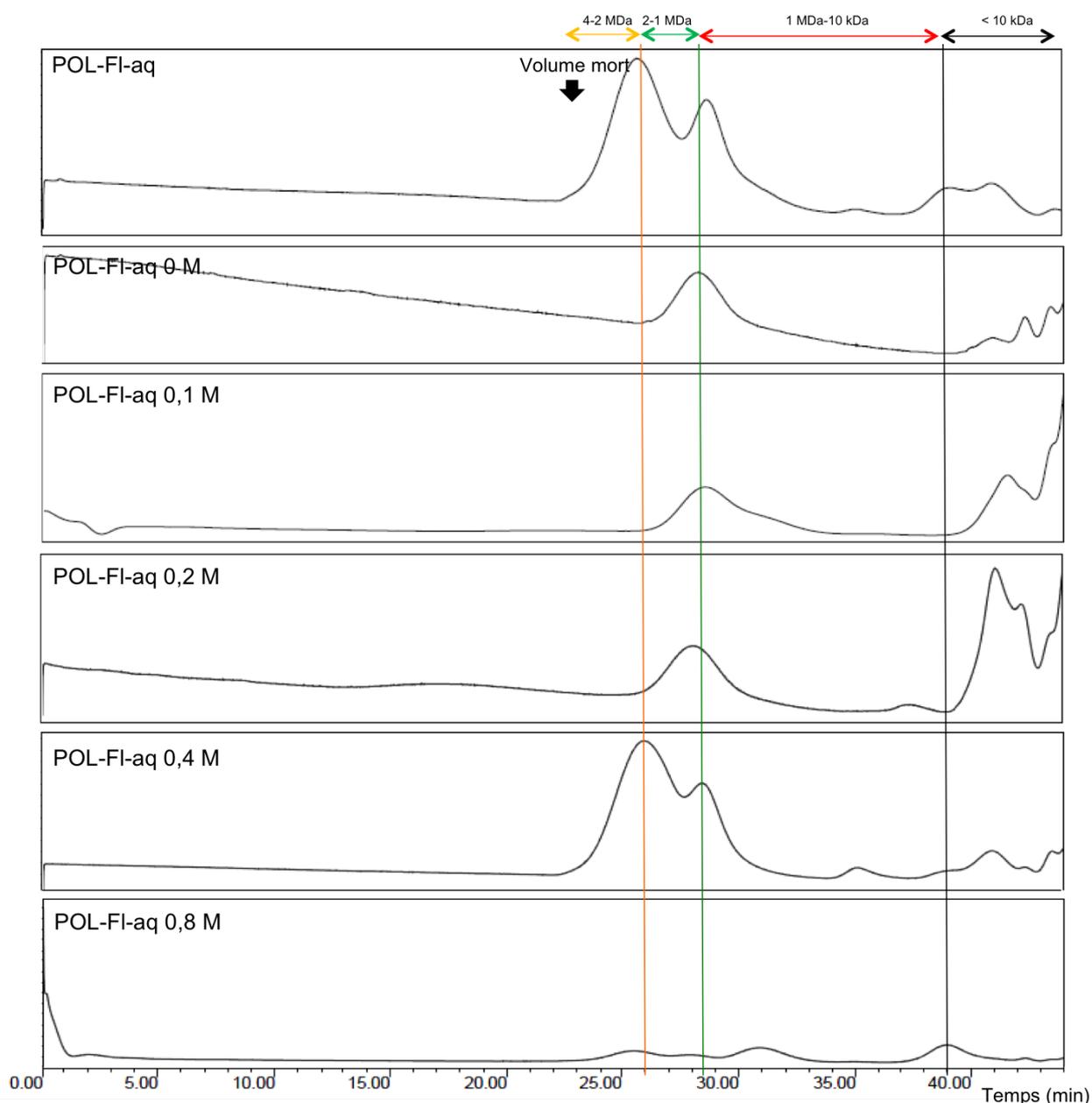


Figure 59. Profils HPSEC des fractions de chromatographie échangeuse d'anions de POL-FI-aq en comparaison avec le profil de l'échantillon global. Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.

L'ensemble de ces fractions a été analysé en CPG-SM après triméthylsilylation des produits d'hydrolyse acide pour déterminer leur composition en monosaccharides. Il apparaît que toutes les fractions contiennent du glucose sauf la fraction 0,8 M dans laquelle aucun sucre n'a été trouvé.

L'échantillon POL-FI-aq et les fractions obtenues après séparation en chromatographie échangeuse d'ions ont été analysés en RMN-¹H (Figure 60). Les fractions glucidiques minoritaires (0 M, 0,1 M et 0,2 M) ont des spectres similaires qui diffèrent de celui de l'échantillon dont elles sont issues (POL-FI-aq avant DEAE). Sur leurs spectres, nous

retrouvons la présence de signaux attribuables à la résonance des protons de groupements lactates (δ 1,32 ppm (3H) et 4,10 ppm (1H)). Il y a donc dans ces fractions au moins un polysaccharide neutre, de type glucane substitué par des lactates, qu'il sera intéressant de comparer avec le glucane neutre précédemment décrit sous le code POL-FI-inter 0 M (voir ci-après pour la comparaison en 5.4.3.3). Dans la fraction majoritaire (0,4 M), les signaux des lactates sont encore visibles, ceci est certainement dû à l'élution résiduelle du glucane neutre (1-2 MDa) que l'on retrouve sur le profil HPSEC de la fraction. Les signaux des acétates, autour de 2 ppm, très présents dans l'échantillon d'origine, se retrouvent naturellement sur le spectre de cette fraction majoritaire. Nous pouvons donc en conclure que dans la fraction 0,4 M, est présent au moins un polysaccharide anionique contenant des acétates. Dans la fraction complexe 0,8 M, les signaux des acétates et des lactates restent présents. Nous observons aussi une superposition de signaux caractéristiques des glucides et du poly-glutamyl-glutamate.

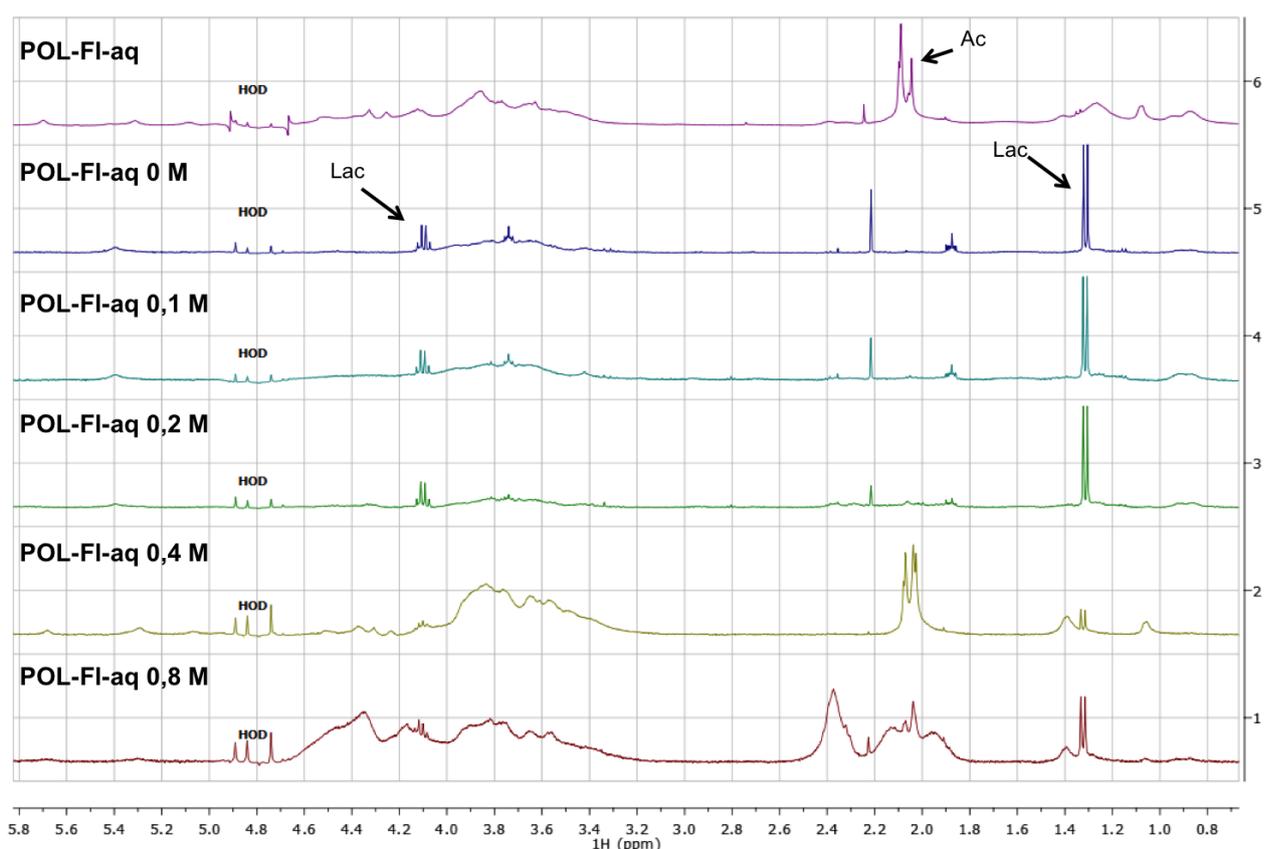


Figure 60. Spectres RMN-¹H de l'échantillon POL-FI-aq et des fractions issues de la chromatographie échangeuse d'ions de cet échantillon. Lac : lactate. Ac : acétate.

La Figure 61 montre plus particulièrement le spectre RMN-¹H de la fraction majoritaire POL-FI-aq (0,4 M). L'enveloppe caractéristique des protons du cycle entre 3,4 et 3,9 ppm et les signaux des groupements méthyles des acétates entre 2,03 et 2,07 ppm sont bien visibles. On notera que ces signaux ne sont pas suffisamment déblindés, avec un déplacement chimique proche de 2 ppm, pour confirmer la liaison O-Ac (δ 2,0-2,2 ppm) des groupements acétyles plutôt que N-Ac (δ 1,8-2,1 ppm) (Cheng et Neiss, 2012). Cependant, étant donnée l'absence de GlcNAc montrée par l'analyse en CPG-SM des dérivés per-acétylés des produits de méthanolyse de ces polysaccharides, nous pouvons envisager la liaison O-Ac de ces groupements. Nous remarquons par ailleurs la présence de plusieurs protons très déblindés qui sortent dans la zone des protons anomériques entre 4,3 ppm et 5,7 ppm. Dans la zone 5,1-5,8 ppm, les trois signaux sous forme de singulets larges correspondent à la résonance de H anomériques en position équatoriale, les résidus Glc composant les polymères en présence étant de ce fait sous forme d'anomères α -Glc p). Dans la zone 4,3-4,8 ppm, apparaissent des signaux attribuables à la résonance de H du cycle (H-2 - H-6') déblindés par la présence sur le même carbone d'une fonction acétate (O-Acyl : δ + 0,3-0,5 ppm) et/ou à la résonance de ¹H anomériques (H-1 (ax)) de résidus β -D-Glc p (Agrawal, 1992 ; Cheng et Neiss, 2012). D'autres signaux de ce type peuvent également être masqués par le pic de l'eau, qui, dans la présentation du spectre, a fait l'objet d'un traitement spécifique. A ces signaux déblindés, s'ajoute une enveloppe de signaux à des déplacements chimiques entre 3,4 et 3,9 ppm pouvant tout à fait correspondre à la résonance de H-2 à H-6' de résidus α -D-Glc p avec absence d'acétylation des carbones liés. Ces différents éléments d'analyse spectrale s'accordent avec le profil HPSEC montrant que cette fraction contient plus d'une structure polysaccharidique (2 polymères majeurs glucaniques ; voir Figure 59).

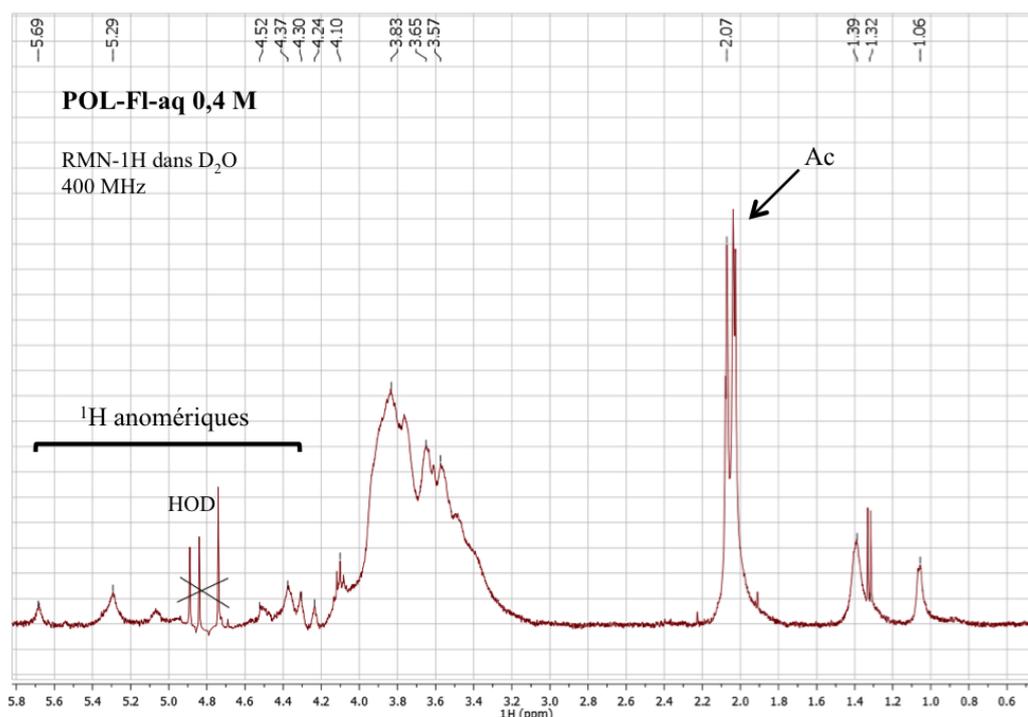


Figure 61. Spectre RMN-¹H de l'échantillon POL-FI-aq 0,4 M.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons conclure que dans l'échantillon POL-FI-aq sont présents au moins 2 composés différents principaux :

- Glucanes neutres substitués par des lactates (M_w 1 à 2 MDa),
- Glucanes anioniques substitués par des acétates (M_w 2-4 MDa), majoritaires et dont nous noterons qu'ils donnent des solutions visqueuses.

L'origine de la charge négative de ces exopolysaccharides solubles n'a pu être déterminée faute de quantité suffisante. Des substituants inorganiques peuvent être envisagés comme des phosphates ou des sulfates associés ; ces derniers joueraient également, en plus des acétates, un rôle dans la multiplicité des signaux déblindés dans la zone anomérique 4,3-4,8 ppm (O-Sulfate : $\delta + 0,3-0,6$ ppm ; O-Phosphate : $\delta + 0,3-0,5$ ppm) (Cheng et Neiss, 2012). Si l'on regarde le spectre Infra-Rouge de l'échantillon POL-FI-aq contenant majoritairement ces glucanes anioniques, nous voyons un doublet de bandes à 1217 et 1252 cm^{-1} qui pourraient venir de fonctions sulfates ; la présence de phosphates est moins facile à mettre en évidence, les bandes correspondantes étant masquées dans la zone des vibrations caractéristiques des sucres autour de 1026 cm^{-1} (Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Moppert *et al.*, 2009 ; Chalkiadakis *et al.*, 2013) (Figure 62).

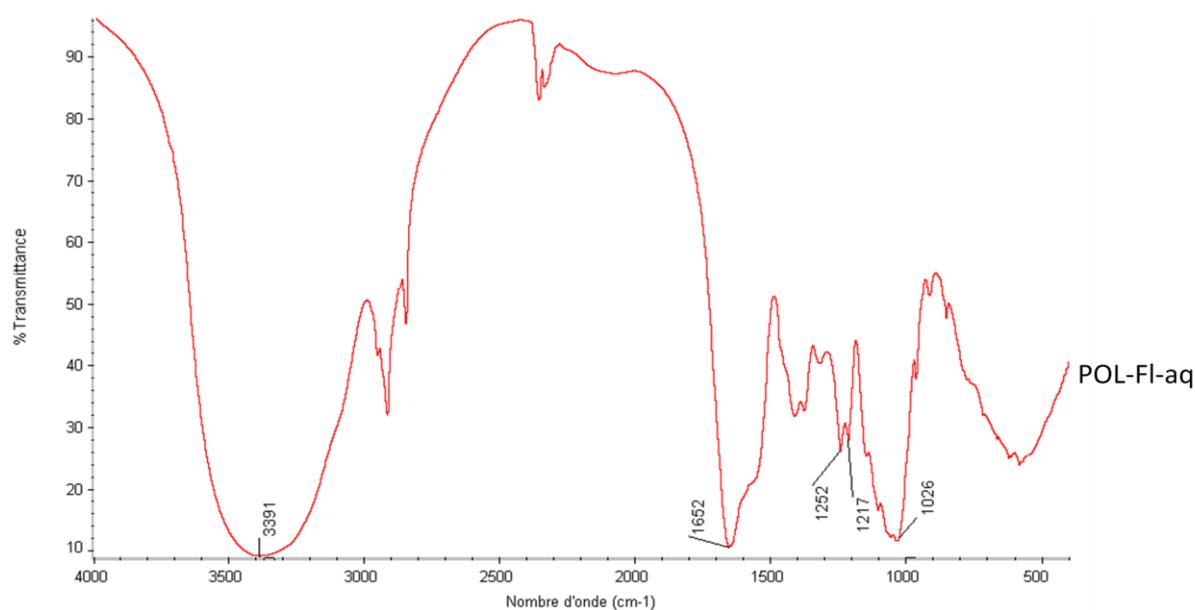


Figure 62. Spectre Infra-Rouge de l'échantillon POL-FI-aq.

5.4.3.3. Comparaison entre les échantillons POL-FI-inter et POL-FI-aq

Afin d'évaluer les différences ou similitudes entre les polymères décrits précédemment, nous avons comparé les fractions principales qui les contiennent d'après leurs profils HPSEC et RMN-¹H.

Les fractions 0 M des échantillons POL-FI-aq et POL-FI-inter apparaissent identiques et de simple composition. En effet, pour toutes les deux, les profils HPSEC présentent un seul pic (pour les masses supérieures à 10 kDa) avec un même temps de rétention (Figure 63 A) et leurs spectres RMN-¹H sont similaires (Figure 64 A). Elles contiennent principalement un glucane neutre substitué par des lactates, de M_w de l'ordre de 1-2 MDa. Bien que ce glucane se solubilise quelque peu dans la phase aqueuse (POL-FI-aq 0 M) lors du partage chloroforme/méthanol/eau des EPS-FI, il forme une interphase car c'est dans l'interphase qu'il est retrouvé essentiellement (POL-FI-inter 0 M). Sa structure le rend donc peu soluble dans l'eau. Cette faible solubilité pourrait être responsable de l'éluion de ce même polymère dans les fractions plus acides en sortie de chromatographie d'échange d'ions puisque sa présence est visible sur les profils HPSEC de POL-FI-aq 0,4 M et POL-FI-inter 0,4 M (Figure 63 B), sous réserve qu'il s'agisse bien du même composé.

Les fractions 0,4 M des échantillons POL-FI-aq et POL-FI-inter sont, quant à elles, toutes deux complexes en termes de dispersion de taille des polymères en présence (Figure 63 B) et de structure de ces polymères étant donné le nombre de signaux dans la zone de résonance des protons anomériques ajouté à la présence de groupements acétates (Figure 64 B). POL-FI-inter 0,4 M contient de faibles quantités de constituants et son spectre RMN

témoigne d'une composition complexe. Ceci peut être interprété par le fait que le glucane anionique acétylé d'environ 2-4 MDa se solubilise majoritairement dans la phase aqueuse lors du partage chloroforme/méthanol/eau des EPS-FI, se retrouvant alors majoritaire dans la fraction POL-FI-aq 0,4 M.

La fraction POL-FI-aq 0,8 M contient plusieurs composés en faibles quantités dont celui ayant été identifié comme un poly-glutamyl-glutamate d'environ 500 kDa (Figures 63 C). Sur le spectre RMN-¹H de cette fraction, les signaux correspondants sont visibles aux côtés de signaux des polysaccharides élués dans les fractions précédentes (Figure 64 C). Ce composé peu soluble se retrouve donc essentiellement dans la fraction POL-FI-inter 0,8 M (Figures 63 C et 64 C).

On peut donc en conclure que parmi les EPS de la matrice de *Pseudoalteromas ulvae* TC14 (EPS-FI), au moins 3 composés différents majoritaires sont présents :

- Glucanes substitués par des lactates, peu solubles, neutres, de M_w 1-2 MDa (POL-FI-inter 0 M),
- Glucanes substitués par des acétates, solubles, anioniques de M_w 2-4 MDa (POL-FI-aq 0,4 M),
- Poly-glutamyl-glutamates peu solubles, anioniques de M_w d'environ 500 kDa (POL-FI-inter 0,8 M).

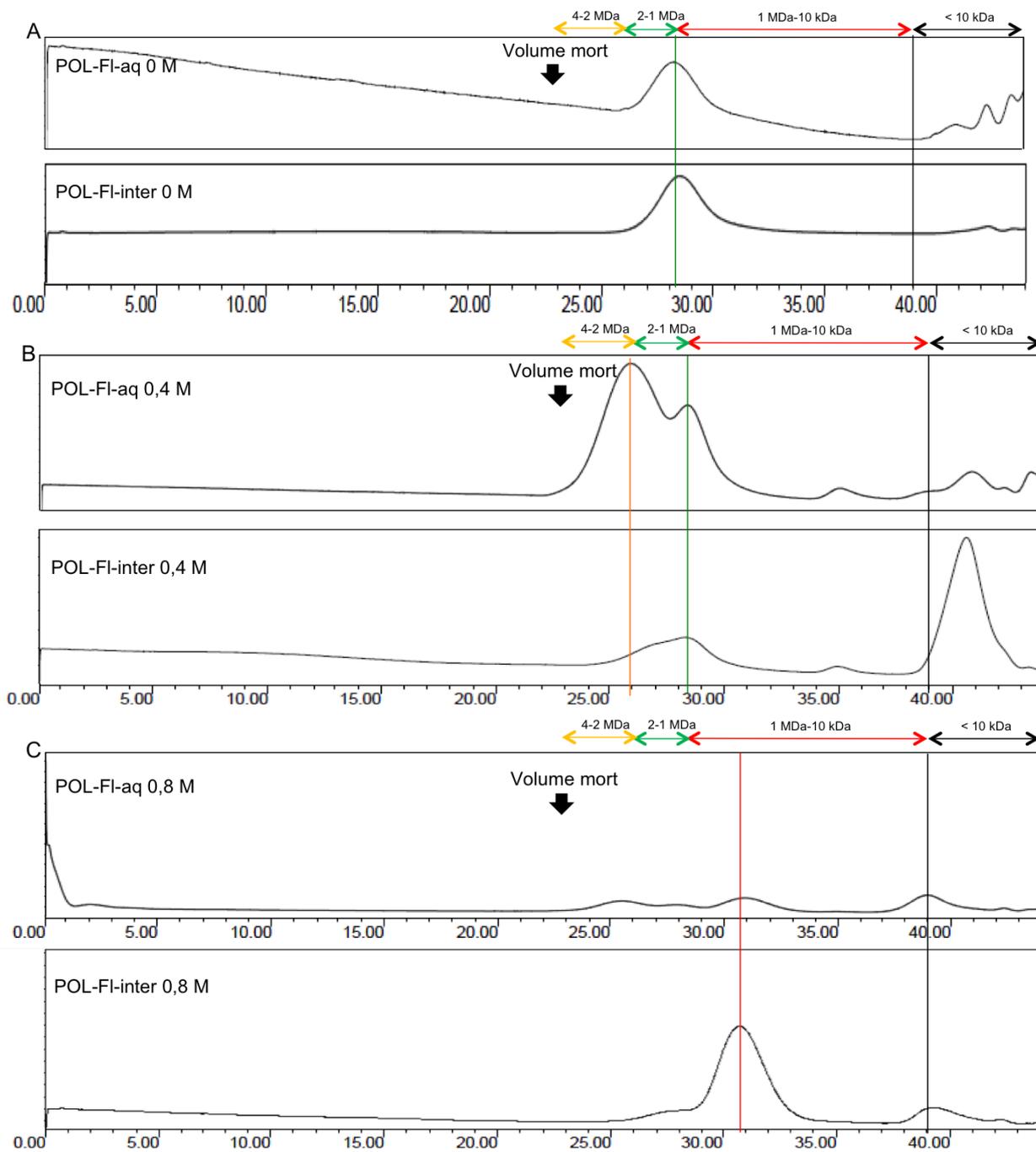


Figure 63. Profils HPSEC des fractions 0 M (A), 0,4 M (B) et 0,8 M (C) de la phase aqueuse et de l'interphase de l'échantillon POL-FI. Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction. En abscisses, le temps de rétention (min).

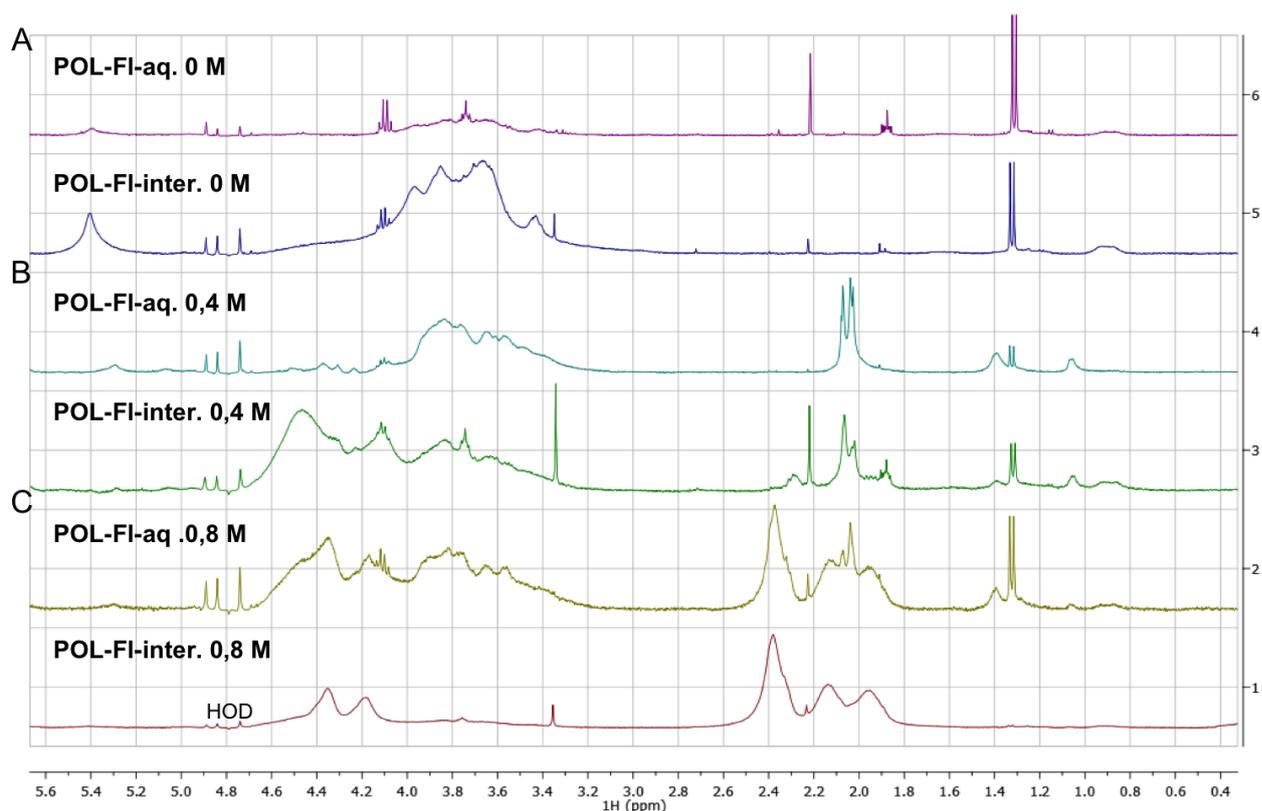


Figure 64. Spectres RMN-¹H des fractions 0 M (A), 0,4 M (B) et 0,8 M (C) des échantillons POL-FI-aq et POL-FI-inter.

5.4.4. Analyse des polysaccharides par microscopie à force atomique (AFM)

Depuis quelques années, la microscopie AFM est une technique très utilisée pour étudier les exopolysaccharides (Morris *et al.*, 1997 ; Pletikapić *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2011 ; Ahmed *et al.*, 2013 ; Kavita *et al.*, 2013). Cette technique permet d’imager une surface en mesurant les forces d’interactions entre une pointe sonde et l’échantillon analysé de polymères, biopolymères

Lors de cette étude, nous avons utilisé le mode contact intermittent (*tapping*) dans des conditions ambiantes (à l’air et à une température de 25°C). La pointe n’est pas en contact permanent avec l’échantillon et ne touche celui-ci qu’en position basse de l’oscillation, ce qui évite un endommagement possible de la surface analysée. Ce mode d’analyse permet d’obtenir simultanément une image topographique et une image de contraste de phase. La première permet d’avoir des informations sur les propriétés morphologiques superficielles de l’échantillon, tandis que l’image de phase reflète la variation des propriétés mécaniques et/ou chimiques de la surface. Dans notre cas, la différence de couleur (en phase) correspond à des différences des propriétés mécaniques entre les différents constituants de la surface (objet mou ou dur).

Afin de mieux caractériser les macromolécules d'exopolymères déposées sur le support de silicium, nous avons effectué dans un premier temps une analyse AFM du silicium brut. La Figure 65 montre une image AFM (échelle 5 μm x 5 μm) faisant apparaître la qualité de la surface utilisée. Cette image montre que la surface Si est relativement lisse (rugosité moyenne $\sim 0,3$ nm) et uniforme en terme de rigidité (faible déphasage).

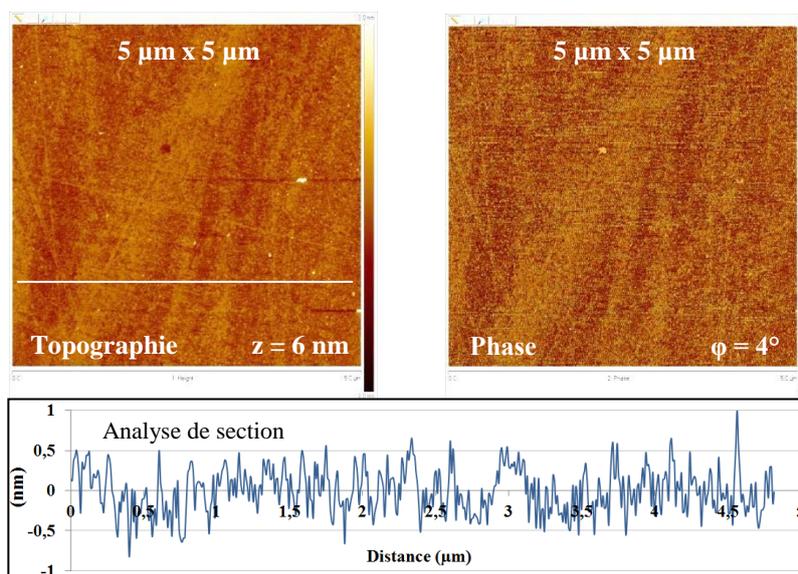


Figure 65. Images AFM (topographie et contraste de phase) du substrat silicium Si utilisé avant le dépôt d'exopolymères. En bas : Analyse de section (trait blanc sur l'image de gauche) montrant la faible rugosité de la surface Si.

Pour l'échantillon POL-FI-inter 0 M (majoritairement constitué de glucanes neutres substitué par des lactates, de M_w 1-2 MDa), l'imagerie AFM (Figure 66) révèle la présence des macromolécules à la surface Si. La rugosité augmente significativement jusqu'à 5 nm, mettant en évidence l'existence des organisations moléculaires à la surface. Les chaînes de glucanes (clairement visibles sur les images de phase) sont filamenteuses et parfois enchevêtrées et incurvées. Le déphasage observé sur l'image de contraste de phase à petite échelle (2 μm x 2 μm) montre la différence des propriétés mécaniques entre les macromolécules de polysaccharides mous (clairs sur l'image) et la surface dure de silicium (en sombre sur l'image). L'analyse de section montre que la largeur d'une chaîne est de l'ordre de 20 nm (section 1), alors que cette taille devient plus élevée (section 2) du fait de l'assemblage de plusieurs macromolécules de glucane.

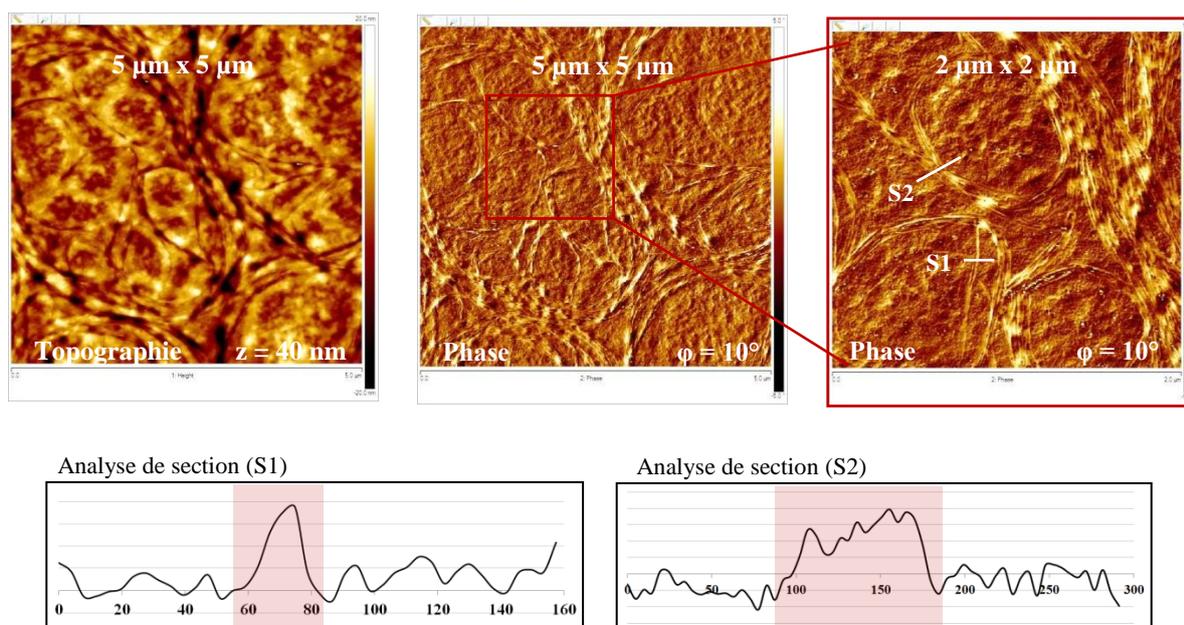


Figure 66. Images AFM (topographie et contraste de phase à deux échelles différentes) de POL-FI-inter 0 M à 10 µg/mL sur une surface Si. En bas : Analyses de sections (traits blancs sur l'image de droite) montrant la présence des chaînes individuelles et souvent assemblées sur la surface.

En ce qui concerne l'échantillon POL-FI-aq 0,4 M (majoritairement constitué de glucanes anioniques acétylés, de M_w 2-4 MDa, et de glucanes neutres liés à des lactates de M_w 1-2 MDa), l'analyse AFM permet de révéler également des organisations moléculaires similaires à celles de POL-FI-inter 0 M. La Figure 67 montre des images AFM à deux échelles différentes (5 µm et 2 µm). Un aspect filamentueux est également observé pour les chaînes d'exopolysaccharides. La simple identification de ces macromolécules par contraste de phase (2 µm x 2 µm) réside dans la différence des propriétés mécaniques (rigidité) entre les biopolymères et la surface. L'AFM montre bien la présence de longs filaments incurvés (donc souples) et associés (par exemple, nous trouvons plusieurs chaînes dissociées puis associées ensemble). Chaque chaîne mesure environ 20 nm de diamètre.

La caractérisation des polysaccharides (POL-FI-inter 0 M et POL-FI-aq 0,4 M) par microscopie AFM a permis de mettre en évidence l'organisation de ces macromolécules à la surface d'un support de silicium. On note que le travail à très faible concentration (10 µg/mL) était un facteur important pour pouvoir disperser les chaînes macromoléculaires et identifier la structure filamentueuse observée.

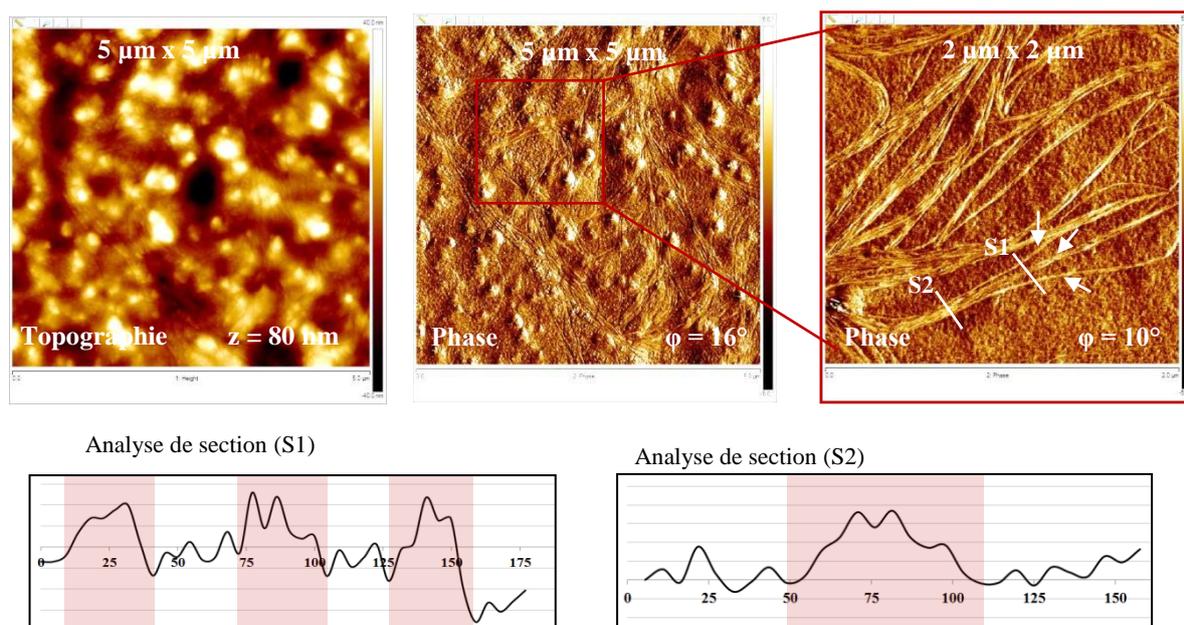


Figure 67. Images AFM (topographie et contraste de phase à deux échelles différentes) de POL-FI-aq 0,4 M à 10 µg/L sur une surface Si. En bas : Analyses de sections (traits blancs sur l'image du droite) montrant la présence d'un paquet de filaments qui se dissocie en plusieurs chaînes macromoléculaires.

5.4.5. Analyse des EPS très fortement liées

Après extraction à la soude des EPS issues du biofilm formé par *P. ulvae* TC14, une étape de centrifugation a permis d'isoler les EPS-FI du culot bactérien, plus exactement du biofilm résiduel (voir Figure 39, chapitre 4). En effet, le volume de ce culot bactérien et une observation au microscope nous ont permis de déduire qu'autour des bactéries, une quantité non négligeable de matrice extracellulaire était encore présente. Afin d'examiner la composition des EPS encore contenues dans cette matrice résiduelle, une étape supplémentaire d'extraction a été ajoutée au protocole d'isolement des EPS. Le biofilm résiduel humide a été agité en présence de billes de verre (5 g de billes de 4-6 mm de diamètre/g de culot bactérien) manuellement afin d'éviter de casser les cellules. Une étape de centrifugation a permis ensuite de séparer, les billes et les bactéries, du surnageant contenant les EPS ainsi extraites que l'on nomme EPS-TFI pour EPS Très Fortement liées aux bactéries. Le rendement d'extraction pour ces EPS-TFI est de 0,04 mg/mg de biofilm résiduel.

Cet échantillon a ensuite subi une étape de partage chloroforme/méthanol/eau permettant de séparer les constituants selon leur polarité et solubilité dans 3 phases, une phase aqueuse, une interphase qui s'est formée et la phase organique. La phase aqueuse n'a pu être étudiée en raison d'une quantité trop faible de constituants. L'étude de la composition en monosaccharides des échantillons avant partage (EPS-TFI) et après partage (EPS-TFI-inter) a été réalisée par CPG-SM (après hydrolyse acide suivie d'une triméthylsilylation) (Figure 68).

Elle montre que ces 2 échantillons sont riches en glucides et contiennent toujours très majoritairement du glucose. Ainsi, nous trouvons de l'ordre de 70 % de glucose dans l'échantillon EPS-TFI et de l'ordre de 62 % de glucose dans la fraction EPS-TFI-inter (résultats obtenus en utilisant un témoin interne, l'érythritol). Ces 2 échantillons sont donc beaucoup plus concentrés en glucose que l'échantillon EPS-FI. Nous pouvons observer dans l'échantillon EPS-TFI que 2 autres pics apparaissent sur le chromatogramme de l'analyse CPG-SM à t_r 30,2 min et 31,5 min correspondant à un composé non identifié qui ne se retrouve pas dans la fraction EPS-TFI-inter. Nous pouvons donc supposer que ce composé était présent dans la phase aqueuse non analysée. La méthanolyse de l'échantillon d'EPS-TFI confirme la composition en glucose des polymères et la présence d'acides uroniques n'a pas été mise en évidence.

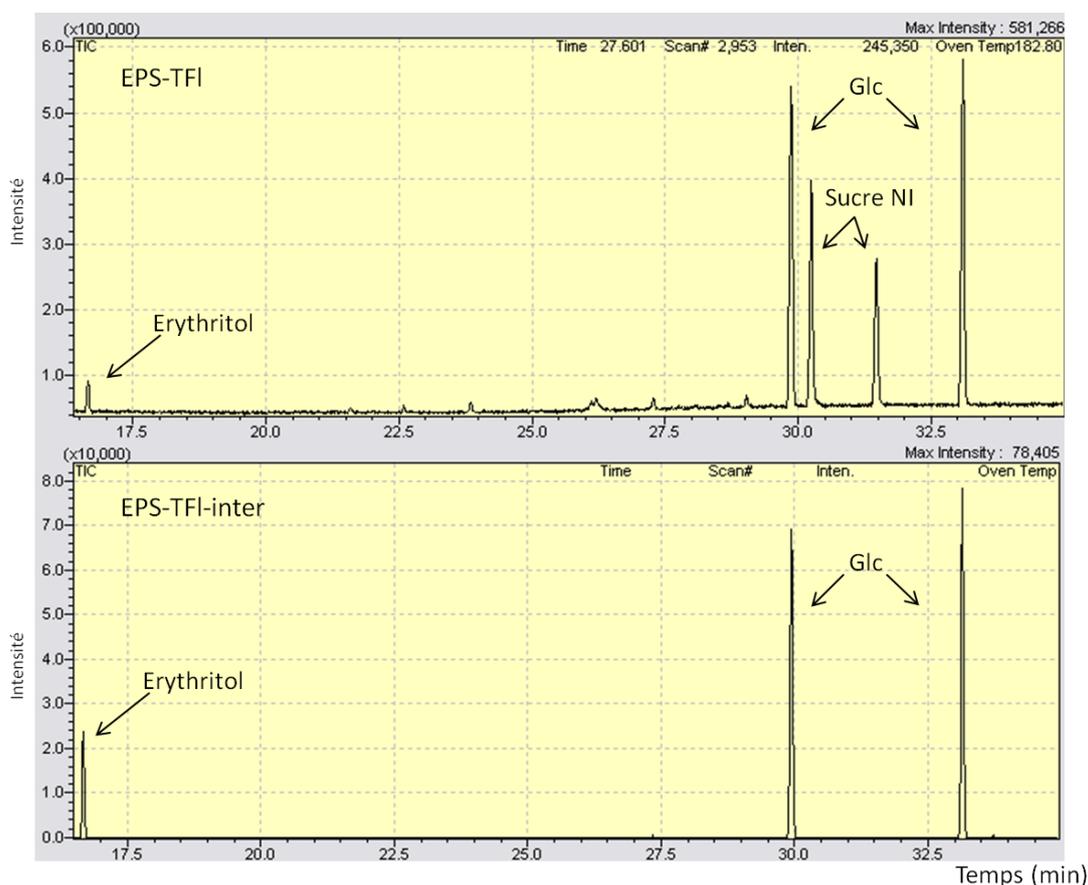


Figure 68. Chromatogrammes (CPG-SM) des dérivés triméthylsilylés des produits d'hydrolyse acide des EPS-TFI et EPS-TFI-inter. Les abscisses correspondent au temps de rétention (en min). Glc : Glucose. Sucre NI : sucre non identifié.

Afin d'évaluer la diversité et la taille des polymères présents dans les EPS très fortement liées aux bactéries, l'échantillon POL-TFI-inter a été analysé par HPSEC (Figure 69). Il est intéressant de constater que pour les masses au-delà de 10 kDa, un seul pic est visible (majoritaire sur l'ensemble du chromatogramme), ce qui veut dire qu'au moins un

polymère est présent de masse moléculaire moyenne de 1-2 MDa. Les analyses en CPG-SM ayant montré que la phase glucidique de cet échantillon POL-FI-inter était composée uniquement de glucose, nous pouvons en conclure qu'il s'agit d'un glucane. Il est fort probable que ce polymère peu soluble de 1-2 MDa soit le même que le glucane neutre peu soluble et de taille équivalente identifié parmi les EPS-FI (POL-FI-inter 0 M). Le spectre RMN-¹H est d'ailleurs tout à fait similaire (non présenté ici).

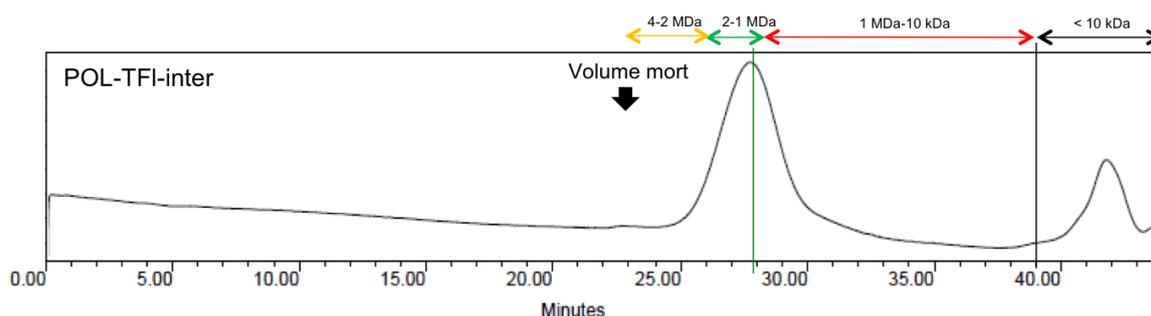


Figure 69. Profil HPSEC de l'échantillon Pol-TFI-inter. Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.

Malheureusement, ce début d'analyse des EPS-TFI n'a pas donné lieu à plus de travaux (étape de fractionnement avec la DEAE) car les masses récupérées ont été très faibles.

5.4.6. Activité antibiofilm des EPS isolées

Plusieurs polysaccharides issus de bactéries marines ont fait l'objet d'études montrant une activité *antifouling* ou plus précisément une activité antibiofilm (Raguénès *et al.*, 1996 ; Loaïc *et al.*, 1997 ; Loaïc *et al.*, 1998 ; Rougeaux *et al.*, 1998 ; Zanchetta et Guezennec, 2001 ; Zanchetta *et al.*, 2003 ; Dobretsov *et al.*, 2006 ; Jiang *et al.*, 2011 ; Kanmani *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2011 ; Sayem *et al.*, 2011 ; Guezennec *et al.*, 2012 ; Kavita *et al.*, 2014). Ces composés ont été isolés de divers genres bactériens (*Alteromonas*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Streptococcus* et *Oceanobacillus*). Leur composition est variée, tous sont des hétéropolysaccharides. Les sucres neutres retrouvés sont le glucose, le mannose, le galactose, l'arabinose, le rhamnose, le xylose et le fructose. La plupart de ces exopolysaccharides contiennent des acides uroniques ou des sucres aminés (Dobretsov *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2011 ; Guezennec *et al.*, 2012). Leur taille est variable et peut atteindre jusqu'à environ 2 MDa. Les plus petits ont une masse moléculaire d'environ 300 kDa. Il faut noter qu'aucun glucane issu d'une souche bactérienne du genre *Pseudoalteromonas* n'a été caractérisé et reconnu pour son activité antibiofilm à ce jour.

Dans cette étude, nous avons déterminé l'activité antibiofilm de différents échantillons d'EPS provenant du biofilm de *P. ulvae* TC14. Pour ce faire, nous avons utilisé le *BioFilm Ring Test*[®] (BFRT[®]). Les échantillons ont été dilués dans du milieu de culture (milieu MB) à une concentration de 250 µg/mL avant le début des tests. Les résultats ont été lus après 48 h d'incubation. Six échantillons ont été testés, les échantillons d'EPS totaux (EPS-sol, EPS-fl et EPS-Fl) et les 3 échantillons enrichis en polysaccharides pour lesquels les quantités étaient suffisantes (POL-fl-aq, POL-Fl-aq et POL-Fl-inter). Les souches cibles ont été choisies parmi les souches isolées et caractérisées, présentées dans le chapitre 3. Il s'agit des 5 souches de bactéries marines suivantes : *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7, *Shewanella* sp. TC9, *Alteromonas genovensis* TC12 et *Pseudoalteromonas* sp. TC15. Le choix de ces souches comprenant 4 genres différents, permet d'observer l'effet des EPS de *P. ulvae* TC14 sur un ensemble varié de souches (genres et espèces différents). Un exemple de résultats de lecture du BFRT[®] est présenté dans la Figure 70. Différents témoins ont permis de s'assurer que les effets mesurés étaient bien dus à l'action des échantillons ajoutés à la culture bactérienne sur la formation des biofilms des bactéries testées (témoin milieu MB, témoin milieu MB+POL-fl-aq et témoin milieu MB+POL-Fl-aq). Un dernier témoin a été réalisé ; il s'agit de puits contenant seulement la souche bactérienne testéeensemencée dans le milieu MB. Ce témoin permet de constater la présence de biofilm formé au bout de 48 h dans le milieu de culture en absence d'échantillon d'EPS. Sur la Figure 70, nous pouvons constater la formation d'un spot au centre des puits des témoins de la première ligne (milieu MB, milieu MB+POL-fl-aq et milieu MB+POL-Fl-aq). Ces résultats montrent que ni le milieu seul et ni le milieu combiné aux échantillons ne perturbent la migration des microbilles magnétiques au centre du puits sous l'effet de l'aimantation. Sur la deuxième ligne, nous pouvons observer dans les puits contenant les bactéries seules dans le milieu de culture, que les microbilles n'ont pas pu former un spot, ce qui traduit la formation d'un biofilm dont la matrice empêche les billes de se rassembler. En présence de POL-fl-aq, nous remarquons que la souche *Shewanella* sp. TC9 (ligne 3) et la souche *Pseudoalteromonas* sp. TC15 (ligne 5) ont formé un biofilm (absence de spot) ce qui montre que l'échantillon testé n'a pas d'effet dans ces conditions. Ce n'est en revanche pas le cas pour l'échantillon POL-Fl-aq qui a un effet antibiofilm sur les 2 souches testées puisque l'on observe nettement les spots des microbilles rassemblées au fond des puits (lignes 4 et 5). Cet échantillon empêche donc la formation de biofilm par ces souches.

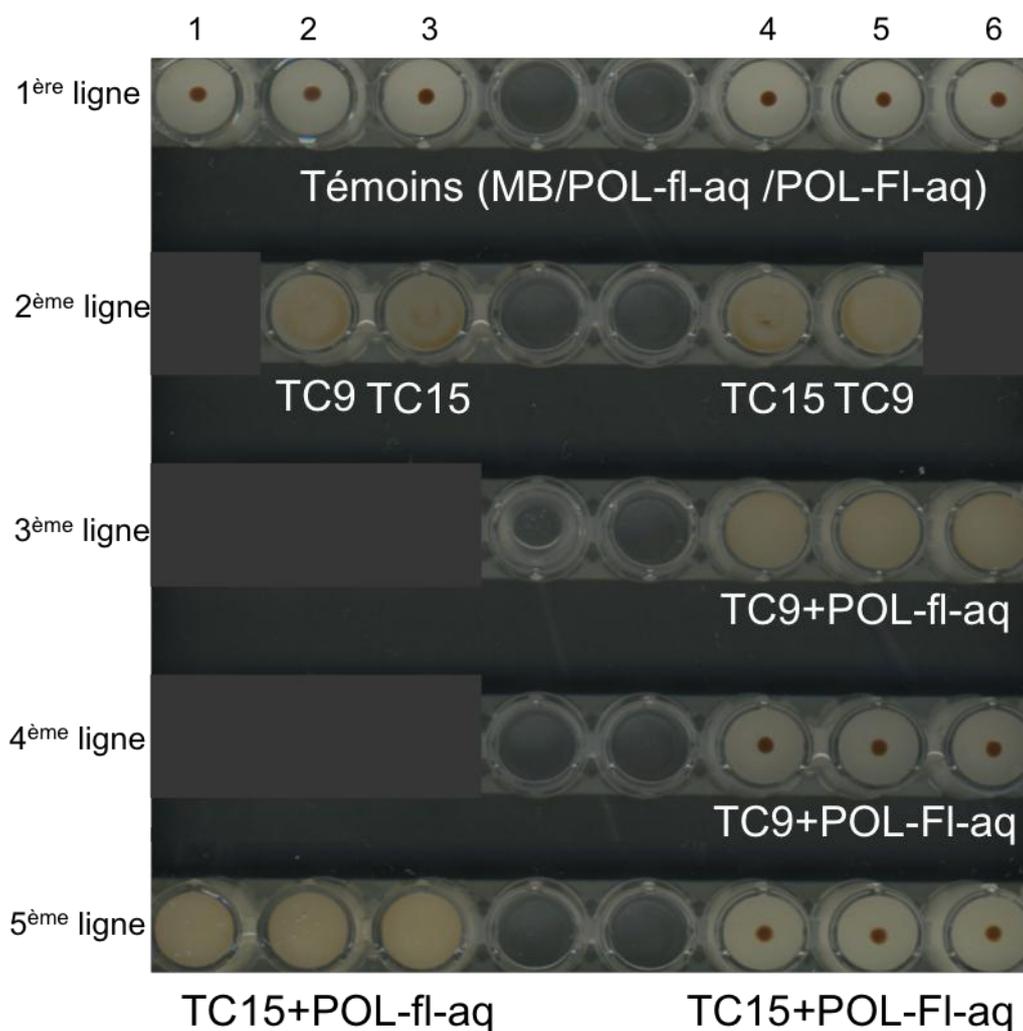


Figure 70. Résultats du BFRT® (photographie du fond des puits) après 48 h d'incubation et aimantation.
 1^{ère} ligne : les puits 1 et 6 : milieu MB stérile. Les puits 3 et 4 : milieu MB stérile + POL-FI-aq. Les puits 2 et 5 : milieu MB stérile + POL-fl-aq.
 2^{ème} ligne : les puits 2 et 5 : culture de la souche TC9 dans le milieu MB. Les puits 3 et 4 : culture de la souche TC15 dans le milieu MB.
 3^{ème} ligne : les 3 puits contiennent une culture de la souche TC9 dans du milieu MB + POL-fl-aq.
 4^{ème} ligne : les 3 puits contiennent une culture de la souche TC9 dans du milieu MB + POL-FI-aq.
 5^{ème} ligne : les 3 puits à gauche contiennent une culture de la souche TC15 dans du milieu MB + POL-fl-aq. Les 3 puits à droite contiennent une culture de la souche TC15 dans du milieu MB + POL-FI-aq.

Les tests d'activité de chaque échantillon ont été réalisés 3 fois et ceci 2 fois au moins, sinon 3 fois, indépendamment, lorsque les quantités le permettaient. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 71. Nous avons fait le choix de considérer qu'un échantillon a un effet antibiofilm significatif s'il permet de réduire la formation du biofilm d'au moins 50 % par rapport au biofilm formé en son absence dans le milieu. Nous pouvons alors constater que les échantillons d'EPS-sol et d'EPS-fl n'ont pas d'effet sur la formation des biofilms des 5 souches testées. Il est à noter que les EPS-fl ont une faible action sur la souche *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 qui ne forme plus que 69 % de son biofilm en présence de cet échantillon. Les EPS-FI paraissent quant à eux avoir un effet mais faible sur la formation

de biofilm des souches *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7, *Shewanella* sp. TC9, *Alteromonas genovensis* TC12 et *Pseudoalteromonas* sp. TC15. Par contre, la souche *P. lipolytica* TC8 qui a déjà montré une certaine sensibilité aux EPS-fl, est sensible à cet échantillon d'EPS-Fl car elle ne produit plus que 20 % de biofilm (par rapport à la référence sans EPS dans le milieu) en sa présence. Les résultats montrent donc que les 3 échantillons d'EPS totaux n'ont pas d'activité antibiofilm significative contre les 5 souches testées sauf dans le cas particulier des EPS-Fl contre la souche TC8 (diminution de 80 % du biofilm) qui est la souche la plus sensible d'après l'ensemble des résultats.

La comparaison entre ces trois échantillons permet de donner une idée de la localisation dans le biofilm de *P. ulvae* TC14, du/des polymère(s) actif(s). Au vue de ces résultats, nous pouvons en conclure que ce/ces polymère(s) actif(s) est (sont) présent(s) surtout au niveau des EPS fortement liées aux bactéries.

Les résultats obtenus pour les échantillons enrichis en polysaccharides montrent que POL-fl-aq a peu d'effet (sauf sur TC8). Ces mesures ont fait l'objet d'une analyse statistique par le logiciel GraphPad PRISM. Les données ont été analysées avec le test Anova (analyse de la variance) à deux facteurs. Le niveau statistique de significativité est fixé $p < 0,001$. Ainsi, les résultats obtenus avec la fraction enrichie en exopolysaccharides POL-fl-aq et les EPS-fl dont elle est issue ont été comparés. Il n'y a pas de différences significatives entre les résultats obtenus pour ces 2 échantillons sur les souches *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7, *Shewanella* sp. TC9, *Alteromonas genovensis* TC12 et *Pseudoalteromonas* sp. TC15. Par contre, sur le biofilm de *P. lipolytica* TC8, l'échantillon POL-fl-aq a un effet plus important que les EPS-fl. La souche TC8 ne produit plus que 25 % de son biofilm en présence de POL-fl-aq. La fraction POL-fl-inter n'a pas pu être testée en triplicat sur toutes les souches car sa quantité était insuffisante, aussi est-elle absente des résultats présentés.

Les résultats obtenus pour les échantillons POL-Fl-aq et POL-Fl-inter ont fait l'objet de la même analyse statistique par le logiciel GraphPad PRISM. Ces 2 échantillons ont ainsi été comparés aux résultats obtenus avec les EPS-Fl dont ils sont issus. En présence de POL-Fl-aq, nous constatons que les souches TC7 et TC12 ne forment plus que respectivement 73 % et 51 % de leur biofilm. L'effet est encore plus marqué avec les souches TC8, TC9 et TC15 qui ne forment plus que 17, 22 et 14 % de leur biofilm, respectivement. L'échantillon POL-Fl-inter n'a, quant à lui, pas d'effet sur la formation du biofilm des souches *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7 et *Pseudoalteromonas* sp. TC15. Par contre, cet échantillon permet de diminuer d'au moins 55 % la formation de biofilm des 3 souches *P. lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC9 et *Alteromonas genovensis* TC12. L'analyse statistique par le logiciel

GraphPad PRISM montre que les échantillons POL-FI-aq et POL-FI-inter sont globalement plus actifs, sur l'ensemble des 5 souches testées, que l'échantillon d'origine EPS-FI. L'enrichissement en polysaccharides (élimination des protéines et des lipides) des EPS-FI permet d'obtenir 2 fractions significativement actives. Les polysaccharides les plus solubles (phase aqueuse) sont actifs sur toutes les souches sauf sur TC7, alors que les polymères de l'interphase inhibent la synthèse de biofilm de TC8, TC9 et TC12. Il est donc probable que le ou les composé(s) actif(s) soient de nature polysaccharidique. Dans la Figure 71 nous remarquons que POL-fl-aq ne donnent pas des résultats très différents de ceux obtenus avec les EPS-fl, malgré l'enrichissement en polysaccharides. Nous pouvons donc en déduire que le ou les polysaccharide(s) actif(s) dans les EPS-FI-aq et EPS-FI-inter n'est (ne sont) pas présent(s) dans les POL-fl-aq.

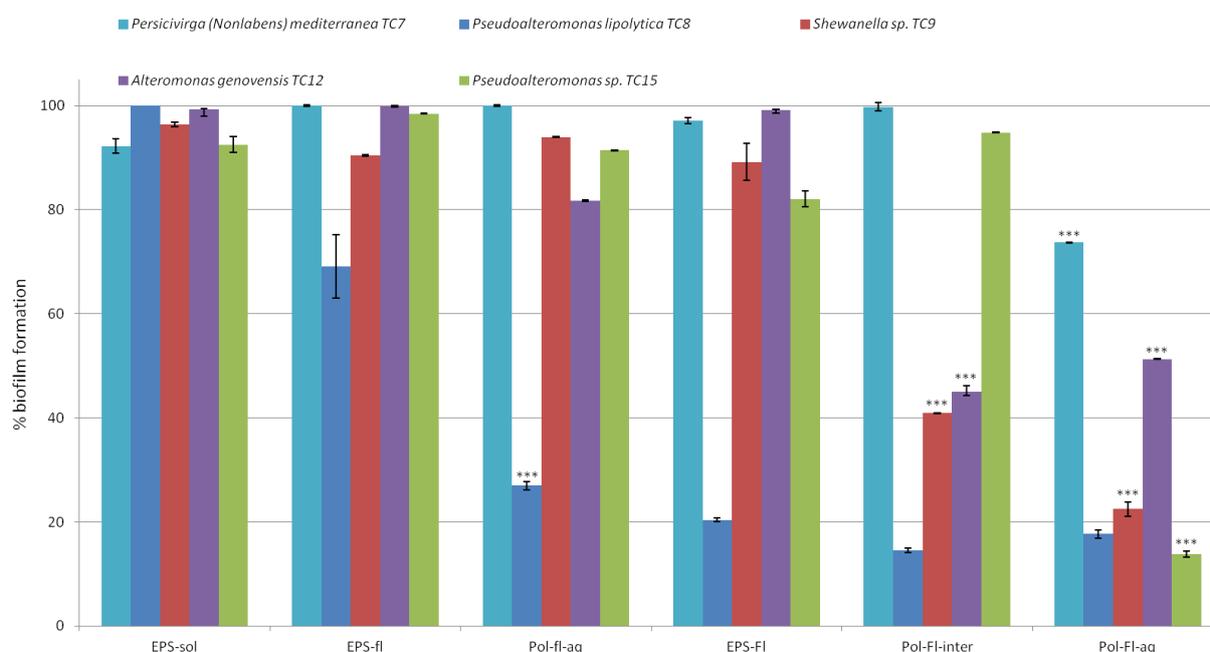


Figure 71. Test antibiofilm de six échantillons (EPS-sol, EPS-fl, POL-fl-aq, EPS-FI, POL-FI-inter et POL-FI-aq) sur 5 souches de bactéries marines (*Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7, *Shewanella sp.* TC9, *Alteromonas genovensis* TC12 et *Pseudoalteromonas sp.* TC15). Les résultats du BFRT[®] sont exprimés en % de biofilm formé par chacune des souches en présence de l'échantillon à 250 µg/mL après 48 h d'incubation, par rapport au biofilm formé en absence d'échantillon ajouté au milieu. Chaque expérience a été réalisée en triplicat 2 ou 3 fois selon les quantités d'échantillons disponibles. Les astérisques indiquent les différences statistiquement significatives entre EPS-fl /POL-fl-aq, EPS-FI/POL-FI-aq et EPS-FI/POL-FI-inter ($p < 0,001$).

Les résultats d'analyse par HPSEC montrant un même composé majoritaire dans l'échantillon POL-fl-aq et POL-FI-aq, un glucane anionique d'environ 2-4 MDa O-acétylé, il ne s'agit certainement pas de lui ou alors son activité est modérée. Par contre, le composé majoritaire dans l'échantillon POL-FI-inter est un glucane neutre d'environ 1-2 MDa

substitué par des lactates que l'on retrouve dans la fraction POL-FI-aq, comme polysaccharide commun. Nous pouvons alors poser comme hypothèse que le composé ayant un effet antibiofilm dans les échantillons POL-FI-aq et -inter est ce glucane neutre d'environ 1-2 MDa, ce qui expliquerait l'absence d'activité des EPS-fl et surtout de la fraction POL-fl-aq par rapport à son équivalente POL-FI-aq d'exopolysaccharides fortement liés. Le rôle joué par le poly-glutamyl-glutamate dans l'activité antibiofilm de la fraction POL-FI-inter dans laquelle il est présent essentiellement ne peut être estimé. Pour cela, la fraction POL-FI-inter 0,8 M dans laquelle il est élué à l'issue de l'analyse par chromatographie échangeuse d'ions devra être testée.

L'effet des échantillons d'EPS est donc plus ou moins important selon la souche testée. Ainsi la souche *P. lipolytica* TC8 est la souche la plus sensible tandis que la souche *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7 est la moins sensible. L'action des échantillons dépend, de façon non surprenante, du genre des bactéries testées en plus de leur composition.

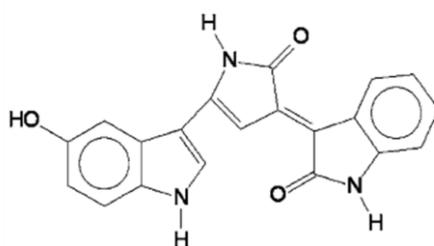
Enfin, l'activité des EPS sur la formation du biofilm a été mesurée avec le BFRT[®]. Ce test ne nous permet pas de savoir comment les EPS de *P. ulvae* TC14 inhibent la formation du biofilm de certaines souches. Plusieurs possibilités peuvent être envisagées, certaines étant liées : les échantillons peuvent avoir une action bactéricide, bactériostatique, empêcher l'adhésion des bactéries, ou inhiber la production de matrice d'exopolymères.

5.5. Analyse de l'extrait organique de *Pseudoalteromonas ulvae* TC14

Etant donnée la coloration violette des colonies sur milieu MA ainsi que du biofilm formé par la souche *Pseudoalteromonas ulvae* TC14, il nous a paru intéressant de confirmer la nature du pigment responsable de cette coloration supposée être la violacéine (Figure 72). Lors de l'extraction des EPS et partage CHCl₃/MeOH/H₂O de ces derniers, le pigment violet extrait venait colorer la phase organique dans laquelle il s'était solubilisé. Une partie a pu se solubiliser dans la phase aqueuse (contenant du méthanol). Afin d'obtenir une quantité suffisante de pigment, un extrait brut organique (CHCl₃/MeOH, 1:1 (v/v)) des bactéries cultivées en biofilm a été préparé avant d'être analysé par HPLC (triple détection). La Figure 73 regroupe l'ensemble des résultats obtenus. Sur le chromatogramme, le pic élué à t_r 4 min (3^{ème} fenêtre) présente 3 maxima d'absorption à 258, 372 et 575 nm (1^{ère} fenêtre). Les spectres de masse (4^{ème} fenêtre) de ce composé montrent la présence de 2 ions à m/z 342 [M-H⁺]⁻ et m/z 344 [M+H⁺]⁺ respectivement sur les spectres -MS et +MS. Ces résultats coïncident exactement avec les données de la littérature sur la violacéine, pigment de couleur violette de

masse 343 g/mol identifié dans des souches bactériennes appartenant au genre *Chromobacterium* (Durán *et al.*, 2007) ou à la bactérie marine *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (Yada *et al.*, 2008). Des études portant sur ce pigment ont montré qu'il possède de nombreuses activités biologiques (antitumorale, antibactérienne, antivirale,...) (Durán *et al.*, 2007 ; Soliev, 2011).

Nous avons donc dans les EPS extrait de biofilms de *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 de la violacéine. Ainsi, lorsque nous testons l'activité antibiofilm des EPS ou des échantillons (POL-fl ou POL-FI), il est important de s'interroger sur le rôle de ce pigment dans les activités mesurées. Lors du partage (chloroforme/méthanol/eau) des EPS, la violacéine est éliminée, en grande partie au moins, dans la phase organique. Aussi, même si des traces ne sont pas à exclure dans les fractions POL-fl ou POL-FI (aq ou inter), l'activité de ces échantillons ne peut être attribuée à la violacéine puisque, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'activité des échantillons POL est significativement supérieure à celle d'un échantillon global d'EPS (contenant le pigment).



Violacéine

Figure 72. Structure chimique de la violacéine.

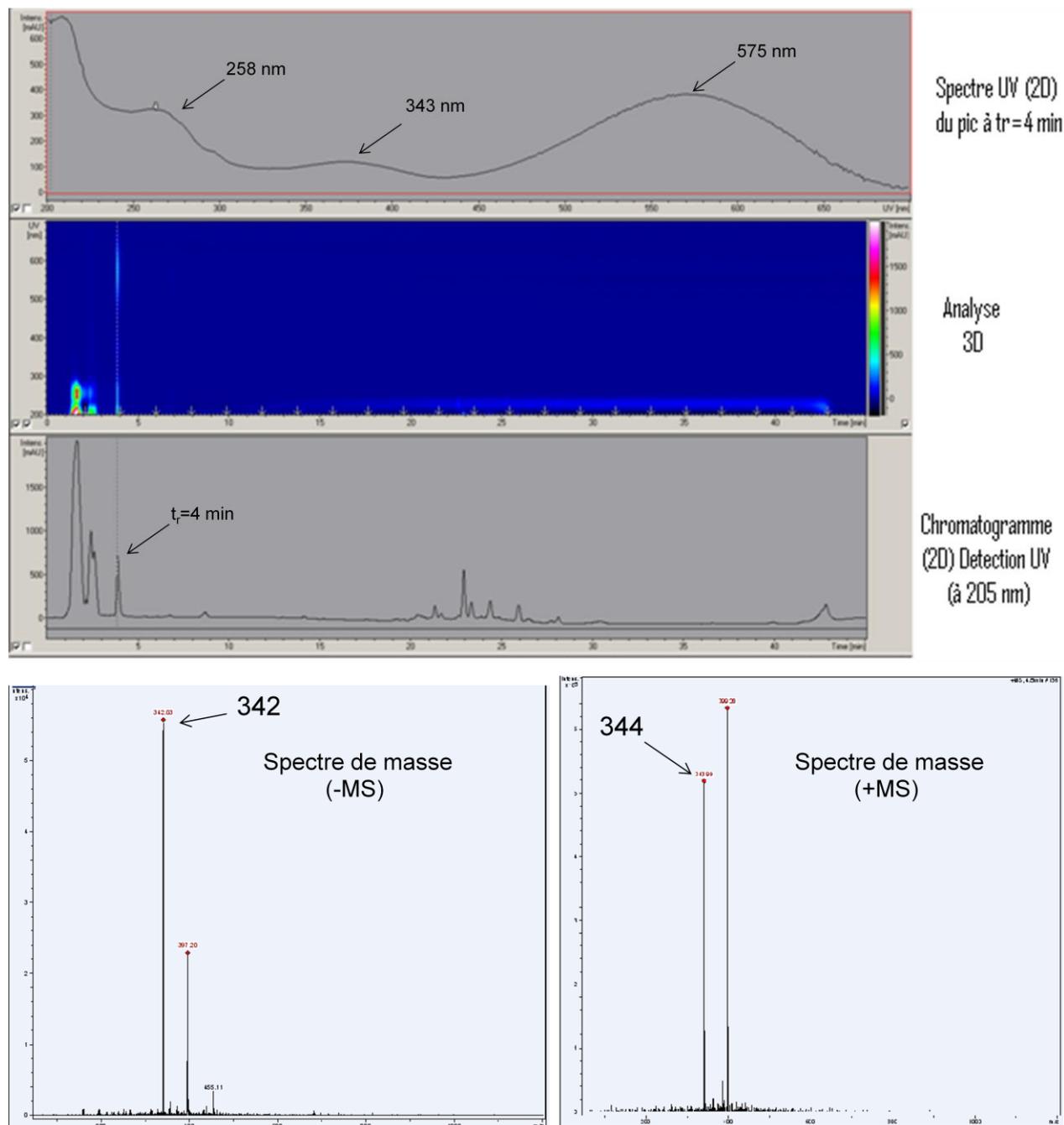


Figure 73. Analyse de la phase organique des EPS par HPLC-SM. 1^{ère} fenêtre : Spectre UV du pic à $t_r = 4$ min. L'intensité est en fonction de la longueur d'onde. 2^{ème} fenêtre : les 3 dimensions sont la longueur d'onde (en ordonnée), l'intensité (axe perpendiculaire) et le temps de rétention (en abscisse). 3^{ème} fenêtre : Chromatogramme (détection à 205 nm). L'intensité est en fonction du temps de rétention. 4^{ème} fenêtre : Spectre de masse du pic à $t_r = 4$ min (à gauche : - MS et à droite : + MS).

5.6. Analyse des EPS d'une culture planctonique de *P. ulvae* TC14

Les comparaisons entre bactéries planctoniques *versus* bactéries sessiles montrent qu'il y a des différences importantes dans l'expression des gènes, impliquant notamment ceux dont les protéines se trouvent au niveau de la surface bactérienne et impliquées dans la production des EPS (Sauer et Camper, 2001 ; Karunakaran et Biggs, 2011). Cependant,

Sutherland dans sa revue de 2001, pense que les exopolysaccharides présents dans le biofilm doivent ressembler à ceux synthétisés par les bactéries planctoniques (Sutherland, 2001a).

L'objectif principal de cette étude est la caractérisation des EPS du biofilm de *P. ulvae* TC14 présentée précédemment. Nous avons, parallèlement à cela, effectué une rapide analyse des EPS produites par *P. ulvae* TC14 en culture planctonique. Ainsi, deux cultures de 800 mL en milieu MB dans des Erlenmeyers de 250 mL (100 mL/ flacon) sous agitation (120 rpm) ont été réalisées. La croissance a été suivie (lecture de A_{600} au cours du temps à partir d'une culture spécifique) pour déterminer le moment d'arrêt de la culture, en fin de phase stationnaire (Figure 74). La mesure faite à environ 47 heures d'incubation a montré une diminution de l'absorbance à 600 nm indiquant le début de la phase de déclin. L'extraction des EPS a donc été réalisée sur des cultures de 48 heures. A ce stade, les bactéries sont entourées d'EPS, ainsi de gros flocons blancs sont visibles dans le milieu de culture. Dans le cas de cette étude en culture planctonique, seuls 3 types d'EPS ont été isolés ou extraits, les EPS-sol, les EPS-FI (action de la soude) et les EPS-TFI (action des billes de verre).

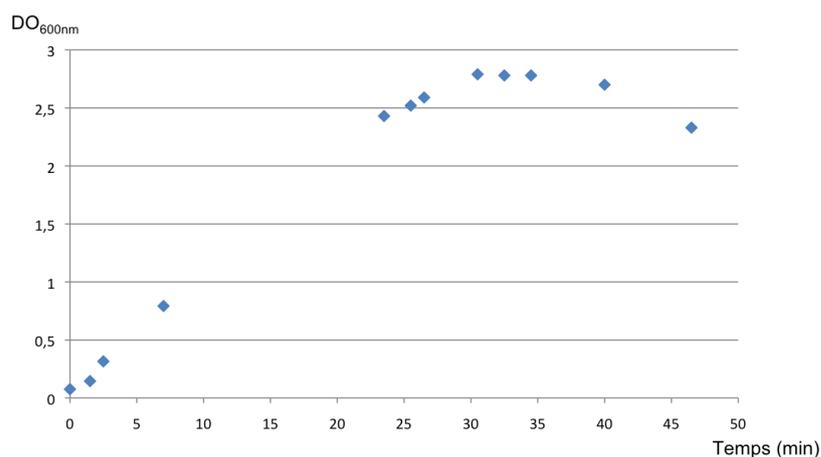


Figure 74. Suivi de l'absorbance à 600 nm au cours du temps d'une culture planctonique de *P. ulvae* TC14 en Erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de milieu.

Les quantités obtenues sont présentées dans le Tableau 31. La comparaison des résultats obtenus en culture planctonique et en biofilm n'est pas facile car, outre le mode de culture différent, les conditions de culture comme la durée d'incubation et l'agitation diffèrent également. Nous remarquons tout de même, en culture planctonique, que la quantité d'EPS solubles (dans le milieu) est inférieure à la quantité d'EPS liées et est inférieure à la quantité d'EPS solubles obtenues avec les cultures en biofilm (0,48 mg/mg de biofilm) ; on aurait pu s'attendre à une quantité supérieure.

Type d'EPS	Quantité (mg/mg de bactéries)
EPS-sol	0,35
EPS-FI	0,50
EPS-TFI	0,10

Tableau 31. Quantité d'EPS –sol/-FI/-TFI obtenus à partir d'une culture planctonique de *P. ulvae* TC14 (48 h).

Chaque type d'EPS a subi un partage chloroforme/méthanol/eau, permettant d'isoler les lipides dans la phase organique et de séparer les autres constituants selon leur répartition dans une interphase formée ou dans la phase aqueuse, (voir Figure 46 pour la méthode). Quelque soit l'échantillon (EPS-sol, -FI, -TFI), la phase organique est en faible proportion (Figure 75). La proportion des composés dans l'interphase est importante dans les EPS-sol (presque 70 % par rapport à ~ 10 % pour les EPS-sol issus des cultures en biofilm) et diminue sensiblement dans les EPS-FI et les EPS-TFI, pour être quasiment identique à la proportion des composés solubles dans la phase aqueuse dans les EPS-TFI. Dans le cas des cultures en biofilm, la masse des composés à l'interphase est plus importante au contraire pour les EPS-FI (voir Figure 47).

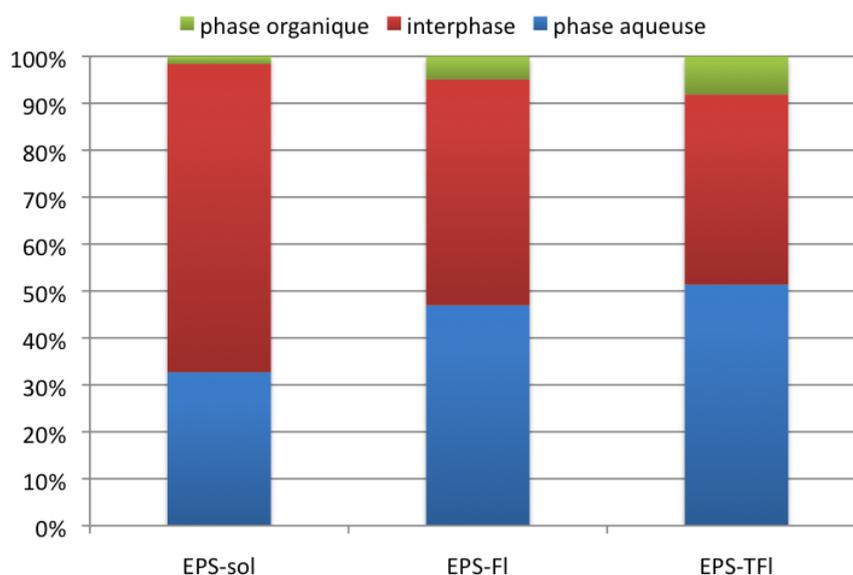


Figure 75. Pourcentages relatifs (masse/masse EPS) de la phase organique, de l'interphase et de la phase aqueuse des EPS-sol, des EPS-FI et des EPS-TFI.

L'étude de la composition en monosaccharides des EPS des cultures planctoniques par CPG-SM montre que les EPS-sol contiennent en faible quantité du glucose et du mannose (ce dernier provenant certainement du milieu de culture) (Figure 76). Si nous les comparons aux

EPS-sol issues de cultures en biofilm, nous constatons que la composition glucidique est plus simple (seulement deux types de monosaccharides) et chaque monosaccharide est en plus faible quantité. Pour les EPS-FI et les EPS-TFI, nous trouvons majoritairement, voire exclusivement du glucose (EPS-FI : ~ 8 % et EPS-TFI : ~ 20 %) comme pour les EPS extraites de cultures en biofilm mais en quantités plus faibles. Les quantités de glucides sont moins importantes que pour les cultures en biofilm. Nous remarquons en revanche dans les échantillons d'EPS-TFI des cultures planctoniques, l'absence des pics du composé non identifié visibles sur les chromatogrammes de CPG-SM des échantillons d'EPS-TFI des cultures en biofilm (voir Figures 68 et 76).

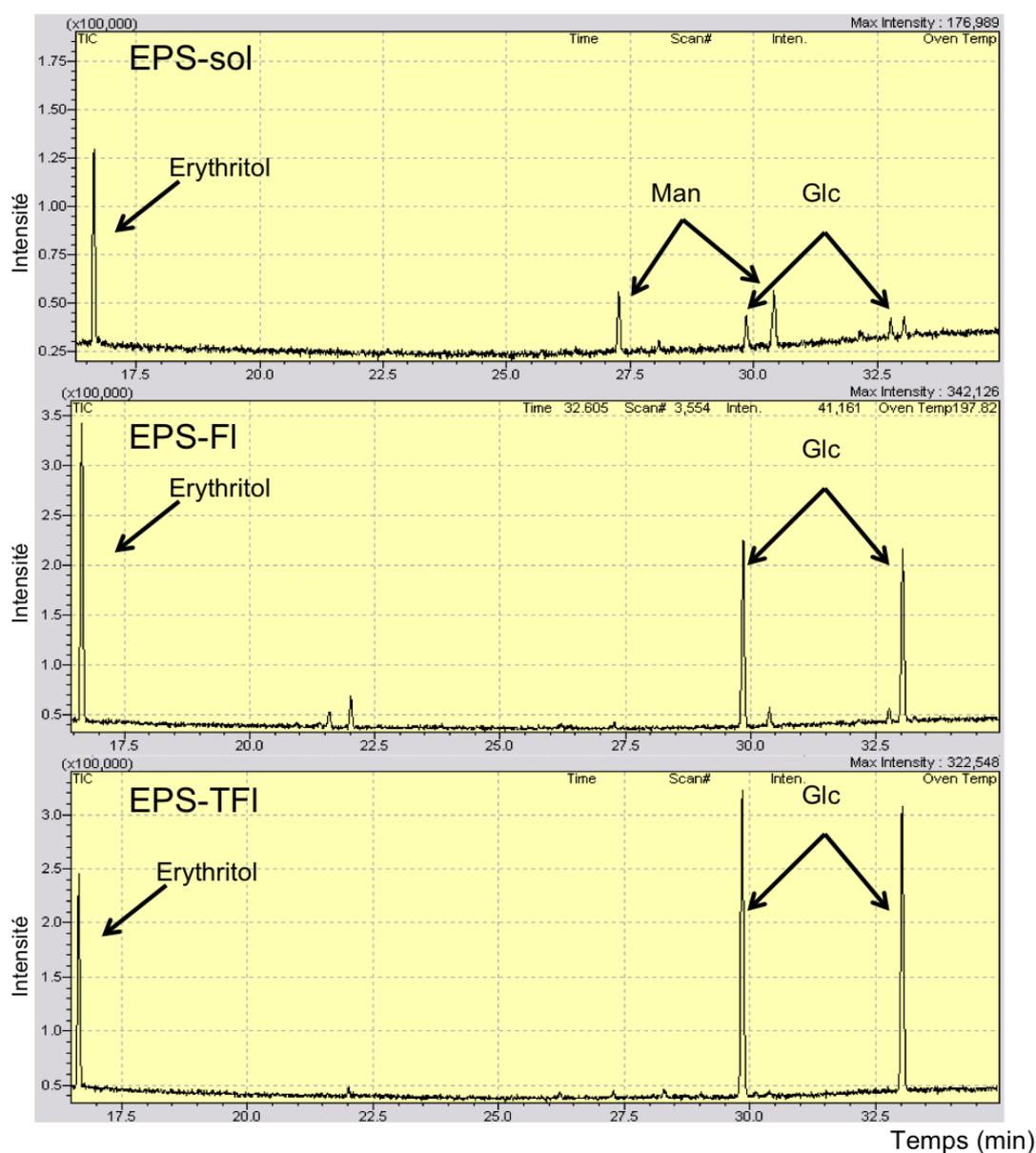


Figure 76. Chromatogrammes CPG-SM des dérivés triméthylsilylés des produits d'hydrolyse acide des EPS-sol, EPS-FI et EPS-TFI. Erythritol (témoin interne). Glc : Glucose. Les abscisses correspondent à la durée d'acquisition (en min).

Les 3 types d'EPS obtenues à partir des cultures planctoniques (EPS-sol, EPS-Fl et EPS-TFl) ont subi les mêmes étapes de partage chloroforme/méthanol/eau, précipitation à l'éthanol et déprotéinisation permettant d'enrichir les échantillons en exopolysaccharides. Une étude de la diversité en nombre et en taille des polymères des différents échantillons obtenus a permis de constater que les profils HPSEC des exopolysaccharides solubles sont certes différents, entre ceux isolés des milieux de culture planctonique (POL-sol-aq PI) et ceux isolés des milieux de culture en biofilm (POL-sol-aq Bf) mais il semble que l'on retrouve le même composé majoritaire (pour les masses moléculaires > 10 kDa) de 2-4 MDa ; celui d'environ 500 kDa peut ne pas être visible dans l'échantillon POL-sol-aq PI du fait d'une concentration trop faible (Figure 77). En effet, ce composé pourrait se retrouver dans le milieu car il apparaît, sur les profils HPSEC, comme étant majoritaire dans les échantillons de polysaccharides extraits à partir des cellules des cultures planctoniques (dans POL-Fl-aq PI et POL-Fl-inter PI), ce qui n'est pas le cas d'ailleurs pour les échantillons équivalents extraits des biofilms (Figures 77 à 79). Aussi, si l'on compare, par analyse HPSEC, les échantillons POL-Fl-aq ou -inter issus des cultures planctoniques et des cultures en biofilm, on observe des différences très importantes entre les profils. On peut remarquer également la similitude des profils POL-Fl-aq PI et POL-Fl-inter PI, comme si le partage chloroforme/méthanol/eau n'avait pas vraiment séparé ces EPS dans une phase plutôt qu'une autre.

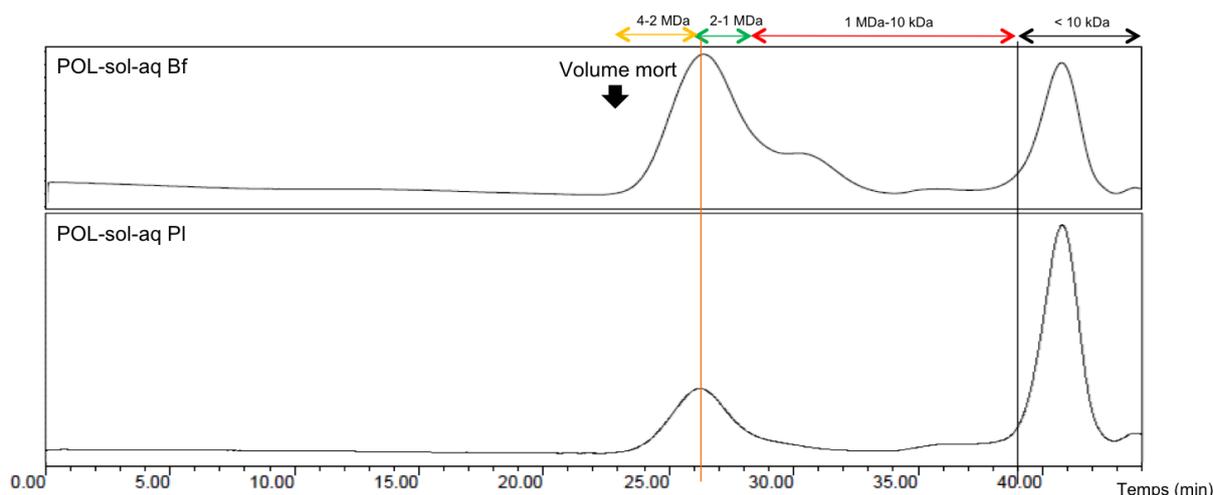


Figure 77. Profils HPSEC des échantillons POL-sol-aq issus de cultures planctoniques (PI) ou en biofilm (Bf). Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.

Ces comparaisons montrent que la nature des exopolymères (au moins dans leurs proportions) est différente entre les EPS isolées de biofilms de *P. ulvae* TC14 et les EPS liées

aux bactéries planctoniques. Il semblerait qu'un composé d'environ 500 kDa prédomine dans les EPS liées aux bactéries planctoniques. Un composé de M_w 1-2 MDa est aussi présent parmi les EPS des cultures planctoniques mais en faible proportion. Nous retrouvons donc globalement les trois mêmes tailles de polymères mises en évidence dans les EPS des bactéries cultivées en biofilm dans des proportions différentes surtout au niveau des EPS extraites.

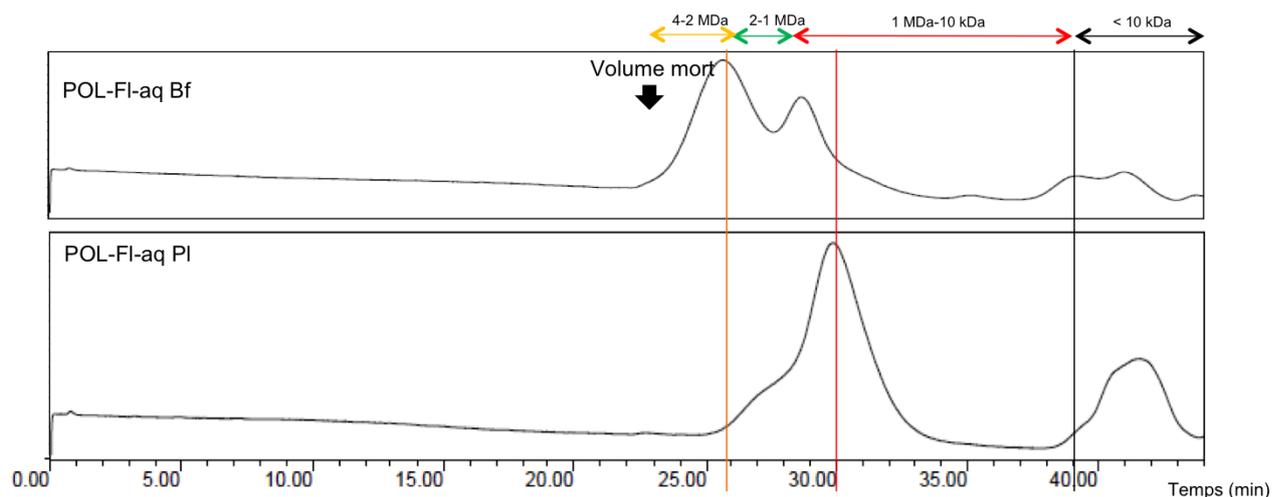


Figure 78. Profils HPSEC des échantillons POL-FI-aq issus de cultures planctoniques (PI) ou en biofilm (Bf). Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.

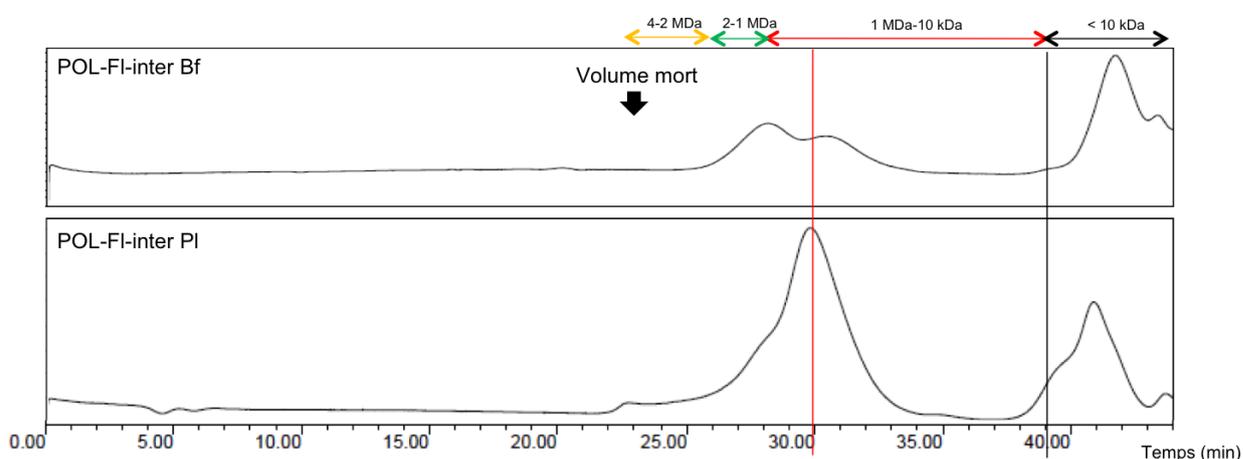


Figure 79. Profils HPSEC des échantillons POL-FI-inter issus de cultures planctoniques (PI) ou en biofilm (Bf). Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.

Les échantillons POL-FI-inter et POL-TFI-inter montrant des profils HPSEC et des spectres RMN- ^1H très similaires (non montré ici), ces 2 échantillons ont été rassemblés permettant un fractionnement en chromatographie échangeuse d'ions à partir d'une quantité plus importante (l'échantillon après addition se nomme POL-FI-inter PI). La fraction éluée à 0,8 M NaCl est la plus importante ; elle représente 27 % (en masse) des fractions récupérées ce qui est plus que les fractions 0 M, 0,1 M et 0,2 M rassemblées. Enfin la fraction 0,4 M

correspond à 25 % de la masse totale récupérée après l'analyse en chromatographie échangeuse d'ions (Figure 80).

Il est à noter que la phase aqueuse, POL-FI-aq PI, n'a pu être analysée en chromatographie échangeuse d'ions par manque de quantité suffisante.

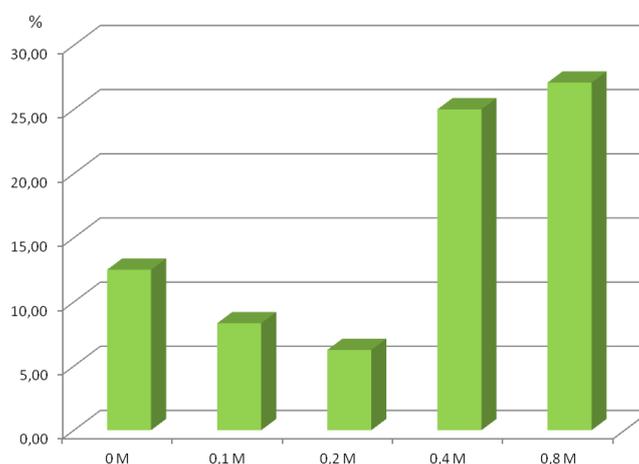


Figure 80. Pourcentages massiques obtenus pour chaque fraction après analyse en chromatographie échangeuse d'ions de l'échantillon Pol-FI-inter PI.

Chaque fraction récupérée a été ensuite analysée par HPSEC (Figure 81). Dans les fractions 0 et 0,1 M est présent au moins 1 polymère de M_w 1-2 MDa. Dans la fraction 0,2 M, nous observons seulement un faible résidu d'élution de ce composé. Ainsi, l'épaule observé dans l'échantillon d'origine POL-FI-inter PI correspond à ce polymère neutre de 1-2 MDa. Il s'agit très certainement du glucane neutre de même taille et substitué par des lactates identifié dans la fraction équivalente des EPS extraites de la culture en biofilm. Le spectre RMN- 1H vient confirmer cette hypothèse (Figure 82 en comparaison avec Figure 54). Dans la fraction POL-FI-inter PI 0,4 M, viennent s'ajouter 2 composés dont le glucane polyanionique de 2-4 MDa O-acétylé identifié également précédemment mais dans la fraction aqueuse des EPS extraites de biofilm, fraction non analysée ici à partir de la culture planctonique. Nous devinons en effet, sur le spectre RMN- 1H , la présence des signaux correspondants masqués par les signaux caractéristiques du polymère acide assimilé à un poly-glutamyl-glutamate retrouvé ici. Ce dernier, de masse moléculaire moyenne de l'ordre de 500 kDa, apparaît majoritaire dans le profil HPSEC et sur le spectre RMN- 1H de la fraction d'origine (POL-FI-inter PI) et correspond au pic unique du profil de la fraction POL-FI-inter 0,8 M. Son élution commence donc dans la fraction 0,4 M et se termine dans la fraction 0,8 M.

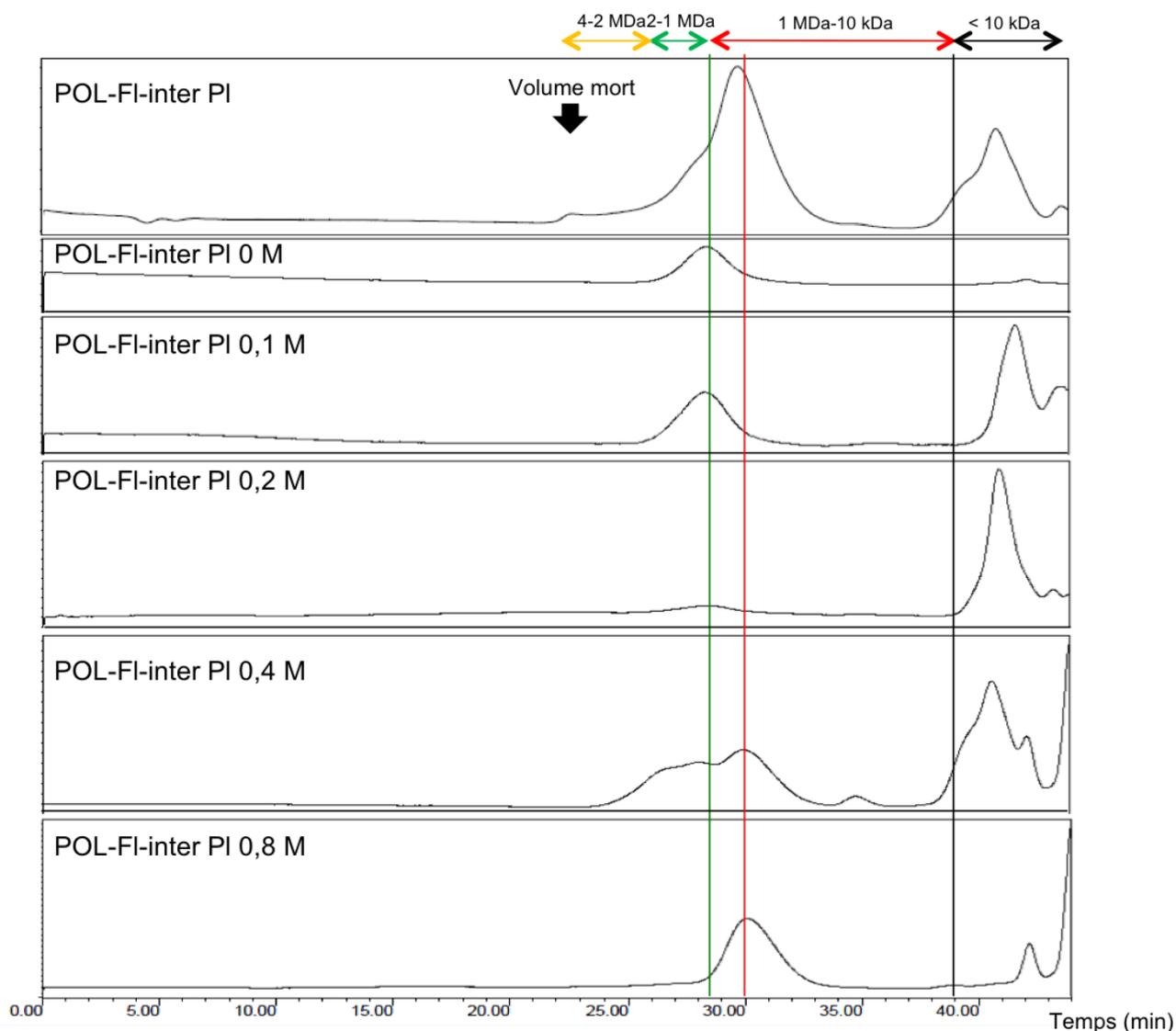


Figure 81. Profils HPSEC des fractions de chromatographie échangeuse d'anions de POL-FI-inter PI en comparaison avec le profil de l'échantillon global. Les ordonnées correspondent à l'indice de réfraction.

On peut donc en conclure que dans l'échantillon POL-FI-inter issu de la culture planctonique de *P. ulvae* TC14 sont présents majoritairement les polymères de type poly-glutamyl-glutamate d'environ 500 kDa (élus à 0, 4 M et 0,8 M NaCl en sortie de colonne de chromatographie échangeuse d'ions). Les glucanes neutres contenant des lactates (d'environ 1-2 MDa) et les glucanes acides liés à des acétates (d'environ 2-4 MDa) sont aussi présents mais restent minoritaires. Ces 3 mêmes polymères semblent être synthétisés dans les 2 modes de culture mais dans des proportions différentes.

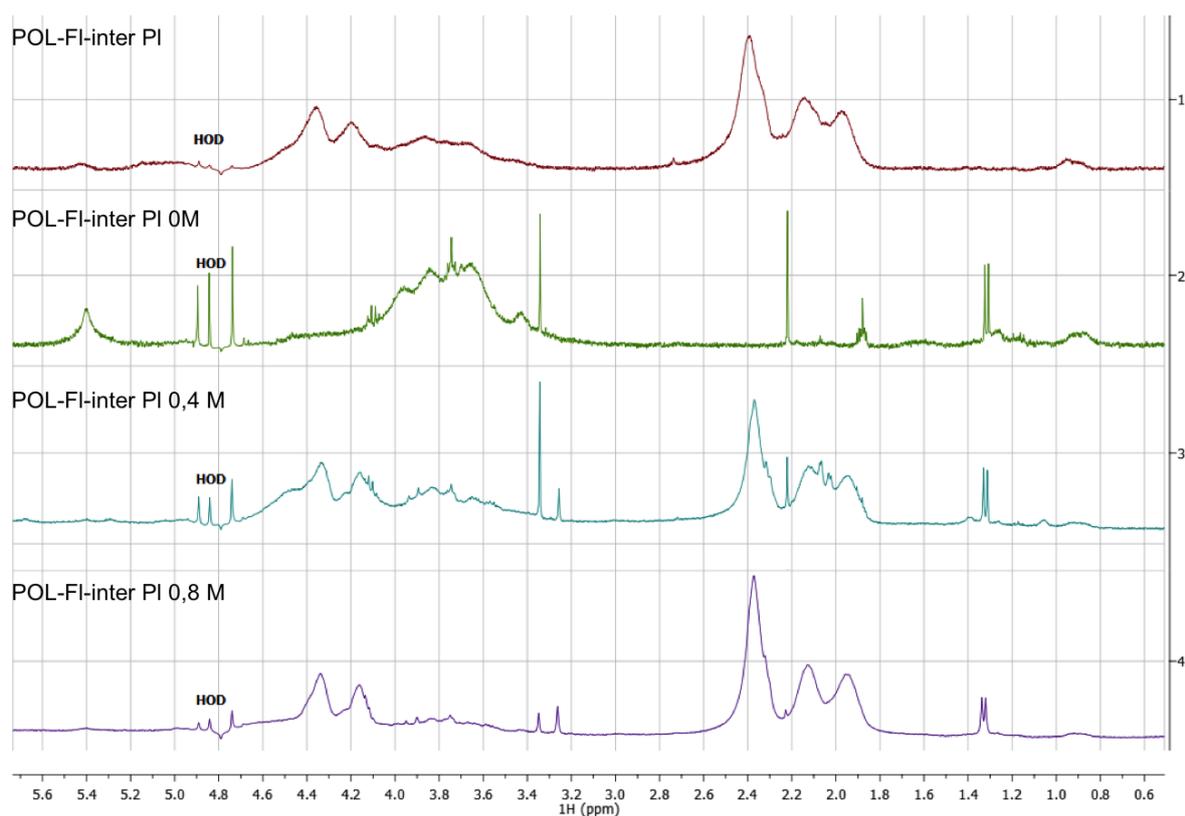


Figure 82. Spectres RMN-¹H des fractions de chromatographie échangeuse d'ions de POL-FI-inter PI en comparaison avec le profil de l'échantillon global.

5.7. Conclusion

Pseudoalteromonas ulvae TC14 forme un biofilm dense ayant la forme d'un voile surnageant dans le milieu de culture et de couleur violette, du fait de la production par les bactéries d'un pigment identifié comme étant la violacéine. Le sujet de ce dernier chapitre a été l'étude de ce biofilm en vue de caractériser les EPS, plus particulièrement les fractions exopolysaccharidiques des EPS, et d'étudier leur activité antibiofilm. Pour cela, 3 types d'EPS ont été distingués, les EPS solubles dans le milieu (EPS-sol), faiblement liées (EPS-fl) et accessibles par rinçages successifs du biofilm et les EPS fortement liées (EPS-FI) extraites par un traitement chimique doux à la soude du biofilm.

L'étude de ces EPS a permis de mettre en évidence la présence de glucides dans chacun des 3 types isolés. Le pourcentage de glucides est toujours supérieur à celui des protéines d'après les résultats des dosages colorimétriques effectués. La présence de glucides dans les échantillons (EPS-sol/-fl/-FI) est confirmée par leur analyse Infra-Rouge qui montre la présence de bandes spécifiques entre 900 et 1200 cm⁻¹ (vibrations C-O-C, C-O-H) mais surtout par l'analyse en CPG-SM des dérivés triméthylsilylés ou acétylés des produits d'hydrolyse acide ou de méthanolyse qui a permis de déterminer la composition en

monosaccharides. Les EPS-sol contiennent en faibles quantités plusieurs types de sucres dont le glucose et le mannose. Ce dernier provient certainement du milieu de culture comme a pu le montrer l'analyse CPG-SM effectuée en parallèle sur le milieu seul. Dans les EPS-fl, le pourcentage de glucides est plus important et le devient encore plus dans les EPS-Fl. Dans ce dernier échantillon, le glucose est le seul monosaccharide présent.

Un protocole d'isolement et de fractionnement des exopolysaccharides a été mis au point, permettant d'obtenir des échantillons enrichis en polysaccharides que l'on a nommés POL-sol, POL-fl et POL-Fl, après élimination des lipides et des protéines des EPS-sol, EPS-fl et EPS-Fl, respectivement. Dans ce protocole, une étape de partage chloroforme/méthanol/eau répartit des polymères dans la phase aqueuse tandis que d'autres forment une interphase. Les analyses des différents échantillons ainsi obtenus, par CPG-SM et dosage colorimétrique, prouvent que l'enrichissement en polysaccharides, plus précisément en polymères de glucose, a bien été effectué.

L'analyse des échantillons POL-sol/-fl/-Fl -aq/-inter par HPSEC a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs composés de masses moléculaires moyennes allant de 7 kDa à environ 4 MDa. Seuls les composés de masse moléculaire moyenne supérieure à 10 kDa ont été considérés dans nos analyses. Nous constatons alors la présence de polymères de masse moléculaire moyenne d'environ 500 kDa parmi les EPS solubles (POL-sol-aq) et surtout les EPS fortement liées peu solubles (POL-Fl-inter). Un polymère de 2-4 MDa est présent dans pratiquement toutes les fractions d'EPS (POL-sol, POL-fl et POL-Fl-aq) hormis la fraction POL-Fl-inter, montrant ainsi sa forte solubilité. A ces 2 tailles de polymères, s'ajoutent des composés de M_w de 1-2 MDa parmi les EPS fortement liées (POL-Fl-aq et -inter). On constate dans la littérature que l'étendue des masses moléculaires moyennes des exopolysaccharides identifiés produits par des bactéries marines est assez large. Cela va de 5,7 MDa, pour un exopolysaccharide de la souche *Pseudoalteromonas* sp. CAM025, à 40 kDa pour la souche *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 (voir Tableau 4). Les tailles des composés présents dans les échantillons d'EPS de *P. ulvae* TC14 rentrent dans cette gamme.

L'ensemble des analyses (HPSEC, RMN-¹H et CPG-SM) des fractions obtenues par chromatographie échangeuse d'ions des échantillons POL-Fl-inter et POL-Fl-aq montre que sont présents au moins 3 composés majoritaires :

- Glucanes substitués par des lactates, peu solubles, neutres et d'environ 1-2 MDa.
- Glucanes substitués par des acétates, solubles, anioniques, d'environ 2-4 MDa et donnant des solutions visqueuses. Ces polysaccharides pourraient être sulfatés.

- Poly-glutamyl-glutamates, peu solubles, anioniques d'environ 500 kDa.

Afin d'obtenir une quantité plus importante de chacun de ces polymères, avec pour perspective leur purification et analyse structurale, et plus largement afin d'examiner plus précisément la composition de la matrice des biofilms de *P. ulvae* TC14, il nous est apparu intéressant de poursuivre l'extraction des EPS par un traitement physique cette fois du biofilm résiduel. Ce dernier a en effet une masse encore conséquente après l'extraction chimique des EPS dites EPS-FI avec de la soude et une observation au microscope nous a permis de visualiser autour des bactéries une quantité non négligeable de matrice encore présente. Pour cela, une étape supplémentaire a été ajoutée au protocole d'extraction des EPS permettant d'extraire des EPS-TFI, très fortement liées. Ces dernières sont très riches en glucose et contiennent principalement un polymère de 1-2 MDa dont nous pouvons supposer que c'est le même polymère que celui présent dans les exopolysaccharides fortement liées (POL-FI), c'est-à-dire un glucane neutre substitué par des lactates.

Parallèlement à la caractérisation des différents échantillons d'EPS isolées, l'activité antibiofilm de ces échantillons a été testée en utilisant le *BioFilm Ring Test*[®] (BFRT[®]). Il en ressort que les EPS totaux n'ont globalement pas d'effet sur la formation de biofilm de 5 souches marines *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7, *Shewanella* sp. TC9, *Alteromonas genovensis* TC12 et *Pseudoalteromonas* sp. TC15. Par contre, les échantillons POL-FI-aq et -inter sont actifs sur la majorité des souches (la souche *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC7 étant la moins sensible). Si l'on compare les résultats obtenus entre les EPS totaux et les fractions polysaccharidiques correspondantes, nous constatons que l'enrichissement en polysaccharides a permis d'augmenter l'activité antibiofilm des échantillons. Nous pouvons donc supposer que ce sont les polysaccharides qui, dans ces fractions (non purifiées) ont une action antibiofilm. Les résultats d'analyses par HPSEC, CPG-SM et RMN-¹H montrent que le composé majoritaire dans l'échantillon actif POL-FI-aq est un glucane anionique d'environ 2-4 MDa acétylé et le composé majoritaire dans l'échantillon POL-FI-inter est un glucane neutre d'environ 1-2 MDa substitué par des lactates. Toutefois, il est important de noter que ces fractions actives, POL-FI-aq et POL-FI-inter, correspondent à un mélange d'exopolymères respectivement solubles ou peu solubles, fortement liés dans la matrice du biofilm de *P. ulvae* TC14. Aussi, afin de confirmer le rôle joué dans cette activité par les exopolysaccharides spécifiquement, il serait nécessaire de les purifier avant de tester à nouveau leur activité.

Plusieurs études de caractérisation de polysaccharides isolés de bactéries du genre *Pseudoalteromonas* ont été menées (Wrangstadh *et al.*, 1986 ; Szewzyk *et al.*, 1991 ; Rougeaux *et al.*, 1996 ; Bozal *et al.*, 1997 ; Rougeaux *et al.*, 1999a ; Mancuso Nichols *et al.*, 2004 ; Nichols *et al.*, 2005a ; Bowman, 2007 ; Qin *et al.*, 2007 ; Saravanan et Jayachandran, 2008 ; Saravanan *et al.*, 2008 ; Poli *et al.*, 2010 ; Al-Nahas *et al.*, 2011 ; Hassler *et al.*, 2011 ; Matsuyama *et al.*, 2013). Seules les souches *Pseudoalteromonas* sp. AM (isolées de la mer Rouge) et SM9913 (isolées d'une source hydrothermale de fonds océaniques) ont été identifiées comme souches productrices d'homopolymères de glucose ou d'exopolysaccharides contenant majoritairement du glucose (Qin *et al.*, 2007 ; Al-Nahas *et al.*, 2011). Cette étude permet de mettre en évidence une activité antibiofilm de substances polymériques extracellulaires riches en glucanes isolées de biofilms d'une souche de *P. ulvae* TC14.

Cette activité pouvant être le résultat de la production d'un (ou de) composé(s) spécifique(s) lors de la croissance de la souche en biofilm, nous avons analysé les EPS issues de cultures planctoniques de cette même souche en parallèle de l'étude des EPS du biofilm de *P. ulvae* TC14. Les résultats des analyses par CPG-SM montrent que les exopolysaccharides fortement liés aux cellules planctoniques (POL-F1 et POL-TF1) contiennent eux aussi uniquement du glucose. Leurs profils HPSEC sont quasiment identiques à ceux obtenus pour les échantillons équivalents issus des cultures en biofilm en termes de tailles des polymères. En revanche, les proportions de ces derniers sont très différentes. Dans l'échantillon d'EPS issues d'une culture planctonique, le poly-glutamyl-glutamate est bien plus présent que dans les échantillons issus de biofilms. Si ce composé devait ne pas avoir d'activité antibiofilm, cela permettrait de mieux comprendre le rôle des glucanes produits en plus grande quantité par les bactéries sessiles.

Conclusions & perspectives

Cette étude se décompose en 3 grandes parties. La première concerne l'identification et la caractérisation de souches bactériennes isolées de la mer Méditerranée, la deuxième porte sur l'étude des biofilms produits par 6 de ces souches en vue de sélectionner une souche produisant une matrice exopolymérique abondante riche en polysaccharides, et enfin la troisième et dernière partie est focalisée sur la caractérisation des EPS, plus particulièrement de nature polysaccharidique, de la souche choisie *Pseudoalteromonas ulvae* TC14, et l'étude de leur activité antibiofilm.

La première partie, l'identification et la caractérisation de souches bactériennes isolées de la Méditerranée, a fait l'objet d'une publication. Sept genres différents ont été identifiés parmi les 13 souches étudiées, dont 2 genres isolés à plusieurs reprises ; *Pseudoalteromonas* et *Shewanella*. Deux souches TC7 et TC4 font partie d'une nouvelle espèce *Persicivirga (nonlabens) mediterranea* qui a été isolée pour la première fois dans la Méditerranée.

La caractérisation de ces souches bactériennes s'est faite via plusieurs tests ; test d'adhésion au cristal violet, test de formation du biofilm (BFRT[®]), potentiel ζ , test MATS, mobilité et caractérisations physiologique et biochimique (galeries API). Les souches TC8, TC10, TC11, TC13, TC14 et TC15 sont capables de se déplacer par *swimming* alors qu'elles font quasiment pas de *swarming* ou de *twitching*. Le test d'adhésion a montré que seules les souches *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC11 et *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 sont capables d'adhérer à une surface en polystyrène alors que la plupart d'entre elles sont capables de former un biofilm conséquent après 72 h d'incubation sur le même support. Le *BioFilm Ring Test*[®] (BFRT[®]) nous a en effet montré que la grande majorité des souches est capable de produire un biofilm, excepté les souches TC4, TC5 et TC7 qui ne forment pas ou peu de biofilm. Enfin, le test MATS a montré que la souche TC5 a un caractère plus hydrophobe que les autres souches bactériennes. Si l'on recoupe certains de ces résultats, nous constatons que les souches TC4, TC5 et TC7, appartenant toutes trois au phylum des *Bacteroidetes*, l'ordre des *Flavobacteriales*, et à la famille des *Flavobacteriaceae*, sont les souches non flagellées, donc ayant les plus faibles capacités à se mouvoir sur milieu gélosé, à adhérer et à former un biofilm sur polystyrène. Tandis que les souches TC8, TC11 et TC14 appartenant au phylum des *proteobacteria*, et à la classe des *γ -Proteobacteria*, ordre des *Alteromonadales* la famille des *Pseudoalteromonadaceae* et *Shewanellaceae* qui sont les seules à adhérer efficacement à une surface en polystyrène, sont par ailleurs capables de former un biofilm. Cependant, si l'on compare l'ensemble de ces résultats obtenus pour les souches TC9, TC10, TC12, TC13 et TC15, le lien entre mobilité, adhésion et biofilm ne paraît

pas être évident car ces souches ont des Δ BFI élevés mais elles n'adhèrent pas ou peu à une surface en polystyrène, ces mécanismes (mobilité, adhésion, biofilm) pouvant être indépendant les uns des autres pour de multiples raisons.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, des conditions de culture en biofilm choisies ont été appliquées à chaque souche de notre étude. Il s'agit de cultiver les bactéries en milieu MB liquide dans des boîtes de Petri, en condition statique, pendant 72 h à 20°C avec, à 48 h, un ajout de milieu neuf. Deux protocoles d'isolement des EPS ont été élaborés du fait de l'absence de protocole standard et en lien avec les nombreuses données de la littérature visant à comparer l'efficacité de traitements physiques ou chimiques des biofilms en vue d'en extraire des EPS. Le premier protocole testé est basé sur l'action destructurante d'une résine échangeuse de cations et le deuxième, sur l'action déstabilisante d'une solution de NaOH à 0,1 M, c'est-à-dire peu concentrée par rapport à la plupart des travaux publiés avec cet agent (Pellicer-Nàcher *et al.*, 2013). Ce protocole utilisant la soude, testé en comparaison avec l'action physique de la résine sur les biofilms de 3 souches bactériennes, est apparu être le plus approprié pour cette étude consistant à extraire avec un meilleur rendement possible des exopolymères, en particulier de nature polysaccharidique. Le traitement des biofilms à la soude à faible concentration nous a, en effet, permis de récupérer, sans lyse cellulaire manifeste, dans un cas 10 fois plus d'EPS qu'avec le traitement avec la résine échangeuse de cations, dans un autre, 4 fois plus à peu près. D'autre part, le protocole mis au point utilisant la soude est moins long et moins fastidieux. Il a donc été retenu pour le reste de l'étude, c'est-à-dire pour la caractérisation des EPS de 6 souches bactériennes retenues pour leur capacité à former un biofilm conséquent (selon le BFRT[®]). Il s'agit des souches *Polaribacter* sp. TC5, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC9, *Alteromonas genovensis* TC12, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 et *Pseudoalteromonas* sp. TC15.

Pour chacune de ces 6 souches cultivées en biofilm, 3 types d'EPS ont été isolés selon leurs interactions plus ou moins fortes avec le biofilm formé ou au sein de la matrice entourant les bactéries. Ainsi, les EPS solubles (EPS-sol) libérées dans le milieu de culture, les EPS faiblement liées au biofilm (EPS-fl) et donc facilement détachables grâce à des rinçages successifs du biofilm et les EPS fortement liées au biofilm (EPS-FI) extraites par un traitement spécifique, dans notre cas chimique, ont été isolées. Pour chacune des 6 souches, ces 3 types d'EPS ont été analysés avec un objectif de comparaison des souches selon plusieurs critères qui sont, en plus de la capacité à former un biofilm (critère de pré-sélection),

la quantité d'EPS produites, la composition générale des EPS (sucres totaux, acides uroniques, protéines, lipides et acides nucléiques) et la composition en monosaccharides (type et diversité des monosaccharides).

Globalement dans les EPS isolées des 6 souches, les sucres sont majoritaires, bien que les quantités dosées soient certainement sous-estimées. La même remarque de quantité sous-estimée peut être faite dans le cas des protéines, dont le pourcentage dans les EPS a également été évalué par dosage colorimétrique. Ces résultats de caractérisation, même partielle, dans la composition globale des EPS isolées ont cependant répondu à notre volonté qui était de comparer les EPS produites par les différentes souches pré-sélectionnées pour retenir celle qui produirait le plus de matrice exopolymérique riche en polysaccharides et si possible de composition simple. La quantité produite et la simplicité de structure peuvent être en effet deux atouts favorables à la recherche d'un polymère actif en *antifouling*, qui était l'objectif final de ce travail de recherche, outre son intérêt fondamental. Une souche a répondu à tous nos critères de sélection, la souche *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 qui, dans nos conditions de culture, se distingue en formant un biofilm conséquent visible à l'œil nu sous forme de voile violet surnageant dans le milieu, riche en exopolysaccharides composés de glucose. La dernière partie de notre étude a donc consisté à mieux caractériser les EPS de cette souche et à évaluer leur potentiel *antifouling*, en commençant par l'activité antibiofilm des échantillons enrichis en polysaccharides.

La troisième partie de cette étude se focalise donc sur la caractérisation des EPS, et plus particulièrement sur les fractions glucidiques de ces EPS isolées ou extraites du biofilm de la souche *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. Pour les 3 types d'EPS étudiés (EPS-sol/-fl/-Fl), les glucides sont toujours majoritaires par rapport aux protéines, au vu des résultats obtenus par dosages colorimétriques de ces composés. L'analyse en CPG-SM des dérivés triméthylsilylés (ou acétylés) des produits d'hydrolyse acide (ou de méthanolyse) des EPS a permis de déterminer que les EPS-sol contiennent en faible quantité du glucose et du mannose, ce dernier pouvant provenir du milieu de culture. La quantité de glucose est plus importante dans les EPS-fl et le devient encore plus dans les EPS-Fl où il est le seul monosaccharide présent identifié. Nous sommes donc en présence d'homopolysaccharides de type glucanes.

Afin d'enrichir les échantillons d'EPS en exopolysaccharides, un protocole d'isolement de ces polymères, en particulier, a été mis au point visant à éliminer les lipides et les protéines en présence. Ainsi, à partir des 3 échantillons EPS-sol/-fl/-Fl, 3 fractions

polysaccharidiques ont été obtenues nommées POL-sol/-fl/-Fl respectivement. Ce protocole est basé sur une étape de partage chloroforme/méthanol/eau qui isole les lipides dans la phase organique et sépare les autres constituants selon leur solubilité relative dans la phase aqueuse, sinon, dans une interphase formée, comme son nom l'indique, entre la phase organique et la phase aqueuse. Les étapes suivantes de précipitation à l'alcool et de digestion enzymatique des protéines clôturent le protocole d'isolement des exopolysaccharides. Les échantillons ainsi obtenus (POL-sol/-fl/Fl -aq/-inter) ont alors fait l'objet d'un fractionnement par chromatographie échangeuse d'ions permettant une séparation des constituants selon leur charge et ainsi une première étape de purification. Les analyses des différents échantillons d'EPS enrichis en polysaccharides (POL-sol/-fl/-Fl -aq/-inter) par dosage colorimétrique (dosage des sucres uniquement à ce stade) et CPG-SM prouvent que l'enrichissement glucidique a bien été effectué (par exemple, ~ 44 % de glucose dans POL-Fl-inter contre 12 % de glucose dans EPS-Fl, échantillon d'origine). L'analyse de ces mêmes échantillons (POL-sol/-fl/-Fl -aq/-inter) fractionnés par chromatographie échangeuse d'ions (POL-sol/-fl/-Fl -aq/-inter 0 M à 0,8 M, selon la force ionique d'éluion) par HPSEC, RMN et CPG-SM a permis de mettre en évidence la présence d'au moins 3 composés majoritaires :

- Glucanes substitués par des lactates, peu solubles, neutres et d'environ 1-2 MDa,
- Glucanes substitués par des acétates, solubles, anioniques, d'environ 2-4 MDa,
- Poly-glutamyl-glutamates (PGG), peu solubles, anioniques, d'environ 500 kDa.

Ces derniers n'ont pas été dégradés sous l'action protéolytique de la protéinase K (qui coupe préférentiellement la liaison peptidique après des acides aminés hydrophobes) utilisée dans le protocole d'enrichissement des EPS en polysaccharides.

Une analyse par microscopie AFM des polymères de glucose présents majoritairement dans les fractions POL-Fl-inter 0 M et POL-Fl-aq 0,4 M montre bien la présence de macromolécules ayant un aspect filamenteux. Les longs filaments sont incurvés (donc souples) et s'associent entre eux.

Les échantillons d'EPS totaux et des échantillons enrichis en exopolysaccharides solubles ou peu solubles ont été testés pour déterminer leur activité antibiofilm sur 5 souches de bactéries marines, au moyen du BFRT[®]. Sont considérés actifs, ceux qui inhibent d'au moins 50 % la formation du biofilm, évaluée en termes de mobilité de microbilles magnétiques ajoutées à la culture. Les EPS totaux isolés (EPS-sol) ou extraits (EPS-fl/-Fl) des cultures en biofilm de *P. ulvae* TC14 n'ont globalement pas d'effet sur les 5 souches testées (*Persicivirga mediterranea* TC7, *P. lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC9, *Alteromonas*

genovensis TC12 et *Pseudoalteromonas* sp. TC15), tandis que les échantillons d'EPS fortement liées enrichis en polysaccharides (POL-Fl-aq et -inter) ont une activité antibiofilm significative sur la majorité de ces souches (3 ou 4 selon les échantillons). On peut supposer que ce sont les exopolysaccharides qui ont une activité antibiofilm et plus particulièrement le glucane neutre d'environ 1-2 MDa, si l'on compare la composition globale des fractions actives et peu actives (POL-fl-aq, inhibant le biofilm d'une souche seulement). Cette hypothèse devra être validée par un test d'activité de ce glucane dans l'échantillon POL-Fl-inter 0 M puis après purification.

Ces résultats concordent avec des publications parues sur l'espèce *P. ulvae*. Skovhus *et al.* reconnaissent l'intérêt des bactéries du genre *Pseudoalteromonas*, largement distribuées dans l'environnement marin, notamment pour leur capacité à produire des composés biologiquement actifs (Skovhus *et al.*, 2007). Ils proposent même d'inclure *P. ulvae* dans le sous-groupe *antifouling*, comprenant également *P. tunicata*. Plus récemment, Bernbom *et al.* montrent que l'espèce *P. ulvae* est capable d'empêcher, sans effet biocide, l'adhésion d'autres espèces du genre *Pseudoalteromonas* sur des surfaces d'acier inoxydable (Bernbom *et al.*, 2013). D'autres travaux ont montré que des souches du genre *Pseudoalteromonas* sont capables de produire des exopolysaccharides contenant majoritairement du glucose et étant actifs (Qin *et al.*, 2007 ; Al-Nahas *et al.*, 2011). Tous ces résultats encouragent à émettre l'hypothèse, au vu des résultats de cette étude, de la production par *P. ulvae* d'un exopolysaccharide actif en antibiofilm de type glucane.

Ce travail a permis de révéler le potentiel antibiofilm des fractions d'EPS enrichies en exopolysaccharides synthétisés par la souche *P. ulvae* TC14. Par la suite, il serait intéressant de tester l'activité antibiofilm spécifique de chacun des 3 polymères identifiés, glucane neutre, glucane anionique et poly-glutamyl-glutamate, en commençant par l'activité des fractions POL-Fl-inter 0M, POL-Fl-aq 0,4 M et POL-Fl-inter 0,8 M où ils sont majoritaires, respectivement. De plus, il serait intéressant d'étendre le test antibiofilm à d'autres souches, cette fois-ci, pathogènes (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* par exemple). L'étude des EPS issues de cultures planctoniques de *P. ulvae* TC14 ayant montré que les polymères de glutamyl-glutamate sont, dans ce mode de culture, bien plus présents que dans les échantillons d'EPS issus de culture en biofilm, le test d'activité antibiofilm de ces poly(acides aminés) pourrait permettre, si le PGG s'avérait inactif, de formuler des hypothèses sur cette modification de synthèse des EPS (en mode planctonique *versus* biofilm), dans la proportion des composés majeurs. Une étude intéressante consisterait alors à évaluer l'influence d'une

autre souche, choisie parmi les souches sensibles (réalisation de co-cultures), sur la synthèse particulière des composés dont l'activité antibiofilm sera reconnue.

Parallèlement à ces travaux de recherche d'activité, il est indispensable de purifier les exopolysaccharides produits par la souche TC14 afin de déterminer leur structure. Il s'agira alors de confirmer la liaison ester des groupements lactyles sur le glucane neutre et déterminer leur position et proportion dans le polysaccharide, en plus de trouver les modes de liaison des résidus glucose. Concernant le glucane anionique O-acétylé, les mêmes questions de structure se poseront avec, en plus, la nécessité de définir l'origine de la charge de ce polymère qui pourrait être due à la présence de sulfates. Cette hypothèse reposant uniquement sur son acidité, son analyse spectrale en IR et sa capacité à augmenter la viscosité d'une solution aqueuse, pourra être confirmée par une analyse élémentaire avant d'initier des travaux de détermination structurale.

Enfin, afin de conduire ces différents travaux en disposant d'une quantité suffisante de matériel, certes la multiplication des boîtes de Petri dans lesquelles les cultures sont effectuées sera envisagée mais il est également possible d'améliorer le protocole d'isolement des EPS. En effet, après action de la soude sur les biofilms, nous avons pu constater que la masse de biofilm résiduel était non négligeable et représentait donc une réserve importante de substances exopolymériques. Un traitement physique doux avec des billes de verre a été testé et les quantités d'EPS (EPS-TFI, très fortement liées) récupérées étant très faibles, il paraît clair que l'utilisation des billes (dans nos conditions de diamètre de billes, temps d'agitation) ne suffit pas pour détacher la matrice résiduelle entourant encore les bactéries à l'issue du traitement chimique. Une seconde extraction à la soude à la même concentration (0,1 M) que la première ou l'utilisation d'une solution plus concentrée dès le début (certains vont jusqu'à extraire des EPS avec une solution de soude 10 fois plus concentrée ; par exemple, voir (Pellicer-Nàcher *et al.*, 2013)) seraient peut-être plus efficace pour détacher cette matrice résiduelle.

Références bibliographiques

Agrawal P (1992) NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31:3307-3330.

Aguilera A, Souza-Egipsy V, San Martín-Úriz P et Amils R (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:1079-1088.

Ahmed Z, Wang Y, Anjum N, Ahmad A et Khan S (2013) Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir – Part II. *Food Hydrocolloids* 30:343-350.

Aires C, Tenuta L, Carbonero E, Sasaki G, Iacomini M et Cury J (2011) Structural characterization of exopolysaccharides from biofilm of a cariogenic streptococci. *Carbohydrate Polymers* 84:1215-1220.

Al-Nahas M O, Darwish M M, Ali a E et Amin M A (2011) Characterization of an exopolysaccharide-producing marine bacterium, isolate *Pseudoalteromonas* sp. AM. *African Journal of Microbiology Research* 5:3823-3831.

Allison D et Sutherland I (1987) The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of General Microbiology* 133:1319-1327.

Almeida L et Araujo R (2013) Highlights on molecular identification of closely related species. *Infection, Genetics and Evolution* 13:67-75.

Amaro A, Chamorro D, Seeger M, Arredondo R, Peirano I et Jerez C (1991) Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology* 173:910-915.

Anderson B, Ding A, Nilsson L, Kusuma K, Tchesnokova V, Vogel V, Sokurenko E et Thomas W (2007) Weak rolling adhesion enhances bacterial surface colonization. *Journal of Bacteriology* 189:1794-1802.

Andersson S, Dalhammar G, Land C et Kuttuva Rajarao G (2009) Characterization of extracellular polymeric substances from denitrifying organism *Comamonas denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82:535-543.

Andersson S, Dalhammar G et Kuttuva Rajarao G (2011) Influence of microbial interactions and EPS/polysaccharide composition on nutrient removal activity in biofilms formed by strains found in wastewater treatment systems. *Microbiological Research* 166:449-457.

Anton J, Meseguer I et Rodriguez-Valera F (1988) Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology* 54:2381-2386.

Arena A, Maugeri T L, Pavone B, Iannello D, Gugliandolo C et Bisignano G (2006) Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International Immunopharmacology* 6:8-13.

Arena A, Gugliandolo C, Stassi G, Pavone B, Iannello D, Bisignano G et Maugeri T L (2009) An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology Letters* 123:132-137.

Azeredo J, Henriques M, Sillankorva S et Oliveira R (2003) Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Science Technology* 47:175-9.

Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg E P et Høiby N (2004) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:1175-1187.

Barbeyron T, Lerat Y, Sassi J-F, Le Panse S, Helbert W, Collén P N, Lerat Y, Sassi J-F, Le Panse S, Helbert W et Collén P N (2011) *Persicivirga ulvanivorans* sp. nov., a marine member of the family *Flavobacteriaceae* that degrades ulvan from green algae *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:1899-1905.

Becking J (1981) *The Prokaryotes*. ed.; Springer, Vol. 1, p 809.

Bellon-Fontaine M N, Rault J et Van Oss C J (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7:47-53.

Bellou N, Papathanassiou E, Dobretsov S, Lykousis V et Colijn F (2012) The effect of substratum type, orientation and depth on the development of bacterial deep-sea biofilm communities grown on artificial substrata deployed in the Eastern Mediterranean. *Biofouling* 28:199-213.

Bermont-Bouis D, Janvier M, Grimont P, Dupont I et Vallaëys T (2007) Both sulfate-reducing bacteria and *Enterobacteriaceae* take part in marine biocorrosion of carbon steel. *Journal of Applied Microbiology* 102:161-168.

Bernadsky G et Rosenberg E (1992) Drag-reducing properties of bacteria from the skin mucus of the cornetfish (*Fistularia commersonii*). *Microbial Ecology* 24:63-76.

Bernbom N, Ng Y, Kjelleberg S, Harder T et Gram L (2011) Marine bacteria from danish coastal waters show antifouling activity against the marine fouling bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S91 and zoospores of the green alga *Ulva australis* independent of bacteriocidal activity. *Applied and Environmental Microbiology* 77:8557-8567.

Bernbom N, Ng Y, Olsen S et Gram L (2013) *Pseudoalteromonas* spp. serve as initial bacterial attractants in mesocosms of coastal waters but have subsequent antifouling capacity in mesocosms and when embedded in paint. *Applied and Environmental Microbiology* 79:6885-6893.

Bitter T et Muir H (1962) A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry* 4:330-334.

Bligh E et Dyer W (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.

- Blumenkrantz N et Asboe-Hansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54:484-489.
- Boles B, Thoendel M et Singh P (2005) Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology* 57:1210-1223.
- Bos R, Van Der Mei H et Busscher H (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* 23:179-230.
- Boudaud N, Coton M, Coton E, Pineau S, Travert J et Amiel C (2009) Biodiversity analysis by polyphasic study of marine bacteria associated with biocorrosion phenomena. *Journal of Applied Microbiology* 109:166-179.
- Bowman J (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs* 5:220-241.
- Boyle C et Reade A (1983) Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 46:392-399.
- Bozal N, Manresa A, Castellvi J et Guinea J (1994) A new bacterial strain of Antarctica, *Alteromonas* sp. that produces a heteropolymer slime. *Polar Biology* 14:561-567.
- Bozal N, Tudela E, Rossello-Mora R, Lalucat J et Guinea J (1997) *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an Antarctic coastal environment. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47:345-351.
- Bozal N, Montes M J, Tudela E, Jiménez F et Guinea J (2002) *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:195-205.
- Bozzi L, Milas M et Rinaudo M (1996) Characterization and solution properties of a new exopolysaccharide excreted by the bacterium *Alteromonas* sp. strain 1644. *International Journal of Biological Macromolecules* 18:9-17.
- Branda S, Vik A, Friedman L et Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13:20-26.
- Branda S, Chu F, Kearns D, Losick R et Kolter R (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology* 59:1229-1238.
- Brian-Jaisson F, Ortalo-Magné A, Guentas-Dombrowsky L, Armougom F, Blache Y et Molmeret M (2014) Identification of Bacterial Strains Isolated from the Mediterranean Sea Exhibiting Different Abilities of Biofilm Formation. *Microbial Ecology* 1-17.
- Briandet R, Meylheuc T, Maher C et Bellon-Fontaine M N (1999) *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5328-5333.

Brown M et Lester J (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Applied and Environmental Microbiology* 40:179-185.

Brown M J et Lester J N (1982) Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge-I. Effects of metal concentration. *Water Research* 16:1539-1548.

Bunt C R, Jones D S et Tucker I G (1995) The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* evaluated by the BATH and HIC methods. *International Journal of Pharmaceutics* 113:257-261.

Busscher H J, Geertsema-Doornbusch G I et Van Der Mei H C (1997) Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: Influence of salivary conditioning films. *Journal of Biomedical Materials Research* 34:201-209.

Caiazza N C, Merritt J H, Brothers K M et O'toole G A (2007) Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 189:3603-3612.

Cambon-Bonavita M A, Raguénès G, Jean J, Vincent P et Guezennec J (2002) A novel polymer produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Journal of Applied Microbiology* 93:310-315.

Camps M (2011) Bio-essais anti-adhésion sur des bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements abtifouling. Université de Toulon, Toulon.

Caudan C, Filali A, Lefebvre D, Spérandio M et Girbal-Neuhauser E (2012) Extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic granular sludges: extraction, fractionation, and anionic properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166:1685-1702.

Chalkiadakis E, Dufourcq R, Schmitt S, Brandily C, Kervarec N, Coatanea D, Amir H, Loubersac L, Chanteau S, Guezennec J, Dupont-Rouzeyrol M et Simon-Colin C (2013) Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp. nov., from New Caledonia. *Journal of Applied Microbiology* 114:1702-1712.

Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M et Bernardi T (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 68:605-612.

Chekabab S M, Paquin-Veillette J, Dozois C M et Harel J (2013) The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157. *FEMS Microbiology Letters* 341:1-12.

Cheng H N et Neiss T G (2012) Solution NMR spectroscopy of food polysaccharides. *Polymer Reviews* 52:81-114.

Chiu J, Zhang R, Wang H, Thiyagarajan V et Qian P (2008) Nutrient effects on intertidal community: from bacteria to invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 358:41-50.

Christensen B E, Kjosbakken J et Smidsrød O (1985) Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Applied and Environmental Microbiology* 50:837-845.

Colliec Jouault S, Chevolut L, Helley D, Ratiskol J, Bros A, Siquin C, Roger O et Fischer a M (2001) Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1528:141-151.

Compère C, Bellon-Fontaine M-N, Bertrand P, Costa D, Marcus P, Poleunis C, Pradier C-M, Rondot B et Walls M G (2001) Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling* 17:129-145.

Comte S, Guibaud G et Baudu M (2006) Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS: Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb²⁺ and Cd²⁺ complexation. *Enzyme and Microbial Technology* 38:246-252.

Conrad A, Kontro M, Keinänen M, Cadoret A, Faure P, Mansuy-Huault L et Block J-C (2003) Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38:1093-1105.

Costerton J, Irvin R et Cheng K (1981) The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology* 35:299-324.

Costerton J W, Geesey G G et Cheng K J (1978) How bacteria stick. *Scientific American* 238:86-95.

Costerton J W, Lewandowski Z, Caldwell D E, Korber D R et Lappin-Scott H M (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49:711-745.

Crémet L, Corvec S, Batard E, Auger M, Lopez I, Pagniez F, Dauvergne S et Caroff N (2013) Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.

D'abzac P, Bordas F O, Hullebusch E, Lens P L et Guibaud G (2010) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85:1589-1599.

Danese P N, Pratt L A et Kolter R (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* 182:3593-3596.

Dang H et Lovell C R (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 66:467-475.

Dang H et Lovell C R (2002) Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine

waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 68:496-504.

Dang H, Li T, Chen M et Huang G (2008) Cross-Ocean distribution of rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Applied and Environmental Microbiology* 74:52-60.

Das T, Sharma P K, Busscher H J, Van Der Mei H C et Krom B P (2010) Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* 76:3405-3408.

Davey M E, Caiazza N C et O'toole G A (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 185:1027-1036.

Decho A W (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography And Marine Biology* 73-153.

Dheilly A, Soum-Soutera E, Klein G L, Bazire A, Compere C, Haras D et Dufour A (2010) Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Applied and Environmental Microbiology* 76:3452-3461.

Dobretsov S et Qian P-Y (2004) The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299:35-50.

Dobretsov S, Dahms H-U et Qian P-Y (2006) Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling* 22:43-54.

Dogsa I, Brloznic M, Stopar D et Mandic-Mulec I (2013) Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms. *PLoS ONE* 8:e62044.

Domínguez L, Rodríguez M et Prats D (2010) Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges. Part I: Influence of extraction methods over three-dimensional EEM fluorescence spectroscopy fingerprint. *Desalination* 261:19-26.

Dong Y-H, Wang L-H, Xu J-L, Zhang H-B, Zhang X-F et Zhang L-H (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817.

Dong Y-H et Zhang L-H (2005) Quorum Sensing and Quorum-Quenching enzymes. *The Journal of Microbiology* 43:101-109.

Donlan R M et Costerton J W (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15:167-193.

Donot F, Fontana A, Baccou J C et Galindo-Schorr S (2012) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* 87:951-962.

- Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A et Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Dubreucq G, Domon B et Fournet B (1996) Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Research* 290:175-181.
- Dupont I (1998) Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Université Laval, Canada.
- Durán N, Justo G Z, Ferreira C V, Melo P S, Cordi L et Martins D (2007) Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 48:127-133.
- Egan S, Thomas T, Holmström C et Kjelleberg S (2000) Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology* 2:343-347.
- Egan S, Holmström C et Kjelleberg S (2001) *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1499-504.
- Egan S, James S, Holmström C et Kjelleberg S (2002) Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environmental Microbiology* 4:433-442.
- Elifantz H, Horn G, Ayon M, Cohen Y et Minz D (2013) *Rhodobacteraceae* are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiology Ecology* 85:348-357.
- Fenical W (1993) Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chemical Reviews* 93:1673-1683.
- Filloux A et Vallet I (2003) Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine/sciences* 19:77-83.
- Flemming H-C et Wingender J (2001a) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 43:1-8.
- Flemming H-C et Wingender J (2001b) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology* 43:9-16.
- Flemming H-C, Neu T R et Wozniak D J (2007) The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology* 189:7945-7947.
- Flemming H-C et Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633.
- Flemming H-C (2011) The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86:251-259.

Fong J C N, Syed K A, Klose K E et Yildiz F H (2010) Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology* 156:2757-2769.

Franks A, Haywood P, Holmström C, Egan S, Kjelleberg S et Kumar N (2005) Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules* 10:1286-1291.

Frolund B, Palmgren R, Keiding K et Nielsen P (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30:1749-1758.

Garrett T R, Bhakoo M et Zhang Z (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18:1049-1056.

Gartner A, Blumel M, Wiese J et Imhoff J (2011) Isolation and characterisation of bacteria from the Eastern Mediterranean deep sea. *Antonie van Leeuwenhoek* 100:421-435.

Gauthier G, Gauthier M et Christen R (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:755-761.

Gauthier M J (1976a) Modification of bacterial respiration by a macromolecular polyanionic antibiotic produced by a marine *Alteromonas*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 9:361-366.

Gauthier M J (1976b) *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26:459-466.

Gauthier M J et Flatau G N (1976) Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds. *Canadian journal of microbiology* 22:1612-1619.

Gauthier M J (1977) *Alteromonas citrea*, a new Gram-negative, yellow-pigmented species from seawater. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27:349-354.

Gauthier M J et Breittmayer V A (1979) A New Antibiotic-Producing Bacterium from Seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 29:366-372.

Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S et Tolker-Nielsen T (2005) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology* 7:894-904.

Gong A, Bolster C H, Benavides M et Walker S L (2009) Extraction and analysis of extracellular polymeric substances: comparison of methods and extracellular polymeric substance levels in *Salmonella pullorum* SA 1685. *Environmental Engineering Science* 26:1523-1532.

- Gonzalez J M, Fernandez-Gomez B, Fernandez-Guerra A, Gomez-Consarnau L, Sanchez O, Coll-Llado M, Del Campo J, Escudero L, Rodriguez-Martinez R, Alonso-Saiz L, Latasa M, Paulsen I, Nedashkovskaya O, Lekunberri I, Pinhassi J et Pedros-Alio C (2008) Genome analysis of the proteorhodopsin-containing marine bacterium *Polaribacter* sp. MED152 (*Flavobacteria*). Proceedings of the National Academy of Sciences 105:8724-8729.
- Goris J, Konstantinidis K T, Klappenbach J A, Coenye T, Vandamme P et Tiedje J M (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57:81-91.
- Gosink J J, Woese C R et Staley J T (1998) *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the *C'ophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus* as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48:223-235.
- Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallee-Rehel K et Haras D (2003) Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. Biofouling 19:307-313.
- Guezennec J, Herry J M, Kouzayha A, Bachere E, Mittelman M W et Bellon Fontaine M N (2012) Exopolysaccharides from unusual marine environments inhibit early stages of biofouling. International Biodeterioration & Biodegradation 66:1-7.
- Hagström A, Pommier T, Rohwer F, Simu K, Stolte W, Svensson D et Zweifel U L (2002) Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. Applied and Environmental Microbiology 68:3628-3633.
- Hall-Stoodley L, Costerton J W et Stoddley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology 2:95-108.
- Hannig C, Follo M, Hellwig E et Al-Ahmad A (2010) Visualization of adherent microorganisms using different techniques. Journal of Medical Microbiology 59:1-7.
- Haras D (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. Matériaux et Techniques 93:27-41.
- Harvey J, Keenan K P et Gilmour A (2007) Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Food Microbiology 24:380-392.
- Hassler C S, Alasonati E, Mancuso Nichols C A et Slaveykova V I (2011) Exopolysaccharides produced by bacteria isolated from the pelagic Southern Ocean — Role in Fe binding, chemical reactivity, and bioavailability. Marine Chemistry 123:88-98.
- Hayashida-Soiza G, Uchida A, Mori N, Kuwahara Y et Ishida Y (2008) Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. Journal of Applied Microbiology 105:1672-1677.
- Heindl H, Wiese J, Thiel V et Imhoff J F (2010) Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats. Systematic and Applied Microbiology 33:94-104.

Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological Reviews* 36:478-503.

Hentschel U, Schmid M, Wagner M, Fieseler L, Gernert C et Hacker J (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology* 35:305-312.

Heukelekian H et Heller A (1940) Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology* 40:547-558.

Holmström C, James S, Neilan B A, White D C et Kjelleberg S (1998) *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1205-1212.

Holmström C, Egan S, Franks A, Mccloy S et Kjelleberg S (2002) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* 41:47-58.

Hong Chun C, On on L, Yi-Li H, Siu Yan M, Roberto K et Pei-Yuan Q (2010) Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *The ISME Journal* 4:817-828.

Hori K et Matsumoto S (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* 48:424-434.

Iwabuchi N, Sunairi M, Urai M, Itoh C, Anzai H, Nakajima M et Harayama S (2002) Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2337-2343.

Iyer A, Mody K et Jha B (2005a) Characterization of an exopolysaccharide produced by a marine *Enterobacter cloacae*. *Indian Journal of Experimental Biology* 43:467-71.

Iyer A, Mody K et Jha B (2005b) Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin* 50:340-343.

Iyer A, Mody K et Jha B (2006) Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology* 38:220-222.

Izano E A, Amarante M A, Kher W B et Kaplan J B (2008) Differential roles of Poly-N-Acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 74:470-476.

James S G, Holmström C et Kjelleberg S (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2783-8.

Jansson P-E, Lindberg B, Lönnngren J, Ortega C et Nimmich W (1984) Structural studies of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* type 66. *Carbohydrate Research* 132:297-305.

Jiang P, Li J, Han F, Duan G, Lu X, Gu Y et Yu W (2011) Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS ONE* 6:e18514.

Johansen C, Falholt P et Gram L (1997) Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3724-8.

Jones H C, Roth I L et Sanders W M (1969) Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology* 99:316-325.

Jones P, Cottrell M, Kirchman D et Dexter S (2007) Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microbial Ecology* 53:153-162.

Kachlany S C, Levery S B, Kim J S, Reuhs B L, Lion L W et Ghiorse W C (2001) Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environmental Microbiology* 3:774-784.

Kamerling J P, Gerwig G J, Vliegthart J F et Clamp J R (1975) Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal* 151:491-495.

Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari K A, Pattukumar V et Arul V (2011) Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology* 102:4827-4833.

Karunakaran E et Biggs C (2011) Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89:1161-1175.

Kato N, Morohoshi T, Nozawa T, Matsumoto H et Ikeda T (2006) Control of Gram-negative bacterial Quorum Sensing with cyclodextrin immobilized cellulose ether gel. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 56:55-59.

Kavita K, Mishra A et Jha B (2011) Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling* 27:309-317.

Kavita K, Mishra A et Jha B (2013) Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications. *Carbohydrate Polymers* 94:882-888.

Kavita K, Singh V K, Mishra A et Jha B (2014) Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. *Carbohydrate Polymers* 101:29-35.

Kierek K et Watnick P I (2003) Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5079-5088.

- Kim M, Park J-M, Um H-J, Lee K-H, Kim H, Min J et Kim Y-H (2011) The antifouling potentiality of galactosamine characterized from *Vibrio vulnificus* exopolysaccharide. *Biofouling* 27:851-857.
- Kim M, Lee K-H, Yoon S-W, Kim B-S, Chun J et Yi H (2013) Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era. *Genomics & Informatics* 11:102-113.
- Klein G L, Soum-Soutéra E, Guede Z, Bazire A, Compère C et Dufour A (2011) The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling* 27:931-940.
- Klemm P, Vejborg R et Hancock V (2010) Prevention of bacterial adhesion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88:451-459.
- Ko S-H, Lee H, Park S et Lee H (2000) Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 5:181-185.
- Körstgens V, Flemming H C, Wingender J et Borchard W (2001) Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Science and Technology* 43:49-57.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M et Hultgren S J (2013) Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3.
- Kreft P, Scheible K et Venosa A (1986) Hydraulic studies and cleaning evaluations of ultraviolet disinfection units. *Water Pollution Control Federation* 58:1129-1137.
- Kumar A, Sunish Kumar R et Sakthivel N (2003) Compositional difference of the exopolysaccharides produced by the virulent and virulence-deficient strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Current Microbiology* 46:0251-0255.
- Kumar A, Mody K et Jha B (2007) Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology* 47:103-117.
- Kurahashi M et Yokota A (2004) *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium isolated from marine animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:693-697.
- Larpin S, Sauvageot N, Pichereau V, Laplace J-M et Auffray Y (2002) Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. *International Journal of Food Microbiology* 77:1-9.
- Lau S C K, Thiyagarajan V, Cheung S C K et Qian P-Y (2005) Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology* 38:41-51.

- Lawrence J, Delaquis P, Korber D et Caldwell D (1987) Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microbial Ecology* 14:1-14.
- Le Costaouëc T, Cérantola S, Ropartz D, Ratiskol J, Siquin C, Collic-Jouault S et Boisset C (2012) Structural data on a bacterial exopolysaccharide produced by a deep-sea *Alteromonas macleodii* strain. *Carbohydrate Polymers* 90:49-59.
- Leathers T et Côté G (2008) Biofilm formation by exopolysaccharide mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-1355. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78:1025-1031.
- Leathers T et Bischoff K (2011) Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnology Letters* 33:517-523.
- Lee H K, Chun J, Moon E Y, Ko S H, Lee D S, Lee H S et Bae K S (2001) *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:661-6.
- Lee J-W, Nam J-H, Kim Y-H, Lee K-H et Lee D-H (2008) Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *The Journal of Microbiology* 46:174-182.
- Lee O O, Lau S C K, Tsoi M M Y, Li X, Plakhotnikova I, Dobretsov S, Wu M C S, Wong P-K, Weinbauer M et Qian P-Y (2006) *Shewanella ircinia* sp. nov., a novel member of the family *Shewanellaceae*, isolated from the marine sponge *Ircinia dendroides* in the Bay of Villefranche, Mediterranean Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:2871-2877.
- Lejars M, Margaillan A et Bressy C (2012) Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings. *Chemical Reviews* 112:4347-4390.
- Lembre P, Lorentz C et Martino P D (2012) Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world. ed., Vol. p.
- Lemos M, Toranzo A et Barja J (1985) Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial Ecology* 11:149-163.
- Lenz A P, Williamson K S, Pitts B, Stewart P S et Franklin M J (2008) Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 74:4463-4471.
- Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Rochet M J, Compère C et Combes D (2007) A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents. *Letters in Applied Microbiology* 44:372-378.
- Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Compere C et Combes D (2008) Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. *Journal of Applied Microbiology* 105:791-799.
- Li Z et Nair S K (2012) Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Science* 21:1403-1417.

- Liang Z, Li W, Yang S et Du P (2010) Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere* 81:626-632.
- Liesse Iyamba J M, Seil M, Devleeschouwer M, Takaisi Kikuni N B et Dehaye J P (2011) Study of the formation of a biofilm by clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Biofouling* 27:811-821.
- Liesse Iyamba J M, Takaisi Kikuni N B, Dulanto S et Dehaye J P (2012) Study of the adhesion of clinical strains of *Staphylococcus aureus* on an abiotic surface using the Biofilm Ring Test®. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 3:547-556.
- Lin M-H, Yang Y-L, Chen Y-P, Hua K-F, Lu C-P, Sheu F, Lin G-H, Tsay S-S, Liang S-M et Wu S-H (2011) A novel exopolysaccharide from the biofilm of *Thermus aquaticus* YT-1 induces the immune response through Toll-like receptor 2. *Journal of Biological Chemistry* 286:17736-17745.
- Liu H et Fang H H P (2002) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* 95:249-256.
- Loaëc M, Olier R et Guezennec J (1997) Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research* 31:1171-1179.
- Loaëc M, Olier R et Guezennec J (1998) Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Polymers* 35:65-70.
- Loeb G I et Neihof R A (1975) Marine conditioning film. *Advances Chemical Series* 145:319-335.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr a L et Randall R J (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Lynch D J, Fountain T L, Mazurkiewicz J E et Banas J A (2007) Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiology Letters* 268:158-165.
- Maki J S, Rittschof D, Costlow J D et Mitchell R (1988) Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films. *Marine Biology* 97:199-206.
- Manca M C, Lama L, Improta R, Esposito E, Gambacorta A et Nicolaus B (1996) Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3265-9.
- Mancuso Nichols C A, Garon S, Bowman J P, Raguénès G et Guézennec J (2004) Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology* 96:1057-1066.
- Marx J G, Carpenter S D et Deming J W (2009) Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia*

psychrerythraea strain 34H under extreme conditions. Canadian journal of microbiology 55:63-72.

Matsuda M, Shigeta S et Okutani K (1999) Antiviral activities of marine *Pseudomonas* polysaccharides and their oversulfated derivatives. Marine Biotechnology 1:68-73.

Matsuda M, Yamori T, Naitoh M et Okutani K (2003) Structural revision of sulfated polysaccharide B-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines. Marine Biotechnology 5:13-19.

Matsuyama H, Hirabayashi T, Kasahara H, Minami H, Hoshino T et Yumoto I (2006) *Glaciecola chathamensis* sp. nov., a novel marine polysaccharide-producing bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:2883-2886.

Matsuyama H, Minami H, Kasahara H, Kato Y, Murayama M et Yumoto I (2013) *Pseudoalteromonas arabiensis* sp. nov., a marine polysaccharide-producing bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63:1805-1809.

Matsuyama T et Nakagawa Y (1996) Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. Journal of Microbiological Methods 25:165-175.

Maugeri T, Gugliandolo C, Caccamo D, Panico A, Lama L, Gambacorta A et Nicolaus B (2002) A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. Biotechnology Letters 24:515-519.

Mcbride M J (2001) Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. Annual Review of Microbiology 55:49-75.

Merino S, Shaw J G et Tomás J M (2006) Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. FEMS Microbiology Letters 263:127-135.

Moens S et Vanderleyden J (1996) Functions of bacterial flagella. Critical reviews in Microbiology 22:67-100.

Molin S R et Tolker-Nielsen T (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. Current Opinion in Biotechnology 14:255-261.

Moppert X, Le Costaouec T G, Raguenees G R, Courtois A, Simon-Colin C, Crassous P, Costa B et Guezennec J (2009) Investigations into the uptake of copper, iron and selenium by a highly sulphated bacterial exopolysaccharide isolated from microbial mats. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 36:599-604.

Moreira J M R, Gomes L C, Araujo J D P, Miranda J M, Simoes M, Melo L F et Mergulhao F J (2013) The effect of glucose concentration and shaking conditions on *Escherichia coli* biofilm formation in microtiter plates. Chemical Engineering Science 94:192-199.

Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R et Kanaya S (2006) Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. Microbiology 152:2801-2807.

Morin A (1998) Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production and recovery of microbial polysaccharides in Polysaccharides-Structural Diversity and Functional Versatility 275-296.

Morris V J, Gunning A P, Kirby A R, Round A, Waldron K et Ng A (1997) Atomic force microscopy of plant cell walls, plant cell wall polysaccharides and gels. International Journal of Biological Macromolecules 21:61-66.

Mulcahy H, Charron-Mazenod L et Lewenza S (2008) Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. PLoS Pathog 4:1.

Nagant C, Tré-Hardy M, Devleeschouwer M et Dehaye J P (2010) Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. Journal of Microbiological Methods 82:243-248.

Nan B, Chen J, Neu J C, Berry R M, Oster G et Zusman D R (2011) Myxobacteria gliding motility requires cytoskeleton rotation powered by proton motive force. Proceedings of the National Academy of Sciences 108:2498-2503.

Nealson K H et Hastings J W (1979) Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiological Reviews 43:496-518.

Nichols C, Bowman J P et Guezennec J (2005a) Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic Sea ice bacterium grown in batch culture. Applied and Environmental Microbiology 71:3519-3523.

Nichols C, Guezennec J et Bowman J P (2005b) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. Marine Biotechnology 7:253-271.

Nichols C, Lardièrre S, Bowman J, Nichols P, Gibson A et Guezennec J (2005c) Chemical characterization of exopolysaccharides from antarctic marine bacteria. Microbial Ecology 49:578-589.

Nicolaus B, Lama L, Panico A, Moriello V S, Romano I et Gambacorta A (2002) Production and characterization of exopolysaccharides excreted by thermophilic bacteria from shallow, marine hydrothermal vents of flegrean ares (Italy). Systematic and Applied Microbiology 25:319-325.

Nithya C, Begum M et Pandian S (2010) Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Applied Microbiology and Biotechnology 88:341-358.

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

Olivera N L, Commendatore M G, Delgado O et Esteves J L (2003) Microbial characterization and hydrocarbon biodegradation potential of natural bilge waste microflora. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30:542-548.

Ortega-Morales B O, Santiago-García J L, Chan-Bacab M J, Moppert X, Miranda-Tello E, Fardeau M L, Carrero J C, Bartolo-Pérez P, Valadéz-González A et Guezennec J (2007) Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 102:254-264.

Othmani A, Bouzidi N, Viano Y, Alliche Z, Seridi H, Blache Y, Hattab M, Briand J F et Culioli G (2013) Anti-microfouling properties of compounds isolated from several Mediterranean *Dictyota* spp. *Journal of Applied Phycology* 1-12.

Pan X, Liu J, Zhang D, Chen X, Li L, Song W et Yang J (2010a) A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using three-dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water SA* 36:111-116.

Pan Y, Breidt F et Gorski L (2010b) Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Applied and Environmental Microbiology* 76:1433-1441.

Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D et Berlutti F (2013) Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene* 25:31-42.

Park C et Novak J T (2007) Characterization of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods. *Water Research* 41:1679-1688.

Parolis H, Parolis L, Boan I F, Rodriguez-Valera F, Widmalm G R, Manca M C, Jansson P-E et Sutherland I W (1996) The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). *Carbohydrate Research* 295:147-156.

Patel P, Callow M E, Joint I et Callow J A (2003) Specificity in the settlement – modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environmental Microbiology* 5:338-349.

Peeters E, Nelis H J et Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 72:157-165.

Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourlioux P et Bellon-Fontaine M N (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 63:1725-31.

Pellicer-Nàcher C, Domingo-Félez C, Mutlu A G et Smets B F (2013) Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass. *Water Research* 47:5564-5574.

Pérez N, Culioli G, Pérez T, Briand J-F, Thomas O P et Blache Y (2011) Antifouling Properties of Simple Indole and Purine Alkaloids from the Mediterranean Gorgonian *Paramuricea clavata*. *Journal of Natural Products* 74:2304-2308.

Pierre G, Graber M, Orvain F, Dupuy C et Maugard T (2010) Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biochemical Systematics and Ecology* 38:917-923.

Pillon M, Pau-Roblot C, Lequart V, Pilard S, Courtois B, Courtois J et Pawlicki-Jullian N (2010) Structural investigation of an exopolysaccharide substituted with a lactyl ether group produced by *Raoultella terrigena* Ez-555-6 isolated in the Chernobyl exclusion zone. *Carbohydrate Research* 345:1163-1173.

Pletikapić G, Radić T M, Zimmermann a H, Svetličić V, Pfannkuchen M, Marić D, Godrijan J et Žutić V (2010) AFM imaging of extracellular polymer release by marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reiman & J.C. Lewin. *Journal of Molecular Recognition* 24:436-445.

Poli A, Moriello V, Esposito E, Lama L, Gambacorta A et Nicolaus B (2004) Exopolysaccharide production by a new *Halomonas* strain CRSS isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica growing on complex and defined media. *Biotechnology Letters* 26:1635-1638.

Poli A, Esposito E, Orlando P, Lama L, Giordano A, De Appolonia F, Nicolaus B et Gambacorta A (2007) *Halomonas alkaliantarctica* sp. nov., isolated from saline lake Cape Russell in Antarctica, an alkalophilic moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium. *Systematic and Applied Microbiology* 30:31-38.

Poli A, Anzelmo G et Nicolaus B (2010) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine Drugs* 8:1779-1802.

Polymenakou P N, Lampadariou N, Mandalakis M et Tselepides A (2009) Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the southern Cretan margin, Eastern Mediterranean Sea. *Systematic and Applied Microbiology* 32:17-26.

Qian P Y, Lau S C K, Dahms H U, Dobretsov S et Harder T (2007) Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology* 9:399-410.

Qin G, Zhu L, Chen X, Wang P G et Zhang Y (2007) Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Microbiology* 153:1566-1572.

Raguénès G, Pignet P, Gauthier G, Peres A, Christen R, Rougeaux H, Barbier G et Guezennec J (1996) Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* 62:67-73.

Raguénès G, Moppert X, Richert L, Ratiskol J, Payri C, Costa B et Guezennec J (2004) A novel exopolymer-producing bacterium, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae*, isolated from a "Kopara" mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *Current Microbiology* 49:145-151.

Raguénès G R, Christen R, Guezennec J, Pignet P et Barbier G (1997) *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent

polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. International Journal of Systematic Bacteriology 47:989-995.

Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Paul E et Girbal-Neuhauser E (2011) Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. Water Research 45:1529-1538.

Rimington C (1931) The carbohydrate complex of serum protein II: improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of blood. Biochemical Journal 25:1062-1071.

Rinker K D et Kelly R M (1996) Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology 62:4478-85.

Rivas L, Dykes G A et Fegan N (2007) A comparative study of biofilm formation by Shiga toxinogenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. Journal of Microbiological Methods 69:44-51.

Roberts S K, Wei G X et Wu C D (2002) Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. Letters in Applied Microbiology 35:552-556.

Rougeaux H, Pichon R, Kervarec N, Raguénès G H C et Guezennec J (1996) Novel bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. Carbohydrate Polymers 31:237-242.

Rougeaux H, Guezennec J, Carlson R W, Kervarec N, Pichon R et Talaga P (1999a) Structural determination of the exopolysaccharide of *Pseudoalteromonas* strain HYD 721 isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Carbohydrate Research 315:273-285.

Rougeaux H, Kervarec N, Pichon R et Guezennec J (1999b) Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. Carbohydrate Research 322:40-45.

Rougeaux H, Talaga P, Carlson R et Guezennec J (1998) Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. Carbohydrate Research 312:53-59.

Rubio C (2002) Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Paris 6, Paris.

Sakuragi Y et Kolter R (2007) Quorum-Sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 189:5383-5386.

Samain E, Miles M, Bozzi L, Dubreucq G et Rinaudo M (1997) Simultaneous production of two different gel-forming exopolysaccharides by an *Alteromonas* strain originating from deep sea hydrothermal vents. Carbohydrate Polymers 34:235-241.

Sar N et Rosenberg E (1989) Fish skin bacteria: Production of friction-reducing polymers. Microbial Ecology 17:27-38.

Saravanan P et Jayachandran S (2008) Preliminary characterization of exopolysaccharides produced by a marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica* (SBT 033). Letters in Applied Microbiology 46:1-6.

Saravanan P, Prabakaran S, Venkata Nancharaiyah Y, Krishnaveni M, Venugopalan V et Jayachandran S (2008) Isolation and characterization of *Pseudoalteromonas ruthenica* (SBT033), an EPS-producing biofilm bacterium from the seawater intake point of a tropical power station. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:509-515.

Satou J, Fukunaga A, Satou N, Shintani H et Okuda K (1988) Streptococcal adherence on various restorative materials. Journal of Dental Research 67:588-591.

Satpute S K, Banat I M, Dhakephalkar P K, Banpurkar A G et Chopade B A (2010) Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. Biotechnology Advances 28:436-450.

Sauer K et Camper A K (2001) Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. Journal of Bacteriology 183:6579-6589.

Sayem S, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, De Felice M et Varcamonti M (2011) Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. Microbial Cell Factories 10:74.

Schiano Moriello V, Lama L, Poli A, Gugliandolo C, Maugeri T L, Gambacorta A et Nicolaus B (2003) Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30:95-101.

Schmitt J R et Flemming H-C (1998) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. International Biodeterioration & Biodegradation 41:1-11.

Seviour T, Lambert L K, Pijuan M et Yuan Z (2010) Structural determination of a key exopolysaccharide in mixed culture aerobic sludge granules using NMR spectroscopy. Environmental Science & Technology 44:8964-8970.

Seviour T, Yuan Z, Van Loosdrecht M C M et Lin Y (2012) Aerobic sludge granulation: a tale of two polysaccharides? Water Research 46:4803-4813.

Sheng G-P, Yu H-Q et Yu Z (2005) Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. Applied Microbiology and Biotechnology 67:125-130.

Sheng G-P, Yu H-Q et Li X-Y (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. Biotechnology Advances 28:882-894.

Shih I-L et Van Y-T (2001) The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. Bioresource Technology 79:207-225.

Shih I-L, Wu P-J et Shieh C-J (2005) Microbial production of a poly(γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry 40:2827-2832.

Shokralla S, Spall J L, Gibson J F et Hajibabaei M (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* 21:1794-1805.

Siegert W (1999) Biofilms - the unknown source of contamination. *Schülke & Mayr GmbH* 105:62-66.

Singh R P, Shukla M K, Mishra A, Kumari P, Reddy C R K et Jha B (2011) Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers* 84:1019-1026.

Skovhus T L, Holmstroem C, Kjelleberg S et Dahlloef I (2007) Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. *FEMS Microbiology Ecology* 61:348-361.

Soliev (2011) Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011.

Spoering A L et Gilmore M S (2006) Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology* 9:133-137.

Spring S, Ludwig W, Marquez M C, Ventosa A et Schleifer K-H (1996) *Halobacillus* gen. nov., with Descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:492-496.

Steinberger R E et Holden P A (2005) Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5404-5410.

Stetter K O, Segerer A, Zillig W, Huber G, Fiala G, Huber R et König H (1986) Extremely thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 7:393-397.

Stewart P S et William Costerton J (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358:135-138.

Stewart P S et Franklin M J (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 6:199-210.

Stinglele F, Neeser J R et Mollet B (1996) Identification and characterization of the eps (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Journal of Bacteriology* 178:1680-90.

Suess A et Lessel T (1977) Radiation treatment of sewage sludge - experience with an operating pilot plant. *Radiation Physics and Chemistry* (1977) 9:353-370.

Sun M, Li W-W, Mu Z-X, Wang H-L, Yu H-Q, Li Y-Y et Harada H (2012) Selection of effective methods for extracting extracellular polymeric substances (EPSs) from *Bacillus megaterium* TF10. *Separation and Purification Technology* 95:216-221.

Sutherland I W, Rose A H et Tempest D W (1972) Bacterial exopolysaccharides in *Advances in microbial physiology* 8:143-213.

Sutherland I W (1982) Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology* 23:79-150.

Sutherland I W (2001a) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3-9.

Sutherland I W (2001b) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* 11:663-674.

Szewzyk U, Holmstrom C, Wrangstadh M, Samuelsson M O, Maki J S et Kjelleberg S (1991) Relevance of the exopolysaccharide of marine *Pseudomonas* sp. strain S9 for the attachment of *Ciona intestinalis* larvae. *Marine Ecology Progress Series* 752:259-265.

Takahashi E, Ledauphin J, Goux D et Orvain F (2009) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Marine and Freshwater Research* 60:1201-1210.

Teasdale M, Donovan K, Forschner-Dancause S et Rowley D (2011) Gram-positive marine bacteria as a potential resource for the discovery of Quorum Sensing inhibitors. *Marine Biotechnology* 13:722-732.

Teasdale M E, Liu J, Wallace J, Akhlaghi F et Rowley D C (2009) Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit Quorum Sensing-controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 75:567-572.

Thomas V, Casson N et Greub G (2007) New *Afipia* and *Bosea* strains isolated from various water sources by amoebal co-culture. *Systematic and Applied Microbiology* 30:572-579.

Tielen P, Strathmann M, Jaeger K-E, Flemming H-C et Wingender J (2005) Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research* 160:165-176.

Tillmans J et Philippi K (1929) The Carbohydrate content of the important proteins of foodstuffs and a colorimetric procedure for the determination of nitrogen-free sugar in protein. *Biochemistry* 215:36-60.

Todorova S G et Costello A M (2006) Design of *Shewanella*-specific 16S rRNA primers and application to analysis of *Shewanella* in a minerotrophic wetland. *Environmental Microbiology* 8:426-432.

Tolker-Nielsen T et Molin S (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology* 40:75-84.

Umezana H, Okami Y, Kurasawa S, Ohnuki T, Ishizuka M, Takeuchi T et Yugari Y (1983) Marinactan, antitumor polysaccharide produced by marine bacteria. *The Journal of Antibiotics* 36:471-7.

- Urai M, Anzai H, Ogihara J, Iwabuchi N, Harayama S, Sunairi M et Nakajima M (2006) Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochromus* strain S-2. *Carbohydrate Research* 341:766-775.
- Urai M, Yoshizaki H, Anzai H, Ogihara J, Iwabuchi N, Harayama S, Sunairi M et Nakajima M (2007) Structural analysis of mucoidan, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. *Carbohydrate Research* 342:927-932.
- Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P et Ghigo J-M (2006) Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:12558-12563.
- Vallet I, Olson J W, Lory S, Lazdunski A E et Filloux A (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:6911-6916.
- Van S, Das S, Wang X, Feng Z, Jin Y, Hou Z, Chen F, Pham A, Jiang N, Howell S et Yu L (2010) Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly(L- γ -glutamyl-glutamine)- paclitaxel nanoconjugate. *International Journal of Nanomedicine* 21:825-37.
- Vandecandelaere I, Nercessian O, Segaert E, Achouak W, Mollica A, Faimali M, De Vos P et Vandamme P (2008) *Alteromonas genovensis* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm and emended description of *Alteromonas macleodii* Baumann et al. 1972 (Approved Lists 1980). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:2589-2596.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J et Michiels J (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology* 16:496-506.
- Vesterlund S, Paltta J, Karp M et Ouwehand a C (2005) Measurement of bacterial adhesion--in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* 60:225-233.
- Viano Y, Bonhomme D, Camps M, Briand J F, Ortalo-Magne A, Blache Y, Piovetti L et Culioli G (2009) Diterpenoids from the Mediterranean brown alga *Dictyota* sp. evaluated as antifouling substances against a marine bacterial biofilm. *Journal of Natural Products* 72:1299-1304.
- Vilain S, Pretorius J M, Theron J et Brözel V S (2009) DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 75:2861-2868.
- Vincent P, Pignet P, Talmont F, Bozzi L, Fournet B, Guezennec J, Jeanthon C et Prieur D (1994) Production and Characterization of an Exopolysaccharide Excreted by a Deep-Sea Hydrothermal Vent Bacterium Isolated from the Polychaete Annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4134-4141.
- Vu B, Chen M, Crawford R et Ivanova E (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 14:2535-2554.

- Watanabe M, Sasaki K, Nakashimada Y, Kakizono T, Noparatnaraporn N et Nishio N (1998) Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. Applied Microbiology and Biotechnology 50:682-691.
- Watnick P I et Kolter R (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Molecular Microbiology 34:586-595.
- Waturangi D E, Bunardi Y A et Madgdalena S (2011) Antibiofilm activity of bacteria isolated from marine environment in Indonesia against *Vibrio cholerae*. Research Journal of Microbiology 6:926-930.
- Webster D C et Chisholm B J (2010) New directions in antifouling technology. Biofouling 366-387.
- Webster N S et Negri a P (2006) Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces. Environmental Microbiology 8:1177-1190.
- Weerkamp A H, Uyen H M et Busscher H J (1988) Effect of zeta potential and surface energy on bacterial adhesion to uncoated and saliva-coated human enamel and dentin. Journal of Dental Research 67:1483-1487.
- Whiteley M, Bangera M G, Bumgarner R, E., Parsek M R, Teitzel G M, Lory S et Greenberg E P (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature 413:860-864.
- Wieczorek S K et Todd C D (1998) Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. Biofouling 12:81-118.
- Wigglesworth-Cooksey B et Cooksey K E (2005) Use of fluorophore-conjugated lectins to study cell-cell interactions in model marine biofilms. Applied and Environmental Microbiology 71:428-435.
- Williams A G et Wimpenny J W (1978) Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in continuous culture. Journal of General Microbiology 104:47-57.
- Wilson G S, Raftos D A, Corrigan S L et Nair S V (2010) Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. Microbiological Research 165:300-311.
- Wilson G S, Raftos D A et Nair S V (2011) Antimicrobial activity of surface attached marine bacteria in biofilms. Microbiological Research 166:437-448.
- Woods Hole Oceanographic Institution (1952) Marine fouling and its prevention. U.S. Naval Institute: Annapolis, MD.
- Wrangstadh M, Conway P et Kjelleberg S (1986) The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. Archives of Microbiology 145:220-227.

Wrangstadh M, Szewzyk U, Ostling J et Kjelleberg S (1990) Starvation-specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp., strain S9. *Applied and Environmental Microbiology* 56:2065-2072.

Wu J et Xi C (2009) Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. *Applied and Environmental Microbiology* 75:5390-5395.

Xu C, Santschi P H, Schwehr K A et Hung C-C (2009) Optimized isolation procedure for obtaining strongly actinide binding exopolymeric substances (EPS) from two bacteria (*Sagittula stellata* and *Pseudomonas fluorescens* Biovar II). *Bioresource Technology* 100:6010-6021.

Yada S, Wang Y, Zou Y, Nagasaki K, Hosokawa K, Osaka I, Arakawa R et Enomoto K (2008) Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Marine Biotechnology* 10:128-132.

Yebra D M, Kiil S R et Dam-Johansen K (2004) Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* 50:75-104.

Zanchetta P et Guezennec J (2001) Surface thermodynamics of osteoblasts: relation between hydrophobicity and bone active biomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 22:301-307.

Zanchetta P, Lagarde N et Guezennec J (2003) A new bone-healing material: a hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcified Tissue International* 72:74-79.

Zobell C E (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology* 46:39-56.

Zuriaga-Agustí E, Bes-Piá A, Mendoza-Roca J A et Alonso-Molina J L (2013) Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR activated sludge flocs in view of improving EPS determination. *Separation and Purification Technology* 112:1-10.

Florence BRIAN-JAISSON
Laboratoire MAPIEM, Université de Toulon

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES EXOPOLYMÈRES DE BIOFILMS DE BACTÉRIES MARINES

Dans l'environnement marin, les surfaces artificielles sont rapidement colonisées par des bactéries qui s'organisent en communautés appelées biofilms, s'entourant d'une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS). La formation d'un biofilm est une étape critique du processus nommé biofouling, c'est-à-dire l'accumulation de micro- et de macro-organismes sur une surface immergée, pouvant conduire à des conséquences néfastes dans le secteur marin. Dans cette étude, il s'agit d'identifier des souches bactériennes isolées de supports immergés en Mer Méditerranée et de les caractériser phénotypiquement par diverses approches. Leur capacité à former un biofilm *in vitro* a été évaluée dans différentes conditions avec une attention particulière portée sur leurs capacités à produire une matrice polymérique abondante riche en polysaccharides; l'objectif étant d'isoler des exopolysaccharides originaux à activité antifouling. Treize souches ont ainsi fait l'objet d'analyses phylogénétiques et d'une caractérisation phénotypique. Sept genres et douze espèces différentes ont été identifiés au sein desquelles deux isolats peuvent être affiliés à une nouvelle espèce, nommée *Persicivirga mediterranea*. Ce genre n'a jamais été décrit en Mer Méditerranée jusqu'à présent. L'extraction des EPS de chaque souche cultivée en biofilm a permis de déterminer leur composition générale en glucides, protéines, acides nucléiques et lipides. Une souche, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14, se distingue par sa capacité à produire des exopolysaccharides en quantité importante. Il s'agit essentiellement de polymères du glucose dont les analyses chromatographiques et spectroscopiques ont révélé la diversité de taille ($M_w \sim 1-4000$ kDa), de charge (neutre ou anionique) et de fonction associée (lactate ou acétate). Les fractions d'EPS enrichies en polysaccharides inhibent la formation de biofilm par d'autres souches marines. Ces derniers sont également synthétisés par les bactéries en culture planctonique mais en proportions très différentes.

Mot clés : Bactéries marines, biofilm, EPS.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYMERS FROM BIOFILMS OF MARINE BACTERIA

In marine environment, artificial surfaces are promptly colonized by biofilms, which are communities of bacteria surrounded by matrix of extracellular polymeric substances (EPS). Formation of biofilm is a critical step of biofouling development, which corresponds to the accumulation of micro and macro-organisms on immersed surfaces and which can have important negative ramifications in particular in the marine sector. In this study, bacteria isolated from the Mediterranean Sea have been identified and characterized using different phenotypical tools. Their capacity to form a biofilm *in vitro* has been studied in different conditions, with a particular focus on their ability to produce abundant carbohydrate-rich EPS, the overall objective of the study being the isolation of original antifouling-active exopolysaccharides. Thirteen strains have been phylogenetically and phenotypically characterized. Seven genera and twelve species were identified among which two isolates were affiliated to a new species, named *Persicivirga mediterranea*. This genus has never been described in the Mediterranean Sea. Extraction of EPS of each strain, grown in biofilm conditions, allowed the determination of their general composition in carbohydrates, proteins, nucleic acids and lipids. One strain, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14, was able to produce large quantities of exopolysaccharides, comprising in majority polymers of glucose whose chromatographic and spectroscopic analyzes revealed a diversity in size ($M_w \sim 1-4000$ kDa), charge (neutral or anionic) and associated function (acetate or lactate). These polysaccharides inhibited biofilm formed by other marine strains isolated from the Mediterranean Sea. They can also be synthesized by planktonic TC14, but in very different proportions.

Keywords : Marine bacteria, biofilm, EPS.