



**HAL**  
open science

## Bio-essais anti-adhésion sur bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements antifouling

Mercedes Camps

► **To cite this version:**

Mercedes Camps. Bio-essais anti-adhésion sur bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements antifouling. Sciences agricoles. Université de Toulon, 2011. Français. NNT : 2011TOUL0006 . tel-00638080

**HAL Id: tel-00638080**

**<https://theses.hal.science/tel-00638080>**

Submitted on 3 Nov 2011

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

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

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences Chimiques (ED 250)  
Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

## THÈSE

pour obtenir le grade de Docteur en **Biologie marine**

par **Mercedes CAMPS**

# BIO-ESSAIS ANTI-ADHESION SUR BACTERIES MARINES POUR LE CRIBLAGE DE MOLECULES ET DE REVETEMENTS ANTIFOULING

Soutenue le : **24 juin 2011**

*THÈSE dirigée par :*

<b>M. BLACHE Yves</b>	Professeur,	Université du Sud Toulon Var <b>Directeur de thèse</b>
<b>M. BRIAND Jean-François</b>	MC,	Université du Sud Toulon Var <b>Co-encadrant</b>

*JURY :*

<b>M. DUFOUR Alain</b>	Professeur,	Université de Bretagne Sud <b>Rapporteur</b>
<b>M. LEBOULANGER Christophe</b>	CR-IRD-HDR,	Université Montpellier II <b>Rapporteur</b>
<b>Mme. COMPERE Chantal</b>	Chercheur IFREMER,	Centre de Brest/Plouzane <b>Examineur</b>
<b>Mme. MICHOTEY Valérie</b>	Professeur,	Université de la Méditerranée Aix- Marseille II <b>Examineur</b>
<b>M. CHATAING Bernardo</b>	Professeur,	Universidad de los Andes, Merida (Venezuela) <b>Invité</b>



## *REMERCIEMENTS*

Cette thèse a été effectuée au laboratoire « Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin » (MAPIEM), de l'Université Sud Toulon Var, sous la direction d'André Margailan, que je remercie pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe « Biofouling et substances naturelles marines ». Je tiens également à remercier Yves Blache, responsable de cette équipe et directeur de ma thèse pour m'avoir permis de découvrir la science par delà les frontières.

Je remercie également Jean-François Briand pour m'avoir encadré, aidé et soutenu, ainsi que pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordée durant ces années d'apprenti chercheur.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Alain Dufour et Christophe Leboulanger qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail, ainsi qu'à Chantal Compère et à Valérie Michotey pour avoir consenti à participer à ce jury.

Bien que l'adage considère qu'un scientifique ne soit qu'un rat de laboratoire, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est sans l'aide précieuse de collaborateurs. C'est pourquoi je tiens à remercier très sincèrement l'IFREMER et le LBCM pour nous avoir fournis les souches bactériennes D41 et 4M6. Merci à Alexis Bazire du LBCM de Lorient de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir initié à la biologie moléculaire et permis d'identifier les bactéries méditerranéennes. Ainsi qu'à Alain Dufour, pour sa gentillesse, son aide et son accueil chaleureux lors de mon cours séjour à Lorient.

J'exprime également ma gratitude aux différentes personnes du laboratoire PROTEE : à Jean Louis Jamet, de l'équipe EBMA, pour le prêt du microscope inversé à épifluorescence, à Stéphane Mounier de l'équipe de recherche CAPTE pour la détermination de l'autofluorescence des peintures, et enfin à Stéphane Coupé et Sandrine Gaillard de l'équipe EB2M pour leur aide lors de la préparation de la PCR.

Au laboratoire MAPIEM, merci à Olivier Bottzeck, Annie Praud, Yannick Viano et Gérald Culioli pour les extraits naturels, et leurs dérivés de synthèse issus d'organismes marins, ainsi qu'à Christine Bressy et Sandra Lafond pour leur aide sur les revêtements.

Je remercie très chaleureusement Brigitte Le Berre et Agnès Bouches, de l'INRA de Thonon-les-Bains, pour la réalisation, l'interprétation et leur aide dans la compréhension de la DGGE. Un grand merci à Gerald Grégori et à Aude Barani du PRECYM de l'université d'Aix-Marseille II, pour la réalisation de la Cytométrie en flux et pour nous avoir éclairés de leurs lumières lors de l'interprétation des résultats.

Un grand merci à Ana Luisa Medina, à Bernardo Chataing, Luis Rojas et Alfredo Usubillaga de l'université des Andes au Venezuela pour leurs gentillesse et leurs accueils chaleureux au sein de leurs laboratoires respectifs, ainsi qu'à Carlos Guerrero pour sa patience informatique, et au PCP pour son aide financière.

Merci beaucoup à toute l'équipe MAPIEM pour leur joie de vivre et plus particulièrement aux membres de l'ISITV de m'avoir supporté durant tout ce temps.

Mais une thèse c'est aussi des rencontres, des coups de cœurs et des amitiés, c'est pourquoi je tiens à remercier Natali Tostes de Souza, ma stagiaire unique et préférée pour sa motivation et son travail sur la dure réalisation du biofilm plurispécifique. Pour leur

sympathie et leur humour de chimiste (pas toujours compréhensible), merci à Yannick et Nico.

Je remercie également Brigitte Tanguy qui avec son tempérament de feu mais son cœur sur la main, a su m'écouter et me conseiller. Un grand merci aussi à Linda Dombrowsky pour sa patience, son soutien, sa générosité d'âme, ses précieux conseils, sa joie de vivre et ses longues discussions qui m'ont permis de mieux comprendre le fonctionnement ne « nos petites bêtes ».

Merci aussi à Marionnette, notre Guy Béart (fournis sans guitare) et blonde préférée du labo microbio.

Un grand merci à Louis Piovetti, pour son accueil chaleureux, son soutien, sa gentillesse et ses précieux conseils

Il ne me reste plus que vous mes poulettes (les meilleures pour la fin, n'est ce pas Zouzou), et pour paraphraser Mina, je n'étais pas venu ici pour « gratter l'amitié » mais je crois bien y être tombée dedans et en plus m'y complaire. Ces quelques années de thèse n'auraient pas été possible sans vous, sans vos élans du cœur et votre tendresse (et oui même toi Zouzou tu deviens miss câlin), vos fous rire, mais aussi vos coups de gueule et les soirées de ripaille (ça entretient les dougdougs). En bref tout simplement merci d'avoir été là, de m'avoir soutenu et encouragé dans les moments difficiles.

Et pour finir j'adresse un grand merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenu dans les moments de doute, encouragé et même remonté les bretelles quand cela était nécessaire. Je vous remercie tout simplement d'avoir été et d'être toujours présent. Et enfin un grand merci à Vincent, pour sa patience, sa douceur, son soutien, ses encouragements et surtout pour avoir réussi à me supporter malgré mon humeur détestable durant les jours de doutes (ou pas).

## *LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES ET ECRITES*

### **ARTICLES:**

- M. Camps, J.F. Briand, L. Dombrowsky, G. Culioli, A. Bazire et Y. Blache (2011) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Marine Pollution Bulletin* 62: 1032-1040
- Y. Viano, D. Bonhomme, M. Camps, J.F. Briand, A. Ortalo-Magné, Y. Blache, L. Piovetti & G. Culioli (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
- M. Camps, L. Dombrowsky, Y. Viano, Y. Blache and J.F. Briand (2011) Chemical defense of marine organisms against biofouling explored with an adhesion bacteria bioassay. *Global change: Mankind-marine environment interactions part 6*: 341-345

### **CONFERENCES:**

- M. Camps, J.F. Briand, L. Dombrowsky, A. Bazire et Y. Blache (Juillet 2010) A reliable marine antifouling bioassay based on *in vitro* adhesion: comparison of the response of five pioneer bacteria with nine biocides including natural products. The 15<sup>th</sup> international congress on marine corrosion and fouling.(Newcastle, Angleterre)
- M. Camps, L. Dombrowsky, A. Bazire, J-F. Briand et Y. Blache (Aout 2009) Biofilm bactérien *in vitro* utilisés comme bio-essais antifouling 4<sup>ème</sup> Colloque de l'association francophone d'écologie microbienne (Lyon, France)
- M. Camps, L. Dombrowsky, G. Culioli, J-F. Briand et Y. Blache (Novembre 2008) Quelle méthodologie pour évaluer l'activité antifouling ? 3<sup>ème</sup> journée scientifique euro-méditerranéennes (Toulon, France)
- M. Camps, J-F. Briand et Y. Blach. (Novembre 2007) Développement de bio-essais antifouling sur un biofilm bactérien *in vitro* Assemblée Générale ECIMAR 2 (Banyuls sur Mer, France)

### **POSTERS:**

- J-F. Briand, M. Camps. L. Dombrowsky, A. Bazire, et Y. Blache (2010) Reliability of marine antifouling assay based on *in vitro* bacterial adhesion 5<sup>th</sup> ASM (Cancun, Mexique)
- J-F. Briand, M. Camps. L. Dombrowsky, B. Tanguy et Y. Blache ( 2007) Utilisation de biofilm bactériens pour caractériser l'activité antifouling en milieu marin 3<sup>ème</sup> Colloque de l'association francophone d'écologie microbienne (La Grande Motte).

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I Etude bibliographique</b> .....	<b>5</b>
<b>I .Le biofouling en milieu marin</b> .....	<b>7</b>
I.1. Formation et développement du biofouling .....	7
I.2. Conséquences économiques et écologiques liées au biofouling .....	8
I.2.1. Sur des supports naturels inertes ou vivants.....	8
I.2.2. Sur les structures artificielles immergées.....	9
<b>II. Formation et développement du biofilm</b> .....	<b>11</b>
II.1. Conditionnement des substrats immergés et approche des bactéries (Figure 4:1)....	12
II.2. L'adhésion réversible (Figure 4: 2) .....	13
II.3. L'adhésion irréversible (Figure 4 :2).....	13
II.4. Croissance et maturation du biofilm bactérien (Figure 4 : 3 et 4) .....	14
II.5 Dispersion bactérienne (Figure 4 : 5).....	15
II.6. Abondance et diversité des communautés microbiennes des biofilms. ....	16
II.6.1. Outils d'études.....	16
II. 6.1.1. La Microscopie.....	16
II. 6.1.2. Outils moléculaires.....	16
II.6.1.3. Cytométrie en flux.....	17
II. 6.2. Influence des surfaces sur l'abondance microbienne .....	19
II.6.3. Diversité des micro-organismes au sein des biofilms marins. ....	20
<b>III. Relations entre les biofilms et les autres organismes du biofouling</b> .....	<b>22</b>
<b>IV. Les différentes techniques pour empêcher la formation du biofouling</b> .....	<b>24</b>
IV.1. Les peintures actives par relargage de biocides.....	24
IV.1.1. Les différents types de peinture .....	24
IV.1.1.1. Les peintures érodables .....	24
IV.1.1.2. Les peintures « auto-polissantes » (SPC : self polishing coating).....	26
IV.1.2. Les substances actives commerciales.....	27
IV.1.2.1. Les biocides à base de métaux.....	27
IV.1.2.2. Les biocides organiques .....	28

IV.1.3. Impact écologique et nouvelle réglementation .....	30
IV.1.4. Les composés antifouling naturels .....	30
IV.1.4.1. Les produits naturels extraits des micro-organismes.....	31
IV.1.4.2. Les molécules extraites des macro-algues ou de plantes marines .....	32
IV.1.4.3. Les molécules extraites des spongiaires.....	34
IV.1.4.4. Molécules naturelles extraites d'autres organismes marins .....	34
IV.1.4.5. Molécules naturelles d'origine terrestre.....	35
IV.1.4.6. Autres molécules .....	35
IV.1.4.7. Analogues de synthèse de molécules naturelles .....	36
IV.2. Les autres méthodes pour stopper le biofouling .....	37
IV.2.1. Les peintures « fouling-release-coating » (FRC).....	37
IV.2.2. Les autres revêtements non toxiques.....	38
<b>V. Les différentes méthodes d'analyse et de quantification des biofilms bactériens <i>in vitro</i>.....</b>	<b>39</b>
V.1. Analyse directe des biofilms par microscopie .....	39
V.2. Analyse indirecte des biofilms.....	41
V.2.1. Bio-essais antibactériens.....	42
V.2.2. Bio-essais anti-adhésion .....	43
V.2.2.1. Supports et conditions .....	43
V.2.2.2. Quantification des biofilms .....	47
V.2.2.3. Application aux peintures antifouling .....	50
<b>VI Les autres bio-essais antifouling .....</b>	<b>51</b>
VI.1. Autres micro-organismes .....	51
VI.2. Utilisation de macro-organismes comme cibles AF .....	52
<b><i>OBJECTIFS DE LA THESE</i> .....</b>	<b>55</b>
<b><i>CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES</i>.....</b>	<b>59</b>
<b>II. Produits utilisés.....</b>	<b>61</b>
II.1. Biocides, produits naturels et solvants .....	61
II.2. Milieux de culture .....	66
II.2.1. Vaatanen Nine Salt Solution (VNSS) et VNSS agar.....	66
II.2.2. Marine Broth (MB) et MB agar (MA).....	67
II.2.3. LB et LB agar.....	67

II.2.4. Brain Heart Infusion (BHI) .....	67
II.2.5 Mueller Hinton II Agar (MHAI) .....	67
II.2.6. Eau de mer artificielle (ASW : Artificial Sea Water).....	68
II.3. Les fluorochromes.....	68
<b>III. Matériel Biologique .....</b>	<b>69</b>
III.1: Souches de bactéries marines de l'Atlantique .....	69
III.2. Souches bactériennes de la Méditerranée.....	70
III.3. Souches « pathogènes ».....	70
III.4. Conservation des souches :.....	71
III.5. Conditions de culture et courbes de croissance. ....	71
III.5.1. Souches marines.....	71
III.5.2. Souches pathogènes.....	72
III. 6. Extraction des produits bruts d' <i>Espeletia schultzi</i> .....	72
<b>IV. Caractérisation des souches .....</b>	<b>74</b>
IV.1. Taxinomie.....	74
IV.2. Coloration de Gram.....	76
IV.3. Mobilité .....	76
IV.3.1. Swimming.....	76
IV.3.2. Swarming.....	77
IV.3.3 Twitching.....	77
IV.4. Microscopie Electronique à Balayage.....	77
IV.5. Angle de contact .....	78
IV.6. Microbial Adhesion To Solvents (MATS).....	79
<b>V. Bio-essais anti-adhésion .....</b>	<b>80</b>
V.1. Mise au point au laboratoire du bio-essai monospécifique .....	80
V.1.1. Optimisation des paramètres d'adhésion des bactéries en microplaque.....	80
V.1.1.1. Adhésion en phase stationnaire.....	80
V.1.1.2. Cinétique d'adhésion.....	80
V.1.1.3. Densité d'ensemencement .....	81
V.1.2. Corrélation entre le nombre de bactéries adhérees et l'IF en microplaque .....	81
V.1.3. Toxicité des solvants. ....	82
V.1.4. Protocole pour l'évaluation de l'activité de molécules en solution.....	83
V.1.5. Adaptation du bio-essai anti-adhésion aux peintures antifouling .....	86

V.2. Bio-essai plurispécifique .....	87
V.2.1. Développement du « Pré-marquage » .....	88
V.2.2. Bio-essais plurispécifiques : .....	88
V.2.2.1. Interactions des souches en biofilms mixtes : .....	88
V.2.2.2. Bio-essai anti-adhésion.....	89
<b>VI. Bio-essais antibactériens.....</b>	<b>90</b>
VI.1. Inhibition de croissance.....	90
VI.1.1. Méthode de diffusion ou des disques en milieu solide.....	90
VI.1.2. Détermination de la CI <sub>50</sub> en milieu liquide.....	90
VI.2. Toxicité .....	92
<b>VII. Représentativité du bio-essai : Etude des communautés des biofilms <i>in situ</i>.....</b>	<b>92</b>
VII.1. Immersion <i>in situ</i> dans la Rade de Toulon.....	92
VII.1.1. Préparation des coupons peints.....	92
VII.1.2. Immersion des plaques .....	93
VII.2. Analyse des biofilms.....	94
VII.2.1. Evaluation de la biomasse .....	94
VII.2.2. Dénombrement pico-« planctonique » par cytométrie de flux. ....	94
VII.2.3. Diversité des communautés procaryotes des biofilms .....	95
VII.3. Abondance et diversité des Bacillariophycées (Diatomées) des biofilms .....	97
<b>VIII. Analyses statistiques.....</b>	<b>99</b>
<b>CHAPITRE III ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES MARINES101</b>	
<b>I. Introduction.....</b>	<b>103</b>
<b>II. Caractérisations des souches bactériennes .....</b>	<b>103</b>
II.1. Cultures et Morphologie .....	103
II.2. Croissance des souches bactériennes.....	108
II.3. Taxinomie moléculaire .....	109
II.4. Coloration de Gram et mobilité: .....	110
II.5. Caractéristiques chimiques des surfaces des bactéries .....	112
<b>III. Discussion générale sur les caractéristiques des souches .....</b>	<b>114</b>
III.1. Diversité des souches de biofilms marins .....	114
III.2. Les caractéristiques biologiques et physico–chimiques pouvant influencer sur l’adhésion .....	115

**CHAPITRE IV DEVELOPPEMENT DES BIO-ESSAIS ET ACTIVITES DE PRODUITS NATURELS MARINS.....117**

**I. Mise au point du bio-essai anti-adhésion mono-spécifique..... 119**

I.1. Adhésion des bactéries en microplaque .....	119
I.1.1. Détermination de la phase optimale de l'adhésion. ....	119
I.1.2. Durée d'adhésion .....	119
I.1.3. Densité d'ensemencement.....	121
I.1.4. Toxicité des solvants. ....	124
I.2. Validation de la méthode de quantification des bactéries adhérees en microplaque	125
I.3. Robustesse du bio-essai .....	126

**II. Activités anti-adhésion et antibactérienne de biocides commerciaux et de produits naturels marins ou dérivés de synthèse sur cinq souches « pionnières » marines..... 127**

II.1. Produits commerciaux .....	128
II.1.1. Activités anti-adhésion .....	128
II.1.2. Inhibition de la croissance et viabilité bactérienne.....	131
II.2. Produits naturels marins et dérivés de synthèse.....	135
II.2.1 Activités anti-adhésion .....	135
II.2.2. Inhibition de la croissance et viabilité bactérienne.....	138
II.3.Des molécules aux peintures antifouling.....	139
II.3.1. Autofluorescence, fluorescence et effet de bord des peintures .....	139
II.3.2. Efficacité anti adhésion des revêtements sur trois souches marines .....	141
II.3.3. Corrélation entre l'adhésion bactérienne et l'angle de contact des revêtements	142

**III. Résultats préliminaires du développement d'un bio-essai anti-adhésion plurispécifique .....**

III.1. Choix des marqueurs fluorescents pour les quatre souches sélectionnées.....	144
III.1.1. Vérification de l'absence d'effet du pré-marquage.....	145
III.1.1.1. Sur l'adhésion en microplaque .....	145
III.1.1.2: Sur la sensibilité des souches.....	147
III.2. Réalisation de « biofilms » mixtes en microplaques et mise en évidence d'interaction potentielle entre les souches utilisées. ....	148
III.2.1. Le couple TC5/4M6 .....	149
III.2.2. Le couple TC5/TC8.....	149
III.2.3. Le couple TC5/D41 .....	150

III.2.4. Le couple D41/ TC8 .....	151
III.2.5. Le couple D41/ 4M6.....	152
III.2.6. Le couple 4M6/ TC8 .....	153
III.3. Activité anti-adhésion du TBTO sur des biofilms plurispécifiques en microplaque	155
<b>IV. Discussion et conclusions sur les bio-essais.....</b>	<b>156</b>
IV.1. Limite des bio-essais anti-adhésion mono- et plurispécifique .....	156
IV.1.1 Bio-essai mono-spécifique .....	156
IV.1.2. Evaluation de l'activité anti-adhésion des peintures AF par le bio-essai.....	159
IV.1.3 Bio-essais anti-adhésion plurispécifiques.....	160
IV.2. Une activité anti-adhésion prometteuse pour le Dictyol C et le TFA Z ?.....	161
<b><i>CHAPITRE V REPRESENTATIVITE DU BIO-ESSAI: ETUDE DES</i></b>	
<b><i>COMMUNAUTES MICROBIENNES DE PEINTURES ANTIFOULING IN SITU.....</i></b>	<b>167</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>169</b>
<b>II. Biomasse des biofilms .....</b>	<b>169</b>
<b>III. Composante picoplanctonique des biofilms .....</b>	<b>171</b>
III.1. Abondance et diversité des bactéries hétérotrophes par cytométrie en flux .....	171
III.2. Abondance et diversité des pico-organismes autotrophes par cytométrie en flux.	175
III.3. Diversité des procaryotes par empreinte moléculaire (PCR-DGGE) .....	179
III.3.1 Analyse qualitative du profil DGGE .....	183
III.3.2. Analyse semi-quantitative du profil DGGE.....	184
<b>IV. Abondance des nanoeucaryotes autotrophes par cytométrie en flux .....</b>	<b>185</b>
<b>V. Composante microphytobenthique des biofilms.....</b>	<b>186</b>
V.1. Abondance et richesse des populations de diatomées des biofilms. ....	187
V.2. Diversité des populations de diatomées des biofilms.....	190
V.3. Comparaison des communautés de diatomées des biofilms en termes de	
biovolumes.....	190
V.3.1. Densités totales.....	191
V.3.2. Densités relatives.....	192
<b>VI. Discussion générale sur la composition des biofilms présents sur les revêtements</b>	
<b>immergés dans la rade de Toulon. ....</b>	<b>194</b>
VI.1. Densités globales des biofilms sur revêtements immergés .....	194

VI.1.1. Bactéries hétérotrophes .....	196
VI.1.2. Recouvrement par les pico-organismes et les nanoeucaryotes autotrophes et les micro-algues .....	198
VI.2. Comparaison avec des études réalisées précédemment dans la Rade de Toulon sur les communautés de diatomées. ....	199
VI.3 Rôle de l'énergie de surface. ....	201
VI.4. Rôle de la composition en biocides des peintures AF. ....	202
<b>VII. Relations biofilms - macrofouling dans la rade de Toulon .....</b>	<b>204</b>
<b>VIII. Représentativité du bio-essai anti-adhésion .....</b>	<b>206</b>
VIII.1. Relation entre CE <sub>50</sub> de molécules <i>in vitro</i> et N <i>in situ</i> .....	206
VIII.2. Revêtements <i>in vitro</i> vs <i>in situ</i> .....	208
<b>IX. Conclusion .....</b>	<b>210</b>
<b><i>CHAPITRE VI ActivitEs antimicrobiennes et anti-adhEsion d'extraits et de molEcules purifiées de plantes terrestres rEcoltEes au Venezuela .....</i></b>	<b><i>213</i></b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>215</b>
<b>II. Criblage de l'activité antimicrobienne d'extraits de plantes sur des souches pathogènes.....</b>	<b>216</b>
<b>III. Mise en place du bio-essais sur souches pathogènes en microplaques .....</b>	<b>218</b>
III.1. Croissance des souches .....	218
III.2. Densité d'ensemencement .....	219
III.3. Effet du DMSO sur les souches pathogènes.....	220
<b>IV. Inhibition de croissance et d'adhésion des souches pathogènes en microplaques</b>	<b>220</b>
IV.1. Identification spécifique d' <i>Espeletia</i> spp. (Frailejon) par chromatographie liquide.....	220
IV.2. Inhibition de la croissance et viabilité bactérienne .....	222
IV.2.1. Les extraits bruts .....	222
IV.2.2. Les composés purs extraits de la Failejon .....	224
IV.3. Inhibition de l'adhésion bactérienne. ....	227
<b>V. Inhibition de l'adhésion et de la croissance de souches marines .....</b>	<b>228</b>
V.1. Inhibition de l'adhésion des extraits bruts .....	228
V.2. Activités des produits naturels purifiés du Frailejon et de Lepechinia .....	230

<b>VI. Conclusion .....</b>	<b>232</b>
VI. 1. Les extraits bruts.....	232
VI. 2. Les composés purs du frailejon .....	234
<b><i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</i></b>	<b>237</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE .....</i></b>	<b>243</b>
<b><i>ANNEXES.....</i></b>	<b>269</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS: FIGURES

Figure 1: Formation du biofouling sur des surfaces immergées .....	7
Figure 2: (a) Baleine grise épiphytée par des balanes (b) <i>Laminaria hyperborea</i> (algue brune) colonisée par <i>Obelia geniculata</i> (Hydrozoaire) (c) Rochers colonisés par des invertébrés (anémones, ascidies etc.).....	8
Figure 3: Bio-salissures présentes (a) sur la coque d'un navire (b) sur des filets de pêche (c) sur des bouées dérivantes .....	10
Figure 4: Séquence générale de formation d'un biofilm bactérien . (1) Adhésion réversible, (2) adhésion irréversible, (3 et 4) maturation du biofilm (5) dispersion bactérienne de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (microscopie à transmission).....	12
Figure 5: Biofilm bactérien avec visualisation des EPS.....	14
Figure 6: Schéma optique d'un cytomètre en flux (type FACSCalibur) équipé de 2 sources d'excitation (un laser 488 nm et une diode rouge 635nm), 2 détecteurs de diffusion de la lumière (FSC et SSC) et 4 photomultiplicateurs FL1 (FITC=Fluorescein isothiocyanate FITC), FL2 (PE=Phycoerythrine), FL3 (CHL=Chlorophylle a) et FL4 (PC/APC= Phycocyanine/Allophycocyanine) .....	19
Figure 7: Mode d'action des peintures à matrice polymérique « dure » .....	25
Figure 8: Mode d'action des peintures à matrice polymérique « soluble ».....	25
Figure 9: Mode d'action des peintures à matrice polymérique auto-polissantes.....	26
Figure 10: Visualisation d'un biofilm (a) marqué au DAPI en microscopie à épifluorescence, (b) au SYTO RED61 (rouge) et au SYTO GREEN (vert) observé au CLBM, (c) biofilm mixte marqué à la GFP et RFP .....	40
Figure 11: Oxydation de la resazurine en resorufine permettant d'observer la viabilité cellulaire (bactéries mortes en bleu, bactéries vivantes en rose) .....	43
Figure 12: Schéma d'une chambre de flux permettant la formation d'un biofilm.....	44
Figure 13: (a) Lecteur de microplaque INFINIT 200 (TECAN), (b) Microplaque modifiée (CBD).....	46
Figure 14: Biofilm marqué au cristal violet (CV).....	48
Figure 15 : Spectre d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés pour les bio-essais.....	68
Figure 16: Localisation des trois sites d'isolement des bactéries marines étudiées.....	69
Figure 17 : Colonne de verre contenant le frailejon mouliné .....	73
Figure 18: Procédé de fractionnement de l'extrait brut de Frailejon .....	73

Figure 19: Coloration des bactéries (a) Gram positifs, (b) Gram négatifs .....	76
Figure 20: Mesure de l'angle de contact.....	79
Figure 21: Schéma d'ensemencement de la microplaque pour l'étude la toxicité des solvants	83
Figure 22 : Schéma d'ensemencement des microplaques .....	84
Figure 23 : Disposition des peintures dans la microplaque .....	87
Figure 24 : Schéma d'ensemencement de la microplaque pour l'étude de l'interaction des souches en biofilms mixtes .....	89
Figure 25 : Schéma de microplaque pour l'étude de l'inhibition de croissance en milieu liquide.....	91
Figure 26 : Radeau et système d'immersion des plaques dans la rade de Toulon .....	94
Figure 27 Calcul du biovolume des diatomées (a) cylindriques et (b) de <i>Licmophora</i> .....	99
Figure 28 : Courbe de croissance de quelques souches de la TC et d'une souche bretonne (D41) réalisée en VNSS à 20°C et à 120 rpm. ....	108
Figure 29 : Arbre phylogénique des souches méditerranéennes isolées (ADNr16S) .....	110
Figure 30 : Représentation graphique des résultats des trois types de mobilité pour chaque souche étudiée .....	111
Figure 31 : Pourcentages d'adhésion aux différents solvants (MATS, NaCl à 8,8 g.L <sup>-1</sup> ).....	113
Figure 32: Pourcentages d'adhésion aux différents solvants (MATS, NaCl à 36 g.l <sup>-1</sup> ) .....	113
Figure 33: Cinétique d'adhésion (IF) de la D41 à quatre temps et pour une gamme de densités d'ensemencement. ....	120
Figure 34 : Adhésion des bactéries (IF) à deux temps (15 et 24 h) pour les cinq souches marines testées.....	121
Figure 35: IF en fonction de la densité d'ensemencement pour les cinq souches étudiées ....	122
Figure 36 : Régression linéaire entre la densité d'ensemencement et l'IF lue pour les différentes souches étudiées .....	123
Figure 37: Courbe dose-réponse de l'effet du méthanol sur l'adhésion de la souche TC5 – Détermination de la CE <sub>90</sub> (μM).....	124
Figure 38: Corrélacion entre l'IF et le nombre de bactéries dénombrées par microscopie inversée à épifluorescence dans les microplaques.....	125
Figure 39: Exemples de courbes dose-réponse sigmoïdes et de détermination de la CE <sub>50</sub> pour deux souches (TC8 et TC5) avec deux biocides différents (TBTO et TFA-Z).128	
Figure 40 : CE <sub>50</sub> des biocides commerciaux sur les cinq souches étudiées.....	129
Figure 41: Exemple des trois types de pentes possibles avec le TBTO sur trois souches.....	131
Figure 42: CI <sub>50</sub> (a) et CL <sub>50</sub> (b) du TBTO et du SN pour les trois souches testées .....	133

Figure 43 : Exemple de courbes dose-réponse de l'inhibition de croissance (a) de la souche D41 et de la viabilité des souches D41 et TC5 en réponse au TBTO .....	133
Figure 44 : Courbes de croissance (a) de la souche D41 aux différentes concentrations de TBTO et phase exponentielle (b) permettant d'obtenir le taux de croissance ( $\mu_{max}$ )	134
Figure 45 : $CE_{50}$ des produits naturels en fonction des cinq souches.....	136
Figure 46: Représentation schématique des trois modes de lectures en fonction de la distance du positionnement du faisceau lumineux à l'intérieur du puits. (a) Excitation au centre du puits (lecture classique). (b) 3x3 excitations en carré à 1 mm du bord du puits. (c) 3x3 excitations en carré à 0,5 mm du bord du puits. ....	140
Figure 47 : Effet des peintures AF sur l'adhésion des trois souches en microplaque .....	142
Figure 48: IF des bactéries « pré-marquées » dans les microplaques pour chacune des quatre souches (4M6, D41, TC8 et TC5) avec trois fluorochromes (DAPI, SYTO 13 et SYTO RED 61) et à trois densités d'ensemencement ( $DO_{600nm}$ ). ....	145
Figure 49: Corrélacion entre l'adhésion bactérienne (IF) et la densité de bactéries « pré-marquées » introduites dans les puits.....	146
Figure 50: Courbes dose-réponse de l'effet du TBTO sur les souches pré-marquées .....	147
Figure 51 : Corrélacion entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC5 et 4M6 seules ou en co-culture.....	149
Figure 52: Corrélacion entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC5 et TC8 seules ou en co-culture .....	150
Figure 53: Corrélacion entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC5 et D41 seules ou en co-culture .....	151
Figure 54: Corrélacion entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries D41 et TC8 seules ou en co-culture .....	152
Figure 55 : Corrélacion entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries D41 et 4M6 seules ou en co-culture.....	153
Figure 56 : Corrélacion entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC8 et 4M6 seules ou en co-culture.....	154
Figure 57 : $CE_{50}$ obtenues pour la souche D41 avec les molécules (TBTO et Eleganolone) en solution ou en « coating ».....	157
Figure 58: Biomasse totale présente sur les sept revêtements immergés durant un mois .....	170
Figure 59 : Recouvrement des plaques après un mois d'immersion pour (a)PVC, (b) IT757 et (c) SL04A. ....	171
Figure 60: Cytogrammes correspondant aux bactéries hétérotrophes des biofilms.....	172

Figure 61 : Densité bactérienne déterminée par cytométrie en flux sur les revêtements immergés .....	172
Figure 62 : Densités des sous-groupes bactériens HNA et LNA présents sur les revêtements immergés. ....	174
Figure 63 : Pico-organismes autotrophes sur les revêtements SL04A et PVC après immersion (R1= « PC-CYAN », R2=PE-CYAN, R3=PicoEuk) .....	177
Figure 64 : Densités (cellules/cm <sup>2</sup> ) des différents groupes de pico-organismes autotrophes (PicoEuk, PE-CYAN et « PC-CYAN ») sur les revêtements immergés .....	178
Figure 65 : Densités (cellules/cm <sup>2</sup> ) des pico-organismes présents sur les sept revêtements immergés .....	179
Figure 66 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus à partir des extraits d'ADN provenant des sept revêtements immergés ainsi que de l'eau de mer prélevée sur le site.....	180
Figure 67 : Gel DGGE des produits de PCR des biofilms récupérés sur les sept revêtements immergés ainsi que de l'eau de mer prélevée sur le site .....	182
Figure 68: Représentation par MDS de la matrice de similarité correspondant aux communautés de biofilms sur les sept revêtements immergés : analyse qualitative. ....	183
Figure 69 : Représentation par MDS de la matrice de similarité correspondant aux communautés de biofilms sur les sept revêtements immergés : analyse semi-quantitative. ....	184
Figure 70: Nanoeucaryotes (R10) et pico-organismes (R8) sur le PVC après immersion.....	185
Figure 71 : Abondance des nanoeucaryotes sur les différents revêtements immergés .....	186
Figure 72 : Densités des diatomées sur les sept supports immergés .....	187
Figure 73 : Densités relatives des diatomées sur les sept substrats immergés.....	188
Figure 74 : Photographies de (a) <i>Licmophora spp</i> , isolée sur PVC (b) <i>Nitzschia sp</i> , isolée sur PVC (c) <i>Thalassionema sp</i> isolée sur NEX .....	189
Figure 75: Densités des diatomées (exprimées en biovolume = cm <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup> ) sur les sept substrats immergés.....	191
Figure 76 : Densités relatives des diatomées (exprimées en biovolume) sur les sept substrats immergés .....	193
Figure 77: Densité globale des micro-organismes présents dans les biofilms sur les sept revêtements immergés durant 1 mois .....	194
Figure 78: Relations entre l'abondance bactérienne sur les supports immergés et l'abondance (a) des diatomées (R <sup>2</sup> =0,61, p<0,05, n=7) et (b) des pico-organismes	

(R <sup>2</sup> =0,57, p<0,05, n=7), (c) entre les diatomées et le pico-organisme (R <sup>2</sup> =0,476, p>0,05, n=7), (d) entre les bactéries et les nanoeucaryotes (R <sup>2</sup> =0,79, p<0,05, n=7), (e) entre les nanoeucaryotes et les diatomées (R <sup>2</sup> =0,56, p>0,05, n=7) et (f) entre les nanoeucaryotes et les pico-organismes (R <sup>2</sup> =0,93, p<0,05, n=7) .....	195
Figure 79: Comparaison des densités de Bacillariophycées récupérées après deux, quatre et six semaines d'immersion. ....	200
Figure 80 : Comparaison de l'indice de Shannon des diatomées sur quatre revêtements pour des temps d'immersion différents dans la rade de Toulon.....	201
Figure 81: Efficacité des sept revêtements par rapport au macrofouling au bout de 12 mois d'immersion.....	205
Figure 82 : Corrélation entre les macro-organismes et les micro-organismes. (a) Bactéries, (b) Pico-organismes (c) Nanoeucaryote et (d) Diatomées .....	205
Figure 83: Effet des biocides utilisés en laboratoire sur l'inhibition des macro-organismes dans le milieu naturel à 6 mois d'immersion.....	206
Figure 84: Classes d'efficacité pour les souches bactériennes et le macro-fouling .....	208
Figure 85 : Relation entre l'abondance des (a) bactérienne, (b) diatomées (c) pico-organismes (d) nanoeucaryotes récoltés sur les supports immergés et l'adhésion de la D41 .....	209
Figure 86 : Répartition des revêtements en quatre classes d'efficacité.....	210
Figure 87: Courbes de croissance des souches en milieu liquide. ....	219
Figure 88: Chromatogrammes des fractions acide (a) et neutre (b) des Frailejones récoltées ( <i>E. schultzi</i> ).....	221
Figure 89: CI <sub>50</sub> des extraits bruts sur les deux souches pathogènes testées.....	223
Figure 90: CI <sub>50</sub> des composés purifiés de la Frailejon sur deux souches pathogènes .....	226
Figure 91 : CE <sub>50</sub> des extraits bruts et des fractions sur les trois souches marines étudiées ....	228

## TABLE DES ILLUSTRATIONS: TABLEAUX

Tableau 1: Les biocides commerciaux -----	61
Tableau 2 : Les produits naturels marins -----	62
Tableau 3: Les extraits bruts-----	64
Tableau 4: Les produits purs et dérivés d'Espeletia schultzei et de Lepechinia bullata -----	65
Tableau 5 : Programme PCR pour l'amplification de l'ADNr 16S des bactéries marines ----	75
Tableau 6 : Programme PCR -----	96
Tableau 7 : Les différentes méthodes de récupération des souches formant la Toulon Collection (TC) et leurs caractéristiques macroscopiques. -----	104
Tableau 8 : Résultats des mises en culture des TC dans deux milieux liquides, le VNSS et le MB (20°C, 120 rpm) -----	105
Tableau 9 : Récapitulatif des caractéristiques des souches bactériennes TCs, 4M6 et D41 --	107
Tableau 10 : Détermination des paramètres de croissance des souches « pionnières » (n=2)	109
Tableau 11: Paramètre de la régression linéaire entre la densité d'ensemencement ( $DO_{600nm}$ ) et l'IF lue pour les cinq souches étudiées-----	123
Tableau 12 : Effet anti-adhésion des solvants utilisés pour la solubilisation des molécules sur les souches étudiées-----	124
Tableau 13 : Corrélation entre l'IF et le nombre de bactéries dénombrées par microscopie inversée à épifluorescence dans les microplaques -----	125
Tableau 14 : Effet des biocides commerciaux sur l'adhésion des cinq souches marines -----	128
Tableau 15: ANOVA à 2 facteurs et post-test de Bonferroni: interactions entre souches et biocides commerciaux. -----	130
Tableau 16 : Toxicité du TBTO et du SN sur les trois souches étudiées. -----	132
Tableau 17 : Effet anti-adhésion des molécules naturelles d'origine marine ou dérivés de synthèse sur les cinq souches de bactéries « pionnières » -----	136
Tableau 18 : Analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs et post test Bonferroni: interactions entre souches et substances naturelles et de synthèses-----	137
Tableau 19 : $CE_{50}$ des produits naturels isolés de Dictyota sp. -----	138
Tableau 20 : Indice de sélectivité (IS) des composés actifs en anti-adhésion-----	139
Tableau 21 : IF moyenne pour les 3 différents modes de lecture sur les souches 4M6 et TC8 pour 5 peintures AF et le témoin (PS)-----	141

Tableau 22 : Inhibition de l'adhésion de trois souches bactériennes par les cinq peintures AF interprétables en microplaque (n=2)-----	142
Tableau 23: Angle de contact des peintures AF. -----	143
Tableau 24: Corrélation entre l'énergie de surface des peintures et l'adhésion bactérienne in vitro souche par souche. -----	143
Tableau 25 Corrélation entre l'adhésion bactérienne et la densité de bactéries « pré- -----	146
Tableau 26 : Effet du TBTO sur l'adhésion des souches pré-marquées -----	147
Tableau 27 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries TC5 et 4M6 seules ou en co-culture-----	149
Tableau 28: Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries TC5 et TC8 seules ou en co-culture-----	150
Tableau 29 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries TC5 et D41 seules ou en co-culture-----	151
Tableau 30 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries D41 et TC8 seules ou en co-culture-----	152
Tableau 31: Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries D41 et 4M6 seules ou en co-culture-----	153
Tableau 32 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries 4M6 et TC8 seules ou en co-culture et le blanc de la microplaque -----	154
Tableau 33 : CE <sub>50</sub> des tests anti-adhésion en « biofilms » mixtes avec le TBTO et l'éléganediol -----	155
Tableau 34: Ratio et significativité de la différence (T test non apparié) entre les densité de bactéries LNA et HNA pour les revêtements immergés. -----	173
Tableau 35: Comparaison entre les données obtenues lors de l'analyse de l'échantillon d'eau de mer avec et sans traitement permettant la dissociation du biofilm pour les quatre groupes d'organismes analysés. -----	177
Tableau 36: Diversité relative (H') déterminée pour chaque revêtement immergé -----	185
Tableau 37: Densité totale, indice de diversité (H') et espèces dominantes (>25%) et sub-dominantes (25%>10) des diatomées sur les revêtements immergés. -----	189
Tableau 38 : Comparaison des dominances relatives des espèces dominantes et sub-dominantes en abondances et en biovolumes. -----	192
Tableau 39 : Corrélation entre les organismes des biofilms présents sur les supports immergés et l'énergie de surface -----	202
Tableau 40 : Composition en biocides des peintures AF étudiées. -----	203

Tableau 41 : Corrélation entre les analyses obtenues en laboratoire et l'indice de macrofouling après six mois d'immersion (N6 mois bis, sans les biocides A4s et CuSO <sub>4</sub> , R <sup>2</sup> =corrélation de Pearson. -----	207
Tableau 42 : Transposition des valeurs obtenues en laboratoire et in situ en termes de classe	207
Tableau 43: Corrélation entre le % d'adhésion obtenu en laboratoire sur trois souches de bactéries et les différentes composantes des biofilms sur les coupons immergés ---	208
Tableau 44: Extraits bruts actifs de plantes vénézuéliennes. -----	216
Tableau 45 : Criblage de l'activité antibactérienne en antibiogramme -----	217
Tableau 46: Détermination des paramètres de croissance des souches pathogènes en milieu BHI à température ambiante et sans agitation (n=2) -----	219
Tableau 47 : Effet du DMSO sur le taux de croissance des bactéries pathogènes -----	220
Tableau 48: CI <sub>50</sub> des extraits bruts de plantes du Venezuela sur SA et BS -----	222
Tableau 49 : concentration maximale sans effet observé sur les deux souches pathogènes étudiées -----	224
Tableau 50: Inhibition de la croissance des produits purs ou dérivés du Frailejon sur deux souches pathogènes -----	225
Tableau 51 : Concentration maximale sans effet observé (CSEO) des composés purifiés de la Frailejon sur SA et BS -----	227
Tableau 52: Effet anti-adhésion (CE <sub>50</sub> ) d'extraits de plantes originaires du Venezuela sur trois souches marines (n=2) -----	229
Tableau 53 : Analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA): interactions entre les souches et biocides -----	230
Tableau 54 : CE <sub>50</sub> des produits naturels purifiés du Frailejon sur trois souches de bactéries marines -----	231

## **ABREVIATIONS**

AF :Antifouling

A3S: A3Speend

A4S : Preventol

ASW : Artificial Sea Water (eau de mer artificielle)

CV : Cristal Violet

DAPI : 4'6'-diamidino-2-phénylindole

DGGE : Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant

DO : Densité Optique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

CE<sub>50</sub> : Concentration effective d'inhibition à 50%

CI<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice à 50%

CL<sub>50</sub> : Concentration létale qui provoque 50% de mortalité de la population considérée.

HNA : Quantité élevée en acide nucleique

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IF : Intensité de Fluorescence

IG : Irgarol

IS360 : Intersmooth 360

IT757 : Interleek 757

LNA: Quantité faible en acide nucleique

MATS: Microbial Adhesion To Solvents

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

NEX : Nexxium

OTU : Operational Taxonomic Units

PC-CYAN : cyanobactéries riche en phycocyanine

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaine par polymérase)

PE-CYAN : cyanobactéries riche en phycoérythrine

PS : Polystyrène

SN : Sea Nine

SQT : Seaquantum

TC : Toulon collection

TBTO : oxyde de tributylétain

# **INTRODUCTION GENERALE**



### *Quand les phénomènes naturels deviennent des problèmes économiques...*

Depuis l'apparition de la vie dans les zones aquatiques, elle n'a cessé de se diversifier et de se complexifier. Cependant, vivre dans un milieu complexe où la viscosité est maître a conduit certains organismes à vivre fixés pendant que d'autres se déplacent librement dans la colonne d'eau. En outre, les mers ainsi que les océans, et plus particulièrement au niveau des zones côtières, présentent des surfaces « dures » telles que les rochers ou les récifs coralliens qui peuvent servir de supports aux organismes sessiles. La compétition interspécifique pour l'espace est telle que la fixation se produira également sur des organismes vivants tels que des macro-algues, des invertébrés (éponges...) et des vertébrés marins (baleines...), créant ainsi de nombreuses relations entre les organismes colonisateurs et leurs basibiontes (Railkin 2004). C'est pourquoi il est tout naturel qu'au moment de l'introduction d'une surface artificielle dans les milieux marins, celle-ci soit colonisée par des organismes. Ce phénomène est alors qualifié de biofouling (Wahl 1989).

Cette colonisation va devenir un véritable problème pour les structures artificielles immergées (dégradations avec augmentation de la corrosion, augmentation de la trainée hydrodynamique et donc de la consommation de carburant et des coûts de nettoyage pour les navires, dérive du matériel scientifique), entraînant ainsi un déclin de leurs fonctionnalités et de leur durabilité. C'est pourquoi de nombreuses techniques physiques (traitement UV, grattage régulier des surfaces) ou chimiques (biocides) ont été mises en place pour limiter ce phénomène (Compère 1999; Yebra et al. 2004).

### *Un peu d'histoire...*

Depuis que l'Homme a utilisé les voies fluviales comme moyen de locomotion, le problème du biofouling est apparu. Celui-ci est d'ailleurs combattu depuis plus de 2000 ans par l'application de cire, de goudron ou d'asphalte. Les premiers à utiliser le cuivre comme revêtement furent les Phéniciens et les Carthaginois. Il semblerait même que le plomb était déjà été utilisé comme antifouling par les Phéniciens 700 ans av. J.C. Par la suite, des revêtements contenant de l'arsenic et du soufre mélangé avec de l'huile pouvaient être utilisés contre l'agrégation de vers tubicoles. Du XIII<sup>ème</sup> ou XV<sup>ème</sup> siècle, le bitume lié à des résines, des huiles ou encore du suif ont été essentiellement employés. Puis au XIX<sup>ème</sup> siècle, les premières peintures à base de métaux (oxyde de cuivre, goudron...) dispersés dans un polymère apparaissent et vont être utilisées jusqu'à la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle. Après la seconde guerre mondiale, de grands changements se mettent en place dans

l'industrie des peintures antifouling (AF) grâce à l'arrivée des résines synthétiques, mais surtout à celle des composés organométalliques tels que le tributylétain (TBT) et ses dérivés. C'est à cette même période que les différents types de peintures, à savoir les peintures à matrices solubles ou dures ainsi que les auto-polissantes, ont été mises en place. Ces trois types de revêtements sont toujours en vigueur mais ce sont les peintures auto-polissantes qui sont le plus couramment utilisées (Yebra et al. 2004, Almeida et al. 2007). Néanmoins, il s'est avéré que les biocides utilisés jusqu'à présent avaient des effets néfastes pour l'environnement et plus particulièrement le TBT et tous ses dérivés. En effet, ces composés sont bioaccumulables et peuvent entraîner des dérives génétiques sur un large spectre d'organismes marins. Par conséquent l'organisation maritime internationale (IMO) a décidé d'interdire à partir de 2008 l'application de revêtements à base de TBTO pour tout type de navire. D'autres biocides tels que l'Irgarol sont également interdits dans certains pays de l'Union Européenne. D'où l'importance de trouver de nouvelles alternatives plus respectueuses de l'environnement (Chambers et al. 2006)

#### *L'espoir d'un avenir plus propre...*

De nouvelles stratégies ont donc été mises en place pour trouver un substitut à ces biocides. Une première approche consiste à éliminer ces biocides et à jouer sur les mécanismes d'adhésion en modifiant les propriétés physico-chimiques des supports. En effet, des revêtements extrêmement lisses à base de silicone ont, par exemple, été mis en place, limitant ainsi l'adhésion des organismes. Une seconde approche se base sur la découverte de nouvelles substances actives issues d'organismes marins (macro-algues, ascidies, éponges...) ou terrestres (châtaigner, poivre) montrant peu ou pas de colonisation. En effet, il est raisonnable de penser que si ces organismes ne sont pas epiphytés, c'est que certains d'entre eux produisent des métabolites secondaires limitant la fixation d'autres êtres vivants à leur surface (de Nys & Steinberg 2002, Xu et al. 2005). Dans tous les cas, il faut disposer d'outils en laboratoire, « représentatif » du milieu marin, pour cribler les molécules ou les revêtements candidats. C'est pourquoi le principal objectif de cette thèse va être la mise en place et le développement d'un bio-essai robuste en microplaque permettant de réaliser un criblage rapide de substances actives et de revêtements potentiellement non toxiques pour l'environnement.

# **CHAPITRE I**

## **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



**I. Le biofouling en milieu marin**

Le biofouling est un processus naturel de colonisation des surfaces qui se produit en particulier sur tout support inerte ou vivant immergé dans l'eau. Il se définit comme étant une accumulation structurée d'organismes vivants allant des bactéries aux invertébrés marins. (Yebra et al. 2004).

**I.1. Formation et développement du biofouling**

Le biofouling est un phénomène principalement aquatique, d'eau douce ou salée, qui peut aussi se produire en milieu terrestre dans des environnements humides. Des biofilms constitués de bactéries, de champignons et de cyanobactéries, se retrouvent souvent sur divers monuments historiques situés dans des zones géographiques humides telles que l'Ecosse (Suihko et al. 2007) ou sur les sites archéologiques Maya du Yucatan (zone tropicale du Mexique) (Videla et al. 2000). Néanmoins, ce processus est beaucoup moins intense en milieu terrestre, de par le fait que l'air est pauvre en ressources nutritives. Les milieux visqueux ou turbides sont plus défavorables à la vie. Cela peut nécessiter quelques adaptations. Par conséquent, les organismes de petite taille vont préférer vivre attachés à des supports. Cette colonisation semble suivre une séquence assez précise, indépendamment du substrat et des espèces colonisatrices présentes dans le milieu. Cela signifie que ce phénomène correspond bien à une implantation séquentielle d'organismes, interagissant entre eux, et non à un processus aléatoire. Cette bioaccumulation peut être résumée globalement en quatre étapes successives (Wahl 1989) (Figure 1).

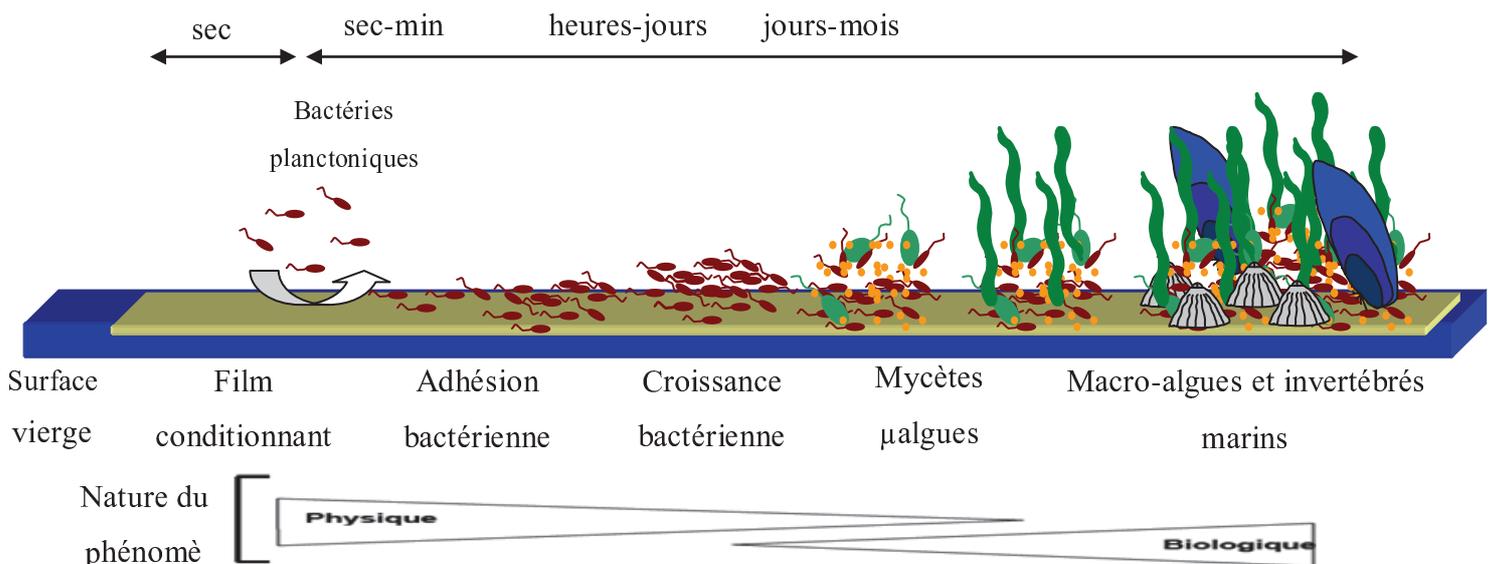


Figure 1: Formation du biofouling sur des surfaces immergées (Wahl 1989, Haras 2005)

La première étape correspond au « conditionnement » biochimique du substrat, qui facilite l'adhésion des bactéries sous la contrainte de phénomènes physiques essentiellement. Ensuite, le biofilm primaire se structure avec la sécrétion de substances polymériques et d'autres micro-organismes unicellulaires hétérotrophes et autotrophes qui vont complexifier le biofilm. Finalement, les eucaryotes pluricellulaires vont adhérer principalement via des processus biologiques (communication, présence des autres espèces...) (Wahl 1989, Huang & Hadfield 2003). Cette agrégation naturelle va avoir des conséquences pour les supports d'adhésion colonisés.

## I.2. Conséquences économiques et écologiques liées au biofouling

### I.2.1. Sur des supports naturels inertes ou vivants.

Le biofouling peut non seulement concerner des substrats rocheux mais également certains organismes sessiles (algues, éponges, ascidies, etc ...) ou libres (baleines, crustacés) (Figure 2). Ces organismes sont considérés comme des basibiontes, alors que les organismes colonisateurs sont appelés épibiontes. Ces derniers peuvent se diviser en deux groupes : les épiphytes qui se fixent sur des végétaux et les épizoaires qui se fixent sur les espèces animales (Wahl & Mark 1999)

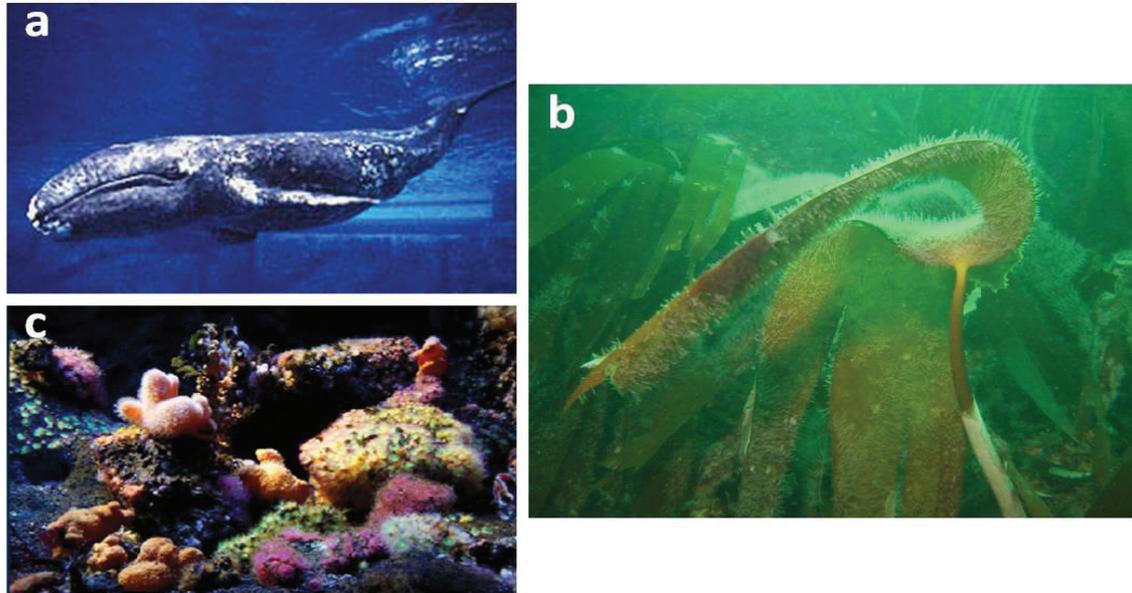


Figure 2: (a) Baleine grise épiphytée par des balanes ([www. ushuaia.com](http://www.ushuaia.com)) (b) *Laminaria hyperborea* (algue brune) colonisée par *Obelia geniculata* (Hydrozoaire) ([www.corynactis.org](http://www.corynactis.org)) (c) Rochers colonisés par des invertébrés (anémones, ascidies etc...) ([www. aquarium-larochelle.com](http://www.aquarium-larochelle.com))

Le biofouling correspond donc à une composante essentielle de la diversité des écosystèmes aquatiques. Il permet la naissance de nouveaux biotopes, servant de refuge et de réserve de nourriture pour de nombreux organismes. La pression de compétition pour l'espace est forte dans le milieu marin et pouvoir coloniser différents types de substrats peut favoriser le développement d'une espèce. Le fait de vivre sur un organisme mobile peut augmenter l'hydrodynamisme des épibiontes, permettant une meilleure pénétration de l'eau ainsi qu'une oxygénation supérieure du biofilm. En plus de cela, les organismes fixés pourront profiter de la protection de leurs hôtes face à une forte pression de prédation (Wahl 1989). Mais certains organismes sont plus colonisés que d'autres, comme par exemple les macro-algues vivants dans les zones eutrophes, là où la croissance des micro-organismes est optimale. Avant que cette fixation ne devienne trop oppressante pour l'hôte, certains basibiontes développent des stratégies pour réduire voire empêcher leur colonisation (Fusetani 2004). Ces modes de défense peuvent être de quatre types : (i) Mécanique avec, par exemple, une modification des téguments externes. Pour cela les organismes peuvent produire du mucus, des aiguilles ou autres structures squelettiques. La vitesse de déplacement des organismes empêche la formation du biofouling. D'autres espèces pratiqueront la mue ou le grattage des épidermes. (ii) Physique par modification de l'énergie de surface de leur structure externe en devenant plus hydrophobe (Railkin 2004). (iii) Chimique par la production de métabolites secondaires qui sont des composés de faibles poids moléculaires (Abarzua et al. 1999, Lee et al. 2006), non indispensables au métabolisme primaire de l'organisme. Ces métabolites peuvent être de diverses classes chimiques mais ce sont souvent des composés terpéniques, phénoliques etc..... De plus, ces substances sont présentes dans divers organismes non colonisés, indiquant une origine ancienne et universelle (Railkin 2004). (iv) Comportementale par association à un autre organisme, capable de produire des métabolites secondaires. D'autres organismes préfèrent attirer le prédateur des épibiontes par libération d'un signal chimique (Wahl, 1989).

### ***1.2.2. Sur les structures artificielles immergées.***

Les « bio-salissures » ou « salissures », autres termes utilisés pour qualifier le biofouling quand il se produit sur des surfaces artificielles, causent de sérieux problèmes de pérennité et de fonctionnalité du matériel. Lorsque cette accumulation se produit sur la coque des navires, leurs poids ainsi que les forces de frottement augmentent, entraînant non seulement une perte de vitesse mais également une mauvaise manœuvrabilité. Il apparaît qu'un biofilm de un millimètre peut réduire la vitesse de 15% (Evans et al. 2000). Afin de

compenser cela, la consommation de carburant augmente parfois jusqu'à 50% (Löschau & Kratke 2005) induisant un coût économique supplémentaire ainsi qu'une émission plus importante de composés nuisibles pour l'environnement dont des gaz à effet de serre. Les périodes de carénage des navires peuvent entraîner des pertes de temps et d'argent considérables (Yebra et al. 2004, Piola et al. 2009, Figure 3a).

La fixation d'organismes favorise aussi la détérioration du matériel par augmentation de la corrosion, par altération de la mouillabilité et de la conductivité électrique. Lorsqu'elle se produit sur des échangeurs de chaleur, elle diminue le transfert de chaleur ainsi que la vitesse d'écoulement, augmentant la consommation en énergie. De plus, ces salissures s'accrochent sur le matériel océanographique immergé, perturbant les mesures des divers capteurs tels que les sondes de pH ou de température (Compère 1999) (Figure 3c). Cela peut également modifier la fiabilité des capteurs optiques marins (Kerr et al. 1998).

Quand le biofouling se produit sur les cages ou les filets des fermes aquacoles, il modifie la flottaison des cages et diminue la taille des mailles des filets (Figure 3b). Cela peut modifier les flux d'eau et réduire les échanges de nutriments, de déchets et d'oxygène causant ainsi une eutrophisation du milieu, qui entraîne une compétition inter- et intra-spécifique pour l'espace et pour la nourriture. Ces salissures peuvent affecter la santé des espèces élevées ainsi que celles du milieu environnant (Braithwaite & McEvoy 2004). Cependant, dans certaines conditions, la présence d'un biofilm « contrôlé » peut améliorer la fixation des bivalves ou des algues dans la pisciculture, voir même servir de nourriture ou de bio-filtre en absorbant le surplus de nutriments (Svane et al. 2006, Qian et al. 2007). Des renouvellements fréquents des filets d'aquaculture ainsi que des procédures de nettoyage régulier sont donc mises en place, augmentant les coûts de maintenance (Piola et al. 2009).

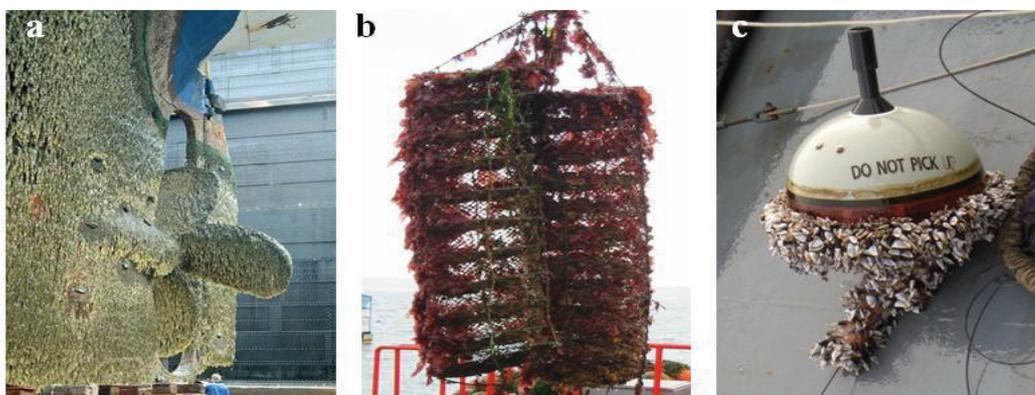


Figure 3: Bio-salissures présentes (a) sur la coque d'un navire (blogs. creamoselfuture.com)

(b) sur des filets de pêche (lyricsdog.eu) (c) sur des bouées dérivantes

([www.aoml.noaa.gov](http://www.aoml.noaa.gov))

Le va-et-vient constant des navires au niveau mondial ainsi que la vidange des eaux de ballast sont à l'origine de l'introduction d'espèces allochtones pouvant devenir invasives. En effet certains organismes sont capables de supporter le transport en dehors de leur zone de répartition naturelle. Ils peuvent former et propager une population viable dans un nouvel environnement souvent dépourvu de prédateur spécifique, et cela au détriment des organismes autochtones, engendrant quelques fois la disparition de certaines d'entre elles. En outre ces espèces allochtones semblent plus résistantes aux diverses substances toxiques présentes dans l'eau leur permettant un développement et un maintien rapide dans les ports, lieux particulièrement pollués (Piola et al. 2009).

## **II. Formation et développement du biofilm**

L'étude des biofilms s'est largement étendue ces dernières années étant donné leurs effets néfastes dans le domaine de la santé publique (responsables de nombreuses maladies nosocomiales ou d'infections des implants prothétiques) (Ren et al. 2002, Boschini et al. 2004) et de l'industrie (agroalimentaire, particulièrement l'industrie laitière et fromagère) (Kumar & Anand 1998). Zobell (1943) a été le premier à observer que les bactéries préféraient vivre en communautés fixées sur un support plutôt qu'en suspension. C'est à la fin des années 70 que le terme de biofilm est utilisé pour la première fois. Il est défini comme étant une communauté fixée et structurée de cellules bactériennes enfermées dans une matrice polymérique. A présent, le biofilm bactérien est considéré comme étant un assemblage cellulaire bactérien, fixé de manière irréversible à une interface (solide/liquide; liquide/gaz), entouré par des substances polymériques extracellulaires (EPS pour exopolymeric substances) autoproduites par les bactéries et présentant un phénotype différent de celui des bactéries planctoniques (Donlan 2002). Ce mode de vie est prédominant dans de nombreux environnements. Il semble en effet que plus de 99% des bactéries se développent en biofilm (Donlan & Costerton 2002). Il a aussi été remarqué que des mécanismes de communication intra- ou interspécifique entre les bactéries présentes au sein du biofilm s'effectuaient grâce à la présence de molécules auto-induites regroupées sous le terme de « quorum sensing » (QS) (Ren et al. 2002, Dobretsov et al. 2007).

La formation du biofilm est un phénomène dynamique et complexe qui fait intervenir des processus chimiques, physiques et biologiques, et sa formation s'effectue en plusieurs étapes (Figure 4).

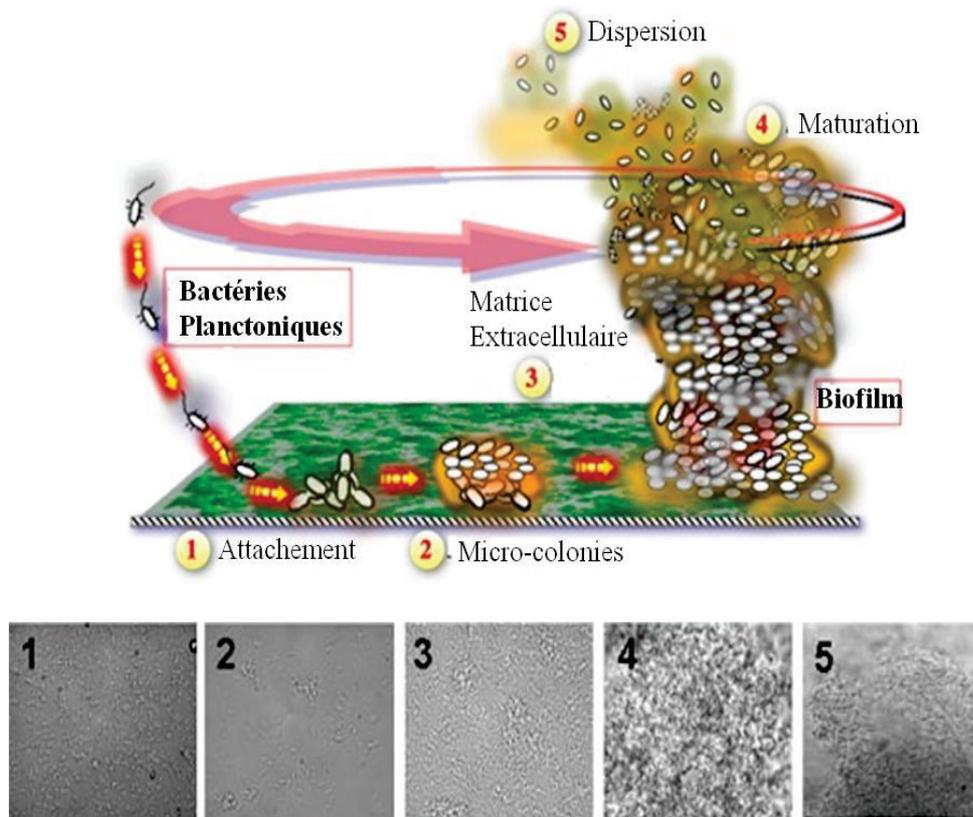


Figure 4: Séquence générale de formation d'un biofilm bactérien ([www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr)). (1) Adhésion réversible, (2) adhésion irréversible, (3 et 4) maturation du biofilm (5) dispersion bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* (microscopie à transmission d'après Sauer et al. 2002)

### II.1. Conditionnement des substrats immergés et approche des bactéries.

Le film conditionnant se forme dans tous les systèmes humides existants, tels que les milieux aquatiques, les tissus organiques, ou encore la plaque dentaire (Donlan 2002). Ce processus se réalise, immédiatement après l'immersion, par adsorption de molécules organiques et inorganiques situées à faible distance du support. La composition va non seulement dépendre de la nature du substrat, mais également des éléments présents dans le milieu naturel (Compère et al. 2001). En effet, des analyses spectrales infrarouges ont déterminé que ce film conditionnant est généralement composé de protéines, de peptides, de sucres, de lipides, de polysaccharides, d'acides humiques, d'acides amino-aromatiques et de sels minéraux. Ces molécules vont alors conférer au support de nouvelles propriétés physico-chimiques, par modification de la charge nette ainsi que de l'énergie libre de surface (mouillabilité) (Kumar & Anand, 1998). Cela va permettre l'adhésion des bactéries situées à proximité du substrat. Cette approche peut se faire de diverses manières : (i) par

transport diffus ou passif : l'adhésion dépend de la somme des forces attractives et répulsives, ainsi que des mouvements browniens, permettant aux bactéries d'être projetées sur le support. Cela n'est réalisable que si la bactérie est suffisamment proche du substrat ( $\approx 1\text{nm}$ ) (Dunne 2002). Il est à noter que les forces électrostatiques jouent plutôt le rôle de répulsif étant donné que la majorité des supports et des bactéries sont chargées négativement. L'adhésion peut aussi être influencée par des effets thermodynamiques (Hori & Matsumoto 2010). (ii) Par transport actif : la bactérie se propulse sur le support à l'aide d'appendices tels que des flagelles ou des pili, lui permettant de sonder et donc de choisir le support (Dunne 2002, Hall-Stoodley & Stoodley 2002). Mais ces appendices ne sont pas toujours nécessaires puisque l'adhésion peut aussi s'effectuer par chimiotactisme.

### **II.2. L'adhésion réversible (Figure 4: 1)**

Une fois que la bactérie s'est rapprochée du support, un attachement transitoire est mis en place. La bactérie « évalue » la nature du film conditionnant et si celui-ci ne lui convient pas, elle redevient planctonique. Cette adsorption fait alors intervenir des liaisons chimiques non covalentes de type van der Waals, électrostatiques ou encore acide-base de Lewis. La rugosité du support va également influencer sur l'adhésion bactérienne. La fixation est possible grâce à la présence de macromolécules de surface présentes sur la bactérie. Ces molécules peuvent être des protéines telles que les fibronectines, les polysaccharides et les lipopolysaccharides (O'Toole & Kolter 1998). L'adhésion dépend de l'hydrophobicité de la surface cellulaire mais aussi du support (Donlan 2002, Dunne 2002). Les appendices tels que les flagelles ou les pili de type I et IV sont également impliqués dans cette fixation. Il a été démontré notamment que les pili de type IV permettent le déplacement le long du support puis diminuent une fois le biofilm formé (Heydorn et al. 2002). Cette phase d'adhésion est réversible, le biofilm peut être facilement altéré voire éliminé.

### **II.3. L'adhésion irréversible (Figure 4 :2)**

Les bactéries vont s'agréger pour former des micro-colonies et sécréter des EPS afin de consolider leur fixation. Pour cela, elles vont former des liaisons entre elles et le support ou avec d'autres micro-organismes par l'intermédiaire de molécules spécifiques, situés dans les appendices cellulaires tels que les pili de type IV, généralement présents chez les bactéries Gram négatif. Cependant, ils ne semblent pas indispensables puisque des micro-organismes non mobiles peuvent former des micro-colonies par divisions cellulaires et

interactions de type hydrophobe. L'adhésion devient alors irréversible et seule une force extérieure pourra éliminer le biofilm de sa surface (An & Friedman 1997, Dunne 2002).

#### II.4. Croissance et maturation du biofilm bactérien (Figure 4 : 3 et 4)

Lors de cette étape, le biofilm commence à croître, les bactéries se divisent et créent des colonies de plus en plus étendues sur le support, jusqu'à devenir un biofilm mature. La matrice d'EPS, également appelée glycocalyx, va occuper entre 50 et 90% du volume total du biofilm mature (Haras 2005) (Figure 5). Les EPS possèdent des propriétés physico-chimiques et une composition variée, en fonction du genre bactérien, de l'âge du biofilm ainsi que des facteurs environnementaux. Ils se composent majoritairement de protéines et de polysaccharides, neutres ou poly-anioniques pour les bactéries à Gram négatif, et plutôt cationiques pour certaines bactéries à Gram positif (Donlan 2002, Dunne 2002). Certaines bactéries telles que *Bacillus subtilis* sécrètent d'autres types de polymères extracellulaires tels que l'acide poly -DL-glutamique également impliqué dans la formation du biofilm (Stanley & Lazazzera 2005). Les EPS peuvent aussi contenir des lipides et des acides nucléiques qui peuvent influencer les propriétés rhéologiques et donc la stabilité du biofilm (Simões et al. 2010). Il est également possible d'y trouver des matériaux non cellulaires comme des cristaux, des particules corrosives, de la boue ou de l'argile, en fonction du milieu dans lequel le biofilm se développe.

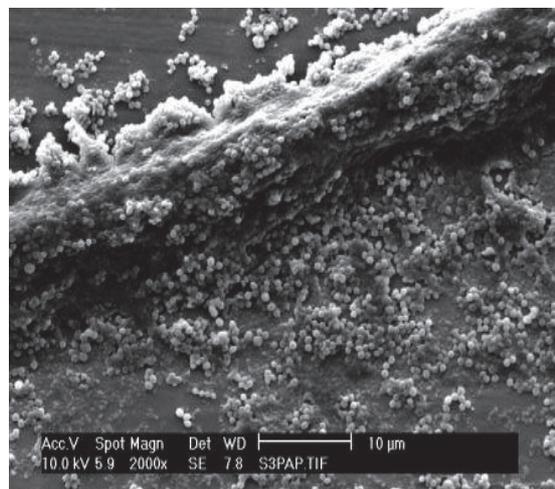


Figure 5: Biofilm bactérien avec visualisation des EPS ([www.nexidia.fr](http://www.nexidia.fr))

Cette matrice est hautement hydratée grâce aux liaisons hydrogènes qui rendent le biofilm visqueux et élastique, lui conférant une forme de gel stable. Certains EPS sont hydrophobes mais, la plupart du temps, ils sont amphiphiles. Les EPS contenant plus de

polysaccharides, de protéines et de lipides se trouvent préférentiellement sur des supports de faibles énergies de surface. Ceux constitués de polysaccharides acides ou neutres adhèrent plus facilement sur des supports hydrophiles (Beech et al. 2005). Cette matrice facilite le transport des nutriments, des toxines et de l'oxygène entre les colonies (Dunne 2002, Filloux & Vallet 2003, Haras 2005). Elle confère aux micro-organismes une meilleure protection vis-à-vis de la prédation ou des molécules antimicrobiennes, en agissant comme un filtre capable de ralentir le transport des molécules au centre du biofilm (Donlan 2002). Les EPS sont également impliqués dans le détachement des bactéries des biofilms matures ainsi que dans la structuration du biofilm. Il a été démontré que certaines souches mutantes ne produisant plus d'EPS ne forment que des biofilms monocouches et donc empêchent la formation tridimensionnelle du biofilm (Donlan 2002, Hall-Stoodley & Stoodley 2002). Cependant, la croissance du biofilm se fait de manière exponentielle en fonction de la disponibilité des nutriments, elle-même influencée par le milieu environnant. Si le milieu est pauvre, le biofilm se développe sous forme de petits amas cellulaires mais, si le milieu est riche, sa répartition se fera par arrangement tridimensionnel hétérogène en forme de « champignon ». Le mouvement des fluides influence aussi l'architecture du biofilm, en la rendant plus ou moins solide (Donlan 2002, Dunne 2002).

### **II.5 Dispersion bactérienne (Figure 4 : 5)**

Quand le biofilm a atteint une certaine densité et un certain degré de complexité dans sa structuration, les cellules bactériennes peuvent se détacher et retourner à une vie planctonique. Il est possible que ce détachement soit lié à un changement environnemental ou simplement induit par son vieillissement. En effet si les conditions de croissance deviennent défavorables (manque de nutriment ou mauvaise oxygénation du biofilm par exemple), les bactéries se détachent afin de trouver un lieu plus propice à leur développement. Ce phénomène de dispersion peut être impliqué dans la colonisation de nouveaux milieux ainsi que dans la réinitialisation d'un nouveau biofilm. Le décrochage des bactéries peut se faire de manière passive en liaison avec les forces physiques présentes dans le milieu (limite de la disponibilité d'oxygène ou de nutriments), ou de manière active lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables. Dans ce dernier cas, le contrôle est assuré par des mécanismes biologiques, notamment lié à des enzymes. Les cellules viables migrent alors vers des environnements plus favorables (Donlan 2002, Sauer 2004).

## **II.6. Abondance et diversité des communautés microbiennes des biofilms.**

### ***II.6.1. Outils d'études***

#### **II. 6.1.1. La Microscopie**

Le dénombrement bactérien peut s'effectuer sous microscope à épifluorescence droit ou inversé par l'intermédiaire de marqueurs tel que le DAPI (4'6'-diamidino-2-phenylindole) ou l'Acridine orange (AO). Cette méthode permet de déterminer l'abondance des micro-organismes présents dans le biofilm (Hannig et al. 2007, Molino et al. 2009a). Les différents types de microscopies ainsi que les marqueurs utilisés pour le dénombrement seront détaillés dans le Chapitre I-V.I. Le dénombrement des diatomées et autres micro-algues qui sont des micro-organismes autofluorescents peut aussi se faire par épifluorescence (Molino et al. 2009b, Pelletier et al. 2009). La microscopie optique inversée est couramment utilisée pour l'identification d'organismes des diatomées (eg Nayar et al. 2005, Patil & Anil 2005, Molino et al. 2009b, Pelletier et al. 2009). Cependant, vu la très faible variabilité morphologique des procaryotes, les techniques microscopiques ne permettent ni d'identifier ces micro-organismes ni d'étudier leur diversité. Les outils classiques d'identification des bactéries pathogènes reposent sur la mise en culture et/ ou les caractéristiques biochimiques et physiologiques. En outre, elles ne permettent d'identifier que quelques familles d'organismes bien décrites et pas toujours au niveau spécifique. L'absence presque totale d'information sur la très grande majorité des micro-organismes présents dans les écosystèmes naturels limite l'utilisation de ces outils. Les techniques de microscopie par fluorescence ont pu être rendues plus spécifiques en les couplant à des outils moléculaires : Fluorescence *in-situ* Hybridization (FISH). Cette technique consiste à créer des sondes moléculaires fluorescentes en utilisant des ADN, ARN ou protéines cibles. Les sondes vont s'hybrider spécifiquement en présence des molécules cibles dans les échantillons et ainsi permettre de les identifier et quantifier sous microscope (cf Chapitre I - V.1). Cette technique nécessite de connaître une séquence spécifique ou bien seule la diversité au niveau des grands groupes bactériens pourra être obtenue. Un autre défaut de cette technique concerne sa sensibilité. Une méthode permettant d'améliorer cet aspect a été mise au point avec le CARD-FISH (CAlyzed Reporter Deposition - FISH) (Dorigo et al. 2005)

#### **II. 6.1.2. Outils moléculaires**

Grâce à la continuelle évolution des techniques moléculaires, l'étude de la diversité microbienne des biofilms a beaucoup progressé ces dernières années. Les techniques les

plus employées actuellement en écologie microbienne sont basées sur les réactions en chaîne par polymérase (PCR : Polymerase Chain Reaction) qui permettent l'amplification de différentes régions d'ADN ou d'ARN après extraction d'échantillons de l'environnement. Les amplicons peuvent ensuite être analysés en termes de diversité via les techniques d'empreintes moléculaires utilisant diverses analyses électrophorétiques : la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) correspond à une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant, la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) correspond à une analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction des amplicons ou encore l'ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses) qui consiste à analyser des fragments de restriction de l'ADN ribosomal amplifié. Ces 3 techniques ont été utilisées en écologie marine des biofilms. Cependant il existe aussi d'autres techniques similaires comme la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ou l'ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) par exemple (Dang & Lovell 2000, Dorigo et al. 2005). En plus de l'absence d'identification des taxa et des biais liés aux problèmes d'extraction d'ADN et de PCR communs à ces techniques, les approches par empreintes génétiques comportent également des limites telles que la sous-estimation de la diversité, voire même une mauvaise différenciation des organismes. Les amplicons peuvent aussi être clonés puis séquencés pour permettre l'identification des taxons au niveau spécifique et donc une meilleure évaluation de la diversité. Les techniques de puces à ADN (DNA chip, DNA-microarray, biochip) sont beaucoup utilisées dans le typage pour des applications médicales. Elles ont aussi été appliquées aux biofilms marins (PhyloChip, Chung et al. 2010). Il faut noter enfin que les techniques de métagénomiques actuellement en expansion peuvent permettre un séquençage sans amplification préalable.

### **II.6.1.3. Cytométrie en flux**

Bien que créée à l'origine pour des applications en microbiologie, la technique de cytométrie en flux (CMF) s'est surtout développée grâce à l'immunologie depuis une trentaine d'année, avec le développement des études sur le SIDA. Elle permet le comptage de cellules isolées qui sont entraînées dans un flux liquide. Les cellules autofluorescentes ou marquées avec un fluorochrome sont séparées et alignées les unes derrière les autres puis défilent à grande vitesse, de l'ordre de plusieurs milliers par seconde, au travers d'un ou plusieurs faisceaux lasers, dont le plus commun est le laser Argon bleu (488nm). Des signaux de diffusion et de fluorescence sont alors collectés pour chaque cellule (Figure 6). Les signaux de diffusion sont de deux types : diffusion aux petits angles (ou Forward Scatter

(FSC)) et diffusion à 90° par rapport à la direction de la source d'excitation (ou Side Scatter (SSC)). L'intensité du FSC est en relation avec la taille des particules (cellules) et correspond aux photons diffusés par les cellules selon un angle solide  $< 15^\circ$  le plus souvent. L'intensité du SSC va dépendre de la forme, de la structure interne et de la granularité des cellules. Des cellules de taille et/ou de forme variées vont donc émettre des intensités de FSC et SSC différentes. La discrimination optique des cellules va également pouvoir se faire par détection et quantification de fluorescence grâce à plusieurs photomultiplicateurs positionnés après un système de lentilles et de filtres (Collier 2000). Les cellules marquées à l'aide d'un fluorochrome (ex DAPI, PicoGreen<sup>®</sup>) vont être excitées par le laser approprié. Les organismes possédant des pigments fluorescents tels que la chlorophylle ou les phycobilines (phycoérythrine, (allo) phycocyanine) vont également être détectés grâce à leur caractère autofluorescent. Pour les marqueurs fluorescents qui se lient à l'ADN comme le DAPI, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans la cellule. La détection des signaux émis par les cellules se fait grâce à des photodétecteurs qui collectent les photons émis par les cellules lorsqu'elles traversent les sources lumineuses et les convertissent en un courant électrique. Ce courant est alors digitalisé grâce à un convertisseur analogique-digital. La valeur générée est alors enregistrée sur un ordinateur (Gregori 2001).

Les données enregistrées par chaque détecteur, pour chaque cellule analysée, sont alors croisées grâce à des graphiques (cytogrammes) générés afin de mettre en évidence l'information désirée. En effet, il est possible de coupler les analyses de diffusion (FSC ou SSC) avec les différents types de réponse en fluorescence permettant de différencier des populations de cellules en fonction de leur taille : le picoplancton regroupe les micro-organismes de taille  $< 2\mu\text{m}$  et les nanoeucaryotes dont la taille est comprise entre 2 et 20  $\mu\text{m}$  (Sieburth et al. 1978, Blanchot et al. 1998). Un logiciel dédié permet de collecter diverses statistiques (moyennes, médianes et autres) et de réaliser le dénombrement des groupes définis par des cellules aux propriétés optiques très proches. Il est également possible de comparer les différentes fluorescences entre elles afin d'identifier par exemple les picoeucaryotes (émission de fluorescence rouge et plus grande taille) des picocyanobactéries (émission de fluorescence orange et plus petite taille) (Collier 2000).

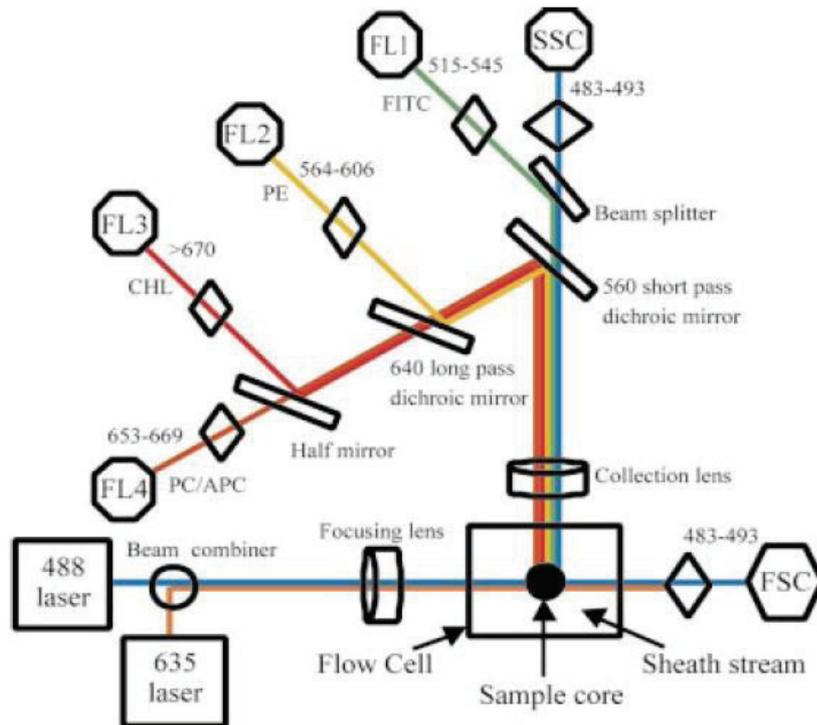


Figure 6: Schéma optique d'un cytomètre en flux (type FACSCalibur) équipé de 2 sources d'excitation (un laser 488 nm et une diode rouge 635nm), 2 détecteurs de diffusion de la lumière (FSC et SSC) et 4 photomultiplicateurs FL1 (FITC=Fluorescein isothiocyanate), FL2 (PE=Phycoerythrine), FL3 (CHL=Chlorophylle a) et FL4 (PC/APC=Phycocyanine/Allophycocyanine) (Collier 2000)

### II. 6.2. Influence des surfaces sur l'abondance microbienne

Les caractéristiques physico-chimiques des supports telles que l'hydrophobicité et donc l'énergie de surface, les forces thermodynamiques et la rugosité peuvent influencer sur l'adhésion bactérienne. Plus la surface sera rugueuse, plus il y aura d'irrégularités pouvant servir de niches écologiques pour la fixation des bactéries. Du reste, des fissures nanométriques suffisent à favoriser l'adhésion (Pradier et al. 2005, Hutchinson et al. 2006, Mitik-Dineva et al. 2009). Plusieurs études ont permis de déterminer l'importance de l'hydrophobicité sur l'adhésion des organismes du fouling. Une étude réalisée sur des supports en acier ou en acrylique a montré que ces deux supports possédaient des espèces communes mais avec des abondances différentes (Lee et al. 2008). Ce phénomène est également apparu sur des coupons en acier inoxydable et en polycarbonate (Jones et al. 2007). Cependant des supports tels que le verre, le polycarbonate, l'acetal-polymère possédant des énergies de surface différentes ont été immergés à deux temps (8 h et 3 jours).

Il est apparu que les supports les moins colonisés avaient des énergies de surface comprises entre 20 et 25 mN.m<sup>-1</sup> sur des immersions de courte durée. En effet, après 8 jours d'immersion, aucune différence de colonisation n'a été observée entre les supports immergés. La mouillabilité du support et l'adhésion bactérienne ne sont corrélées que durant les premières heures de l'immersion (Becker 1998). Après quoi, ce n'est plus la nature de substrat qui interagit avec l'extérieur mais plutôt les premiers micro-organismes fixés (Compère et al. 2001). Les relations entre les propriétés de surface et la structure de la communauté des biofilms évoluent au fur et à mesure que celui-ci se développe. Au bout d'un certain temps dépendant probablement des conditions générales du milieu, les bactéries semblent évoluer indépendamment du support sur lequel elles sont fixées (Hugget et al. 2009).

### ***II.6.3. Diversité des micro-organismes au sein des biofilms marins.***

Un grand nombre de genres bactériens ont été identifiés dans les biofilm marins. Les plus fréquents sont *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Achromobacter* et *Flavobacterium* (Railkin 2004). Dans le but de cibler les premiers organismes à coloniser le support, des études sur des supports et des récifs artificiels ont été effectuées. Il semble que les bactéries pionnières de l'adhésion soit des *Alteromonas* ( $\gamma$ -proteobacteria) et des *Roseobacter* ( $\alpha$ -proteobacteria). Néanmoins cette dominance est de très courte durée (9 à 72h). D'après les études menées par Dang et Lovell (2000 et 2002), ce sont plutôt les  $\alpha$ -Proteobacteria qui dominent le biofilm. Durant les neuf premières heures d'immersion, le biofilm est principalement constitué de  $\gamma$ -Proteobacteria. Ces bactéries constituent le premier stade de colonisation et vont donc être les organismes pionniers au sens strict de l'adhésion. Puis après douze heures d'immersion la dominance change au profit des  $\alpha$ -Proteobacteria faisant de cette classe les seconds colonisateurs du biofilm (Lee et al. 2008). Des études réalisées sur des supports tels que le verre, l'acier inoxydable et le polycarbonate ou encore dans des zones géographiques diverse tel que l'Antarctique montrent également une dominance des sous groupes  $\alpha$ - et  $\gamma$ -Proteobacteria (Webster & Negri 2006, Jones et al. 2007), indiquant que la colonisation ne se fait pas de manière aléatoire. Au court du temps, les communautés évoluent, de plus une abondance et une richesse plus grande de micro-organismes a été observée sur des supports immergés à des températures élevées (30°C) ou dans des milieux enrichis en nutriments (Lau et al. 2005, Chiu et al. 2008). Chung et al. (2010) ont travaillé sur des biofilms isolés dans un port de Hong-Kong sur du polystyrène et des supports granitiques. Ils ont observé que les Bacteroidetes, les Cyanobactéries, les Firmicutes et les

Proteobacteria étaient présents dans des biofilms âgés de six et douze jours. D'autres clades se développent au fur et à mesure que le biofilm vieillit. Par exemple, les Acidobacteria et Verrucomicrobia sont plus visibles dans les biofilms de douze jours que dans ceux de six jours, alors que les Planctomycetes ne se trouvent que dans les biofilms âgés de douze jours. Mais là encore, le groupe le plus diversifié sera celui des Proteobactéria : en plus des classes  $\alpha$  et  $\gamma$  présentes dès les premières minutes de l'immersion, les classes  $\delta$  et  $\epsilon$  sont présentes dans des biofilms de six jours. Par contre, la classe des  $\beta$ -Proteobacteria ne se rencontre que dans des biofilms vieux de douze jours. Sur les deux types de biofilms étudiés, 100 à 123 taxa affiliés à 10 phyla ont été identifiés.

Après quelques heures voire jours d'immersion, c'est au tour de micro-organismes eucaryotes de venir coloniser le substrat. Parmi eux se trouvent des levures, des champignons, des protozoaires et des micro-algues dont les diatomées qui, après les bactéries, vont représenter les organismes majoritaires des biofilms (Abarzua et al. 1999). Là encore, plusieurs genres de Diatomées ont fréquemment été observés. Parmi eux se trouvent essentiellement des Pénées (Patil & Anil, 2005) telles que *Navicula*, *Nitzschia*, *Cocconeis*, *Licmophora*, *Synedra*, *Amphora* ainsi que des Centriques en proportion moindre telles que *Fragilaria*, *Grammatophor* ou *Rhabdonema*. La diatomée *Amphora coffeaeformis* est communément observée dans les biofilms, et en particulier sur des peintures AF à base de cuivre (Cooksey & Wigglesworth-Cooksey 1995, Braithwaite & McEvoy 2004). La force d'adhésion de ces organismes est importante et elle leur permet de coloniser des surfaces artificielles très répulsives pour les autres organismes constituant le biofilm (Molino & Wetherbee 2008). Des coupons de verre et de fibre de verre immergés dans un estuaire tropical étaient principalement recouverts par les genres *Navicula*, *Amphora*, *Nitzschia*, *Pleurosigma* et *Thalassionema*. Leurs diversités et leurs densités variaient en fonction du substrat. En outre, des différences saisonnières ont également été remarquées probablement influencées par des changements physico-chimiques et biologiques (Patil & Anil 2005). Les genres *Nitzschia*, *Cylindrotheca*, *Navicula* et *Amphora* isolés de biofilms âgés de 10 jours sur du polystyrène en zone intertidale à Hong-Kong (Chiu et al. 2008). Il s'avère que les diatomées se fixent sur le biofilm primaire bactérien grâce à la sécrétion d'un mucus. Celui-ci va contenir une grande quantité de polysaccharides et de protéines (Becker 1998). Le fait que les diatomées mettent plusieurs jours à adhérer laisse sous-entendre qu'une phase de conditionnement, effectuée par les bactéries, peut faciliter leur adhésion. Cependant il semblerait que ces micro-algues peuvent adhérer sans la présence des bactéries (Mitbavkar & Anil 2008). Des communautés de cyanobactéries sont également

trouvées dans les biofilms, telles que les genres filamenteux *Leptolyngbya*, *Lyngbya* et *Rivularia* (DePhilippis et al. 2005). Il semble que *Synechococcus* soit également présente dans les biofilms. En effet une étude réalisée dans un estuaire de Singapour a montré que la composition algale comprenait 30 espèces de micro-algues dont la répartition était la suivante : 78% de diatomées, 19% de cyanobactéries dont *Synechococcus* et 3% répartis entre des micro-algues vertes flagellées, des dinoflagellés et d'autres types cellulaires (Nayar et al. 2005).

### **III. Relations entre les biofilms et les autres organismes du biofouling.**

Au fil des jours et des semaines, les spores algales et les larves d'invertébrés, dont le développement constituera le macrofouling, viennent se fixer sur le support. Afin de consolider leur adhésion, ces organismes vont produire des gels viscoélastiques de compositions variées (Zardus et al. 2008). Le choix du support se fait en fonction de la luminosité, de sa couleur mais également en fonction de la turbulence de l'eau ou la salinité (Brown 2005). Cependant plusieurs études ont montré que les biofilms naturels pouvaient influencer sur l'adhésion des larves et des spores des macro-organismes (Lee et Qian 2002, Dobrestov 2006). En effet la présence d'un biofilm naturel va significativement augmenter l'adhésion de l'ascidie *Phallusia nigra*, du vers tubicole *Hydroides elegans* ainsi que de la balane *Balanus amphitrite* (Zardus et al. 2008). Bien qu'il soit possible à certaines larves d'adhérer sur des supports sans biofilm, leur densité est plus importante lorsque le support est déjà colonisé par les micro-organismes, montrant qu'il existe bien un lien entre ces organismes (Zardus et al. 2008, Park et al. 2011). De plus les larves et les spores sont capables de faire la différence entre des biofilms d'âge, de densité, d'activité métabolique ou encore d'origine variable, indiquant une réponse finement régulée par des médiateurs présents dans le biofilm (Lau et al. 2005, Hung et al. 2007). De surcroît, les procaryotes sont capables de communiquer entre eux et avec les eucaryotes par signaux chimiques tels que ceux du QS (Quorum sensing). Ces molécules peuvent inciter certains organismes tels que les zoospores d'*Ulva intestinalis* à préférer un support plutôt qu'un autre (Qian et al. 2007). Il en va de même pour les larves d'ascidies (Wieczorek & Todd 1998), de balanes (Thompson et al. 1998, Hung et al. 2008), de moules (Bao et al. 2007) et de spores algales (Patel et al. 2003). En outre, la métamorphose de *H. elegans* s'effectue lorsqu'il est en présence d'un biofilm mature (Huggett et al. 2009, Chung et al. 2010), laissant supposer que son adhésion est plutôt favorisée par la densité du biofilm que par sa composition phylogénique. Par ailleurs, des biofilms composés de *Vibrio* spp., *Deleya marina* et

*Roseobacter* sp. pouvaient inhiber l'adhésion des cypris, stade larvaire des balanes (Faimali et al. 2004). Il semble que 21% des bactéries vivants à la surface des algues telles que *Fucus serratus*, *Laminaria digitata*, *Corallina officinalis* et autres, inhibent la croissance de bactéries. Ces épiphytes vont alors exercer un certain contrôle sur la composition de la population colonisatrice de l'algue (Boyd 1999). La souche *P. tunicata* isolée du tunicier *Ciona intestinalis* peut perturber l'attachement des larves de *B. amphitrite* et de *H. elegans* ainsi que les spores d'*Ulva lactuca* et de *Polysiphona* sp. (Dobrestsov & Qian 2004). Holmström et al. (1992) ont montré que des bactéries isolées de substrats différents (roches et ascidies) inhibaient ou tuaient les larves de balanes et d'ascidies qui venaient adhérer sur leur biofilm. L'adhésion des balanes *B. amphitrite* est inhibée par les bactéries *Alteromonas* sp., *Acinetobacter* sp., et *Halomonas marina* ou *Vibrio campbell* respectivement isolées de l'éponge *Halichondria okadai*, de l'ascidie *Stomosoia murrayi* ainsi que de biofilms naturels (Dobrestosov et al. 2005, Qian et al. 2007). Mais il semble que l'effet des bactéries varie non seulement avec l'âge du biofilm mais également avec celui des cypris. Cette inhibition est due au fait que les polysaccharides des bactéries se lient au récepteur de lectine de la larve, l'empêchant ainsi d'adhérer (Dobrestosov et al. 2005). D'autres auteurs par contre n'ont pas trouvé de corrélation entre l'attachement de *H. elegans* et la densité du biofilm (Chung et al. 2010). De même la fixation des larves de *B. amphitrite* et *B. trigornus* était indépendante de la densité bactérienne (Lau et al. 2005).

En outre, les EPS formés par les diatomées peuvent aussi influencer l'adhésion des macro-organismes. Lam et al. (2005) montre qu'une variation du poids moléculaire ainsi que de la composition des monomères agit sur l'attachement des larves. Harder et al. (2002) a également démontré que des diatomées isolées de biofilms naturels peuvent fortement inciter l'attachement de 10% des larves de *H. elegans*, alors que 31% de la fixation de ces larves n'a été que faiblement influencée et que 59% des larves n'étaient pas du tout affectées par la présence des diatomées. Il ne semble pas que ces variations soient liées à la densité du biofilm.

Tout ceci montre bien la complexité des relations existant entre les micro- et les macro-organismes. Néanmoins, il est clair que les biofilms affectent les autres organismes colonisateurs et notamment leur attachement.

#### **IV. Les différentes techniques pour empêcher la formation du biofouling**

Le biofouling cause de sérieux dommages aux structures immergées. Afin de pallier à ces problèmes, divers revêtements antifouling (AF) ont été développés. Cependant certains d'entre eux sont grandement préjudiciables pour l'environnement.

##### **IV.1. Les peintures actives par relargage de biocides**

###### ***IV.1.1. Les différents types de peinture***

Le dépôt de peintures AF contenant des biocides est la technique la plus utilisée pour résoudre le problème de la colonisation sur les surfaces artificielles immergées. Afin que les substances actives puissent être libérées dans le milieu environnant, ces peintures vont subir une dégradation physique causée par différents facteurs. Les peintures AF contiennent plusieurs substances telles que des liants qui sont généralement des polymères, des biocides, des colorants, des dissolvants, des additifs, des diluants et autres composés (Watermann et al. 2005). Le terme de biocide désigne des substances actives capables de détruire, repousser, ou bloquer l'adhésion ou/et la croissance des organismes par des actions chimiques ou biologiques (Directive 98/8/CE, 1998). Le problème principal est que ces substances s'accumulent dans l'eau et les sédiments marins et entraînent une pollution de l'eau (Arrhenius et al. 2006).

Il existe une grande variété de peintures « antifouling » contenant de plusieurs sortes de biocides. Parmi ces revêtements il y a :

###### **IV.1.1.1. Les peintures érodables**

Dans ce type de peinture, l'agent biocide va être dispersé dans la matrice, c'est-à-dire qu'il va être sous forme libre. Ces revêtements sont différenciés en deux systèmes.

(i) Premièrement il y a les peintures à matrice polymère « dure », ou peintures de contact, insolubles dans l'eau. Ce sont des peintures stables et inertes, qui utilisent des liants de haut poids moléculaire tels que les vinyliques, les acryliques ou encore des caoutchoucs chlorés. Comme ces peintures possèdent une bonne résistance mécanique, elles peuvent contenir une grande quantité de biocide. La diffusion de ce dernier se fait par relargage progressif dans l'eau de mer. Une fois le biocide libéré, des microrugosités (petites cavités) apparaissent dans la matrice permettant le passage de l'eau et la dilution progressive du biocide (Figure 7). Au cours du temps, ces cavités ralentissent la dissolution de l'agent biocide, rendant cette peinture de moins en moins efficace (Almeida et al. 2007, Finnie & Williams 2010).

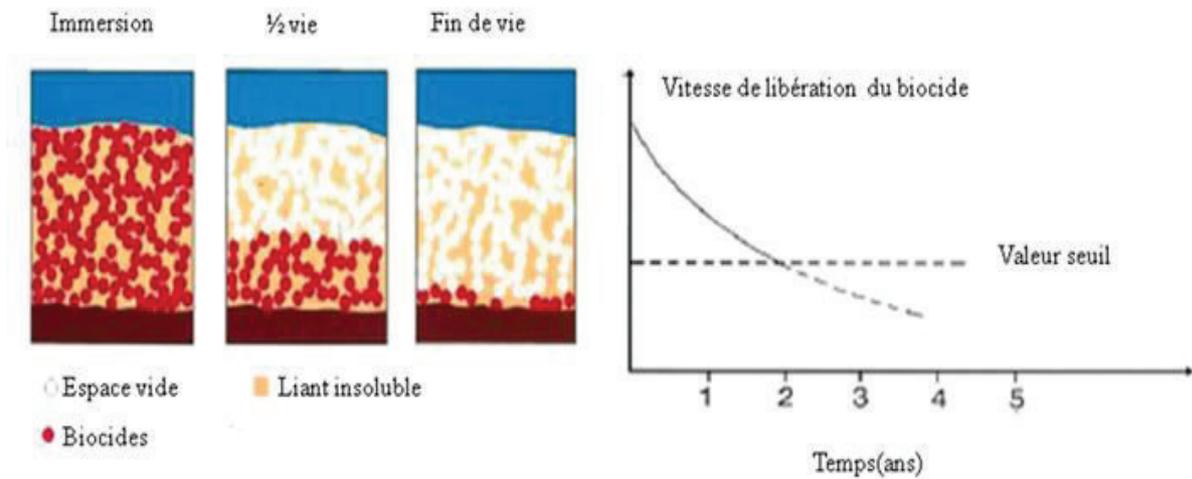


Figure 7: Mode d'action des peintures à matrice polymérique « dure » (Almeida et al. 2007)

(ii) Deuxièmement, il y a les peintures à matrice polymère soluble (CDP : controlled depletion polymer) (Figure 8), qui, comme leur nom l'indique, sont solubles dans l'eau. Le biocide est relargué par dissolution mais, cette fois, la matrice d'origine naturelle, constituée de colophane ou de dérivés d'acides gras, sera elle aussi dissoute dans l'eau. Contrairement aux matrices polymères « dures », la libération du biocide se fait de manière continue et constante, jusqu'à la dissolution totale de la peinture antifouling. Mais ce type de peinture ne peut pas intégrer une grande quantité de biocides. Les inconvénients majeurs de cette peinture sont qu'elle possède une durée de vie relativement courte d'environ un an, qu'elle s'oxyde au contact de l'air et qu'elle est peu efficace dans des conditions statiques (Finnie & Williams 2010)

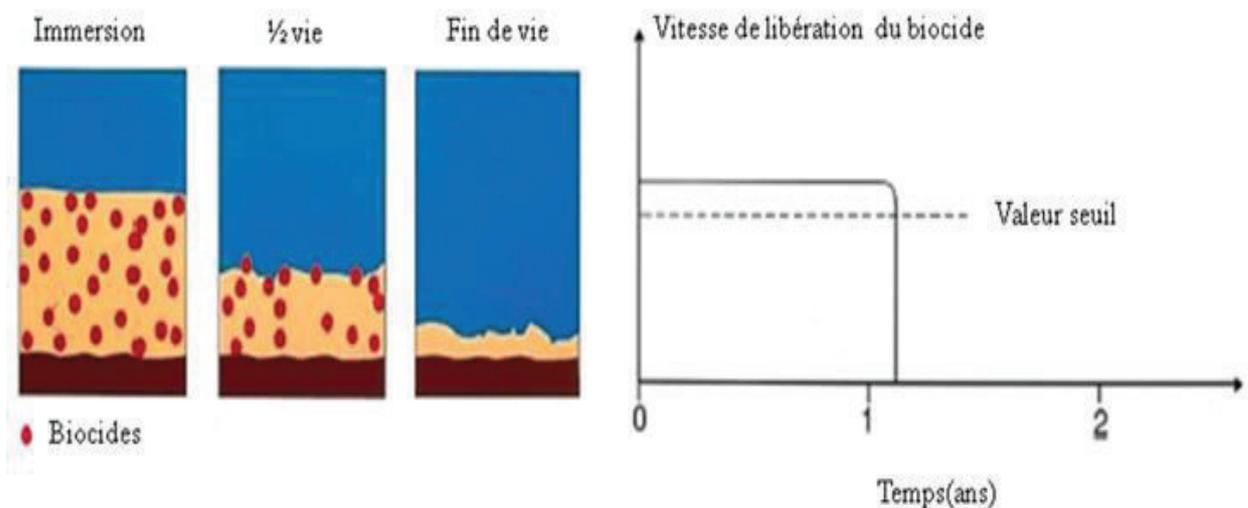


Figure 8: Mode d'action des peintures à matrice polymérique « soluble »  
(Almeida et al. 2007)

#### IV.1.1.2. Les peintures « auto-polissantes » (SPC : self polishing coating)

Ce type de peinture a connu un essor industriel important, faisant de ce type de revêtement l'un des plus répandus. Ces peintures captent les ions de l'eau de mer permettant l'hydrolyse des groupements portant l'agent biocide.

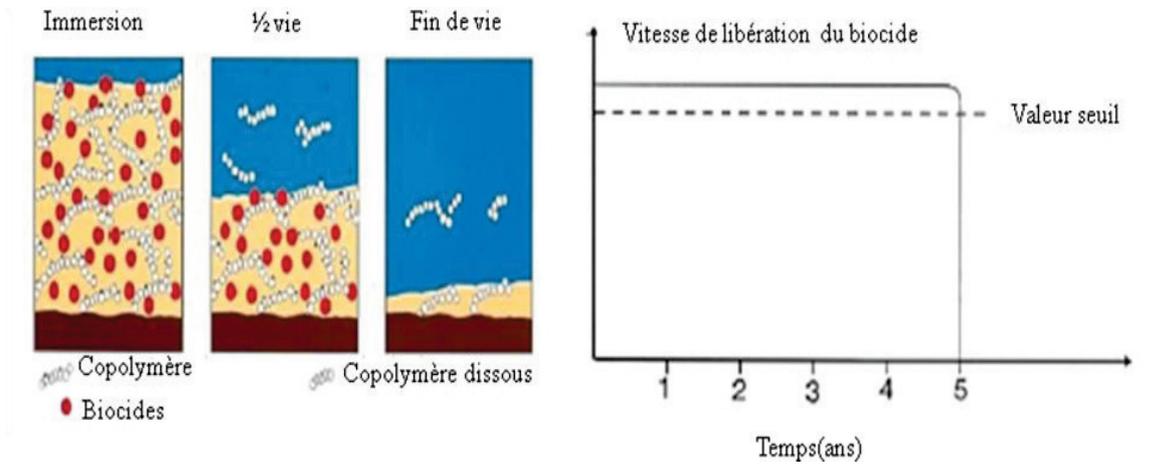


Figure 9: Mode d'action des peintures à matrice polymérique auto-polissantes  
(Almeida et al. 2007)

Cette matrice possède principalement des co-polymères acryliques ou méthacryliques hydrolysables qui, une fois en contact avec l'eau, permettent la libération lente du biocide (Watermann et al. 2005). Une fois que le biocide est libéré, une nouvelle couche est mise à nue afin d'être érodée à son tour. L'ancienne pellicule entraîne avec elle les organismes adhérents. Cette peinture libère la substance active de manière continue et a l'avantage d'avoir une épaisseur constante, donc de rester uniforme sur le support. Ces matrices à polymère auto-polissant (Figure 9) sont particulièrement performantes en comparaison avec les autres systèmes, notamment de part le fait qu'elles ont une surface assez lisse et une durée de vie longue (5 ans) (Omae 2003, Finnie & Williams 2010). En plus des différents types de peintures, il y a plusieurs types de biocides tels que les pesticides, les antibiotiques et les produits phytosanitaires par exemple. Les nouvelles substances actives doivent avoir une activité vis-à-vis des espèces cibles du biofouling sans pour autant être toxiques pour les autres organismes. De plus un biocide sera d'autant plus intéressant s'il se dégrade rapidement et s'il présente une bioaccumulation faible. Pendant de nombreuses années, ces caractéristiques nécessaires à la protection de l'environnement marin n'étaient pas réglementairement requises.

#### ***IV.1.2. Les substances actives commerciales***

##### **IV.1.2.1. Les biocides à base de métaux**

L'un des composés les plus utilisés à partir des années 70 lors de l'essor de la construction navale et l'expansion des bateaux de plaisance est le Tributylétain (TBT : TriButylTin). Ce biocide est l'un des antifouling les plus efficaces mais également un des plus toxiques pour l'environnement. En effet, il a été constaté que cette substance active a la capacité d'agir sur un grand nombre d'organismes marins (Alzieu et al. 2000). Elle peut affecter le développement des chloroplastes, des mitochondries, endommager les membranes cellulaires mais également inhiber la formation des EPS (Konstantinou & Albanis 2004), et causer des dommages endocriniens (Martins et al. 2005). Cette molécule peut aussi affecter la reproduction puisque des individus femelles développent des organes mâles ce qui les rend stériles. De plus ces organostaniques sont bio-accumulés par les saumons d'élevage ou autres espèces élevées en pisciculture et se retrouvent dans la chaîne alimentaire de l'Homme (Champ, 2000). Divers dérivés tels que le TBTO (TriButylTin Oxide) permettaient d'obtenir des biocides avec différents spectres d'activité ainsi que des durées de vie plus ou moins longues.

Afin de réduire l'utilisation des TBT, plusieurs alternatives ont été développées. Le cuivre est largement utilisé en tant que biocide, entraînant sa forte accumulation dans les sédiments de zones côtières comme dans le nord ouest de l'Espagne (Bao et al. 2010), ou encore dans les tissus d'organismes filtreurs. En effet, il a été constaté une forte bio-accumulation de cuivre dans les huîtres de la baie d'Arcachon entre 1979-1991 (Omae 2003). Bien que ce soit un nutriment nécessaire au développement des organismes vivants, à forte concentration, il devient nuisible pour beaucoup d'invertébrés marins tels que les polychètes, les oursins, les ascidies et les coraux. Beaucoup d'autres composés du cuivre sont utilisés tels que la pyrithione de cuivre ou encore l'oxyde de cuivre. Ce dernier est le plus utilisé de par son faible coût et son large spectre d'activité (Kobayashi & Okamura 2002, Pelletier et al. 2009, Bao et al. 2010). Bien qu'il soit un biocide à large spectre, il est inefficace sur certaines espèces de macro-algues telles que *Enteromorpha* spp., *Ectocarpus* spp. ou de diatomées comme *Achnanthes* spp. (Omae 2003). Il faut donc ajouter d'autres biocides organiques appelés co-biocides ou « booster » biocides, afin d'améliorer son rendement (Finnie & Williams 2010). Des bio-essais avec des mélanges de co-biocides ont été effectués, mais seuls certains mélanges présentaient un effet synergique. Cette synergie doit aussi être prise en compte au moment d'évaluer les risques écologiques de ces peintures (Fernández-Alba et al. 2002).

La pyrithione de zinc est à la fois bactéricide, fongicide et algicide. Elle se trouve le plus souvent associée à l'oxyde de cuivre. Elle est peu soluble dans l'eau et s'accumule facilement dans les sédiments (Thomas 2001). Toutefois ce produit a montré des effets néfastes sur le développement des œufs d'oursin ainsi que sur les larves de poisson (Kobayashi & Okamura, 2002)

Un grand nombre de molécules ont été et sont encore utilisés comme co-biocides. Seuls les plus couramment utilisés vont être décrits dans le paragraphe suivant.

#### **IV.1.2.2. Les biocides organiques**

Le Sea nine 211 ou Kathon 287T ( $C_{11}H_{17}Cl_2NOS$ ) est un produit hautement actif qui pénètre dans la membrane cellulaire et inhibe les réactions enzymatiques de divers organismes. De plus, il possède une dégradation rapide dans l'eau, réduisant sa bio-accumulation dans les organismes non ciblés ou encore dans les sédiments (Arrhenius et al. 2006). Malgré sa rapide dégradation, ce produit ne semble pas être une bonne alternative au TBT étant donné qu'il est toxique pour les poissons, les invertébrés, ainsi que pour le phytoplancton (Fernández-Alba et al. 2002).

Le dichlofluanide (Preventol A4S,  $C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$ ) et le tolyfluanide (Preventol A5S,  $C_{10}H_{13}O_2S_2 N_2Cl_2F$ ) sont déclarés comme fongicides et couramment utilisés en agriculture, ainsi que comme co-biocides du cuivre. Ils possèdent des propriétés antifouling contre les bactéries, les algues et les invertébrés marins. Le dichlofluanide est plutôt instable et très toxique pour l'environnement car il s'accumule facilement dans les sédiments (van Wezel & van Vlaardingen 2004, Fay et al. 2010).

L'Irgarol ( $C_{11}H_{19}N_5S$ ), est un herbicide très employé comme co-biocide du cuivre. Il inhibe la photosynthèse en empêchant le transport des électrons dans les chloroplastes (Burgess et al. 2003). Il est relativement stable et persistant dans les sédiments en mer et dans les eaux douces (van Wezel & van Vlaardingen 2004). Ce biocide est haute toxicité pour les algues marines non ciblées en inhibant leur croissance, ainsi que pour les crustacés, les coraux et indirectement pour les herbivores (Konstantinou & Albanis 2004).

Il existe d'autres herbicides tels que le Diuron ( $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ ), dérivé de l'urée, très utilisé en agriculture depuis les années 50. Tout comme l'Irgarol, il inhibe la photosynthèse et présente la même toxicité et la même persistance dans l'eau (Konstantinou & Albanis 2004). A forte concentration, il peut devenir antibactérien, même si, au niveau des biofilms, il reste plus performant dans l'inhibition des micro-organismes photosynthétiques comme les diatomées (Fay et al. 2010).

Des co-biocides fongicides tels que le Ziram ( $C_6H_{12}N_2S_2Zn$ ) ou le Zineb ( $C_4H_6N_2Zn$ ) sont aussi couramment utilisés. C'est pourquoi leur utilisation a été réglementée. Divers composés aminés ont également montré des activités contre les macro-organismes et les micro-algues (Bressy et al. 2010). En effet, le chlorure de benzalkonium (ammonium quaternaire) est couramment utilisé en pharmacologie et en cosmétique. Ce produit inhibe la croissance bactérienne, et plus particulièrement les bactéries à Gram positif. Il semble qu'il soit moins toxique que le TBT ou le cuivre. (Beveridge et al. 1998).

Pour des raisons économiques des peintures antifouling contenant des biocides ont également été utilisées en aquaculture, car moins coûteuses que les techniques manuelles. Pour des raisons sanitaires, les peintures contenant du cuivre sous la forme monovalente d'oxyde de cuivre sont utilisées presque exclusivement dans la pisciculture. Comme il s'accumule, sa concentration ne doit pas dépasser les 40%. De nouvelles investigations semblent indiquer que des revêtements contenant du chlorure de polyvinyle, connu pour ses capacités antifouling, pourraient être utilisés (Braithwaite & McEvoy 2004). Un mélange de deux isothiazolinones associées à un produit conservatif, le Kathon 886, a également été utilisé. Bien que celui-ci soit capable d'agir sur la réduction de l'attachement des organismes sans pour autant empêcher le dépôt de particules de matières organiques, il ne semble pas très efficace (Svane et al. 2006).

L'élimination des biofilms formés dans les eaux de lestage des bateaux se fait à l'aide de produits chlorés. Cependant ce sont des produits cancérigènes engendrant la production de molécules toxiques. Le glutaraldéhyde toxique en solution et assez coûteux peut lui aussi être utilisé comme Anti-Fouling (AF). D'autres biocides déjà utilisés pour le traitement de l'eau tels que les dérivés de naphthoquinones alkylés ont été étudiés. Ces deux dérivés semblent prometteurs étant donné qu'ils possèdent une forte activité antibactérienne et qu'ils sont hautement photodégradables (Chelossi & Faimali 2006).

Pour l'instant, les alternatives mises en place pour pallier à l'interdiction du TBT ne semblent pas très efficaces, sauf les peintures constituées de cuivre et de co-biocides organiques qui elles continuent de présenter des risques pour l'environnement. Les biocides montrant des toxicités faibles, liées à leur temps de vie relativement court, sont moins efficaces contre le biofouling et nécessitent un renouvellement plus régulier (Omae 2003).

### ***IV.1.3. Impact écologique et nouvelle réglementation***

Une forte accumulation de ces différents biocides est observée dans les océans et plus particulièrement dans les zones semi-fermées telles que les ports, les estuaires et les zones de carénage des navires (Turner 2010). Une grande majorité de ces substances est persistante dans les sédiments voire dans les tissus vivants (Railkin 2004), les rendant dangereuses pour l'environnement et pour l'Homme. C'est pourquoi, un grand nombre de pays ont instauré une réglementation liée au programme de travail de l'Organisation maritime internationale (IMO : International Maritime Organization). Il définit que la toxicité d'un produit doit être évaluée en fonction de son activité sur les organismes non cibles, sur sa persistance dans l'environnement ainsi que par sa présence dans la chaîne alimentaire. En ce qui concerne les peintures à base d'organostanniques, la France en 1982 fut l'un des premiers pays à interdire leur application sur des navires inférieurs à 25 m. Elle fut suivie par d'autres pays de l'union européenne mais également par l'Australie et l'Amérique du Nord (Terlizzi et al. 2001). En Janvier 2003, le parlement européen a interdit l'application des composés organostanniques sur les navires et en janvier 2008, ces composés ont complètement été éliminés. Dorénavant, tout navire possédant du TBT dans son revêtement se verra refuser l'entrée dans les ports communautaires. Tous les pays membres de l'IMO ont ratifié cette loi (782/2003/CE (JO L 115) (Hallers-Tjabbes & Walmsley 2010). Depuis septembre 2000, l'Irgarol 1051 n'est plus autorisé que sur des grands navires (> 25m) et ce jusqu'en juillet 2003 où il a été totalement interdit au Royaume Uni, en Suède et au Danemark (Zhou et al. 2008). Le Diuron est également interdit dans les pays européens aussi bien pour les navires de plaisance que pour la marine marchande (directive européenne 98/8/CE). Le Royaume-Uni ne tolère que les revêtements contenant du dichlofluamide, de la pyrithione de zinc et du Zineb pour tous types de navires, alors que le Sea Nine 211 n'est autorisé que pour des bateaux mesurant plus de 25 m (Thomas et al. 2002).

La prise de conscience des risques écologiques causés par ces substances n'a fait que croître durant ces dernières décennies. Il semble désormais impératif de trouver des revêtements plus respectueux des espèces non ciblées.

### ***IV.1.4. Les composés antifouling naturels***

Le biofouling qui se développe sur les organismes vivants peut engendrer de graves problèmes pour la survie de ces derniers, comme la diminution de leur croissance, l'arrêt de la photosynthèse, la réduction des échanges gazeux, une compétition pour la nourriture vis-

à-vis de leur hôte (de Nys & Steinberg 2002, Lee et al. 2006). Afin de pallier à ces problèmes, les organismes ont développé des mécanismes de défense, notamment la production de métabolites secondaires (Gregg & Hallegraeff 2007)(Chapitre I - I.2.1). Des recherches ont donc été menées afin d'identifier des molécules naturelles potentiellement actives contre le fouling. Pour cela ces substances doivent répondre à certains critères comme le fait qu'elles doivent être actives à faible concentration sur plusieurs organismes impliqués dans le biofouling, non toxiques et peu bioaccumulables (Dobretsov et al. 2006). Le problème est que, souvent, ces produits peuvent se dégrader au cours du temps, d'où l'importance de pouvoir ensuite les synthétiser en laboratoire.

#### **IV.1.4.1. Les produits naturels extraits des micro-organismes**

Un grand nombre d'études montrent que les bactéries marines, telles que *Streptomyces*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* ou encore *Roseobacter* par exemple, sont capables de produire des substances actives n'existant pas chez les bactéries terrestres et pouvant influencer aussi bien sur les biofilms terrestres que marins (Dobretsov et al. 2005, Silva-Aciaras & Riquelme 2008, Dheilily et al. 2010). Les substances extraites des micro-organismes peuvent affecter la viabilité, la croissance ou l'adhésion de divers organismes. Plusieurs molécules telles que l'acide Phenazine-1-carboxylique, l'acide pyolique et le 2-alkylquinol-4-one, issus de *Pseudomonas* sp. isolé de nudibranche, sont antimicrobiens même après intégration dans une peinture AF (Burgess et al. 2003, Qian et al. 2010).

Certaines souches de *Pseudoalteromonas*.sp. produisent des lectines liées à du D-galactose et à du mannane (polymère du mannose), et sont capables de réduire l'adhésion et la mobilité des diatomées *Amphora coffeaeformis* et *Navicula* sp. Les bactéries marines *Streptomyces* secrètent l'acide 12-methylmyristique et des butenolides alkylés très actifs contre les larves de *Balanus amphitrite*, *Hydroides elegans* et *Bugula neritina*, sans pour autant être toxiques (Xu et al., 2010). Bhattarai et al. (2007) ont également isolé des composés tels que l'acide 1-hydroxymyristique ou encore l'acide 9-Z-oleique de *Shewanella oneidensis*. Ces molécules sont capables de repousser les bactéries *Alteromonas marina* et *Bacillus atrophaeus* présentes dans les biofilms et d'inhiber l'attachement des spores de *Ulva pertusa*. De plus ces composés appliqués sur des panneaux immergés entre 6 mois et un an dans le milieu naturel se sont montrés très efficaces puisque ils étaient dépourvus de micro et de macro organismes.

Des *Bacillus* isolés de la plante marine *Thalassia testudinum* inhibent la croissance de *Halomonas marina*, bactérie commune du microfouling. Ils possèdent aussi un effet létal

sur les larves d'*Artemia salina*. Il semble que ces activités antifouling soit liées à la production de plusieurs classes de lipoheptapeptides non ribosomiaux telles que les surfactines et les mycosubtilines (Ortega-Morales et al. 2008)

Depuis quelques années, des composés extracellulaires isolés des cyanobactéries ont révélé des propriétés antibactériennes, anti-fongiques et algicides. En effet la cyanobactérie *Scytonema hofmanni* produit des cyanobactérines capables d'inhiber la croissance de *Nitzschia pusilla*, alors que *Microcystis aeruginosa* et *M. viridis* produisent des aeruginosines pouvant inhiber les protéases (Abarzua et al. 1999, Dahm et al. 2006). Des substances actives AF ont également été trouvées dans les diatomées. Il s'avère que la diatomée *Thalassiosira rotula* produit le decanal, qui est un composé organique qui peut inhiber la croissance des bactéries *Vibrio splendidus* et *Bacillus megaterium*. Du reste, les champignons isolés de biofilms naturels produisent aussi des substances telles que l'alcool 3-chloro-2,5-dihydroxybenzylique capable d'inhiber la fixation des larves de *B. amphitrite* et de *H. elegans* sans pour autant les tuer (Kwong et al. 2006).

Le fait que seulement environ 1% des procaryotes soit cultivables est un facteur limitant dans la découverte de nouvelles substances actives. Néanmoins, les molécules extraites de bactéries présentent l'avantage de pouvoir être obtenues relativement rapidement et en grande quantité en conditions contrôlées de culture en laboratoire. Ceci est loin d'être le cas des substances actives isolées d'autres organismes marins ou terrestres. En effet, les métabolites secondaires sont généralement produits en faible quantité par l'organisme, ce qui suggère qu'une fois le métabolite actif identifié celui-ci doit être synthétisé chimiquement afin de ne pas endommager les fonds marins par une extraction massive d'organismes potentiellement intéressants (Hellio et al. 2004, Dobretsov et al. 2005).

#### **IV.1.4.2. Les molécules extraites des macro-algues ou de plantes marines**

Les algues sont un bon exemple d'organismes sessiles peu colonisés en général. Il est possible de trouver dans un même habitat des algues épiphytées alors que d'autres espèces seront « propres », indiquant que certaines d'entre elles sont capables de se défendre via des mécanismes d'antifouling ou d'allélopathie (émission de substances organiques issues d'une plante pouvant interagir de manière négative ou positive sur une autre) (Cho et al. 2001). En effet, l'acide zostérique extrait de la plante marine *Zostera* s'avère être un composé antifouling efficace et peu toxique en comparaison avec le TBT et le SeaNine 211 contre l'adhésion bactérienne. De plus, ce composé a continué de montrer une activité

intéressante une fois incorporé dans un revêtement et immergé durant 14 jours (Barrios et al. 2005, Xu et al. 2005). Ce dernier a également été introduit dans des revêtements en silicone et, là aussi, une diminution de la colonisation bactérienne a pu être observée (Barrios et al. 2005). Les diterpènes isolés de *Cerriops tagal* (mangrove) peuvent inhiber fortement l'adhésion des cypris du *Balanus albicostatus*. La molécule luteolin-4'-glucuronide isolée de *Enhalus acoroides* (herbiers) peut stopper l'adhésion des larves de *B. neritina* (Qian et al. 2010).

Plusieurs types de molécules telles que des tannins extraits de *Sargassum natans*, des bromophenols issus de l'algue rouge *Rhodomela larix*, ainsi que des diterpènes issus de *Dictyota menstrualis* sont capables d'inhiber spécifiquement l'adhésion des macro-organismes comme les bryozoaires (Cho et al. 2001). Les méroditerpènes, autres molécules présentes dans divers genres d'algues brunes telles que *Halidrys siliquosa* et *Cystoseira baccata* inhibent respectivement l'adhésion de *B. amphitrite* et la croissance de macro-algues (Qian et al. 2010). Les divers composés isolés de *Sargassum confusum* ont montré une activité inhibitrice de l'attachement d'*Ulva pertusa*. En outre, une grande quantité de métabolites isolés de plusieurs *Sargassuma* possèdent des propriétés allélopatiques (Ganti et al. 2006).

Les furanes halogénés isolés de l'algue rouge *Delisea pulchra* présentent une forte inhibition de l'attachement des organismes procaryotes et eucaryotes formant le biofilm. De plus, ces composés restent actifs sur les organismes colonisateurs une fois introduits dans des polymères et immergés dans le milieu naturel (DeNys & Steinberg 2002). D'autre part, les furanes présentent une faible toxicité pour les organismes non cibles (Xu et al. 2005, Dobretsov et al. 2007). Les furanes isolés de *Delisea pulchra* peuvent interférer avec les molécules impliquées dans le QS. La communication entre les colonies ne se fait plus correctement et la croissance des bactéries Gram négatif est inhibée, tout comme l'attachement des larves d'invertébrés (Dobretsov et al. 2007).

L'aptitude des algues à inhiber l'adhésion d'autres organismes va particulièrement être utile en pisciculture. La présence de l'algue *Ceracium brotyocarpum*, limiterait l'adhésion des spores d'algues vertes opportunistes ainsi que la colonisation des balanes (Bazes et al. 2006).

Les variations de la production des composés extraits des organismes dépendent non seulement de l'espèce, mais aussi de l'extraction des métabolites secondaires. En effet les substances inhibitrices ne sont pas toujours situées à la surface des organismes non épiphytes mais quelque fois encapsulées dans des vésicules spéciales comme c'est le cas

pour *Delisea pulchra* (Dworjanyn et al. 2006). Les variations saisonnières peuvent aussi influencer sur la production de substances actives (Marechal et al. 2004).

#### IV.1.4.3. Les molécules extraites des spongiaires

Un grand nombre de molécules ont été isolées de plusieurs genres d'éponges. Certaines d'entre elles ont été utilisées contre des bactéries pathogènes pour l'Homme (Dobretsov et al. 2005), d'autres telles que certains terpénoïdes et stéroïdes vont plutôt posséder des capacités anti-prédatrices et antifouling (Tsoukatou et al. 2002). Les molécules oroïdines et bromoageliférine, généralement trouvées dans les Agelasidae, peuvent inhiber le développement du biofilm de la bactérie *Rhodospirillum rubrum* (Richards et al. 2008). D'après l'étude réalisée par Sera et son équipe (2000), il apparaît que le secosterol extrait de l'éponge *Dysidea granulosa* inhibe l'adhésion des moules. Mais ces produits semblent toxiques pour les macro-organismes (Sera et al. 2000, Qian et al. 2006). De surcroît, quatorze terpénoïdes isolés d'éponges méditerranéennes affectent les larves de balanes (Qian et al. 2010). Le polymère 3-octylpyridinium isolé de *Reniera sarai*, bien que moins efficace que la pyrithione de zinc ou de cuivre, peut inhiber l'adhésion des Balanes. Cette molécule s'avère être moins toxique que ces biocides pour les larves. De plus, il semble que cette substance puisse affecter divers micro-organismes du biofilm (Sepcic & Turk 2006). Les molécules bastadines 3, 4 et 9, isolées d'*Ianthella basta* et l'aplysamine-2, isolée de *Pseudoceratina purpurea*, n'affectent pas la viabilité des larves de *Balanus improvisus* mais empêchent leur adhésion (Ortlepp et al. 2007).

Des molécules possédant une activité antifouling aussi importante que les organostanniques semblent avoir été identifiées. En effet l'hydroquinone A présente chez *Ircinia spinolusa* peut inhiber une grande partie du biofouling et de manière plus efficace que le TBTO (Tsoukatou et al. 2002).

Il a également été démontré que les éponges peuvent réguler la communauté bactérienne présente sur leur surface en réduisant leur abondance et/ou leur diversité. Cela a été observé avec des extraits organiques de l'éponge *Mycale adhaerens* immobilisés dans de l'hydrogel et mis en contact avec de l'eau de mer naturelle (Lee et al. 2006).

#### IV.1.4.4. Molécules naturelles extraites d'autres organismes marins

Des métabolites secondaires ont également été isolés chez d'autres organismes marins tels que l'holothurie *Scorpaenopsis*. Ces substances sont capables d'inhiber l'adhésion de *Patella vulgata* (mollusque). Cependant il apparaît que ces substances peuvent être très

toxiques pour certains poissons (Selvin & Lipton 2004). Le composé isocyanoterpenoïde isolé de nudibranches, mais également présent dans les éponges présente une activité antibalane (Qian et al. 2010). Les extraits des Gorgones *Subergorgia suberosa* et *Scripearia gracillis* empêchent l'adhésion des balanes sans pour autant les tuer. De plus, ces extraits inhibent la croissance de plusieurs bactéries marines isolées de divers substrats (Qi et al. 2008). Le diterpène renillafouline isolé des Octocoralliaires *Renilla reniformis* et *Leptogorgia virgulata* peut aussi inhiber la croissance de la diatomée *Navicula salinicola* (Targett et al. 1983) ainsi que celle des balanes (Clare et al. 1999). Différents extraits d'étoile de mer (*Luicidia clathrata L. laevigata*, *Fromica indica*, *Cryptasterina pentagona* et *Archaster typicus*) inhibent la croissance de bactéries (*B. subtilis* et *S. aureus*), l'adhésion de diatomées (*Amphora* sp. et *Nitzschia closterium*), du polychète *H. elegans* et du bryzoaire *B. neritina* (Guenther et al. 2009). L'extrait aqueux du corail *Leptogorgia virgulata* peut non seulement inhiber l'attachement des balanes (Rittschof et al. 1985). L'ascidie *Eudistoma olivaceum*, possède un composé non toxique capable d'inhiber l'adhésion de *B. neritina* (Davis & Whright, 1990).

#### IV.1.4.5. Molécules naturelles d'origine terrestre

Des substances issues de plantes terrestres, souvent connues pour leurs vertus médicinales, montrent des activités AF. La capsaïcine, extraite du poivre du Chili, bloque l'adhésion de bactéries d'eau douce. Elle fluidifie la membrane cellulaire des bactéries sans pour autant les tuer. A plus forte concentration, elle est aussi capable de réduire la taille des colonies (Xu et al. 2005). De plus, elle peut inhiber la fixation du byssus des mollusques (Angarano et al. 2007). Les molécules 2'-méthoxykurarinone et matrine issues de la plante chinoise *Sophora flavescens* empêchent l'adhésion du cypris de *Balanus albicostatus* et montrent une faible toxicité (Qian et al. 2010). Les tannins du châtaignier, du mimosa ou encore de l'arbre quebracho peuvent bloquer l'adhésion des balanes, mais également celles des polychètes (*Polydora ligni*) et des algues (*Enteromorpha* et *Ectocarpus*) (Stupak et al. 2003). Un total de 17 flavonoides et isoflavones présents dans une grande majorité de plantes (mousse, fougères, conifères et angiospermes) ont été identifiés comme des composés AF non toxiques contre les larves de *B. amphitrite* (Qian et al. 2010).

#### IV 1.4.6 Autres molécules

La recherche de nouveaux composés antifouling ne s'arrête pas à l'identification de métabolites secondaires. Des études démontrent que des composés neuroactifs tels que les

catémines sont capables d'empêcher l'adhésion des balanes. Par exemple, la medetomidine agit sur la production du ciment qui permet à l'organisme d'adhérer au substrat. Ce produit est efficace à basse concentration. Par contre, il semble qu'à forte dose il agisse sur la croissance et la reproduction des mammifères (Bellas et al. 2006). Plusieurs chercheurs se sont aussi penchés sur le possible effet des enzymes sur le biofouling (Leroy et al. 2008). Il a été démontré que des enzymes appropriées pouvaient hydrolyser divers glycoprotéines et polysaccharides contenus dans les EPS produits par les organismes du biofouling. D'autres enzymes peuvent, par catalyse, libérer les composés antifouling de la surface ou encore empêcher la communication intercellulaire. Pettitt et al. (2004) confirment effectivement que certaines enzymes commerciales (savinase, Lipex et alcalase...) peuvent affecter la viabilité et la colonisation des spores d'ulves, des balanes et même des diatomées. Cependant, il semble que ces organismes ne seront pas affectés par le même type d'enzymes. Celles-ci sont regroupées en deux catégories, celles à large spectre capable d'agir sur le micro- et le macrofouling et celles plus spécifiques, principalement ciblées sur les micro-organismes (Kristensen 2008). Comme les biofilms bactériens possèdent des EPS fortement hétérogènes, il est préférable de coupler plusieurs enzymes afin d'obtenir un meilleur agent antifouling (Augustin & Ali-Vhemas 2004).

#### IV.1.4.7. Analogues de synthèse de molécules naturelles

De nombreux produits naturels non toxiques à fort potentiel antifouling peuvent donc être isolés des divers organismes marins. La quantité nécessaire pour réaliser un revêtement commercialisable à grande échelle est très élevée. Pour le moment, aucune peinture à base de substance naturelle n'a été produite. Et afin de ne pas endommager l'environnement naturel par une trop grande extraction, la synthèse chimique des composés les plus intéressants doit être envisagée (Qian et al. 2010). Par exemple, parmi des triazols dérivés de terpènes et synthétisés au laboratoire, deux ont montré une activité anti-adhésion sur une souche bactérienne marine (Praud et al. 2009). Une autre étude rapporte l'activité de deux analogues de synthèse de la bromogeliferin (composé naturel d'éponge). Ces deux substances s'avèrent être actives contre la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Huigens et al. 2007). Des dérivés de synthèse de dérivés bromés d'éponges ont également été testés. Il ressort que le composé debromohemibastadine 1 synthétisé à partir de l'hemibastadine inhibe moins l'adhésion des *B. improvisus* que le produit naturel duquel il est issu. Néanmoins il semble que l'autre produit de synthèse de l'hemiblastine, le 5,5'-dibromohemibastadine, soit aussi efficace que le produit naturel. De plus, aucun de ces

composés n'a été toxique pour le crustacé *Artemia salina* (Ortlepp et al. 2007). Plusieurs dérivés de l'oroïdine (alcaloïde présent chez les éponges) ont été synthétisés afin de déterminer leur activité anti-biofilm sur *P. aeruginosa*. Le composé ayant montré la plus forte inhibition est la dihydrosventrine (Richards et al. 2008). Cependant, à ce jour, les synthèses restent trop coûteuses pour pouvoir être commercialisées (Qian et al. 2010).

#### **IV.2. Les autres méthodes pour stopper le biofouling**

Pour pallier aux problèmes de contaminations de l'environnement liées au relargage de biocides, de nouvelles recherches se sont aussi basées sur l'étude de revêtements ne contenant pas de substance active. Pour cela diverses stratégies ont été testées comme les techniques électriques qui consistent à attirer la bactérie grâce à une électrode positive et la tuer par action d'un courant de basse intensité (Omae 2003). La radioactivité est connue pour ses effets néfastes sur de nombreux organismes. Il a donc été envisagé d'utiliser des isotopes radioactifs comme protection contre le biofouling. En effet il semble que l'isotope du technetium-99 soit un élément plutôt efficace et possédant un temps de demi-vie supérieur à deux ans. Mais cette technique semble particulièrement dangereuse pour la santé et l'environnement et c'est pourquoi l'étude n'a pas été poussée plus loin (Railkin 2004). Les ultrasons ont également été envisagés. Ils se basent sur les fréquences de vibration acoustique de 20 à 200 kHz mais pouvant aller jusqu'à 1kW. Cette technique se base sur la destruction de l'attachement des organismes pouvant même aller jusqu'à la destruction du squelette de vers tubucole (Railkin 2004). D'autres approches plus prometteuses ont été développées en modifiant cette fois la mouillabilité ainsi que la topographie du revêtement. Elles vont être décrites dans les paragraphes suivants.

##### ***IV.2.1. Les peintures « fouling-release-coating » (FRC)***

Ces peintures ne possèdent pas de biocide. Il semble donc qu'elles soient potentiellement moins toxiques pour l'environnement. Elles sont à base de polymères fluorés ou d'élastomères de silicones. Leur mode d'action repose sur leur faible énergie de surface, donnant ainsi au substrat une propriété ultra-lissante et sur leur module élastique. Seules des liaisons de faible énergie peuvent être réalisées entre le revêtement et les salissures. De ce fait, les micro-organismes marins adhérents se détachent sous l'effet de leur propre poids, par pulvérisation d'eau ou encore par mise en mouvement de la structure immergée. Mais l'épaisseur ainsi que la rugosité du revêtement améliorent aussi les performances des FRC (Becker 1998). Il semble qu'après l'interdiction des SPC (cf : p24)

contenant du TBT, les FRC à base de silicone deviennent économiquement intéressantes. Ce type de peinture est particulièrement utilisé sur les navires évoluant à grande vitesse et caractérisés par une grande activité alors que son action est relativement limitée lorsque le navire reste longtemps ou souvent à quai (cas des navires militaires par exemple). En outre, pour que ce revêtement soit le plus efficace possible, il faut que la surface du navire soit la plus propre possible (Finnie et Williams 2010, Webster & Chisholm 2010).

#### ***IV.2.2. Les autres revêtements non toxiques***

Les peintures de type « hydrogels » sont constitués de gels très hydrophiles qui permettent la libération d'une substance active (Finnie & Williams 2010). Ce type de revêtement est utilisé plus spécialement sur les capteurs et les cameras immergés durant une longue période. Ces gels peuvent aussi contenir des tensioactifs cationiques qui pourraient maintenir leur efficacité dans le temps (Smith et al. 2002).

L'attachement des organismes peut également dépendre de la topographie de la surface. C'est pourquoi des systèmes de revêtements caractérisés par une micro- et une nanotopographie particulière ont été étudiés. Il apparait que des revêtements constitués de polymères avec une microstructure sont plus efficaces contre l'adhésion des balanes *Balanus improvisus* que des surfaces totalement lisses. La forme des microstructures semble pouvoir influencer l'adhésion. Il a été remarquée que les spores d'*Ulva* se fixaient plus facilement sur des revêtements à microstructures plates et longues que sur des surfaces lisses, elles-mêmes plus colonisées que des microstructures pyramidales appelées Sharklet<sup>TM</sup> (structure assimilée à la peau du requin) (Webster & Chisholm 2010). Cependant, dans la nature, d'autres organismes tels que les mammifères marins, possèdent des structures de peau particulières empêchant la formation du biofouling. Des études ont été menées sur les nanopores en forme de crêtes présentes sur la peau du globicéphale *Globicephala melas*. Ces nanostructures sont plus petites que la majorité des organismes colonisateurs et ne permettent pas la formation de point d'ancrage pour l'adhésion. Cette structure de peau a été copiée et a montré un faible taux d'adhésion des zoospores et de l'algue verte *Ulva*. Il a également été démontré que ces nano-pores réduisent l'adhésion de *P. aeruginosa* de 93%. La nature amphiphile de la peau du globicéphale soit également un élément important de la réduction du biofouling. La structure des coquilles de bivalves semble elle aussi influencer sur l'adhésion et devenir une approche intéressante pour la découverte de revêtements non toxiques (Scardino et al. 2011).

Une étude se basant sur des surfaces « super-hydrophobes » a aussi été envisagée. Pour cela des AF possédant un angle de contact supérieur ou égal à 150° ont été développées. Ce type de surface se rencontre déjà dans la nature. Les feuilles de Lotus sont connues pour posséder cette caractéristique, ce qui leur permet d'être dépourvues de salissures. Cela est possible grâce à formation d'une mince couche d'air sur la surface de la feuille, permettant à cette dernière de rester sèche durant plusieurs jours sous l'eau. Mais il s'avère que cette approche est difficilement réalisable sur des navires (Salta et al. 2010). Néanmoins il apparaît que toutes ces techniques biomimétiques sont prometteuses pour le développement de revêtements AF non toxiques.

## **V. Les différentes méthodes d'analyse et de quantification des biofilms bactériens *in vitro*.**

Au cours des dernières décennies et avec l'émergence de nouvelles technologies, l'étude des biofilms *in vitro* n'a cessé de s'améliorer. Ceux-ci peuvent être examinés soit de manière directe grâce à la microscopie (optique, confocale à balayage laser (MCBL), électronique à balayage (MEB), à épifluorescence, etc ...), soit de manière indirecte à travers différentes méthodes spectrométriques de quantification (coloration vitale, radiomarquage, dosage immunoenzymatique, etc ...) (Djordjevic et al. 2002). La technique à utiliser va non seulement dépendre du but propre de la recherche mais également du type de bactérie et du support colonisé. En fonction de l'analyse à effectuer, les bactéries seront plutôtensemencées dans des milieux nutritifs riches (croissance bactérienne) ou pauvres (favorisant l'adhésion) (Leroy et al. 2007). Ces différentes techniques sont décrites dans les paragraphes suivants

### **V.1. Analyse directe des biofilms par microscopie**

La continuelle avancée des techniques d'observation a permis d'observer et de caractériser plus en détail les biofilms et les micro-organismes qui les composent. En effet, les microscopies électroniques à transmission et à balayage ont permis l'étude de la cellule au niveau de la morphologie et de leur répartition spatiale ainsi que l'étude de la structure du biofilm (Wimpenny et al. 2000).

L'utilisation du microscope à épifluorescence permet la visualisation et la quantification des bactéries dans les biofilms qui vont être marquées par un fluorochrome tel que le DAPI, l'acridine orange, etc ... (cf Chapitre I-V.2.2.2) (Hannig et al. 2007). Ce sont des molécules capables d'interagir spécifiquement avec les micro-organismes et en

particulier leur ADN. Le fluorochrome va être excité par des radiations lumineuses spécifiques à la molécule ( $\lambda$  excitation) et va fluorescer par réémission de photons à une autre longueur d'onde également spécifique ( $\lambda$  émission) (Brown & Poujol 2009). Bien souvent, ce type de marquage est utilisé pour dénombrer rapidement et directement la totalité des bactéries présentes dans un échantillon par comptage (Auty et al. 2001, Pascaud et al. 2009). En outre, il rend possible l'identification de bactéries viables grâce à l'utilisation de deux fluorochromes complémentaires : un capable de pénétrer dans toutes les cellules tel que le SYTO<sup>®</sup> 9, le SYTO<sup>®</sup> RED 61 ou le FDA (fluoresceine diacetate) et l'autre ne pouvant pénétrer uniquement que dans les cellules dont la membrane est endommagée tel que l'iodure de propidium, le SYTOX GREEN ou le bromure d'éthidium (Alakomi 2005, Hannig et al. 2007, Fay et al. 2010). Des marqueurs protéiniques comme la protéine fluorescente verte (GFP=Green Fluorescent protein) ou encore la protéine fluorescente rouge (RFP=Red Fluorescent protein) peuvent également être utilisées pour étudier des biofilms mixtes généralement formés dans des chambres à flux laminaire (condition dynamique) (Rao et al. 2005, Dheilly et al. 2010) (Figure 10).

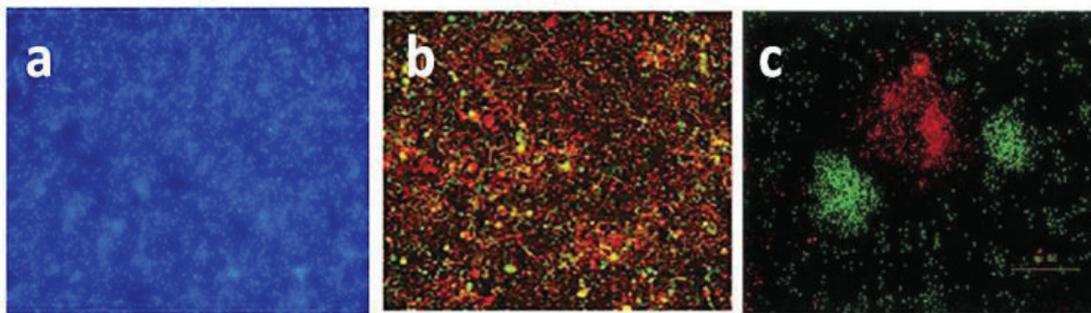


Figure 10: Visualisation d'un biofilm (a) marqué au DAPI en microscopie à épifluorescence (M. Camps), (b) au SYTO RED61 (rouge) et au SYTO GREEN (vert) observé au CLBM (Fay et al. 2010), (c) biofilm mixte marqué à la GFP et RFP (Rao et al. 2005).

La détermination et la quantification des micro-organismes présents dans le biofilm peuvent aussi être déterminées par la technique de FISH. Comme il a rapidement été expliqué précédemment (Chapitre I-II.6.1.1), cette méthode permet d'identifier des cellules intactes au niveau morphologique au sein d'un biofilm. Pour cela une sonde moléculaire correspondant à une séquence d'acide nucléique est introduite dans l'échantillon. Cette séquence correspond à un gène particulier en fonction de la question posée. Dans le cas d'étude de la diversité des procaryotes par exemple, des séquences correspondant aux ADNr 16S sont souvent utilisées. La sonde marquée avec un fluorochrome va donc s'associer à sa

séquence complémentaire spécifique si elle est présente. Les cellules ainsi marquées vont pouvoir être visualisées par microscopie à épifluorescence. Cela va permettre non seulement d'identifier les taxa présents dans l'échantillon mais également d'évaluer le taux de croissance, l'activité et la viabilité des organismes (Veal et al. 2000, Dorigo et al. 2005). Le CARD-FISH (Catalysed Reporter Deposition-FISH) qui est une adaptation du FISH, va permettre un meilleur marquage des cellules et donc d'augmenter la sensibilité de la technique (Dorigo et al. 2005).

Le problème principal de ces techniques de comptage sous microscope est qu'elles sont longues et fastidieuses (An & Friedman 1997). De plus, dans le cas spécifique des biofilms, la structure tridimensionnelle ainsi que la présence d'EPS rend très difficile le marquage et la reconnaissance visuelle sous microscope des bactéries.

L'apparition du microscope confocal à balayage laser (MCBL) a permis une observation plus nette et plus sensible du biofilm. En effet le faisceau lumineux projeté sur l'objet va être réémis en plusieurs rayons lumineux issus de différents plans. Le MCBL va permettre de sélectionner les rayons provenant d'un seul plan de l'échantillon en éliminant les autres grâce à la présence d'un diaphragme. Après quoi ce signal est converti en signal numérique qui permet d'obtenir une image de l'échantillon. Puis le faisceau va se déplacer le long de l'objet pour former une image en 2D. La géométrie du système peut être modifiée de sorte que le plan focal ne soit pas à la même profondeur que l'échantillon permettant ainsi d'obtenir une image 3D. La distribution spatiale des organismes, les épaisseurs moyenne et maximale, la visualisation des EPS, ainsi que la forme tridimensionnelle du biofilm vont pouvoir être déterminées. La quantification du nombre de micro-organismes présents dans les biofilms est plus rapide et plus précise grâce à l'acquisition d'images (Auty et al. 2001). Il a même été utilisé pour mesurer le débit des liquides présents dans les biofilms (Wimpenny et al. 2000). La quantité de bactéries vivantes et mortes présentes dans le biofilm peut aussi être déterminée en utilisant la même technique de double marquage que celle décrite ci-dessus. Cet appareil est principalement utilisé pour les études des biofilms en condition dynamique en chambre de flux (cf Chapitre I-V.2.2.1).

## **V.2. Analyse indirecte des biofilms**

La quantification, l'étude de la viabilité et de l'adhésion du biofilm peuvent s'effectuer par différentes méthodes plus ou moins spécifiques.

### V.2.1. Bio-essais antibactériens

Ce type d'essais permet d'évaluer l'effet bactéricide ou bactériostatique d'un composé. Une substance active peut soit directement tuer l'organisme soit bloquer sa multiplication. Dans le deuxième cas, l'organisme pourra reprendre une croissance normale après ré-introduction dans un nouveau milieu. L'inhibition de croissance peut être obtenue sur milieu gélosé par diffusion (dépôt de disques ou puits formés dans la gélose) (Hellio et al. 2001, Ortega-Morales et al. 2008) ou dans un milieu liquide par mesure directe de la croissance (Turbidité ou après étalement sur boîtes, croissance et détermination des Unités Formant Colonies) à différentes dilutions des produits. Cependant la méthode par diffusion est à utiliser avec précaution en raison de la mauvaise diffusion de certains produits (huiles essentielles par exemple). Les produits peu solubles ne peuvent pas non plus diffuser au travers de la gélose. La méthode par dilution par contre est beaucoup plus fiable et plus précise pour la détermination de l'efficacité d'un produit. C'est d'ailleurs cette technique qui sera utilisée essentiellement pour déterminer la MIC (minimum inhibitory concentration) (Rios et al. 1988)

La toxicité peut également être déterminée en utilisant d'autres méthodes. Les bactéries luminescentes du genre *Vibrio* ont également été utilisées pour déterminer la toxicité (test « Microtox »). En effet ces organismes sont un bon indicateur de la qualité des eaux puisqu'ils n'émettent de la lumière que lorsque leur densité, et donc l'environnement, est optimal. Le problème de cette méthode est que ces bactéries ne sont sensibles qu'à certains composés (Watermann et al. 2005) et, pour nos applications, que la souche utilisée ne provient pas d'un biofilm. Une autre méthode consiste à utiliser divers marqueurs respiratoires tels que le CTC (5-cyano-2,3-ditolylterazolium chloride) ou des sels de tetrazolium. Lorsqu'il est sous sa forme oxydé, le CTC ne fluoresce pas, mais lorsqu'il est sous forme réduite il fluoresce. Pitts et al. (2003) utilisent cette technique afin de déterminer la quantité bactérienne qui aura survécu après que les bactéries soient restées une heure en contact avec divers substances désinfectantes. Ce test est réalisé en microplaque 96 puits. Ils considèrent que c'est une manière rapide d'évaluer le potentiel inhibiteur des biocides à condition qu'il soit couplé à une analyse colorimétrique. La biomasse cellulaire est également déterminée par l'utilisation d'un colorant non fluorescent tel que la fluorescéine diacetate qui devient jaune et auto-fluoresce au contact de cellules vivantes (Peeters et al. 2008). L'Alamar blue, également connu sous le nom de resazurine, est aussi un indicateur d'oxydo-réduction, capable de fluorescer et de changer de couleur lorsqu'il est réduit par l'activité métabolique des cellules en résorufine (Figure 11).

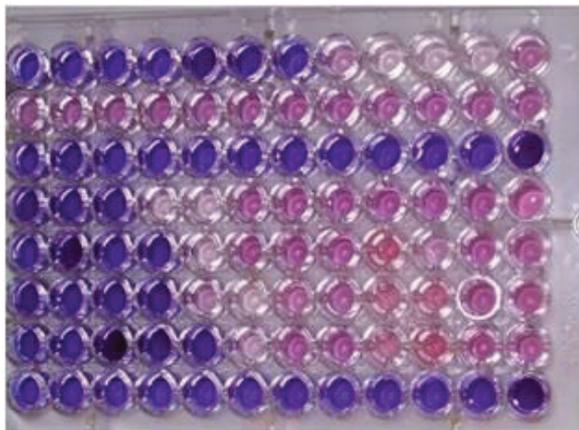


Figure 11: Oxydation de la resazurine en resorufine permettant d'observer la viabilité cellulaire (bactéries mortes en bleu, bactéries vivantes en rose) (Sarker et al. 2007)

L'avantage de ce marqueur est qu'il est simple, rapide, peu onéreux et ne nécessite pas d'appareil sophistiqué pour être observé (Kuda & Yano 2003, Augustin & Ali-Vhemas 2004, Kuda et al. 2004, Peeters et al. 2008). Les sels de Tetrazolium tels que le XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide) ou le MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt) peuvent être utilisés pour déterminer la toxicité sur des biofilms bactériens mais également sur des levures. L'étude de la toxicité des biocides est réalisée directement sur des biofilms formés en microplaque après que le surnageant ait été éliminé (Kuda et al. 2004, Peeters et al. 2008, Chaieb et al. 2011).

## ***V.2.2 Bio-essais anti-adhésion***

### ***V.2.2.1. Supports et conditions***

L'étude des effets d'inhibition de l'adhésion de bactéries peut s'effectuer sur divers supports. Un premier type d'expérience est réalisé sur des tubes à essais. Les bactéries sont incubées durant une nuit à une température donnée. Le milieu contenant les organismes non adhérents aux parois de verre est retiré. Les cellules adhérentes sont marquées avec un colorant comme la safranine. L'essai est considéré comme positif lorsqu'une couche colorée apparaît sur les parois de verre. Plus la coloration est importante plus il y a de bactéries. Bien que cette méthode soit facilement réalisable, elle est longue et peut engendrer des erreurs d'interprétations lors de la lecture pour un observateur peu expérimenté (Stepanovic et al. 2000).

Des coupons de verre ou d'un autre matériau peuvent être introduits dans des tubes à essais contenant la bactérie et le biocide à différentes concentrations. Après que le biofilm se soit

formé (24h), les coupons sont retirés et rincés rapidement à l'eau distillée. Le biofilm est alors récupéré par grattage et l'efficacité du biocide est déterminée par comptage par dilution en série (Bhosale et al. 2002) ou par observation microscopique couplée à une caméra (Xu et al. 2005). Il faut noter que le terme biofilm peut être abusif étant donné que la formation d'EPS n'est pas vérifiée par ces méthodes. Il est possible qu'on soit juste dans le cadre de l'adhésion de bactéries isolées et non dans celui du biofilm. Même si cela sort un peu du cadre des expériences en laboratoire, certains auteurs intègrent les produits à tester, des extraits organiques généralement, dans des matrices d'hydrogel qu'ils exposent par la suite en milieu marin permettant la formation de biofilms. Par la suite, ces gels sont colorés puis observés au microscope (Lee et al. 2006).

Néanmoins, l'étude des biofilms se fait principalement en système de flux ou en microplaque. La première méthode consiste à former un biofilm sur lame de verre, pouvant être irrigué par un liquide durant un temps déterminé (Figure 12).

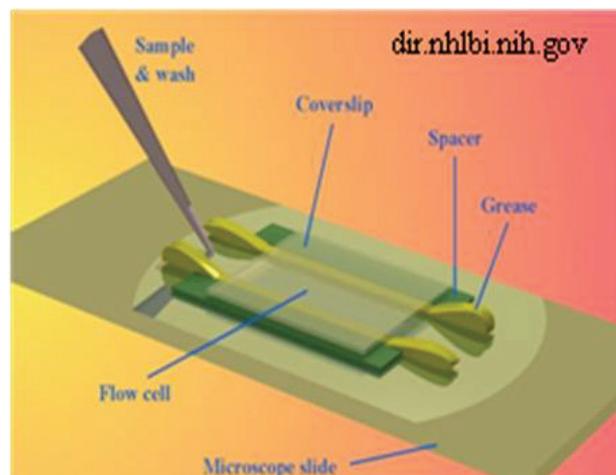


Figure 12: Schéma d'une chambre de flux permettant la formation d'un biofilm.

([www.dir.nhlbi.nih.gov](http://www.dir.nhlbi.nih.gov))

La vitesse d'écoulement de ce flux est de l'ordre de  $0,20 \text{ mm.s}^{-1}$  (Wimpenny et al. 2000). Les systèmes de déplacement de flux sont des systèmes ouverts, alimentés par un liquide « propre » permettant ainsi le brassage de l'oxygène et le rejet des déchets organiques. Ces systèmes peuvent fonctionner en gardant des conditions environnementales stables ou progressivement variables durant l'étude. Des réacteurs à écoulement au « goutte à goutte » peuvent être employés pour analyser l'efficacité des biocides sur le biofilm dans des conditions environnementales plus réelles. En effet le biofilm se forme sur des coupons inclinés en continu et irrigués par de petits volumes, simulant les forces de cisaillement du

milieu naturel. Puis les informations sont collectées par microscopie, le plus souvent au MCBL, et permettent d'obtenir la densité ou la composition du biofilm. Cet examen s'effectue pareillement avec des milieux de culture permettant de voir la croissance du biofilm en temps réel. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle permet le développement du biofilm dans des conditions physiologiques pertinentes tout en contrôlant les conditions environnementales (Coenye & Nelis 2010)

Les tests en microplaques, classiquement utilisés pour les activités antibactériennes, sont aussi utilisés pour le criblage d'activité anti-adhésion dans le domaine médical ou alimentaire (Stepanovic et al. 2000, Djordjevic et al. 2002, Pitts et al. 2003, Hannig et al. 2007, Harvey et al. 2007, Rivas et al. 2007, Richards et al. 2008). Une microplaque est considérée comme un système statique (même sous agitation par opposition à des chambres de flux), fermé, dans lequel il n'y a ni entrée ni sortie de fluide. Cela va entraîner la création d'une micro niche à l'intérieur des puits. Des petites quantités de produit sont nécessaires pour réaliser le bio-essai et plusieurs produits en répliquats peuvent être testés en même temps, en présence de contrôles positifs et négatifs. De plus, les résultats sont obtenus grâce à un lecteur automatique de microplaque ce qui est beaucoup plus rapide et reproductible qu'un comptage sous microscope. Il est aussi possible d'observer les effets des revêtements sur l'adhésion bactérienne (Shakeri et al. 2007, Stafslie et al. 2007). Dans la plupart des cas, les bactéries sont introduites dans les puits et incubées le temps nécessaire à la formation du biofilm. Par la suite, les bactéries non adhérentes sont éliminées à l'aide de divers lavages puis marquées. La lecture peut s'effectuer grâce à un lecteur spécifique (Figure 13, a) ou par microscopie (Acord et al. 2004, Burton et al. 2006, Stafslie et al. 2006, Leroy et al. 2007, Sandberg et al. 2008).

Les microplaques peuvent être fabriquées avec différents matériaux et un nombre (et donc des tailles) de puits différents permettant l'analyse de différents types d'organismes. Les plaques 96 puits sont classiquement utilisées pour l'étude des bactéries (Gentry & Dalrymple 1980, Roberts et al. 2002, Rudney & Staikov 2002, Sandberg et al. 2008), des diatomées voire des cellules de bivalves (Domart-Coulon et al. 2000). Les microplaques 24 puits quant à elles sont plus utilisées pour l'étude des larves de balanes et d'autres macro-organismes (Maréchal et al. 2004). Cependant, le matériau dans lequel est fabriqué le support peut influencer sur l'adhésion bactérienne. Il a été observé par exemple qu'un plus grand nombre de bactéries adhèrent sur des supports en verre que sur des microplaques en PS ou PP (Polypropylène), sur des supports en PVC ou en acier inoxydable (Dobretsov et al. 2006).

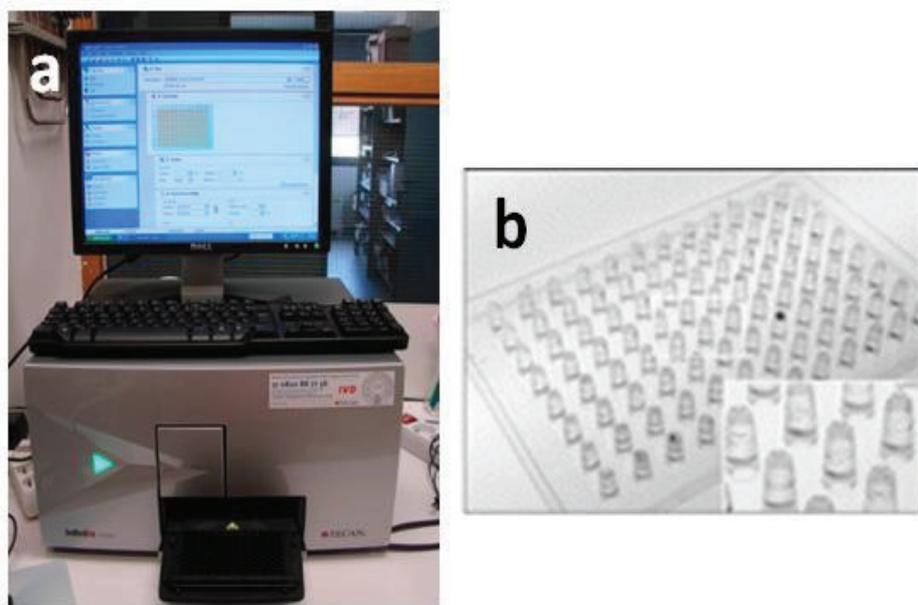


Figure 13: (a) Lecteur de microplaque INFINIT 200 (TECAN) (M. Camps), (b) Microplaque modifiée (CBD) (Wei et al. 2005)

Une adaptation a été développée pour améliorer l'étude des biofilms en microplaques (Figure 13 b): le Calgary Biofilm Device (CBD). Cette adaptation permet un criblage rapide et reproductible des antibiotiques. Cet outil consiste en une modification des couvercles des microplaques sur lesquels des chevilles sont fixées. Le biofilm se forme sur les chevilles qui sont par la suite introduites dans une autre plaque contenant les molécules à tester. Après le temps d'incubation adéquat, le couvercle contenant le biofilm est rincé à l'aide d'un tampon phosphate. Le biofilm est alors récupéré par sonication dans une autre microplaque, contenant du milieu de culture. Les bactéries viables pourront ainsi être quantifiées. Le CBD est donc surtout utilisé pour l'étude de l'inhibition d'un biofilm déjà formé et non pour empêcher la fixation des organismes (Ceri et al. 1999).

Le comptage effectué par microscopie est beaucoup plus fastidieux et lent que les analyses indirectes détaillées précédemment (Chap.V.2) (Hannig et al. 2007). Dans le cadre de l'étude spécifique des biofilms, les analyses indirectes présentent moins d'inconvénients. En effet, certaines techniques de récupération (sonication) du biofilm ou de séchage peuvent endommager le biofilm. Celui-ci ne se développe pas de manière uniforme et comporte généralement des agglomérats susceptibles également d'entraîner des erreurs de comptage en sous-estimant sa densité (Djordjevic et al. 2002). Enfin, les microscopes qui sont performants dans l'analyse des biofilms, essentiellement les MCBL, sont sophistiqués et coûteux. La quantification des biofilms se fait par différentes méthodes de marquage

détaillées ci-dessous. Le choix du marqueur a son importance étant donné que certains marqueurs peuvent interférer avec le support ou avec la molécule (Chavant et al. 2007).

#### **V.2.2.2. Quantification des biofilms**

Une première méthode de quantification des biofilms est basée sur l'introduction de radiotracteur comme la [ $^{14}\text{C}$ ] leucine ou encore la [ $^3\text{H}$ ] thymidine. Cette méthode est plus sensible et reproductible que les autres méthodes de coloration décrites ci-dessous (Vesterlund et al. 2005) mais nécessite de manipuler des éléments radioactifs (An & Friedman 1997).

La spectrophotométrie est une seconde méthode permettant l'analyse des biofilms. Cette dernière peut être utilisée lors de l'adhésion bactérienne en microplaque. Une fois le biofilm formé, celui-ci est marqué à l'aide d'un colorant, généralement le cristal violet (CV), permettant de quantifier le biofilm par mesure de densité optique à 570 nm (Figure 14). Ce colorant est souvent utilisé pour évaluer l'activité anti-adhésion de molécules sur des espèces pathogènes telles que *Staphylococcus* sp, *Echerichia coli* ou marines comme *Cytophaga lytica*, *Bacillus pumilus*, *Halomonas pacifica*... etc. (Djordjevic et al. 2002, Rivas et al. 2007). Afin d'améliorer la sensibilité, le colorant lié aux cellules adhérentes va être extrait. Pour cela divers solvants peuvent être utilisés tels que l'acide acétique (Stepanovic et al. 2000; Staflien et al. 2007) ou l'éthanol (Rivas et al. 2007). L'utilisation du CV nécessite au préalable une étape de fixation par introduction de méthanol à 99% (Stepanovic et al. 2000) ou de formaldéhyde à 2% (Gentry et Dalrymple 1980) ou par séchage (Rivas et al. 2007). La concentration de colorant à utiliser semble varier en fonction de la souche étudiée (Peeters et al. 2008). D'autres colorants peuvent être utilisés comme la safranine ou encore le bleu de méthylène (Roberts et al. 2002). Par ailleurs, Donlan et al. (2002) ont préféré étudier le biofilm en marquant les polysaccharides présents dans les EPS avec du Rouge de Ruthenium couplé à un fixateur le tetroxide d'osmium. Le 1,9 diméthyl méthylène blue (DMMB) peut également être utilisé pour quantifier la matrice du biofilm. Celui-ci va se lier aux polysaccharides sulfatés présents dans la matrice (Peeters et al. 2008). Dans tous ces cas, la mesure d'intensité se fait par un lecteur spectrophotométrique.

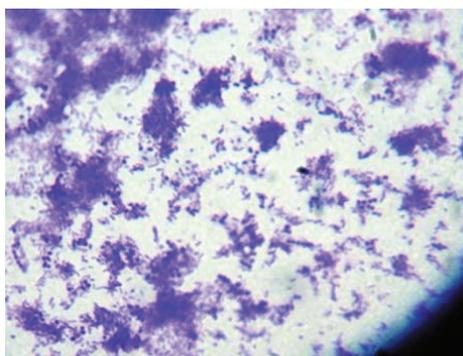


Figure 14: Biofilm marqué au cristal violet (CV) (Cf : archive. Microbelibrarv.org)

Une troisième manière de quantifier les biofilms est d'utiliser des fluorochromes dont une large gamme a été commercialisée ces dernières années. Ces molécules ont la capacité de se lier aux protéines ou encore aux acides nucléiques. En ce qui concerne l'adhésion bactérienne, le fluorochrome le plus utilisé est le DAPI (Leroy et al. 2007). Ce fluorochrome a la particularité de se fixer aux acides nucléiques présents dans l'ADN mais pas aux EPS (Donlan et al. 2004). C'est son association avec le groupement AT du petit sillon de l'ADN qui va entraîner sa fluorescence (Coleman et al. 1980, Breusegem et al. 2002). Afin d'augmenter son passage intracellulaire, une perméabilisation des cellules à l'aide de 2,5 voire 5% de formaldéhyde (Donlan et al. 2004, Nanacharaiah et al. 2005, Leroy et al. 2007) ou d'un autre perméabilisant (1% SDS NaOH à 1M, Vesterlund et al. 2005) est nécessaire. Tout comme pour le CV, sa concentration d'utilisation semble varier en fonction des souches étudiées. Les concentrations classiquement utilisés se situent entre 2 et 4  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (Donlan et al. 2004, Vesterlund et al. 2005, Hannig et al. 2007, Leroy et al. 2007). Une étape d'extraction est également nécessaire pour augmenter la sensibilité de la méthode (Leroy et al. 2007). Cette molécule peut également être associée à d'autres fluorochromes en tant que co-marqueur pour la distinction entre des cellules mortes ou vivantes au sein des biofilms (Williams et al. 1998, Rudney & Staikov 2002). D'autres fluorochromes peuvent aussi se fixer aux acides nucléiques tels que le SYTO<sup>®</sup> 9, 13, 61 (Bosch et al. 2003) etc. Ces fluorochromes ont été utilisés sur divers micro-organismes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Candida albicans* ou encore sur des bactéries marines telles que *Cobetia marina* (Peeters et al. 2008, D'Souza et al. 2010). Contrairement au DAPI, la liaison avec l'ADN se fait après transfert passif à travers les membranes cellulaires, éliminant ainsi l'étape de perméabilisation. Le colorant se lie également aux ADN présents dans les EPS. Cependant une étude réalisée avec le SYTO 9 montre que la présence de résidus visqueux dans le biofilm de certaines souches telles que

*Propionibacterium acnes* peut empêcher la coloration des cellules (Peeters et al. 2008). Ces marqueurs présentent un avantage certain car ils ne nécessitent pas non plus d'étape d'extraction et peuvent donc être lus directement (Bosch et al. 2003, Peeters et al. 2008). La quantification du biofilm peut aussi se faire grâce à des marqueurs très spécifiques comme le « wheat germ agglutinin-Alexa Fluor 488 conjugate » qui peut se lier aux N-acetylglucosamines présentes dans les EPS ainsi qu'à la paroi des bactéries à Gram positif (Donlan et al. 2004). Une autre étude a montré qu'il avait aussi la capacité de se lier aux lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif. Ce fluorochrome a principalement été utilisé sur des bactéries terrestres telles que *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Stathmann et al. 2002, Burton et al. 2006). Certains fluorochromes tels que l'acridine orange ou le picogreen seront principalement utilisés en microscopie à épifluorescence ou confocale dans le but d'effectuer un comptage des micro-organismes présents dans le biofilm (Mittelman et al. 1993, Cassé et Swain 2006, Das et al. 2009). Mais les autres fluorochromes décrits précédemment ont pu être utilisés à la fois en microscopie et avec des lecteurs de microplaques par fluorescence. Une dernière possibilité de quantification par fluorescence est basée sur l'intégration de plasmides possédant des protéines fluorescentes dans les bactéries à étudier (Green Fluorescent Protein, Red Fluorescent Protein). Cette technique permet d'éliminer par la suite toutes les étapes de marquage et de disposer d'organismes autofluorescents. Elle permet aussi de marquer différemment plusieurs bactéries au sein d'un même biofilm (Dheilly et al. 2010). Cependant toutes les souches ne peuvent pas être transformées, réduisant ainsi le champ d'application de cette méthodologie (Donlan et al. 2004, Dheilly 2007).

Les techniques de colorimétrie ou de fluorométrie ont été comparées par quelques auteurs. Burton et son équipe (2006) rapportent que les analyses avec le CV sont peu performantes et comportent des limites de détection pour la quantification du biofilm. Il est possible que les étapes successives de coloration puissent entraîner des pertes de matériel biologique. Ils concluent que les tests réalisés par spectrofluorométrie sont plus sensibles et plus spécifiques que le test colorimétrique. Il ressort aussi que certains fluorochromes sont plus appropriés que d'autres. En effet Peeters et al. (2008) montrent que le SYTO<sup>®</sup> 9 marque bien les cellules planctoniques, mais semble peu efficace pour quantifier le biofilm. Cependant, ils sont en accord avec Burton et al. (2006) sur le fait que la spectrofluorométrie reste plus spécifique et plus répétable que la colorimétrie. Hannig et al. (2002) ont aussi comparé plusieurs méthodes permettant de quantifier le biofilm avec des techniques liées à la fluorescence en microscopie (FISH, live/dead et DAPI) mais aussi à la détermination des

CFU. Ils en déduisent que les techniques de fluorescence, bien que présentant des sensibilités différentes, sont clairement plus sensibles que les CFU.

Chavant et son équipe (2007) ont développé une technologie originale permettant de quantifier les biofilms en microplaque : le « biofilm Ring Test ». Ce kit permet d'évaluer plus particulièrement la capacité des souches bactériennes à former un biofilm dans un milieu donné. Cette méthode est basée sur la capacité d'immobilisation de billes paramagnétiques inertes incluses dans le milieu lors de la formation du biofilm. Les billes non immobilisées sont rassemblées au même endroit par un aimant et la quantification du biofilm est déterminée par un scanner. Le développement du biofilm dans les puits, notamment avec la production d'EPS, va limiter la mobilité de ces billes qui ne pourront plus bouger. Le scan sera transformé en une valeur définie comme étant l'Indice du BioFilm (BFI) d'autant plus faible que les billes seront immobilisées. Cette technique qui semble reproductible est très intéressante notamment pour l'analyse cinétique des biofilms ainsi que pour la caractérisation des EPS. Les auteurs considèrent notamment que les étapes de lavage, nécessaire pour éliminer les bactéries non adhérentes et l'excès de colorant lors de la révélation du biofilm par des techniques classiques de marquage, peuvent considérablement influencer la quantification du biofilm.

### V.2.2.3. Application aux peintures antifouling

Afin de pouvoir déterminer l'efficacité des revêtements sur les micro-organismes en laboratoire, quelques adaptations ont dû être apportées aux techniques décrites précédemment. En effet, pour les analyses effectuées dans des microplaques, des coupons de verre ou de plastique ont dû être introduits au fond des puits afin de les protéger des solvants dans lesquels sont formulés les revêtements. Les microplaques 24 puits vont préférentiellement être choisies pour ces études (Stafslien et al. 2006). D'souza et al. (2010) ont quant à eux déposé les peintures sur des lames de verre et la quantification des biofilms a été réalisée avec du SYTO<sup>®</sup> 13 et un lecteur de microplaque. Les lames ont alors été déposées sur un support représentant une microplaque 384 puits.

Le problème des études réalisées en laboratoire est qu'elles ne prennent pas en compte les conditions environnementales ni la diversité des organismes constituant le biofouling, d'où l'importance de valider les résultats trouvés en laboratoire avec des immersions *in situ* de coupons. Mais peu d'études ont évalué la corrélation entre les tests effectués sur peintures antifouling en laboratoire et ceux réalisés *in situ* (Stafslien et al. 2007).

On peut aussi noter qu'il existe une technique permettant de voir directement les effets de métabolites naturels *in-situ* et donc de les comparer aux tests en laboratoire. Pour cela les substances à étudier sont introduites dans un gel stable et solide immergé par la suite en mer. Cela permet également de tenir compte du phénomène de diffusion des molécules dans le milieu. Cependant il semble que la diffusion des substances ne se fasse pas toujours de manière homogène et il est possible que les molécules se lient aux sucres présents dans la matrice (Henrikson & Pawlik 1995).

## **VI Les autres bio-essais antifouling**

### **VI.1. Autres micro-organismes**

Plusieurs espèces de diatomées telles que *Navicula* spp, *Amphora* spp, *Nitzschia* spp et *Cylindrotheca clostrium* ont été utilisées pour déterminer l'activité anti-adhésion et d'inhibition de croissance de substances potentiellement actives (Dobrestov & Qian 2004, Casse et al. 2006, Hellio et al. 2004, Pettitt et al. 2004). Ces études semblent particulièrement importantes car il s'avère qu'un grand nombre de revêtements AF sont relativement inefficaces contre les biofilms riches en micro-algues et en particulier en diatomées (Molino & Wetherbee 2008). Les méthodes utilisées pour déterminer l'inhibition de leur croissance se basent généralement sur des adaptations des méthodes de diffusion sur agar. Les substances actives sont directement mélangées à l'agar, sur lequel les diatomées sont déposées. Après un temps optimal de croissance, dépendant de la micro-algue étudiée, la biomasse de diatomées va être déterminée par mesure de la fluorescence liée à la chlorophylle (Targett et al. 1983). D'autres auteurs préfèrent utiliser la méthode des dilutions (croissance en milieu liquide), l'inhibition de croissance étant toujours déterminée par mesure de la chlorophylle a ou par simple comptage sous microscope optique (Dobrestov et al. 2005). Afin de mesurer la force d'adhésion de bactéries telles que *H. pacifica* et de diatomées telles que *N. perminuta* sur divers revêtements, un appareil permettant la libération d'un jet d'eau à pression variable à l'intérieur de microplaque 24 puits a été développé. Cette adaptation permet de prendre en compte l'effet des forces hydrodynamiques sur l'adhésion du biofilm (Cassé et al. 2007).

Des mycètes tels que *Corollopsora maritima*, *Lulworthia* sp. et *Dendryphiella salina* ont eux aussi été utilisés. Là aussi, ce sont les capacités d'inhibition de croissance qui ont été mesurées par dilution (Tsoukatou 2002, Hellio et al. 2004).

## VI.2. Utilisation de macro-organismes comme cibles AF

Les macro-organismes présents dans le biofouling sont également utilisés pour évaluer l'efficacité des molécules et des revêtements AF (Briand, 2009).

Les organismes les plus utilisés sont les Balanes et en particulier l'espèce tropicale *Balanus amphitrite*. L'analyse porte particulièrement sur l'inhibition de l'adhésion des cyprides, stade final de maturation des balanes (DeNys et al. 1994, Afsar et al. 2003, Ortlepp et al. 2007, Qi et al. 2008). Pour cela, diverses approches ont été mises en place. Une quinzaine de larves peuvent être déposées dans des boîtes de Pétri contenant les biocides ou les revêtements. Après un temps d'incubation, le nombre de larves adhérentes est compté sous microscope (Burgess et al. 2003, Ortlepp et al. 2007, Kwong et al. 2006). Cependant, les tests effectués en microplaques 24 puits restent la principale méthode de détermination de l'adhésion. Là encore une dizaine de larves sont déposées dans les puits contenant les solutions à tester, puis les larves sont dénombrées sous loupe binoculaire (Pettitt et al. 2004, Marchal et al. 2004, Hellio et al. 2005). L'activité des substances peut également être déterminée après adhésion des larves. D'autres études se proposent de déterminer non plus spécifiquement l'adhésion mais la toxicité en observant l'effet des biocides sur la nage, la métamorphose de la larve ou la viabilité du second stade larvaire nauplius (Rittschof et al. 1992, Stupak et al. 2003, Afsar et al. 2003, Marechal et al. 2004).

Les méthodes directes de comptage sur gélose ou dans les microplaques sont également utilisées pour déterminer l'activité anti-adhésion des substances sur le polychète *Hydroides elegans* ainsi que le bryzoaire *Bugula neritina* (Dobrestov & Qian 2002, Kwong et al. 2006). Les moules semblent particulièrement bien étudiées pour évaluer l'efficacité AF. L'analyse se base généralement sur les capacités du byssus (ensemble de fibres secrétées par certains mollusques pour se fixer) à fixer les organismes sur les substrats. Pour cela des papiers filtres imbibés de biocides sont introduits au fond d'une boîte de Pétri. Les boîtes sont remplies avec de l'eau de mer et trois moules y sont déposées. Le nombre de byssus attachés à chaque filtre est ensuite compté. La libération de gamètes est également contrôlée car elle indique un possible effet de stress (Da Gama et al. 2003, Ramasamy & Murugan 2007). D'autres auteurs préfèrent déterminer l'efficacité des biocides en utilisant le pied de la moule. En effet, il s'avère que le pied sert au déplacement du mollusque mais également au choix du support et à la production du byssus. Il est donc possible que le dernier soit sensible au conditionnement du support. Pour cela la substance à tester va être « coulée » sur le pied de la moule et sa contraction va être observée (Sera et al. 2000). Plusieurs espèces de moules peuvent être utilisées telles que *Mytilus* spp. (Cho et al. 2001,

Angorano et al. 2007) *Perna* spp. (Barbosa et al. 2007, Ramasamy & Murugan 2007). Un bivalve bioturbateur (*Abra nitida*) est également utilisé pour déterminer l'impact de biocides sur son comportement. Dans un aquarium, les sédiments ont été saturés en biocides puis les organismes y ont été déposés. Leur capacité à s'enfouir a ensuite été notée (Bellas 2006).

L'adhésion des spores algales a été largement étudiée (DeNys et al. 1995, Tsoukatou et al. 2002, Hellio et al. 2004). Elle est déterminée par des méthodes de comptage sous microscope droit (Burgess et al. 2003) ou inversé (Nylund et al. 2007) ou par microscopie à épifluorescence (Cassé et al. 2007). Les supports utilisés peuvent être des coupons de verre, des gélases ou des microplaques 24 puits. L'étude de la mobilité des spores peut également donner une indication sur la toxicité du solvant (Ganti et al. 2006). Un système de jet d'eau a été développé pour déterminer la force d'adhésion des spores et des jeunes plantes d'*Ulva*. Cet appareil permet de simuler la turbulence du milieu naturel sur la coque des navires. Cela a permis de déterminer les contraintes de cisaillement nécessaires pour le détachement des spores (Tang et al. 2005, Cassé et al. 2007, Finlay et al. 2008). Ce type d'appareil a aussi été adapté pour les balanes (Conlan et al. 2008). La rétractation, la mobilité ou encore le manque d'adhésion des patelles peuvent également être un bon indicateur de l'effet de certaines substances actives (Selvin & Lipton 2004), ainsi que les embryons d'huître, le taux de fertilisation et le développement des œufs d'oursins (Kobayashi & Okamura 2002)



# OBJECTIFS DE LA THESE



Suite à l'interdiction des organostanniques par l'IMO depuis 2008 et aux nouvelles restrictions mises en place progressivement notamment au niveau européen (Directive Biocide n°98/8/CE, modifiée par la Directive n°2011/12/UE), la recherche de nouvelles substances actives en antifouling non toxiques pour l'environnement marin devient urgente.

L'une des principales activités de recherche du laboratoire MAPIEM est de développer des peintures AF tout en respectant l'environnement. Dans cette optique, l'objectif de cette thèse était de développer un bio-essai en laboratoire, rapide et robuste, permettant d'identifier des substances actives non toxiques pouvant être incorporées dans les peintures, mais aussi permettant de cribler les peintures elles-mêmes.

Le premier objectif de cette thèse a été d'isoler et de mettre en culture des souches de bactéries « pionnières » de l'adhésion isolées dans la Rade de Toulon. Une analyse phénotypique de ces organismes a été effectuée afin de les caractériser et de voir de possibles différences entre ces organismes pour mieux les choisir dans le cadre du bio-essai.

Dans le but d'identifier rapidement des substances actives ou des revêtements capables d'inhiber la formation du biofilm, le deuxième objectif consistait à développer une méthodologie de bio-essais au sein du laboratoire. Il fallait déterminer les principaux paramètres d'adhésion des souches bactériennes en microplaques noires 96 puits et réussir à quantifier l'adhésion de ces bactéries grâce à un marquage par fluorescence. L'optimisation du bio-essai a été réalisée en utilisant des molécules commerciales connues pour leur efficacité AF. La robustesse (répétabilité, reproductibilité) du bio-essai a été évaluée sur plusieurs souches pour déterminer les variations potentielles de sensibilité. Une fois le bio-essai mis en place, des molécules extraites d'organismes marins (Algues brunes) ou terrestres (plantes du Venezuela) peu épiphytées ainsi que leurs dérivés synthétiques, ont été testés pour leur activité anti-adhésion. Nous voulions savoir s'il était possible de mettre en évidence des activités intéressantes couplées à une absence de toxicité sur des souches bactériennes.

Un autre objectif pour ce bio-essai monospécifique a été de le transposer à l'étude des revêtements antifouling en microplaque.

Enfin, nous avons cherché à complexifier le bio-essai en travaillant sur des biofilms plurispécifiques (deux souches) dans les microplaques. L'interaction entre les souches a été étudiée et l'efficacité d'une molécule active modèle a été comparée au biofilm mono spécifique.

Le troisième objectif consistait à étudier la composition de biofilms complexes (abondance et diversité des bactéries, pico-« organismes » et diatomées) sur divers revêtements immergés dans la rade de Toulon pour pouvoir comparer ces données avec les résultats des bio-essais *in vitro*.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS ET MÉTHODES



### I. Stérilité du matériel

Tout le matériel et les milieux de culture utilisés ont préalablement été stérilisés à l'autoclave (Appareil à Couvercle Amovible à Fermeture Rapide, Systec, 5050 MLV) selon les cycles de stérilisation suivant : pour la verrerie et les plastiques (cônes, eppendorff, ...), le cycle était de 7 minutes à 134°C sous 1 bar, puis ils ont été séchés dans une étuve à 100°C. Pour les liquides, un cycle de 20 minutes à 120°C a été appliqué.

### II. Produits utilisés

#### II.1. Biocides, produits naturels et solvants

Tableau 1: Les biocides commerciaux

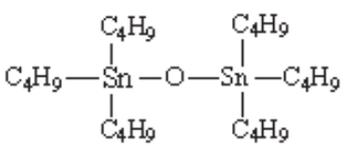
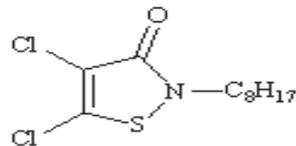
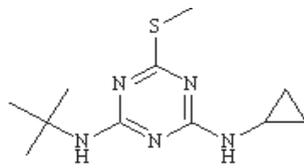
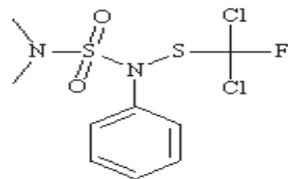
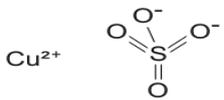
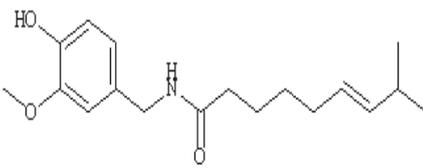
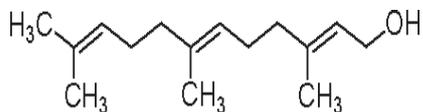
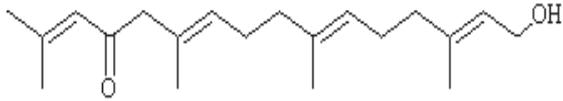
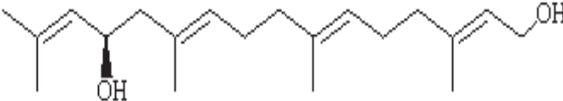
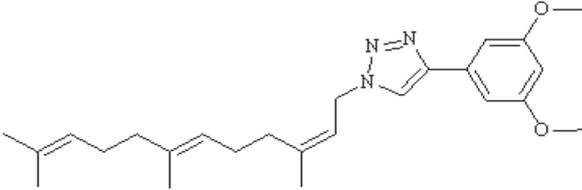
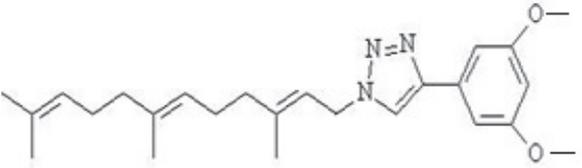
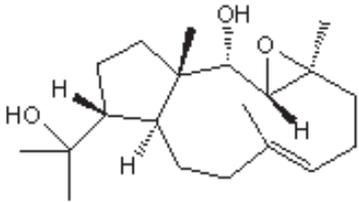
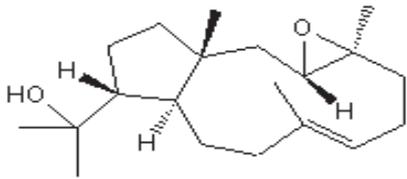
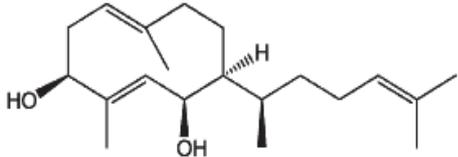
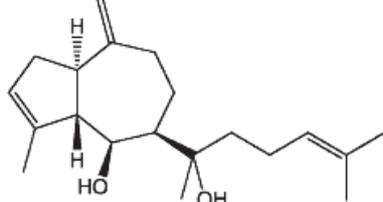
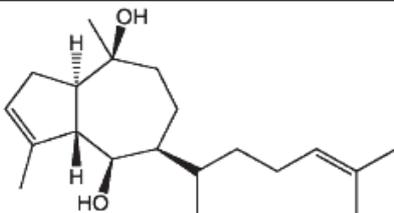
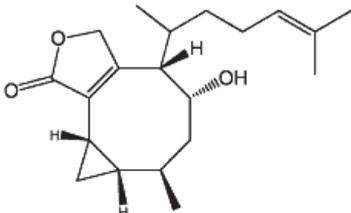
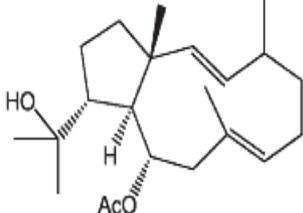
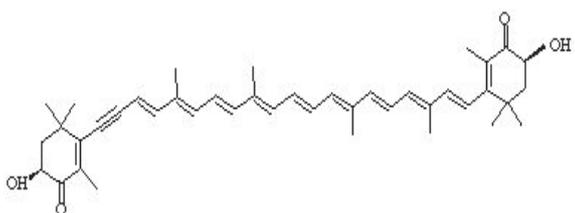
Nom	Abréviation	Marque et Provenance	Formule	Activité
<b>Oxyde de TriButyl Etain</b>	TBTO	Acros, Fisher, Illkrich, France		Spectre large (Kotrikla 2009)
<b>Sea Nine 211® (Kathon 287T)</b>	SN	Rohm and Haas, SAS, Paris, France		Spectre large (Cima et al. 2008)
<b>Irgarol 1051®</b>	Ig	Cibas Speciality Chemicals, Lyon, France		Herbicide et algicide (Dahl & Blanck 1996)
<b>Preventol A4S® Dichlofluanide</b>	A4S	Lanxess Courbevoie, France		Fongicide et algicide (Fernández-Alba et al. 2002)
<b>Sulfate de cuivre, pentahydraté</b>	CuSO <sub>4</sub>			Biocide à large spectre (Bao et al. 2010)
<b>Capsaïcine</b>		Sigma Aldrich®, St Quentin, France		Bactéricide (Turgut et al. 2004)
<b>Trans, trans farnesol 96%</b>	Farnesol			Fongicide et bactéricide (Jabra-Rizk et al. 2006)

Tableau 2 : Les produits naturels marins

Nom	Nomenclature (CIP)	Organismes producteurs	Formule
Eléganolone	13-oxogeranylgeraniol	<i>Bifurcaria bifurcata</i> (Fuciales)	
Eléganediol	13-hydroxygeranylgeraniol	Algue brune récoltée à Quiberon, (Bretagne, France) (Maréchal et al. 2004)	
TFA Z	3,5-dimethoxy-1,2,3, triazoles	Analogue de ynthèse obtenu à partir du 1,2,3 triazoles	
TFA E		Dérivé du farnesol(Praud-Tabaries et al. 2009)	
3	3,4-époxy-2,18-dihydroxydolabell-7-ène	<i>Dictyota</i> sp. Algue brune de Méditerranée récoltée au Brusuc (Var, France)	
4	3,4-époxy-18-hydroxydolabell-7-ène	(Viano et al. 2009)	

5	3β- hydroxydilophol		
6	Dictyol E		
7	Dictyol C		
8	Hydroxycrenulide	<i>Dictyota</i> sp. Algue brune de Méditerranée récoltée au Brusc (Var, France) (Viano et al. 2009)	
9	10-acétoxy-18- hydroxydollabella_ 2,7-diène		
<b>Fucoxanthine (Caroténoïde)</b>			

Les molécules extraites d'algues brunes ont été préparées au laboratoire MAPIEM par Dr. Y. Vianno et Mr O. Bottzeck sous la responsabilité du Dr. Gérald Culioli. La synthèse et la purification du TFA Z et E ont été réalisées par O. Bottzeck.

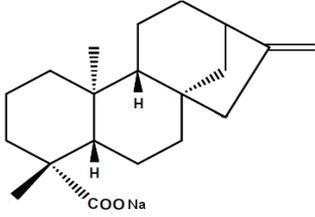
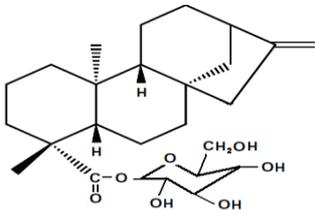
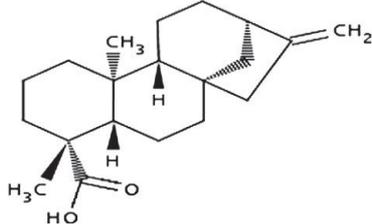
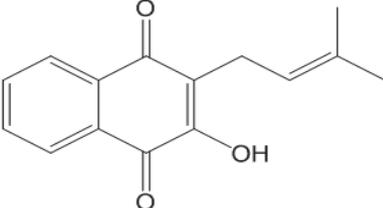
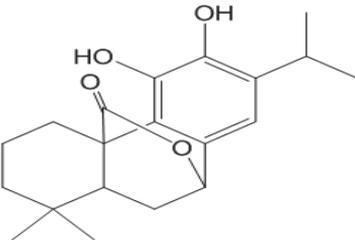
## Les produits naturels terrestres

Tableau 3: Les extraits bruts

Nom	Organismes Producteurs	Famille	Activité
LBRH, LBHH, LBHA, LBHH5,	<i>Lepechinia bullata</i>	Laminaceae	Divers <i>Lepechinia</i> connus pour leurs vertus médicinales et antibactériennes (Cerón 2006; Rojas 2003)
LCH, LCTB, LCHA	<i>Lepechinia conferta</i>		
SBF, SBFC, SBFB SBH et ses fractions SBH2 à SBH5	<i>Solanum bicolor</i>	Solanaceae	Divers <i>Solanum</i> sont antimicrobiens et antifongiques (Chah et al. 2000,)
SBh, SHC, APCA33	<i>Solanum hypomalacophyllum</i>		
CbHh, CbEh	<i>Carramboa badillo</i>	Asteraceae	Font partie de la sous-tribu des Espeletiinae et possèdent les mêmes caractéristiques que cette dernière
CtHEh, CtEh, CtHEt, CtMt	<i>Carramboa tachirensis</i>		
CpHE	<i>Carramboa pittier</i>		
OMM, OMH, OMM2, OMD, OMA	<i>Ocotea macropoda</i>	Lauraceae	Divers <i>Ocotea</i> sont antibactériens et antifongiques (Bruni et al. 2004)
MH <sub>2</sub> O, MetOH, Mhex	<i>Munnozia</i>	Asteraceae	Antiparasitaire (Rojas de Arias et al. 1994)
A, B, C, F, D, E	<i>Petrea aspera</i>	Verbenaceae	Vertu médicinale ( <a href="http://www.plantencyclo.com">www.plantencyclo.com</a> )
G	<i>Hyericum</i>	Hypercaceae	Antibactérienne (Meral & Karabay 2002)
H, I	<i>Stachytarpheta mutabilis</i>	Verbenaceae	Famille connue pour ses vertus médicinales et antibactériennes (Vicini et al. 2008)
J	<i>Vitacea cissus</i>	Vitaceae	Plantes médicinales (Viana et al. 2004)
K	<i>Albahaca monte</i>	Laminaceae	Famille connue pour ses vertus médicinales (Singh et al. 2007, Galindo et al. 2010)
L	<i>Albahaca amarilla</i>		
M	<i>Albahaca morada</i>		
N	<i>Albahaca blanca</i>		
DD1, DD2 (fraction)	<i>Divi dive</i> ( <i>Caesalpinia coriaria</i> )	Fabaceae	Antibactérienne (Mohana D.C et al. 2008)
TOMA	<i>Tomatina</i> ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	Solanaceae	Antifongique et antibactérienne (Lairini et al. 1996, Germosén-Robineau 2005)
A, N, T	<i>Espeletia schultzii</i>	Asteraceae	Famille connue pour ses vertus médicinales et antibactériennes (de los Ríos et al. 1999)

Tableau 4: Les produits purs et dérivés d'*Espeletia schultzei* et de *Lepechinia bullata*

Nom	Nomenclature (CIP)	Formule brute
3	Acide 15-oxo- kaur-16 en -19- carboxylique	
4	Acide 15- $\alpha$ -OH kaur- 16 en -19- carboxylique	
5	Acide 16,17 epoxy-kauran -19- carboxylique	
6	15-o-acetoxi-kaurénate de sodium	
7	ester méthylique de l'acide 15-16 epoxy 17-OH-19 carboxylique	
8	15,16 époxy 17-OH-Kaur-19- carboxylique	
<b>Kaurénol KM</b>	Kaur-16-en-18-ol	

KS	Kaurenate de sodium	
KG	Kaurenate de glucose	
Acide Kaurénique	<i>ent</i> -Kaur-16-en-19-oic acid (Mestres et al. 2011)	
Lapachol ( <i>L. bullata</i> )	4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione	
Carnosol – ( <i>L.bullata</i> )	1,3,4,9,10,10as-hexahydro-5,6-dihydroxy-1,1-dimethyl-7-isopropyl-2H-9S,4aR-(epoxymethano)phenanthren-12-one	

### Les solvants :

Tous les solvants utilisés (le méthanol, l'éthanol et le DiMéthyl SulfoXide (DMSO)) étaient purs à 98%, de grade HPLC (Sigma Aldrich, St Quentin, France).

## II.2. Milieux de culture

### II.2.1. Vaatanen Nine Salt Solution (VNSS) et VNSS agar

Les cultures planctoniques des souches marines ont été réalisées dans le milieu VNSS (Annexe I-I.1). Celui-ci est conservé durant un mois à température ambiante après passage à l'autoclave.

Le milieu VNSS agar a été constitué à partir du milieu VNSS auquel a été ajouté 1,5% (p/v) d'agar (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Quentin, France). Après sa solubilisation par chauffage à ébullition, le milieu a été stérilisé par autoclavage. Après refroidissement, il a été coulé en boîte de Pétri (ronde en Polystyrène de Ø 90 mm, Gosselin, Hazebrouck, France). Ces géloses ont été utilisées pour réaliser les isolements ainsi que les étalements bactériens.

### **II.2.2. Marine Broth (MB) et MB agar (MA)**

Certaines souches nécessitaient l'utilisation d'un milieu plus riche que le VNSS pour être conservées : le MB (BD<sup>®</sup>: Becton, Dickson and company, Grenoble, France) (Annexe I-I.2). C'est le mélange le plus couramment utilisé pour la croissance des bactéries marines. Cependant il est très turbide à la sortie de l'autoclave, ce qui peut générer des problèmes lors de l'étude de la croissance. Pour pallier à cela, il est possible de le filtrer sur du 0,2 µm mais cela risque de modifier sa composition.

Le MA (BD<sup>®</sup>: Becton, Dickson and company, Grenoble, France) se différencie du MB par sa concentration en MgCl<sub>2</sub> et par l'ajout d'agar à 1,5% (p/v).

### **II.2.3. LB et LB agar**

Le LB est un milieu nutritif riche utilisé lors du clonage bactérien pour la mise en culture de la souche *Escherichia coli*.

Le LB agar a été utilisé lors de l'étalement des souches clonées (Annexe I-I.3).

### **II.2.4. Brain Heart Infusion (BHI)**

Toutes les bactéries planctoniques non marines ont été mises en culture dans du BHI (HiMedia<sup>®</sup>, Bombay, Inde) (Annexe I-II.1). C'est un milieu polyvalent servant à cultiver des micro-organismes exigeants et non exigeants à partir d'échantillons cliniques. Après passage à l'autoclave, ce milieu a été conservé à 4°C durant un mois.

### **II.2.5 Mueller Hinton II Agar (MHAI)**

Les antibiogrammes des bactéries non marines ont été effectués sur le milieu gélosé MAII, (BD<sup>®</sup>: Becton, Dickinson and company, Grenoble, France). C'est un milieu riche classiquement utilisé pour les méthodes de diffusion sur gélose (Annexe I-II.2). Après passage à l'autoclave, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri conservées à 4°C durant 1 mois.

### II.2.6. Eau de mer artificielle (ASW : Artificial Sea Water)

L'eau de mer artificielle ou Sea Salt (Sigma Aldrich, France) est dépourvue de source de carbone. Sa composition proche d'une eau de mer « moyenne » permet de maintenir les bactéries marines en vie tout en bloquant leur croissance. Ce milieu a été utilisé pour induire un état de « stress » chez les bactéries marines issues de biofilms et favoriser la formation d'un biofilm *in vitro* (Annexe I-III). Après passage à l'autoclave ce milieu est filtré et conservé à température ambiante.

### II.3. Les fluorochromes

Les fluorochromes ont été utilisés pour révéler les biofilms. Ils ont été préférés aux colorants classiques comme le cristal violet car ils sont plus spécifiques et à priori plus sensibles. Ce sont des intercalants de l'ADN qui possèdent des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission spécifiques. Nous avons utilisé le DAPI qui émet dans le bleu ( $\lambda_{\text{ex}}=358\text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{em}}=461\text{ nm}$ ), le SYTO<sup>®</sup>13 qui fluoresce dans le vert ( $\lambda_{\text{ex}}=488\text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{em}}=509\text{ nm}$ ) ainsi que le SYTO<sup>®</sup> RED 61 qui fluoresce dans le rouge ( $\lambda_{\text{ex}}=628\text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{em}}=645\text{ nm}$ ). Tous les composés de la gamme « SYTO » provenaient de chez Molecular Probes<sup>®</sup> Invitrogen (Pontoise, France) (Figure 15)

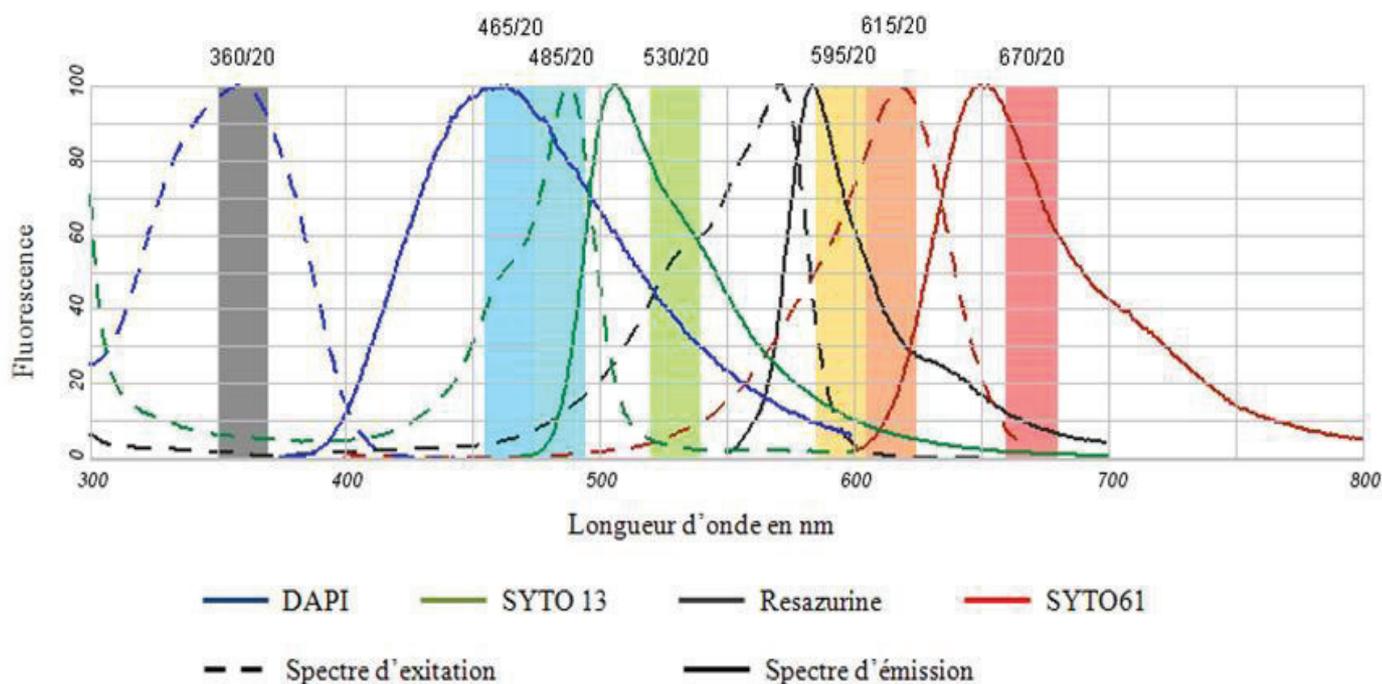


Figure 15 : Spectre d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés pour les bio-essais.

(les bandes colorées représentent les bandes passantes des filtres utilisés)

Pour certains fluorochromes, les filtres disponibles au laboratoire ne correspondaient pas exactement au maximum d'excitation ou d'émission des produits, ce qui a pu légèrement influencer l'intensité du signal lors de la lecture.

Afin d'évaluer la toxicité des biocides sur les souches, la viabilité des bactéries a été évaluée à l'aide d'un colorant indicateur d'oxydo-réduction, la résazurine (Sigma Aldrich, St Quentin, France). Ce colorant bleu est non fluorescent sous sa forme réduite. Lorsqu'il est oxydé en résorufine par les enzymes de la chaîne respiratoire bactérienne, il devient rose et fluorescent ( $\lambda_{ex}=570\text{nm}$  /  $\lambda_{em}=585\text{nm}$ ).

### III. Matériel Biologique

#### **III.1: Souches de bactéries marines de l'Atlantique**

Les souches D41 et 4M6, proviennent de l'océan Atlantique. La première a été isolée dans la Rade de Brest à Sainte Anne du Portzic ( $48^{\circ}21'32''\text{N}$ -  $4^{\circ}32'58''\text{O}$ ) en novembre 1998 par l'IFREMER (Rubio 2002). La seconde nous a été fournie par le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marine (LBCM) de l'Université de Bretagne Sud (UBS). Cette souche a été isolée en mars 2000 dans le Golfe du Morbihan (Ile Bailleron,  $47^{\circ}34'37''\text{N}$ -  $2^{\circ}44'54''\text{O}$ ) (Grasland et al. 2003) (Figure 16).



Figure 16: Localisation des trois sites d'isolement des bactéries marines étudiées (Google Earth).

### III.2. Souches bactériennes de la Méditerranée

Les isolements ont été réalisés à partir de l'immersion de deux plaques : une en silicone (20X15, Intersleek 760<sup>®</sup>, International Paint Limited) et l'autre en polystyrène (11,9X7,7, PS). Elles ont été immergées à une profondeur de 1m durant 8h en février 2008 dans la Rade de Toulon (Mourillon, 43°06'23''N-5°57'17''E). Afin d'éliminer les bactéries non adhérentes, un rinçage doux des plaques à l'ASW stérilisée a été réalisé. Les plaques ont ensuite été transportées immergées dans de l'ASW stérile au laboratoire. Les bactéries ont été récupérées selon différentes méthodes : une plaque de chaque substrat a été grattée à l'aide d'une öse puis les bactéries ont (i) soit été isolées directement sur des boîtes de Petri contenant du MA (ii) ou remises en suspension dans du MB puis 100 µl ont été étalés sur du MA. Les deux autres plaques ont été respectivement frottées à l'aide d'une compresse et d'un disque de fibre de verre. La compresse a été appliquée directement sur MA puis retirée, alors que le disque de verre a été déposé et laissé sur le milieu gélosé. Les boîtes de Pétri ont été incubées 24 à 48h à 20°C.

Les différentes colonies observées ont été récupérées à l'aide d'un cône et introduites séparément dans 5ml de MB liquide et laissées 24h dans l'incubateur à 20°C sous une agitation de 120 rpm (0,31 g)

### III.3. Souches « pathogènes »

- Gram négatif

→ *Escherichia coli* ATCC25923 (EC) : bacille de la famille des Enterobacteriaceae se trouvant communément dans les intestins de beaucoup d'organismes vivants. A forte concentration, il peut rendre son hôte malade (Nataro & Kaper 1998)

→ *Pseudomonas aeruginosa* (PA): bacille flagellé, de la famille des Pseudomonadaceae. C'est une bactérie pathogène résistante très répandue dans les milieux hospitaliers. Elle se rencontre aussi dans les lieux humides (Klausen et al. 2003).

- Gram positif :

→ *Bacillus subtilis* (BS) : bacille flagellé de la famille de Bacillaceae. Il se trouve principalement dans le sol mais peut coloniser tous les milieux. Ce n'est pas réellement une bactérie pathogène mais elle peut contaminer les aliments et entraîner ainsi des intoxications alimentaires (Wipat & Harwood 1999).

→ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (SA) : bactérie de la famille des Staphylococcaceae. Il est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections diverses

pouvant entraîner des septicémies chez l'homme mais également chez d'autres animaux (Saadatian-Elahi et al. 2008).

→ *Clostridium perfringens* (CP) : bacille immobile et anaérobie de la famille des Clostridiaceae. Il constitue un véritable danger pour de nombreux être vivants car il est responsable de la nécrose de divers tissus (Rood & Cole 1991).

Ces espèces ont été utilisées comme organismes modèles pour l'étude de l'adhésion étant donné leur capacité à former des biofilms résistants sur de nombreuses surfaces. La majorité des bactéries utilisées sont des souches sauvages, isolées de patients hospitalisés à l'hôpital universitaire de Merida (IHULA : Autonomo Hospital Universitario de Los Andes), exceptés EC et SA.

#### **III.4. Conservation des souches :**

Ces isollements ont permis la constitution d'un soucier au laboratoire. Ces souches ont été nommées par les deux premières lettres TC pour Toulon Collection suivie d'un numéro. La conservation de toutes les bactéries marines a été réalisée par cryogénéisation. Pour cela 500µl de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance en milieu VNSS auxquels sont additionnés 500µl de glycérol sont introduits dans des cryotubes et conservés à -80°C. Le même mode opératoire a été effectué pour les souches pathogènes excepté que la conservation s'est effectuée à -20°C.

#### **III.5. Conditions de culture et courbes de croissance.**

##### ***III.5.1. Souches marines***

Les pré-cultures ont été obtenues par introduction dans 5 ml de VNSS d'une colonie issue de la culture sur boîtes de Petri réalisée à partir de l'étalement du contenu du cryotube. Ces pré-cultures ont été mises à incuber 12 h à 20°C à 120 rpm. A partir de cette préparation, des cultures liquides ont étéensemencées à une densité optique à 600nm (DO<sub>600nm</sub>) de 0,1. Un repiquage a été effectué tous les jours et la croissance grossièrement suivi afin de s'assurer que la phase exponentielle se produisait toujours de façon reproductible. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (2501PC, UV VIS recording spectrophotometer, Shimadzu). Chaque semaine une nouvelle colonie issue de la boîte conservée à 4°C a été réensemencée afin d'éviter d'éventuelles dérives génétiques des souches. Les boîtes ont été conservées durant trois semaines au réfrigérateur.

Afin de déterminer les différentes phases de croissance ainsi que le taux de croissance maximum ( $\mu_{\max}$ ) de chacune des souches, une courbe de croissance a été réalisée. Pour cela, trois cultures à une DO<sub>600nm</sub> de 0,1 ont été préparées dans du VNSS à partir d'une

culture repiquée la veille. Les cultures ont été incubées sous agitation à 120 rpm à 20°C. L'évolution de la croissance a été suivie par une mesure toutes les heures de l'absorbance à 600 nm. L'ajustement des points expérimentaux de la courbe de croissance  $DO = f(\text{temps})$  ainsi obtenue à une exponentielle a servi à déterminer le  $\mu_{\max}$ .

### **III.5.2. Souches pathogènes.**

Les pré-cultures ont été obtenues par introduction de 100  $\mu$ l de suspension bactérienne issue des cryotubes dans 10 ml de milieu BHI, puis mises à incuber 12 h à température ambiante sans aucune agitation. Tout comme pour les bactéries marines, des cultures liquides ont été ensemencées à partir de cette préparation à une densité optique à 600nm ( $DO_{600\text{nm}}$ ) de 0,1. Un repiquage a été effectué tous les jours, et la croissance grossièrement suivie afin de s'assurer que la phase exponentielle se produisait toujours de façon reproductible. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (UNICO Spectrophotometers 1100 series). Toutes les deux semaines, une nouvelle pré-culture était réalisée à partir d'un cryotube pour les mêmes raisons que citées ci-dessus.

### **III. 6. Extraction des produits bruts d'*Espeletia schultzii***

Le Frailejon, plante endémique de la cordillère des Andes et plus particulièrement du Venezuela et de Colombie, a été récolté le 15 janvier 2010, au Paramo, près du Pico el Aguila situé à plus de 4100 m d'altitude (Venezuela). La matière sèche obtenue après 1 mois de séchage a été broyée à l'aide d'un moulin électrique. Sur les 6 kg de matières fraîches récoltées il ne restait plus que 1,4 kg de matières sèches. Puis, environ 1 kg de plante fraîchement moulue a été introduit dans une colonne de verre de 1 m de haut et un mélange Hexane/Ether (5/1) a été ajouté afin de procéder à l'obtention d'un extrait brut (Figure 17).

Le mélange a été laissé à décanter pendant 72 h. Puis 5,5 L d'extrait total ont été récupérés, équivalent à 48,4 g. Afin d'obtenir les différentes fractions, les traitements décrits dans la Figure 18 ont été effectués.



Figure 17 : Colonne de verre contenant le frailejon mouliné

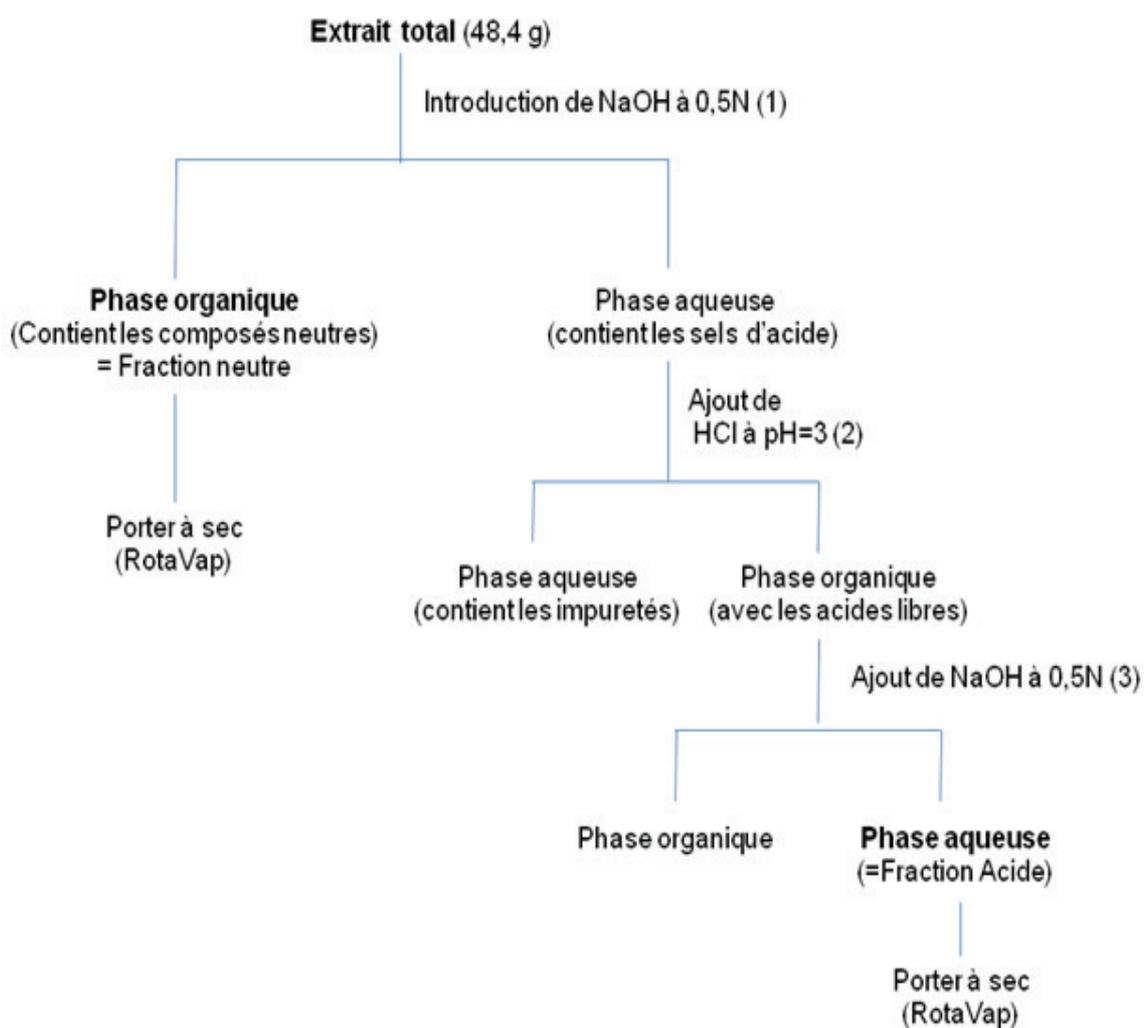


Figure 18: Procédé de fractionnement de l'extrait brut de Frailejon

Quelques gouttes de sulfate de sodium sont rajoutées à la fraction acide afin de la déshydrater avant le passage à l'évaporateur rotatif.

## **IV. Caractérisation des souches**

### **IV.1. Taxinomie**

L'analyse génétique des bactéries isolées de la mer Méditerranée a été réalisée au LBCM (UBS, Lorient).

Extraction de l'ADN : Elle a été réalisée à partir de 1,4 ml de suspension bactérienne en phase stationnaire de croissance. Celle-ci a été préalablement centrifugée à 13000 tr/min, afin d'éliminer le milieu de culture. Les protéines, les ARN et toutes autres impuretés qui pourraient gêner la PCR ont été éliminés à l'aide du Kit Dneasy Blood and tissues Hand book (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Pour vérifier la qualité de l'extraction de l'ADN, une électrophorèse en gel d'agarose a été réalisée. Ce gel a été préparé en introduisant 0,4 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE (Tris/Acétate/EDTA). Le mélange a été chauffé au four micro-onde pendant 1 minute environ jusqu'à ce que l'agarose soit totalement dissous. Avant d'être coulé, 1,5 µl de BET (Bromure d'éthidium) ont été ajoutés au mélange pour marquer les acides nucléiques. Le gel a été séché à l'air libre durant 45 minutes dans une cuve en plastique *ad hoc* permettant aussi la formation des puits de dépôts des échantillons. Puis il a été placé dans la cuve à électrophorèse et recouvert de TAE. Ensuite les extraits d'ADN auxquels ont été rajoutés 4µl de bleu de Bromophénol glycérolé ont été introduits dans les puits. Le glycérol permet d'augmenter la densité des échantillons afin qu'ils se positionnent au fond des puits. La coloration bleue permet de suivre l'évolution de la migration des ADN dans le gel. Un marqueur de taille a également été déposé dans l'un des puits pour estimer la taille des différents fragments obtenus. L'électrophorèse a alors été mise en route durant ¾ d'heure à 5,6 V/cm.

La révélation du gel a été effectuée sous éclairage ultraviolet ce qui permet d'observer les bandes d'ADN.

Réaction de PCR. Cette étape permet d'amplifier une région particulière des génomes bactériens, dans notre cas la sous-unité 16S de l'ADN (ADNr 16S) qui est classiquement utilisée comme marqueur phylogénétique des procaryotes. Des amorces universelles bactériennes (16sF et 16sR) ont été choisies (Grasland et al. 2003). Après extraction de l'ADN, l'amplification de l'ADNr 16S par PCR peut être réalisée. Pour cela, un mix contenant 5 µl de tampon 10x PCR, 34,5 µl d'eau ultra pure, 1µl de dNTP, 6 µl de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de l'amorce 16sF (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') à 25 µM et 2 µl de l'amorce 16sR (5'-CGGYTACCTTGTTACGAC-3') à 25 µM ainsi que 0,5 µl de la Taq DNA polymérase (0,5 U) (Invitrogen, Carlsbad, Canada) a été préparé. Puis 49 µl de ce mix a été introduit dans des tubes à PCR, dans lesquels 1µl des différents ADN à tester a été ajouté. Le cycle PCR utilisé est le suivant :

	1 <sup>ère</sup> boucle	2 <sup>ème</sup> boucle	3 <sup>ème</sup> boucle
<b>Nombre de cycle</b>	1	32	1
<b>Dénaturation</b>	10 min à 95°C	1 min à 95°C	
<b>Hybridation</b>		1 min à 55°C	
<b>Elongation</b>		1 min à 72°C	
<b>Elongation finale</b>			10 min à 72°C

Tableau 5 : Programme PCR pour l'amplification de l'ADNr 16S des bactéries marines

La vérification de l'amplification est faite par électrophorèse sur gel d'agarose.

Clonage : L'ADN amplifié doit alors être cloné avant séquençage pour obtenir une meilleure spécificité. Pour cela le Kit « TOPO TA cloning, TOP 10 » (Invitrogene, Carlsbad, Canada) a été utilisé. Il permet d'insérer les produits de PCR dans des plasmides (TOPO) possédant un gène de résistance à un antibiotique (ici la Kanamycine). Ces plasmides modifiés ont ensuite été intégrés dans des bactéries (*Escherichia coli*) choisies pour leur reproduction rapide et rendues compétentes par électroporation (lyse osmotique par choc électrique), permettant ainsi l'intégration des produits de ligation. Afin de vérifier la bonne intégration du plasmide, un étalement sur LB agar contenant de la Kanamycine (50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) a été réalisé. Les boîtes ont été incubées 24 h à 37°C. Des colonies bleues et blanches sont alors apparues sur la gélose : seules les bactéries blanches contiennent le plasmide. En effet, tous les plasmides introduits dans les bactéries n'intègrent pas de produit de PCR. Or celui-ci s'insère dans le gène  $\beta$ -galactosidase présent dans le plasmide et qui devient donc inactif. Il inhibe ainsi la capacité de la bactérie à transformer le substrat X-Gal introduit dans le milieu. S'il y a absence de l'insert, le gène peut dégrader le substrat qui va colorer les bactéries en bleu. Une pré-culture a été réalisée à partir d'une colonie blanche dans du milieu LB durant 24 h. Une colonie bleue a également été prélevée et mise en culture pour servir de témoin. La pression de sélection est toujours maintenue dans ces différentes cultures par ajout de 5  $\mu\text{l}$  de Kanamycine (50  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ).

Vérification de l'insertion du fragment d'ADN amplifié par digestion enzymatique : le kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN Courtaboeuf, France) a permis d'extraire les plasmides présents dans les bactéries. Ensuite des enzymes de restriction Eco RI et Eco RV ont été utilisées pour couper les plasmides au niveau des sites de restriction Eco RI et Eco RV qui encadrent le fragment inséré. La taille des produits de restriction a été contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose.

Deux plasmides correspondants à chaque souche étudiée ont été séquencés par Génome Express (Cogenics, Meylan, France). Les résultats du séquençage ont été analysés par le logiciel TBLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) qui permet de comparer la séquence nucléotidique de la souche aux séquences nucléotidiques de la base de données du NCBI.

#### IV.2. Coloration de Gram

Elle fut développée en 1884 par le physicien Hans Christin Gram. La coloration de Gram permet de classer les bactéries dans deux catégories : les Gram positifs et les Gram négatifs. La différence se trouve dans la constitution de leurs membranes cellulaires. En effet, les Gram positifs possèdent une paroi plus épaisse, constituée principalement de peptidoglycane, composé déterminant lors de la coloration. Les Gram positifs sont colorés en violet alors que les Gram négatifs sont colorés en rose (Figure 19).

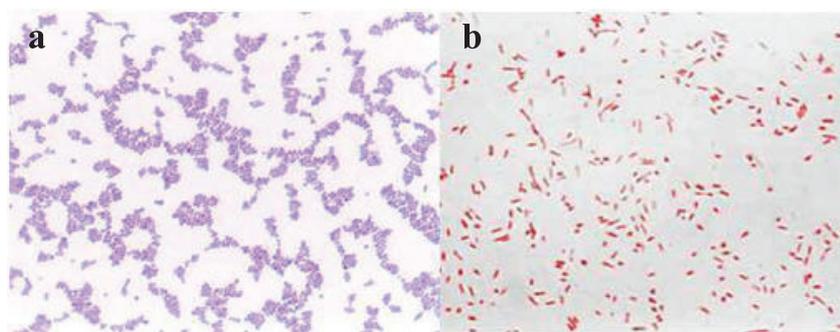


Figure 19: Coloration des bactéries (a) Gram positifs, (b) Gram négatifs

#### IV.3. Mobilité

Afin de mieux caractériser les bactéries, leur mode de déplacement sur différents types de géloses (molle, semi molle ou solide) a été observé (Henrichsen 1972, Harunur et al. 2000) de la façon suivante :

##### *IV.3.1. Swimming*

Ce déplacement se fait surtout en milieu liquide ou semi-solide. En général, les bactéries utilisant ce mode de déplacement possèdent des flagelles. Les cellules nagent de façon non organisée dans les canaux aqueux de la gélose. Afin d'observer ce déplacement, une gélose à 0,3 % d'agar a été préparée et 5  $\mu$ l de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance y a été déposé en son centre sans autre action.

### ***IV.3.2. Swarming***

Le déplacement en essaim nécessite une modification morphologique de la bactérie. Elle va se doter de nombreux flagelles permettant ainsi une colonisation rapide du milieu. Pour observer ce phénomène, un dépôt de 5 $\mu$ l a été fait sur une gélose semi molle à 0,5% d'agar.

### ***IV.3.3 Twitching***

Certaines bactéries se déplacent par glissement sur des surfaces solides. Pour cette étude, nous avons utilisé une gélose solide à 1,5% d'agar. La gélose a été percée à l'aide d'un cône préalablement immergé dans la suspension bactérienne à étudier. Les cellules se retrouvent alors prises entre la gélose et la surface solide.

Les boîtes ont été mises à incuber 48h dans l'incubateur à 20°C puis les halos de dispersion mesurés. Les tests ont été réalisés en duplicats pour chaque souche, à la fois sur MB agar et sur VNSS agar.

## **IV.4. Microscopie Electronique à Balayage**

Afin de pouvoir observer la structure du biofilm, une étude en microscopie électronique à balayage (MEB) a été effectuée. Cet appareil permet une bonne observation d'une petite surface possédant du relief. Le principe du MEB est basé sur l'interaction entre un faisceau d'électrons et la matière étudiée. En effet, les électrons émis par l'appareil vont irradier l'échantillon et perdre de l'énergie, ce qui va entraîner des phénomènes tels que la réémission d'électrons secondaires, qui va permettre l'observation topographique des échantillons.

Pour réaliser cette expérience, des coupons de 1cm<sup>2</sup> de silicone et de lames de verre ont été stérilisés par autoclavage. Puis ils ont été mis à incuber durant 24 h à 20°C dans une culture bactérienne préparée à une DO de 0,1 afin de permettre la formation d'un biofilm sur leur surface. Les substrats recouverts de biofilms ont ensuite été récupérés à l'aide d'une pince stérile et déposés dans de petits piluliers contenant une solution de glutaraldéhyde à 3% dans un tampon phosphate 0,1 M permettant la fixation du biofilm. Le biofilm a été laissé en contact avec le fixateur pendant une nuit à 4°C. Les coupons ont ensuite été lavés trois fois toutes les dix minutes par un tampon phosphate (0,1 M) puis déshydratés. Pour cela, ils ont été rincés trois fois 10 min avec de l'éthanol à 70%, puis trois fois 10 min à 95% et enfin trois fois 10 min à l'éthanol absolu. La déshydratation totale a été obtenue soit par plusieurs rinçages successifs d'une séquence de 10 minutes chacun (échantillons

préparés au laboratoire MAPIEM) soit par la méthode du point critique (échantillons préparés au LBCM).

- ↳ Déshydratation totale par des solvants : Les trois premiers rinçages sont faits avec un mélange éthanol/acétone 70/30 (v/v), suivi de trois rinçages réalisés avec un mélange éthanol/ acétone 50/50 (v/v) et enfin les trois derniers rinçages sont effectués avec une solution d'éthanol/acétone 30/70 (v/v). Les échantillons sont mis à sécher 15 minutes à l'air libre, permettant ainsi la totale évaporation des solvants.
- ↳ Déshydratation par le point critique : la méthode du point critique est réalisée à l'aide d'un CPD030 Critical Point Dryer (Bal\_Tec, France) utilisant le CO<sub>2</sub> comme fluide de transition. Dans un premier temps les échantillons sont recouverts par de l'éthanol absolu qui va être remplacé par du CO<sub>2</sub> après plusieurs passages de celui-ci dans une enceinte refroidie à 8°C. Afin de sécher complètement l'échantillon un dernier passage de CO<sub>2</sub> effectué à une température de 40°C est réalisé.

Puis les échantillons déshydratés sont montés sur des plots d'aluminium puis métallisés à l'or pendant 120 s à 20 mA à l'aide d'un alliage or/palladium en utilisant un pulvérisateur.

Une première observation à été effectuée au MAPIEM sur les coupons de silicone (Philips<sup>®</sup>, modèle XL30). La distance moyenne de travail était d'environ 10 mm et le voltage maintenu à 15 KV.

Les échantillons préparés sur lame de verre ont été analysés au LBCM à Lorient (UBS) à l'aide d'un microscope électronique à balayage (Jeol JSM 6406LV, Tokyo, Japon), à une amplification de 8,5 à 10,0. Le voltage a été maintenu à 10 kV ou 15 KV à une distance moyenne de travail d'environ 10mm.

#### **IV.5. Angle de contact**

L'angle de contact ( $\Theta$ ) est un paramètre permettant de déterminer l'hydrophobicité de surface des matériaux (eg Bruinsma et al. 2001). Il peut aussi être utilisé pour estimer l'hydrophobicité en surface de bactéries (Grasland et al. 2003). Cette méthode consiste à mesurer l'angle que fera une goutte de solvant avec le revêtement. Plus l'angle existant entre le support et la goutte de solvant est grand, plus le substrat est hydrophobe. Ceci peut être résumé par la Figure 20 suivante :

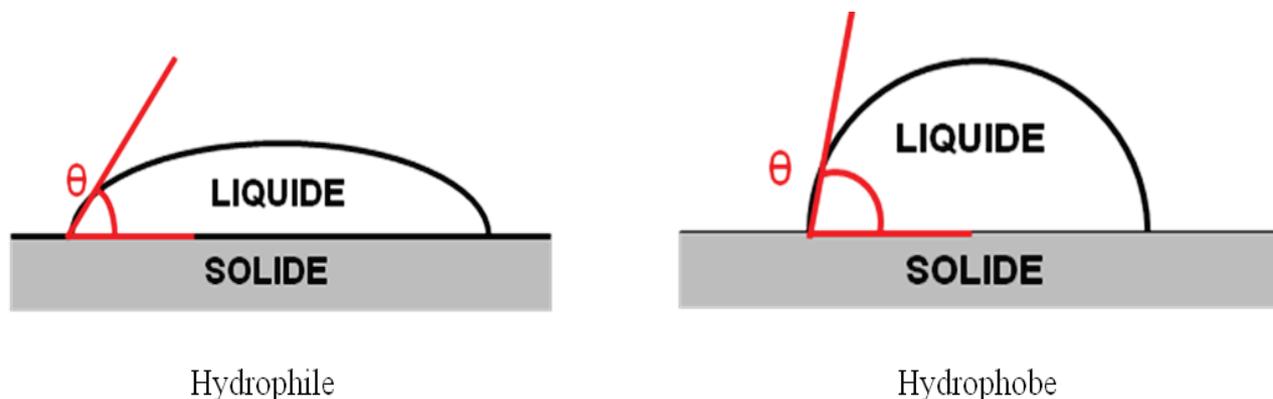


Figure 20: Mesure de l'angle de contact

Des filtres de nitrocellulose de porosité  $0,22 \mu\text{m}$  ont été saturés en bactéries par filtration sous vide de 10 ml de culture en phase stationnaire. Les filtres ont ensuite été déposés sur un support dépourvu de rugosité (afin d'éviter de modifier la surface des filtres). Puis ils ont été séchés environ 60 minutes sous hotte à flux laminaire empêchant les contaminations (Bruinsma et al. 2001). La mesure de l'angle de contact a été effectuée par un Digidrop (GBX Instruments, Romans, France). Cinq gouttes d'eau ont été déposées successivement sur le filtre fixé sur la plateforme de l'appareil. La mesure de l'angle est réalisée après stabilisation de la goutte. La moyenne des 5 mesures a été calculée pour chaque souche. Cette étude a été effectuée sur cinq tapis bactériens de souches marines, trois méditerranéennes (TC4, TC5 et TC8) ainsi que les deux souches bretonnes (D41 et 4M6).

#### **IV.6. Microbial Adhesion To Solvents (MATS)**

Cette analyse a permis de déterminer le caractère donneur-accepteur des souches bactériennes. Pour cela, la méthode mise au point par Bellon-Fontaine et al. (1996) a été utilisée. Elle repose sur la différence d'affinité de la bactérie pour des solvants monopolaires et des solvants apolaires. Le couple hexadécane (apolaire) et chloroforme (monopolaire acide) nous renseigne sur le caractère électron-donneur. Le couple acétate d'éthyle (monopolaire basique) et décane (apolaire) nous renseigne sur le caractère électron-accepteur.

Pour réaliser cette analyse, la culture bactérienne en phase stationnaire a été centrifugée durant 10 minutes à 6000 rpm (soit 3824g), puis lavée deux fois au NaCl à  $36\text{g.L}^{-1}$

Après quoi le culot a été récupéré dans du NaCl et la DO mesurée à 400 nm ajustée à 0,8 ( $D_i = DO$  initiale). Deux concentrations de NaCl ont été testées :  $36\text{g.L}^{-1}$  (Rubio 2002) et

8,8g.L<sup>-1</sup> (Grasland et al. 2003). Une partie de cette suspension (2,4 ml) a été ajoutée à 0,4 ml de solvant, puis agitée durant une minute. L'échantillon a été laissé durant quinze minutes à l'air ambiant. La phase aqueuse a alors été récupérée et sa DO mesurée à 400 nm (Df= DO finale). Le calcul du pourcentage d'adhésion (A%) se fait comme suit :

$$A\% = ((D_i - D_f) / D_i) * 100$$

## **V. Bio-essais anti-adhésion**

### **V.1. Mise au point au laboratoire du bio-essai monospécifique**

#### ***V.1.1. Optimisation des paramètres d'adhésion des bactéries en microplaque***

##### **V.1.1.1. Adhésion en phase stationnaire.**

Des études ont montré que la bactérie adhère mieux lorsqu'elle était ensemencée en phase stationnaire (Djordjevic et al. 2002, Vesterlund et al. 2005, Burton et al. 2007). Pour cela 10 ml de culture bactérienne à une DO<sub>600nm</sub> de 0,1 sont préparés dans du VNSS, dans des flacons de 60 ml (permettant ainsi les échanges de gaz entre l'air et le liquide) et mis à incuber à 20°C sous agitation de 120 rpm. La croissance est suivie toutes les heures jusqu'à la fin de la phase stationnaire, permettant ainsi de déterminer la durée de la phase exponentielle de croissance ainsi que l'arrivée en phase plateau pour toutes les souches et donc de déterminer le moment optimal d'ensemencement de la bactérie dans la microplaque.

##### **V.1.1.2. Cinétique d'adhésion.**

Le temps d'adhésion correspond au temps nécessaire permettant l'adhésion irréversible des bactéries en suspension dans l'ASW. C'est-à-dire à partir du moment où les lavages successifs n'entraînent plus l'élimination de ces bactéries. Afin d'optimiser le protocole, la durée minimale d'adhésion a donc été définie pour chacune des souches. Pour cela, des temps d'adhésion de 3h, 6h, 12h, 15h et 24h ont été testés. Les suspensions bactériennes situées en début de phase stationnaire ont été centrifugées à 6000 rpm durant 10 minutes permettant ainsi l'élimination du milieu de culture. Le culot a ensuite été remis en suspension dans 10 ml d'ASW. Puis une gamme de dilution de la suspension bactérienne dont les DO<sub>600nm</sub> sont comprises entre 0,2 et 1 a été ensemencée dans plusieurs microplaques noires 96 puits à fonds plats en Polystyrène (Nunc, Fisher scientific, Illirch, France). Les microplaques ainsi préparées ont été mises à incuber à 20°C à 120 rpm durant un temps défini précédemment. Les lignes A et H ainsi que les colonnes 1 et 12 ne contenaient que de l'ASW et servaient de blanc.

Le protocole de quantification des bactéries adhérees sera appliqué par la suite pour toute analyse au DAPI et provient des travaux de Leroy et al. (2007). Après un temps d'adhésion déterminé pour le suivi de la cinétique, les bactéries non adhérees sont éliminées par retournement de la microplaque, ainsi que par trois lavages successifs au NaCl à 36 g.l<sup>-1</sup>. Les bactéries adhérees sont alors fixées avec du NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> contenant 2 % de formaldéhyde (stérilisé au préalable par filtration sur 0,22µm). Les microplaques sont alors incubées durant 1h30 à 4°C. La quantification des bactéries adhérees est réalisée par l'introduction de 200 µl de DAPI à 4 µg.ml<sup>-1</sup> dilué dans du NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> filtré. Après 20 minutes à l'obscurité, le DAPI n'ayant pas interagi avec l'ADN bactérien est éliminé par retournement puis 3 lavages au NaCl sont à nouveau réalisés. Bien qu'une lecture directe à ce stade puisse être réalisée, une extraction cellulaire du DAPI augmentait la sensibilité de la méthode. Voilà pourquoi 200 µl d'éthanol à 95 % sont introduits dans les puits. Les microplaques sont laissées 15 minutes sous agitation à 120 rpm à 20°C toujours à l'obscurité. L'intensité de fluorescence (IF) peut alors être mesurée à l'aide du lecteur de microplaque Infnit 200 (TECAN à λ=358/461 nm).

#### **V.1.1.3. Densité d'ensemencement**

Afin d'optimiser la sensibilité du bio-essai, il est nécessaire de déterminer la densité maximale d'ensemencement. Pour être exploitable, le signal de fluorescence doit rester proportionnel à la quantité de bactéries dans le puits, il faut donc obtenir un tapis bactérien « monocouche et homogène ». Une gamme de DO<sub>600nm</sub> allant de 0,05 à 0,8 a été réalisée en microplaque à partir d'une suspension bactérienne en phase stationnaire introduite dans de l'ASW selon la méthodologie décrite dans le paragraphe précédent. La microplaque a été mise à incuber à 20°C pendant la durée déterminée par la cinétique d'adhésion. La quantification des bactéries adhérees a été réalisée au DAPI (Chapitre II -V.1.1.2).

#### ***V.1.2. Corrélation entre le nombre de bactéries adhérees et l'IF en microplaque***

Afin de vérifier la corrélation entre la densité optique d'ensemencement des microplaques, l'IF et le nombre de bactéries adhérees dans les puits, un protocole de comptage en microplaque a été mis en place. Pour cela des plaques noires à fonds plats transparents (96 puits en PS, Greiner Bio-one Cellstar, Fisher scientific, Illirch, France) permettant l'observation par microscopie à épifluorescence inversée ont été utilisées. Une gamme effectuée à partir d'une culture bactérienne en phase stationnaire, de densités bactériennes allant d'une DO<sub>600nm</sub> de 0,05 à 0,8, a été utilisée. Le temps d'adhésion utilisé correspond à celui déterminé précédemment pour chaque souche.

Une fois les bactéries adhérees, le marquage au DAPI est effectué comme décrit précédemment à l'exception de l'extraction du DAPI par l'éthanol. Les bactéries ont alors été observées au microscope inversé à épifluorescence ( $\times 400$ , Leica DM1 4000B) au laboratoire PROTEE (USTV). Pour chaque densité bactérienne, cinq champs de deux puits chacun ont été photographiés (caméra LEICA DFC 420C). Afin de tenir compte de l'hétérogénéité éventuelle des biofilms dans les puits, les photographies ont été prises en suivant le rayon du puits de la périphérie vers le centre.

Une fois les images obtenues, celles-ci ont été traitées à l'aide du logiciel Gimp 2,4. Ce dernier a permis d'obtenir une photographie sur laquelle une partie d'image qu'on appellera champ a pu être mesurée. Une fois la taille de ce champ déterminé, le comptage a été effectué. Par la suite, le champ compté a été rapporté à la photo entière, obtenue par le microscope, après au puits afin d'obtenir le nombre de bactéries adhérees par puits. Les calculs sont explicités ci-dessous:

- Aire des champs comptés (1) :  $L \times l$  ( $\text{cm}^2$ )
- Aire totale de la photographie sur le logiciel (2) :  $L \times l$  ( $\text{cm}^2$ )
- Rapport du calque (3) : (1)/ (2).
- Aire de la photographie du microscope (4) :  $L \times l$  ( $\text{cm}^2$ )
- Taille réelle de l'image : (3)\*(4).
- Aire du puits :  $\pi \times r^2$ . Ici le diamètre du puits est de 6,8 mm

Une fois le comptage terminé, l'extraction du DAPI à l'éthanol dans les microplaques a été réalisée comme précédemment décrit. (Cf. Chapitre II-V.1.1.2)

### ***V.1.3. Toxicité des solvants.***

La majorité des molécules testées sont peu polaires, voire même pour certaines apolaires. Il fallait donc les dissoudre dans des solvants adaptés et compatibles avec la matière des microplaques (PS). De plus, ces solvants ne devaient pas influencer sur la viabilité et/ou sur l'adhésion des bactéries. En fonction de ces deux critères, l'activité du méthanol, de l'éthanol ainsi que du DMSO a été déterminée dans le cadre du bio-essai. Une gamme de concentration allant de 0 à 50 % a été testée en triplicats suivant la Figure 21

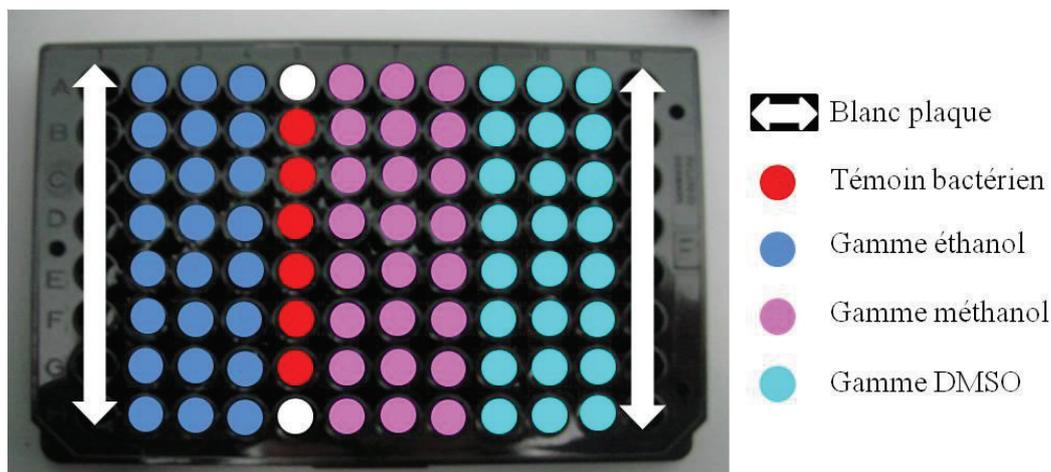


Figure 21: Schéma d'ensemencement de la microplaque pour l'étude la toxicité des solvants

Premièrement, 100  $\mu$ l de solvant aux différentes concentrations choisies, de 0 à 50 %, ont été introduits dans l'ASW en 4 réplicats dans les colonnes 2 à 4 et 6 à 11. Les solutions introduites sont deux fois (x2) plus concentrées que celles désirées car elles vont être diluées par 2 au moment de l'introduction des bactéries. Dans les lignes B à G, 100  $\mu$ l d'une culture bactérienne en phase stationnaire (après centrifugation et resuspension dans l'ASW comme précédemment décrit) ont été ajoutés pour constituer des triplicats. Dans les lignes A et H, 100  $\mu$ l d'ASW ont été ajoutés pour constituer des « blancs échantillons » (molécules + marqueurs sans bactéries). Cela permet de vérifier que le biocide n'interagit pas de manière aspécifique avec le fluorochrome, ce qui aurait pour conséquence de surestimer les pourcentages d'adhésion et de rendre les résultats inexploitable. Enfin, les puits des colonnes 1 et 12 ont été remplis avec 200  $\mu$ l d'ASW. Les puits en « bordure de plaque » ne sont classiquement pas utilisés pour les tests d'activité et ne peuvent servir que de « blancs » parce que leur position extérieure peut générer un biais. Les microplaques ont été incubées et révélées comme précédemment décrit (Chapitre II-V.1.1.2).

#### ***V.1.4. Protocole pour l'évaluation de l'activité de molécules en solution.***

Pour déterminer l'activité anti-adhésion des divers produits à tester, les bio-essais ont été réalisés en microplaque noire 96 puits à fonds plats. Dans un premier temps, les bactéries ont été mises en culture dans du VNSS à 20°C et sous agitation 120 rpm, récupérées en début de phase stationnaire puis centrifugées durant 10 minutes à 6000 rpm. Le milieu de culture a été éliminé et remplacé par de l'ASW. Les microplaques ont alors étéensemencées à la  $DO_{600nm}$  déterminée pour chaque souches par l'étude de densité d'ensemencement (cf. :V.1.1.3)



Figure 22 : Schéma d'ensemencement des microplaques

Le schéma de microplaque classique est représenté Figure 22. Les colonnes 1 et 12 contenaient 200  $\mu$ l d'ASW. Dans les colonnes 2 à 5 et 8 à 11, 100  $\mu$ l de molécules à tester, à différentes concentrations, ont été déposés dans les puits. Puis 100  $\mu$ l d'inoculum bactérien à la densité retenue suite aux mises au point décrites précédemment ont été ajoutés dans les lignes B à G et des colonnes 2 à 11. Les puits des lignes A et H ont été complétés avec 100  $\mu$ l d'ASW pour servir de blancs échantillons.

Pour chaque biocide une gamme de 8 concentrations à été choisie. Chaque concentration a été testée en triplicats. Les microplaques contenaient également trois témoins. Un « témoin positif d'adhésion » réalisé en 6 réplicats et qui servait de référence d'adhésion pour l'ensemble de la microplaque. Ces puits contenaient 100  $\mu$ l d'ASW et 100  $\mu$ l de l'inoculum bactérien (colonne 7). Le « témoin solvant », réalisé en triplicats, permettait de vérifier que le ou les solvants utilisés pour solubiliser les molécules ou les extraits n'affectaient pas l'adhésion à la concentration utilisée. Ces puits contenaient le solvant à la concentration maximale utilisée (x2) dans 100  $\mu$ l d'ASW et 100  $\mu$ l de l'inoculum bactérien (colonnes 6 lignes E à H). Le « témoin positif d'activité » permettait de vérifier que la sensibilité de la souche n'avait pas varié, notamment suite aux repiquages successifs même s'ils ont été limités (cf Chapitre II-III.5.1). Ce point est important pour pouvoir garder une bonne reproductibilité au bio-essai. Ces puits comprenaient 100  $\mu$ l de TBTO à une concentration de l'ordre de sa  $CE_{50}$  x2 (30  $\mu$ M au lieu de 15  $\mu$ M) et 100  $\mu$ l de l'inoculum bactérien (colonne 6 lignes A à D).

Dans le cas des molécules apolaires qui ne peuvent pas être dissoutes dans les solvants compatibles avec une activité bactérienne normale (Cf Chapitre II- 5.1.3), le protocole a été adapté. les biocides ont alors été dilués aux concentrations voulues dans

100% d'éthanol ou de méthanol (le DMSO étant peu volatile, il n'a pas été retenu), puis 100 µl de ces solutions ont été introduites dans les puits et laissés durant un minimum de 12h sous hotte à flux laminaire afin de permettre l'évaporation totale du solvant dans des conditions de stérilité. Ensuite, la microplaque a étéensemencée telle que décrit précédemment.

Après un temps d'adhésion optimal (déterminé pour chaque souche), les bactéries non-adhérées ont été éliminées par retournement de la microplaque. Puis trois lavages successifs au NaCl à 36g.l<sup>-1</sup> ont été effectués. Les bactéries adhérentes ont alors été fixées avec du NaCl 36g.l<sup>-1</sup> contenant 2% de formaldéhyde durant 1h30 à 4°C. La révélation du biofilm a été réalisée par introduction de 200µl de DAPI à 4 µg.ml<sup>-1</sup>. Après 20 minutes à l'obscurité, le DAPI n'ayant pas interagi avec l'ADN bactérien a été éliminé par retournement puis 3 lavages au NaCl ont à nouveau été réalisés. 200µl d'éthanol à 95% ont été introduits dans les puits ensuite les microplaques ont été mises 15 minutes à l'obscurité à 20°C et sous agitation à 120 rpm. L'intensité de fluorescence (IF) a été mesurée avec le lecteur de microplaque Infnit 200 (TECAN) à  $\lambda_{ex}=360 / \lambda_{em}=465$  nm.

Pour les extraits bruts de plantes terrestres du Venezuela ainsi que pour les revêtements, la quantification a été faite avec les fluorochromes SYTO 61 et SYTO 13. Après incubation avec les composés, les plaques ont été lavées trois fois au NaCl 36 g.l<sup>-1</sup> pour éliminer les bactéries non adhérentes. Puis, 200 µl du fluorochrome approprié, à 1µM, ont été introduits. Les plaques ont été placées 15 minutes à l'obscurité. Après trois lavages au NaCl 36 g.l<sup>-1</sup>, permettant d'éliminer le surplus de marqueur, la fluorescence a été mesurée à l'aide du lecteur de microplaque Infnit 200 (TECAN), aux longueurs d'onde  $\lambda_{ex}=615$  nm /  $\lambda_{em}=670$  nm pour le SYTO<sup>®</sup> 61 et  $\lambda_{ex}=485$  nm /  $\lambda_{em}=530$  nm pour le SYTO<sup>®</sup> 13.

Le pourcentage d'adhésion par puits a été calculé de la façon suivante :

$$(IF_n - IF_P) / (IF_{TB} - IF_B) * 100$$

Où : IF n = Moyenne des IF des différentes concentrations testées

IF P= IF du produit seul

IF TB= Moyenne des IF du témoin bactérien.

IF B= Moyenne du blanc (fixation aspécifique des fluorochromes sur le polystyrène)

Enfin, la courbe sigmoïde dose-réponse % adhésion= f (Log Ci) ainsi que le calcul de la concentration efficace 50 (CE<sub>50</sub>) ont été réalisés.

Les souches pathogènes non marines ont étéensemencées dans des microplaques transparentes et marquées à l'aide du cristal violet (CV) pour des raisons logistiques. Pour cette coloration, les plaques ont été lavées 3 fois avec de l'eau osmosée stérile, laissées 20 minutes sous la hotte à flux laminaire, puis 200 µl de CV à 0,1 % ont été introduits dans les puits. La safranine a également été testée comme colorant mais elle présentait une sensibilité moindre comparée au CV. Deux concentrations de CV ont été testées : 1% selon Barreto et al. (2009) et 0,1% selon Gentry & Dalrymple (1980). La réponse obtenue pour la concentration de CV de 1 % était trop élevée pour être lue par le lecteur de plaque (Bio Rad modèle 550). La concentration de 0,1 % a donc été retenue. Le colorant a été laissé à incuber avec les bactéries durant 20 minutes puis éliminé par retournement. Trois lavages successifs ont ensuite été réalisés avec 200µl d'eau stérile. Puis le CV a été extrait avec 200 µl d'éthanol à 95% et la lecture effectuée après 10 minutes d'extraction, à une longueur d'onde de 570nm.

#### ***V.1.5. Adaptation du bio-essai anti-adhésion aux peintures antifouling***

Afin de pouvoir cribler plus rapidement les peintures AF, nous avons adapté le bio-essai anti-adhésion. Pour cela, celles-ci ont été introduites dans les microplaques 96 puits. Cependant, les peintures (détaillées dans le Chapitre II-VII.1.1) sont classiquement synthétisées et diluées dans des solvants comme le Xylène qui dissolvent le polystyrène des microplaques. Il a donc fallu introduire des petits disques de PVC ou de verre d'un diamètre légèrement inférieur à celui des puits sur lesquels les peintures ont été déposées. Pour notre expérience, une moyenne de six à huit gouttes ont été déposées sur des disques de PVC, excepté pour les peintures visqueuses (IT757 et SL04A) où seulement 4 gouttes ont été déposées. Les microplaques ont été mises à sécher à l'air libre durant un minimum de 15 jours. Puis elles ont été lavées trois fois à l'eau distillée et laissées sous agitation durant deux heures. L'eau a ensuite été éliminée et les plaques ont été mises à sécher 10 minutes retournées sur du papier absorbant. Enfin, elles ont été stérilisées durant 30 minutes sous UV. Cette méthodologie a été développée au laboratoire par Brigitte Tanguy (IGE). Par ailleurs, elle avait montré dans des expériences préliminaires une fixation aspécifique très fréquente du DAPI sur les peintures. Nous avons donc choisi d'utiliser d'autres marqueurs fluorescents (SYTO<sup>®</sup> 61 et SYTO<sup>®</sup> 13). Comme cela a été décrit au Chapitre II-V.1.4, ils permettent une lecture directe sans extraction. De plus, ils ne fluorescent qu'après leur liaison spécifique avec l'ADN, ce qui doit limiter les problèmes de fluorescence aspécifique liée aux interactions des marqueurs avec les peintures.

La colonne 7 correspondait au témoin d'adhésion et donc ne contenait ni peinture ni disque en PVC (Figure 23). Pour chaque peinture deux colonnes ont été utilisées.

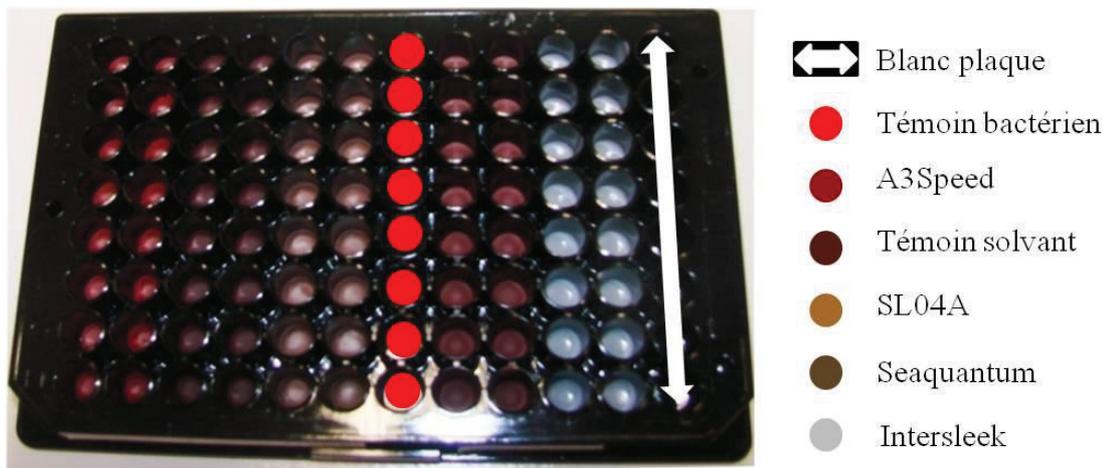


Figure 23 : Disposition des peintures dans la microplaque

Afin de vérifier l'absence de fixation aspécifique des fluorochromes sur les revêtements, trois puits contenant uniquement 200  $\mu$ l de marqueur, et trois autres puits contenant 200  $\mu$ l d'ASW ont été préparés. La deuxième colonne contenait la peinture et 200  $\mu$ l de l'inoculum bactérien à la densité déterminée pour chaque souche comme précédemment décrit (cf paragraphe 5.1.1). Trois souches bactériennes ont été choisies pour ces tests : TC8, D41 et 4M6. La souche TC4 a été écartée de l'étude du fait de sa mauvaise capacité à adhérer ainsi que la TC5 pour son incapacité à être marquée par les SYTO<sup>®</sup>, probablement dûe à un manque de pénétration du marqueur après adhésion dans les puits. Ceci peut être lié à sa production d'EPS.

Les temps d'adhésion ont été conservés comme déterminés précédemment.

Afin d'évaluer l'auto-fluorescence potentielle des peintures, des coupons de 5x5 cm de PVC ont été peints avec les six peintures étudiées. Ces coupons ont été séchés pendant 15 jours, et leur autofluorescence en 3D a été mesurée à l'aide d'un spectromètre de fluorescence (F4500 Fluorescence spectrophotometer) par le Dr. Stéphane Mounier (laboratoire PROTEE, USTV). Les coupons ont été soumis aux longueurs d'onde comprises de 400 nm à 650 nm.

## V.2. Bio-essai plurispécifique

Dans le but d'améliorer le bio-essai pour tenter de mieux représenter la diversité et la complexité du milieu marin, nous avons essayé de mettre au point le test en utilisant un

mélange de deux souches bactériennes (co-adhésion) dans les puits des microplaques. Avant d'étudier l'effet des biocides à proprement parler sur les biofilms mixtes, il a été nécessaire, dans un premier temps, de trouver un moyen de quantifier individuellement chacune des deux souches dans les puits. Le principe retenu a consisté à marquer de façon différentielle avec deux fluorochromes les organismes avant leur ensemencement dans les microplaques (« pré-marquage »). Dans un second temps, nous avons étudié les interactions éventuelles entre les souches (inhibition ou stimulation).

### ***V.2.1. Développement du « Pré-marquage »***

Trois marqueurs fluorescents (DAPI, SYTO RED 61 et SYTO 13) possédant des longueurs d'ondes d'excitations et d'émissions différentes ont été testées sur quatre des souches étudiées (TC5, TC8, 4M6 et D41). La TC4 a été écartée de l'étude du fait qu'elle ne présentait pas une reproductibilité de l'adhésion ni une sensibilité suffisante. Les suspensions bactériennes en phase stationnaire ont été centrifugées (10 min à 6000 rpm). Une fois le surnageant éliminé, le marqueur choisi a été incorporé au culot. Différentes concentrations de marqueur solubilisé dans du NaCl 36g.l<sup>-1</sup> filtré ont été testées (2 et 4 µM pour les SYTO, 25 et 50µM pour le DAPI). Le fluorochrome a été incubé pendant 15 minutes avec les bactéries puis cette suspension a été centrifugée à 6000rpm durant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot a été remis en suspension dans de l'ASW. Des gammes de densités bactériennes d'une DO<sub>600nm</sub> allant de 0,05 à 0,6 ont été testées en microplaque. Les conditions d'adhésion ont été conservées (cf paragraphe 5.1.4). Ensuite, les microplaques ont été lavées une fois au NaCl à 36g.l<sup>-1</sup>, puis la fluorescence a été mesurée directement avec le lecteur de microplaque comme précédemment décrit, puis une autre lecture a été effectuée après un deuxième lavage.

Afin de vérifier que la réponse des biocides n'était pas modifiée par ce nouveau mode de quantification, le bio-essai anti-adhésion a été réalisé sur les 4 souches en monospécifique « pré-marquées » avec ce nouveau protocole, et avec le TBTO comme biocide modèle.

### ***V.2.2. Bio-essais plurispécifiques :***

#### ***V.2.2.1. Interactions des souches en biofilms mixtes :***

Les souches bactériennes ont été ensemencées deux par deux dans les microplaques afin de voir si elles interagissaient entre elles. Pour chaque souche « pré-marquée », une gamme de DO<sub>600 nm</sub> de 0,2 à 0,8 (c'est-à-dire de 0,1 à 0,4 dans les puits) a été préparée avec le fluorochrome choisi précédemment. Puis 100µl de deux isolats bactériens aux différentes

densités préparées ont été introduits dans les colonnes 5 à 8. 100  $\mu\text{l}$  de l'inoculum de la souche 1 à différentes densités ont été introduits dans les colonnes 2 à 4 et 100  $\mu\text{l}$  de l'inoculum de la souche 2 à différentes densités ont été introduits dans les colonnes 9 à 11. Les puits ont été complétés à 200 $\mu\text{l}$  avec de l'ASW. (Figure 24)

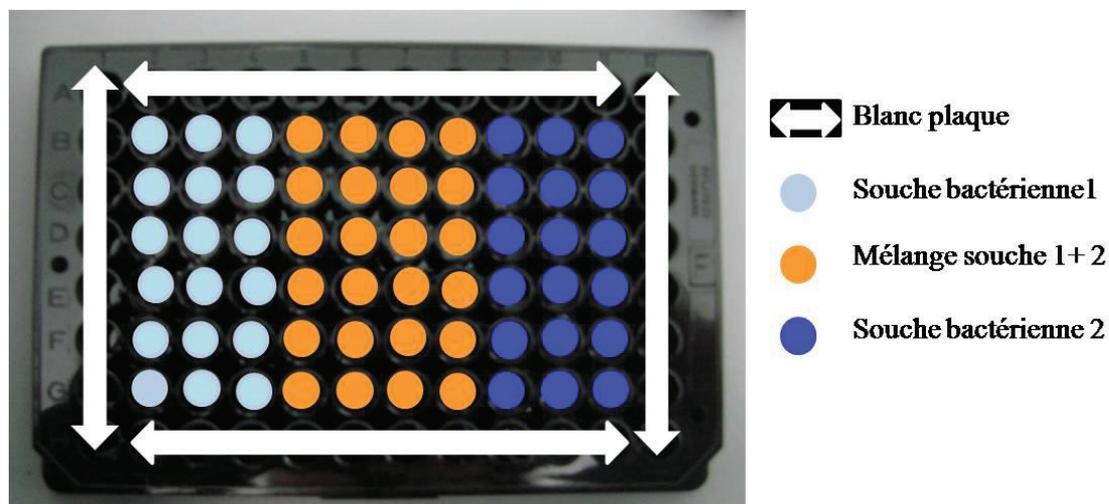


Figure 24 : Schéma d'ensemencement de la microplaque pour l'étude de l'interaction des souches en biofilms mixtes

Les temps d'adhésion choisis correspondaient au temps d'adhésion le plus long des deux pour chaque biofilm mixte (cf paragraphe 5.1.4). Après un premier lavage au NaCl à 36g.l<sup>-1</sup>, la fluorescence a été mesurée directement avec le lecteur de microplaque aux deux longueurs d'onde correspondant aux fluorochromes utilisés, l'opération sera répétée après un deuxième lavage.

#### V.2.2.2. Bio-essai anti-adhésion.

Tous les couples de bactéries (excepté TC8+4M6) ont été testés en présence d'une gamme de TBTO. Une gamme d'éléganediol a aussi été testée sur les couples D41+4M6 et D41+TC8. Le schéma de microplaque correspondait à celui du test classique (cf paragraphe 5.1.4) excepté que les colonnes 1 et 12 ont été utilisées en triplicats pour les deux souches seules aux deux concentrations étudiées, afin de s'assurer qu'aucune interférence n'avait eu lieu entre les bactéries. Le pré-marquage a été réalisé comme décrit ci-dessus. La densité des deux inocula « pré-marqués » a été ajustée à 0,6 et 0,8, c'est-à-dire à 0,3 et 0,4 dans les puits. La fluorescence a été mesurée après un seul lavage au NaCl à 36 g.l<sup>-1</sup>.

## **VI. Bio-essais antibactériens**

Dans le but de préciser la spécificité du mode d'action des molécules actives en anti-adhésion, différents tests antibactériens ont été réalisés.

### **VI.1. Inhibition de croissance**

#### ***VI.1.1. Méthode de diffusion ou des disques en milieu solide***

Cette méthode permet de déterminer rapidement si un produit possède ou non une activité aux fortes concentrations. Cette étude a été réalisée avec la méthode de diffusion par disque sur agar à partir de plusieurs protocoles (Boyanova et al. 2005, Valgas et al. 2007). Des disques de papier et de papier filtre de 6mm de diamètre ont été utilisés mais pour des raisons de logistique, très peu de papier filtre type Whatman ont pu être utilisés. C'est pourquoi les disques ont été imprégnés avec des volumes moindres que ceux classiquement utilisés dans la littérature. 6µl des divers produits, dont la concentration maximale pour les produits purs et dérivés est de 2mg/ml et 10mg/ml pour les extraits bruts, y ont été déposés. Les disques ont été séchés durant 15min sous hotte à flux laminaire.

En parallèle, les boîtes de Petri contenant 20ml de MHAI ont été inondées avec 3ml de suspension bactérienne en phase exponentielle, préalablement diluée à une turbidité de 0,1. Les boîtes ont légèrement été agitées afin de bien homogénéiser l'inoculum bactérien, puis le surplus de suspension a été éliminé. Les boîtes ont été séchées durant 10 à 15 minutes sous la hotte à flux laminaire. Les disques ont alors été placés sur la gélose à l'aide d'une pince stérile, il est nécessaire d'appuyer légèrement sur le disque afin de favoriser la diffusion des molécules. De plus un disque contenant 100% de DMSO (témoin solvant) et un d'antibiotique (témoin positif) ont été déposés sur la gélose. Le témoin positif a été choisi en fonction de la bactérie, pour les Gram négatifs l'acide nalidixique à 30µg (Becton, Dickinson and company, Grenoble, France) et pour les Gram positifs l'erythromycine à 15µg (Becton, Dickinson and company, Grenoble, France).

Les boîtes ont été laissées 24h à température ambiante. Les produits qui présentaient une activité montraient un halo d'inhibition tout autour du disque.

#### ***VI.1.2. Détermination de la $CI_{50}$ en milieu liquide***

La croissance bactérienne a été évaluée par un suivi de la turbidité ( $DO_{600nm}$ ) dans des microplaques transparentes 96 puits (PS, fond plat, greiner Bio-one Cellstar, Fisher scientific, Illirch, France). Pour ce test, les bactéries en phase exponentielle ont été introduites dans les puits.

Les colonnes 1 et 12 contenaient 200 $\mu$ l de VNSS, les colonnes 2 à 5 et 8 à 11 respectivement 20 $\mu$ l des différents biocides (1 et 2) ainsi que 160 $\mu$ l de VNSS. Dans toutes ces colonnes, 20 $\mu$ l de l'inoculum bactérien à une DO<sub>600nm</sub> de 0,01 a été introduit. Les lignes A et H servaient de blanc échantillon, elles contenaient 180 $\mu$ l de VNSS et de 20 $\mu$ l des différentes concentrations de biocides à tester. Le témoin bactérien (colonne 7) a été réalisé avec 180 $\mu$ l de VNSS et 20 $\mu$ l de suspension bactérienne. Le témoin solvant (colonne 6) contenait 20 $\mu$ l de bactéries ainsi que le pourcentage maximal de solvant acceptable pour la bactérie. Quant au témoin positif (colonne 6) d'inhibition de croissance, il était constitué d'une solution d'éthanol dilué à 70% dans du VNSS (Figure 25).

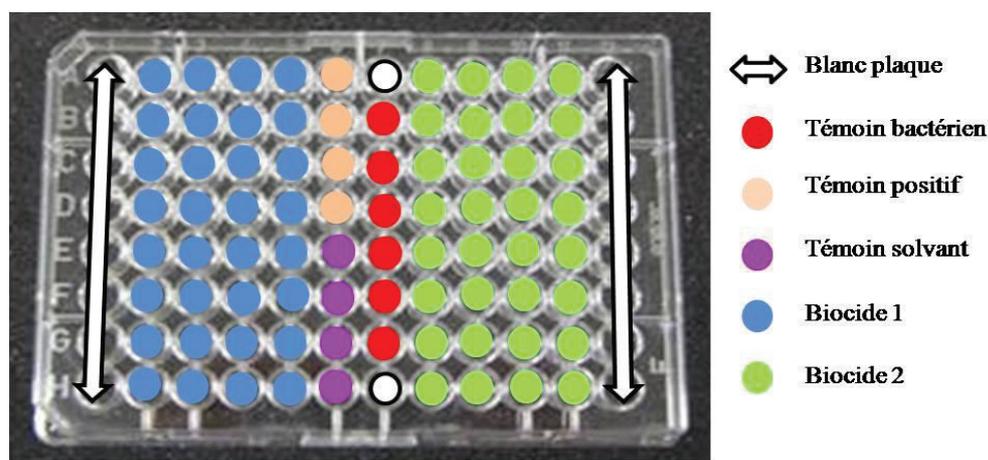


Figure 25 : Schéma de microplaque pour l'étude de l'inhibition de croissance en milieu liquide.

Le suivi de la croissance a été réalisé grâce à une mesure de la DO<sub>600nm</sub> toutes les heures pendant 8h à l'aide du lecteur de microplaque Infnit 200 (TECAN).

Le taux de croissance  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) a été calculé aux différentes concentrations testées grâce à l'équation suivante :

$$N=N_0*e^{\mu t}$$

Ou : N = nombre de bactéries au temps t

$N_0$  = nombre de bactéries au temps  $t_0$

$\mu$  = taux de croissance

Le pourcentage d'inhibition de croissance a été calculé comme suit :

$$(\mu_i - \mu_0 / \mu_0) \times 100$$

Ou :  $\mu_i$  = taux de croissance pour une molécule à une concentration donnée

$\mu_0$  = taux de croissance en l'absence de molécule

Enfin, la courbe sigmoïde dose-réponse % d'inhibition de croissance =  $f(\text{Log } C_i)$  ainsi que le calcul de la concentration inhibitrice 50 ( $CI_{50}$ ) ont été effectués.

Pour les études d'inhibition de croissance réalisées au Venezuela, des microplaques 96 puits transparents en polystyrène à fond rond (Falcon) ont été utilisées. La lecture de la turbidité a été faite après 24h d'incubation à température ambiante avec un lecteur de plaque Bio Rad 550 à 595 nm. La cinétique de croissance n'a pu être suivie, car elle nécessitait d'être réalisée couvercle ouvert, ce qui compromettrait la stérilité de l'expérience.

## VI.2. Toxicité

Une fois la phase stationnaire atteinte un marqueur de viabilité, la résazurine, a été ajouté. 50 $\mu$ l de ce dernier ont été introduits à 20 $\mu$ M, diluée dans de l'ASW dans tous les puits. Après deux heures d'incubation, la fluorescence a été mesurée avec le lecteur de microplaque ( $\lambda_{\text{ex}}$  530 nm /  $\lambda_{\text{em}}$  595 nm).

Le calcul du pourcentage de viabilité a été effectué de la même façon que le pourcentage d'adhésion (cf Chapitre II.V.1.4). La courbe sigmoïde dose-réponse % de viabilité =  $f(\text{Log } C_i)$  ainsi que le calcul de la concentration létale 50 ( $CL_{50}$ ) ont ensuite été déterminées.

## VII. Représentativité du bio-essai : Etude des communautés des biofilms *in situ*

### VII.1. Immersion *in situ* dans la Rade de Toulon

#### VII.1.1. Préparation des coupons peints

Parmi les six revêtements utilisés, cinq étaient des peintures AF commerciales et la sixième (SL04A) a été synthétisée au laboratoire dans le cadre du programme FUI ECOPAINT PACA (C. Bressy, com. pers.) :

- Nexxium (NEX) (Sigma Coatings, France) : Antifouling auto-polissant avec des biocides organiques, sans étain ni cuivre. Elle est composée de : 4-bromo-2-(P-chlorophényl)-5-(trifluorométhyl) pyrrole-3-carbonitrile, Isothiazolone, Xylène, Ethylbenzène, Colophane et O-xylène
- Seaquantum (SQT) (Jotun France SA, Levallois-Perret): Système antisalissure auto-polissant sans étain à base de polymère organosilylé. Elle est constituée de Colophane, Solvant naphta aromatique léger, Bis (1-hydroxy-1h-pyridine-2-thionato-o, s) cuivre,  $Cu_2O$ ,  $ZnO$ , Xylène et Ethylbenzène
- Intersmooth 360 (IS360) (International Peinture SA, Le Havre, France) : Antifouling haute performance de type copolymère auto-polissant sans étain basé sur la technologie acrylate de cuivre déposée. Elle contient : 4-Méthyl-2-pentanone, Méthanol, N-Butanol,  $Cu_2O$ ,  $ZnPy$ , Xylène et Ethylbenzène.

- A3speed (A3S) (Nautix, Guidel, France): Antisalissure auto-polissant haute performance. Elle est constituée de copolymère méthacrylique tel que le propylbenzene, mesitylene, 1, 2, 4- trimethylbenzene, des biocides tels que l'oxyde de zinc, le thiocyanate de cuivre et le pyrithione de zinc, des polytetrafluor et du naphta.
- Intersleek 757 (IT757) (International Peinture SA, Le Havre, France): Anti-adhérente élastomère silicone. Elle est composée de Xylène, éthylbenzène, 2,4-pentanedione, dioctyltindilaurate, éthanol ainsi que des agents de durcissement.
- SL04A (SL04A) (Préparé au laboratoire MAPIEM): A base de liant acrylique érodable connu pour les peintures antifouling (Métamare B- 175). Elle est constituée de :  $TiO_2$ ,  $Cu_2O$ ,  $ZnO$ , préventol A4S, Zineb, Aériosil 200, Disperbyk 180, Sea nine 211, Acetate de Butyle, Méthoxypropanol.

Des plaques de PVC ont été découpées, sablées puis percées en haut et en bas. Elles ont été peintes sur une de leur surface à l'aide d'un bar-coater afin d'obtenir une couche humide d'une épaisseur de 300  $\mu m$  puis séchées durant 15 jours. Les plaques servant à l'étude quantitative et qualitative de la composante microphytoplanctonique des biofilms mesuraient 10x10 cm, alors que celles utilisées pour l'étude de la biomasse, le dénombrement des pico-organismes (Cytométrie en flux) et l'analyse de la diversité des communautés procaryotes des biofilms (empreintes moléculaires) mesuraient 5x5 cm (3 plaques). Quatre plaques de chaque peinture AF (6) en triplicats (c'est-à-dire 21 « chapelets » de quatre plaques en comptant un « chapelet » de plaques PVC comme références) ont donc été immergées.

### *VII.1.2. Immersion des plaques*

Les plaques ont été immergées dans la rade de Toulon dans le port militaire (43°06'24,69'' Nord et 5°55'40,87'' Est). Elles ont été fixées par des cordelettes en « chapelets » sur les structures submersibles du radeau du laboratoire (Figure 26) et immergées à une profondeur constante de 1 m (épilimnion) durant un mois du 10 juin au 10 juillet 2010.



Figure 26 : Radeau et système d'immersion des plaques dans la rade de Toulon

## VII.2. Analyse des biofilms

### VII.2.1. Evaluation de la biomasse

Cette analyse a permis de quantifier la matière organique présente sur l'échantillon. Pour cela, une des trois plaques de 5x5 cm par « chapelet » a été grattée à l'aide d'un scalpel et la matière obtenue introduite dans 2ml d'ASW. Au laboratoire, les suspensions ont été filtrées sous vide sur filtres GF/F (filtres Whatman en fibre de verre, 0,7 $\mu$ m, résistants à des températures de 500°C) préalablement séchés à 105°C afin d'éliminer toute trace d'humidité, et les filtres pesés ( $m_0$ ). Après filtration, ils ont été à nouveau séchés pendant 24h puis pesés afin d'obtenir la masse sèche ( $m_1$ ). La masse minérale ( $m_2$ ) a été obtenue après calcination des filtres à 480°C pendant 2h, puis une nouvelle pesée a été effectuée. La masse organique ( $m_3$ ) a enfin été calculée comme suit :

$$m_3 = [(m_1 - m_0) - (m_2 - m_0)] / \text{surface du substrat (mg/cm}^2\text{)} \text{ (Volatier 2004)}$$

### VII.2.2. Dénombrement pico-« planctonique » par cytométrie de flux.

Une seconde plaque de 5x5 cm par « chapelet » a été grattée à l'aide du scalpel et la matière obtenue introduite dans 4 mL d'ASW contenant 2% de formaldéhyde. Les échantillons ont été rapidement transportés au laboratoire en glacière, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C (Villeneuve et al. 2010). Afin de dénombrer les cellules présentes dans nos échantillons, des analyses en cytométrie en flux ont été réalisées à la Plateforme Régionale de Cytométrie pour la Microbiologie (PRECYM, <http://precym.com.univ-mrs.fr>) située au Centre d'Océanologie de Marseille, sur le campus de Luminy (Université d'Aix- Marseille II) par Aude Barani (IE). Après décongélation, 4 $\mu$ l de Tween 80 (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Quentin, France), 800  $\mu$ l de solution de pyrophosphate de sodium (10 mM, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Quentin, France) et 3,2 mL d'eau distillée ont été rajoutés aux échantillons. Les solutions ont alors été soumises aux ultrasons 3 x 1 minutes,

puis laissées dans la glace 15 minutes. Les tubes ont été homogénéisés au vortex puis centrifugés durant 1 minute à 800 g. Ces différentes étapes permettent la déstructuration du biofilm. Afin de discriminer les cellules des débris ou autres particules contenues dans l'échantillon, un marquage au DAPI ( $\lambda_{ex} = 351 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 461 \text{ nm}$ , signal récolté avec un filtre 405/15 nm), a été réalisé. Au moment de l'analyse, 490  $\mu\text{l}$  d'échantillon préalablement filtrés sur un tamis de 50  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{l}$  de DAPI (1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St Quentin, France) ainsi que 5  $\mu\text{l}$  d'une suspension de billes fluorescentes de 2  $\mu\text{m}$  (standard interne, Fluoresbrite YG, Polyscience) ont été mélangés. Les échantillons ont enfin été incubés 10 minutes à l'obscurité.

L'analyse des échantillons a été réalisée sur un cytomètre en flux analyseur-trieur MoFlo<sup>®</sup> (Beckman-Coulter) (annexe II) et les raies laser bleue ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ , obtention des signaux de diffusion et de fluorescence naturelle du picophytoplancton) et UV ( $\lambda_{ex} = 351 \text{ nm}$ ) ont été utilisées. Les échantillons trop concentrés ont été dilués avec de l'ASW.

L'acquisition des données est réalisée à l'aide du logiciel Summit qui permet leur visualisation et leur analyse (sous forme d'histogrammes ou de cytogrammes).

Pour l'analyse des bactéries hétérotrophes, le déclenchement de l'acquisition a été réalisé sur le paramètre de diffusion de la lumière à 488nm structure (Side Scatter (SS), structure) et les populations bactériennes ont été déterminées en fonction de leur fluorescence DAPI.

Pour l'analyse du phytoplancton, le déclenchement de l'acquisition a été réalisé sur le signal de fluorescence de la Chlorophylle a (Rouge (FL3), signal récolté avec un filtre 640LP nm).

La discrimination entre le Pico- et le Nanophytoplancton a été réalisée sur la base des signaux de diffusion de la lumière à 488nm (en relation avec la taille des particules) en utilisant les billes de 2 $\mu\text{m}$ , tel que: Picophyto-« plancton » < 2 $\mu\text{m}$  < Nanophytoeucaryote.

Au sein des classes de picophytoplancton, des groupes de cellules ont été recherchés sur la base de leurs propriétés d'autofluorescences induites par les pigments photosynthétiques : fluorescence Rouge (FL3) de la Chlorophylle a et fluorescence Orange (FL2) de la Phycoérythrine (cyanobactéries, signal récolté avec un filtre 580/30 nm).

Enfin, afin d'obtenir un comptage absolu de chaque groupe déterminé, le débit exact de la machine a été évalué en réalisant 3 pesées successives. L'acquisition des données est réalisée à l'aide du logiciel Summit qui permet leur visualisation et leur analyse (sous forme d'histogrammes ou de cytogrammes).

### ***VII.2.3. Diversité des communautés procaryotes des biofilms***

Cette étude a pour but de déterminer la diversité des communautés microbiennes sur la base d'empreintes moléculaires, donc de leurs génotypes. Pour cela, il a fallu tout

d'abord extraire l'ADN, puis après amplification par PCR, une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a permis de mettre en évidence les différents génotypes constitutifs de nos biofilms.

Les dernières plaques de 5x5 cm par chapelets ont été légèrement rincées à l'ASW, puis placées dans des boîtes de Pétri et rapidement transportées au laboratoire dans des glacières.

Extraction de l'ADN: au laboratoire les plaques ont été grattées à l'aide d'un scalpel et les suspensions introduites dans des tubes contenant des billes de céramique permettant de déstructurer les biofilms en désagréant leurs matrices. Pour cela, le kit Power Soil<sup>®</sup> DNA Isolation (MO BIO laboratories, Inc, St Quentin en Yvelines, France) a été utilisé. L'extraction à proprement parlé de l'ADN a ensuite été réalisée, toujours avec ce kit, en plusieurs étapes de purification et de centrifugation.

Amplification de l'ADNr 16S : les PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycler PTC-100<sup>®</sup> (MJ Research, Inc). Pour cela un mix contenant 2 µl de dNTP (5mM), 2 µl de chaque amorce (10µM), 5 µl de tampon 10X, 0,4 µl de TaqDNA polymérase et 38,6 µl d'eau ultra pure a été préparé. Ce mix a été introduit dans des tubes à PCR puis 2µl d'ADN extrait ont été rajoutés.

Les deux amorces utilisées sont l'amorce 907RM (5'-CCG TCA ATT C(AC)T TTG AGT TT-3') et l'amorce 358F (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3'). La 907RM est une amorce universelle procaryote du gène de la sous unité ribosomale 16S alors que la 358F est une amorce spécifique avec un clamp ou queue GC permettant de réaliser la DGGE (Schauer et al. 2000). Cette queue artificielle va empêcher la totale séparation de la double hélice de l'ADN lors de sa dénaturation.

L'amplification est réalisée suivant le programme décrit dans le Tableau 6

	<b>1<sup>ère</sup> boucle</b>	<b>2<sup>ème</sup> boucle</b>	<b>3<sup>ème</sup> boucle</b>	<b>4<sup>ème</sup> boucle</b>
<b>Nombre de cycle</b>	1	10	20	1
<b>Dénaturation</b>	5 min à 94°C	1 min à 94°C	1 min à 94°C	
<b>Hybridation</b>		1 min à 65°C (-1°C/cycle)	1 min à 55°C	
<b>Elongation</b>		3 min à 72°C	3 min à 72°C	5 min à 72°C

Tableau 6 : Programme PCR

Afin de vérifier si l'amplification a bien été effectuée, une électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % dans un tampon TBE 10X (Tris/ Borate/EDTA) a été réalisée. La révélation des bandes a été faite par coloration dans un bain de Bromure d'Ethidium (BET). Au bout de 10 minutes, le BET a été éliminé par rinçage et le gel observé sous UV.

Les échantillons ont alors été envoyés à l'INRA de Thonon-les-Bains (UMR CARRTEL) où la DGGE a été réalisée par Brigitte Le Berre (IE). Pour cela un gel de 0,75 mm d'épaisseur, contenant plusieurs concentrations d'acrylamide (0 %, 40 % et 80 %) a été préparé. Afin que ce gel puisse polymériser du tétraméthyléthylènediamine (Temed) et de l'ammonium persulfate (APS, à 20 %) ont été ajoutés ainsi que du tampon gamma butyrolactone (GBL). Le gel a été coulé entre deux plaques de verre disposées verticalement. La polymérisation du gel s'est faite durant 2 à 3 heures. Une fois que la cuve à DGGE contenant du TAE 1X a atteint les 60°C, le gel y a été introduit et 20 à 25 µl des produits de PCR auquel ont été rajouté 5 µl de tampon GBL ont été déposés dans le puits. L'électrophorèse a été laissée durant 16h à 100 V. Le gel a ensuite été déposé dans un bac et recouvert par le marqueur Syber gold dilué dans du TAE 1X. Après 45 minutes, le gel a été rincé plusieurs fois avec de l'eau bi-permutée puis les fragments d'ADN sont observés sous UV.

### VII.3. Abondance et diversité des Bacillariophycées (Diatomées) des biofilms

Les plaques de 10x10 cm ont été rincées avec précaution à l'ASW afin d'éliminer les débris et les microalgues non adhérentes. La surface des plaques a été fermement grattée à l'aide de brosses à dent (une par type de peinture) et reprise dans 10 ml d'ASW. Puis, 20 à 30 µl de Lugol acide de concentration finale à 0,3% ont été ajoutés afin de fixer les échantillons. Les flacons ont été conservés à l'obscurité à 4°C.

L'observation des diatomées a été réalisée selon la méthode d'Utermöhl (1958). Cette technique utilise la sédimentation d'un volume connu dans une cellule à décanter. L'échantillon est agité doucement pendant une minute afin d'homogénéiser son contenu, puis en fonction de sa turbidité, 0,5 ou 1 ml ont été mis à sédimenter dans une cellule sur laquelle une lamelle de verre a été déposée afin d'éviter l'évaporation ou une possible pollution du milieu. Cette dernière est laissée durant 2h à température ambiante, dans un lieu sans vibration permettant ainsi la sédimentation correcte de l'échantillon.

L'identification et le comptage ont été effectués au microscope inversé à contraste de phase (Leica® DM1 4000 B) au grossissement  $\times 400$ . Pour chaque peinture, un minimum de

30 champs ou 100 organismes ont été comptés. Seules les frustules avec plastes (cellules vivantes) ont été prises en compte. L'identification a été faite au rang du genre.

Afin de quantifier les diatomées présentes sur nos plaques, la densité spécifique a été calculée selon la formule suivante :

$$D_{sp} = [(n_i/n_c) \times 2308] / S$$

$D_{sp}$  = Densité spécifique (Cellule/cm<sup>2</sup>)

$n_i$  = Nombre d'individus de l'espèce

$n_c$  = Nombre de champ compté sur la lame

$S$  = Surface de la plaque

**2308** = nombre total de champs dans la cellule de sédimentation

Un indice de diversité a aussi été calculé. Celui-ci se base sur l'influence qu'aura une espèce déterminée sur le nombre total d'individus. L'indice le plus couramment utilisé est celui de Shannon (1949) dont l'équation est décrite ci dessous:

$$H' = \sum_{i=1}^s [(N_i / N) * \log_2 (N_i / N)]$$

$H'$  = Indice de Shannon

$N_i$  = Effectif de l'espèce  $i$

$N$  = Nombre d'individu total

$S$  = Nombre total d'espèces (Richesse spécifique)

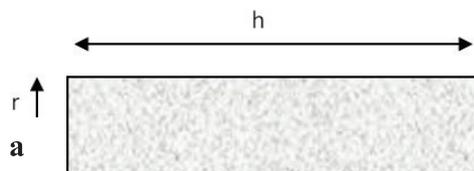
Pour une communauté peu diversifiée l'indice sera proche de 0, alors que plus elle sera complexe plus l'indice sera élevé.

Afin de déterminer l'espace réellement occupé par un organisme sur la plaque, le biovolume a été déterminé pour les diatomées présentes à plus de 5%. Pour cela, la longueur et la largeur des organismes ont été mesurées au microscope optique au grossissement X 400. Une goutte des différentes solutions à étudier a été déposée entre lame et lamelle, l'observation a immédiatement été effectuée. Une moyenne de 25 mesures par taxon a été réalisée tous revêtements confondus. Afin de pouvoir déterminer le biovolume de ces organismes, la majorité d'entre eux a été rapportée à des modèles mathématiques simplifiés tels que le cylindre ou la sphère. Bien que cette méthode soit moins fiable que celle proposée par Hillebrand et al. (1999), elle reste une approche suffisante pour donner une idée du biovolume (Smayda 1978). Tous les organismes identifiés dans notre étude

correspondaient en fait à des cylindres (Figure 27 a) et leur biovolume a donc été calculé grâce à la formule suivante :

Seuls les organismes plus complexes tels que *Licmophora* ont été mesurés selon le modèle de Hillebrand et al. (1999) qui considère que le clade des *Gomphonema* possède un corps très complexe, avec une double hétérogénéité. C'est pourquoi l'organisme est assimilé à une pyramide coupée (Figure 27 b) dont la formule est la suivante :

$$V = \pi * r^2 * h$$



$$V = b.c \left[ \frac{(\pi \times e)}{4} \right] + \left[ \frac{(f-e)}{3} \right]$$

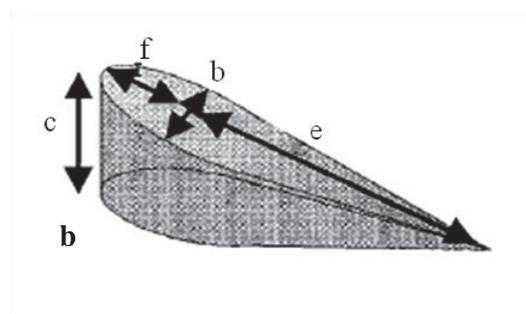


Figure 27 Calcul du biovolume des diatomées (a) cylindriques et (b) de *Licmophora* d'après Hillebrand (1999)

### VIII. Analyses statistiques

Les régressions linéaires, courbes sigmoïdes dose-réponse ainsi que le calcul des CE<sub>50</sub>, CI<sub>50</sub> et CL<sub>50</sub> ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad prism 5 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Les CE<sub>50</sub>, CI<sub>50</sub> et CL<sub>50</sub> pour chaque biocide et chaque souche ont été obtenues avec un minimum de 3 courbes, chacune d'entre elles est réalisée à partir de 6 ou 8 concentrations en triplicats. Pour l'étude des solvants, les CE<sub>90</sub> ou CE<sub>85</sub> ont été déterminées de la même manière que les CE<sub>50</sub>. Elles permettent de s'assurer que l'adhésion des bactéries n'est pas affectée à plus de 10 ou 15 %.

De plus, plusieurs tests statistiques ont été réalisés : t-tests, ANOVA à un ou deux facteurs (permet d'analyser deux variables simultanément telles que la différence entre souches et entre biocides). Si des interactions sont détectées entre les divers paramètres analysés, l'ANOVA va alors être associée à des tests de comparaisons multiples telles que le post test de Bonferroni. Les CE<sub>50</sub> ainsi que d'autres variables ont dû préalablement être transformées en valeurs logarithmiques afin qu'elles suivent une loi normale permettant

ainsi de réaliser l'étude statistique en utilisant les tests paramétriques. Les différences significatives ont été acceptées à partir de  $p < 0,05$ .

La DGGE a été interprétée suite à une étude à échelle multidimensionnelle (Multidimensional Scale, MDS, XLStat) permettant de comparer la similitude et l'éloignement de chaque variable afin de pouvoir obtenir une représentation euclidienne de la meilleure approximation des variables étudiées.

## **CHAPITRE III**

# **ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES MARINES**



## **I. Introduction**

La finalité de notre étude est le développement d'un bio-essai permettant de déterminer l'efficacité de molécules (naturelles ou synthétiques) et de revêtements, peu ou non toxiques pour l'environnement. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur les premiers organismes marins à coloniser de façon irréversible les surfaces, à savoir les bactéries pionnières. En effet, l'élimination de ces organismes pourrait réduire la fixation des autres micro-organismes et potentiellement celle des macro-organismes (Hellio et al. 2001, Dobrestov & Qian 2004). Compte tenu de la diversité bactérienne élevée du milieu marin, nous avons choisi de travailler sur plusieurs isolats bactériens présentant des caractéristiques différentes afin de voir si les réponses obtenues au niveau du bio-essai seraient distinctes. Ces souches proviennent de supports de natures différentes telles que le verre, le teflon, le silicone ou encore le polystyrène qui présentent des hydrophobicités différentes permettant l'adhésion d'une plus grande diversité d'organismes. Une partie des souches a été isolée en Méditerranée par mes soins et avec l'aide de Linda Dombrowsky (MC, MAPIEM). L'autre partie nous a été gracieusement fournie par le LCBM de Lorient et par l'IFREMER de Brest. La croissance, la morphologie, la taxinomie moléculaire, la mobilité et les propriétés physico-chimiques propres à chaque souche sont décrites dans ce chapitre.

## **II. Caractérisations des souches bactériennes**

### **II.1. Cultures et Morphologie**

Dix souches ont été isolées de la rade de Toulon à partir de biofilms primaires formés sur deux types de support immergés pendant 8h, d'hydrophobicités différentes, le polystyrène (PS) et un silicone (Peinture AF de type FRC : Intersleek 740®). Les microplaques utilisées pour réaliser le bio-essai sont en PS, c'est pourquoi ce dernier a été choisi pour l'isolement bactérien. Le silicone est un revêtement ultra-lisse où l'adhésion bactérienne est à priori défavorisée, ce qui nous permettait éventuellement d'obtenir des souches différentes d'un revêtement plus classique, notamment en terme de propriétés d'adhésion.

Afin d'augmenter nos chances d'isoler un plus grand nombre de souches bactériennes viables et cultivables, trois méthodes ont été utilisées. Deux d'entre elles consistaient à réaliser une empreinte sur un milieu gélosé par application d'une compresse et d'un disque de fibre de verre stériles. La troisième s'est basée sur le grattage du support avec une öse stérile et la réalisation d'un isolement sur milieu gélosée (Tableau 7). Ces trois méthodes ont toutes donné un résultat positif. Les différents isolats récupérés vont constituer la Toulon Collection (TC).

Nom	Support	Technique de récupération	Morphologie des colonies	Couleur des colonies	Autres observations
TC1	PS	Compresse	Ronde/ Aplatie	Jaune/ Bord blanchâtre	
TC2	PS	Gratté avec l'öse	Ronde/ Bombée	Jaune or	
TC3	PS	Gratté avec l'öse	Ronde/ Légèrement bombée	Blanche	Incrustante
TC4	PS	Disque en fibre de verre	Ronde/ Bombée	Rouge orange/ Bord jaunâtre	
TC5	Silicone	Gratté avec l'öse	Ronde	Jaune brillant	
TC6	Silicone	Gratté avec l'öse	Ronde	Translucide	Film solidaire
TC7	Silicone	Compresse	Ronde/ Bombée	Rouge orange/ Bord jaunâtre	
TC8	Silicone	Compresse	Ronde/ Etalée	Rose	
TC9	Silicone	Compresse	Étalée	Blanchâtre/ Brillante	Visqueuse
TC10	Silicone	Gratté avec l'öse	Aplatie striée	Blanche Rosé au centre	

Tableau 7 : Les différentes méthodes de récupération des souches formant la Toulon Collection (TC) et leurs caractéristiques macroscopiques.

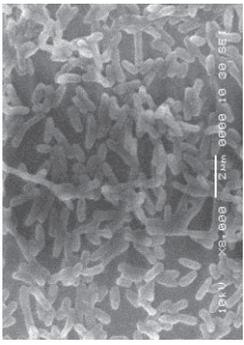
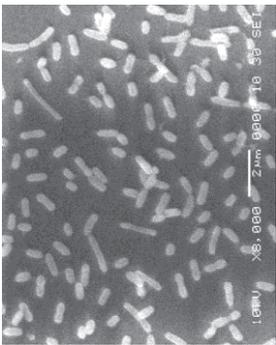
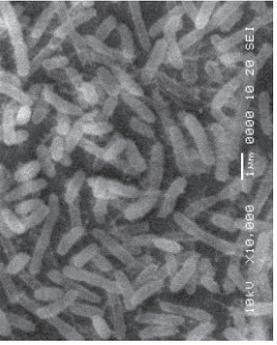
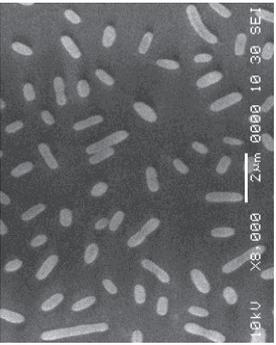
Parmi les souches récoltées, quatre ont été isolées des supports en PS et six des plaques en silicone. Les colonies formées par ces bactéries possèdent des couleurs et/ou des formes différentes sur le même milieu, d'où l'hypothèse que ce sont bien des souches distinctes. Bien que les bactéries puissent croître en milieu solide, cela ne signifie pas pour autant qu'elles sont cultivables en milieu liquide. En effet, la souche TC2 est incapable de se développer dans les deux milieux liquides couramment utilisés, à savoir les milieux MB et VNSS. De plus, le développement de certaines d'entre elles ne s'effectue que sur un milieu, comme la TC3 qui ne se multiplie qu'en milieu MB. Bien que ce milieu soit couramment utilisé pour la croissance bactérienne, il est turbide après stérilisation à l'autoclave et donc moins adapté à la quantification bactérienne par mesure de l'absorbance à 600 nm. Par conséquent ce milieu ne sera pas choisi pour le reste de l'étude. La souche bactérienne TC1, quant à elle, forme des flocules en milieu liquide pouvant gêner la quantification par mesure de l'absorbance. Les milieux de culture et la particularité des TC sont résumés dans le Tableau 8.

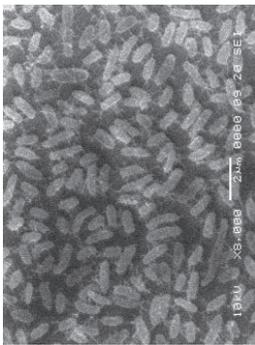
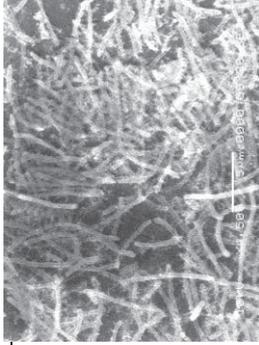
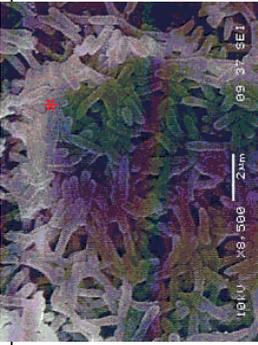
Nom	Milieu de culture liquide	Particularité
TC1	VNSS	Floculat
TC2	Aucun des 2	
TC3	MB	
TC4	VNSS	
TC5	VNSS	
TC6	VNSS	croissance très faible $\mu=0,07$
TC7	VNSS	
TC8	VNSS	
TC9	VNSS	
TC10	VNSS	

Tableau 8 : Résultats des mises en culture des TC dans deux milieux liquides, le VNSS et le MB (20°C, 120 rpm)

Suite aux données précédentes, nous avons donc exclu les souches TC1, TC2 et TC3 pour le développement des bio-essais. La souche TC6 a également été écartée car elle possède une croissance faible en VNSS. La TC4, seule souche à avoir été isolée sur un support PS, matériau identique aux microplaques, a été choisie pour le bio-essai. Les bactéries *Pseudoalteromonas* sp. (D41) et *Paracoccus* sp. (4M6), isolées en Bretagne, ont également été sélectionnées. En effet la D41 a été utilisée comme souche de référence car elle possède une bonne capacité d'adhésion, une mise en culture facile (Rubio 2002) et qu'elle a servi de modèle dans l'étude de Leroy et al. (2007). La 4M6 a été choisie pour le bio-essai car elle a été isolée sur un support plus hydrophile (verre) que les autres souches avec un temps d'immersion plus court (6 h contre 8 h pour les TC et 24 h pour la D41). De plus, il était intéressant d'étudier une autre souche que la D41 issue de l'Atlantique mais n'appartenant pas au même genre. Enfin, cette souche avait été décrite au préalable par Grasland et al. (2003).

Comme le montre les clichés effectués au MEB sur des biofilms formés sur des lames de verre (Tableau 9), toutes les souches sont des bacilles de tailles différentes. En effet la bactérie TC10 est un bâtonnet très allongé ( $5,8 \pm 1,16 \mu\text{m}$ ) comparé à la souche TC5 qui possède la plus petite taille ( $0,8 \pm 0,17 \mu\text{m}$ ). Les souches TC4, TC8 et D41 possèdent des dimensions très similaires comprises entre 1,1 et 1,3  $\mu\text{m}$ . Les souches bactériennes 4M6 et TC7 sont légèrement plus grandes ( $\sim 1,8 \mu\text{m}$ ). En plus de la taille et de la forme, les photographies obtenues au MEB montrent que les souches TC7 et TC10 forment des filaments semblant relier les bactéries entre elles, il est possible que cela soit des substances exopolymériques.

Souches	Taxinomie (16S rDNA)	Coloration de Gram Taille (µm)	Angle de contact (°)	Hydrophobicité		Electron Donneur (D) / Accepteur (A)		MEB
				8,8 g.L <sup>-1</sup>	36 g.L <sup>-1</sup>	8,8 g.L <sup>-1</sup>	36 g.L <sup>-1</sup>	
TC4	Flavobacteriaceae (Flavobacteria)	- (Bacille) 1,2 ± 0,25	42 ± 3	+++	+++	D	D	
TC5	<i>Polaribacter</i> sp. (Flavobacteria)	- (Bacille) 0,8 ± 0,17	37 ± 3	+	++	D	D	
TC7	Flavobacteriaceae (Flavobacteria)	- (Bacille) 1,8 ± 0,24						
TC8	<i>Pseudoalteromonas</i> s.sp. (γ-Proteobacteria)	- (Bacille) 1,1 ± 0,11	27 ± 2	++	++	D>A	D>A	

<b>TC9</b>	<i>Shewanella</i> sp. ( $\gamma$ -Proteobacteria)	- (Bacille) 1,5 $\pm$ 0,43							
<b>TC10</b>	Alteromonales ( $\gamma$ -Proteobacteria)	- (Bacille) 5,8 $\pm$ 1,6							
<b>D41</b> (Rubio, 2002)	<i>Pseudoalteromona</i> s sp. ( $\gamma$ -Proteobacteria)	- (Bacille) 1,3 $\pm$ 0,21	35 $\pm$ 2	++	++	++	D>A	D>A	
<b>4M6</b> (Grasland)	<i>Paracoccus</i> sp. ( $\alpha$ -Proteobacteria)	- (Bacille) 1,7 $\pm$ 0,43	43 $\pm$ 2	+	+	+++	D>A	D	

\*\* : Photographies issues de Dheilly (2007), + = hydrophobe modéré ++ = hydrophile +++ = très hydrophile, D=donneur A= accepteur

Tableau 9 : Récapitulatif des caractéristiques des souches bactériennes TCs, 4M6 et D41

## II.2. Croissance des souches bactériennes

Tout organisme possède une croissance qui lui est propre comme le soulignent les courbes de croissance des souches potentiellement intéressantes pour la réalisation du bio-essai (Figure 28). Ces courbes peuvent classiquement être découpées en cinq phases (latence, exponentielle, ralentissement, stationnaire et sénescence). La phase qui va particulièrement nous intéresser au cours de l'étude des bio-essais en microplaque est la phase stationnaire. Durant cette période le milieu nutritif s'appauvrit et les déchets toxiques s'accumulent. Le nombre de bactéries viables est constant (autant de bactéries mortes que de vivantes) et  $\mu$  est donc proche de zéro. Dans ces conditions de stress, leur métabolisme peut alors s'orienter vers d'autres fonctions que la multiplication, à savoir la production de métabolites secondaires de fonctions diverses ou la formation de biofilms par exemple.

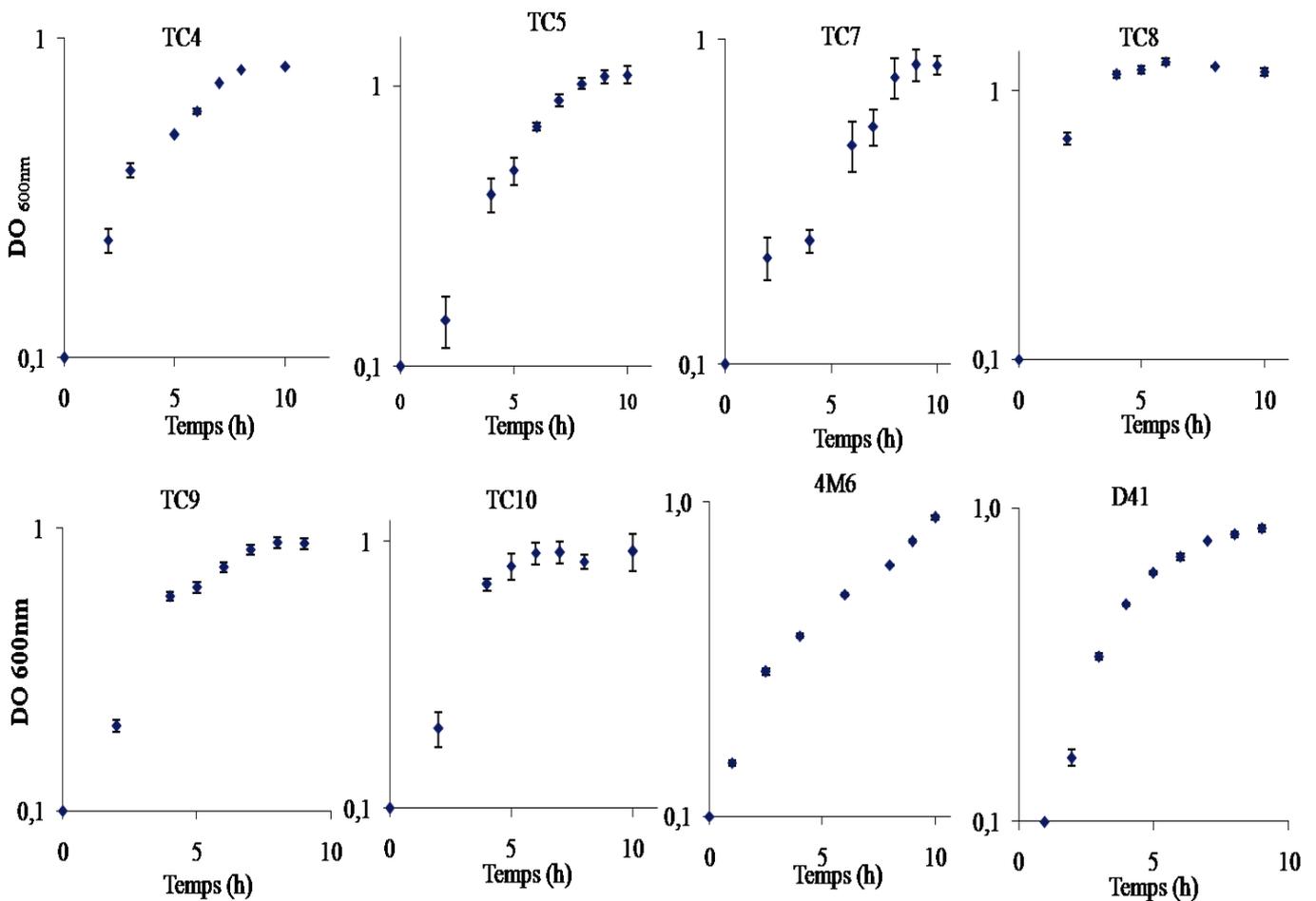


Figure 28 : Courbe de croissance de quelques souches de la TC et d'une souche bretonne (D41) réalisée en VNSS à 20°C et à 120 rpm.

Le taux de croissance maximum ( $\mu_{\max}$ ) a été déterminé. Ce facteur est caractéristique d'une souche, d'un milieu nutritif et des conditions générales de croissance (température, agitation, volume de culture, etc ...).

Les bactéries TC7 et 4M6 possèdent les  $\mu_{\max}$  les plus faibles (respectivement  $0,29 \pm 0,02$  et  $0,22 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ), indiquant une phase de croissance lente. La souche TC8 possède un  $\mu_{\max}$  presque trois fois plus élevé ( $0,60 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) que ces deux dernières et donc une croissance beaucoup plus rapide. Cette dernière est suivie par la D41. Les autres souches vont avoir des croissances intermédiaires situées entre  $0,29 \pm 0,02$  et  $0,39 \pm 0,08 \text{ h}^{-1}$ . Il apparaît clairement que les deux souches isolées de l'Atlantique possèdent des croissances très différentes l'une de l'autre (Tableau 10).

Souches	Début de la phase stationnaire (h)	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
TC4	10 à 12	$0,29 \pm 0,02$
TC5	9 à 10	$0,36 \pm 0,04$
TC7	8 à 11	$0,22 \pm 0,01$
TC8	4 à 5	$0,60 \pm 0,01$
TC9	8 à 9	$0,33 \pm 0,03$
TC10	6 à 10	$0,39 \pm 0,08$
4M6	12 à 14	$0,24 \pm 0,05$
D41	5 à 6	$0,44 \pm 0,06$

Tableau 10 : Détermination des paramètres de croissance des souches « pionnières » (n=2)

### II.3. Taxinomie moléculaire

La taxinomie des souches isolées en mer Méditerranée a été déterminée après séquençage de l'ADN ribosomal 16S, la classification de la souche D41 (Rubio 2002) ainsi que celle de la souche 4M6 (Grasland et al. 2003) ont été réalisées respectivement par l'IFREMER de Brest et le LBCM de Lorient. Toutes les souches isolées en Méditerranée et en Bretagne peuvent être réparties dans deux phyla. Les TC4, TC5 et TC7 font parties des Bacteroidetes alors que les TC8, TC9, TC10, 4M6 et D41 sont des Proteobacteria. Plus précisément, la TC4, la TC7 et la TC5 appartiennent à la famille des Flavobacteriaceae. Les autres souches font partie de la sous-division des Rhodobacteria. Parmi cette sous division, les souches vont être réparties en deux classes. Les bactéries TC8, TC9, TC10 et D41 appartiennent à la classe des  $\gamma$ -Proteobacteria, elles sont toutes rattachées à l'ordre des

Alteromonales. Quant à la 4M6, elle fait partie de la classe des  $\alpha$ -Proteobacteria et elle est rattachée à la famille des Rhodobacteraceae. Pour certaines souches, le genre a pu être déterminé. Il s'avère que la TC5 est un *Polaribacter*, la TC8 comme la D41 sont des *Pseudoalteromonas*, la TC9 appartient au genre *Shewanella* et la 4M6 est un *Paracoccus*. L'identification de la TC10 est plus difficile car il semble qu'elle puisse aussi bien être membre de la famille des Alteromonadaceae (99%) que de celle des Shewanellaceae (99%). A partir de toutes ces informations, un arbre phylogénique dans lequel la parenté des souches peut être observée a pu être obtenu (Figure 29). Mais cet arbre doit être analysé avec précaution car, pour certaines souches, seule la famille a pu être déterminée, ce qui ne permet pas de définir correctement la proximité entre les souches.

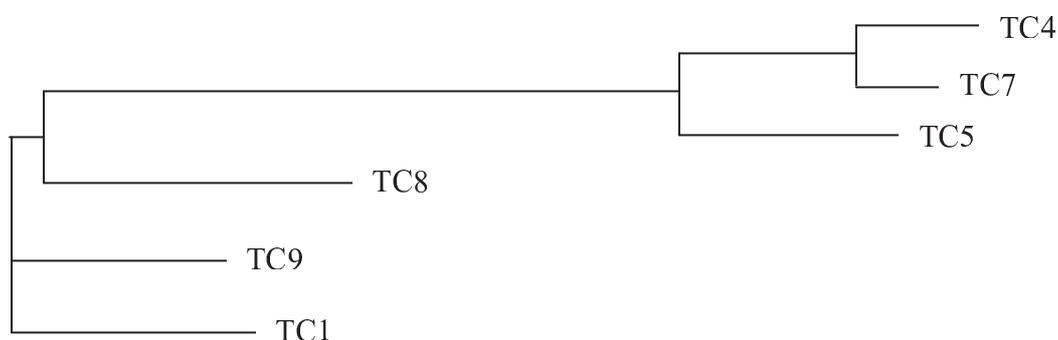


Figure 29 : Arbre phylogénique des souches méditerranéennes isolées (ADNr16S)

A partir de ces données taxinomiques, la souche TC7 a été écartée de l'étude. En effet, cette souche est proche phylogénétiquement de la souche TC4. Or il nous semblait important d'étudier une large gamme bactérienne plus représentative du milieu marin. Comme explicité précédemment, la TC4, a été conservée car elle est la seule à avoir été isolée sur un support en polystyrène (PS).

#### II.4. Coloration de Gram et mobilité:

Les six souches toulonnaises cultivables ainsi que les deux bretonnes sont des bactéries à Gram négatif.

La Figure 30 montre que les souches TC8, TC9, TC10, D41 et 4M6 se déplacent préférentiellement en utilisant le swimming, bien qu'elles soient capables d'utiliser le swarming et le twitching. Ce type de mobilité est généralement associé aux bactéries monotriches ou péritriches (Henrichsen 1972). Les souches TC4, TC5, TC6 et TC7 utilisent aussi bien la nage que l'essaimage pour se déplacer. Néanmoins, les halos observés pour ces deux modes de déplacement restent proches de 0,5 cm, alors que les cinq autres souches

exhibent des halos de diamètres supérieurs à 1 cm. Le swarming est un mode particulier de déplacement, il nécessite la présence de plusieurs flagelles. De plus, il est généralement pratiqué par les souches ayant la capacité de nager (Henrichsen 1972). Les souches TC10 et D41 peuvent pratiquer ce mode de déplacement assez aisément puisqu'elles produisent les plus grands halos (respectivement 0,8 et 0,7 cm). Toutes les souches, exceptée la TC8, peuvent effectuer le twitching mais seule la TC4 va préférer ce type de déplacement. Les bactéries TC9 et TC10 produisent des halos similaires pour le twitching. Une étude menée par Dheilly (2007) sur la D41 et la 4M6 confirme que ces deux souches peuvent utiliser la swimming et l'essaimage, mais qu'elles préfèrent le swimming. Cependant les valeurs trouvées sont assez différentes des nôtres. En effet, il semble que la D41 présente des halos plus grands pour le swimming que ceux trouvés pour la 4M6 alors que nous obtenons le contraire. Le déplacement en twitching semble se confirmer pour la D41 même si celui-ci est plutôt faible. Enfin Dheilly (2007) trouve que la 4M6 ne peut pas pratiquer ce mode de déplacement alors que nous avons obtenu une faible valeur. Il est possible que ces différences soient liées à la concentration d'agar utilisée. Dheilly (2007) a utilisée une gélose à 1% pour le twitching alors que la notre était à 1,5%. Mais malgré les différences de diamètre des halos obtenus, il semble que les caractéristiques des souches restent les mêmes.

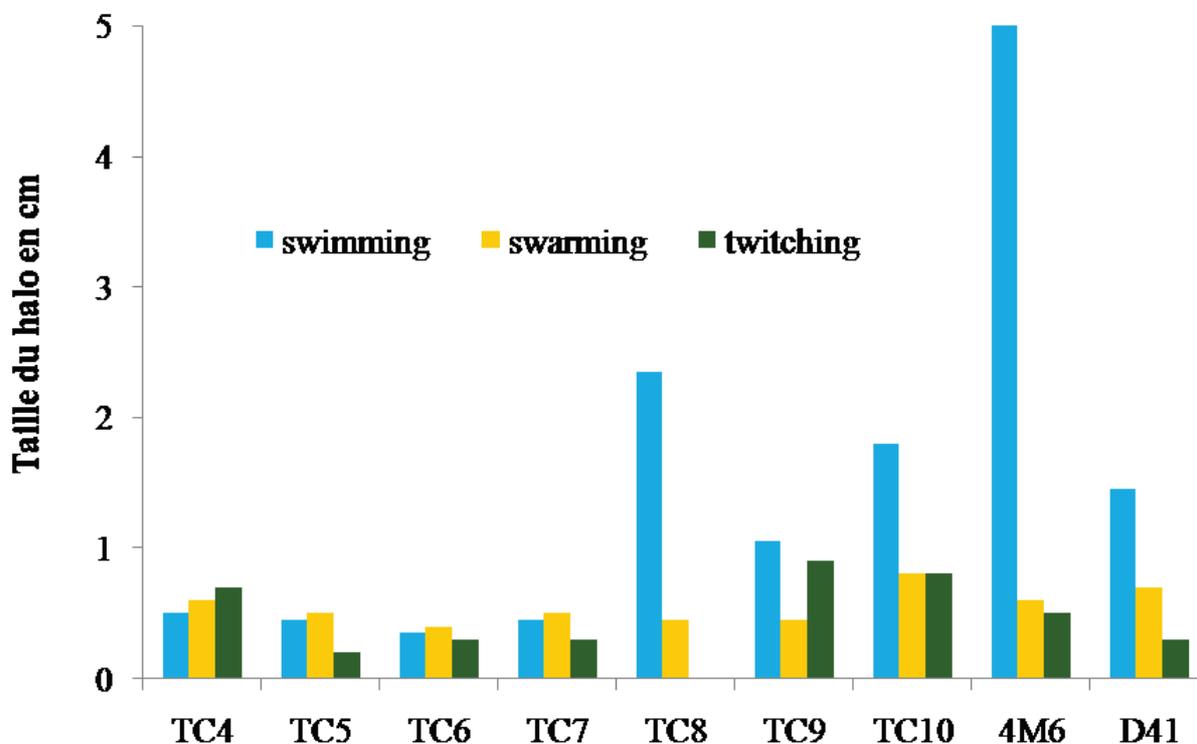


Figure 30 : Représentation graphique des résultats des trois types de mobilité pour chaque souche étudiée

## II.5. Caractéristiques chimiques des surfaces des bactéries

Les caractéristiques chimiques n'ont été déterminées que pour cinq souches bactériennes, trois toulonnaises (TC4, TC5 et TC8) et les deux issues de l'Atlantique. En effet comme il sera expliqué dans le Chapitre IV, parmi les six TC restantes, trois vont être choisies. En effet, outre les critères de sélection déjà évoqués comme la nature des supports d'isolement et la taxinomie, un critère plus « pratique » lié à la capacité de la souche à adhérer sur PS a été pris en compte pour la réalisation du bio-essai.

Concernant l'hydrophobicité des souches, on a pu constater que la TC8 est la plus hydrophile avec un angle de contact de  $27 \pm 2^\circ$  (Tableau 9). La TC4 et la 4M6 semblent être les moins hydrophiles avec des angles de contact respectifs de  $42 \pm 3^\circ$  et  $43 \pm 2^\circ$ . La valeur obtenue pour la 4M6 est proche de celle donnée par Grasland et al. (2003). Ces deux souches peuvent être considérées comme hydrophobes modérés. La D41 et la TC5 possèdent des valeurs intermédiaires respectivement de  $35 \pm 2^\circ$  et de  $37 \pm 3^\circ$ . De plus, la surface de la cellule est capable de donner ou d'accepter des électrons et cette capacité peut jouer un rôle lors de l'adhésion. La MATS (Microbial Adhesion To Solvents) est basée sur la comparaison entre l'adhésion bactérienne à des solvants apolaires et monopolaires, possédant des énergies de surface et des forces de Lifshitz-van der Waals similaires. Le caractère électron-donneur de la cellule est déterminé par une plus forte affinité avec le chloroforme qu'avec l'hexane, alors que le caractère électron-accepteur est défini par une affinité plus forte avec l'acétate d'éthyle qu'avec le décane. De plus cette analyse va permettre de déterminer le degré d'hydrophobicité d'une souche en fonction de son pourcentage d'adhésion avec les solvants apolaires (Bellon-Fontaine et al. 1996, Prokopovich & Perni 2009). Les pourcentages d'affinité avec les solvants sont représentés dans la Figure 31.

Les faibles pourcentages d'adhésion (<50%) aux solvants apolaires (décane et hexadécane) confirment l'hydrophilie des souches sauf pour la 4M6 qui montre un caractère hydrophile plus modéré ( $50\% < 4M6 < 75\%$ ), en cohérence avec les données d'angles de contact. Par ailleurs, la TC4 et la TC5 montrent clairement un caractère électron-donneur (forte affinité pour le chloroforme et faible affinité pour l'acétate d'éthyle). La TC8 et la D41 montrent une forte affinité pour le chloroforme et une affinité modérée pour l'acétate d'éthyle. Cela semble indiquer à la fois un caractère donneur et accepteur d'électrons, avec une prépondérance du premier. Cette caractéristique a également été trouvée pour la D41 par Rubio (2002). Pour la 4M6, l'affinité pour le chloroforme n'est pas plus faible que pour les solvants polaires, ce qui empêche de déterminer si elle possède un caractère électron-

donneur. Cependant, le fait qu'elle possède une faible affinité pour l'acétate d'éthyle indique qu'elle n'a pas de caractère électron-accepteur, et laisse sous entendre qu'elle est plutôt électron-donneur. Grasland et al. (2003) trouvait un caractère électron-donneur pour cette souche, de par le fait qu'elle possédait une forte adhésion avec le chloroforme, ce qui est également notre cas.

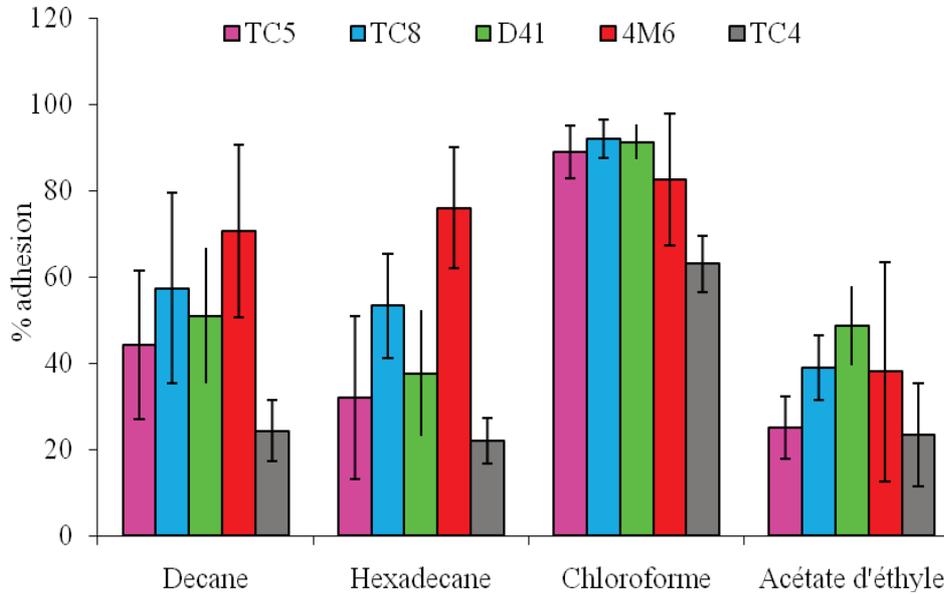


Figure 31 : Pourcentages d'adhésion aux différents solvants (MATS, NaCl à 8,8 g.L<sup>-1</sup>)

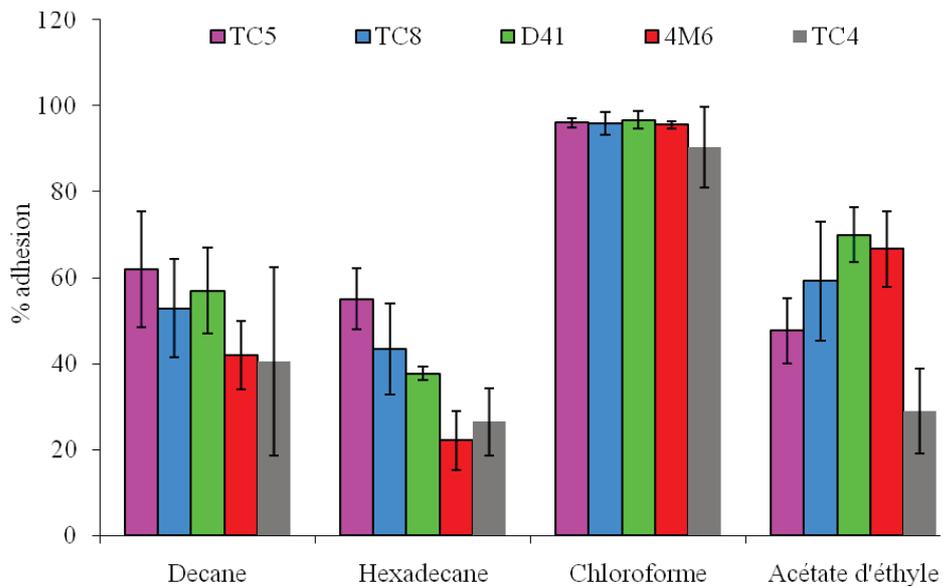


Figure 32: Pourcentages d'adhésion aux différents solvants (MATS, NaCl à 36 g.l<sup>-1</sup>)

Cette expérience a été effectuée à des concentrations salines proches de celles de l'eau physiologique comme décrit par Grasland et al. (2003). Il est possible que cela affecte les bactéries marines qui se retrouvent dans un milieu hypotonique par rapport à leur milieu naturel. Le MATS a donc également été réalisé à une concentration en NaCl de 36 g.l<sup>-1</sup> (Figure 32), plus proche des concentrations en sels du milieu marin et du protocole utilisé par Rubio (2002). On s'aperçoit que les résultats restent assez proches de ceux décrits ci-dessus à quelques nuances près. La TC5 paraît avoir des propriétés d'hydrophobicité modérée, mais avec des pourcentages d'adhésion proches de 50% pour les solvants apolaires alors que la 4M6 qui présentait un caractère hydrophobe modéré, devient hydrophile. En ce qui concerne les caractéristiques acido-basiques, de légères variations peuvent aussi être observées. La 4M6, plutôt considérée comme électron donneur (basique) lors du précédent test, conserve cette capacité car elle montre toujours une forte adhésion avec le chloroforme. Néanmoins, elle présente potentiellement un caractère électron-accepteur car elle a une affinité modérée avec l'acétate d'éthyle.

D'après Rubio (2002), il semble que plus la concentration en sel diminue, plus l'affinité pour les solvants baisse. Mais seule la souche 4M6 présente des différences très significatives ( $p < 0,001$ ) pour l'hexadecane et significatif ( $p < 0,05$ ) pour l'acétate d'éthyle. D'après Rubio (2002), cette diminution est liée à l'apparition d'interactions électrostatiques répulsives, perturbant plus la détermination de l'hydrophobicité des souches que leur caractère acide base. En effet, si l'on classe les souches en fonction de leur hydrophobicité pour les deux expériences, il s'avère que pour des concentrations à 36 g.l<sup>-1</sup> de NaCl, la TC5 est plus hydrophobe que la TC8, elle-même suivie par la D41 puis par la TC4 et la 4M6 qui sont les deux souches les plus hydrophiles. Pour la concentration à 8,8 g.l<sup>-1</sup> de NaCl, la 4M6 devient la souche la plus hydrophobe suivie par la TC8, la D41, la TC5 et enfin la TC4.

### **III. Discussion générale sur les caractéristiques des souches**

#### **III.1. Diversité des souches de biofilms marins**

L'utilisation d'une technique de mise en culture limite l'accès à un nombre considérable de bactéries en général et de biofilms en particulier. En effet, il est reconnu que la proportion de bactéries cultivables n'excède pas 1 à 5% des bactéries totales de l'environnement. Dans la majorité des études réalisées sur les biofilms, les bio-essais sont effectués sur une seule souche. Or les biofilms marins sont constitués par une large variété de bactéries. De plus, il n'est pas évident que toutes les souches présentent la même sensibilité aux différents biocides, d'où l'importance de travailler avec plusieurs souches

issues de lieux et de supports différents. Le fait que les bactéries aient été isolées à des temps d'immersion relativement courts (de 6 à 24h) a pour but l'isolement de souches formant le biofilm primaire. Bien que le terme ne soit pas forcément juste au sens écologique, nous parlerons de bactéries « pionnières » de l'adhésion. De récentes études décrivant les communautés bactériennes marines pionnières de la colonisation sur des récifs artificiels ont démontré que, durant le stade préliminaire de la formation du biofilm, la classe prédominante identifiée par clonage sur divers supports est celle des  $\gamma$ -Proteobacteria (Lee et al. 2008). Quatre de nos souches appartiennent à ce groupe, ce qui est cohérent avec leur caractéristique de souches pionnières. Par la suite, les bactéries dominantes dans les biofilms marins semblent appartenir au groupe des Rhodobacterales, principalement des  $\alpha$ -Proteobacteria, identifiée par FISH et par DGGE. Elles semblent être présentes sur divers supports tels que l'acier inoxydable ou encore du polycarbonate (Jones et al. 2007). La souche du Golfe du Morbihan (4M6) appartient à ce sous groupe. Les autres souches présentent au laboratoire sont des Bacteroidetes. Ce groupe a également été identifié par la technique moléculaire PhyloChip dans des études de biofilms primaires marins *in situ*. Cependant elles sont présentes en plus faible quantité (Chung et al. 2010).

### **III.2. Les caractéristiques biologiques et physico-chimiques pouvant influencer sur l'adhésion**

De nombreuses études ont montré que le fait de posséder des flagelles peut aider à l'adhésion bactérienne d'où l'intérêt d'étudier la mobilité des souches. Cependant la présence d'un flagelle n'est pas obligatoire pour effectuer l'adhésion. Une étude menée sur un *Vibrio alginolyticus* avec et sans flagelle (Kogure et al. 1998), ainsi que sur des *Aeromonas caviae* (Kirov et al. 2004), confirme bien l'importance de ce dernier pour faciliter l'adhésion de la bactérie. Il apparaît dans cette étude que toutes nos souches possèdent au moins un flagelle étant donné qu'elles sont toutes capables de pratiquer la nage. Toujours d'après l'étude de Kirov et al. (2004), il semble que la nage soit essentielle à la formation du biofilm, en effet les mutants privés de leurs flagelles polaires et latéraux perdent de leur capacité à former un biofilm, alors que ceux privés uniquement des flagelles latéraux peuvent encore créer d'importants biofilms sans pour autant recouvrir tout le support. Il est possible que le swarming soit plus impliqué dans la colonisation rapide du support et dans l'augmentation des forces de maintien que dans la formation du biofilm à proprement parlé (Kirov 2003).

L'hydrophobicité peut aussi être un caractère prédominant dans le choix des souches. Si l'on compare les deux types d'études (MATS et angle de contact (AC)), les résultats ne semblent pas toujours concordants, en particulier pour la TC4 qui était la souche la plus la hydrophile avec le MATS alors que pour l'AC elle était la moins hydrophile. Une étude menée sur la comparaison de ces deux méthodes a montré qu'il n'y a pas toujours de corrélation entre elles, excepté pour les souches qui auraient un faible pourcentage d'adhésion à l'hexadécane, ce qui n'est pas le cas dans notre étude (Hamadi & Latrache 2008). Une autre étude a montré que la porosité, la rugosité, ainsi que l'énergie de surface, peuvent jouer un rôle dans l'adhésion bactérienne (Huggett et al. 2009). Une autre étude a aussi montré que l'adhésion bactérienne était plus importante sur des surfaces de verre finement rayées que sur des surfaces lisses, indiquant l'importance de la nanorugosité du support (Mitik-Dineva et al. 2009). D'après l'étude de Grasland et al. (2003), il semble que les bactéries pionnières soient principalement hydrophiles, ce qui est le cas de la majorité de nos souches. Mais il semble difficile d'établir des conclusions générales sur le rôle des paramètres physico-chimiques lors de la colonisation des surfaces, étant donné qu'il existe différents mécanismes d'adhésion dépendant de l'organisme (Pradier et al. 2005). Ces mêmes auteurs ont montré que l'étude de ces deux caractères n'est pas suffisante pour déterminer l'adhésion bactérienne sur un support. Pour comprendre le mécanisme de fixation des organismes, il est important d'analyser d'autres facteurs physico-chimiques ainsi que la composition des EPS (pour les bactéries qui en produisent) et leurs caractéristiques.

#### RESUME

\_ Difficulté d'interprétation des mesures d'angles de contact et du MATS. Il faudrait également mesurer les angles de contact avec d'autres solvants et déterminer plus en détail les composantes hydrophobes et hydrophiles de ces souches.

\_ Diversité des souches pionnières de l'adhésion et importance de travailler sur plusieurs souches possédant des affiliations taxinomiques, des caractéristiques physico –chimiques, des lieux et des supports d'isolement différents.

# **CHAPITRE IV**

## **DEVELOPPEMENT DES BIO-ESSAIS ET ACTIVITES DE PRODUITS NATURELS MARINS**



## **I. Mise au point du bio-essai anti-adhésion mono-spécifique**

### **I.1. Adhésion des bactéries en microplaque**

Au cours des multiples études effectuées sur les biofilms, il est apparu que l'adhésion bactérienne ne se produit que sous certaines conditions. Ces dernières incluent la détermination de la phase optimale d'adhésion, le temps et la densité d'ensemencement optimisés pour l'adhésion des bactéries sur toute la surface du puits. Ce n'est qu'après obtention de ces paramètres, définis pour chaque souche, que les bio-essais seront réalisés.

#### ***I.1.1. Détermination de la phase optimale de l'adhésion.***

L'ensemencement de la microplaque doit être effectué avec des bactéries en début de phase stationnaire, moment où leur multiplication se ralentit. Afin d'augmenter leur état de stress, les bactéries « pionnières » ont été introduites dans un milieu pauvre en carbone (ASW) favorisant ainsi leur adhésion au fond des puits. Dans un premier temps, l'adhésion en microplaque a été effectuée avec des bactéries en phase exponentielle. Or aucune des souches testées n'a adhéré. De la même façon, l'ensemencement des plaques avec des souches trop avancées dans la phase stationnaire pourrait être problématique. Il est possible que la quantité de bactéries vivantes ne soit pas suffisante pour former un tapis bactérien ou que la sensibilité des souches soit accentuée. Au cours de cette étude, la souche TC9 n'adhérant pas sur le polystyrène a été exclue du bio-essai.

Comme il est montré dans le Tableau 10 (Chapitre III- I.2), le temps obtenu pour atteindre la phase stationnaire est très variable d'une souche à l'autre. Cette dernière peut être atteinte rapidement, en 4 à 5 h pour la bactérie TC8, ou beaucoup plus lentement comme pour la bactérie 4M6 (12 à 14 h). La phase stationnaire des autres souches se situent entre ces deux temps. Lors de la mise en place du protocole du bio-essai, le temps pour atteindre cette phase a été raccourci pour les souches bactériennes 4M6 et TC5 en augmentant la DO d'ensemencement à 0,2 au lieu de 0,1.

#### ***I.1.2. Durée d'adhésion***

Toujours dans le but d'optimiser le bio-essai, le temps nécessaire à l'adhésion des bactéries dans la microplaque a été déterminé. D'après la littérature, pour des bactéries marines, un temps minimum de 3h et un maximum de 24h ont été choisis (Grasland et al. 2003, Leroy 2006, D'Souza et al. 2010). Trois durées intermédiaires d'adhésion ont été testées (6 h, 12 h et 15 h) à plusieurs densités d'ensemencement. Ces différents tests ont été réalisés uniquement pour la D41. Il a été observé que l'intensité de fluorescence (IF), c'est-à-dire la quantité de bactéries adhérees dans les puits, augmente logiquement avec la densité

d'ensemencement (Figure 33). Cet aspect sera approfondi dans le paragraphe suivant. Pour cette étude une gamme d'ensemencement de densité optique maximale de 0,6 a été réalisée. Le temps d'adhésion a été déterminé grâce à l'évolution des IF aux plus fortes concentrations. Il a été constaté que les bactéries adhèrent rapidement puisque après 3h de contact avec le support, une fixation bactérienne a pu être observée, mais avec des IF et une répétabilité faible pour les six réplicats pour la D41, confirmant les travaux de Leroy et al. (2007) pour cette souche. Cependant, le but de l'étude est de voir l'effet des molécules sur l'adhésion bactérienne. Il est donc préférable qu'une quantité suffisante de bactéries se fixe au support. De plus il faut que cette fixation soit suffisamment consolidée pour résister aux divers traitements effectués lors de la révélation. Afin de s'assurer une adhésion suffisante, un temps supérieur à 3 heures a donc été choisi. En ce qui concerne les temps d'adhésion à 6h et 12 h, il est clair que les IF sont suffisamment élevés, même après trois lavages, et présentent une bonne répétabilité vu les faibles écarts-types. Cependant il faut aussi prendre en compte le temps nécessaire à la souche pour atteindre la phase stationnaire avant ensemencement. La somme de ces deux temps rend difficilement réalisable l'expérimentation sur une journée. Suite à ces constatations, il a été décidé que le temps minimal d'adhésion de la D41 serait de 15 h (Révélation le lendemain). Les IF obtenus à ce temps ainsi que la répétabilité étaient aussi bon qu'à 6 ou 12h.

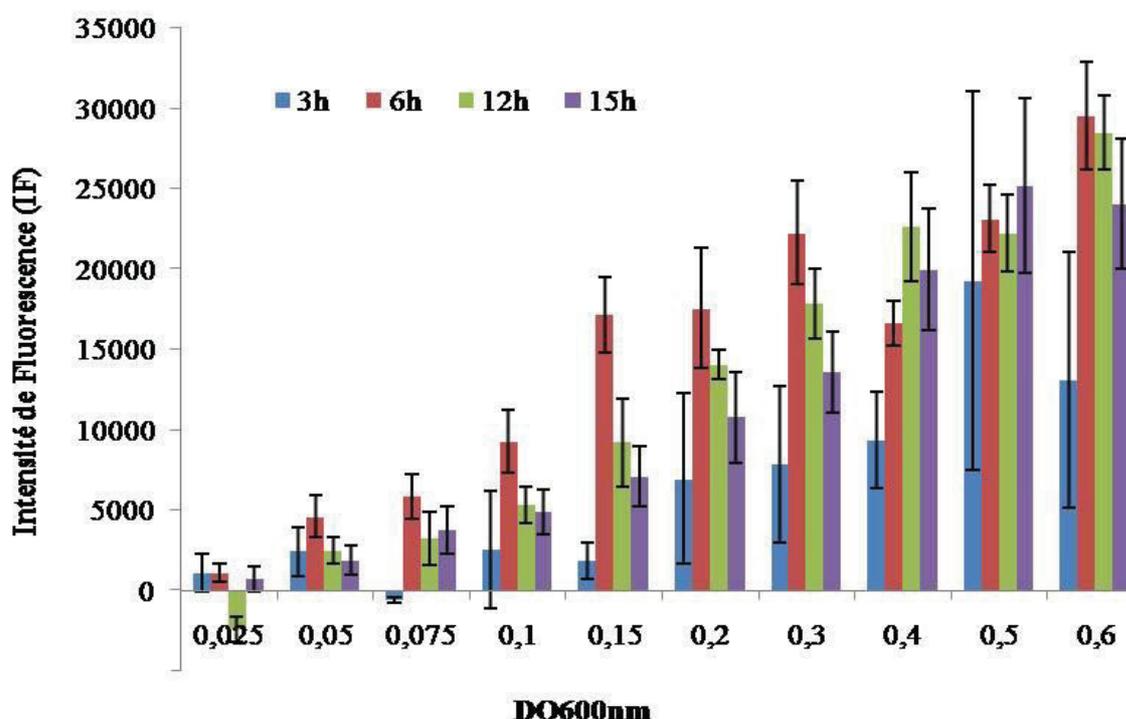


Figure 33: Cinétique d'adhésion (IF) de la D41 à quatre temps et pour une gamme de densités d'ensemencement.

Au vu des informations obtenues pour la D41, seuls les temps de 15 et 24 h ont été étudiés pour les autres souches. La comparaison des IF obtenus pour les cinq autres souches a montré que la TC10 et la TC8 possèdent des IF plus faibles à 15h, la durée à 24h a donc été choisie. La TC4 présentait de faibles intensités de fluorescence à 15 et à 24h, indiquant une mauvaise adhésion de cette souche. Afin de permettre à cette bactérie de consolider au maximum sa fixation et d'éviter une perte trop importante lors des lavages, un temps de 24h a été choisi pour la réalisation du bio-essai. La TC5 et la 4M6 ont montré des similitudes à 15 et à 24h, le temps le plus court a donc été choisi pour le reste de l'étude (Figure 34).

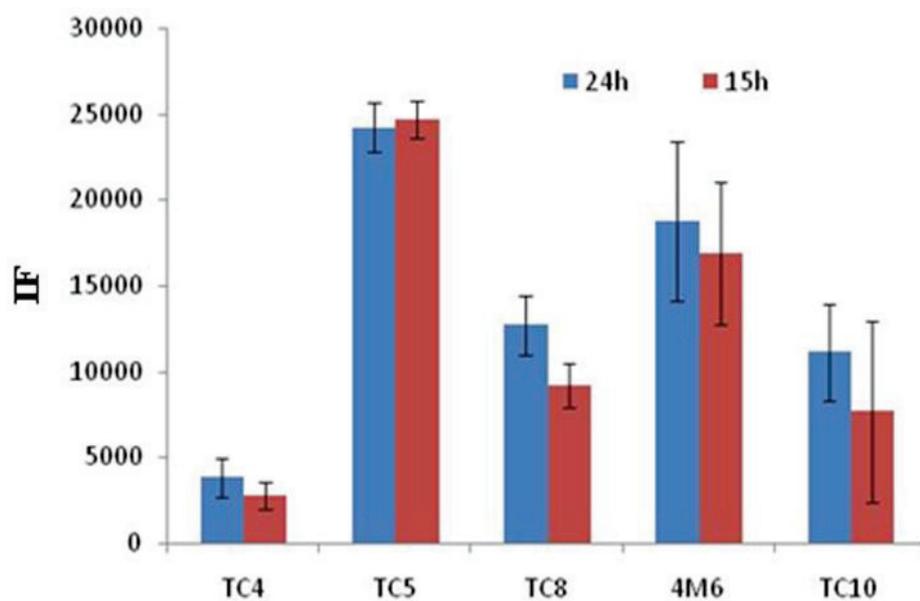


Figure 34 : Adhésion des bactéries (IF) à deux temps (15 et 24 h) pour les cinq souches marines testées

### ***1.1.3. Densité d'ensemencement***

La densité d'ensemencement optimale est la quantité de bactéries qu'il faut introduire dans les puits afin d'avoir un recouvrement maximum de celui-ci, tout en gardant une proportionnalité entre le nombre de bactéries inoculées (DO) et l'IF. En effet, lorsque le tapis bactérien devient trop dense, le « biofilm » va se structurer dans l'espace et le DAPI ne peut pas rentrer dans toutes les cellules ou être excité au moment de la lecture. Cela entraîne une saturation du signal, et une perte de la proportionnalité entre la quantité de marqueur fluorescent et le nombre de bactéries adhérees dans les puits (Figure 35). Un recouvrement maximal des puits permet par ailleurs de maximiser la variation potentielle entre la plus forte et la plus faible réponse. Cependant, cette saturation pourrait aussi être due en partie au phénomène de quenching. Le début de ce plateau est la valeur seuil à utiliser pour

ensemencer la plaque, afin d'obtenir le plus grand recouvrement du puits tout en ayant une « monocouche » de bactéries.

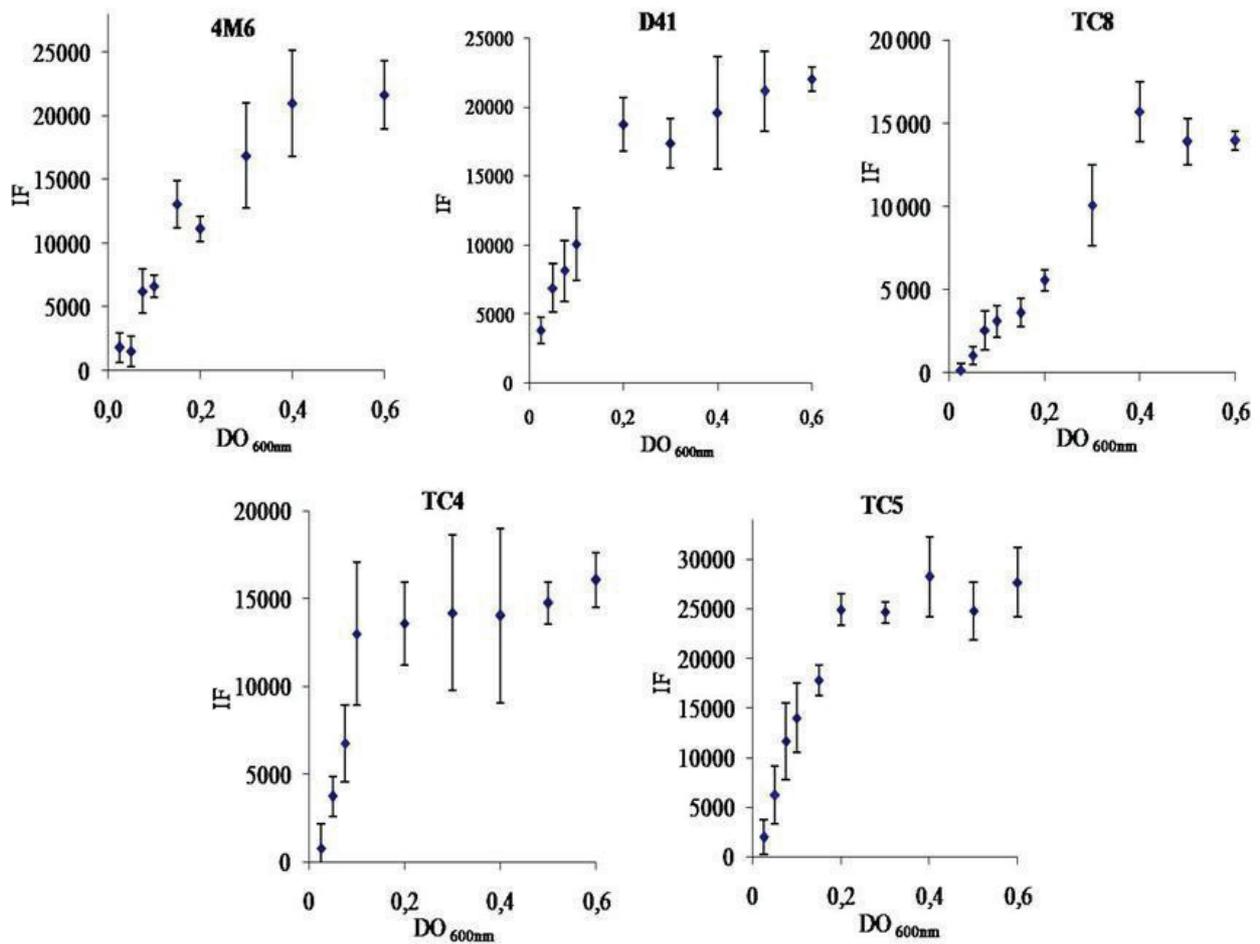


Figure 35: IF en fonction de la densité d'ensemencement pour les cinq souches étudiées

La bactérie TC10 a été exclue du bio-essai car l'obtention d'un recouvrement maximal des puits nécessitait un ensemencement à une densité trop élevée ( $DO > 0,6$ ). La plaque doit être ensemencée à une DO deux fois plus élevée que celle voulue dans le puits, puisqu'elle contient déjà 100  $\mu$ L de solution à tester (dilution au demi). Il faut donc que la croissance atteigne une DO minimale de 1,2 voire 1,4 après centrifugation. Cette étape engendre généralement une perte bactérienne et donc une diminution de la DO. De plus cette souche présentait des irrégularités importantes d'adhésion. Au vue de ces résultats, les souches TC4, TC5 et TC8 ont été choisies pour la réalisation du bio-essai, comme déjà précisé au Chapitre III. Ces souches possèdent des  $DO_{600nm}$  de saturation situées entre 0,2 et 0,4.

Afin de déterminer la souche qui présente la plus grande quantité bactérienne adhérente dans les puits, une régression linéaire a été effectuée pour chaque micro-organisme

et la pente des droites a été calculée (Figure 36). Ces valeurs sont représentées dans le Tableau 11

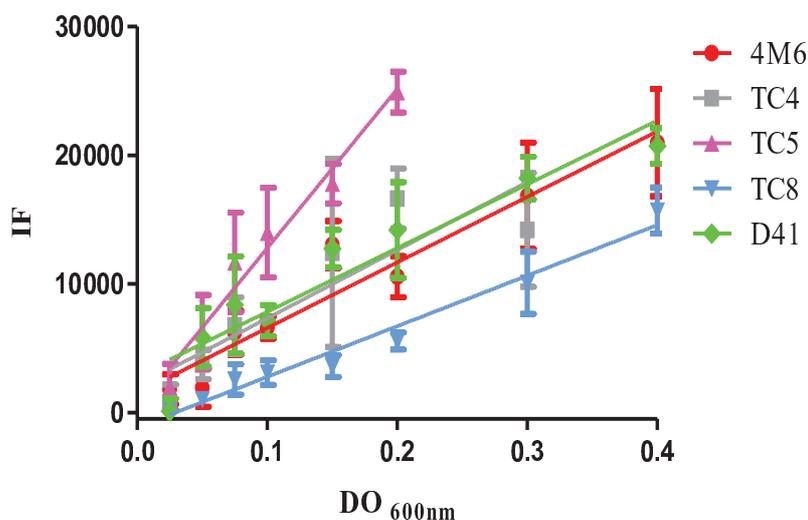


Figure 36 : Régression linéaire entre la densité d'ensemencement et l'IF lue pour les différentes souches étudiées

	TC4	TC5	TC8	D41	4M6
<b>Pente</b>	$5,3 \cdot 10^4 \pm 1,4 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5 \pm 1,0 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4 \pm 2,6 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^4 \pm 6 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^4 \pm 5,7 \cdot 10^3$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,78	0,97	0,97	0,90	0,93
<b>p</b>	0,0202	0,0003	0,0001	0,0003	0,0001

Tableau 11: Paramètre de la régression linéaire entre la densité d'ensemencement ( $DO_{600nm}$ ) et l'IF lue pour les cinq souches étudiées

La souche qui incorpore la plus grande quantité de fluorochrome par bactérie est la TC5 étant donné qu'elle possède la pente la plus forte. Cette forte accumulation pourrait être liée à la quantité d'ADN, à la taille de la bactérie ou à la présence d'ADN extracellulaire. Cependant, comme il a été décrit au Chapitre III –II.1, cette souche est la plus petite. Pour une même DO, il y a donc un plus grand nombre de bactéries et donc d'ADN. Les quatre autres souches présentent des pentes assez identiques d'environ moitié moindre que celle de la TC5 (Figure 36). La souche présentant l'inclinaison la plus faible est la TC8. La bactérie TC4 possède le plus mauvais coefficient de détermination pour la régression linéaire avec des écarts-types importants dus à son adhésion irrégulière.

### I.1.4. Toxicité des solvants.

Pour chacune des souches, l'effet sur l'adhésion bactérienne des trois solvants choisis pour la solubilisation des molécules a été déterminé. Il ressort que les bactéries ne tolèrent qu'une faible quantité de solvant. Cette dernière ne peut pas dépasser 5 % pour l'éthanol et le méthanol et seulement 2% pour le DMSO. Le seuil de tolérance aux solvants est resté identique pour l'analyse de l'inhibition de croissance. Il faut noter que, pour les concentrations de biocides les plus élevées, il persiste tout de même un léger effet inhibiteur. Cet effet est inférieur ou égal à 10% pour toutes les souches, exceptée pour la 4M6 qui a une sensibilité légèrement supérieure (15%) à l'éthanol et au DMSO. Ces valeurs seuils ont été déterminées à l'aide des  $CE_{90}$  ou des  $CE_{85}$  (Tableau 12, Figure 37)

		4M6	D41	TC4	TC5	TC8
<b>Méthanol</b>	<b>CE<sub>90</sub> (%)</b>	<b>6,4 ± 0,1</b>	<b>5,8 ± 2,8</b>	<b>5,2 ± 0,8</b>	<b>5,6 ± 3,4</b>	<b>6,9 ± 3,8</b>
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,98 ± 0,02	0,95 ± 0,01	0,84 ± 0,17	0,95 ± 0,05	0,98 ± 0,02
<b>Ethanol</b>	<b>CE<sub>90</sub> (%)</b>	<b>4,5 ± 0,6*</b>	<b>6,7 ± 2,9</b>	<b>6,6 ± 2,3</b>	<b>4,6 ± 1,8</b>	<b>4,8 ± 1,3</b>
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,04	0,93 ± 0,04	0,84 ± 0,06	0,98 ± 0,01
<b>DMSO</b>	<b>CE<sub>90</sub> (%)</b>	<b>2,1 ± 1,4*</b>	<b>3,8 ± 1,9</b>	<b>3,7 ± 2,8</b>	<b>4,2 ± 0,9</b>	<b>8,9 ± 0,4</b>
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,80 ± 0,06	0,92 ± 0,04	0,93 ± 0,06	0,96 ± 0,01	0,91 ± 0,03

\* : valeur obtenue pour la  $CE_{85}$

Tableau 12 : Effet anti-adhésion des solvants utilisés pour la solubilisation des molécules sur les souches étudiées

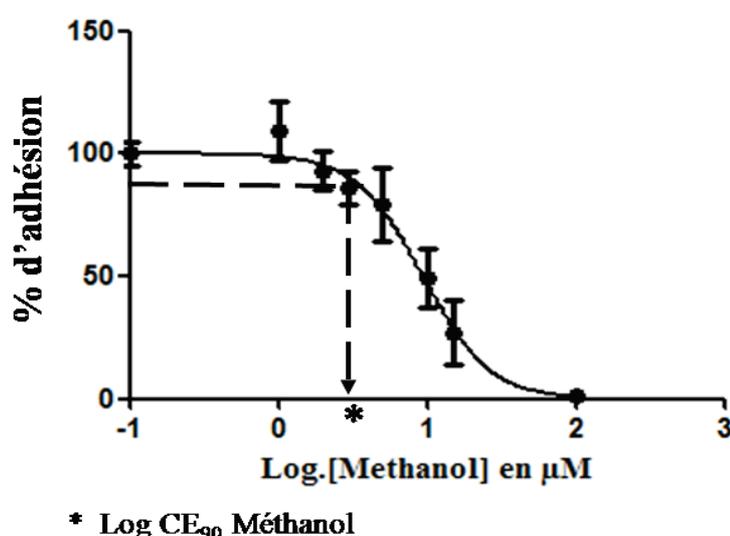


Figure 37: Courbe dose-réponse de l'effet du méthanol sur l'adhésion de la souche TC5 – Détermination de la  $CE_{90}$  ( $\mu\text{M}$ )

## I.2. Validation de la méthode de quantification des bactéries adhérees en microplaque

Afin de pouvoir déterminer rapidement la densité de bactéries adhérees dans les puits, une corrélation entre l'IF et le nombre de bactéries adhérees dénombrées par comptage en microscopie à épifluorescence directement dans la microplaque a été réalisée. Puis les IF ont été obtenus comme décrit précédemment par extraction du DAPI à l'éthanol à 95%. Les corrélations obtenues (Figure 38, Tableau 13) sont bonnes puisque, pour les cinq souches, un  $R^2$  supérieur à 0,8 ( $p < 0,05$ ) a été observé

Souches	TC4	TC5	TC8	4M6	D41
n	7	6	6	4	6
$R^2$	0,85	0,81	0,95	0,86	0,86
Pente	$211 \pm 40$	$809 \pm 197$	$295 \pm 35$	$1741 \pm 497$	$109 \pm 21,8$
p (<0,05)	0,009	0,001	0,001	0,073	0,0078
Limite de détection (Nombre de bactéries/puits)	$6,4 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^6 \pm 3,5 \cdot 10^5$	$7,6 \cdot 10^5 \pm 2,4 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^5 \pm 8,0 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^5 \pm 2,3 \cdot 10^5$
Nombre de bactéries /cm <sup>2</sup>	$6,9 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$

Tableau 13 : Corrélation entre l'IF et le nombre de bactéries dénombrées par microscopie inversée à épifluorescence dans les microplaques

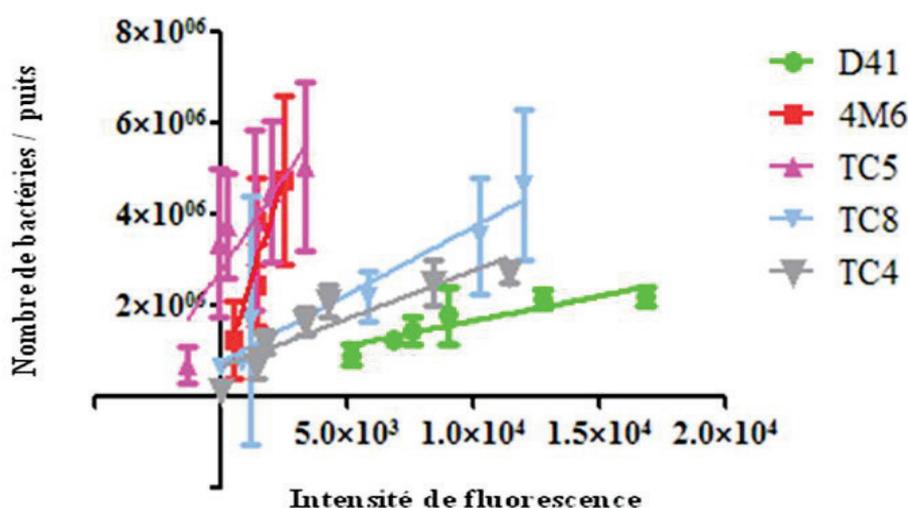


Figure 38: Corrélation entre l'IF et le nombre de bactéries dénombrées par microscopie inversée à épifluorescence dans les microplaques

Au delà d'une certaine quantité de bactéries, qui dépend des souches, le « biofilm » devient trop dense et le comptage sous microscope n'est plus possible. Cette DO maximale est généralement comprise entre  $DO_{600nm} = 0,3$  et  $0,4$  en fonction des souches. Bien que pour une même DO la quantité bactérienne soit différente pour chaque souche, cela ne semble pas influencer sur l'adhésion. En effet, les souches 4M6 et D41 ne présentent pas de différence de taille alors qu'elles possèdent des différences de sensibilité. Par contre, les bactéries TC5 et TC8 possèdent des tailles différentes mais des sensibilités similaires.

Le nombre de bactéries adhérees dans le puits et/ou la quantité de DAPI fixée par bactérie dépend de la souche. Pour chacune des souches, une pente et une limite de détection ont été déterminées. La limite de détection correspond à la quantité minimale qu'il faut introduire de bactéries dans le puits pour qu'elles soient détectables par le lecteur de microplaque. La limite de détection varie entre  $5,2 \cdot 10^6 \pm 8,1 \cdot 10^5$  bactéries par puits pour la 4M6 et  $2,8 \cdot 10^6 \pm 3,5 \cdot 10^5$  pour la TC5.

Il est intéressant de calculer la densité bactérienne que cela représenterait en  $cm^2$  afin de pouvoir comparer ces valeurs aux travaux de Leroy et al. (2007) ainsi qu'aux expériences menées *in situ* (cf Chapitre V).

Lors de la comparaison des deux expériences effectuées entre la densité optique, l'IF et le nombre de bactéries, il est apparu que la TC5 est la souche qui possède la plus grande densité bactérienne dans les puits. Les autres souches sont relativement proches les unes des autres. Seule la TC8 a montré des divergences entre les deux analyses. Dans l'étude réalisée par le Leroy et al. (2007), le nombre de bactéries par  $cm^2$  était compris entre  $2 \cdot 10^7$  et  $2 \cdot 10^8$  bactéries/ $cm^2$ , ce qui est également notre cas pour au moins une de nos souches (TC5). Les autres sont comprises entre  $1 \cdot 10^7$  et  $2 \cdot 10^7$  bactéries par  $cm^2$ . Pour comparaison, la densité bactérienne sur un coupon de PVC immergé durant un mois dans la Rade de Toulon en juillet (Chapitre V), est similaire, elle s'élève à  $1,32 \cdot 10^7$  bactérie par  $cm^2$ .

### I.3. Robustesse du bio-essai

Toutes les souches ne possèdent pas la même capacité d'adhésion en microplaque (PS). En effet, la reproductibilité est comprise entre 99% pour la bactérie D41 (n=55) et 53% pour la TC4 (n= 35). L'autre souche de *Pseudoalteromonas* sp. (TC8) montre également une très bonne reproductibilité (91%, n= 38). En ce qui concerne les deux dernières souches étudiées, leur reproductibilité pour l'adhésion est intermédiaire : 71% (n= 34) pour la 4M6 et 70% (n= 33) pour la souche TC5.

Nous avons décidé de valider le bio-essai à deux conditions : premièrement il faut que le ratio entre l'IF du témoin bactérien d'adhésion et l'IF du mélange fluorochrome +

solution à tester (témoin marqueur) soit supérieure ou égale à 2,5. Cette valeur permet de s'assurer qu'il y a au moins deux fois plus de bactéries dans les puits « témoins » que dans les puits « blancs », et donc que l'adhésion a été suffisante pour que le test soit interprétable. Deuxièmement il faut que le coefficient de détermination de l'ajustement de la courbe dose-réponse aux points expérimentaux ( $R^2$ ) réalisé avec le logiciel GraphPad Prism soit supérieur à 0,7 ( $p < 0,05$ ).

La bonne répétabilité du test a été vérifiée grâce à la détermination des écarts-types au sein d'une même plaque entre les triplicats d'une même concentration. En ce qui concerne la reproductibilité, elle a été évaluée à travers les  $CE_{50}$  (triplicats de courbes dose-réponse, elles-mêmes basées sur 8 concentrations en triplicats). Bien que les valeurs d'écart-types soient relativement élevées (Tableau 14), elles restent acceptables pour un bio-essai basé sur l'utilisation de populations d'organismes clonaux.

## **II. Activités anti-adhésion et antibactérienne de biocides commerciaux et de produits naturels marins ou dérivés de synthèse sur cinq souches « pionnières » marines**

Une fois tous les paramètres ci-dessus déterminés pour les différentes souches de bactéries choisies, les bio-essais ont pu être réalisés. Dans un premier temps, des biocides AF commerciaux connus pour leur efficacité sur les différents organismes constituant le biofouling ont été testés. Cela a permis de vérifier l'intérêt de notre étude sur les différentes souches et d'évaluer aussi sa robustesse. Par la suite des molécules naturelles issues d'organismes marins seront également intégrées dans notre étude.

L'effet anti-adhésion des biocides est répartie sur une large gamme de valeur de  $CE_{50}$  (Figure 39) comprises entre  $0,9 \pm 0,5$  et  $500 \mu\text{M}$ . Ces variations dépendent non seulement des molécules mais également des souches. Au vu des résultats, cinq classes d'activité peuvent être définies:

- (i) les biocides très actifs avec des  $CE_{50} \leq 50 \mu\text{M}$
- (ii) ceux possédant une bonne activité avec des  $CE_{50}$  comprises entre 50 et  $100 \mu\text{M}$
- (iii) les molécules ayant des  $CE_{50}$  comprises entre 100 et  $200 \mu\text{M}$  qui présentent une efficacité moyenne,
- (iv) celles possédant une activité avec des  $CE_{50}$  comprises entre 200 et  $500 \mu\text{M}$  sont considérées comme faibles
- (v) et enfin les biocides avec des  $CE_{50}$  égales ou supérieures à  $500 \mu\text{M}$  sont définis comme non actifs.

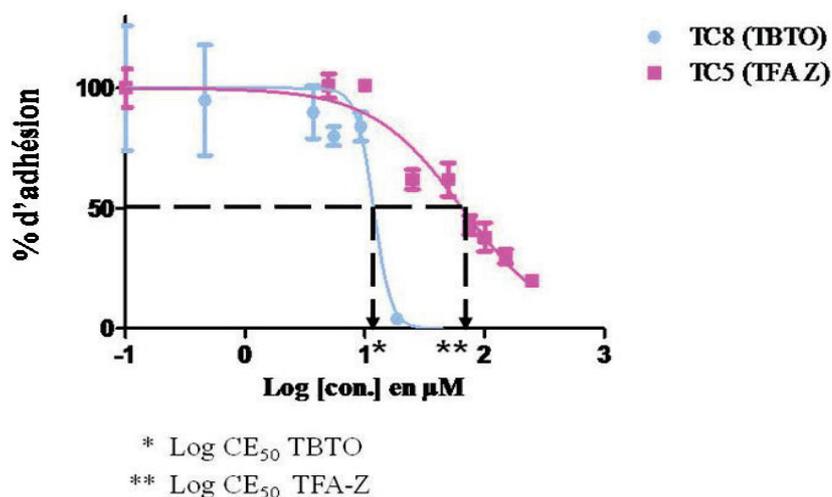


Figure 39: Exemples de courbes dose-réponse sigmoïdes et de détermination de la CE<sub>50</sub> pour deux souches (TC8 et TC5) avec deux biocides différents (TBTO et TFA-Z).

## II.1. Produits commerciaux

### II.1.1. Activités anti-adhésion

Dans un premier temps, six produits AF commerciaux possédant des modes d'action et des organismes cibles différents ont été testés. Les résultats sont montrés dans le Tableau 14 et la Figure 40.

		TC4	TC5	TC8	4M6	D41
TBTO	CE <sub>50</sub> (µM)	17,1 ± 6,7	9,6 ± 5,5	12,1 ± 3,1	15,4 ± 7,5	13,9 ± 4,0
	Pente	Faible	Faible	Forte	Forte	Faible
	R <sup>2</sup>	0,88 ± 0,04	0,90 ± 0,12	0,95 ± 0,01	0,85 ± 0,13	0,72 ± 0,17
SN	CE <sub>50</sub> (µM)	> 500*	3,5 ± 3,7*	13,2 ± 5,2*	0,9 ± 0,5*	74,2 ± 28,4*
	Pente		Faible	Faible	Forte	Faible
	R <sup>2</sup>		0,89 ± 0,16	0,87 ± 0,15	0,97 ± 0,04	0,82 ± 0,15
A4S	CE <sub>50</sub> (µM)	> 500	> 500	> 500	45,9 ± 29,3*	> 500
	Pente				Faible	
	R <sup>2</sup>				0,82 ± 0,19	
CuSO <sub>4</sub>	CE <sub>50</sub> (µM)	> 500	299,8 ± 100,2	> 500	14,8 ± 9,3	> 500
	Pente		Faible		Faible	
	R <sup>2</sup>		0,89 ± 0,11		0,76 ± 0,04	
Capsaïcine	CE <sub>50</sub> (µM)	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
Irgarol®	CE <sub>50</sub> (µM)	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500

\*Bio-essai réalisé par la méthode d'évaporation

Tableau 14 : Effet des biocides commerciaux sur l'adhésion des cinq souches marines

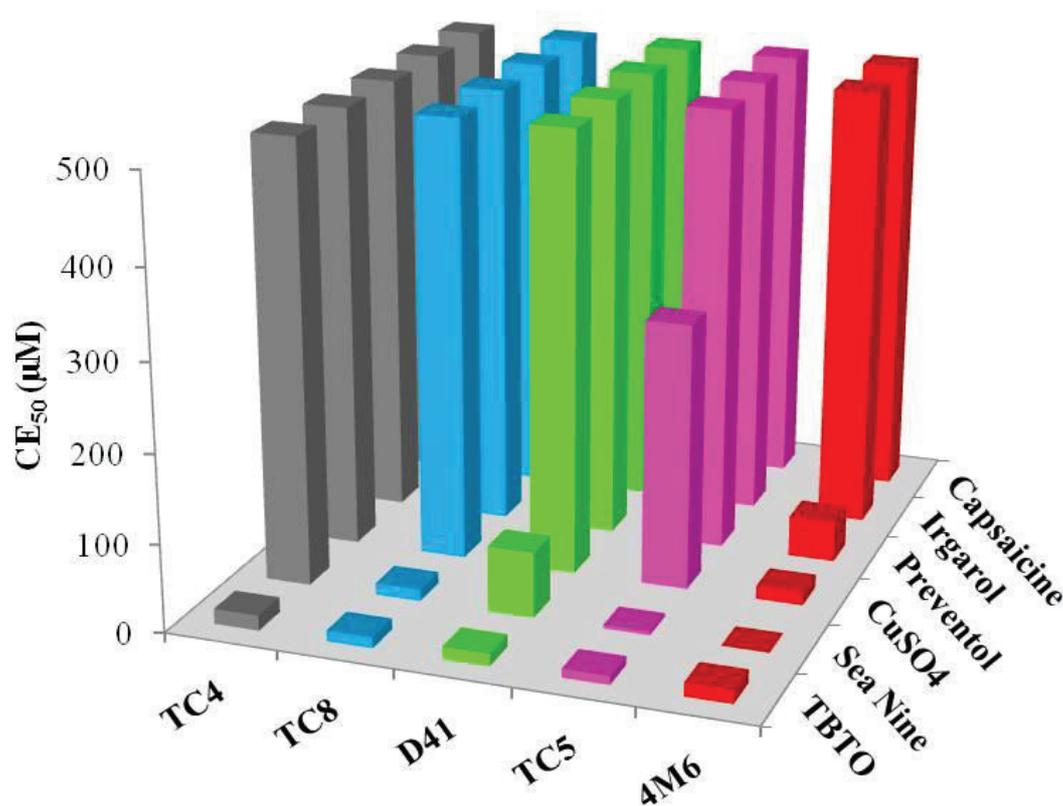


Figure 40 : CE<sub>50</sub> des biocides commerciaux sur les cinq souches étudiées

Le TBTO montre une forte activité sur toutes les souches avec une CE<sub>50</sub> maximale à  $17,1 \pm 6,7 \mu\text{M}$ . Afin de voir si l'activité des biocides est significativement différente d'une souche à l'autre, un test statistique a été réalisé. Le test d'Agostino et Pearson ( $p > 0,05$ ) permet de vérifier si les données suivent une loi normale. celle-ci a été vérifiée en transformant les CE<sub>50</sub> en logarithmes. Une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs a alors été effectuée. Cette étude a globalement montré des effets extrêmement significatifs à la fois des souches et des biocides mais aussi de l'interaction entre souches et biocides ( $P < 0,0001$ ) (Tableau 15). Le post-test de Bonferroni n'a révélé aucune différence significative pour le TBTO sur les différentes souches ( $p > 0,05$ ). Le SN, par contre, montre des différences significatives d'activité sur toutes les souches ( $p < 0,0001$ ), malgré le fait qu'il présente des CE<sub>50</sub> fortes pour trois souches (TC5, TC8 et 4M6). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature sur ces biocides très efficaces et à spectres larges (eg Yebra et al. 2004). L'A4S et le CuSO<sub>4</sub> présentent également une forte efficacité mais de façon un peu surprenante puisqu'ils ne sont actifs que pour une souche (4M6). En ce qui concerne les 2 derniers produits, la Capsaïcine et l'Irgarol, aucune activité n'a été détectée même aux concentrations les plus élevées.

De façon peu surprenante, les souches présentent des sensibilités différentes aux divers biocides. Si à présent on compare les souches en prenant en compte tous les biocides, excepté l'Irgarol et la Capsaïcine qui sont non actifs, on constate que seule l'adhésion de la souche de *Paracoccus* (4M6) est inhibée par tous les biocides. De plus le SN, le TBTO ainsi que le  $\text{CuSO}_4$  montre une forte efficacité anti-adhésion contre de cette souche de l'Atlantique. Mais d'après le « post-test » de Bonferroni, cette souche n'est significativement différente ( $p < 0,0001$ ) des autres bactéries que pour le  $\text{CuSO}_4$  et pour l'A4S. A l'opposé, la souche méditerranéenne TC4 n'est affectée que par le TBTO avec une  $\text{CE}_{50}$  équivalente aux quatre autres souches. Les trois autres bactéries étudiées présentent des profils intermédiaires : en effet, la TC5 montre une sensibilité importante à tous les biocides exceptés à l'A4S. Concernant l'adhésion des deux *Pseudoalteromonas* spp., ils ne sont affectés que par le TBTO et le SN. Malgré le fait qu'ils soient du même genre, leur sensibilité pour le SN diffère. En effet la souche TC8 possède une  $\text{CE}_{50}$  de  $13,2 \pm 5,2 \mu\text{M}$  alors que celle de la bactérie D41 est significativement plus élevée à  $74,2 \pm 28,4 \mu\text{M}$  (Figure 40).

	TC4 vs TC5	TC4 vs TC8	TC4 vs 4M6	TC4 vs D41	TC5 vs TC8	TC5 vs 4M6	TC5 vs D41	TC8 vs 4M6	TC8 vs D41	4M6 vs D41
TBTO	NS									
SN	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
A4S	NS	NS	***	NS	NS	***	NS	***	NS	***
$\text{CuSO}_4$	NS	NS	***	NS	NS	***	NS	***	NS	***

→\*\*\* : Extrêmement significatif

\* : Significatif

→\*\* : Très significatif

NS : Pas de différence significative

Tableau 15: ANOVA à 2 facteurs et post-test de Bonferroni: interactions entre souches et biocides commerciaux.

Le logiciel GraphPad Prism donne également l'inclinaison des pentes des courbes dose-réponse (exprimé par le nombre de Hill). Cette étude pourrait donner des informations quant au mode d'action des molécules mais aussi permettre de différencier deux produits qui présentent des  $\text{CE}_{50}$  très proches ou égales (Tableau 14).

Au vu des résultats obtenus, trois types de pente ont été définis : un nombre de Hill  $< -5$  correspond à des pentes fortes,  $> -2$  à des pentes faibles et les pentes moyennes

correspondent aux valeurs intermédiaires. Ces trois types de pentes sont illustrés dans la Figure 41.

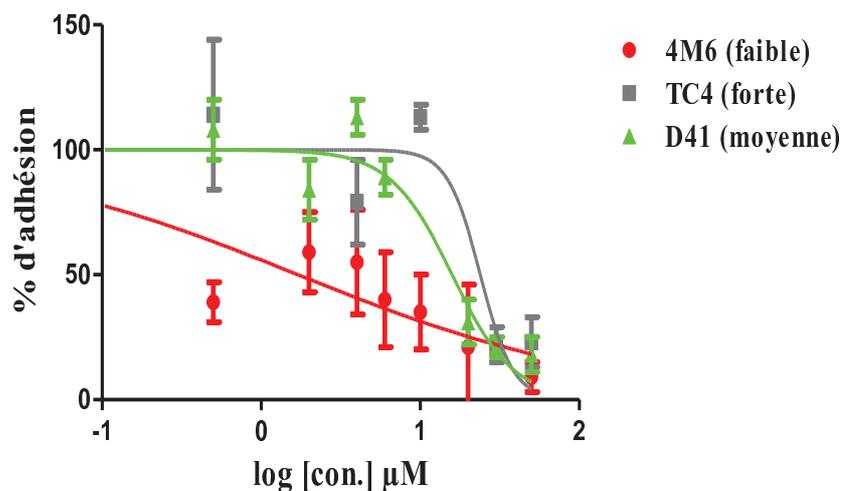


Figure 41: Exemple des trois types de pentes possibles avec le TBTO sur trois souches

D'une manière générale, les pentes des biocides sont majoritairement faibles. Si l'on regarde les souches individuellement, il ressort que les bactéries TC5 et D41 n'ont que des pentes faibles alors que les bactéries TC8 et 4M6 sont caractérisées par 50 % de pente forte. A présent, si l'on s'intéresse aux biocides, le SN (sauf pour 4M6), le  $\text{CuSO}_4$  et l'A4S montrent toujours des pentes faibles. Le TBTO quant à lui montre des pentes fortes et faibles en proportions similaires.

### II.1.2. Inhibition de la croissance et viabilité bactérienne

Dans le souci d'identifier des molécules moins dangereuses pour l'environnement, des tests de toxicité ont été mis en place en parallèle, sur les mêmes souches bactériennes qu'utilisées précédemment. En effet, l'effet anti-adhésion des molécules peut être lié à une inhibition spécifiquement des mécanismes d'adhésion des bactéries sans pour autant les tuer. L'autre possibilité est qu'elles inhibent la formation du biofilm en tuant simplement les cellules. Notre objectif est bien sûr d'identifier des molécules présentant un mode d'action spécifique qui ne devrait donc pas impacter négativement les organismes marins non cibles. Il est évident que la toxicité des molécules présentant un fort intérêt devra aussi être testée sur d'autres organismes non cibles situés à d'autres niveaux des réseaux trophiques marins.

Ces essais n'ont été effectués que sur les produits montrant une activité anti-adhésion intéressante. C'est pourquoi seuls les résultats du TBTO et du SN sont donnés pour les molécules commerciales. Comme la bactérie TC4 est la moins sensible, il est fort

probable qu'elle soit également moins sensible que les autres en termes d'inhibition de croissance. Elle a donc été exclue du test. La D41 et la TC8 sont du même genre et possèdent plus ou moins la même sensibilité. Seule la D41 a donc été utilisée pour les tests d'inhibition de croissance et de viabilité. Les souches TC5 et 4M6 ont également été employées.

Des tests préliminaires de viabilité ont d'abord été effectués sur le biofilm en lui-même, à l'aide du kit Live-Dead<sup>®</sup> (Invitrogen) permettant d'évaluer directement la quantité de bactéries mortes. Mais ce kit est généralement utilisé pour des analyses antibactériennes en microplaque (Auty et al. 2001, Alakomi et al. 2005). Ce type d'analyse a également été appliqué à des biofilms mais en microscopie à épifluorescence (Prakash Singh 2006) ou confocale (eg Huigens III et al. 2008, Dheilly et al. 2010). Un des marqueurs (SYTO<sup>®</sup> 9) va pénétrer dans toutes les cellules alors que le deuxième ne rentre que dans les cellules mortes (Iodure de propidium). Malheureusement les résultats obtenus avec cette méthode n'étaient pas exploitables. Cette étude mériterait d'être approfondie mais nous avons choisi d'utiliser une autre stratégie basée sur le couplage de l'étude de l'inhibition de croissance suivi de la détermination de la viabilité cellulaire. Cela a été effectué grâce à un indicateur d'oxydo-réduction, marqueur de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire, la résazurine. La dégradation de la résazurine en résorufine n'intervient qu'en présence de bactéries vivantes. Les CI<sub>50</sub> (Figure 42 a) et les CL<sub>50</sub> (Figure 42 b) des trois souches étudiées sont données dans le Tableau 16.

		<b>TC5</b>	<b>4M6</b>	<b>D41</b>
<b>TBTO</b>	<b>CI<sub>50</sub> (µM)</b>	0,2±0,1	2,1±1,5	4,2±0,3
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,95±0,06	0,97±0,01	0,96±0,03
	<b>Pente</b>	Moyenne	Moyenne	Moyenne
	<b>CL<sub>50</sub> (µM)</b>	0,3±0,1	2,3±0,8	5,1±0,5
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,99±0,00	0,99±,01	0,99±0,00
	<b>Pente</b>	Forte	Forte	Forte
<b>SN</b>	<b>CI<sub>50</sub> (µM)</b>	10,3±1,7	7,9±1,1	5,9±1,5
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,97±0,02	0,97±0,02	0,97±0,03
	<b>Pente</b>	Moyenne	Forte	Moyenne
	<b>CL<sub>50</sub> (µM)</b>	6,9±3,4	7,3±0,8	5,2±1,9
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,98±0,01	0,99±0,00	0,98±0,02
	<b>Pente</b>	Forte	Forte	Moyenne

Tableau 16 : Toxicité du TBTO et du SN sur les trois souches étudiées.

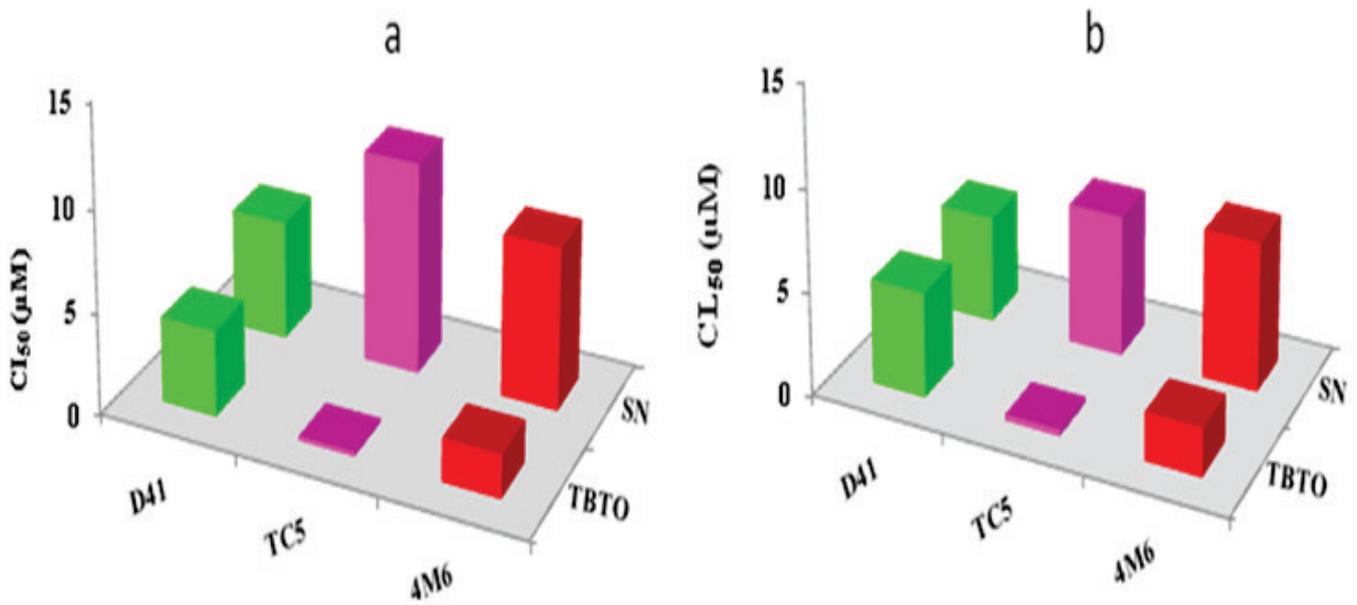


Figure 42:  $CI_{50}$  (a) et  $CL_{50}$  (b) du TBTO et du SN pour les trois souches testées

Pour la détermination de la  $CI_{50}$ , il faut au préalable calculer les  $\mu_{max}$  obtenus pour chaque concentration (Figure 43 et 44) puis les rapporter au  $\mu_{max}$  du témoin de croissance pour obtenir un pourcentage d'inhibition de croissance.

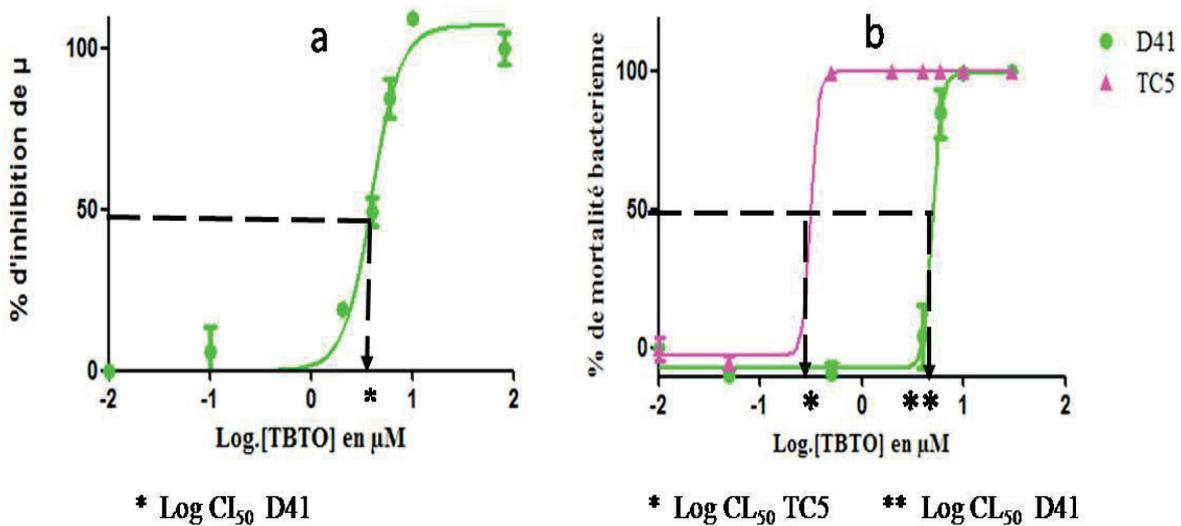


Figure 43 : Exemple de courbes dose-réponse de l'inhibition de croissance (a) de la souche D41 et de la viabilité des souches D41 et TC5 en réponse au TBTO

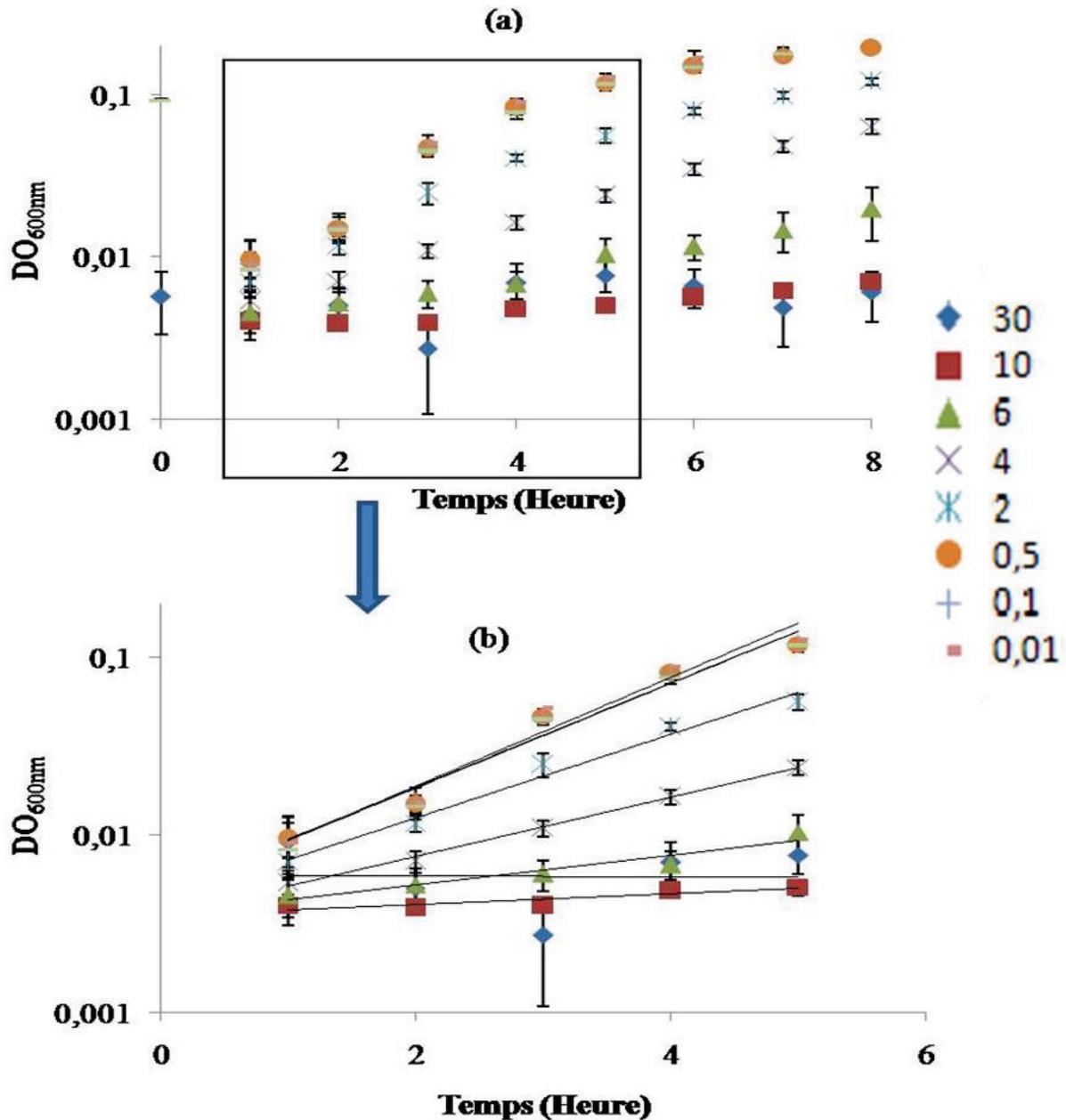


Figure 44 : Courbes de croissance (a) de la souche D41 aux différentes concentrations de TBTO et phase exponentielle (b) permettant d'obtenir le taux de croissance ( $\mu_{max}$ )

Le TBTO et le SN montrent une forte activité d'inhibition de la croissance ainsi qu'une forte toxicité pour les trois souches ( $CI_{50}$  et  $CL_{50} < 5,1 \pm 0,5 \mu M$  pour le TBTO et entre  $5,2 \pm 1,9$  et  $10,3 \pm 1,8 \mu M$  pour le SN, Tableau 16, Figure 42). L'ANOVA deux facteurs n'a détecté aucune différence globalement entre les souches ( $p > 0,05$ ), mais par contre, elle a montré des différences très significatives ( $p < 0,001$ ) entre ces deux biocides. Il apparaît ainsi que la TC5 soit la souche la plus sensible au TBTO alors qu'elle est la plus résistante au SN.

L'étude des pentes a aussi été réalisée pour ces bio-essais et a montré des nombres de Hill moyens ou forts contrairement à ceux obtenus pour les courbes dose-réponse anti-adhésion. Le TBTO a des pentes moyennes pour les trois souches pour l'inhibition de croissance, alors que des pentes fortes sont toujours observées pour l'étude de viabilité. Le SN présente un profil similaire avec une majorité de pentes moyennes pour l'inhibition de croissance et une majorité de pentes fortes pour les résultats de viabilité. Si maintenant on s'intéresse aux souches individuellement, la 4M6 possède 75% de pentes fortes alors que la D41 a 75% de pentes moyennes.

## II.2. Produits naturels marins et dérivés de synthèse

Le laboratoire travaille depuis plusieurs années sur la recherche de molécules naturelles à activité antifouling extraites d'algues marines. La démarche provient de l'observation du milieu naturel. En effet, certains macro-organismes vont totalement être épiphytés alors que d'autres (éponges, gorgonaires, ...) le sont très peu. Au cours de l'évolution, ces organismes ont développé des capacités de défense empêchant la colonisation de leurs surfaces. Ces aptitudes peuvent être de nature physique (libération de mucus, mue, etc....) et/ou chimique (production de métabolites secondaires) (Raïlkin 2004).

Des produits naturels extraits de deux algues brunes marines, *Bifurcaria bifurcata* et *Dictyota* sp., récoltées respectivement en Bretagne et sur la côte méditerranéenne près de Toulon, ont été testés. De plus, des analogues de synthèse préparés au laboratoire (Praud-Tabaries et al. 2009) ont aussi été testés. Le farnésol est un isolat d'huiles essentielles naturel, extrait de camomille et de palmarosa. Cette molécule a aussi été testée car elle correspond au squelette de base de l'éléganolone, l'éléganeediol (extraits de *B. bifurcata*) et des dérivés de synthèse.

### II.2.1 Activités anti-adhésion

L'éléganolone et l'éléganeediol ainsi que les produits analogues de synthèse du farnésol ont montré des résultats intéressants sur l'inhibition de l'adhésion des souches bactériennes. Ceux-ci sont présentés dans le Tableau 17 et Figure 45.

		TC4	TC5	TC8	4M6	D41
<b>Eleganolone</b>	CE <sub>50</sub> (μM)	> 500	58,4 ± 1,7	427,7 ± 75,0	40,3 ± 13,5	174,0 ± 56,1
	Pente		Moyenne	Moyenne	Moyenne	Moyenne
	R <sup>2</sup>		0,99 ± 0,00	0,77 ± 0,13	0,98 ± 0,02	0,96 ± 0,02
<b>Eleganediol</b>	CE <sub>50</sub> (μM)	> 500	63,5 ± 8,3	482,0 ± 62,4	103,9 ± 12,8	224,0 ± 65,6
	Pente		Faible	Moyenne	Moyenne	Moyenne
	R <sup>2</sup>		0,93 ± 0,07	0,95 ± 0,02	0,96 ± 0,03	0,82 ± 0,05
<b>TFA Z</b>	CE <sub>50</sub> (μM)	79,0 ± 14,9	63,5 ± 5,6	139,0 ± 69,3	71,3 ± 1,7	63,4 ± 19,1
	Pente	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible
	R <sup>2</sup>	0,90 ± 0,1	0,98 ± 0,02	0,90 ± 0,05	0,75 ± 0,14	0,84 ± 0,10
<b>TFA E</b>	CE <sub>50</sub> (μM)	46,1 ± 43,0	64,2 ± 6,6	> 250	56,4 ± 54,2	67,2 ± 5,3
	Pente	Faible	Faible		Faible	Faible
	R <sup>2</sup>	0,86 ± 0,1	0,97 ± 0,02		0,91 ± 0,09	0,89 ± 0,04
<b>Farnesol</b>	CE <sub>50</sub> (μM)			124,6 ± 27,4		248,8 ± 70,7
	Pente			Moyenne		Faible
	R <sup>2</sup>			0,94 ± 0,05		0,83 ± 0,12

Tableau 17 : Effet anti-adhésion des molécules naturelles d'origine marine ou dérivés de synthèse sur les cinq souches de bactéries « pionnières »

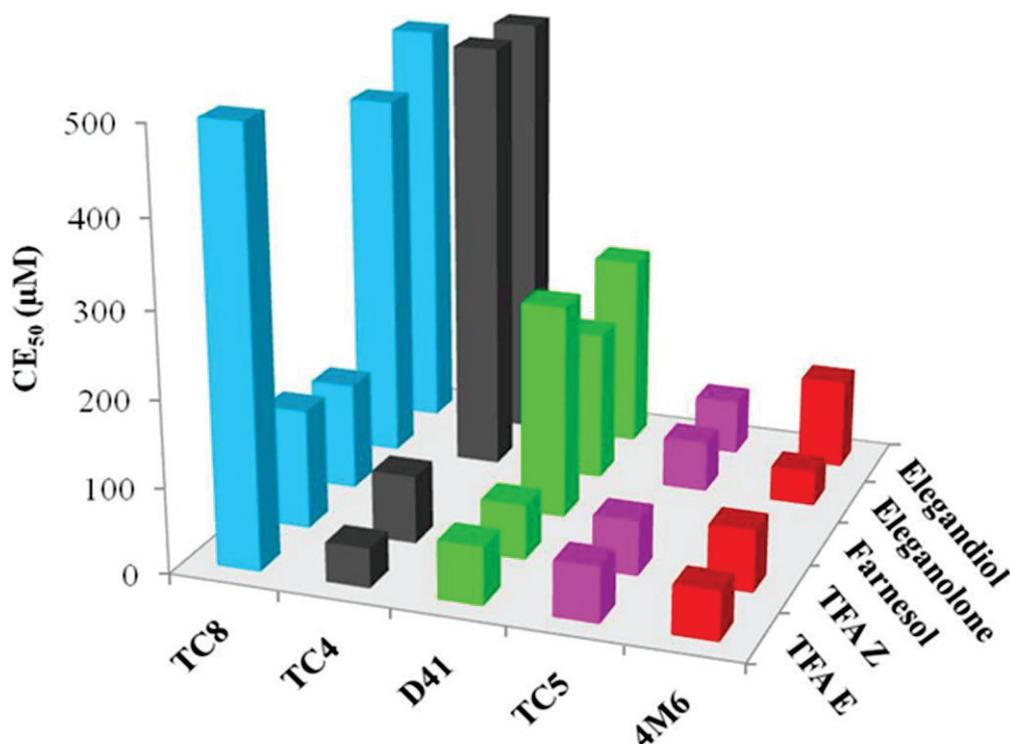


Figure 45 : CE<sub>50</sub> des produits naturels en fonction des cinq souches.

Si l'on regarde l'activité de chaque biocide, le TFA Z montre une bonne activité sur toutes les souches ( $63,4 \pm 19,1 \mu\text{M}$  à  $79,0 \pm 14,9 \mu\text{M}$  sauf pour la TC8, (Tableau 17). La  $\text{CE}_{50}$  de la TC8 semble plus élevée mais le fort écart-type observé ne permet pas de d'affirmer que cette différence est statistiquement significative. Le TFA E possède un profil similaire même si les écarts-types concernant les souches TC4 et 4M6 sont peu satisfaisants. L'éleganolone et l'éleganediol, quant à eux, possèdent une large gamme de  $\text{CE}_{50}$  en fonction de la souche testée ( $\text{CE}_{50}$  entre  $40,3 \pm 13,5 \mu\text{M}$  et  $> 500 \mu\text{M}$ ). Une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre l'activité de ces deux molécules n'a été observée que pour la 4M6. Il ressort clairement que ces 2 molécules agissent essentiellement sur TC5 et 4M6 ( $\text{CE}_{50}$  entre  $40,3 \pm 13,5 \mu\text{M}$  et  $103,9 \pm 12,8 \mu\text{M}$ ). Le farnèsol n'a été testé que sur deux souches sur lesquelles il n'a pas semblé avoir un effet très important. Si l'on s'intéresse aux souches individuellement, les bactéries TC5 et 4M6 sont les plus réactives aux dérivés synthétiques comme aux produits issus de *B. bifurcata*. Inversement, la souche TC4 n'est affectée que par les TFA Z et E (Figure 45). Bien que les souches TC8 et D41 soient toutes les deux des *Pseudoalteromonas*, leur sensibilité est différente. En effet il existe une différence significative entre la souche D41 et la TC8 pour l'éleganolone, ainsi que pour le TFA E (Tableau 18). La TC8 est d'ailleurs significativement différente de toutes les autres souches pour le TFA E.

	TC4 vs TC5	TC4 vs TC8	TC4 vs 4M6	TC4 vs D41	TC5 vs TC8	TC5 vs 4M6	TC5 vs D41	TC8 vs 4M6	TC8 vs D41	4M6 vs D41
Eleganolone	***	NS	***	**	***	NS	*	***	*	***
Eleganediol	***	NS	***	NS	***	NS	***	***	NS	NS
TFA Z	NS									
TFA E	NS	***	NS	NS	***	NS	NS	***	**	NS

→\*\*\* : Extrêmement significatif

\* : Significatif

→\*\* : Très significatif

NS : Pas de différence significative

Tableau 18 : Analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs et post test Bonferroni: interactions entre souches et substances naturelles et de synthèses

Les pentes associées aux courbes dose-réponse rencontrées avec ces molécules sont toutes faibles ou moyennes. Les molécules de synthèse ne présentent que des pentes faibles alors que les produits naturels de *B. bifurcata* ne possèdent que des pentes moyennes sauf la

souche TC5 avec l'éléganediol. Le farnesol quand à lui présente des pentes faibles et moyennes en proportion égale.

Les activités des produits naturels isolés de *Dictyota* sp. sont représentées séparément car, malheureusement, seule une très faible quantité a pu être extraite et ils n'ont pu être expérimentés que sur une seule souche, la D41 (Tableau 19). Le choix de la souche est lié à l'antériorité au laboratoire ainsi qu'à la forte capacité d'adhésion de cette souche. Sur les sept composés testés, trois d'entre eux ont montré une bonne activité (3, 6 et fucoxanthine) alors que le produit 7 a montré une très bonne efficacité anti-adhésion ( $CE_{50}$ = 30  $\mu$ M).

		3	4	6	7	8	9	Fucoxanthine
D41	$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	110	250	100	30	230	330	70
	$R^2$	0,78	0,99	0,99	0,96	0,92	0,84	0,92

Tableau 19 :  $CE_{50}$  des produits naturels isolés de *Dictyota* sp.

### II.2.2. Inhibition de la croissance et viabilité bactérienne

Pour cette étude, seuls l'éléganediol, l'éleganolone ainsi que le TFA Z ont été testés sur les trois mêmes souches utilisées pour les produits commerciaux. Il ressort qu'aucun des produits testés n'a montré d'inhibition de croissance ou de toxicité sur aucune des souches.

On peut donc en conclure que ces produits présentent un intérêt certain de par le fait qu'ils inhibent l'adhésion bactérienne sans montrer un effet toxique sur ces mêmes souches. Pour évaluer l'intérêt global des composés, il faut prendre en compte à la fois leur activité et leur toxicité. Pour cela un index de sélectivité improprement appelé « ratio thérapeutique » par Rittschof et al. (1999) peut être calculé. Celui-ci correspond au rapport entre la  $CL_{50}$  et la  $CE_{50}$  : plus il se rapproche de 1 (ou <1), plus l'activité de la molécule est liée à sa toxicité. Les molécules avec un ratio supérieur à 10 ont un mode d'action plus spécifique (de l'adhésion en ce qui nous concerne) et sans impact sur la viabilité cellulaire.

Afin de pouvoir calculer ce rapport, nous avons considéré que la  $CL_{50}$  des produits naturels qui sont non toxiques est égale à 500  $\mu$ M: Les indices de sélectivité des biocides commerciaux ont également été rapportés comme références dans le Tableau 20

IS	TC5	4M6	D41
TFA Z	8	7	8
Eleganolone	8	12	3
Eleganediol	8	5	2
TBTO	1	0,1	0,4
SN	2	8	0,1

Tableau 20 : Indice de sélectivité (IS) des composés actifs en anti-adhésion

Au vu des données, les biocides commerciaux ont globalement des indices de sélectivité proches de 1 indiquant leur toxicité. On peut noter que la valeur relativement élevée pour le SN sur la 4M6 est liée à une  $CE_{50}$  particulièrement basse ( $0,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ). Seul le TFA Z montre un indice de sélectivité relativement élevé pour toutes les souches, indiquant son réel intérêt. Concernant ceux de l'éléganolone et de l'éléganediol, ils varient en fonction des souches, mais semblent surtout moins bons pour la D41 de par le fait qu'elle possède les  $CE_{50}$  les plus élevées. De plus, la toxicité des composés a été testée sur les trois bactéries qui présentaient une sensibilité aux biocides significativement meilleure que les deux autres (TC4 et TC8). Pour ces deux dernières, à supposer qu'aucune toxicité n'aurait été mise en évidence, l'indice de sélectivité de l'éléganolone et de l'éléganediol aurait donc été encore moins bons.

### II.3.Des molécules aux peintures antifouling

#### *II.3.1. Autofluorescence, fluorescence et effet de bord des peintures*

Une fois que le bio-essai anti-adhésion en microplaque a été mis en place pour des molécules pures, l'objectif a été de le transposer aux criblages de peintures AF. Des études réalisées avec le DAPI ont montré une fluorescence non spécifique élevée sur plusieurs revêtements AF. Les deux hypothèses étaient que les peintures pouvaient soit adsorber le marqueur soit émettre aux mêmes longueurs d'onde que celui-ci. Une évaluation des propriétés autofluorescentes des peintures a donc été entreprise. Une analyse spectrofluorométrique 3D réalisée au laboratoire PROTEE (USTV) par le Dr S. Mounier a permis de démontrer l'absence d'autofluorescence des 6 peintures AF étudiées, en particulier aux longueurs d'onde correspondant à nos différents fluorochromes (annexe III). Cette étude a permis de confirmer que les problèmes liés à l'utilisation du DAPI dans ce cas venaient bien d'une adsorption non spécifique de celui-ci sur les peintures. Il a donc été décidé d'utiliser dans un premier temps le SYTO RED 61.

La souche TC5 a été exclue de cette étude puisqu'elle ne peut pas être marquée avec ce fluorochrome du fait que les SYTO<sup>®</sup> sont utilisés sans étape de perméabilisation cellulaire. Il est possible que la matrice extrapolymerique des biofilms constitués par cette souche empêche le marqueur d'atteindre l'ADN des bactéries. Les souches bactériennes TC8, 4M6 et D41 ont donc été ensemencées dans des microplaques dont le fond avait préalablement été revêtu des peintures AF sélectionnées et le % d'adhésion calculé par rapport à l'adhésion sur les puits témoins (PS).

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas d'effet de bord lié à une mauvaise répartition des bactéries adhérees dans les puits où des peintures, des lectures plus ou moins proches du bord ont été effectuées. Comme le lecteur de microplaque permet de choisir différents modes de lecture, nous avons décidé de comparer l'analyse classiquement utilisé pour le bio-essai à deux autres méthodes. L'analyse classique (a) consiste à exciter et récupérer le signal de fluorescence au centre du puits ( $d=4\text{mm}$ ) (Figure 46 a). Les deux autres méthodes consistent à effectuer 3x3 excitations dans le puits en étant respectivement éloigné du bord de (b) 1mm (Figure 46 b) et de (c) 0,5mm (Figure 46 C). Dans ces deux derniers cas, l'analyse prend beaucoup plus de temps puisque 9 valeurs par puits sont obtenues. Nous avons alors calculé une IF moyenne des neuf valeurs.

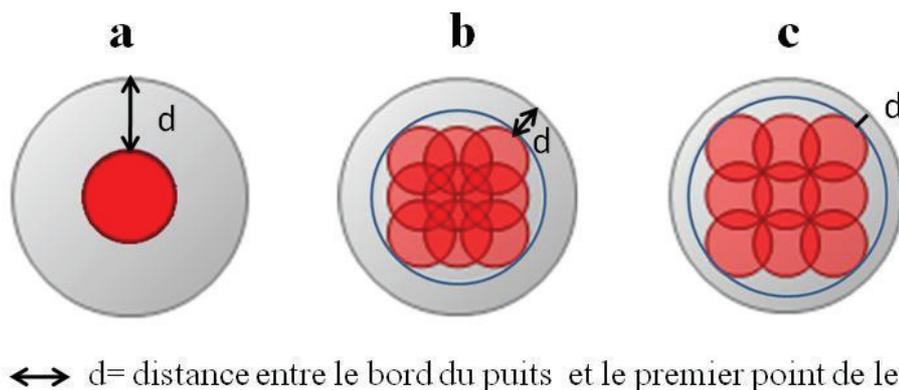


Figure 46: Représentation schématique des trois modes de lectures en fonction de la distance du positionnement du faisceau lumineux à l'intérieur du puits. (a) Excitation au centre du puits (lecture classique). (b) 3x3 excitations en carré à 1 mm du bord du puits. (c) 3x3 excitations en carré à 0,5 mm du bord du puits.

Cette analyse a été effectuée avec deux souches sur les cinq revêtements introduits dans la microplaque (Tableau 21). Au vu des résultats, la valeur absolue de l'IF augmente légèrement entre la méthode a et c, ce qui indique effectivement, comme nous l'avons observé lors des comptages de bactéries sous microscope à épifluorescence (Chapitre IV-I.2), qu'il y a un léger gradient de densité qui augmente vers la périphérie des puits.

Cependant, les ratios IF(b) / IF(a) et IF(c) / IF (a) restent constants, respectivement à  $0,8 \pm 0,1$  et  $0,9 \pm 0,1$  quels que soient les revêtements et quelles que soient les souches. La méthode classique d'analyse semble donc parfaitement convenir à l'étude des revêtements.

		Témoin	A3S	IS360	SL04A	SQT	IT757
<b>4M6</b>	<b>(b)</b> <b>d=0,5mm</b>	$1,4.10^5 \pm 615$	$8,6.10^3 \pm 372$	$5,8.10^3 \pm 33$	$1,1.10^4 \pm 502$	$6,4.10^3 \pm 161$	$2,8.10^4 \pm 7150$
	<b>(c)</b> <b>d=1mm</b>	$1,5.10^4 \pm 641$	$9,2.10^3 \pm 441$	$6,3.10^3 \pm 33$	$1,2.10^4 \pm 591$	$6,9.10^3 \pm 170$	$3,0.10^4 \pm 7203$
	<b>(a)</b> <b>d=4mm</b>	$1,8.10^4 \pm 718$	$1,1.10^4 \pm 551$	$7,2.10^3 \pm 105$	$1,3.10^4 \pm 378$	$8,8.10^3 \pm 170$	$3,6.10^4 \pm 4410$
<b>TC8</b>	<b>(b)</b> <b>d=0,5mm</b>	$7,9.10^3 \pm 481$	$4,6.10^3 \pm 471$	$2,9.10^3 \pm 43$	$6,3.10^3 \pm 496$	$3,0.10^3 \pm 60$	$3,0.10^4 \pm 5335$
	<b>(c)</b> <b>d=1mm</b>	$7,8.10^3 \pm 337$	$5,3.10^3 \pm 645$	$3,2.10^3 \pm 50$	$7,3.10^3 \pm 667$	$3,3.10^3 \pm 79$	$3,4.10^4 \pm 3700$
	<b>(a)</b> <b>d=4mm</b>	$8,6.10^3 \pm 278$	$6,2.10^3 \pm 283$	$3,4.10^3 \pm 69$	$8,0.10^3 \pm 105$	$3,6.10^3 \pm 125$	$3,3.10^4 \pm 8282$

Tableau 21 : IF moyenne pour les 3 différents modes de lecture sur les souches 4M6 et TC8 pour 5 peintures AF et le témoin (PS)

### II.3.2. Efficacité anti adhésion des revêtements sur trois souches marines

A3S, IS360, SL04A et SQT ont montré une très forte inhibition des biofilms pour toutes les souches ( $<24,6 \pm 12,3$  %, Tableau 22, Figure 47). IS360 semble la plus efficace, notamment sur la TC8 et la 4M6 (respectivement  $0,7 \pm 0,8$  % et  $0,1 \pm 1,2$  %). Le revêtement SL04A est légèrement moins efficace que les 3 autres (de  $24,6 \pm 12,3$  % à  $15,3 \pm 2,1$  %). Si l'on s'intéresse à la sensibilité des souches, l'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) a montré qu'il n'y a pas de différences significatives entre les souches bactériennes ( $p > 0,05$ ). Par contre, des différences extrêmement significatives sont observées entre les revêtements pour toutes les souches ( $p < 0,001$ ) (Figure 47).

Aucune valeur n'a pu être obtenue pour NEX et IT757 car ceux-ci adsorbent le SYTO<sup>®</sup> RED 61 empêchant ainsi toute interprétation des résultats. Pour pallier à ce problème, le SYTO<sup>®</sup> 13 a été utilisé. IT757 n'a pas semblé interagir avec ce marqueur, ce qui a permis de déterminer que cette peinture est un revêtement peu efficace dans le cadre de notre bio-essai. On peut même considérer qu'il semble favoriser l'adhésion des bactéries dans le cadre de notre bio-essai (Tableau 22). Malheureusement le même phénomène d'adsorption aspécifique est apparu pour NEX empêchant toute évaluation de son efficacité sur nos bactéries en microplaque.

% d'adhésion	TC8	4M6	D41
IS360	0,7 ± 0,8	0,1 ± 1,2	4,0 ± 3
A3S	6,8 ± 1,8	14,2 ± 1,2	3,0 ± 3
SQT	2,5 ± 5,5	19,2 ± 13,7	12,2 ± 7,3
SL04A	24,6 ± 12,3	15,3 ± 2,1	16,0 ± 4,0
IT757	1032,0 ± 188,4	155,0 ± 77,6	861,0 ± 46,8

Tableau 22 : Inhibition de l'adhésion de trois souches bactériennes par les cinq peintures AF interprétables en microplaque (n=2)

(IS360, A3S, SQT et SL04A = SYTO<sup>®</sup> RED 61, IT757 = SYTO<sup>®</sup> 13)

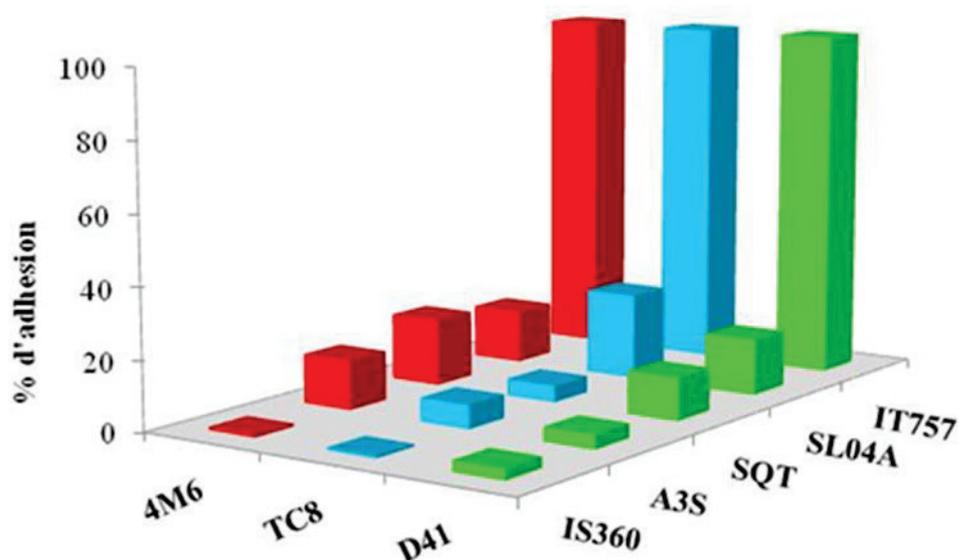


Figure 47 : Effet des peintures AF sur l'adhésion des trois souches en microplaque

### II.3.3. Corrélation entre l'adhésion bactérienne et l'angle de contact des revêtements

Afin de vérifier s'il existe une relation entre l'énergie de surface des peintures et l'adhésion *in vitro*, l'hydrophobicité des peintures avant immersion a été mesurée à travers l'angle contact. Le résultat est donné par le Tableau 23.

REVETEMENTS	ANGLE DE CONTACT ( $\theta$ )
A3S	83,3 $\pm$ 0,9
NEX	78,5 $\pm$ 1,6
SQT	90,9 $\pm$ 0,8
IS360	88,2 $\pm$ 1,2
SL04A	81,9 $\pm$ 1,8
IT757	99,6 $\pm$ 2,0

Tableau 23: Angle de contact des peintures AF.

Tous les revêtements utilisés possèdent des angles de contact situés entre 78,5  $\pm$  1,6 et 99,6  $\pm$  2,0° indiquant qu'ils sont tous hydrophobes. Il est clair que plus les peintures s'érodent plus elles deviennent hydrophiles.

Afin de voir si l'hydrophobicité des supports influence l'adhésion bactérienne *in vitro*, la corrélation a été calculée entre les valeurs de l'angle de contact et l'adhésion obtenue sur les revêtements en laboratoire. Même si les coefficients de détermination sont bons, les droites ne sont pas significativement différentes de zéro ( $p > 0,05$ ) indiquant qu'il n'y a probablement pas de relation entre ces deux facteurs (Tableau 24). En effet, comme toutes les peintures présentent des activités très fortes pour les trois souches excepté IT757, les corrélations ne sont tenues que par un point. Ce type de comparaison nécessiterait un plus grand nombre de points présentant des efficacités intermédiaires.

Bactéries		TC8	4M6	D41
Angle	R <sup>2</sup>	0,72	0,73	0,73
de	p	>0,05	>0,05	>0,05
contact	n	5	5	5

Tableau 24: Corrélation entre l'énergie de surface des peintures et l'adhésion bactérienne *in vitro* souche par souche.

### III. Résultats préliminaires du développement d'un bio-essai anti-adhésion plurispécifique

Dans le but de complexifier le bio-essai et donc de mieux représenter la complexité du milieu naturel, des biofilms mixtes en microplaques ont été formés. Pour cela, les souches ont été croisées deux à deux afin de déterminer le type de relation qu'il pouvait y avoir entre elles. Une méthodologie de marquage des quatre bactéries choisies avec des

fluorochromes différents a été mise en place pour pouvoir les quantifier individuellement au sein des biofilms mixtes. Pour cela les bactéries ont été marquées avant l'ensemencement dans les microplaques. Cette technique a permis d'étudier séparément le comportement de deux souches ensemencées dans le même puits. Par la suite, la réponse de ces biofilms mixtes à quelques biocides modèles a été évaluée.

### III.1. Choix des marqueurs fluorescents pour les quatre souches sélectionnées

Pour cette étude, la TC4 a été exclue car elle est peu sensible et qu'elle présente une faible reproductibilité en termes d'adhésion en microplaque (Chapitre II-I.3). Toutes les autres souches ont été testées en « pré-marquage » avec trois fluorochromes différents (DAPI, SYTO<sup>®</sup>13 et SYTO<sup>®</sup>RED 61, Figure 48). Les SYTO ont été testés à 2  $\mu$ M alors que le DAPI nécessitait une concentration beaucoup plus élevée de 25  $\mu$ M étant donné qu'il n'y avait pas d'étape de perméabilisation comme pour le post-marquage.

Au vu des résultats, les souches semblent pouvoir être marquées avec plusieurs fluorochromes. Mais il est clairement apparu que pour la 4M6 le fluorochrome le plus approprié est le SYTO<sup>®</sup>RED 61, tout comme le DAPI l'est pour la D41. La TC5 présente de bonnes intensités de fluorescence pour le SYTO<sup>®</sup>13 ainsi que pour le SYTO<sup>®</sup>RED 61. Le DAPI ne semble pas conserver une relation proportionnelle entre les IF et la DO. La TC8, quant à elle, peut être marquée avec le SYTO<sup>®</sup>13 ainsi qu'avec le DAPI. Mais le marquage effectué avec le SYTO<sup>®</sup>13 montre une meilleure proportionnalité avec la densité d'ensemencement, indiquant probablement une meilleure pénétration de ce fluorochrome dans la bactérie. A partir de ces observations, les marqueurs choisis pour les six couples sont : TC5 / TC8 (SYTO<sup>®</sup>RED 61 / SYTO<sup>®</sup>13), TC5 / D41 (SYTO<sup>®</sup>13 / DAPI), TC5 / 4M6 (SYTO<sup>®</sup>13 / SYTO<sup>®</sup>RED 61), TC8 / D41 (SYTO<sup>®</sup>13 / DAPI), TC8 / 4M6 (SYTO<sup>®</sup>13 / SYTO<sup>®</sup>RED 61) et D41 / 4M6 (DAPI / SYTO<sup>®</sup>RED 61).

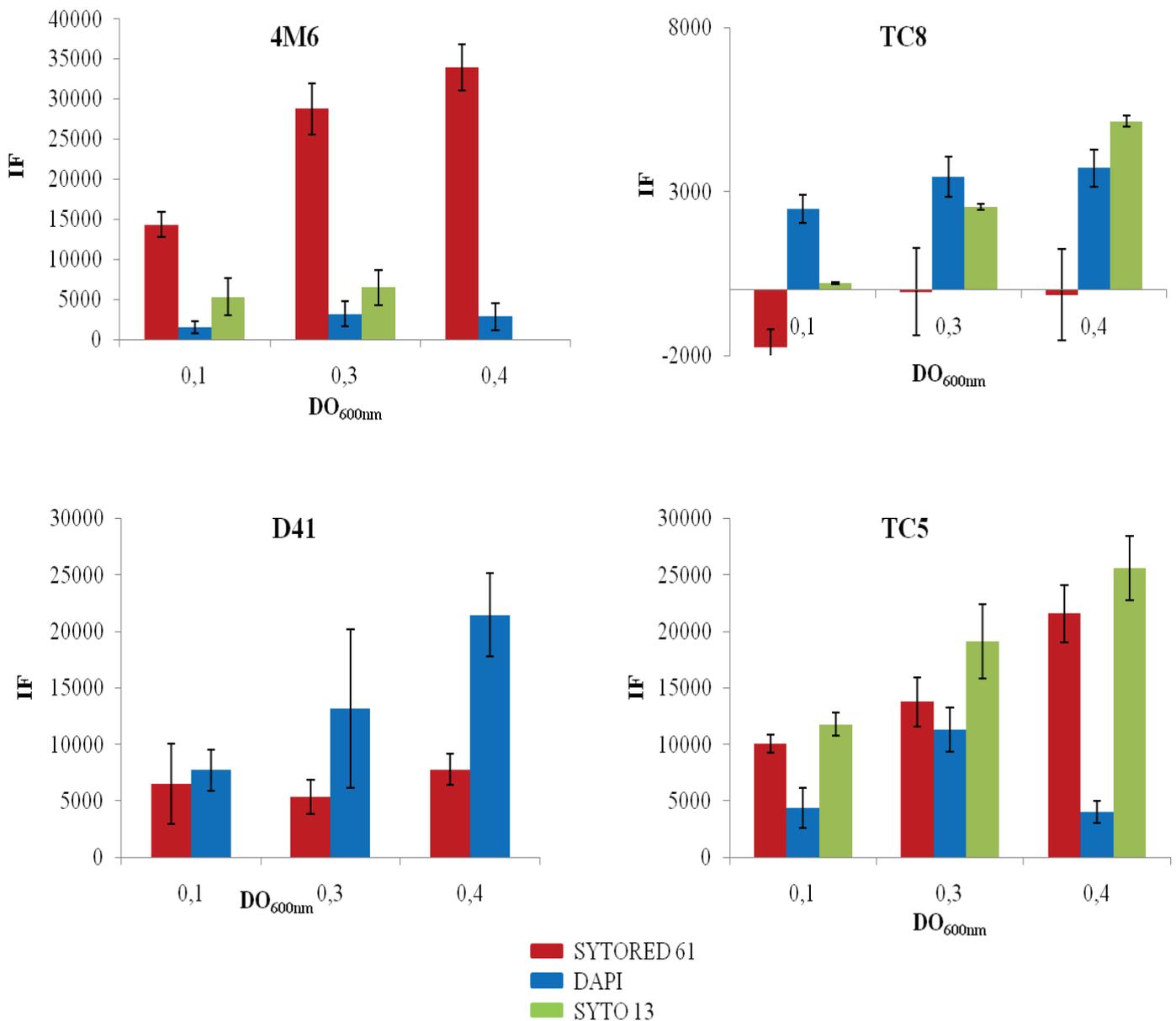


Figure 48: IF des bactéries « pré-marquées » dans les microplaques pour chacune des quatre souches (4M6, D41, TC8 et TC5) avec trois fluorochromes (DAPI, SYTO 13 et SYTO RED 61) et à trois densités d'ensemencement (DO<sub>600nm</sub>).

### III.1.1. Vérification de l'absence d'effet du pré-marquage

#### III.1.1.1. Sur l'adhésion en microplaque

Afin de voir si le marquage avant l'ensemencement des bactéries ne perturbait pas l'adhésion des bactéries, les souches « pré-marquées » ont été ensemencées à différentes densités en microplaque. Une régression linéaire entre les densités d'ensemencement et les IF a toujours été observée, comme lorsqu'on procédait au « post marquage » (Figure 49).

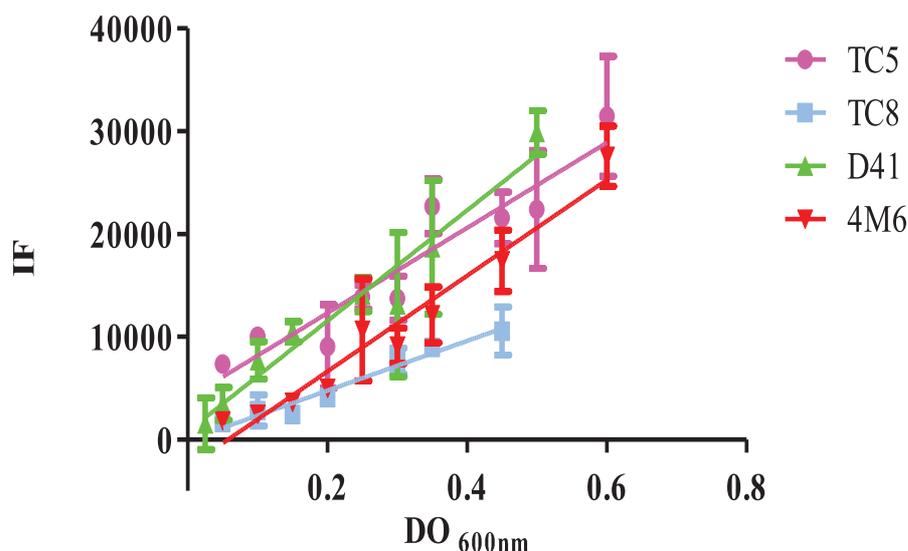


Figure 49: Corrélation entre l'adhésion bactérienne (IF) et la densité de bactéries « pré-marquées » introduites dans les puits

Lors des bio-essais en « post-marquage », le plateau de saturation a été obtenu à des  $DO_{600nm}$  proches de 0,4. Or dans cette étude aucune saturation n'est apparue pour aucune des souches à 0,6 pour une raison difficilement explicable en l'état. Une comparaison avec les régressions linéaires obtenues lors du post-marquage a été effectuée (Tableau 25). Pour cela un ratio entre les pentes en pré-marquage et en post-marquage a été calculé. Il montre que les pentes de la TC5 et de la TC8 sont plus fortes en pré-marquage, même si la différence pour cette dernière est moindre. Cela semble indiquer que la TC5 est la souche la plus perturbée par cette méthode de marquage bien que le coefficient de détermination reste très bon ( $R^2=0,92$ ;  $p=0,0002$ ).

	TC5	TC8	D41	4M6
<b>R<sup>2</sup></b>	0,92	0,96	0,95	0,96
<b>p (&lt;0,05)</b>	0,0002	0,0001	0,0001	0,0001
<b>Ratio (témoin/blanc)</b>	2,1	4,8	8,7	1,7
<b>Pente de la droite du pré marquage (1)</b>	$3,8 \cdot 10^4 \pm 4909$	$2,4 \cdot 10^4 \pm 2121$	$5,3 \cdot 10^4 \pm 4121$	$4,6 \cdot 10^4 \pm 3755$
<b>Pente de la droite du post marquage (2)</b>	$1,2 \cdot 10^5 \pm 10460$	$3,9 \cdot 10^4 \pm 2657$	$4,9 \cdot 10^4 \pm 6666$	$5,1 \cdot 10^4 \pm 5716$
<b>Ratio (2)/ (1)</b>	3,2	1,6	0,9	1,1

Tableau 25 Corrélation entre l'adhésion bactérienne et la densité de bactéries « pré-marquées » introduite dans les puits

A partir de ces données, nous avons choisi de travailler à des densités optiques de 0,3-0,4 nous permettant de comparer plus facilement les résultats du post- et du pré- marquage, et de voir ainsi les perturbations liées au marquage en lui-même. De plus, lors du pré-marquage, le ratio obtenu entre les témoins d'adhésion et les blancs (avec marqueur) est rarement supérieur à 2 pour les gammes seules (Tableau 25), ce qui indique que l'adhésion est perturbée.

### III.1.1.2. Sur la sensibilité des souches.

Afin de s'assurer que la perturbation observée lors de cette étude n'était pas trop importante, la  $CE_{50}$  du TBTO a été déterminée en pré-marquage pour chaque souche (Tableau 26 et Figure 50)

	TC5	TC8	4M6	D41
<b>Nombre d'essai</b>	1	2	3	3
<b>CE<sub>50</sub> (μM)</b>	>50	5,8 ± 2,9	23,2 ± 6,7	3,5 ± 1,8
<b>TBTO</b>		Moyenne	Faible	Moyenne
<b>Pente</b>				
<b>R<sup>2</sup></b>		0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
<b>Ratio</b> (Témoins/Blancs)	2,0	9,3 ± 8,1	2,4 ± 1,7	3,0 ± 1,6

Tableau 26 : Effet du TBTO sur l'adhésion des souches pré-marquées

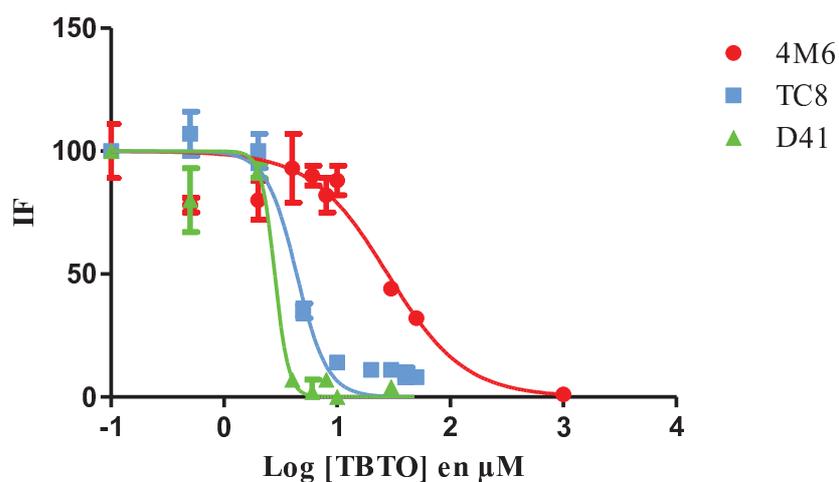


Figure 50: Courbes dose-réponse de l'effet du TBTO sur les souches pré-marquées

Au vu des résultats, des différences de sensibilité entre les souches sont clairement apparues, ce qui n'était pas le cas lors des « post marquages ». En effet, l'ANOVA à un facteur a montré que ces différences sont extrêmement significatives ( $p > 0,001$ ). La souche TC5 présente la plus forte résistance au TBTO mais le ratio témoin bactérien/blanc plaque est faible. Il est donc difficile de tirer une réelle conclusion pour cette souche puisque l'expérience n'a été réalisée qu'une fois. D'après le post test de Bonferroni, il ressort que la TC5 est significativement différente des deux *Pseudoalteromonas* sp. ( $p < 0,05$ ) mais pas de la 4M6. La valeur de  $CE_{50}$  de cette dernière n'est pas significativement différente de celle obtenue lors du post-marquage ( $23,2 \pm 6,7$  au lieu de  $15,4 \pm 7,5 \mu\text{M}$ ). De la même manière, les deux *Pseudoalteromonas* sp. ne montre pas de différence significative avec les valeurs en post-marquage (t test,  $p > 0,05$ ).

### **III.2. Réalisation de « biofilms » mixtes en microplaques et mise en évidence d'interaction potentielle entre les souches utilisées.**

Les souches ont étéensemencées deux par deux et pré-marquées comme précédemment décrit à différentes densités. Dans chacune des microplaques, les deux souches pré-marquées ont également étéensemencées séparément aux mêmes densités, afin de servir de références d'adhésion. La détection a ensuite été réalisée pour les deux fluorochromes successivement. Un grand nombre de paramètres vont jouer sur l'adhésion bactérienne, y compris la production de molécules par les bactéries elles-mêmes. Ces substances permettent aux bactéries de communiquer entre elles. Dans le milieu naturel, les bactéries préfèrent vivre en biofilms plurispécifiques afin que chacune d'entre elles puissent tirer des avantages de cette proximité (synergie). Mais il est également possible que certaines bactéries qui sont en compétition pour l'espace et/ou la nourriture inhibent la croissance des autres espèces. Une des espèces colonisera majoritairement le milieu au détriment des autres, on parle alors de relation d'antagonisme. Enfin il est possible que plusieurs espèces bactériennes puissent vivre « côte à côte » sans qu'il y ait la moindre interaction entre elles, on parle alors de neutralisme (Dobrestov et al. 2001, Burmolle et al. 2006, Rao et al. 2006).

Afin de déterminer quel type de relation il peut exister entre nos souches, six « biofilms » mixtes ont été développés en microplaques. Pour chaque courbe, le ratio témoins bactériens sur blancs de la plaque a bien sûr été déterminé. Cependant, il faut noter qu'il ne correspond pas exactement à la même chose qu'en post-marquage puisqu'il n'y a pas de fluorochrome dans les blancs dans ce cas. On peut donc s'attendre à ce que sa valeur soit plus élevée globalement.

### III.2.1. Le couple TC5/4M6

Lors de l'association de la TC5 avec la 4M6, il est clairement apparu que l'adhésion de la bactérie TC5 augmente sensiblement en présence de la souche 4M6 (Figure 51, Tableau 27). En effet l'inclinaison de la pente de TC5 est 10 fois plus importante lorsqu'elle est couplée à la 4M6. Alors que pour cette dernière, c'est le phénomène inverse qui s'est produit. Elle semble mieux adhérer seule, l'inclinaison de la pente diminue de moitié lorsqu'elle est en présence de TC5. Les ratios obtenus pour ces souches sont corrects, en particulier pour la TC5 ou il est extrêmement élevé. Lors de cette étude, toutes les régressions linéaires obtenues sont significativement différentes de 0 ( $p < 0,05$ ). Il semble donc y avoir un effet d'antagonisme qui profite à la TC5 au détriment de la 4M6.

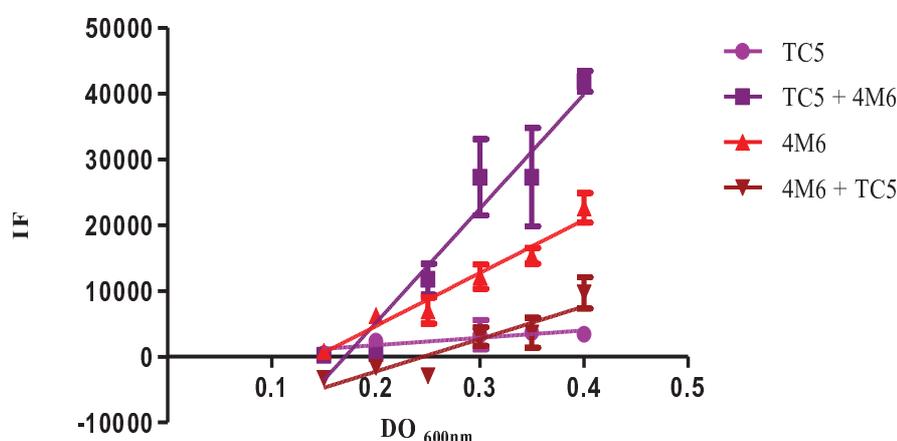


Figure 51 : Corrélation entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC5 et 4M6 seules ou en co-culture

	TC5	TC5 (avec 4M6)	4M6	4M6 (avec TC5)
<b>Pente</b>	11210 ± 3446	173700 ± 21660	80740 ± 8016	49430 ± 10380
<b>Ratio Témoins/Blancs</b>	4,2	33,9	2,7	1,9
<b>R<sup>2</sup></b>	0,78	0,94	0,96	0,85

Tableau 27 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries TC5 et 4M6 seules ou en co-culture

### III.2.2. Le couple TC5/TC8

En ce qui concerne le couple TC5/TC8, de nouveau la densité bactérienne dans le puits est supérieure pour la TC5 lorsqu'elle est associée à la TC8. Cependant cette augmentation semble deux fois moindre que celle obtenue avec la 4M6. Le ratio de la TC5

seule est assez faible (1,4) indiquant une mauvaise adhésion. En ce qui concerne la TC8, l'adhésion est meilleure en couple que seule, mais là aussi des problèmes d'adhésion importants sont à noter. Le ratio pour la TC8 seule est tout juste supérieur à 1 indiquant qu'il n'y a pas eu de véritable adhésion. Lorsqu'elle est associée à la TC5 ce ratio augmente légèrement (1,3). De plus la régression linéaire de la TC8 n'était pas significativement différente de 0 ( $p>0,05$ ). Il est donc difficile de tirer des conclusions concernant cette souche. La seule chose qui semble apparaître pour ces données, c'est que la TC8 a bien eu un effet favorisant la TC5 (Figure 52 et Tableau 28).

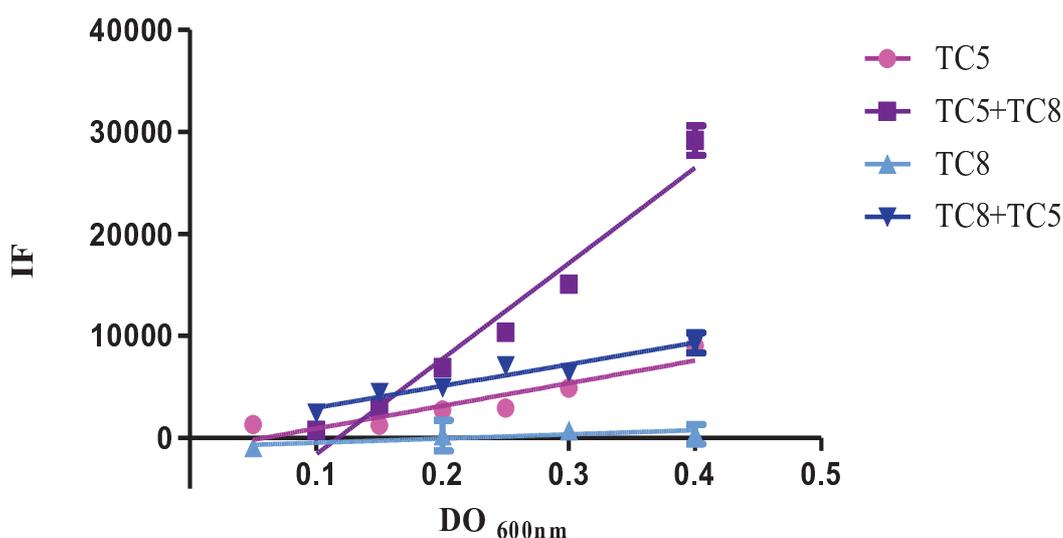


Figure 52: Corrélation entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC5 et TC8 seules ou en co-culture

	TC5	TC5 (avecTC8)	TC8	TC8 (avec TC5)
<b>Pente</b>	22180 ± 4947	93690 ± 9710	4102 ± 1824	21210 ± 2943
<b>Ratio</b>	1,4	3,3	1,1	1,3
<b>R<sup>2</sup></b>	0,83	0,96	0,72	0,93

Tableau 28: Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries TC5 et TC8 seules ou en co-culture

### III.2.3. Le couple TC5/D41

Une fois de plus, la souche TC5 a montré une densité bactérienne plus importante lorsqu'elle est associée à la D41 que seule. La différence entre les deux inclinaisons de pente est inférieure à 2, indiquant que l'avantage provoqué par la présence de la D41 est moindre que celui trouvé avec les deux autres souches. La D41 est donc la souche qui

semble avoir l'effet bénéfique le moins fort sur l'adhésion de la TC5. En ce qui concerne la D41, une légère augmentation a pu être observée lors de son association avec la TC5, mais celle-ci semble trop faible pour indiquer un réel effet de la co-adhésion (Figure 53, Tableau 29). Les interactions entre ces deux souches s'avèrent être plus proches du neutralisme que de la synergie. Mais les ratios obtenus pour la souche D41 étaient faibles en particulier lorsqu'elle a été ensemencée seule, d'où la difficulté de voir réellement l'effet causé par la TC5 sur cette souche si effet il y a. Ceux obtenus pour la TC5 par contre sont plus que satisfaisants.

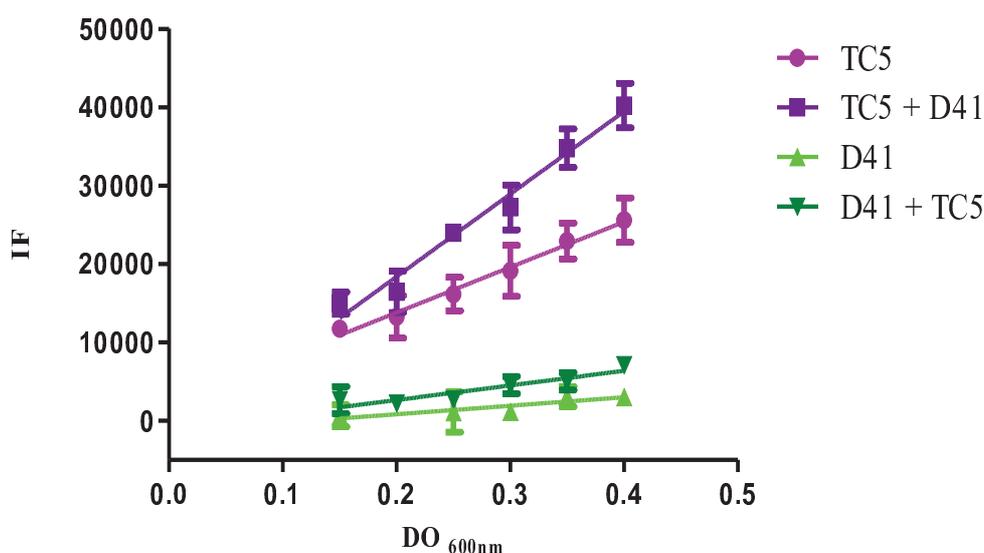


Figure 53: Corrélation entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC5 et D41 seules ou en co-culture

	TC5	TC5 (avecD41)	D41	D41 (avec TC5)
<b>Pente</b>	57840± 3201	105300 ± 7975	10770 ± 3259	18650 ± 3818
<b>Ratio</b>	8,1	12,4	1,4	2,0
<b>R<sup>2</sup></b>	0,99	0,98	0,78	0,86

Tableau 29 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries TC5 et D41 seules ou en co-culture

### III.2.4. Le couple D41/ TC8

Lorsque les deux *Pseudoalteromonas* ont été couplées, il est apparu un effet d'antagonisme particulièrement marqué pour la TC8 (Figure 54, Tableau 30). En effet la régression linéaire montre que la densité bactérienne est 3 fois moins importante pour la TC8

lorsqu'elle était associée à la D41. De plus, les ratios obtenus pour cette souche sont satisfaisants. La faible diminution de D41 survenue lors du mélange avec la TC8, indique une relation proche du neutralisme. Les ratios sont supérieurs à 2, montrant que l'adhésion s'est correctement produite pour les deux souches.

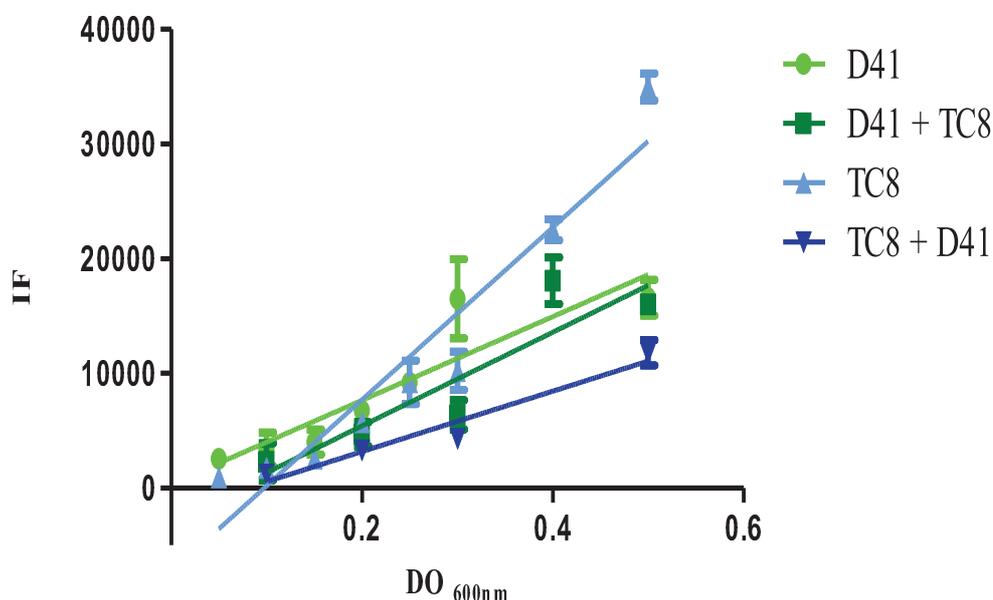


Figure 54: Corrélation entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries D41 et TC8 seules ou en co-culture

	D41	D41 (avec TC8)	TC8	TC8 (avec D41)
<b>Pente</b>	36490 ± 7320	40830 ± 10660	75130 ± 9127	26300 ± 4288
<b>Ratio</b>	3,1	3,0	5,3	2,4
<b>R<sup>2</sup></b>	0,83	0,83	0,82	0,95

Tableau 30 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries D41 et TC8 seules ou en co-culture

### III.2.5. Le couple D41/ 4M6

La D41 montre une légère augmentation de densité dans le puits lorsqu'elle est en présence de 4M6. Il est à noter que la D41 influence grandement l'adhésion de la 4M6 en favorisant sa fixation. Un facteur de 3,5 entre la courbe de la 4M6 seule et celle obtenue pour le couple est observé. Il s'avère donc que la D41 possède un effet de synergique pour la 4M6. Malheureusement les ratios d'adhésion pour la souche 4M6 sont relativement

faibles, par conséquent les interprétations sont à prendre avec précaution (Figure 55, Tableau 31).

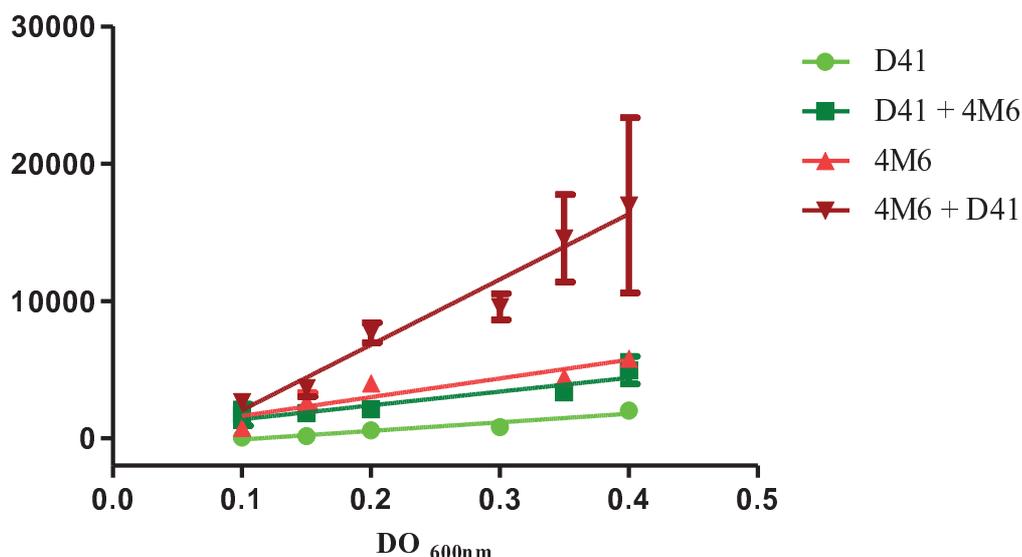


Figure 55 : Corrélation entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries D41 et 4M6 seules ou en co-culture

	D41	D41+4M6	4M6	4M6+D41
<b>Pente</b>	6256 ± 1079	10050 ± 1958	13640 ± 3351	47660 ± 4804
<b>Ratio</b>	5	10	1,3	1,8
<b>R<sup>2</sup></b>	0,92	0,90	0,85	0,96

Tableau 31: Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries D41 et 4M6 seules ou en co-culture

### III.2.6. Le couple 4M6/ TC8

L'adhésion de la TC8 est favorisée par la présence de la 4M6. En effet un facteur de 4 est trouvé entre les deux droites de régression montrant une influence positive forte de la 4M6 sur la TC8 (Figure 56). De plus, le rapport signal bruit pour ces deux courbes et les témoins bactériens sont corrects. (Tableau 32). La bactérie 4M6, quant à elle, a réagi de manière plus surprenante. En effet, une plus forte adhésion en présence de TC8 a d'abord été observée aux faibles densités d'ensemencement. Mais lorsque cette densité dépasse 0,3, l'IF chute, indiquant une diminution de l'adhésion de la 4M6. Il est possible que la TC8 émette une substance active bloquant l'adhésion de la 4M6 et lui permettant

d'occuper tout le puits. Mais là encore les ratios entre témoins d'adhésion et blancs étaient faibles pour la 4M6, ce qui peut fausser l'interprétation des résultats.

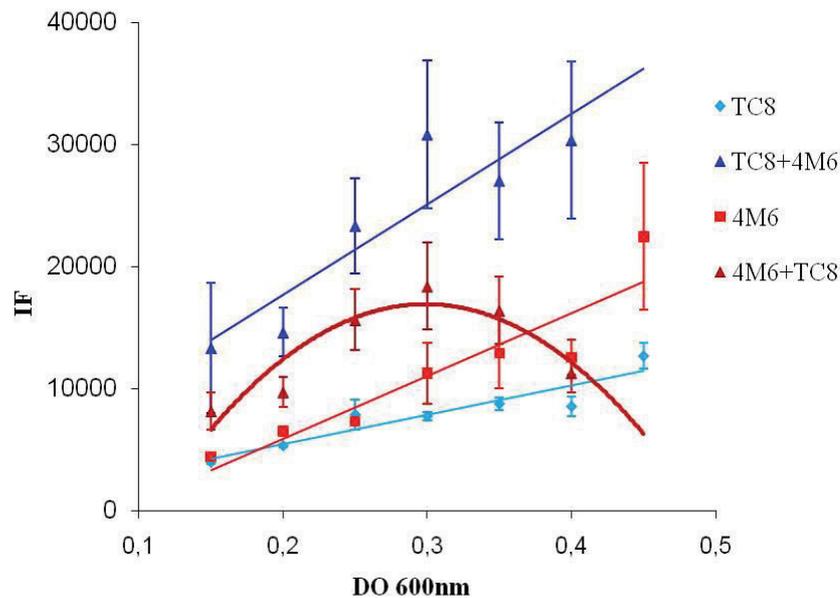


Figure 56 : Corrélation entre la densité d'ensemencement et l'IF pour les bactéries TC8 et

	4M6	4M6 (avecTC8)	TC8	TC8 (avec 4M6)
<b>Pente</b>	36500 ± 15142	73160 ± 2609	18900± 4277	74180 ± 17580
<b>Ratio</b>	1,8	1,7	9,6	31,7
<b>R<sup>2</sup></b>	0,92	-	0,83	0,82

4M6 seules ou en co-culture

Tableau 32 : Caractéristiques de la régression linéaire pour les bactéries 4M6 et TC8 seules ou en co-culture et le blanc de la microplaque

Comme l'effet antagoniste de la TC8 sur la 4M6 était élevé, ce couple a été exclu de la suite des expériences. Cependant, il serait très intéressant d'étudier plus en détail cette interaction.

En résumé, pour les six couples observés, il résulte que l'adhésion de la *Polaribacter* sp (TC5) semble augmenter à chaque fois qu'elle est couplée à une autre bactérie. En ce qui concerne les autres souches, des différences sont apparues en fonction des appariements réalisés. La densité du biofilm de D41 n'a été modifiée de manière positive que par la présence du *Paracoccus* (4M6). La souche TC8 est la souche qui présente le plus de variabilité. En effet, elle est inhibée par la D41, mais semble inhiber l'adhésion de la 4M6.

La 4M6, quant à elle, a été inhibée par deux des souches (TC5 et TC8) alors qu'elle a été stimulée par la présence de la D41.

A l'égard du rapport signal bruit (adhésion bactérienne /autofluorescence de la plaque), le ratio était souvent correct pour une souche mais rarement pour les deux. Pour la 4M6, il a rarement atteint la valeur de 2, indiquant peut être que cette souche était plus sensible au « pré-marquage » que déterminé lors des tests préliminaires. Cela ne semble pas illogique étant donné qu'elle a montré une plus forte sensibilité aux biocides en général lors des bio-essais mono-spécifiques.

### III.3. Activité anti-adhésion du TBTO sur des biofilms plurispécifiques en microplaque

Afin de déterminer si la sensibilité d'un biofilm mixte est comparable au biofilm mono-spécifique, des bio-essais anti-adhésion en présence de biocide modèle ont été réalisés. Nous avons choisi des biocides dont l'activité était déjà connue sur des « biofilms » mono-spécifiques quantifiés par « post-marquage ». Le TBTO ainsi qu'un des produits naturels, l'éléganediol qui lui aussi avait montré une bonne activité sur le bio-essai mono-spécifique, ont été choisis. Ces 2 biocides ont été testés sur tous les couples exceptés sur TC8/4M6 pour la raison décrite précédemment. Les résultats sont présentés dans le Tableau 33.

		D41+4M6		D41+TC5		D41+TC8		TC5+TC8		TC5+4M6	
TBTO	CE <sub>50</sub> (μM)	>200	>200	>200	N.E	10,5	2,3	N.E	0,5	N.E	N.E
	R <sup>2</sup>					0,73	0,88		0,98		
	Ratio	4,6	5,6	3,2	1,2	1,5	3,8	1	7	1	1
Eleganediol	CE <sub>50</sub> (μM)	42,0	6,0	>200	N.E	6,9	136,9	N.E	>200	N.E	N.E
	R <sup>2</sup>	0,9	0,9			0,94	0,85				
	Ratio	4,6	5,6	3,2	1,2	1,5	3,8	1	7	1	1

N.E : Données Non Exploitable à cause d'un ratio trop faible

Tableau 33 : CE<sub>50</sub> des tests anti-adhésion en « biofilms » mixtes avec le TBTO et l'éléganediol

Dans très peu de cas les souches ont présenté un bon ratio en même temps. De plus, lors de la révélation, il est apparu que le fait d'effectuer un ou plusieurs lavages pouvait grandement modifier la réponse du bio-essai. Le problème est que cette perturbation n'apparaît pas toujours de manière identique. En effet il est possible de rencontrer des CE<sub>50</sub>

plus faibles avec un seul lavage que celles acquises après deux. Ici seules les valeurs obtenues après un lavage ont été prises en compte. De plus, les essais n'ont été réalisés qu'une seule fois ne permettant pas de considérer ces valeurs comme représentatives de l'efficacité des biocides.

Les  $CE_{50}$  pour le TBTO sont comprises entre 0,5 et 200  $\mu$ M. Dans les deux cas où le ratio est  $\geq 1,5$  (D41 couplée à 4M6 et D41 associée à TC8), nous avons constaté que les souches D41, 4M6 et TC8 possèdent des  $CE_{50}$  beaucoup plus élevées que celles observées lors du bio-essai mono-spécifique. Cela pourrait indiquer que le fait d'être couplée à une autre espèce augmenterait leur résistance à ce biocide.

Au sujet de la bactérie TC5, il n'a jamais été possible de déterminer une valeur de  $CE_{50}$  vu les faibles ratios obtenus. Cela est également vrai pour la  $CE_{50}$  de la 4M6 couplée à la TC5. Les  $CE_{50}$  déterminées pour l'éléganediol pour D41 associé à 4M6, ainsi que pour la D41 couplé avec la TC8 sont plutôt faibles comparées aux valeurs obtenues avec les bio-essais mono-spécifiques pour les trois souches. Mais lorsque la D41 est couplée à la TC5, elle est plus résistante que lorsqu'elle est seule. Il semble donc que la sensibilité aux biocides de certaines souches évolue en fonction de la bactérie à laquelle elle est associée.

#### **IV. Discussion et conclusions sur les bio-essais**

Le but de cette étude était de développer des bio-essais anti-adhésion mono- et plurispécifiques en microplaque. En outre, avant de considérer ces molécules comme potentiellement intéressantes pour être exploitées, leur toxicité sur les bactéries a été déterminée. Une étude directe sur la peinture a aussi été réalisée dans le but de valider le bio-essai en le comparant par la suite, à des analyses obtenues *in situ* (cf Chapitre V).

##### **IV.1. Limite des bio-essais anti-adhésion mono- et plurispécifique**

###### ***IV.1.1 Bio-essai mono-spécifique***

Lors de la mise en place du test, il est apparu que certaines molécules ne pouvaient pas être testées. En effet, l'absence de solubilité dans des solvants (et à des concentrations) compatible avec les cultures bactériennes mais aussi la stabilité des produits est un paramètre important dans le résultat des bio-essais. En plus, certains marqueurs fluorescents se fixaient de manière aspécifique aux molécules ou aux revêtements, empêchant ainsi de voir leurs effets. Le problème de solubilité peut être résolu par la méthode du « coating ». Non seulement, cela permet d'être certain de la quantité de produit introduite dans le puits, mais également de se placer en condition réelle de diffusion du biocide. En effet par cette méthode, la bactérie doit tenter d'adhérer au contact du biocide, se rapprochant ainsi d'un

mécanisme d'interaction de surface dans le cas où les substances actives des peintures ne sont pas relarguées.

Afin de voir si les deux méthodologies donnent des résultats semblables, la  $CE_{50}$  du TBTO ainsi que celle de l'éleganolone ont été évaluées par les deux analyses sur une seule souche, la D41. Il faut noter que les  $CE_{50}$  sont plus faibles pour les deux biocides par la méthode d'évaporation (Figure 57). Cependant une différence très significative ( $p < 0,01$ , T test) apparaît pour le TBTO, alors qu'aucune différence significative n'apparaît pour l'éleganediol ( $p > 0,05$ ). Malgré cela il semble que les deux méthodes sont aussi efficaces l'une que l'autre pour évaluer l'effet anti-adhésion d'une molécule. D'autres études doivent être effectuées pour confirmer ces résultats.

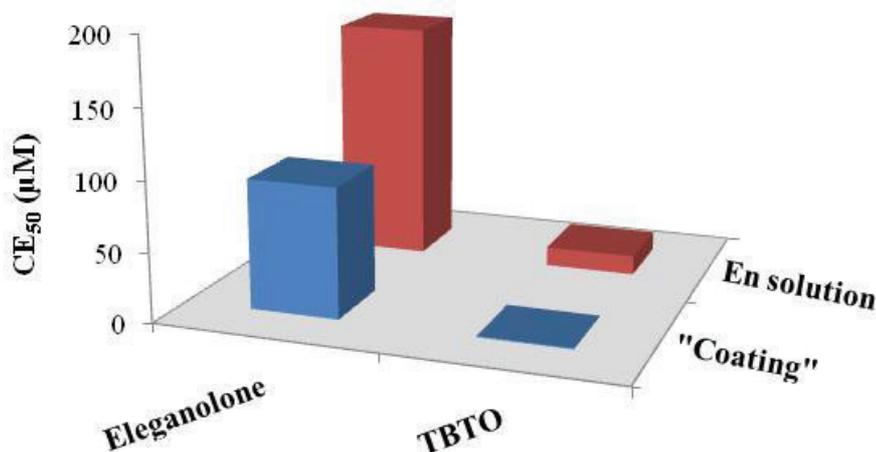


Figure 57 :  $CE_{50}$  obtenues pour la souche D41 avec les molécules (TBTO et Eleganolone) en solution ou en « coating »

En ce qui concerne les problèmes de fixation aspécifique du marqueur DAPI, (ratio témoin sur blanc inférieur à 2,5), la seule solution envisageable est de changer de fluorochrome (SYTO<sup>®</sup>13 et SYTO<sup>®</sup> RED 61). En outre, l'utilisation de ces marqueurs permet de faire une lecture directe sans extraction, et donc de réduire le protocole d'une étape. Cela permet aussi de ne prendre en compte que les bactéries adhérentes au fond du puits et pas celles éventuellement adhérentes sur ses bords qui pourraient poser problème lors de l'étude des peintures AF qui ne peuvent pas être « appliquées » sur les bords des puits. C'est d'ailleurs cette méthode qui est maintenant utilisée au laboratoire pour l'analyse en routine des capacités anti-adhésion des molécules naturelles et dérivées de synthèse. Il serait aussi peut-être intéressant de comparer nos fluorochromes à des colorants plus classiques et

moins spécifiques tels que le cristal violet (CV) (Extremina et al. 2011). Ces problèmes de marquage aspécifique étaient aussi survenus lors de l'étude des peintures AF avec NEX. En effet, aucun de nos trois fluorochromes n'a pu être utilisé pour déterminer son efficacité. Afin de s'assurer que ce problème ne provenait pas d'une possible autofluorescence de la peinture, son spectre 3D a été déterminé. Cette analyse a permis d'écarter cette hypothèse et a confirmé que c'est bien la fixation aspécifique qui posait problème. Un criblage d'autres marqueurs existants devrait être fait afin de trouver éventuellement un marqueur plus approprié à la diversité des revêtements AF. Des études menées en parallèle dans le laboratoire semblent indiquer que le CV peut être une bonne alternative.

Concernant la reproductibilité du bio-essai, des différences ont été observées entre les souches. En effet certaines d'entre elles adhèrent « toujours » (D41) alors que d'autres n'adhèrent qu'une fois sur deux en microplaque PS (TC4). Ces capacités d'adhésion peuvent être en partie liées aux aptitudes de la bactérie à produire des substances exopolymériques et, comme nous travaillons sur des populations clonales, des variations de sensibilité peuvent être envisagées. Ces variations peuvent également être liées au processus de marquage en lui-même ou encore aux diverses étapes de lavage. Ces différentes étapes pourraient être étudiées individuellement de façon plus approfondie pour améliorer la reproductibilité du bio-essai. Concernant la différence de sensibilité des souches aux diverses molécules, ni l'hydrophobicité de la souche ou du substrat ni leur phylogénie ne semblent pouvoir expliquer ce résultat. En effet, les souches isolées d'un même substrat (TC5 et TC8) ou étant du même genre (TC8 et D41) ne possèdent pas forcément la même hydrophilie ni les mêmes caractéristiques d'adhésion. Il est probable que la sensibilité des souches aux molécules soit liée à d'autres propriétés intrinsèques de la bactérie. Dans tous les cas, cela souligne l'importance de bien définir les paramètres d'adhésion de chaque souche. Il apparaît clairement que la comparaison de l'efficacité des molécules doit se faire au niveau des  $CE_{50}$  et non en utilisant une seule concentration, étant donné les variations globales de réponse du test.

Afin de s'assurer qu'il y avait bien un lien entre la quantité bactérienne introduite dans le puits et celle détectée par le lecteur de microplaque, les IF ont été corrélées au nombre de bactéries observées dans le puits en microscopie à épifluorescence. Au vu des résultats, la méthodologie utilisée pour réaliser le comptage semblait plutôt bonne. Des différences d'adhésion entre bactéries ont été observées lors de cette analyse. La densité bactérienne réelle pour une même DO d'ensemencement peut varier sensiblement d'une bactérie à l'autre (pour une  $DO=0,2$  le nombre de bactéries par puits pour la D141 est de  $1,2 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^3$  alors que, pour la TC5, il est de  $5,1 \cdot 10^6 \pm 1,8 \cdot 10^6$ ). Une étude réalisée par

Leroy et al. (2007) sur la D41 indiquait que sa limite de détection était de  $3,75.10^7$  bactéries par puits alors que, pour cette même souche, nous avons déterminé une valeur de  $5,6.10^6$  bactéries par puits. Cette différence est probablement due à la méthode utilisée pour réaliser le comptage. La méthodologie que nous avons utilisée sous-estime la quantité réelle de bactéries présentes dans le puits. En effet, seules les bactéries adhérees sur le fond ont été comptées au microscope alors que l'extraction du DAPI a également inclus les bactéries qui se sont fixées sur le bord du puits. La méthode utilisée par Leroy et al. (2007), contrairement à la notre, surestime la quantité bactérienne présente dans le puits. En effet, elle a préparé une suspension bactérienne préalablement marquée au DAPI dont une partie a été filtrée sur des filtres noirs en polycarbonate de  $0,22 \mu\text{m}$  puis comptée sous microscope. L'autre partie de la suspension a été utilisée pour mesurer la fluorescence en microplaque. Mais le comptage sur filtre donne la quantité totale de bactériesensemencées dans le puit alors que toutes ces bactéries filtrées n'adhèrent pas dans le puits.

#### ***IV.1.2. Evaluation de l'activité anti-adhésion des peintures AF par le bio-essai.***

Les bio-essais réalisés sur des peintures ont démontré la difficulté de travailler sur des revêtements complexes pouvant interagir avec les fluorochromes comme il a été expliqué dans le paragraphe IV.4.1. En outre, la question de la reproductibilité des techniques d'application des peintures dans les microplaques 96 puits se pose. Les variations de rugosité dans les puits lors du dépôt des peintures par exemple, ne nous incitaient pas à un grand optimisme. Cependant, les résultats semblent correctement répétables et reproductibles et permettraient donc un criblage. Il faut noter qu'un des intérêts principaux à utiliser des fluorochromes plutôt que le CV, outre la spécificité, tient à l'absence d'extraction du colorant. Celui-ci permet de ne tenir compte que des bactéries adhérees au fond du puits et pas sur les bords qui sont dépourvus de peinture. Une extraction pourrait donc induire une sous-estimation de l'efficacité.

Les peintures étudiées ont toutes montré une forte efficacité sur toutes nos souches exceptée IT757, une peinture de type silicone (Fouling Release Coating) qui semblait plutôt favoriser l'adhésion bactérienne. Ce résultat n'est pas surprenant puisque ce type de revêtement AF agit plus particulièrement lorsque les forces de frottement rentrent en compte, c'est-à-dire lors de la mise en mouvement des bateaux par exemple. Ce résultat indique donc que nos tests « statiques » ne sont pas du tout adaptés à ce type de revêtements. Afin de vérifier si les études menées au laboratoire étaient représentatives du milieu naturel, des études *in situ* ont été réalisées en parallèle sur les mêmes revêtements. Des corrélations entre ces deux types d'étude seront détaillées dans le Chapitre V.

### IV.1.3 Bio-essais anti-adhésion plurispécifiques

Il existe très peu d'études dans la littérature sur des biofilms mixtes en laboratoire, probablement en raison des difficultés techniques à visualiser séparément plusieurs souches de bactéries au sein d'un même biofilm. Notre démarche visait à essayer une méthodologie relativement simple. Nos résultats ont montré que la méthode du « pré-marquage » ne semble pas idéale ou, en tout cas, nécessite des modifications. L'interaction avec le marqueur même sans perméabilisation fragilise la bactérie qui adhère plus difficilement soit par un effet toxique global sur les bactéries, soit par une diminution des capacités d'adhésion plus spécifiques. Les fluorochromes sont tous des molécules qui interagissent avec l'ADN bactérien ce qui peut expliquer ces effets. Les ratios obtenus entre le témoin bactérien et le blanc étaient souvent faibles, suggérant que l'adhésion l'était également. Ce ratio n'a en fait été satisfaisant que pour D41 et TC8 respectivement marquées au DAPI et au SYTO 13. Les résultats obtenus pour la TC5 et la 4M6 étaient un peu plus mitigés. En effet, il semble que l'adhésion de la TC5 soit meilleure lorsqu'elle est marquée au SYTO 13. Par contre, lorsque les souches sont marquées avec le SYTO RED 61, elles présentent le plus souvent de mauvais ratios. Il est probable que ce marqueur ne soit pas le plus approprié pour ce type d'étude. Il serait judicieux d'essayer d'autres fluorochromes fluoresçant dans le rouge.

D'autres méthodologies ont été mises en place pour étudier les co-adhésions comme le marquage au cristal violet des bactéries totales sans distinction après formation du biofilm (Burmole et al. 2006). Dans ce cas, les réactions respectives des souches ne peuvent évidemment pas être analysées. Plus récemment des auteurs ont quantifié les différentes souches par amplification de l'ARNr 16S par qPCR (Dheilly et al. 2010). Ce type d'expérimentation n'est bien entendu pas utilisable pour des études de criblage mais semble extrêmement intéressante pour des études de relation entre souches en biofilms mixtes. Une autre stratégie consiste à transformer génétiquement une des souches pour la rendre fluorescente à l'aide du gène *gfpmut3* qui code pour la green fluorescent protéine (GFP). Après quoi l'autre souche peut être marquée à l'aide d'un autre fluorochrome. Ce type d'étude a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal (Rao et al. 2006, Dheilly et al. 2010). Il serait intéressant d'essayer de transposer ce type d'étude en microplaque.

Malgré les réserves précédemment données, nos résultats semblaient indiquer que le fait de coupler deux souches entre elles avait plutôt tendance à augmenter la densité du biofilm global. Cela était particulièrement vrai pour la TC5 qui semble préférer un mode de vie communautaire plutôt qu'isolé. De plus il a été clairement démontré qu'il existe des interactions entre les souches, notamment l'inhibition de l'adhésion de la bactérie 4M6 par

la TC8. Il semble même que la 4M6 soit l'une des souches les plus affectées par le couplage à d'autres bactéries. En effet lorsqu'elle a été associée à la TC5, son adhésion a eu tendance à diminuer, voire même à être inhibé en présence de TC8. Là encore, on peut voir qu'il existe des différences entre les souches étant donné que la TC8 et la D41 n'agissent pas de la même manière en présence de *Paracoccus* sp. (4M6) alors qu'elles font partie du même genre.

Les résultats obtenus pour les co-espèces associées aux biocides sont peu clairs. En effet, comme l'adhésion n'était pas toujours très bonne, il a été difficile d'obtenir des CE<sub>50</sub>. Lorsque celles-ci ont été obtenues, des différences de sensibilité aux biocides ont été observées pour une même souche. La D41 semblait plus sensible au TBTO lorsqu'elle était couplée à la bactérie TC8 que lorsqu'elle était en présence des souches 4M6 ou TC5. Cela est peut être à mettre en relation avec les densités bactériennes relatives dans le puits. En effet, même si la D41 semble le plus généralement peu perturbée par la présence des autres souches, il est clair que c'est lorsqu'elle a été au contact de la TC8 que son adhésion a été le plus affecté. Le phénomène contraire s'est produit pour la TC8. En effet, elle était plus sensible lorsqu'elle était en présence de la TC5 que lorsqu'elle était associée avec la D41. Or c'est lorsqu'elle est en présence de *Pseudoalteromonas* sp. que son biofilm est le moins dense. Cependant, comme lors de l'essai du couplage TC5/TC8, l'adhésion de la TC8 seule n'a pas été bonne, il est donc difficile de tirer des conclusions pour cette souche. Les mêmes observations ont été obtenues pour l'éléganediol avec le D41. La TC8 n'a montré aucune activité en présence de ce biocide tout comme cela était le cas lors du bio-essai mono-spécifique.

#### **IV.2. Une activité anti-adhésion prometteuse pour le Dictyol C et le TFA Z ?**

Etant donné que l'un des principaux objectifs de notre laboratoire est d'identifier des composés antifouling peu ou non toxiques pour l'environnement, le choix de développer un test d'adhésion spécifique en ASW pour empêcher la formation du biofilm primaire semblait pertinent (Leroy et al. 2007). Cependant l'inhibition de la fixation peut soit résulter d'un blocage spécifique du processus d'adhésion, soit d'un effet de toxicité directe envers la souche. La discrimination de ces deux modes d'action a été effectuée en réalisant des bio-essais d'inhibition de croissance et de viabilité sur les molécules actives en anti-adhésion potentiellement intéressantes. Le choix des différentes molécules étudiées s'est fait sur plusieurs critères. Les sept biocides commerciaux employés sont communément utilisés dans les peintures AF, même si certains d'entre eux sont totalement interdits comme le TBTO ou juste partiellement comme l'Irgarol (Konstantinou & Albanis 2004). Le choix de

certaines molécules naturelles s'est basé sur le fait que l'extrait brut duquel elles ont été isolées montrait des activités antimicrobiennes. En effet l'extrait brut contenant l'éléanolone et l'éléanediol avait dévoilé une inhibition de croissance sur 2 souches marines (*Cobetia marina* et *Pseudoalteromonas haloplanktis*) (Marechal et al. 2004). Le farnésol est connu pour posséder une activité antibactérienne sur la souche pathogène *Staphylococcus aureus* (Jabra-Rizk et al. 2006). De plus, plusieurs de ces dérivés avaient été étudiés, mais seulement deux d'entre eux avaient montré une activité intéressante et ce sur une seule souche (D41) (Praud et al. 2009). C'est pourquoi ils ont été étudiés sur les quatre autres bactéries marines.

Globalement et malgré des écarts types assez élevés, notamment pour les molécules les moins solubles, nous avons obtenu une bonne répétabilité et reproductibilité. De plus il est clairement apparu qu'il existait des différences d'efficacité entre les biocides mais également de sensibilité entre les souches. Le TBTO, connu pour sa grande toxicité contre un grand nombre d'organismes, a été utilisé comme biocide de référence (Evans et al. 2000, Yebra et al. 2004). Celui-ci a effectivement entraîné une forte inhibition de l'adhésion pour toutes nos bactéries. Le SN également connu comme étant un bon antifouling à lui aussi montré une haute activité. Mais ces molécules se sont révélées très toxiques. En effet, elles possédaient un indice de sélectivité ( $CL_{50}/CE_{50}$ ) proche de 1, contrairement au TFA Z et, dans une moindre mesure de par le fait que leurs réponses variaient en fonction des souches, à l'éléanolone ou à l'éléanediol. En effet, ces molécules révèlent une bonne activité anti-adhésion sans pour autant afficher d'effet toxique contre les bactéries. L'éléanolone et l'éléanediol, avaient aussi déjà montré des capacités d'inhibition de l'adhésion des balanes (Maréchal et al. 2004). Cependant, des immersions *in situ* dans les rades de Toulon et Brest réalisées après incorporation dans une peinture lors du programme ECOPAINT PACA ont montré une faible efficacité (cf Chapitre V-VI.1). Par contre, les propriétés anti-adhésion du TFA-Z, voire du TFA-E, seraient intéressantes à étudier sur d'autres organismes cibles du fouling. De plus, des études d'immersion *in situ* après incorporation dans des peintures permettraient d'avoir une idée plus précise des potentialités réelles de ces molécules. Il faut cependant noter que la difficulté de séparation des deux isomères Z et E reste le frein majeur au développement de cette molécule (Praud et al. 2009).

L'Irgarol et l'A4S ne présentaient pas d'activité anti-adhésion ce qui n'est pas surprenant puisqu'ils sont respectivement un herbicide et un fongicide. L'A4S a été décrit comme toxique sur *Vibrio fisheri* (Fernández-Alba et al. 2002). Cependant, comme nous n'avons pas testé la toxicité des molécules non actives en anti-adhésion, nous ne pouvons pas comparer la sensibilité de nos souches sur ce point. En ce qui concerne le cuivre, il

s'agit d'une substance hormétique, c'est-à-dire qu'elle est nécessaire à très faible concentration pour les organismes vivants. Cependant, elle peut devenir rapidement toxique à des concentrations plus élevées. Le cuivre constitue un biocide à spectre large dont le seuil de toxicité dépend des organismes. Par ailleurs, cette toxicité est essentiellement liée aux ions  $\text{Cu}^{2+}$  et dans une moindre mesure aux ions  $\text{Cu}^+$ . La spéciation du cuivre dans le milieu et en particulier son interaction avec des ligands organiques et/ou son adsorption sur des parois cellulaires, jouent un rôle important dans la biodisponibilité et donc sur la toxicité de cet élément. L'absence d'activité anti-adhésion du cuivre sur la majorité des bactéries marines testées peut en partie s'expliquer par la faible sensibilité des bactéries au cuivre ainsi que par le possible impact des EPS générés par l'adhésion des bactéries sur la biodisponibilité du cuivre. La Capsaïcine n'a montré aucune inhibition d'adhésion pour l'ensemble des souches pionnières. Cependant, son activité anti-adhésion a été reportée sur des bactéries d'eau douce, telles que *Pseudomonas putida* et sur une bactérie non identifiée avec respectivement des  $\text{CE}_{50}$  de 18 et 74  $\mu\text{M}$  (Xu et al. 2005). Cette molécule s'est également avérée efficace contre des bactéries provenant de « surfaces ménagères » (Villa et al. 2009) et contre des bivalves (Angarano et al. 2007). Le mode d'action proposé pour ce produit, connu pour son activité sur le système nerveux des mammifères, est une fluidification des membranes bactériennes entraînant un effet antibactérien (Molina-Torres et al. 1999). L'absence d'activité anti-adhésion dans nos essais semble indiquer une sensibilité moindre des cinq bactéries marines, comme cela a également été rapporté pour une souche de *Pseudomonas stutzeri* (Villa et al. 2009).

La bactérie 4M6 est la souche la plus sensible à tous les biocides (excepté l'éleganediol) alors que la TC4 est la plus résistante. Les souches 4M6 et TC5 bien qu'issues de famille, de lieu et de supports différents possèdent des sensibilités très proches sauf pour A4S. Par contre TC4 et TC5, toutes 2 des Flavobacteriaceae issues de la Méditerranée présentent des profils distincts pour le SN, l'éleganediol et l'éléganolone. Les *Pseudoalteromonas* (D41 et TC8) ont également affiché des différences de sensibilité pour deux produits naturels (Eléganolone et TFA E)

Seuls le TBTO et le TFA Z agissent avec la même intensité sur toutes les souches, mais le TBTO reste le plus actif. Par contre au niveau de la toxicité, les différences de sensibilité entre les souches sont faibles. Il semble en fait que lorsqu'un produit est toxique pour une souche, il l'est pour toutes les souches. Cette différence de sensibilité entre souches et biocides a déjà été observée pour des biofilms pathogènes (Pitts et al. 2003a, Bodet et al. 2008).

De plus, il apparait clairement que la sensibilité des souches ne dépend ni du lieu, ni du support d'isolement, ni de la reproductibilité d'adhésion *in vitro*. Elle ne semble pas non plus liée à la phylogénie ou à l'hydrophobicité. Il semble que cette sensibilité ne dépende que des propriétés biologiques propres de la souche, y compris probablement de celles de la matrice permettant la formation du biofilm. Dans la littérature, seule une étude a comparé la sensibilité de diverses souches marines en anti-adhésion. Lors de cette étude plusieurs bactéries marines ont été mises en contact avec différents revêtements contenant du SN. Il s'est avéré que la souche *Cobetia. marina* a toujours été plus résistante aux divers revêtements testés que les souches *Halomonas. pacifica* et *Pseudoalteromonas. atlantica* (Stafslie et al. 2007). Des différences de sensibilité de souche ont également été rapportées dans la littérature mais pour des biofilms pathogènes oraux (Bodet et al. 2008) ou pour des biofilms infectieux liés à *Pseudomonas aeruginosa*, plus sensible que *Staphylococcus epidermidis* (Pitts et al. 2003b). D'autres bio-essais effectués sur l'adhésion des organismes marins ont été appliqués aux revêtements, (Stafslie et al. 2006), aux agents nettoyants industriels, aux enzymes (Leroy et al. 2008) ou à des produits naturels non commerciaux (Melander et al. 2009).

Concernant l'étude des métabolites isolés de *Dictyota* sp., le Dictyol C (7) a montré la plus forte activité contre la souche D41. De plus, ce métabolite secondaire est présent en grande quantité dans l'algue. Cela indique peut être son implication dans la défense chimique contre la colonisation des autres organismes. Cette molécule fait partie des diterpènes qui sont connus pour leur activité antifouling et antibactérienne. En effet d'autres diterpènes cycliques appartenant à la famille des Renillafoulins (issu de *Renilla reniformis*, Octocoralliaire) (Clare et al. 1999) et Kalihinenes (extrait d'*Acanthella cavernosa*, spongiaire) ont montré une inhibition contre l'attachement des balanes (Okino et al. 1996). Il a également été montré dans la littérature que les Dolabellanes (dont fait partie l'extrait 3 qui montre aussi une bonne activité contre la D41) extraites de *Dictyota paffii* pouvaient inhiber l'adhésion de certains bivalves tels que *Perna perna*. L'autre molécule ayant montré une efficacité intéressante sur la D41 est le Dictyol E (6). Cette molécule est également connue pour sa capacité à inhiber l'attachement d'invertébrés marins tels que *Bugula neritina* ou encore *Amathia convoluta*. Mais cette molécule s'avère toxique étant donné qu'elle cause généralement la mort des larves (Schmitt et al. 1998). Il résulte au final que certaines molécules extraites de cette algue telles que le Dictyol C ou encore la molécule 3 pourraient s'avérer être des substances antifouling intéressantes, pour lesquelles une étude

plus approfondie devrait être réalisée sur d'autres souches bactériennes et en évaluant leur toxicité.

### RESUME

\_ Importance de bien déterminer les facteurs d'adhésion pour chaque souche afin de s'assurer d'une meilleure reproductibilité d'adhésion.

Bonne reproductibilité du bio-essai anti-adhésion, cependant quelques améliorations restent à apporter comme le choix du fluorochrome.

\_ Vu les différences de sensibilité entre les souches aux divers biocides, il est indispensable de travailler sur plusieurs organismes.

\_ Importance de connaître la toxicité des molécules sur les organismes cibles pour les substances actives montrant une bonne activité antifouling.

Intérêt de voir si l'efficacité de la molécule est la même sur un biofilm plurispécifique que mono-spécifique en microplaque. Malheureusement cette étape n'a pas donné de résultat satisfaisant. Il serait peut être judicieux de refaire l'expérience avec une autre méthode de marquage.

\_ Importance de pouvoir réaliser les bio-essais sur des revêtements complets et pas seulement sur des substances actives. Cela permettra de voir s'il n'y a pas de perte d'activité ni une interaction entre elles et les divers composants de la peinture avant d'effectuer une immersion en milieu marin.



# **CHAPITRE V**

## **REPRESENTATIVITÉ**

### **DU BIO-ESSAI :**

#### **ETUDE DES COMMUNAUTÉS**

#### **MICROBIENNES DE PEINTURES**

#### **ANTIFOULING**

#### ***IN SITU***



## **I. Introduction**

Les expériences réalisées dans le milieu naturel sont importantes car elles permettent d'intégrer toutes les variables physico-chimiques et biologiques influant la formation et la dynamique du biofilm. Ces expériences permettent d'avoir une représentation de la richesse des organismes et de la complexité des biofilms ne pouvant pas être obtenue en laboratoire. De nombreuses études ont été menées sur les biofilms marins. Elles s'intéressent principalement à la compréhension des mécanismes d'adhésion des micro-organismes, et plus rarement à l'abondance et/ou la diversité des micro-organismes qui les composent.

Cette étude a deux objectifs :

- Caractériser les communautés de micro-organismes présents sur différents revêtements immergés durant un mois dans la rade de Toulon. Ces communautés microbiennes peuvent être divisées selon leur taille en pico-organismes (0 à 2-3  $\mu\text{m}$ ), nanoeucaryotes (2 à 20  $\mu\text{m}$ ) et en microeucaryotes (20 à 200  $\mu\text{m}$ ). Les analyses par cytométrie en flux concernent le premier type d'organismes et permettent de distinguer les organismes hétérotrophes (bactéries) des autotrophes (picocyanobactéries et picoeucaryotes). Une technique d'empreinte moléculaire (PCR-DGGE) a permis une étude plus poussée de la diversité des procaryotes. Les nanoeucaryotes peuvent être quantifiés grâce à leur taille en cytométrie en flux sans distinction de population. Le microbenthos, constitué essentiellement de microalgues eucaryotes de type diatomées (microphytobenthos) dans les biofilms a été étudié par microscopie inversée.

- Comparer les résultats d'adhésion bactérienne obtenus au laboratoire sur six revêtements antifouling (cf Chapitre IV) aux résultats acquis *in situ* afin de voir si les peintures les plus efficaces restent les mêmes, que l'on soit en milieu marin avec un biofilm complexe ou au laboratoire avec un biofilm mono-spécifique.

## **II. Biomasse des biofilms**

Cette étude a permis d'estimer la biomasse totale des biofilms présents sur les revêtements. Celle-ci va non seulement prendre en compte la matière organique vivante mais également les micro-organismes nécrosés et les exopolymères protéiques et polysaccharidiques (EPS). Le but est de comparer globalement la densité des biofilms formés sur chaque revêtement, indépendamment des organismes qui les composent.

Les masses ( $\text{m}^3$ ) obtenues sont comprises entre 0,61 et 0,22  $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ , ce qui est plutôt faible comparé à d'autres études réalisées en milieu marin (mer de Hong Kong) sur des disques de polystyrène. Ces biomasses peuvent atteindre des valeurs avoisinant 6

mg.cm<sup>2</sup> en Mars et 27 mg.cm<sup>2</sup> en Avril après 20 jours d'immersion (Lau et al. 2005). Par contre, une autre étude réalisée dans des estuaires d'eau froide, sur des revêtements contenant des biocides tels que le Sea Nine, le CuSO<sub>4</sub> ou encore la Pyriithione de cuivre ont montré des biomasses faibles. En effet il ressort qu'après 63 jours d'immersion la densité du biofilm était proche de 8.10<sup>-4</sup> mg.cm<sup>2</sup> pour tous les revêtements (Pelletier et al. 2009). Le PVC est le revêtement qui a la masse la plus importante. Toutes les autres peintures sont situées entre 0,2 et 0,3 mg.cm<sup>-2</sup> (Figure 58). Afin de déterminer s'il existe des différences significatives entre les biomasses, le test non paramétrique de Kruskal Wallis a été effectué. Seul le PVC et le SQT qui sont respectivement les supports possédant la plus forte (0,61 mg.cm<sup>-2</sup>) et la plus faible (0,22 mg.cm<sup>-2</sup>) biomasse, apparaissent significativement différents l'un de l'autre (p<0,05).

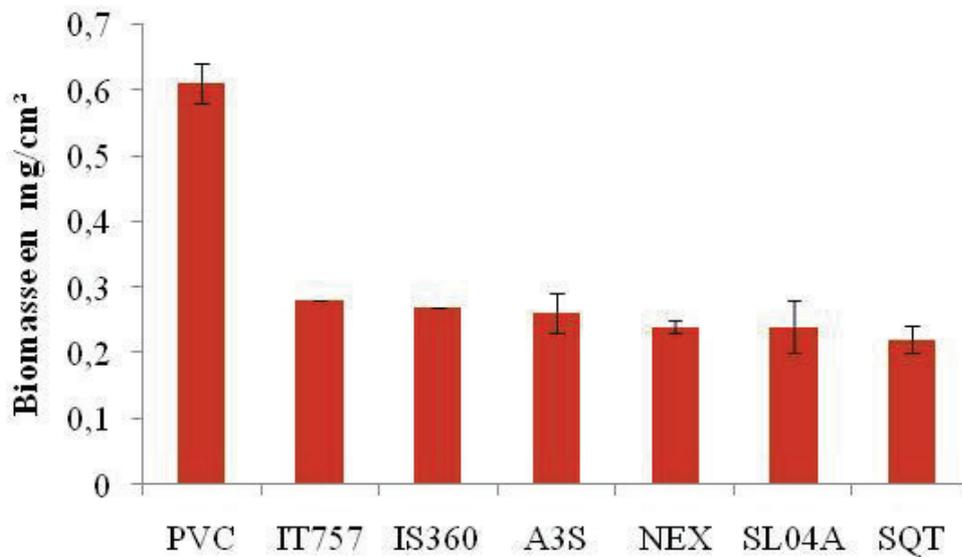


Figure 58: Biomasse totale présente sur les sept revêtements immergés durant un mois

La valeur obtenue pour IT757 est plutôt surprenante. En effet, vu la quantité de matière récupérée sur le coupon, on se serait attendu à trouver une biomasse proche de celle du PVC, ce qui n'a pas été le cas. Par contre, en ce qui concerne les autres revêtements, les valeurs obtenues paraissent cohérentes par rapport à ce qui a pu être observé sur les surfaces immergées. Contrairement à des études sur rivière (Villeneuve et al. 2010), la mesure de la biomasse totale n'a malheureusement donnée aucune information pertinente. Seul le PVC, utilisé comme plaque témoin du biofouling, a montré une quantité significativement plus importante que les autres surfaces. Cet outil ne semble donc pas assez sensible pour l'étude des biofilms marins sur des périodes aussi courtes.

En ce qui concerne la possible présence de macrofouling sur nos revêtements, des macro-organismes n'ont été observés que pour IT757 et pour le PVC (Figure 59).



Figure 59 : Recouvrement des plaques après un mois d'immersion pour (a)PVC, (b) IT757 et (c) SL04A.

### **III. Composante picoplanctonique des biofilms**

#### **III.1. Abondance et diversité des bactéries hétérotrophes par cytométrie en flux**

L'analyse des données a été effectuée à partir des divers cytoigrammes. Sur ces graphiques, chaque cellule détectée est représentée par un pixel (Figure 60). Chaque point est nommé événement. Parmi ces événements, différentes populations sont identifiées. Des « fenêtres » sont dessinées manuellement afin d'isoler les groupes de cellules. En ce qui concerne les procaryotes hétérotrophes, deux sous-groupes peuvent être définis en fonction de la quantité d'ADN des cellules. En effet, les bactéries possédant une quantité élevée en acide nucléique fluorescent plus et apparaissent avec un « side scatter » plus élevé sur le cytoigramme (Figure 61, fenêtre R11). Elles sont généralement nommées HNA (High Nucleic Acid). Les bactéries possédant une plus faible quantité d'acide nucléique sont appelées LNA (Low Nucleic Acid) (Figure 61 fenêtre R10). Cette variation d'intensité peut être liée à divers facteurs tels que l'activité métabolique, la taille de la cellule, la physiologie (Lemarchand et al. 2001) ou encore l'appartenance à différents taxons (Sherr et al. 2006). Il est également possible que les LNA soient en fait des cellules mortes ou endommagées (Lebaron et al. 2001). Dans un premier temps, l'analyse a été effectuée sur la globalité des communautés bactériennes hétérotrophes. Seuls les événements situés dans la zone délimitée par le rectangle R9 sont considérés comme des bactéries. Les événements correspondants à une double fluorescence liée au DAPI et à la chlorophylle ou à la PE (pico-organismes autotrophe) sont soustraits de cette analyse. Les événements se trouvant sous cette zone sont probablement des débris et sont considérés comme du bruit de fond

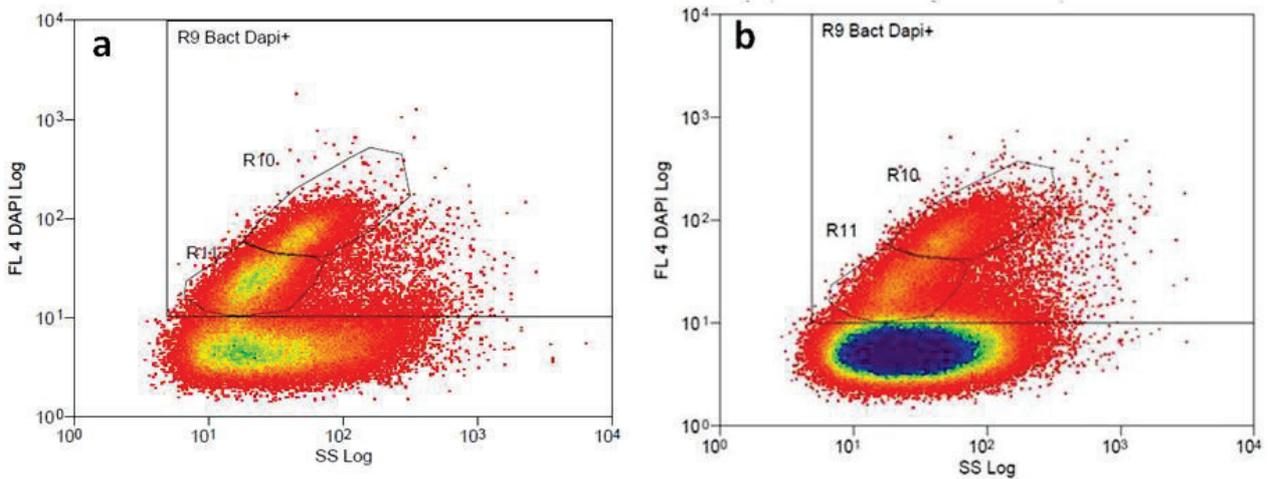


Figure 60: Cytogrammes correspondant aux bactéries hétérotrophes des biofilms

(a) peinture A3S (b) peinture AF NEX

(Le gradient de couleur correspond à une densité croissante d'événements: rouge-jaune-bleu)

R9= bactéries hétérotrophes totales (picoplancton autofluorescent soustrait des événements DAPI positifs), R11= LNA et R10=HNA

Pour chaque revêtement en triplicat, la densité bactérienne par  $\text{cm}^2$  a été déterminée. Les résultats obtenus sont reportés sur la Figure 61 ci-dessous.

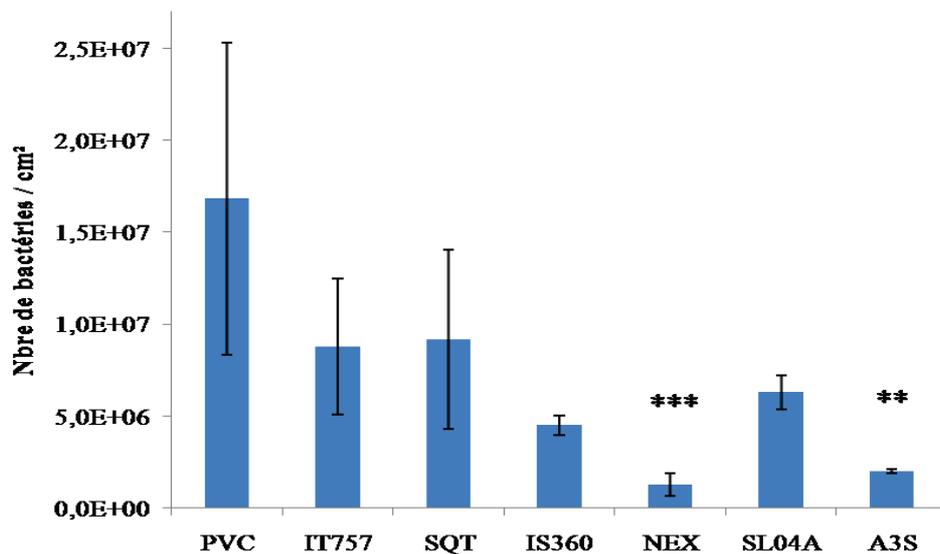


Figure 61 : Densité bactérienne déterminée par cytométrie en flux sur les revêtements immergés

(\*\* et \*\*\* : Revêtement significativement différent du PVC  $p < 0,01$  et  $0,001$ )

Le PVC est le revêtement le plus recouvert par les bactéries. Il est suivi par les peintures SQT, IT757, SL04A, IS360, A3S et enfin NEX, indiquant ainsi que cette dernière

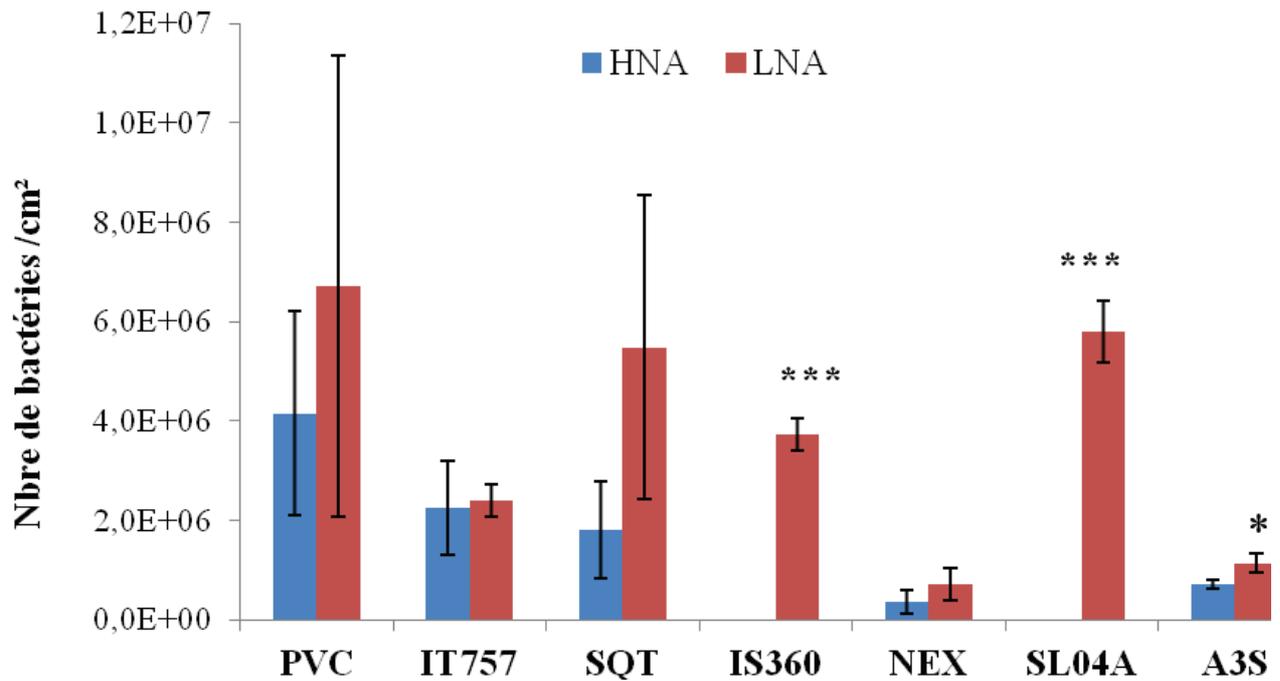
est la plus efficace contre les bactéries hétérotrophes. Afin de déterminer si ces différences sont bien significatives, une analyse ANOVA à un facteur est réalisée, après que la normalité ait été vérifiée à l'aide du test d'Agostino et Pearson. Cette analyse a effectivement mis en évidence des différences d'inhibition d'adhésion entre les revêtements ( $p < 0,05$ ). D'après le post test de Bonferroni, ces différences apparaissent entre le PVC et les revêtements A3S et NEX respectivement de manière très significative ( $p < 0,01$ ) et extrêmement significative ( $p < 0,001$ ). De plus, IT757 et SQT montrent également des différences significatives par rapport à NEX et A3S (respectivement  $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ ), et SL04A uniquement pour NEX ( $p < 0,01$ ). Le PVC, utilisé comme témoin de colonisation, possède environ 10 fois plus de bactéries que NEX ou A3S. Un échantillon d'eau de mer récupéré sur le site d'immersion a également été analysé en cytométrie. Il s'avère que la quantité bactérienne est de  $1,20 \cdot 10^8$  cellules.L<sup>-1</sup>. Une étude également réalisée en Méditerranée (mer Ligure) a montré que la quantité de procaryotes, déterminée en CMF, se situait entre 0,9 et  $15 \cdot 10^8$  cell.L<sup>-1</sup> dans la zone épipélagique. La biomasse maximale a été déterminée entre mai et juin. Pour la période de juillet il semble que l'abondance soit située aux alentours de  $8 \cdot 10^8$  cell.L<sup>-1</sup> (Winter et al. 2009). Ces ordres de grandeurs (compris entre 0,2 et  $5,3 \cdot 10^8$  cell.L<sup>-1</sup>) ont également été trouvés en Méditerranée sur la côte catalane (Lebaron et al. 2001).

Comme décrit précédemment, deux sous-groupes de bactéries hétérotrophes (HNA et LNA) peuvent être définis en fonction de leur quantité d'ADN. La même tendance apparaît sur tous les revêtements avec une dominance du groupe LNA dans ces biofilms obtenus dans la rade de Toulon (Figure 62). Cette dominance des LNA est particulièrement marquée pour IS360 et SL04A, puisque aucune bactérie HNA n'a été dénombrée sur ces deux revêtements.

Afin de préciser cette dominance, un ratio entre les deux groupes bactériens a été calculé et rapporté dans le Tableau 34 ci-dessous.

Peintures	PVC	IT757	SQT	IS360	NEX	SL04A	A3S	Eau de mer
Ratio LNA/HNA	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,2	3,6 ± 1,0	/	2,3 ± 0,9	/	1,6 ± 0,3	8,1

Tableau 34: Ratio et significativité de la différence (T test non apparié) entre les densité de bactéries LNA et HNA pour les revêtements immergés.



\* =Différence significative ( $p < 0,05$ ) entre HNA et LNA (Unpair T test)

Figure 62 : Densités des sous-groupes bactériens HNA et LNA présents sur les revêtements immergés.

D'après l'étude statistique effectuée avec le t-test (données non appariées), on peut dire que le PVC possède un ratio faible ( $1,5 \pm 0,3$ ) et ne présente pas de différence significative entre la proportion de bactéries LNA et de HNA adhérees. Il apparaît au contraire que les peintures A3S, IS360 et SL04A présentent des différences significatives ( $p < 0,05$  pour la première et  $p < 0,0001$  pour les deux autres) entre ces deux groupes. Le ratio le plus important correspond à SQT bien que l'écart-type important de ce dernier limite l'interprétation. Les supports IS360 et SL04A qui possèdent une efficacité intermédiaire ne possèdent pas de HNA, indiquant peut être que ce sont des supports hautement sélectifs. Les revêtements A3S et IT757 montrent des ratios proches de celui obtenu pour le PVC. Par rapport au PVC, il semble néanmoins que SL04A et IS360 agissent préférentiellement sur les bactéries HNA, bactéries de plus grande taille ou métaboliquement plus actives. Il est possible que les bactéries HNA soit globalement un peu plus sensibles que les LNA. Cependant ces revêtements reflètent le plus la composition de la colonne eau. En effet celle-ci possède également les deux groupes bactériens. Là encore la quantité de LNA ( $1,02 \cdot 10^8$  cell.L<sup>-1</sup>) est plus élevée que celle de HNA ( $1,42 \cdot 10^7$  cell.L). Des études ont montré que, dans

la colonne d'eau, il y a généralement plus de HNA, du moins dans les premiers 100 m (Thyssen et al. 2005). La quantité de HNA est généralement comprise entre 40 et 60 % de l'abondance totale. Sur divers sites étudiés en Méditerranée, les HNA sont quasiment toujours majoritaires excepté pour un site. Le fait que les HNA soient le plus souvent présentes à la surface est lié à une plus forte disponibilité de nourriture. En effet, il semble que dans les milieux oligotrophes il y ait moins de HNA (Lebaron et al. 2001). Or notre étude a été réalisée dans une zone plutôt mésotrophe. Le fait que le prélèvement ait été effectué en été, période où la pression de prédation est la plus forte, peut également jouer sur la quantité de HNA, préférentiellement consommées par les prédateurs (Moran et al. 2007).

Comme décrit précédemment, il est probable que la différence entre LNA et HNA soit une question de taille, il est donc possible au final que le PVC et IT757 soient des niches favorables à la croissance des bactéries. En ce qui concerne la peinture la plus active, c'est-à-dire A3S, le faible ratio pourrait indiquer que le mode d'action de cette peinture n'est pas de bloquer la croissance bactérienne mais plutôt d'empêcher son adhésion. Il se peut également que les peintures les plus actives (NEX, A3S) possèdent un ratio faible car elles sont peu ou pas sélectives. Leur action est donc similaire sur les deux groupes bactériens.

### **III.2. Abondance et diversité des pico-organismes autotrophes par cytométrie en flux**

Ces organismes sont très répandus dans le milieu océanique (50 à 90 % de la biomasse phytoplanctonique) et occupent toutes les niches écologiques. Pourtant ils n'ont été découverts qu'à la fin des années 70, grâce à l'émergence des nouvelles technologies d'observation telles que la CMF. Lors de notre étude, plusieurs groupes ont été identifiés : les picoeucaryotes (PicoEuk), qui sont des organismes unicellulaires autotrophes eucaryotes (Figure 63, R3), et les picocyanobactéries (Figure 63, R1+R2), qui sont des organismes unicellulaires autotrophes procaryotes. La taille des picocyanobactéries est plus petite en général, comprise entre 0,6 et 2  $\mu\text{m}$ . En plus de la chlorophylle, les picocyanobactéries, qui appartiennent essentiellement au genre *Synechococcus*, possèdent des pigments rouges appelés phycoérythrine (PE) et bleus appelés phycocyanine (PC). Les longueurs d'ondes d'émission de ces pigments sont spécifiques et donc différentes de celles de la chlorophylle, seul pigment présent chez les Picoeuk (Blanchot et al. 1998). Le rapport picocyanobactéries riches en PE (PE-CYAN) sur picocyanobactéries riches en PC (PC-CYAN) varie en fonction des niveaux de turbidité des écosystèmes et donc des niveaux trophiques. Les

picocyanobactéries riches en PE dominant essentiellement les systèmes mésotrophes à oligotrophes alors que celles riches en PC dominant les systèmes eutrophes turbides, aussi bien en milieu marin que d'eau douce. Les deux populations coexistent dans les systèmes intermédiaires (Stomp et al. 2007; Bec et al. 2011). Le fait qu'ils possèdent des pigments différents (PE-CYAN vs PC-CYAN ou PicoEuk) et des tailles globalement différenciables (nano-eucaryotes vs pico-organismes) permet de les identifier sans ajout de fluorochrome.

L'acquisition des données a été réalisée sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour le dénombrement bactérien mais en utilisant les réponses en fluorescence rouge (FL3) et orange (FL2). Le groupe R1 pourrait correspondre à *Prochlorococcus*, le plus petit organisme picoplanctonique actuellement identifié (Blanchot et al. 1998) et l'un des organismes photosynthétiques le plus abondant dans la colonne d'eau. Cet organisme présente cependant une signature proche de celle des PC-CYAN (Bec et al. 2011). Il possède en effet l'unique dérivé divinyle de la chlorophylle *a* et *b* (pigment rouge sombre). Ce genre est d'ailleurs rattaché aux cyanobactéries (Gregori 2001, Scanlan & West 2002). L'absence de discontinuité claire sur les cytogrammes entre les populations R1 et R2 (PE-CYAN) ainsi que la prédominance de *Prochlorococcus* dans des milieux nettement oligotrophes (ce qui n'est pas notre cas dans la rade de Toulon) nous a amené à émettre l'hypothèse que R1 correspondait plutôt à des PC-CYAN, même si l'intensité de fluorescence orange est un peu faible. Une étude génomique après tri pourrait permettre d'identifier définitivement ces différents groupes.

Il est aussi possible que le traitement imposé aux cellules lors de la désagrégation du biofilm endommage certains organismes. Dans le but de pouvoir quantifier les organismes présents dans le biofilm, il est nécessaire de déstructurer la matrice afin de récupérer des cellules libres en suspension pour l'analyse en cytométrie en flux. D'une façon générale, les études sur ces pico-organismes ont été réalisées sur des cellules planctoniques et « jamais » à notre connaissance sur des biofilms marins. Afin de vérifier cela, l'échantillon d'eau de mer a été analysé avec et sans traitement de dissociation (Tableau 35).

Au vu des pourcentages, il semble que le traitement infligé aux organismes peut affecter les organismes et tout particulièrement les picocyanobactéries. Cela peut entraîner une sous-estimation de la biomasse de ces organismes. Néanmoins la comparaison n'a été effectuée que sur un seul échantillon, c'est pourquoi ces informations doivent être interprétées avec précaution. De plus, il est possible que les traitements effectués en amont de l'analyse comme la congélation à l'azote liquide ou l'introduction de formol puissent aussi endommager les cellules.

Nb d'événements (par L)	Eau de mer : protocole de dissociation (1)	Eau de mer : filtration et marquage au DAPI (2)	% de diminution de la biomasse entre (1) et (2)
PicoEuk	$2,9 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^6$	29%
PE CYAN	$5,9 \cdot 10^6$	$9,6 \cdot 10^7$	38%
R1	$8,3 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^7$	37%
Bactéries	$1,3 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	15%

Tableau 35: Comparaison entre les données obtenues lors de l'analyse de l'échantillon d'eau de mer avec et sans traitement permettant la dissociation du biofilm pour les quatre groupes d'organismes analysés.

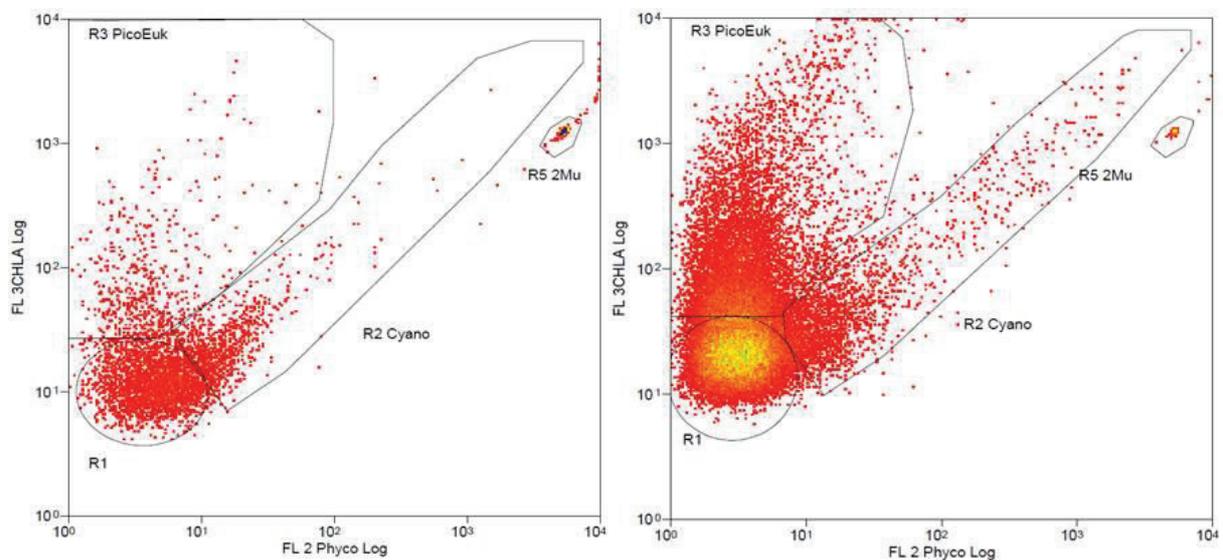


Figure 63 : Pico-organismes autotrophes sur les revêtements SL04A et PVC après immersion (R1= « PC-CYAN », R2=PE-CYAN, R3=PicoEuk)

Les événements regroupés sous R5 sont les marqueurs de taille (microbilles inertes) permettant de calibrer l'appareil. Pour cette étude, ces microbilles mesurent 2  $\mu\text{m}$ .

Comme on le voit dans la Figure 64, les densités des trois groupes varient énormément de  $1,64 \times 10^6$  (PVC) à  $1,21 \times 10^4$  (NEX) cellules/cm<sup>2</sup> pour les PicoEuk, de  $2,74 \times 10^5$  (PVC) à  $2,76 \times 10^4$  (SL04A) cellules/cm<sup>2</sup> pour les PE-CYAN et de  $1,14 \times 10^7$  (PVC) à  $9,98 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> pour les « PC-CYAN ». Il s'avère que les « PC-CYAN » sont majoritairement présentes sur les revêtements par comparaison aux PE-CYAN, excepté pour IS360. Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) ont été trouvées entre ces deux groupes pour les revêtements PVC, SL04A et A3S. Cette tendance est cohérente avec les proportions

relatives de ces groupes rencontrées dans les conditions physico-chimiques de l'eau de mer d'un port en méditerranée (Bec et al. 2011). Les PicoEuk représentent toujours le groupe le moins abondant sauf pour le PVC où ce sont les PE-CYAN qui sont minoritaires. Des différences significatives ont d'ailleurs été trouvées entre ce groupe et les PE-CYAN pour NEX ( $p < 0,01$ ), IS360 ( $p < 0,001$ ) ainsi que pour PVC ( $p < 0,05$ ). Les PicoEuk sont significativement différents des « PC-Cyan » pour IT757 et A3S ( $p < 0,05$ ) ainsi que pour SL04A ( $p < 0,01$ ) et pour NEX et IS360 ( $p < 0,001$ ). C'est aussi classique puisque les densités planctoniques sont en général inversement proportionnelles à la taille des organismes. NEX, SL04A et A3S sont les revêtements les plus efficaces contre le pico-organismes autotrophes d'une manière générale. Quand à IT757 et SQT, ils montrent une colonisation intermédiaire.

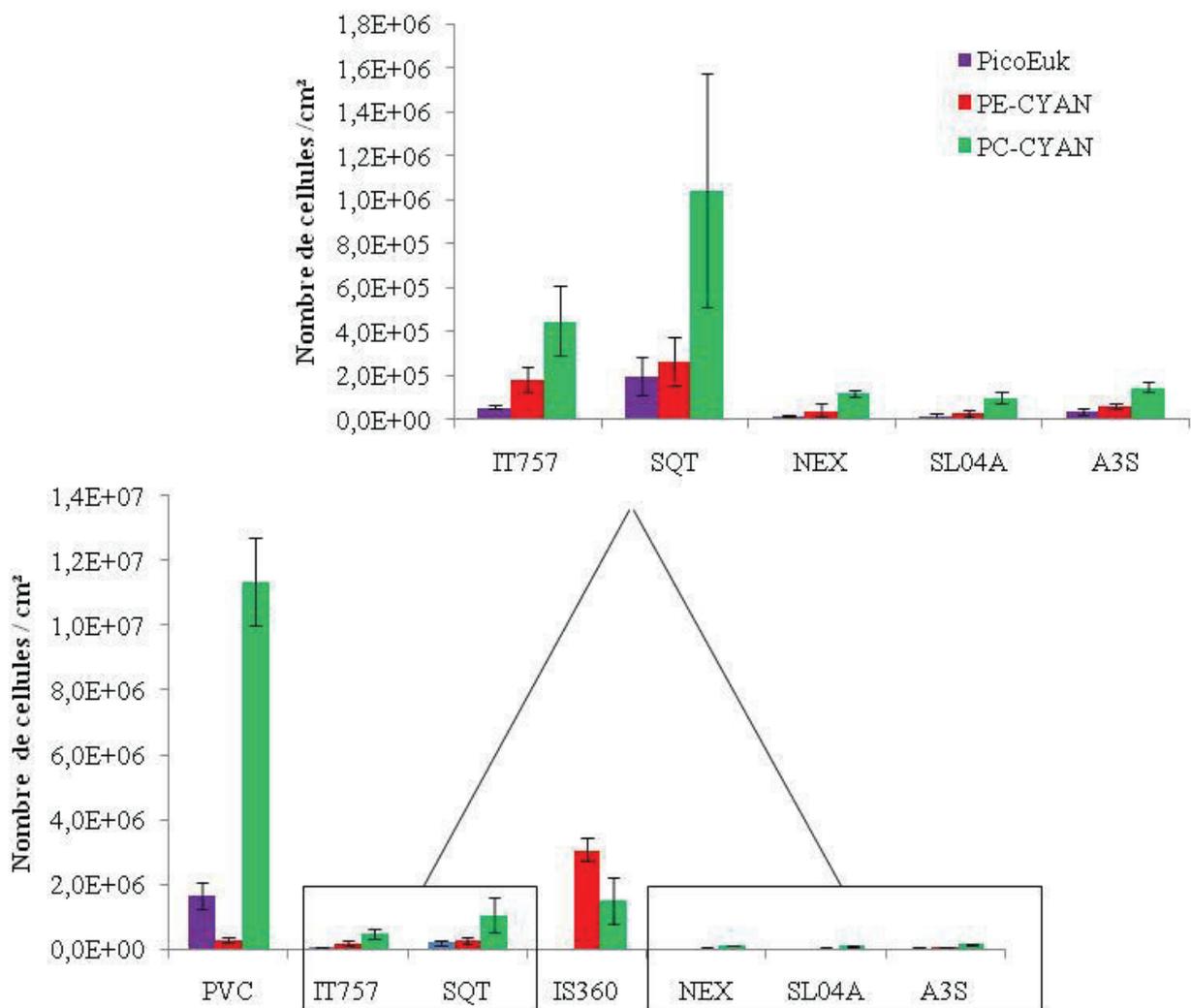


Figure 64 : Densités (cellules/cm<sup>2</sup>) des différents groupes de pico-organismes autotrophes (PicoEuk, PE-CYAN et « PC-CYAN ») sur les revêtements immergés

Comme les PE-CYAN et les « PC-CYAN » sont toutes des cyanobactéries, ces deux groupes peuvent être associés et analysés ensemble (Pico-CYAN). Malgré cela, les organismes les plus nombreux dans les biofilms des revêtements immergés dans la rade de Toulon restent nettement les bactéries hétérotrophes, excepté pour IS360 qui détient une quantité plus importante de Pico-CYAN. Le PVC possède quant à lui quasiment autant de Pico-CYAN que de bactéries hétérotrophes (Figure 65). Ce sont d'ailleurs les deux seuls revêtements qui ne présentent pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre ces deux groupes d'organismes.

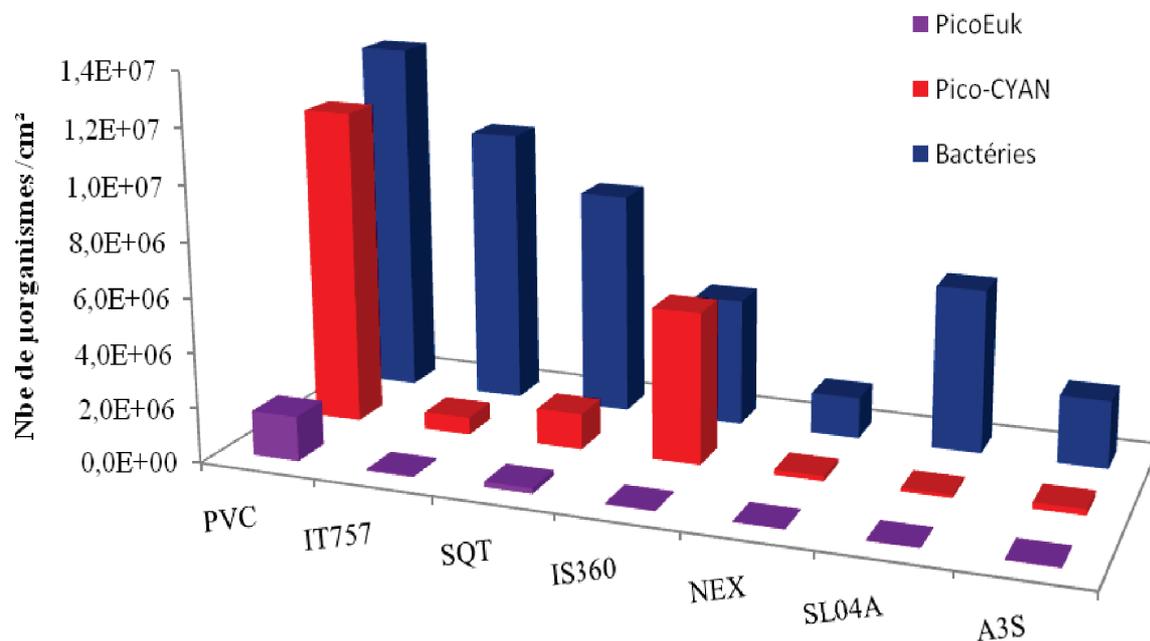


Figure 65 : Densités (cellules/cm<sup>2</sup>) des pico-organismes présents sur les sept revêtements immergés

### III.3. Diversité des procaryotes par empreinte moléculaire (PCR-DGGE)

Dans le but d'évaluer la diversité spécifique des communautés bactériennes (y compris cyanobactériennes) présentes sur les revêtements, une des techniques d'empreinte moléculaire classiquement utilisée en écologie microbienne a été réalisée.

L'ADN des biofilms a été récupéré par grattage, comme pour les analyses de cytométrie de flux mais sur d'autres coupons et toujours en triplicats. Une extraction de l'ADN total a été effectuée en utilisant un kit (Power Soil<sup>®</sup> DNA Isolation) déjà validé pour des biofilms (Villeneuve et al. 2010, Briand et al. 2010). L'ADN ribosomal 16S a été amplifié par PCR. Cette région est classiquement choisie car l'opéron ribosomal est présent

en abondance dans tous les organismes procaryotes et est constitué d'une région conservée (non variable) et d'une région plus variable permettant l'identification des différentes bactéries. Les amorces ont été choisies car elles ont déjà été utilisées lors de l'identification de bactéries planctoniques en Méditerranée. De plus, l'une des deux amorces contient une queue CG permettant la stabilisation de l'ADN lors de sa dénaturation (Schauer et al. 2000). Les résultats de la PCR sont présentés ci-dessous (Figure 66).

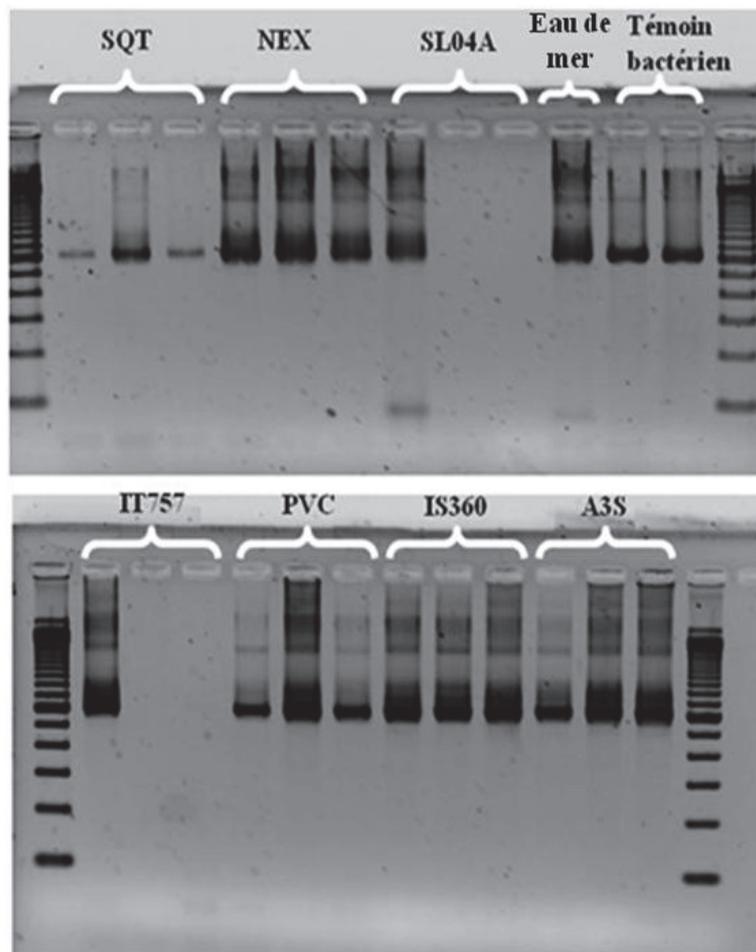


Figure 66 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus à partir des extraits d'ADN provenant des sept revêtements immergés ainsi que de l'eau de mer prélevée sur le site

L'amplification par PCR a fonctionné étant donné que des amplicons sont visibles pour tous les revêtements. Bien que pour IT757 et SL04A seul un échantillon sur trois avait été amplifié, lors d'une seconde PCR réalisée à l'INRA avant la DGGE, seul un des triplicats d'IT757 n'a pu être amplifié sur les échantillons de tous les revêtements. Cela signifie dans un premier temps que du biofilm bactérien a bien été récupéré sur tous les revêtements immergés, ce qui confirme les données de CMF. Cette première analyse a aussi

permis de vérifier qu'il n'y avait pas d'interférence entre la PCR et les revêtements. Il aurait été possible que certaines peintures qui contiennent de nombreux biocides inhibent la Taq polymérase. Une fois le matériel génétique amplifié, une électrophorèse sur gel d'agarose en gradient dénaturant (DGGE) a été réalisée à l'INRA de Thonon-les-Bains par Brigitte Leberre (IGE, UMR CARRTEL). Cette technique permet de séparer les amplicons par rapport à leur séquence nucléotidique et non par leur taille, comme le fait une électrophorèse classique. La DGGE exploite les conditions de rupture de la structure bihélicoïdale de l'ADN. Elle va permettre la dénaturation de l'ADN par rupture des liaisons hydrogènes, situées entre les bases azotées de chaque brin. Cette dénaturation va donc dépendre de la composition en nucléotides de l'ADN étudié. Plus l'ADN contient de fragment GC, plus celui-ci est stable puisque l'appariement CG se fait par trois liaisons hydrogène alors que l'appariement AT n'en possède que deux. L'altération de la structure de l'ADN peut s'effectuer par la chaleur. Cette température de dénaturation permet de caractériser les fragments d'acides nucléiques, on parle alors de température de fusion. Elle est définie comme la température pour laquelle 50% de l'ADN est sous la forme double brin et 50% sous la forme simple brin. Le principe de séparation se fonde sur le fait que si deux fragments diffèrent d'une seule paire de base, leurs températures de fusion seront distinctes. La dénaturation de l'ADN va se produire sous les effets combinés de la température du bain dans lequel le gel est déposé (généralement 60°C) et de la concentration en substance dénaturante. Cela va entraîner la rupture de la structure bi-hélicoïdale du fragment et affecter sa mobilité sur le gel. Ainsi tous les fragments possédant des ADN différents vont être représentés par des bandes distinctes sur le gel. Chacune d'entre elle va représenter une espèce ou un groupe d'espèces identiques, c'est pourquoi le terme d'OTU (Operational Taxonomic Unit) sera préférentiellement utilisé pour décrire l'analyse de la DGGE en terme de diversité (Figure 67). Chaque OTU va donc être caractérisée par une distance de migration et le nombre de bandes permet d'accéder à la richesse spécifique de la communauté présente dans l'échantillon (Schauer et al. 2000; Dorigo et al. 2005).

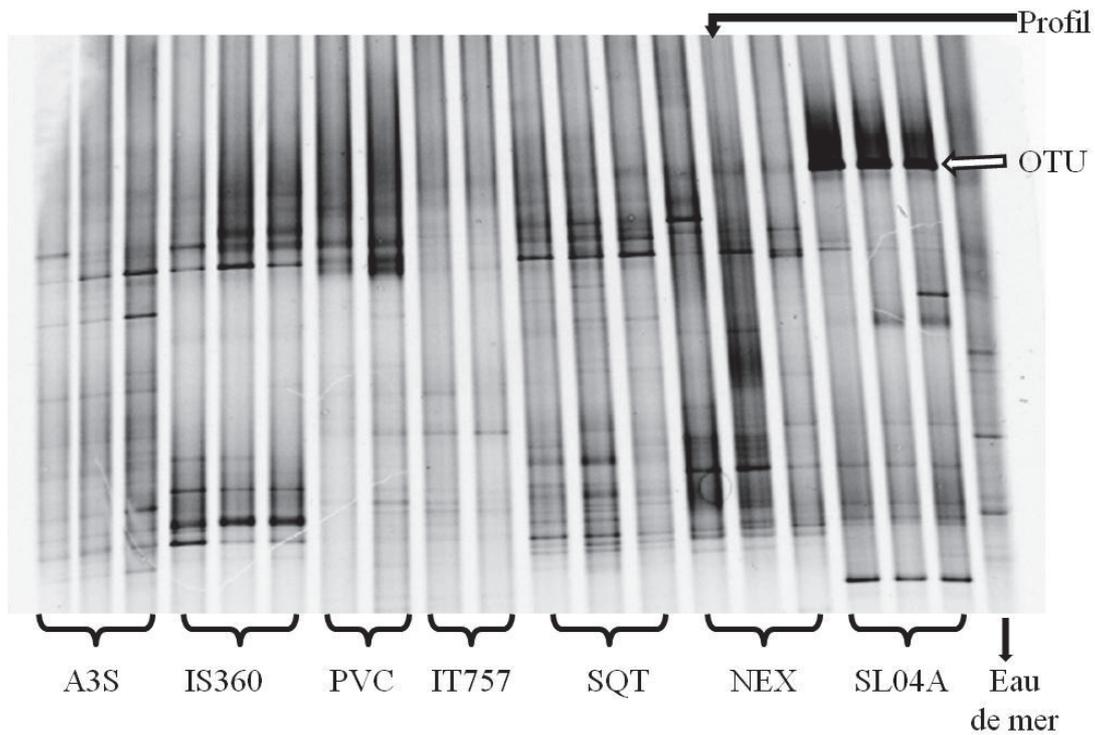


Figure 67 : Gel DGGE des produits de PCR des biofilms récupérés sur les sept revêtements immergés ainsi que de l'eau de mer prélevée sur le site

Afin de déterminer la richesse spécifique présente sur les revêtements, le nombre d'OTU pour chacun d'entre eux a été calculé. Il s'avère que la richesse est comprise entre 18 et 28 OTU par peinture sur 53 OTU présentes sur l'ensemble des revêtements. Les revêtements possédant la plus grande richesse spécifique sont A3S et SQT alors que NEX et SL04A possèdent le plus faible nombre d'OTU (respectivement 18 et 19 OTU). La respectabilité obtenues entre triplicats (ou duplicats pour PVC et IT757) est bonne (écart-type faible) pour tous les revêtements. Si à présent on compare les profils de la DGGE, il apparaît que certaines peintures possèdent des bandes communes. En effet, 4 OTU (8%) ont été retrouvées sur six revêtements, et une d'entre elle est visible sur toutes les peintures. Il a également été constaté que 19 OTU sont communs à plus de 50% des revêtements (à chaque fois présents sur au moins quatre des revêtements). 8 OTU sont présents dans moins de 25% des échantillons et 4 OTU peuvent être qualifiés de spécifique à un revêtement car chacun d'entre eux ne va être présent que sur une seule peinture. Les revêtements possédant de tels OTU sont PVC, NEX, SQT et A3S (un OTU rare par revêtements). Cela signifie que les revêtements possèdent un pourcentage non négligeable d'organismes en commun mais qu'il existe aussi des différences entre les populations bactériennes formant le biofilm et que certains supports sélectionnent préférentiellement un taxon plutôt qu'un autre.

### III.3.1 Analyse qualitative du profil DGGE

Dans le but de mieux discerner les divergences ou les similitudes entre les peintures, les données obtenues par la DGGE vont être transformées en une matrice présence/absence permettant de réaliser une étude statistique à échelle multidimensionnelle (MDS). Cela donne une idée qualitative de la structure de la communauté (Figure 68).

Ces données confirment bien la répétabilité entre les triplicatas étant donné qu'on ne voit pas de dispersion entre les trois mêmes coupons pour un même revêtement. Seules les communautés procaryotes sur NEX et IS360 ne semblent pas se différencier. Cela implique une forte similarité d'OTU entre ces 2 revêtements. Cela indique aussi que les autres revêtements présentent des différences globales au niveau des communautés. Il est intéressant de noter qu'IT757 et PVC semblent posséder des communautés assez différentes de celles des quatre autres revêtements. Mais on note toute de même que SQT et SL04A sont aussi assez éloignés l'un de l'autre, indiquant des différences entre les communautés bactériennes fixées sur ces supports.

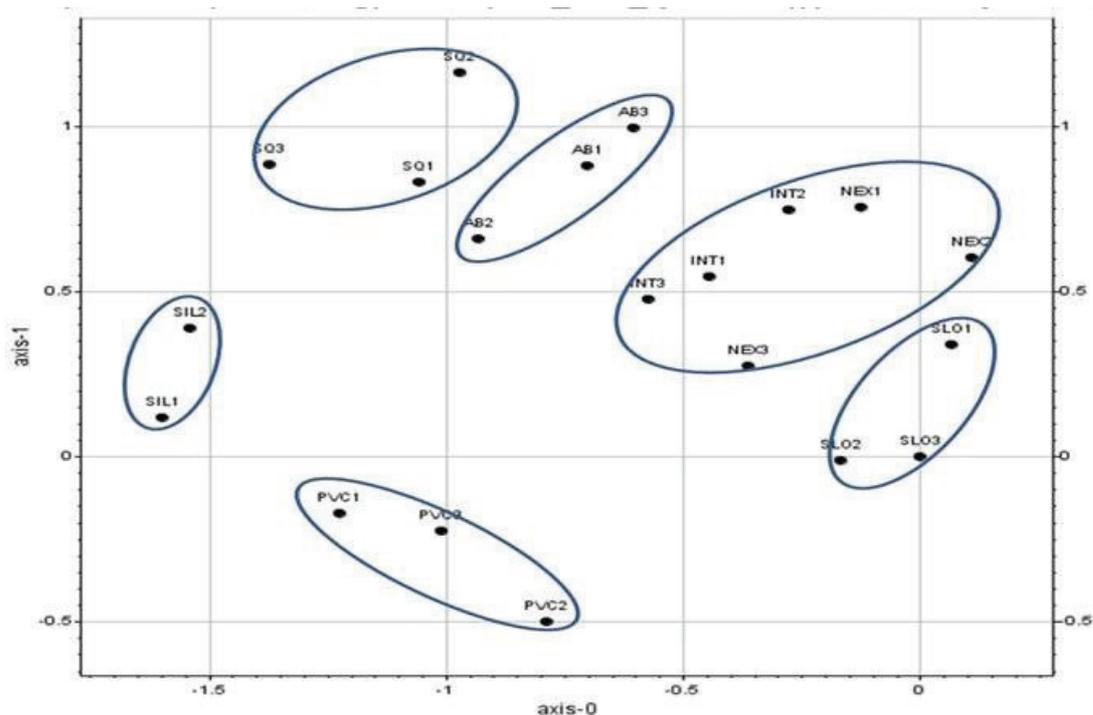


Figure 68: Représentation par MDS de la matrice de similarité correspondant aux communautés de biofilms sur les sept revêtements immergés : analyse qualitative.  
(PVC= PVC; SIL= IT757; SQ=SQT; AB=A3S; NEX=NEX; INT=IS360 et SLO= SL04A)

### III.3.2. Analyse semi-quantitative du profil DGGE

A partir de la DGGE, une analyse semi-quantitative tenant compte à la fois du nombre de bandes, de leur position mais aussi de l'intensité de celles-ci peut-être réalisée (e.g. Schauer et al. 2003). Cette approche n'est possible que lorsque l'interprétation des gels est effectuée à l'aide d'un logiciel de traitement d'image et qu'elle ne repose pas sur une appréciation visuelle. La démarche qualitative attribue en effet autant d'importance à une OTU peu représentée qu'à une OTU fortement représentée, ce qui limite la portée de l'analyse. Cependant, il faut préciser que l'interprétation quantitative des profils DGGE est à manier avec précaution étant donné les biais méthodologiques possibles (extraction et/ou amplification préférentielle, nombre de copies du gène variable d'une espèce à l'autre). Une analyse par MDS a donc aussi été effectuée sur ces données (Figure 69).

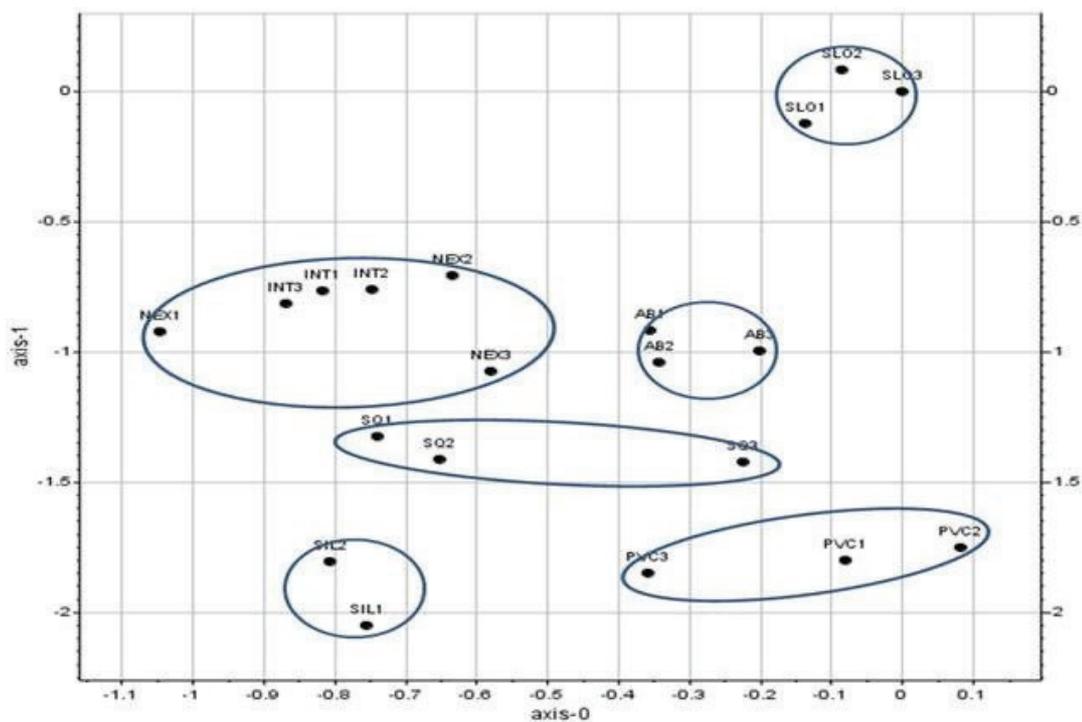


Figure 69 : Représentation par MDS de la matrice de similarité correspondant aux communautés de biofilms sur les sept revêtements immergés : analyse semi-quantitative. (PVC= PVC; SIL= IT757; SQ=SQT; AB=A3S; NEX=NEX; INT=IS360 et SLO= SL04A)

IS360 et NEX apparaissent là aussi regroupés, confirmant qu'ils possèdent une communauté bactérienne similaire. Même si c'est moins net que sur l'analyse MDS qualitative, IT757 et PVC semblent différer des autres communautés procaryotes puisqu'ils sont tous les deux situés les plus bas sur le graphique. On note enfin que SL04A se différencie très nettement de l'ensemble des autres revêtements. Afin de tenter d'évaluer la

diversité procaryote sur les divers revêtements l'indice de Shannon ( $H'$ ) a également été calculé. Dans le cas de la DGGE, l'abondance ne se traduit pas par un effectif mais par l'intensité des bandes.  $H'$  est assez élevé pour tous les revêtements étant donné qu'il se situe entre 3,1 et 4,2 (Tableau 36). Les revêtements présentant la plus grande diversité sont SQT et A3S alors que SL04A a la plus faible diversité, ce qui peut expliquer en partie qu'il se différencie des autres. Aucune relation n'a été trouvée entre la diversité et l'abondance (intensité totale des bandes par revêtement).

	PVC	IT757	SQT	IS360	NEX	SL04A	A3S
$H'$	$3,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$

Tableau 36: Diversité relative ( $H'$ ) déterminée pour chaque revêtement immergé

#### **IV. Abondance des nanoeucaryotes autotrophes par cytométrie en flux**

Les organismes autotrophes ont dans un premier temps été séparés en fonction de leur taille (FS) et de leur forme (SS) comme le montre le cytogramme (Figure 70). Les organismes mesurant plus de  $3\mu\text{m}$  seront considérés comme des nanoeucaryotes (Figure 70, R10) alors que ceux possédant une taille inférieure à  $3\mu\text{m}$  seront des pico-organismes (Figure 70, R8).

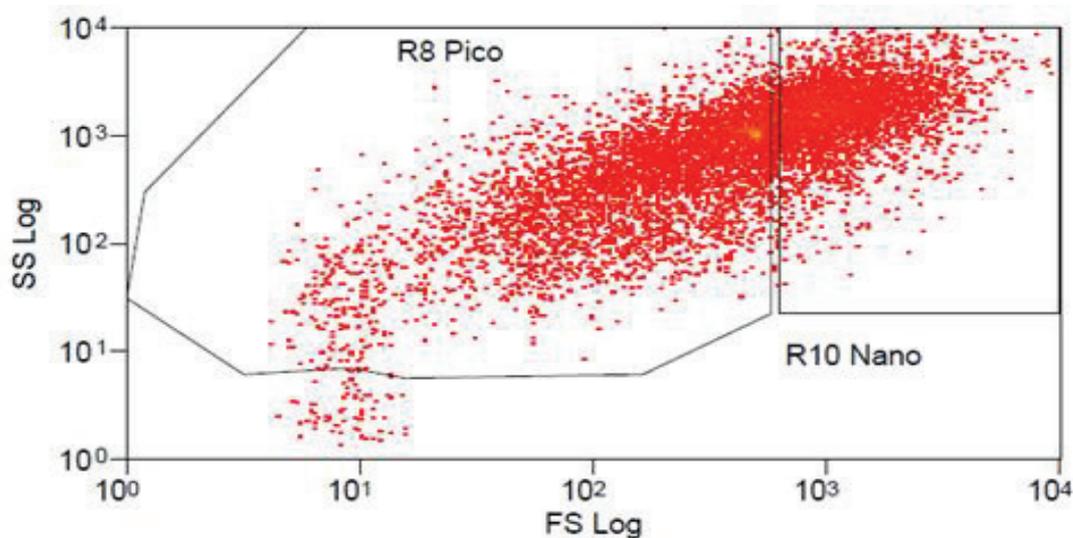


Figure 70: Nanoeucaryotes (R10) et pico-organismes (R8) sur le PVC après immersion

Il apparaît que NEX, SL04A et A3S sont les revêtements les plus efficaces et qui montrent des différences significatives (respectivement  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,05$ ) avec le

PVC. NEX présente également des différences significatives avec IT757 et IS360 ( $p < 0,05$ ) et très significatives avec SQT ( $p < 0,01$ ). Le revêtement IT757 semble être peu colonisé contrairement au résultat trouvé pour les bactéries (Figure 71).

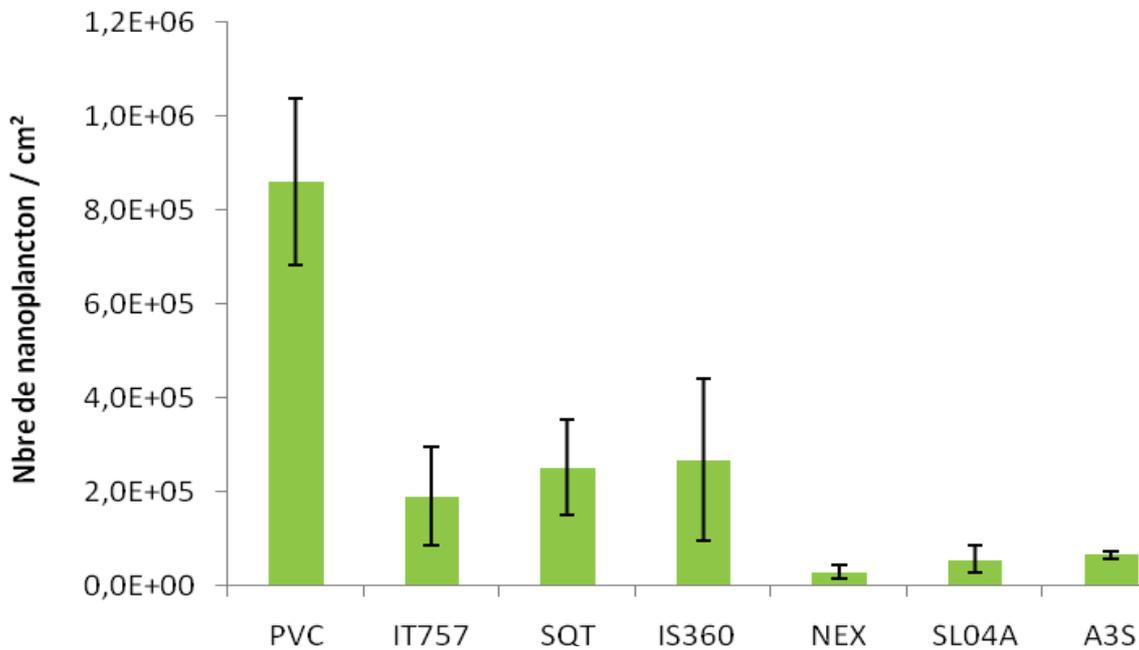


Figure 71 : Abondance des nanoeucaryotes sur les différents revêtements immergés

### **V. Composante microphytobenthique des biofilms**

Une fois le biofilm bactérien constitué celui-ci se complexifie par l'arrivée de micro-organismes unicellulaires appartenant au pico-organisme autotrophe décrit ci-dessus mais également aux micro-algues de plus grande taille, le microphytobenthos, principalement des diatomées (Bacillariophycées) en milieu tempéré et tropical (De philippis et al. 2005, Patil & Anil 2005). Ce sont des organismes unicellulaires à plastes bruns, jaunes ou verts jaunâtres. Ces organismes sont caractérisés par la présence d'une capsule protectrice siliceuse appelé frustule. Cette carapace est constituée de deux parties emboîtées symétriques. Les diatomées sont divisées en deux groupes, les Centrales et les Pennales. Cette distinction se fait selon la géométrie de leur frustule : les centrales regroupent les diatomées circulaires à symétrie radiale (les stries rayonnent depuis un point ou une auréole) alors que les Pennales regroupent les individus ayant une frustule allongée à symétrie bilatérale (les stries sont disposées autour de la symétrie bilatérale). De plus, de nombreuses Pennales disposent d'une fente sur le plan de symétrie appelé raphé. La taille et l'ornementation de leur frustule permettent d'identifier les différentes espèces constituant cette classe.

### V.1. Abondance et richesse des populations de diatomées des biofilms.

Les abondances totales (Figure 72) et relatives (Figure 73) ainsi que la diversité spécifique des micro-algues sur les sept revêtements immergés ont été analysées après récupération par grattage des revêtements, fixation au lugol, identification (au niveau du genre essentiellement) et comptage sous microscope inversé. Afin de faciliter la lecture des graphiques, seules les espèces présentes à plus de 2% ont été représentées (l'intégralité des espèces et des données sont rapportées dans l'annexe IV I).

En ce qui concerne la densité totale, il apparaît clairement que le PVC et IT757 sont les substrats colonisés par le plus grand nombre d'organismes (Tableau 37). SQT, IS360, SL04A et A3S présentent des valeurs de densité plus faibles. L'ANOVA confirme bien des valeurs significativement très différentes entre elles ( $p < 0,0001$ ), ce qui indique aussi que les triplicats sont assez proches en terme de communauté de diatomées. Le post-test de comparaison multiple de Bonferroni montre que le PVC est significativement différent ( $p < 0,0001$ ) des autres revêtements (sauf avec IT757 où  $p < 0,01$  seulement). De même IT757 est significativement différent ( $p < 0,0001$ ) des autres revêtements excepté NEX ( $p > 0,05$ ). Il semble enfin que les autres peintures ne présentent aucune différence significative entre elles ( $p > 0,05$ ).

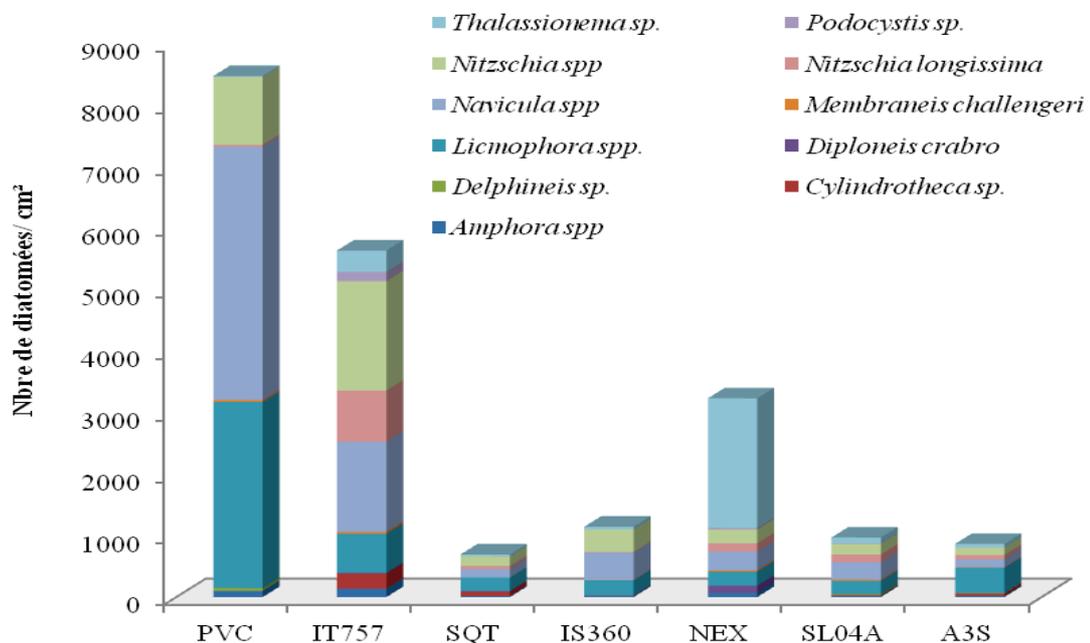


Figure 72 : Densités des diatomées sur les sept supports immergés

Sur les sept supports, 40 espèces ont été identifiées à des densités variables. Néanmoins la richesse de chaque revêtement reste assez proche étant donné qu'elle se situe

entre 9 et 14 espèces. IT757 est le support qui possède la plus grande richesse, alors que le PVC est le moins riche. Néanmoins d'après une ANOVA à un facteur suivi du post test de Tukey, aucune différence n'a été trouvée entre les autres revêtements ( $p > 0,05$ ) (Tableau 37). Certains organismes ne sont observés que sur un seul revêtement tels que *Gyrosigma* sp., *Synedra undulata*, etc... alors que d'autres tels que *Navicula* spp, *Amphora* spp., *Membraneis challengeri* ont colonisé tous les substrats. La majorité des organismes trouvés appartiennent à la famille des Pennées.

Afin de mieux visualiser les répartitions entre espèces, les données de densités sont transformées en pourcentages relatifs en tenant compte du fait que seuls les organismes présents à plus de 2% sont représentés sur la Figure 73. Des classes de dominance ont ensuite été définies : si une espèce est présente à plus de 25% sur le support, elle est considérée comme dominante alors que lorsqu'elle est présente à plus de 10% sur le support (sous-entendu inférieure à 25%), elle est définie comme sub-dominante. (annexe IV II)

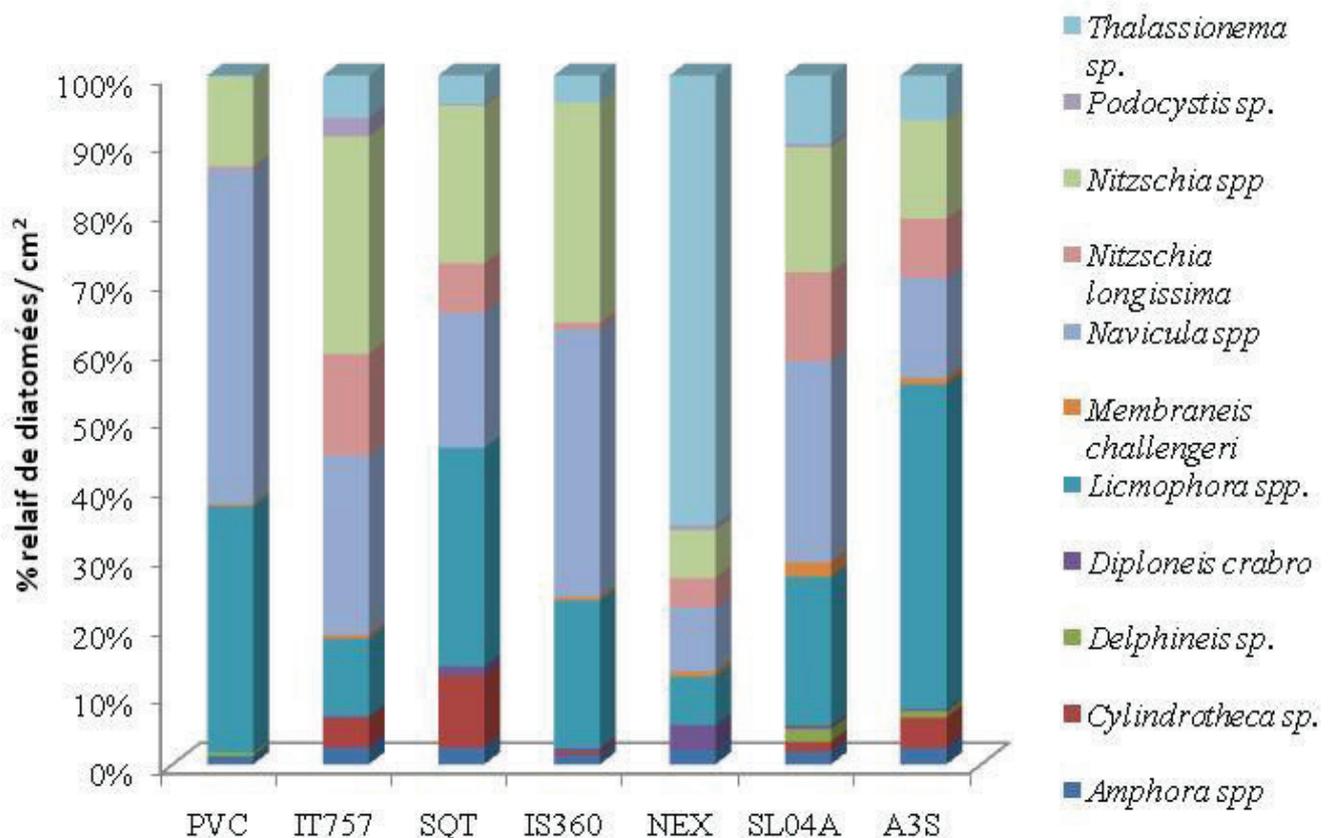


Figure 73 : Densités relatives des diatomées sur les sept substrats immergés

Les espèces majoritaires sont souvent les mêmes quelque soit le revêtement (Tableau 37, Figure 74). *Licmophora* sp. prédomine à plus de 25% sur trois d'entre eux (PVC, SQT,

A3S) et se retrouve au moins à 10% sur trois autres (IT757, SL04A et IS360). *Navicula* spp. sont dominantes sur le PVC, SL04A et sur IS360 et seul NEX ne les compte pas parmi ses espèces dominantes ou sub-dominantes. De même, *Nitzschia* spp. est sub-dominante sur tous les revêtements et dominantes sur IT757 et IS360. Globalement, seul NEX présente une structure de communauté assez différente. En effet, il est recouvert essentiellement par *Thalassionema* sp. qui fait partie des espèces minoritaires sur les autres revêtements. Les autres espèces fixées ne vont jamais excéder 10%, faisant de celui-ci un support sélectif.

	Densité totale (nb cellules /cm <sup>2</sup> )	Indice de Shannon (H')	Richesse spécifique	Espèces majoritaires	
				>25 %	25 > % >10
<b>PVC</b>	8723±2026	1,7 ± 0,19	9 ± 1	<i>Navicula</i> spp. (47%) <i>Licmophora</i> spp. (35%)	<i>Nitzschia</i> spp. (13%)
<b>IT757</b>	5768±723	2,7 ± 0,15	14 ± 5	<i>Nitzschia</i> spp. (31%)	<i>Navicula</i> spp. (25%) <i>Licmophora</i> spp. (11%) <i>Nitzschia longissima</i> (14%)
<b>SQT</b>	799±260	2,6 ± 0,18	12 ± 1	<i>Licmophora</i> spp. (30%)	<i>Navicula</i> spp. (18%) <i>Nitzschia</i> spp. (21%)
<b>IS360</b>	1176±214	2,0 ± 0,31	12 ± 5	<i>Navicula</i> spp. (38%) <i>Nitzschia</i> spp. (31%)	<i>Licmophora</i> spp. (21%)
<b>NEX</b>	3365±452	2,0 ± 0,28	11 ± 1	<i>Thalassionema</i> sp. (63%)	
<b>SL04A</b>	990±143	2,5 ± 0,06	11 ± 1	<i>Navicula</i> spp. (28%)	<i>Licmophora</i> spp. (21%) <i>Nitzschia longissima</i> (13%) <i>Nitzschia</i> spp. (18%)
<b>A3S</b>	887±160	2,3 ± 0,33	10 ± 4	<i>Licmophora</i> spp. (46%)	<i>Nitzschia</i> spp. (14%) <i>Navicula</i> spp. (14%)

Tableau 37: Densité totale, indice de diversité (H') et espèces dominantes (>25%) et sub-dominantes (25>%>10) des diatomées sur les revêtements immergés.



Figure 74 : Photographies de (a) *Licmophora* spp. isolée sur PVC (b) *Nitzschia* sp. isolée sur PVC (c) *Thalassionema* sp isolée sur NEX.

Il apparaît aussi clairement qu'il existe des différences importantes entre les communautés de microphytobenthos et planctoniques dans la Rade de Toulon, Ces dernières sont plutôt constituées de diatomées centriques (eg *Chaetoceros* spp.) et de Dinophycées en général (Rossi, 2008). Plus précisément, le microphytobenthos présent dans la colonne d'eau de la rade de Toulon au mois de juin 2010 pendant notre étude d'immersion était constituée essentiellement de Dinophycées (D. Jamet, PROTEE, USTV, com. pers.). Quelques diatomées appartenant principalement à la famille des centriques telles que *Cyclotella* sp., *Leptocylindrus danicus*, *Pseudonitzschia delicatissima* ou *Navicula* sp. ont aussi été détectées avec des abondances relatives faibles (< 1%). On peut noter que la majorité de ces genres ne se retrouvent pas sur les supports étudiés.

### **V.2. Diversité des populations de diatomées des biofilms.**

Les indices sont plutôt de valeurs moyennes et varient peu d'une peinture à l'autre, compris entre ~2,0 (NEX et IS360) et  $2,7 \pm 0,15$  (IT757) (Tableau 37). Le PVC montre la diversité la plus faible ( $H'=1,7 \pm 0,19$ ). L'indice de diversité semble montrer qu'IT757, SL04A et SQT sont les supports les moins sélectifs au niveau de l'adhésion des diatomées, étant donné qu'ils possèdent les indices les plus forts. Néanmoins d'après une ANOVA à un facteur suivi du post test de Tukey, il apparaît que IT757 soit significativement différent de PVC et de NEX ( $p < 0,05$ ). Aucune différence n'a été trouvée entre les autres revêtements ( $p > 0,05$ ). Comme pour les bactéries, il n'y a pas de relation ( $R^2=0,2$  et  $p > 0,05$ ) entre la densité totale de micro-algues dans les biofilms et la diversité.

### **V.3. Comparaison des communautés de diatomées des biofilms en termes de biovolumes.**

Les différentes espèces de diatomées possèdent des tailles différentes et le comptage n'est pas suffisant pour estimer correctement le recouvrement effectif d'un substrat. En effet, les cellules de petites tailles peuvent être nombreuses mais recouvrir un plus faible pourcentage du support que des diatomées de plus grandes tailles même si elles sont moins nombreuses. Pour estimer leur biovolume et ne pas être confronté à une complexité trop importante difficilement compatible avec une observation par microscopie classique et non par microscopie électronique à balayage, les cellules des diatomées ont été assimilées grossièrement à des cylindres. *Licmophora* sp. a été l'exception en raison de sa forme particulière qui a nécessité une formule plus complexe pour le calcul du biovolume

(Hillebrand et al. 1999). Pour cette étude, seuls les organismes présents à plus de 5% ont été pris en compte. Les densités exprimées en  $\text{cm}^3 / \text{cm}^2$  sont données dans la Figure 75.

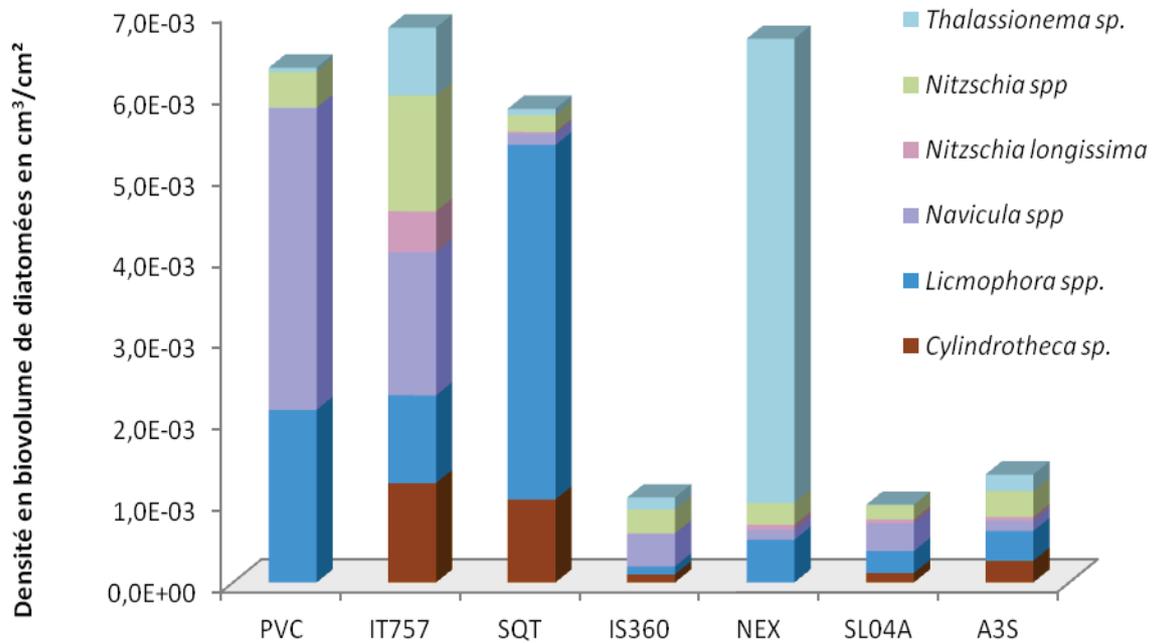


Figure 75: Densités des diatomées (exprimées en biovolume =  $\text{cm}^3/\text{cm}^2$ ) sur les sept substrats immergés

### V.3.1. Densités totales

Si on s'intéresse à l'espace occupé par les diatomées sur le support et non plus à leur abondance uniquement, il apparaît clairement que le recouvrement des revêtements n'est plus exactement le même. Cela est particulièrement vrai pour SQT qui semblait faire partie des peintures les plus efficaces mais qui en fait est quasiment aussi recouverte que le PVC en terme de surface. La même tendance ressort pour NEX et IT757 dans une moindre mesure. Pour SQT et NEX, l'espace va surtout être occupé par une seule espèce, qui est différente pour les deux supports. SQT est majoritairement recouvert par *Licmophora spp.* malgré le fait qu'elle n'était présente qu'à 30%. *Nitzschia* qui était le genre dominant en abondance, occupe en fait un espace plus restreint sur le revêtement. Le cas de NEX est un peu différent puisque la conversion en biovolume ne fait qu'amplifier la dominance en abondance de *Thalassionema sp.* qui était présent à plus de 60% sur le revêtement. Au sujet d'IS360, SL04A et A3S le passage en biovolume des diatomées majoritaires ne semble pas modifier l'analyse de leurs efficacités relatives.

### V.3.2. Densités relatives

Si à présent on compare les abondances relatives et les dominances relatives (en biovolume) de chaque support, des modifications de dominance apparaissent (Figure 76). Les dominances pour PVC et NEX ne changent pas, excepté qu'il n'y a plus d'espèces sub-dominantes pour le PVC. En ce qui concerne IS360, SQT, A3S et SL04A, quelques changements apparaissent comme cela est montré dans le Tableau 38.

	Espèces majoritaires en abondance		Espèces majoritaires en biovolume	
	>25 %	25 > % >10	>25 %	25 > % >10
<b>PVC</b>	<i>Navicula</i> spp. (47%) <i>Licmophora</i> spp. (35%)	<i>Nitzschia</i> spp. (13%)	<i>Navicula</i> spp. (59%) <i>Licmophora</i> sp. (34%)	-
<b>IT757</b>	<i>Nitzschia</i> spp. (31%)	<i>Navicula</i> spp. (25%) <i>Nitzschia longissima</i> (14%) <i>Licmophora</i> sp. (11%)	<i>Navicula</i> spp. (26%)	<i>Nitzschia</i> spp. (21%) <i>Cylindrotheca</i> sp. (18%) <i>Licmophora</i> spp (16%) <i>Thalassionema</i> sp.(12%)
<b>SQT</b>	<i>Licmophora</i> sp. (30%)	<i>Nitzschia</i> spp. (21%) <i>Navicula</i> spp. (18%)	<i>Licmophora</i> spp. (75%)	<i>Cylindrotheca</i> sp. (18%)
<b>IS360</b>	<i>Navicula</i> spp. (38%) <i>Nitzschia</i> spp. (31%)	<i>Licmophora</i> spp. (21%)	<i>Navicula</i> spp. (38%) <i>Nitzschia</i> spp. (28%)	<i>Thalassionema</i> sp.(14%)
<b>NEX</b>	<i>Thalassionema</i> sp. (63%)	-	<i>Thalassionema</i> sp.(85%)	-
<b>SL04A</b>	<i>Navicula</i> spp. (28%)	<i>Licmophora</i> spp. (21%) <i>Nitzschia longissima</i> (13%) <i>Nitzschia</i> spp. (18%)	<i>Navicula</i> spp. (36%) <i>Licmophora</i> spp. (29%)	<i>Nitzschia</i> spp. (18%)
<b>A3S</b>	<i>Licmophora</i> sp. (46%)	<i>Nitzschia</i> spp. (14%) <i>Navicula</i> spp. (14%)	<i>Licmophora</i> spp. (28%)	<i>Nitzschia</i> spp. (24%) <i>Cylindrotheca</i> sp. (20%) <i>Thalassionema</i> sp. (15%)

Tableau 38 : Comparaison des dominances relatives des espèces dominantes et sub-dominantes en abondances et en biovolumes.

Bien que toujours dominante pour A3S, *Licmophora* sp. ne représente plus que 28% en biovolume contre 46% en abondance, notamment en raison de l'importance de *Thalassionema* qui passe de 6 % à 15%. Au contraire, *Licmophora* sp. devient dominante pour SL04A. *Thalassionema* sp. devient l'espèce sub-dominante pour IS360 à la place de *Licmophora* spp, et pour A3S à la place de *Navicula* spp.

D'autres modifications apparaissent dans la hiérarchisation des espèces sub-dominantes pour ces revêtements mais de façon moins spectaculaire. *Navicula* spp. deviennent dominantes chez IT757, à la place de *Nitzschia* spp. qui devient une espèce sub-dominante. D'autres espèces considérées comme minoritaires sur les revêtements en termes de densité numérique deviennent sub-dominantes comme *Cylindrotheca* sp. pour IT757, SQT et A3S. Au contraire, *Nitzschia longissima* qui était sub-dominante pour IT757et SI04A n'occupe qu'une faible place sur le support et n'est donc plus considérée comme sub-dominante en termes de biovolumes. Pour SQT et NEX, la dominance de *Licmophora* sp. et de *Thalassionema* sp. respectivement est encore accentuée par l'expression des densités en biovolumes.

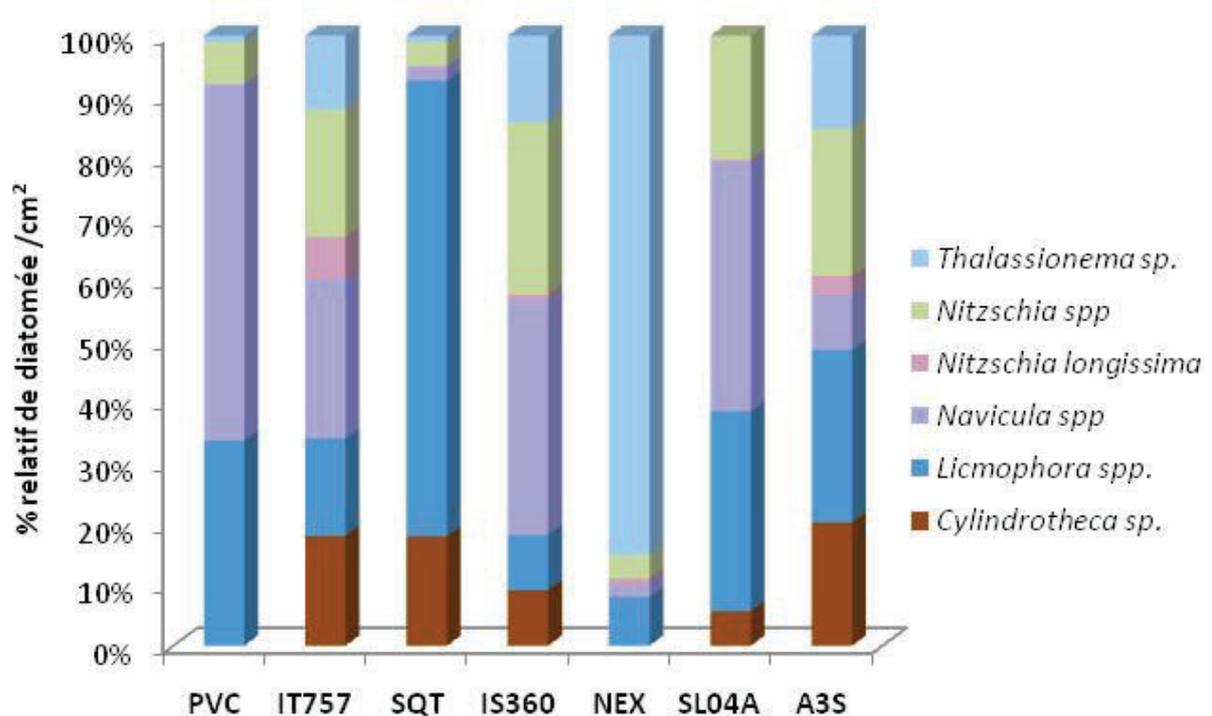


Figure 76 : Densités relatives des diatomées (exprimées en biovolume) sur les sept substrats immergés

## VI. Discussion générale sur la composition des biofilms présents sur les revêtements immergés dans la rade de Toulon.

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe résultant de l'interaction entre les micro-organismes, les surfaces colonisées et les autres éléments du biotope (Lee et al. 2008). Il est donc important de prendre en compte les divers organismes qui le constituent, et voir comment agissent les revêtements sur chacun d'entre eux.

### **VI.1. Densités globales des biofilms sur revêtements immergés**

Au vu des résultats obtenus pour les différents groupes de micro-organismes qui composent les biofilms sur les revêtements après un mois d'immersion dans la rade de Toulon, on constate que les diatomées sont le clade minoritaire en terme de nombre sur les revêtements, bien en dessous des bactéries et des picocyanobactéries. En toute logique, les organismes eucaryotes, qui sont les organismes les plus grands globalement, y compris en tenant compte des nanoeucaryotes, ont des densités significativement plus faibles que les procaryotes (Figure 77 et 78).

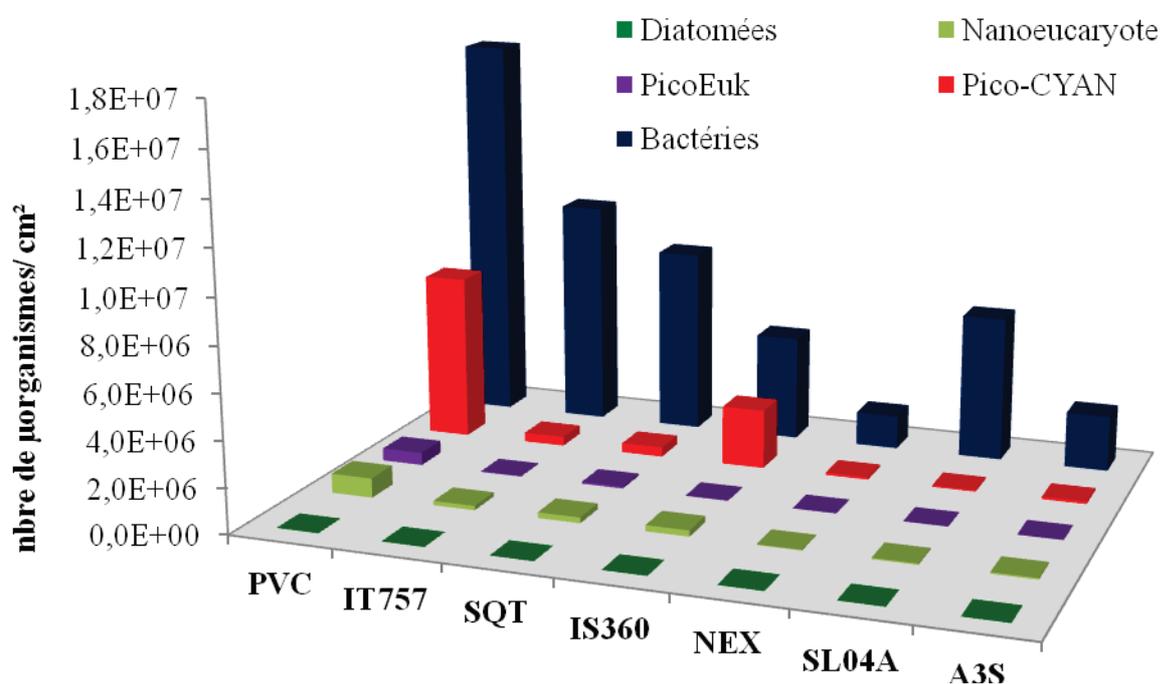


Figure 77: Densité globale des micro-organismes présents dans les biofilms sur les sept revêtements immergés durant 1 mois

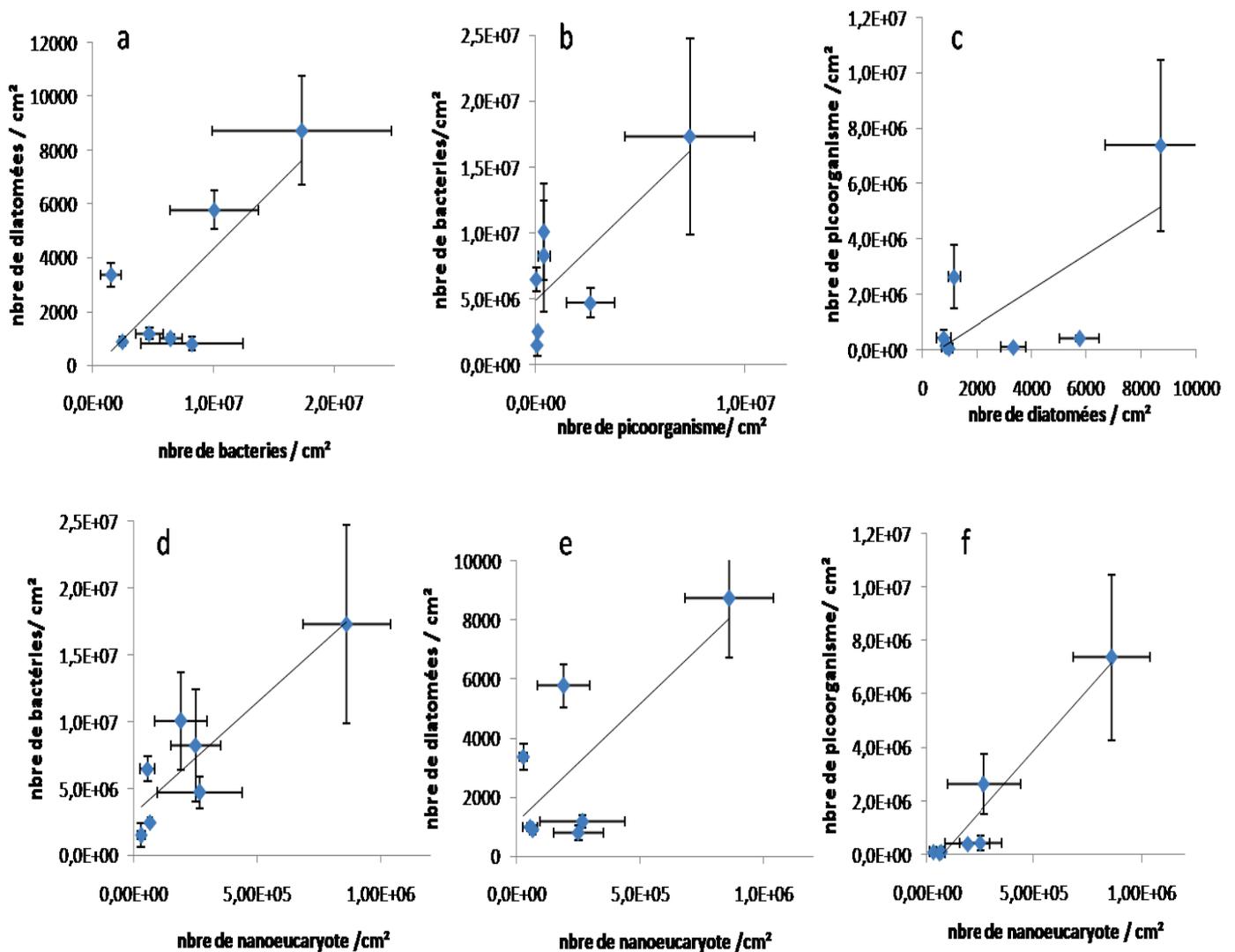


Figure 78: Relations entre l'abondance bactérienne sur les supports immergés et l'abondance (a) des diatomées ( $R^2=0,61$ ,  $p<0,05$ ,  $n=7$ ) et (b) des pico-organismes ( $R^2=0,57$ ,  $p<0,05$ ,  $n=7$ ), (c) entre les diatomées et le pico-organisme ( $R^2=0,476$ ,  $p>0,05$ ,  $n=7$ ), (d) entre les bactéries et les nanoeucaryotes ( $R^2=0,79$ ,  $p<0,05$ ,  $n=7$ ), (e) entre les nanoeucaryotes et les diatomées ( $R^2=0,56$ ,  $p>0,05$ ,  $n=7$ ) et (f) entre les nanoeucaryotes et les pico-organismes ( $R^2=0,93$ ,  $p<0,05$ ,  $n=7$ )

Nous avons regardé s'il existait des relations entre les densités de ces différents groupes de micro-organismes (Figure 78). Une corrélation positive significative ( $p<0,05$ ) peut être constatée entre les bactéries hétérotrophes et les diatomées ( $R^2=0,61$ ), les bactéries hétérotrophes et les pico-organismes (picoEuk+Pico-CYAN) ( $R^2=0,57$ ) et entre les nanoeucaryotes et tous les autres organismes présents dans les biofilms. Une corrélation non significative a été trouvée entre les pico-organismes et les diatomées ( $p>0,05$ ) indiquant qu'il n'y a pas de corrélation entre les densités de ces deux types d'organismes.

Si on regarde globalement les communautés microbiennes des revêtements, on s'aperçoit que (i) le PVC et IT757 sont plus colonisés par tous les groupes d'organismes que les cinq peintures antifouling de type SPC, et en particulier A3S qui semblent la plus efficace (ii) certains revêtements sont clairement plus efficaces contre certains groupes de micro-organismes que d'autres. NEX, le revêtement significativement le plus actif contre les bactéries hétérotrophes et les nanoeucaryotes est aussi parmi les trois revêtements les plus actifs contre les picocyanobactéries (avec A3S et SL04A). Cependant il n'est pas parmi les quatre revêtements les plus actifs sur les diatomées (A3S, IS360, SL04A et SQT). Au contraire, SL04A et IS360 semblent efficaces contre les diatomées mais pas contre les procaryotes (bactéries hétérotrophes pour SL04A et bactéries hétérotrophes et picocyanobactéries pour IS360).

### ***VI.1.1. Bactéries hétérotrophes***

Au vu des résultats, et donc dans nos conditions statiques, il apparaît clairement que NEX et A3S sont des peintures fortement actives contre l'adhésion bactérienne contrairement à IT757, SQT ou IS360. D'autres études ont été réalisées sur la composante bactérienne des biofilms pour IS360 et Intersleek 700 (Molino et al. 2009b) et SQT (Cassé & Swain, 2006). Une d'entre elles a été réalisée en juillet/août dans les eaux tempérées du chantier naval de Williamstown (Australie). Elle montre des différences de pourcentage de recouvrement bactérien entre Intersleek 700, colonisé à 62%, et IS360 recouvert à 46% après 16 jours d'immersion (Molino et al. 2009b). Durant cette étude basée sur une analyse d'image prise au microscope à épifluorescence après marquage au Hoechst 33342, les cyanobactéries et les bactéries n'ont pas pu être discriminées contrairement à notre étude. Néanmoins, ces valeurs sont assez proches de nos pourcentages de recouvrement (IT757 77% et IS360 36%). Les auteurs montrent aussi que les peintures sont plus rapidement colonisées dans des eaux tropicales (après 16 jours d'immersion Intersleek 700 est recouvert à 90% et IS360 à 82%). Néanmoins il semble que IS360 empêche la formation en champignon (3D) des biofilms et ce dans les deux environnements. Ceci indique logiquement que les conditions environnementales influent sur l'efficacité des revêtements. SQT et IT757 ne montrent pas de différence en conditions statiques, ce qui a également été observé par Cassé & Swain (2006) sur des coupons recouverts de SQT et d'une autre peinture de type FRC immergés durant 60 jours à partir de mars dans la rivière « Indian Lagoon » en Floride. Par contre, en immersion dynamique, le FRC possède une densité bactérienne inférieure à SQT. Par ailleurs, il semble que les FRC possédaient une plus

grande diversité que les SPC, mais cela ne semble pas être le cas dans notre analyse. Pelletier et al. (2009) n'observe pas non plus de grosses différences de colonisation bactérienne après dénombrement en cytométrie en flux entre différents revêtements incluant des peintures auto-polissantes et des FRC.

En ce qui concerne les résultats obtenus pour les deux groupes bactériens HNA et LNA, il semble que la différence de fluorescence soit liée en partie à la taille de la bactérie. En effet, plus la bactérie est grande plus elle contiendra d'ADN et donc plus elle aura une intensité de fluorescence élevée après marquage au DAPI. Une étude réalisée par Gasol et al. (1999) sur la concentration relative de chaque groupe a montré que les bactéries HNA étaient plus denses et plus larges que les bactéries LNA. D'autres auteurs ont montré aussi que la présence de bactéries HNA était généralement plus marquée dans les zones riches en chlorophylle. En effet cela signifie qu'il y a plus de matière organique à dégrader et donc plus de ressource nutritive. Les bactéries LNA se trouveraient donc plus en profondeur donc mieux adaptées à un manque de nutriment (Thyssen et al. 2005; Winter et al. 2009). Mais ce raisonnement ne semble pas transposable au cas des biofilms puisque un des avantages de la vie sessile est d'obtenir une meilleure disponibilité en nutriments. Il est alors possible que la différence de fluorescence entre ces deux groupes soit plutôt liée à l'activité métabolique des bactéries. En effet les bactéries HNA seraient responsables en grande partie de la dynamique de la communauté alors que les bactéries LNA seraient plutôt des cellules endommagées ou possédant un mode de vie ralenti (Lebaron et al. 2001; Longnecker et al. 2005). Si on considère que les revêtements AF sont utilisés pour empêcher ou du moins ralentir la fixation des micro-organismes, il n'est pas illogique que les biofilms soient particulièrement constitués de bactéries possédant un métabolisme ralenti. Enfin, comme les prédateurs semblent préférer des bactéries plus grosses ou métaboliquement actives, il est également possible que le fait que l'expérience soit réalisée en été, saison où la thermocline apparaît et donc où la quantité de prédateurs augmente, entraînent une diminution relative des bactéries HNA dans la colonne d'eau (Gasol et al. 1999; Longnecker et al. 2005). Il faut noter que toutes les études réalisées sur la répartition et l'abondance des deux groupes bactériens HNA et LNA ont été réalisées sur la colonne d'eau et jamais sur le biofilm. C'est pourquoi d'autres études doivent être effectuées afin de voir si cette dominance particulière des LNA est due à une sélection spécifique des revêtements ou simplement reflète l'activité métabolique des bactéries au sein des biofilms.

Concernant la structure des communautés bactériennes, aucune étude n'a été réalisée sur peinture AF, à part celle de Cassé & Swain (2006) mais après mise en culture, ce qui en

plus de ne concerner qu'entre 1 et 5 % des bactéries, n'est pas représentatif des communautés *in situ*. Les seules données de structure de communautés des biofilms sur surfaces artificielles concernent des revêtements en verre, polystyrène ou acier. Les structures des communautés sur ce type de revêtements non toxiques, étudiées essentiellement avec des techniques d'empreintes moléculaires (DGGE, T-RFLP) semblent converger quelles que soient les propriétés initiales (Jones et al. 2007; Hung et al. 2008; Huggett et al. 2009). Au contraire, nos données DGGE indiquent clairement des différences entre les revêtements, notamment entre les peintures auto-polissantes d'une part et les revêtements sans biocides (PVC et IT757) d'autre part, et ce pour des temps d'immersion supérieurs à ceux des études citées précédemment. Une étude précédente dans la Rade de Toulon sur 15 jours avait montré également des différences de communautés entre les substrats non toxiques (PS et téflon) d'une part et les mêmes peintures AF (SQT, IS360 et SL04A) d'autre part. De plus, les OTU communes semblaient plus important que dans notre cas (Briand et al. 2010). Une étude approfondie des communautés des peintures AF notamment avec identification des bactéries par clonage-séquençage et analyse de la dynamique de la colonisation serait nécessaire.

#### ***VI.1.2. Recouvrement par les pico-organismes et les nanoeucaryotes autotrophes et les micro-algues***

L'étude par cytométrie en flux des communautés de pico-organismes autotrophes de biofilms de surfaces artificielles n'avait encore jamais été réalisée. La présence de cyanobactéries de type *Synechococcus* était décrite (Nayar et al. 2005) mais sans quantification précise et sans distinction entre les PC-CYAN et le PE-CYAN. Cette affiliation reste à confirmer dans notre cas, mais serait cohérente avec les données de colonne d'eau en méditerranée (Bec et al. 2011).

Si à présent on s'intéresse aux organismes autotrophes en général, on constate que ceux-ci sont très présents sur le PVC. En ce qui concerne A3S, son efficacité semble aussi forte pour les pico-organismes et les diatomées que pour les bactéries. Néanmoins certaines peintures vont présenter des caractéristiques différentes en fonction des organismes étudiés, on parle de mode d'action plus sélectif. SL04A semble plus actif sur les organismes photosynthétiques. Par contre NEX est moins active sur les diatomées que contre les pico-organismes en général et les nanoeucaryotes.

Concernant la diversité observée pour les bactéries et les diatomées, il n'est pas étonnant qu'il n'y ait pas de relation claire. Il est tout à fait possible qu'un revêtement

possède une espèce dominante capable de recouvrir tout le substrat, alors qu'un autre présentera une grande diversité mais avec une faible quantité d'individus. Cela se voit plus particulièrement pour le PVC qui présente la plus forte quantité de micro-organismes mais une faible diversité. Il semble même que les revêtements les plus actifs, tels qu'A3S ou SL04A, montrent une diversité moyenne.

La dominance dans les biofilms des pennées par rapport aux centriques est bien connue dans la littérature, de même que la différence entre les communautés planctoniques et benthiques (eg Cooksey & Wigglesworth-Cooksey 1995; Braithwaite & McEvoy 2004; Patil & Anil 2005, Cassé & Swain 2006, Mitbavkar & Anil 2008, Chiu et al. 2008). Une étude réalisée sur le recouvrement de Diatomées sur Intersleek 700 et IS360 confirme que la première est plus colonisée que la deuxième, mais, d'après les auteurs, il semble que cette colonisation soit plus liée au biofilm bactérien qu'à la nature du substrat (Molino et al. 2009a). La corrélation trouvée entre la densité de bactéries et celle des diatomées pourrait aller dans ce sens. De plus il semble que les supports ne possédant pas de biocides soit souvent recouverts par des *Navicula* qui est aussi l'espèce dominante sur les supports en verre et en fibre de verre, suivi par *Amphora*, *Nitzshia* et *Thalassionema* (Patil & Anil 2005). D'autres genres qui dominent dans nos peintures comme *Cylindrotheca* ou *Licmophora* ont aussi été décrits sur des peintures AF (Molino et al. 2009; Pelletier et al. 2009). Cassée & Swain (2006) montrent également que *Navicula* est moins présent sur les FRC que sur les SPC ce qui ne semble pas être notre cas. L'autre genre qui semble récurrent sur les peintures et particulièrement sur les FRC dans la littérature est *Amphora* (Cassé & Swain 2006; Pelletier et al. 2009). Ce genre est présent sur l'ensemble de nos revêtements mais jamais à plus de 2%. Il semble que cette diatomée soit résistante à certains biocides tels que le cuivre (Almeida et al. 2007; Molino & Wetherbee 2008; Pelletier et al. 2009).

## **VI.2. Comparaison avec des études réalisées précédemment dans la Rade de Toulon sur les communautés de diatomées.**

D'autres études ont été réalisées au sein de notre laboratoire sur la diversité des diatomées sur NEX, SQT et IS360, sur des durées d'immersion de quinze jours, quatre et six semaines (Briand et al. 2010). Dans un premier temps les résultats obtenus après un mois d'immersion sont comparés aux nôtres (Figure 79). La première immersion a eu lieu au mois d'avril alors que la deuxième s'est effectuée au mois de juillet.

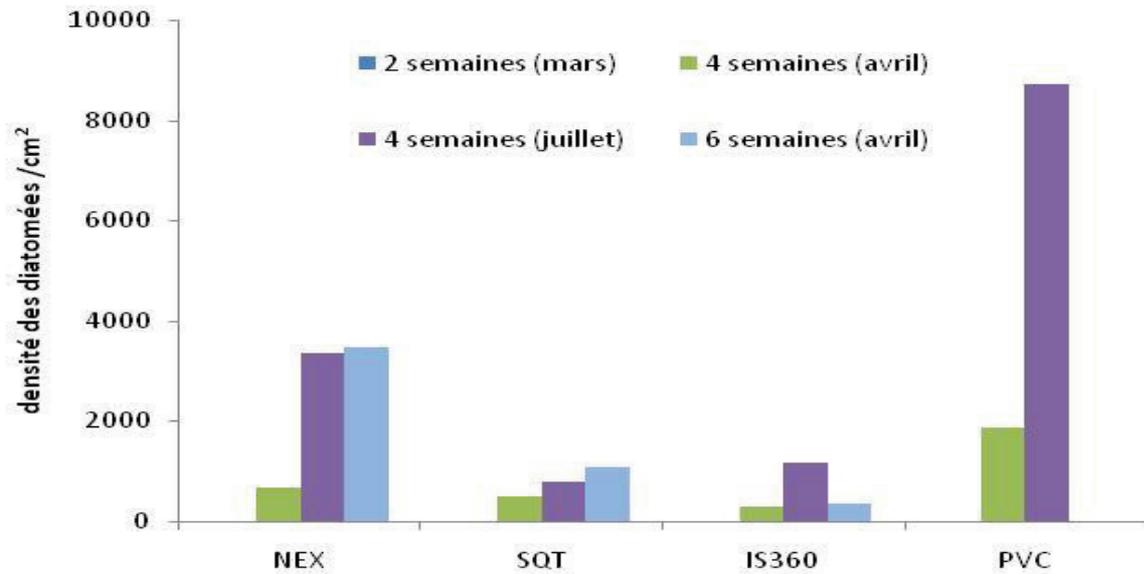


Figure 79: Comparaison des densités de Bacillariophycées récupérées après deux, quatre et six semaines d’immersion.

Malgré des différences de valeurs de densités obtenues entre les deux expériences à 4 semaines, pouvant être attribuée à la période et donc à une pression de fouling plus importante en été par rapport au printemps, une bonne corrélation ( $R^2=0,96$ ,  $p<0,05$ ,  $n=4$ ) a été obtenue, suggérant que l’efficacité des peintures reste globalement la même pour les diatomées. En fonction de la durée d’immersion, la biomasse augmente logiquement sur les supports (Figure 79), mais, là encore, l’efficacité reste proportionnelle au cours du temps. Pour IS360, les quantités d’organismes fixés à quatre et six semaines sont cependant très proches. Le fait qu’au mois de juillet, la biomasse soit plus importante sur ce revêtement est certainement lié à l’augmentation des communautés micro-algues dans le milieu marin. Cela a déjà été proposé par Patil & Anil (2005). Il aurait été intéressant de voir si, après six semaines d’immersion en juillet, cela se confirmait.

La dominance des espèces change d’une période d’immersion à l’autre, exceptée pour IS360. En effet, tous les autres supports vont être dominés par *Navicula* sp. Néanmoins la forte dominance par une espèce obtenue en juillet pour NEX n’apparaît pas lors de cette étude. En effet aucune espèce dominante (>25%) n’a été observé pour ce revêtement au mois d’avril. En ce qui concerne la diversité, aucune tendance claire n’a pu être dégagée en comparant nos données à celles des autres immersions dans la rade.

Entre les expériences menées à quatre et six semaines pour la même période l'indice de Shannon diminue pour les trois revêtements indiquant peut être qu'au cours du temps les peintures deviennent plus sélectives. Cela semble particulièrement vrai pour NEX puisque, lors de l'étude effectuée en juillet, une seule espèce recouvrait la quasi totalité du support. Une telle dominance s'est retrouvée pour l'immersion de six semaines. En effet ce support était alors colonisé à plus de 80% par *Nitzschia* sp. cette fois-ci, faisant de celui-ci un substrat très sélectif.

Après 15 jours d'immersion seulement une dizaine d'espèces sont identifiées sur les revêtements. Ceux-ci sont tous dominés par *Licmophora* et *Cylindrotheca*. Au cours du temps les structures des communautés de diatomées se sont complexifiées et les dominances ont changé (essentiellement *Nitzschia* et *Navicula* à quatre et six semaines). *Licmophora* reste l'espèce majoritaire sur quatre substrats (Figure 80). Il pourrait être intéressant de réaliser ces diverses expériences sur des temps d'immersion plus longs ou encore de faire un suivi saisonnier.

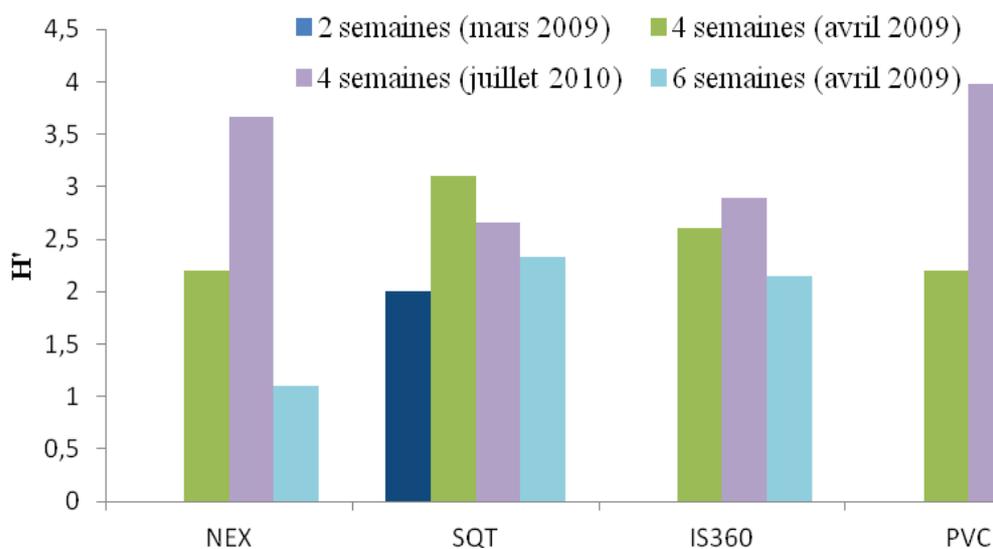


Figure 80 : Comparaison de l'indice de Shannon des diatomées sur quatre revêtements pour des temps d'immersion différents dans la rade de Toulon.

### VI.3 Rôle de l'énergie de surface.

Afin de déterminer s'il existe une relation entre l'hydrophobicité (valeur d'angle de contact des revêtements données dans le Chapitre IV II.3) et les différentes quantités de micro-organismes présentes sur ces revêtements, les coefficients de détermination ont été

calculés (39). Aucun lien significatif n'a été obtenu entre les trois groupes de micro-organismes présents sur les substrats et l'énergie de surface ( $p > 0,05$ ). Ces résultats ne sont pas surprenant dans la mesure où des études démontrent que l'énergie de surface intervient pendant la première heure d'immersion, déterminant peut-être la composition du biofilm primaire, mais, après un mois d'immersion, les organismes ne vont plus réellement interagir avec le substrat mais plutôt avec les communautés déjà présentes sur ce dernier (Jones et al. 2007; Hung et al. 2008; Huggett et al. 2009; Chung et al. 2010). L'adhésion bactérienne dépend également de la tension de surface de l'eau. En effet, il semble que les bactéries vont plutôt adhérer sur des surfaces hydrophiles si l'énergie de surface de la bactérie est plus forte que la tension de surface de l'eau alors que si cette tension devient trop forte, les bactéries se fixeront plutôt sur des surfaces hydrophobes (Genzer & Efimenko 2006).

		<b>Bactéries</b>	<b>Pico-organisme</b>	<b>Nanoeucaryote</b>	<b>Diatomées</b>
Angle	R <sup>2</sup>	0,01	0,00	0,03	0,06
de	p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
contact	n	7	7	7	7

Tableau 39 : Corrélation entre les organismes des biofilms présents sur les supports immergés et l'énergie de surface

#### **VI.4. Rôle de la composition en biocides des peintures AF.**

Afin de voir si l'efficacité de ces revêtements est liée à leur composition en biocides, les substances actives des substrats étudiés sont comparées. Comme il est décrit dans le Chapitre I-IV.1, il existe différents types de peintures. Dans cette étude, une peinture érodable (SL04A) a été étudiée. Celle-ci repose sur la libération plus ou moins contrôlée des biocides sous l'action des frottements de l'eau. IS360, SQT, NEX et A3S sont des peintures dites auto-polissantes, c'est-à-dire que les substances actives sont libérées lentement par hydrolyse du support. L'IT757, quant à elle, est une peinture ultra-lisse sans biocide. L'action des peintures va donc dépendre probablement du type de mécanisme et des biocides qui les composent. Le manque d'efficacité d'IT757 peut clairement être expliqué par le fait que cette expérience a été réalisée en mode statique. Au sein des peintures auto-polissantes, l'efficacité et la composition des biofilms vont être directement liées aux différentes substances actives qui les composent. Celles-ci sont décrites dans le Tableau 40.

On note que ces mélanges sont assez complexes et qu'il existe plusieurs différences de composition entre chaque peinture ce qui rend l'analyse difficile.

	NEX	SQT	SL04A	IS360	A3S
Substances actives			Cu <sub>2</sub> O		
			ZnO		Cu <sub>2</sub> O
	4-Bromo-2-(P-chlorophényl)-5-(trifluorométhyl) pyrrole-3-carbonitrile	Cu <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	Cu <sub>2</sub> O	ZnPy
		ZnO	A4S	ZnPy	CuSCN
	Isothiazolone	CuPy	Zineb		
		SN			

Tableau 40 : Composition en biocides des peintures AF étudiées.

(Cu<sub>2</sub>O=oxyde cuivre, CuPy=pyrithione de cuivre, CuSCN=Thiocyanate de cuivre, ZnPy=pyrithione de zinc, ZnO=oxyde de Zn, TiO<sub>2</sub>=dioxyde de titane, SN=Sea Nine)

On peut observer que quatre des cinq peintures contiennent de l'oxyde de cuivre (biocide à large spectre), associé dans deux cas à un autre composé cuivré. Les quatre mêmes peintures contiennent de la pyrithione de zinc (ZnPy) ou de l'oxyde de Zn (ZnO), connus pour leurs propriétés bactéricides, bien que le ZnO ne soit pas réellement considéré comme un biocide. NEX est la seule peinture sans composé métallique, elle comporte deux biocides organiques, un antibactérien, l'isothialozone et un insecticide de la famille des arylpyrroles inhibant les déphosphorylations oxydatives. Enfin, SL04A possède également, en plus des oxydes de Cu et de Zn, plusieurs substances organiques commerciales couvrant une large gamme d'activité biocide (A4S, SN, Zineb).

A3S et IS360, qui possèdent deux biocides en commun, présentent des activités similaires contre les bactéries et contre les diatomées, même si A3S est toujours légèrement plus active. Par contre, A3S n'est pas colonisée comme IS360 par les picocyanobactéries ou par les nanoeucaryotes. Cela est probablement dû à la présence des deux autres substances actives et notamment du Thiocyanate de Cu puisque le cuivre est particulièrement connu pour ses propriétés contre les organismes photosynthétiques. Cu<sub>2</sub>O, semble plus actif contre les diatomées puisque trois des quatre peintures qui en possèdent sont peu colonisées par ces organismes et que NEX, la seule à ne pas en posséder, est colonisée par ces organismes. De plus, les biocides originaux de NEX vont de paire avec une dominance par une espèce de

diatomées (*Thalassionema* sp.) généralement peu présente sur les biofilms. Si on compare A3S et SQT, elles possèdent toutes les deux, deux composés cuivrés (dont  $\text{Cu}_2\text{O}$ ) et un dérivé du Zn. Cependant, SQT montre une activité plus faible contre l'ensemble des organismes des biofilms. En fait, en ce qui concerne les diatomées, elle semble active contre les espèces de petites tailles mais laisse adhérer et proliférer des espèces de grande taille (*Licmophora gracilis* et *Cylindrotheca closterium*). On peut émettre l'hypothèse que CuPy et ZnO soient moins efficaces que CuSCN et la ZnPy respectivement. SL04A est la peinture qui contient la plus grande variété de biocides et elle est efficace surtout sur les organismes photosynthétiques et moins sur les bactéries. Cela confirme que ce n'est pas forcément le nombre de biocides qui rend un revêtement plus efficace mais plutôt le choix pertinent de deux ou trois molécules ciblant des organismes différents (Abarzua et al. 1999).

### **VII. Relations biofilms - macrofouling dans la rade de Toulon**

Au sein de notre laboratoire, des études sur les revêtements que nous avons étudiés ont été effectuées sur des immersions plus longues afin de décrire l'adhésion des macro-organismes. L'observation des divers macro-organismes présents sur le support conduit à la détermination d'un indice d'efficacité du revêtement (N) déterminé par la formule suivante :  $N = \sum (I_x \times G_x)$ , où I est le pourcentage de surface recouverte et G le groupe d'organisme colonisateur. Cet indice et le protocole d'évaluation de l'efficacité antifouling ont été développés à partir de la norme française (NF.T 34-552) notamment dans le cadre du programme ECOPAINT (FUI 2007-2011). N tient compte à la fois du taux de recouvrement mais aussi de la « gravité » associée aux organismes présents en termes d'impact sur l'efficacité de ce revêtement. Ainsi les algues ont une valeur de deux, les organismes non encroûtant une valeur de trois et les organismes encroûtant une valeur de cinq. Les résultats obtenus après 12 mois d'immersion sont montrés par la Figure 81 (C. Bressy, com. pers.).

Le PVC et IT757 sont peu actifs contre les macro-organismes alors que SQT est celui qui présente la plus forte efficacité suivi par SL04A. Il existe une très forte corrélation ( $R^2=0,9$ ,  $p<0,001$ ,  $n=7$ ) entre la présence des diatomées et l'efficacité sur les macro-organismes sur les divers revêtements ainsi qu'avec les pico-organismes autotrophes ( $R^2=0,57$ ,  $p<0,05$ ,  $n=7$ ) et les nanoeucaryotes ( $R^2=0,53$ ,  $p>0,05$ ,  $n=7$ ). Par contre il ne semble pas y avoir de corrélation entre les bactéries ( $R^2=0,3$ ,  $p>0,05$ ,  $n=7$ ) et l'efficacité sur les macro-organismes (Figure 82). Au final, il semble que seules les diatomées puissent être reliées au macrofouling comme possible indicateur d'efficacité à long terme

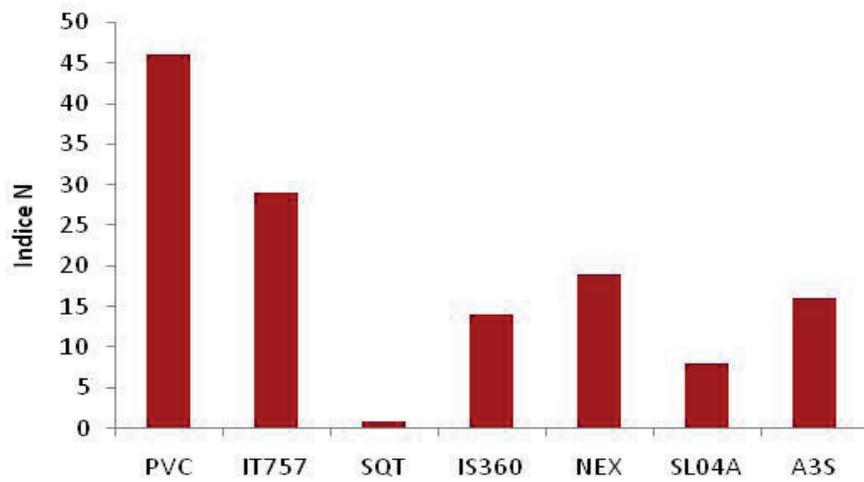


Figure 81: Efficacité des sept revêtements par rapport au macrofouling au bout de 12 mois d'immersion.

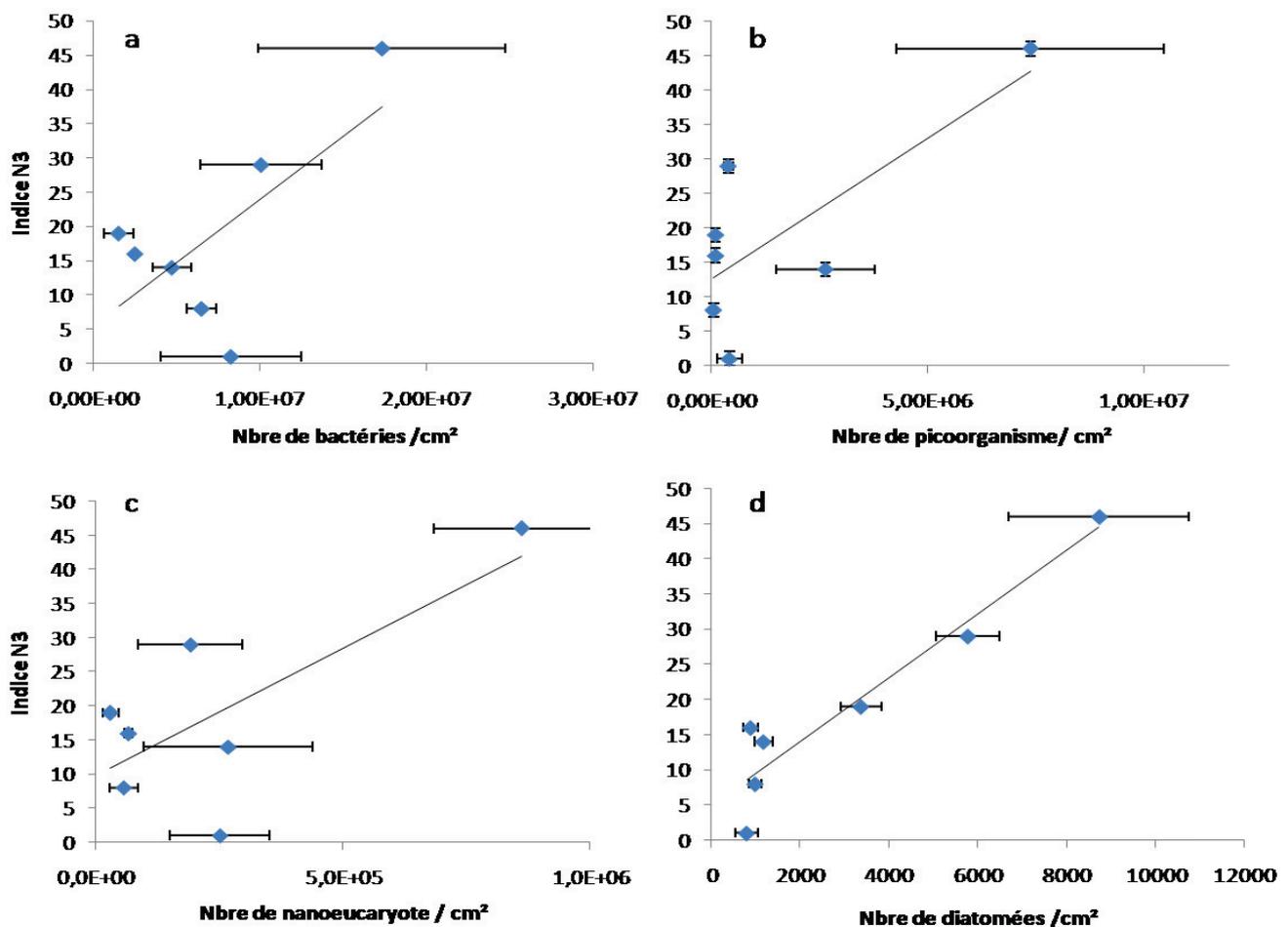


Figure 82 : Corrélation entre les macro-organismes et les micro-organismes. (a) Bactéries, (b) Pico-organismes (c) Nanoeucaryote et (d) Diatomées

### VIII. Représentativité du bio-essai anti-adhésion

L'objectif de ce chapitre était la détermination d'une possible corrélation entre les résultats obtenus en laboratoire et les efficacités des peintures AF *in situ*.

#### **VIII.1. Relation entre CE<sub>50</sub> de molécules *in vitro* et N *in situ***

Actuellement, un certain nombre de recherches a pour but la découverte de nouvelles molécules naturelles, synthétisées ou d'enzymes capable d'inhiber le biofouling en se basant uniquement sur un voire deux types d'organismes en laboratoire. Cependant il est important d'observer comment ces molécules se comportent une fois intégrées dans le revêtement et voir si les études menées au sein du laboratoire peuvent donner des indications sur ce qui se passe dans le milieu naturel. L'intégration des biocides TBTO, SN, Farnesol, Elegandiol, Cu<sub>2</sub>O, A4S et Capsaïcine au sein d'une matrice (Copolymère (meth) acrylique) a été réalisée au laboratoire MAPIEM dans la cadre du programme ECOPAINT. L'efficacité sur les macro-organismes a été observée après 6 mois d'immersion dans la rade de Toulon (Anton et al. 2010, Figure 83).

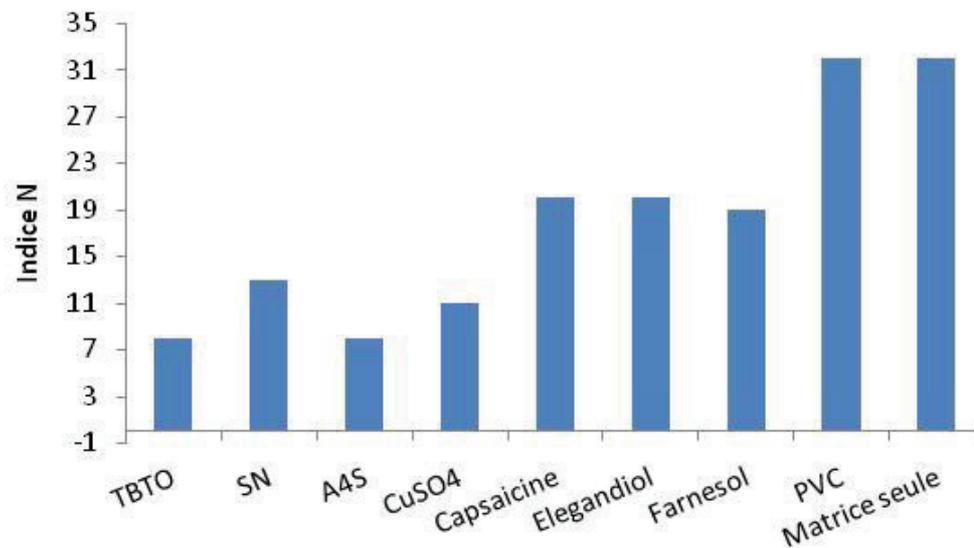


Figure 83: Effet des biocides utilisés en laboratoire sur l'inhibition des macro-organismes dans le milieu naturel à 6 mois d'immersion

Les molécules montrant une forte activité dans le cadre des bio-essais anti-adhésion (TBTO et SN, cf Chapitre IV-II.1.1) semblent également efficaces dans le milieu naturel. En outre le Farnèsol, la capsaïcine et l'élégandiol qui ont montré une activité globalement moyenne ou faible au laboratoire possèdent des N très élevés proches de ceux rencontrés sur les

supports témoins confirmant leurs faibles efficacités. Seul l'A4S et le CuSO<sub>4</sub> montrent des résultats contradictoires à ceux obtenus au laboratoire pour certaines souches. Néanmoins ces deux biocides sont efficaces contre au moins une souche (4M6) laissant suggérer que le laboratoire bien que loin d'être représentatif du milieu naturel reste un bon moyen pour cribler les molécules actives. Afin de s'assurer de cela une régression linéaire ont été déterminées (Tableau 41). A priori aucune relation n'a été établie entre le bio-essai *in vitro* et les N excepté pour 4M6 ( $R^2 = 0,54$   $p > 0,05$ ). Si les biocides A4S et CuSO<sub>4</sub> sont exclus de l'analyse en raison de leurs effets contradictoires, une relation entre les deux analyses semble se former malgré le fait que  $p > 0,05$ . Le fait que les corrélations ne soient pas significativement différentes de zéro pourrait s'expliquer par les faibles valeurs d'échantillonnage.

		TC8	TC5	D41	4M6
<b>N6 mois</b>	R <sup>2</sup>	0,04	0,01	0,01	0,5
	p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	n	7	6	7	6
<b>N6 mois bis</b>	R <sup>2</sup>	0,6	0,4	0,7	0,5
	p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
	n	5	4	5	4

Tableau 41 : Corrélation entre les analyses obtenues en laboratoire et l'indice de macrofouling après six mois d'immersion (N6 mois bis, sans les biocides A4s et CuSO<sub>4</sub>,

R<sup>2</sup>=corrélation de Pearson.

Afin de voir si l'activité anti-adhésion des biocides obtenue au laboratoire peut tout de même donner un aperçu de leur efficacité une fois introduit dans le milieu marin, des classes d'efficacité sont déterminées (Tableau 42, Figure 84)

Classe	CE <sub>50</sub> (μM)	N 6mois
<b>1</b>	0-50	0-10
<b>2</b>	50-100	10-15
<b>3</b>	100-250	15-20
<b>4</b>	250-500	20-50

Tableau 42 : Transposition des valeurs obtenues en laboratoire et *in situ* en termes de classe

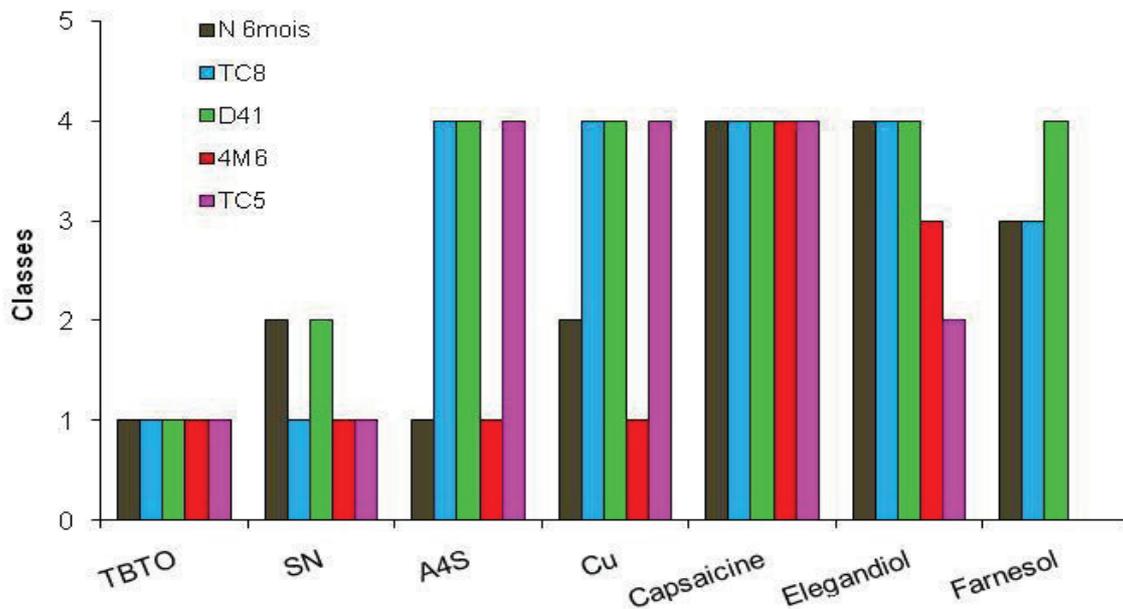


Figure 84: Classes d'efficacité pour les souches bactériennes et le macro-fouling

### VIII.2. Revêtements *in vitro* vs *in situ*

Afin de voir si les revêtements agissent de la même manière sur une seule souche en microplaque au laboratoire (*in vitro*) et sur la formation d'un biofilm plus complexe *in situ*, des corrélations ont été calculées séparément entre la densité bactérienne, pico-organismes, nanoeucaryotes et de diatomées et les % d'adhésion obtenus au laboratoire sur trois souches testées individuellement (Tableau 43, Figure 85).

		TC8	4M6	D41
<b>Densité bactériennes</b>	R <sup>2</sup>	0,48	0,51	0,50
	p	>0,05	>0,05	>0,05
	n	5	5	5
<b>Diatomées</b>	R <sup>2</sup>	0,94	0,94	0,97
	p	<0,05	<0,05	<0,05
	n	5	5	5
<b>Pico-organisme</b>	R <sup>2</sup>	0,06	0,08	0,06
	p	>0,05	>0,05	>0,05
	n	5	5	5
<b>Nanoeucaryote</b>	R <sup>2</sup>	0,01	0,01	0,02
	p	>0,05	>0,05	>0,05
	n	5	5	5
<b>Macro-organismes</b>	R <sup>2</sup>	0,68	0,65	0,67
	p	>0,05	>0,05	>0,05
	n	5	5	5

Tableau 43: Corrélation entre le % d'adhésion obtenu en laboratoire sur trois souches de bactéries et les différentes composantes des biofilms sur les coupons immergés

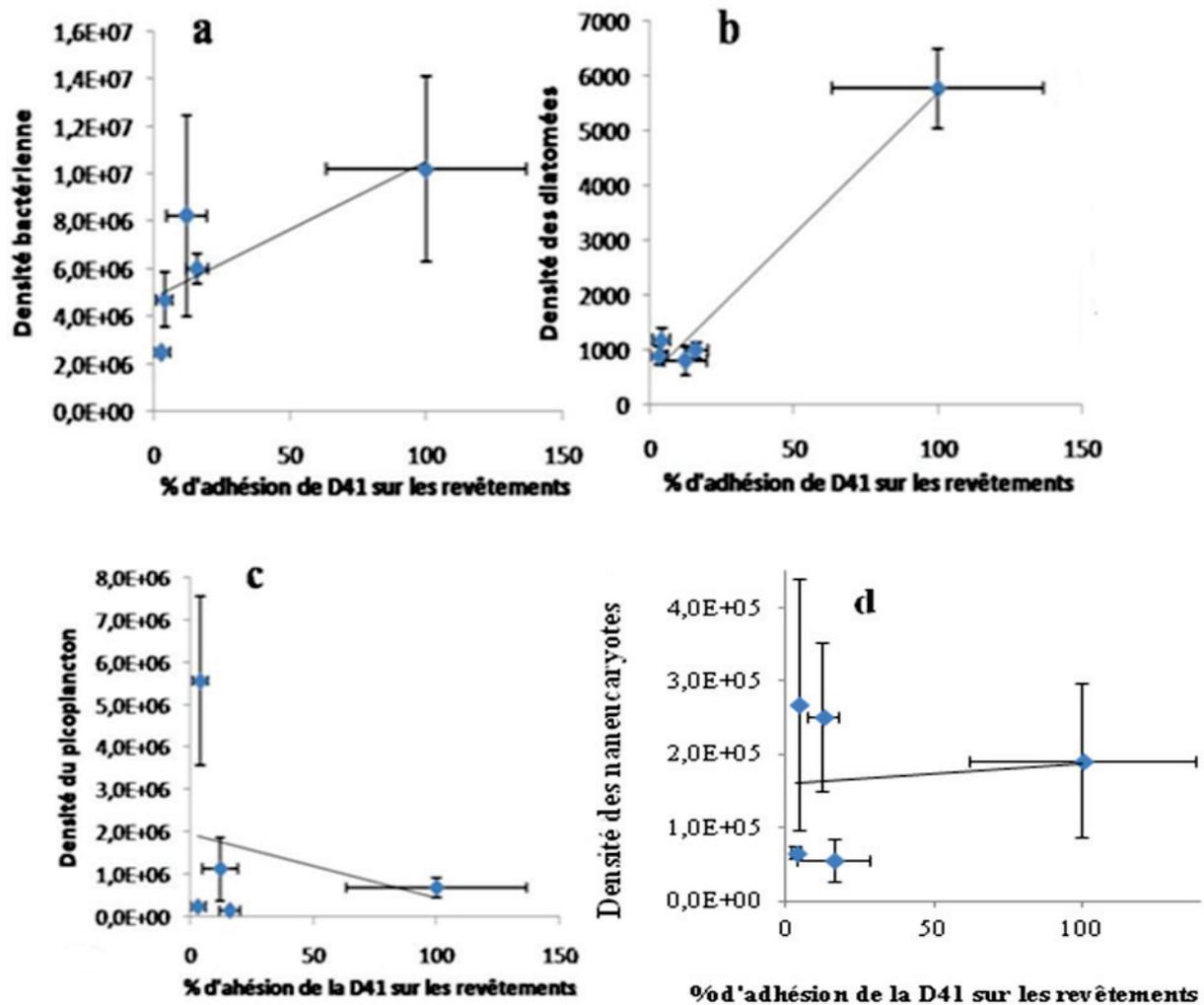


Figure 85 : Relation entre l'abondance des (a) bactérienne, (b) diatomées (c) pico-organismes (d) nanoeucaryotes récoltés sur les supports immergés et l'adhésion de la D41

Une forte corrélation a été trouvée entre les diatomées et les études réalisées en laboratoire, laissant supposer que les bio-essais *in vitro* seraient un bon indicateur de l'activité des revêtements sur les micro-algues. Par contre, aucun lien n'a été observé entre l'inhibition de l'adhésion des souches bactériennes et la densité des pico-organismes, des nanoeucaryotes ou des bactéries ou encore avec les macro-organismes. Ces corrélations semblent suivre celles trouvées entre ces groupes d'organismes dans le paragraphe V.3.2, indiquant peut être que les micro-algues sont des organismes plus sensibles que les organismes autotrophes, voire même que la densité des diatomées pourrait « dépendre » de celles des bactéries. Cependant ces résultats sont à prendre avec précaution car la linéarité n'est soutenue que par un point (IT757).

Afin de tenter de mieux discerner des différences entre l'activité des revêtements en laboratoire, quatre classes d'efficacité ont été déterminées : très efficaces de 0 à 25% (classe 1), moyennement actifs de 25 à 50% (classe 2), peu actifs de 50 à 75% (classe 3) et pas actifs de 75 à 100% (classe 4). Si on suppose que le PVC (*in situ*) et le PS (*in vitro*) sont les supports de références et qu'ils possèdent 100% d'adhésion, il ressort que tous les revêtements, excepté IT7557, sont très actifs en laboratoire, alors que les résultats obtenus après immersion sont un peu plus diversifiés comme le montre la Figure 86. Là encore des différences apparaissent entre les revêtements. Néanmoins, les revêtements les plus efficaces en laboratoire le sont également *in situ*. De plus le changement d'efficacité entre les deux études (*in vitro* et *in situ*) ne se fait généralement que d'une seule classe, pouvant indiquer que les résultats trouvés en laboratoire peuvent donner une bonne approximation des effets obtenus dans le milieu naturel.

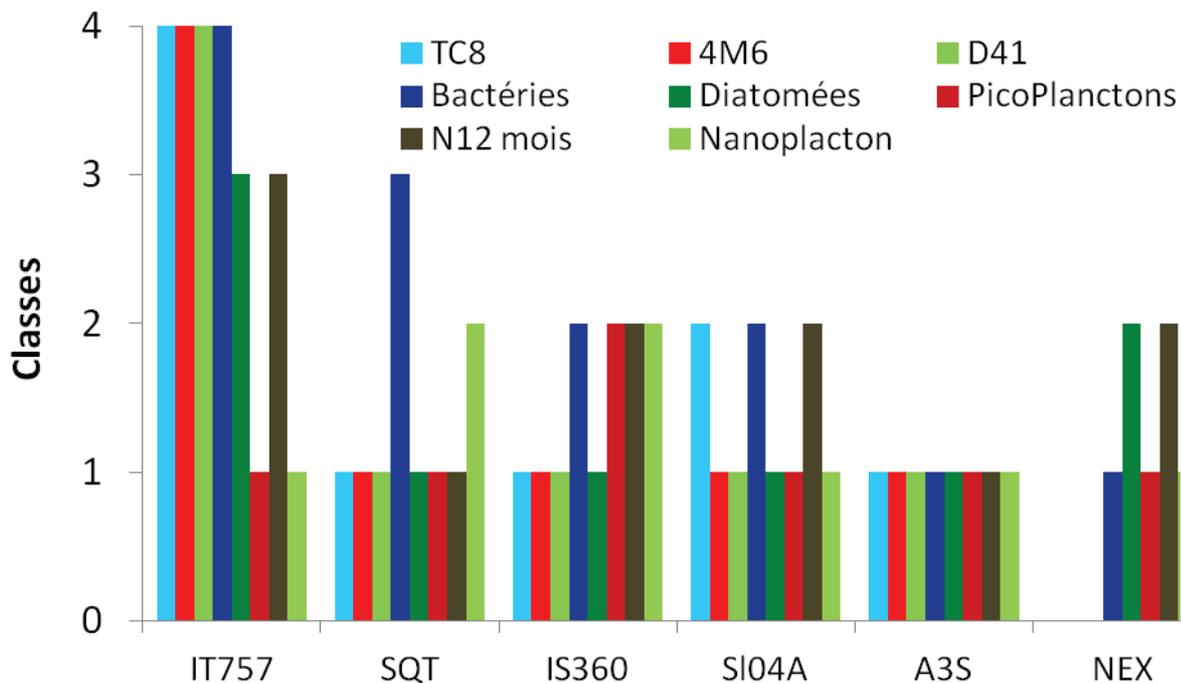


Figure 86 : Répartition des revêtements en quatre classes d'efficacité.

## IX. Conclusion

Peu d'études ont comparé des bio-essais réalisés en laboratoire et des immersions *in situ*, en particulier sur des revêtements AF. Une bonne corrélation a été trouvée entre le pourcentage de recouvrement du biofilm bactérien et l'adhésion des balanes (Stafslie et al. 2007). Cependant lors de notre étude une corrélation a été trouvée entre le laboratoire et le macro-fouling. Mais comme les diatomées ont montré la meilleure corrélation entre le

laboratoire et les immersions *in situ*, il serait intéressant de développer un test d'adhésion sur les diatomées en plus des bactéries au sein du laboratoire. Néanmoins lorsque l'efficacité des revêtements ou des biocides seuls sont transposés en classe, une relation entre les deux études apparait, laissant supposer que les données du laboratoire peuvent être un indicateur du milieu naturel. Les immersions n'ont été effectuées qu'une seule fois en triplicat et seulement sur six revêtements et un support témoin, ne permettant pas d'affirmer ou d'infirmer les possibles relations existant entre les divers organismes. En outre, tous les revêtements testés, excepté IT757, possédaient des classes d'activités fortes et proches les unes des autres. C'est pourquoi, il serait intéressant de refaire d'autres immersions avec plusieurs supports d'efficacité variée.

### RESUME

\_ Importance de travailler dans le milieu naturel, car celui-ci prend en compte les divers organismes présents dans le biofilm.

\_ Intéressant de voir si les organismes présents dans la colonne d'eau sont les mêmes que ceux constituant le biofilm

\_ Importance d'étudier l'abondance de chaque organisme afin de mieux déterminer le mode d'action des revêtements.

\_ Intéressant de déterminer s'il existe un lien entre les divers organismes du biofilm, ou si l'adhésion de chaque groupe est indépendante.

\_ Importance de comparer les résultats trouvés *in situ* sur les micro-organismes et les macro-organismes et ceux obtenus en laboratoire. L'objectif est de voir si les résultats trouvés en laboratoire peuvent prédire ce qui se passe dans le milieu naturel. De plus déterminer la relation entre le macro et le microfouling peut permettre de réduire les temps d'immersion des bio-essais des revêtements test.



# **CHAPITRE VI**

## **ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES ET ANTI-ADHÉSION D'EXTRAITS ET DE MOLECULES PURIFIÉES DE PLANTES TERRESTRES RECOLTEES AU VENEZUELA**



## **I. Introduction**

Les bactéries se rencontrent dans toutes les niches écologiques (sol, eaux douces et salées et air), et certaines d'entre elles vont être pathogènes pour les autres êtres vivants. Jusqu'alors mes recherches se sont uniquement centrées sur les bactéries marines et les problèmes liés à la formation du biofilm sur les structures immergées en milieu marin. Cependant, les biofilms se développent très souvent dans les milieux hospitaliers malgré l'utilisation de produits désinfectants. Par ailleurs, leur utilisation systématique peut engendrer une résistance accrue des bactéries aux antibiotiques et par conséquent l'augmentation des maladies nosocomiales (Allion 2004). Durant ces dernières années, 60% de ces infections étaient dues à des bactéries Gram-positifs (Ren et al. 2002). Ces contaminations sont généralement transmises par des instruments médicaux tels que les cathéters, le personnel médical, les patients, l'air conditionné ou encore lors de l'implant de prothèse (Fux et al. 2005). Les bactéries les plus communes à ces lieux sont principalement des *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. En outre les infections buccales et les maladies parodontales sont souvent causées par la formation de biofilms (Ren et al. 2002; Boschini et al. 2004). Au vu de la complexité de ces derniers et de la mutation rapide des bactéries, il devient urgent de trouver de nouvelles molécules pouvant stopper leur formation. Comme décrit précédemment, des molécules extraites d'organismes vivants telles que les alcaloïdes capables d'agir sur les parasites, les flavonoïdes pouvant agir sur certains systèmes enzymatiques ou encore les diterpénoïdes utilisés comme antibactériens, pourraient agir sur les biofilms (Albornoz 1992, Gil et al. 2005). Or, la Terre dispose de plus de 500000 espèces végétales dont approximativement 100000 se trouvent en Amérique latine (Álvarez 2005). Environ 21000 espèces différentes ont été identifiées au Venezuela, faisant de celui-ci un des sept pays à posséder la plus grande biodiversité végétale terrestre du monde et un lieu potentiellement intéressant pour la découverte de nouvelles substances actives. De plus approximativement 1500 espèces de plantes vénézuéliennes ont été utilisées pour leurs capacités médicinales telles que *Lepechinia*, employé dans les infections gastro-intestinales ou encore contre la leucémie lymphatique murine (Bravo et al. 2004), *Divi dive* généralement utilisée pour ses propriétés astringentes, contraceptives et hémostatiques ou encore *Espeletia* spp. connue pour ses propriétés anti-allergique, antiasthmatique ou anti-cancérogène (Ruiz et al. 2008). Un projet d'échange entre la France et le Venezuela, le PCP (Programme de Coopération Postgraduée) a été mis en place. Ce programme regroupe plusieurs projets. Celui auquel j'ai participé porte sur l'obtention et la valorisation de substances biologiques actives par bio-guidage, de divers extraits bruts issus de plusieurs plantes médicinales endémiques ou très répandues au

Venezuela. Ces substances ont dans un premier temps été testées sur des bactéries pathogènes au laboratoire « d'analyse biologique des composés naturels » de l'université des Andes à Merida (Venezuela) sous la direction du Professeur Bernardo Chataing du 11 octobre 2009 au 5 avril 2010. Dans un deuxième temps, ces produits ont été rapportés en France et testés sur les bactéries marines au MAPIEM à l'USTV.

## **II. Criblage de l'activité antimicrobienne d'extraits de plantes sur des souches pathogènes**

Un criblage de 66 extraits ou produits issus de plusieurs plantes à vertus médicinales (Chapitre II -II.1) a été réalisé en triplicats sur 5 espèces pathogènes : *Staphylococcus aureus* (SA), *Escherichia coli* (EC), *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Bacillus subtilis* (BS) et *Clostridium perfringens* (CP). Ce criblage a été réalisé par la méthode de diffusion sur agar (antibiogramme). Les 53 extraits ou fractions analysés provenaient de feuilles, de racines, de fleurs ou encore de graines de plantes appartenant à diverses familles telles que les Lamiaceae, Solanaceae, Asteraceae, Lauraceae, Verbenaceae, Hypericaceae, Vitaceae et Fabaceae. Seuls une dizaine (13) d'entre eux, extraits à l'aide de divers solvants organiques et inorganiques, ont montré une activité antibactérienne sur au moins une des souches testées. Ces produits sont présentés dans le Tableau 44.

<b>LBRH</b>	Extrait hexanique de la racine de <i>L. bullata</i>
<b>LBHH</b>	Extrait hexanique de la feuille de <i>L. bullata</i>
<b>LCH</b>	Extrait méthanol/eau (7/3) de la feuille de <i>L. conferta</i>
<b>LCHA</b>	Extrait acétonique de la feuille de <i>L. conferta</i>
<b>SBF</b>	Extrait méthanoïque du fruit de <i>S. bicolor</i>
<b>SBH3</b>	Fraction n°3 de SBH extrait méthanol/eau (7/3) de la feuille de <i>S. bicolor</i>
<b>SBH5</b>	Fraction n°5 de SBH extrait méthanol/eau (7/3) de la feuille de <i>S. bicolor</i>
<b>OMM</b>	Extrait méthanolique de la feuille de <i>O. macropoda</i>
<b>L</b>	Extrait de <i>A. amarilla</i>
<b>J</b>	Extrait de <i>V. cissus</i>
<b>G</b>	Extrait avec du dichlorométhane de la plante <i>Hypericum</i>
<b>DD2</b>	Fraction 93 de l'extrait butanolique de <i>D. dive</i>
<b>Munnozia</b>	Extrait aqueux de la feuille de <i>Munnozia</i>

Tableau 44: Extraits bruts actifs de plantes vénézuéliennes.

La quinzaine de produits purs analysés provenaient surtout d'*Espeletia* spp, espèce phare du laboratoire et de *Lepechinia bullata*. Toutes les mesures des halos d'inhibition de croissance sont exprimées en cm et sont présentées dans le Tableau 45.

	SA	BS	PA
<b>Extraits bruts</b>	LCHA*		
	LBRH*		
	LBHH*	LBHH (1,8±0,26)	
	LCH*	LCHA (0,8±0,21)	
	SBF*	LCH (0,95±0,13)	
	Munnozia*	SBH5*	Non Testé
	OMM*	G (1±0,05)	
	L*	DD2 (0,75±0,07)	
	J*		
	G*		
	DD2*		
	<b>Produits purs d'<i>E. spp</i> et de <i>L. bullata</i></b>		KM*
		KS (1±0,14)	KM (1,1 ± 0,07)
KM*		KG (0,9±0,14)	KS (0,7 ± 0,07)
KS*		1 (1,1±0,05)	KG (1,8 ± 0,14)
KG*		3 (1,2±0,22)	2*
3*		6 (1)	3 (1 ± 0,07)
6*		8*	4 (1,1 ± 0,14)
	Carnodol (0,9±0,15)		
	Lapachol (1,15±0,5)		
<b>Témoin positif</b>	Nalidixine (2,3±0,3)	Nalidixine (2,5±0,1)	Erythromycine (2±0,4)

\* halo peu intense présent autour du disque (compris entre 0,65 et 0,70)

Tableau 45 : Criblage de l'activité antibactérienne en antibiogramme

En ce qui concerne la souche EC, aucun des extraits n'a montré d'activité.

Pour SA, certains produits (Tableau 45) possèdent un léger effet d'inhibition de croissance mais rien de réellement concluant. Toutefois, des halos bien que trop petits pour être mesurés précisément étaient visibles, c'est pourquoi, il été décidé d'effectuer les bio-essais en microplaque. De surcroît, d'après une étude réalisée en France avec une autre *S. aureus* (ATCC53156), une activité a été mise en évidence pour les deux produits purs 1 et 2. Une autre étude réalisée à l'université de Merida (Venezuela) a montré que l'extrait J de *V. cissus* inhibe la croissance de SA (Camacho & Mendez 2008).

Une autre bactérie Gram-positif *Clostridium perfringens* (CP) a également été employée, mais aucune des molécules testées n'a montré d'activité.

Pour confirmer l'effet des produits sur les bactéries Gram-positif, la souche BS a été étudiée. Un problème est survenu au moment de l'observation, le tapis bactérien qui aurait dû se former sur les boîtes de Pétri n'est pas apparu. A la place, plusieurs petites colonies se sont formées. Les boîtes ont alors été préparées avec des concentrations bactériennes plus élevées ( $DO_{600nm}=0,3$ ). Une fois le tapis bactérien obtenu, l'antibiogramme a montré que sept extraits bruts ainsi que neuf produits purs possèdent une activité. Les halos sont situés entre 0,8 et 1,8 cm. Les substances les plus actives proviennent de la *Lepechina bullata*. (LBHH, Lapachol) et d'*Espeletia schultzi* (3 et 1).

L'activité des produits purs du Fralejon a été testée sur la souche PA, autre bactérie Gram négatif. Cette dernière a été choisie lors de l'étude anti-adhésion pour sa capacité à former un biofilm. De plus une étude réalisée en France (Nouzared, com. Pers.) avec une *P. aeruginosa* (ATTCA22) a déjà montré que les produits 1 et 2 inhibaient sa croissance. Cinq d'entre eux ont montré une bonne activité (Tableau 45). Le produit qui possède le plus grand halo d'inhibition est le KG.

Au vu des résultats, il est clair que les souches PA et BS n'ont pas la même sensibilité aux diverses molécules pures. Par exemple, le produit 3 est le plus efficace contre la souche BS alors que pour la souche PA c'est le KG. Cependant, ces deux souches sont tout de même plus sensibles que SA, pour laquelle aucun véritable halo d'inhibition n'a pu être observé.

### **III. Mise en place du bio-essais sur souches pathogènes en microplaques**

#### **III.1. Croissance des souches**

Tout comme pour les souches marines, le début de la phase stationnaire et le taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) ont été déterminés pour les trois souches pathogènes en milieu BHI (SA, EC et PA) (Figure 87 et Tableau 46). Cependant, pour des raisons de logistique, les bactéries ont été laissées à température ambiante et non à 37°C (température optimale de croissance) (Annexe V). Le fait de ne pas pouvoir contrôler la température et de travailler en mode statique (mauvaise aération du milieu) a probablement influé sur leur caractéristique de croissance et donc sur l'entrée en phase stationnaire.

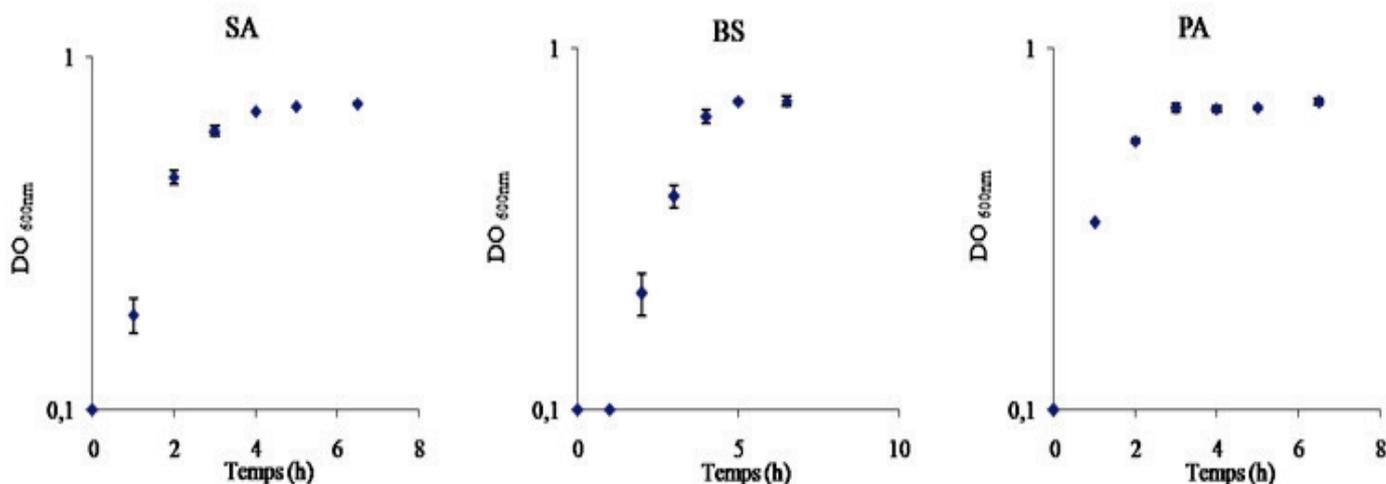


Figure 87: Courbes de croissance des souches en milieu liquide.

	Début de la phase stationnaire (h)	$\mu_{max}$ ( $h^{-1}$ )
BS	6	$0,51 \pm 0,02$
SA	5	$0,63 \pm 0,01$
PA	4 à 5	$0,63 \pm 0,01$

Tableau 46: Détermination des paramètres de croissance des souches pathogènes en milieu BHI à température ambiante et sans agitation (n=2)

Il apparaît que les trois souches présentent des phases stationnaires relativement proches qui n'excèdent pas les 6h. Leurs taux de doublement sont également proches.

### III.2. Densité d'ensemencement

Tout comme pour les souches marines, la quantité maximale de bactéries à introduire pour avoir un recouvrement optimal du puits, sans perdre la proportionnalité entre l'absorbance et la quantité de bactéries introduite, a été déterminée. En outre, une trop forte quantité de colorant, ici le cristal violet (CV), peut entraîner une saturation du signal et empêcher la lecture. Il a donc été décidé de travailler avec une concentration de 0,1% de CV. En effet, l'analyse a été effectuée dans un premier temps à 1 %, mais la fluorescence était trop importante pour la sensibilité de l'appareil. Une concentration de 0,5 % a aussi été utilisée mais le plateau de saturation survenait pour des concentrations bactériennes faibles ( $DO_{600nm}=0,1$ ). Après quoi, l'optimisation de la densité d'ensemencement a été réalisée

pour les trois souches avec une gamme bactérienne ( $DO_{600nm}$  de 0,1 à 0,6). Le plateau de saturation est survenu entre 0,3-0,4 pour BS et SA et à 0,2-0,3 pour PA.

### III.3. Effet du DMSO sur les souches pathogènes

Les molécules testées sont apolaires et se solubilisent principalement dans du DMSO. Comme pour les souches marines, ce solvant peut inhiber la croissance et/ou l'adhésion des bactéries pathogènes, par conséquent la quantité maximale de solvant pouvant être tolérée par ces dernières a été déterminée (Tableau 47). Les tests ont été réalisés deux fois pour BS et PA et une fois pour SA.

		BS	SA	PA
DMSO	CI <sub>85</sub> (%)	7,3 ± 0,07	8,1	7,4 ± 0,3
	R <sup>2</sup>	0,96 ± 0,03	0,82	0,97 ± 0,01

Tableau 47 : Effet du DMSO sur le taux de croissance des bactéries pathogènes

Il est à noter qu'au delà de 7,5 % de DMSO, la croissance des souches est affectée de 15 à 20 %. Ce pourcentage a donc été considéré comme valeur seuil de tolérance. Toutefois avec cette concentration de solvant, les produits précipitent, entraînant de nombreux problèmes de répétabilité. En effet, la concentration introduite dans les puits peut varier d'une plaque à l'autre et grandement modifier les valeurs des CE<sub>50</sub> et CI<sub>50</sub>.

Les pourcentages seuils pour l'inhibition de l'adhésion étaient assez proches du pourcentage déterminé ci-dessus, excepté pour PA qui pour une inhibition inférieure à 20% ne tolère pas plus de 6,5 % de DMSO.

## IV. Inhibition de croissance et d'adhésion des souches pathogènes en microplaques

L'objectif du laboratoire « d'analyse biologique des composés naturels » (ABCN) du Venezuela est de trouver des molécules antimicrobiennes et/ou inhibant l'adhésion issues de plantes médicinales terrestres.

### IV.1. Identification spécifique d'*Espeletia* spp. (Frailejon) par chromatographie liquide.

Dans le but d'effectuer l'extraction de molécules du Frailejon, une récolte a été organisée. Le genre le plus couramment étudié par les membres du laboratoire de Merida (Venezuela) est *Espeletia semiglobulata*, car il possède une assez grande quantité d'acide

kaurénique (1), molécule déjà connue par ses capacités antimicrobiennes. Mais il existe une grande variété d'*Espeletia* et bien que certaines présentent des tailles et des épaisseurs de feuilles différentes, l'observation de la fleur reste la manière la plus efficace pour les différencier. Malheureusement lors de la récolte (janvier 2010), les Frailejones n'étaient plus en fleurs et l'identification des différents genres présents au Páramo (Andes Vénézuélienne) était difficile (Annexe VI). Cette identification a donc été confirmée au laboratoire par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP). Au vu des chromatogrammes obtenus, la plante récoltée n'était pas *E. semiglobulata* mais plutôt *E. schultzii*. En effet, la fraction acide de cette dernière est majoritairement constituée d'acide grandiflorique et d'une faible quantité d'acide kaurénique (1), contrairement à *E. semiglobulata* qui possède une quantité importante d'acide kaurénique. Les deux types de Frailejon comportent du Kaurenol (2) dans la fraction neutre. Les chromatogrammes de ces deux extraits sont donnés dans la Figure 88.

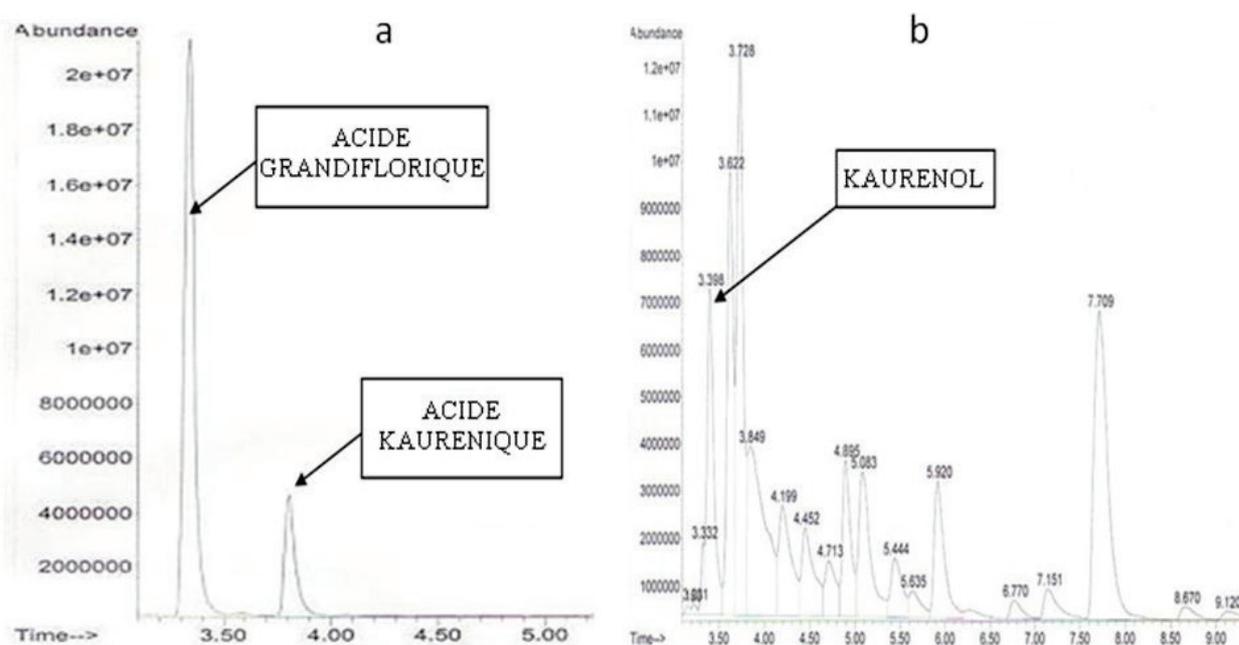


Figure 88: Chromatogrammes des fractions acide (a) et neutre (b) des Frailejones récoltées (*E. schultzii*).

Ces extraits ont été rapportés en France et testés sur les souches de bactéries marines, tout comme les deux molécules pures.

L'acide kaurénique présent dans la phase aqueuse est récupéré par ajout d'acide chlorhydrique permettant de séparer les acides de l'eau, puis la fraction acide est extraite avec l'hexane. Une fois que celui-ci a été évaporé, elle est introduite dans une colonne de gel de silice éluée dans un premier temps à l'hexane, permettant la libération de l'acide

kaurénique. Les autres acides présents dans la fraction sont récupérés par d'autres solvants tels que des mélanges hexane/acétate. La purification du kaurénol se fait comme pour le 1, par purification de la fraction neutre sur une colonne de gel de silice éluée à l'Hexane et récupérée par TLC (technique de chromatographie sur couche mince) (hexane/acétate d'éthyle, 4/1 L). Cela n'a pas pu être effectué, lors de mon séjour au Venezuela, c'est pourquoi l'acide kaurénique et le kaurénol utilisés lors des tests provenaient d'anciennes purifications.

## IV.2. Inhibition de la croissance et viabilité bactérienne

### IV.2.1. Les extraits bruts

Sur les 16 extraits ayant montré une activité en antibiogramme, seulement sept ont montré un effet sur au moins une des deux souches étudiées. Les  $CI_{50}$  des autres substances étaient toutes situées au dessus de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , valeur seuil choisie comme pouvant être potentiellement intéressante pour l'inhibition de la croissance. Les valeurs des  $CI_{50}$  inférieures à  $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pour au moins une des souches sont présentées dans le Tableau 48 et la Figure 89.

		SA	BS
<b>DD2</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b><math>113,5 \pm 6,4</math></b>	<b><math>108,0 \pm 0,0</math></b>
	Pente	moyenne	Forte
	$R^2$	$0,85 \pm 0,13$	$0,96 \pm 0,04$
<b>L</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b><math>154,0 \pm 0,0</math></b>	<b>Non testé</b>
	Pente	Faible	
	$R^2$	$0,94 \pm 0,00$	
<b>LCHA</b>	<b><math>CI/E_{50}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b><math>6,8 \pm 0,0</math></b>	<b>&gt;500</b>
	Pente	Faible	
	$R^2$	$0,98 \pm 0,00$	
<b>G</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b>&gt;500</b>	<b><math>119,0 \pm 2,8</math></b>
	Pente		Faible
	$R^2$		$0,77 \pm 0,05$
<b>LBHH</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b>&gt;500</b>	<b><math>57,1 \pm 4,8</math></b>
	Pente		moyenne
	$R^2$		$0,89 \pm 0,02$
<b><u>Munnozia</u></b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>)</b>	<b><math>212 \pm 11</math></b>	<b>&gt;500</b>
	Pente	Faible	
	$R^2$	$0,84 \pm 0,08$	

Tableau 48:  $CI_{50}$  des extraits bruts de plantes du Venezuela sur SA et BS

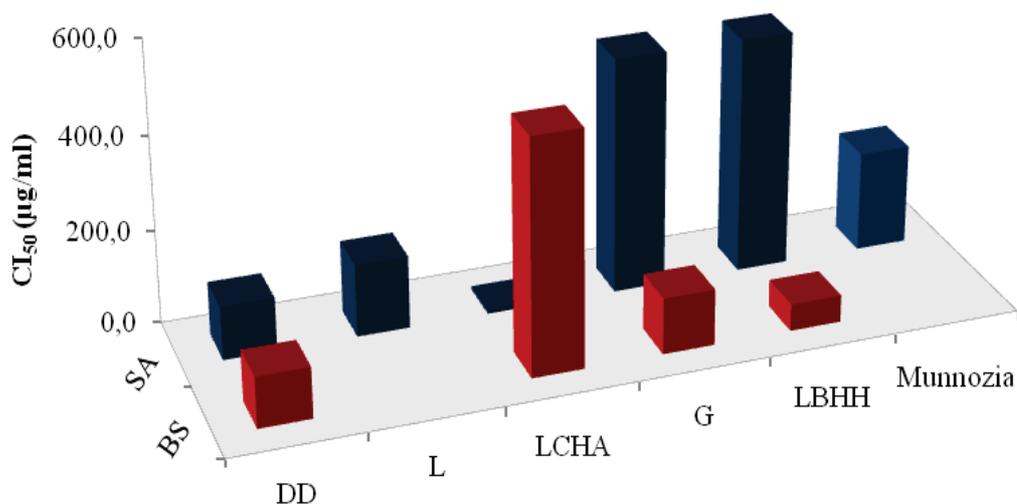


Figure 89:  $CI_{50}$  des extraits bruts sur les deux souches pathogènes testées

Comme décrit précédemment dans le Chapitre IV pour les souches marines, ainsi que dans l'étape de criblage, toutes les bactéries n'avaient pas la même sensibilité aux biocides. La majorité des études effectuées sur des extraits bruts se basent sur les CMI et non sur les  $CI_{50}$ , d'où la difficulté de déterminer des valeurs seuil d'efficacité. Certains auteurs ont comparé la CMI de leur extrait naturel à celle de la ciprofloxacine, un antibiotique efficace contre les bactéries Gram positif et négatif. Cette valeur était proche de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Kloucek et al. 2005), mais, malheureusement, nous ne disposons pas d'antibiotique au laboratoire ABCN. Cette valeur peut être utilisée à titre indicatif pour nous orienter sur la possible efficacité de nos produits. La souche BS montre une sensibilité plus importante que SA pour la majorité des produits actifs sur les deux souches en antibiogramme, excepté pour LCHA (extrait de *L. conferta*). En ce qui concerne la souche BS, l'extrait LBHH de (*L. bullata*) présente la plus forte activité, tout comme cela a été le cas lors de l'antibiogramme. Par contre, le DD2 qui semblait présenter une faible activité en antibiogramme, montre une activité modérée ( $108,0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), tout comme l'extrait G. SA montre une forte inhibition de croissance en présence de LCHA. Les deux autres produits (DD2 et L) sont moyennement actifs (Figure 89), alors que Munnozia possède une efficacité faible ( $212 \pm 11 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cependant, parmi les quatre extraits testés sur les deux souches, seul DD2 ne présente pas de différence d'activité entre les deux souches ( $p > 0,05$ ) alors que LBHH et LCHA, respectivement extraits de *L. bullata* et *L. conferta*, ainsi que G extrait d'*Hypericum*, montrent des activités significativement très différentes ( $p < 0,0001$ ).

Les pentes des courbes sigmoïdes sont toutes faibles ou moyennes excepté DD2 pour BS. La souche SA possède une majorité de pente faible alors que pour BS, il y a autant de pente faible que de pente moyenne.

La viabilité bactérienne a été évaluée en fin de phase de croissance après contact avec les molécules par introduction de résazurine. Comme le laboratoire ne possède pas les filtres nécessaires pour effectuer les mesures au lecteur de microplaque, les variations de couleur ont été évalués visuellement. Trois colorations ont été définies : rose pour les bactéries viables, violet pour des concentrations toxiques (pas toujours facilement définissable) et enfin bleu pour les bactéries non viables. La détermination de la toxicité s'est basée sur la concentration maximum sans effet observé (CSEO), c'est-à-dire la valeur seuil pour laquelle la couleur rose reste identique au témoin bactérien (Tableau 49).

CSEO	G	LBHH	LCHA	L	DD2
SA ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	500	500	>500	150	100
BS ( $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	200	150	Non testé	Non testé	100

Tableau 49 : concentration maximale sans effet observé sur les deux souches pathogènes étudiées

Au vu des résultats, l'extrait brut DD2 est le premier à montrer un effet toxique ( $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) sur les deux souches, de même ordre que la  $CI_{50}$ . L'extrait LBHH semble particulièrement intéressant du fait de sa faible toxicité et de sa forte activité, du moins pour BS. Il en est de même avec le LCHA pour la souche SA, qui présente une forte inhibition de croissance mais une faible toxicité, laissant plutôt penser à un effet bactériostatique que bactéricide. Mais ces résultats sont à prendre avec précaution, car le bio-essai n'a été réalisé qu'une seule fois, et que la lecture « visuelle » effectuée est très imprécise.

#### ***IV.2.2. Les composés purs extraits de la Failejon***

Cette plante, très répandue dans les Andes Vénézuéliennes, se retrouve principalement dans la partie Nord de la montagne. Elle se trouve généralement à de hautes altitudes (2500 à 4150 m) et peut atteindre deux mètres de haut. Comme il a déjà été dit cette plante est connue pour ses vertus thérapeutiques (Ruiz et al. 2008) mais également pour son activité antimicrobienne. C'est pourquoi deux produits purs, l'acide Kaurénique (1), qui se trouve dans la fraction acide du Frailejon, et le Kaurénol (2), présent dans la fraction neutre,

ainsi que plusieurs dérivés ont été testés sur BS et SA pour leur potentiel d'inhibition de croissance (sans que l'activité des extraits bruts aient été évaluée). Les  $CI_{50}$  sont données dans le Tableau 50 et la Figure 90.

		SA	BS
<b>KM</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>548,6 <math>\pm</math> 63,8</b>	<b>179,7 <math>\pm</math> 41,4</b>
	Pente	Moyenne	Faible
	$R^2$	0,95 $\pm$ 0,05	0,96 $\pm$ 0,04
<b>KS</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>337,8 <math>\pm</math> 69,3</b>	<b>89,7 <math>\pm</math> 29,8</b>
	Pente	Forte	Moyenne
	$R^2$	0,88 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,07
<b>KG</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>335,5 <math>\pm</math> 1,4</b>	<b>74,0 <math>\pm</math> 59,8*</b>
	Pente	Moyenne	Faible
	$R^2$	0,92 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,06
<b>1 (acide kaurenique)</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>402,0 <math>\pm</math> 46,7</b>	<b>136,8 <math>\pm</math> 48,3</b>
	Pente	Forte	Faible
	$R^2$	0,85 $\pm$ 0,21	0,95 $\pm$ 0,08
<b>3</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>411,5 <math>\pm</math> 52,3</b>	<b>265,3 <math>\pm</math> 31,9</b>
	Pente	Faible	Moyenne
	$R^2$	0,95 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,14
<b>4</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>413,5 <math>\pm</math> 2,1</b>	
	Pente	Moyenne	Non testé
	$R^2$	0,84 $\pm$ 0,08	
<b>6</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>275,5 <math>\pm</math> 20,5</b>	<b>130,3 <math>\pm</math> 25,9</b>
	Pente	Moyenne	Faible
	$R^2$	0,97 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,00
<b>Carnosol</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Non testé</b>	<b>&gt;550</b>
<b>Lapachol</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Non testé</b>	<b>&gt;550</b>

Tableau 50: Inhibition de la croissance des produits purs ou dérivés du Frailejon sur deux souches pathogènes

Les deux produits purs testés uniquement sur BS (carnosol et lapachol) n'ayant pas montré d'activité d'inhibition de croissance, sont exclus de la Figure 90.

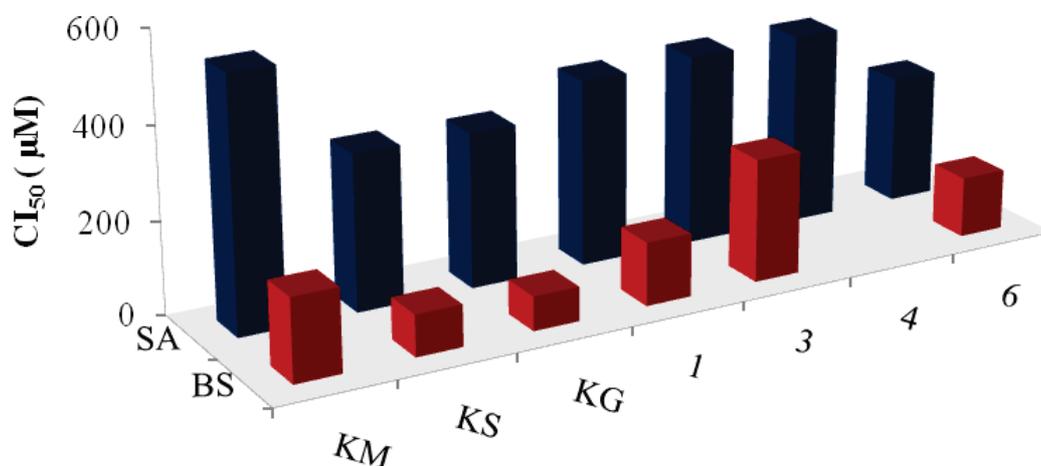


Figure 90:  $CI_{50}$  des composés purifiés de la Frailejon sur deux souches pathogènes

La souche BS montre de nouveau une plus grande sensibilité pour toutes les molécules. Les substances KS et KG ont une bonne activité avec des  $CI_{50}$  respectives de  $89,7 \pm 29,8$  et  $74,0 \pm 59,8$   $\mu\text{M}$  alors que KM, 1 et 6 ont plutôt une activité moyenne. Seul le produit 3 peut être considéré comme ayant une activité faible (Figure 90). Une ANOVA à un facteur suivit d'un post-test de Bonferroni n'a montré aucune différence significative entre ces produits, excepté entre KG et 3 ( $p < 0,05$ ).

En ce qui concerne la souche SA, il est apparu au final que tous les composés purs testés n'affectent que faiblement sa croissance. Seule une différence significative est trouvée entre KM et 6 ( $p < 0,05$ ), qui sont respectivement les molécules la moins active et la plus active. Cependant aucun des extraits de la Frailejon ne s'est avéré efficace contre ce type de souche. Cela confirme d'ailleurs le faible halo d'inhibition trouvé pour ces molécules lors du criblage réalisé en antibiogramme.

Si l'on compare les pentes obtenues pour ces différents biocides il apparaît clairement des différences entre les souches, en particulier pour KS et 1 qui présentent une pente forte pour SA et respectivement moyenne et faible pour BS. La souche SA exhibe une majorité de pente moyenne alors que BS a une majorité de pente faible.

Un test de viabilité a aussi été effectué avec ces composés purifiés, mais une fois encore, le test n'a été fait qu'une seule fois; c'est pourquoi les résultats présentés dans le Tableau 51 doivent être pris avec précaution.

CSEO	KM	KS	KG	1	3	4	6
SA ( $\mu\text{M}$ )	217	214	188	248	341	472	Non testé
BS ( $\mu\text{M}$ )	304	171	135	207	265	236	196

Tableau 51 : Concentration maximale sans effet observé (CSEO) des composés purifiés de la Frailejon sur SA et BS

Il semble que toutes les substances actives aient un effet bactéricide sur BS, mais toujours à des concentrations plus élevées que celles trouvées pour les  $CI_{50}$ . Cela est particulièrement vrai pour KG et KS, mais cette différence n'est peut être pas suffisante pour considérer que ces molécules sont peu toxiques. En ce qui concerne la souche SA, les molécules présentent des effets létaux de même amplitude voir plus faibles que les  $CI_{50}$  faisant de ces substances des produits peu intéressants. Le produit 6 n'a pu être testé que sur BS, souche la plus sensible car la quantité de produit disponible était insuffisante. Le nouvel échantillon récupéré n'a plus montré d'activité d'inhibition de croissance. Des études plus approfondies sur ces produits et sur d'autres souches devraient être envisagées.

#### IV.3. Inhibition de l'adhésion bactérienne.

Afin de favoriser l'adhésion de biofilms sans pour autant avoir de croissance bactérienne, le milieu de culture a été remplacé par de l'eau physiologique ( $\text{NaCl}$  à  $9 \text{ g.L}^{-1}$ ) avant ensemencement des microplaques, comme dans le Chapitre IV.

Les résultats obtenus pour ces bio-essais n'ont pas été très concluants. Le premier test effectué a montré que KG, 1, 3 et 7 avaient un effet inhibiteur très faible situé entre 360 et  $456 \mu\text{M}$  pour PA. Aucun effet n'a été trouvé pour SA et BS. Lorsque le bio-essai a été renouvelé avec ces molécules, non seulement les produits testés n'inhibaient plus du tout l'adhésion, mais l'augmentaient par rapport au témoin, pour les concentrations les plus élevées. Il est possible que cela soit lié à une mauvaise dissolution des produits. De plus, la seconde série de bio-essais a été réalisée avec des composés nouvellement purifiés, dont la pureté aurait pu être altérée par rapport aux anciennes molécules. Malheureusement cette hypothèse n'a pu être vérifiée par HPLC ou par RMN au Venezuela par manque de temps.

Afin de tenter de s'affranchir des problèmes de solubilisation, les composés ont été dissous dans 100% d'éthanol, puis les molécules ont été testées en utilisant la technique « par évaporation » (cf. Chapitre II, sous Chapitre V.1.4). Les résultats obtenus n'ont pas été plus concluants, laissant à penser que ces molécules n'auraient pas d'effet anti-adhésion.

## V. Inhibition de l'adhésion et de la croissance de souches marines

### V.1. Inhibition de l'adhésion des extraits bruts.

En plus des fractions totale, neutre et acide du Frailejon, quelques molécules ayant montré un halo d'inhibition sur les souches pathogènes, dont la quantité était suffisante pour effectuer les bio-essais ont été rapportées en France. Cette étude a été réalisée sur trois souches marines (TC8, D41 et 4M6). Des essais préliminaires ont montré que les extraits tels que DD2, LBHH ou encore LCH ne peuvent pas être marqués au DAPI étant donné que ce dernier se fixe de manière aspécifique sur ces molécules, rendant l'interprétation impossible. Partant de ce fait, la quantification des bactéries adhérentes a été effectuée avec le fluorochrome SYTORED 61 comme pour l'étude des revêtements (Figure 91 et Tableau 52). Comme explicité précédemment (cf Chapitre V- II.3), ce marqueur n'est pas utilisable pour la TC5 par conséquent cette souche a été exclue de l'étude. La TC4 n'a pas été retenue en raison de sa capacité modérée à adhérer sur les microplaques (Chap IV- II.3). Même avec le SYTORED 61, la fraction totale (T) a adsorbé le marqueur et a donc définitivement été éliminée de l'étude.

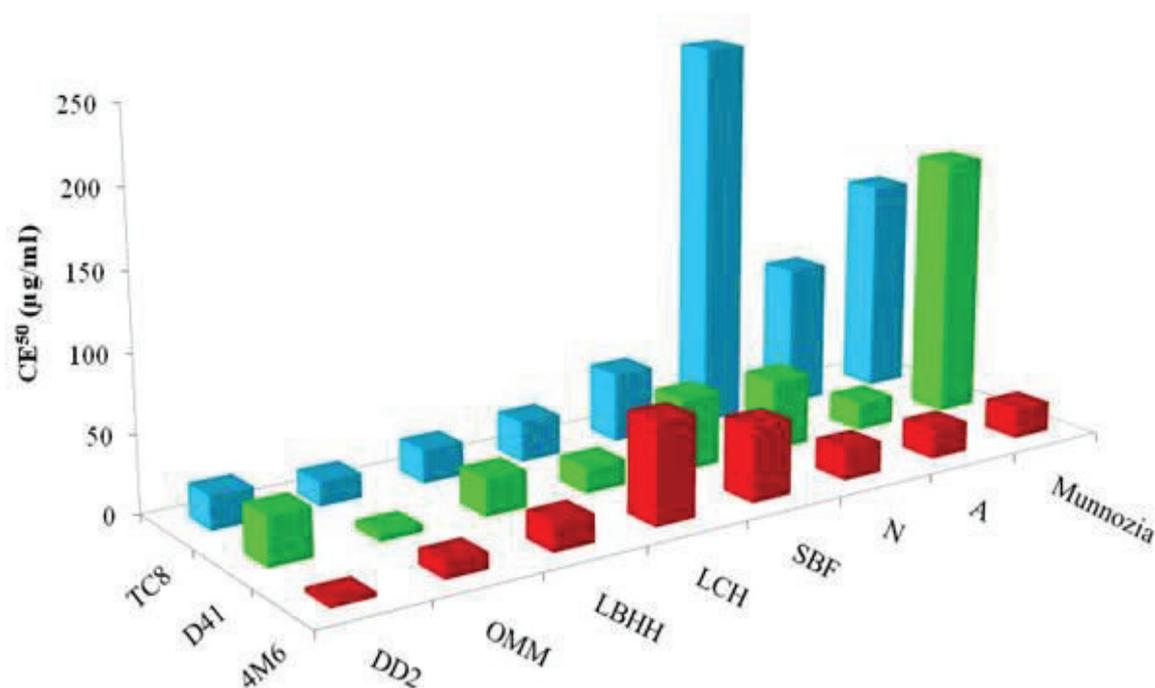


Figure 91 :  $CE_{50}$  des extraits bruts et des fractions sur les trois souches marines étudiées

		<b>4M6</b>	<b>D41</b>	<b>TC8</b>
<b>TBTO</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>9,2 ± 4,5</b>	<b>8,3 ± 2,4</b>	<b>7,2 ± 1,8</b>
	<b>Pente</b>	<b>Forte</b>	<b>Faible</b>	<b>Forte</b>
	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>0,85 ± 0,13</b>	<b>0,72 ± 0,17</b>	<b>0,95 ± 0,01</b>
<b>DD2</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>3,1 ± 2,7</b>	<b>26,0 ± 19,7</b>	<b>21,7 ± 24,7</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Faible	Faible
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,01
<b>Munnozia</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>19,5 ± 6,4</b>	<b>170 ± 28,2</b>	<b>140 ± 14,1</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Faible	Faible
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,96 ± 0,07	0,95 ± 0,03	0,96 ± 0,02
<b>LBHH</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>18,0 ± 1,7</b>	<b>23,7 ± 9,8</b>	<b>21,5 ± 2,1</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Faible	Moyenne
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,95 ± 0,07	0,95 ± 0,05	0,96 ± 0,01
<b>SBF</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>48,0 ± 12,7</b>	<b>46,0 ± 30</b>	<b>44,7 ± 27,4</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Faible	Faible
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,93 ± 0,02	0,98 ± 0,01	0,94 ± 0,07
<b>LCH</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>65,0 ± 2,1</b>	<b>16,5 ± 4,9</b>	<b>26,0 ± 15,6</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Moyenne	Faible
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,97 ± 0,02	0,99 ± 0,01	0,99 ± 0,01
<b>OMM</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>10,3 ± 5,9</b>	<b>4,7 ± 2,4</b>	<b>15,7 ± 9,5</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Faible	Faible
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,99 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,02
<b>N</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>20,2 ± 1,1</b>	<b>45,5 ± 6,3</b>	<b>&gt;300</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Faible	Faible
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,88 ± 0,01	0,82 ± 0,05	0,98 ± 0,01
<b>A</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg.ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>19,5 ± 0,7</b>	<b>18,0 ± 5,6</b>	<b>92,2 ± 7,1</b>
	<b>Pente</b>	Faible	Faible	Faible
	<b>R<sup>2</sup></b>	0,88 ± 0,01	0,92 ± 0,01	0,81 ± 0,16

Tableau 52: Effet anti-adhésion (CE<sub>50</sub>) d'extraits de plantes originaires du Venezuela sur trois souches marines (n=2)

Au vu des résultats (Tableau 52, Figure 91), la majorité des extraits testés a montré une forte activité inhibitrice. En effet, si les CE<sub>50</sub> du TBTO décrites au Chapitre IV sont transformées de µM en concentrations massiques, elles se situent entre 7 et 10 µg/ml pour les souches marines. Certaines fractions se sont révélées aussi actives que le TBTO, voire plus, telles que DD2 sur la 4M6 (3,1 ± 2,7 µg.ml<sup>-1</sup>) ou encore OMM sur la D41 et la 4M6 (4,7 ± 2,4 et 10,3 ± 5,9 µg.ml<sup>-1</sup>). La majorité de ces extraits présente une efficacité proche voire meilleure que celle obtenue avec le produit pur le plus actif décrit dans le Chapitre IV,

le TFA Z. Ses concentrations massiques étaient situées entre 25,9 et 56,9  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour ces trois souches. Ces extraits sont donc potentiellement intéressants pour l'activité anti-adhésion. L'extrait le moins efficace est Munnozia. Des différences de sensibilité cohérentes avec celles observées dans le Chapitre IV sont observées entre les souches. La 4M6 reste globalement la bactérie la plus sensible, excepté pour le LCH. En effet, d'après une ANOVA 2 facteurs, des différences significatives de sensibilité ( $p < 0,05$ ) entre les souches sont observées. Le post-test de Bonferroni a montré que la 4M6 a une sensibilité très significativement différente ( $p < 0,001$ ) de TC8 pour l'extrait N. De plus elle est aussi significativement différente de TC8 et de D41 pour Munnozia ( $p < 0,01$ ) et pour DD2 ( $p < 0,05$ ). La D41 semble particulièrement affectée par OMM ( $4,7 \pm 2,4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ) suivi de LCH, A, LBHH et DD2 pour lesquelles les  $CE_{50}$  se situent entre  $16,5 \pm 4,9$  et  $26,0 \pm 19,8 \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Les substances OMM, LBHH DD2 et LCH, sont les extraits les plus efficaces contre la souche TC8 ( $CE_{50}$  entre  $15,7 \pm 9,5$  et  $26,0 \pm 15,6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Cependant des variations en terme de sensibilité apparaissent aussi entre la D41 et la TC8. Ces différences sont particulièrement importantes pour les extraits A ( $p < 0,05$ ) et N ( $p < 0,01$ ) issus du Frailejon (Tableau 53). En effet la TC8 n'est pas affectée par la fraction N alors que ce dernier inhibe fortement l'adhésion de la D41.

	DD	Munnozia	LBHH	SBF	LCH	N	OMM	A
<b>D41 vs TC8</b>	NS	NS	NS	NS	NS	***	NS	*
<b>4M6 vs D41</b>	***	***	NS	NS	**	NS	NS	NS
<b>4M6 vs TC8</b>	*	**	NS	NS	NS	***	NS	*

→\*\*\* : Extrêmement significatif

\* : Significatif

→\*\* : Très significatif

NS : Pas de différence significative

Tableau 53 : Analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA): interactions entre les souches et biocides

Les pentes obtenues lors de cette étude sont toutes faibles, excepté LCH avec la D41 et LBHH avec la TC8 qui présentent des pentes moyennes

## V.2. Activités des produits naturels purifiés du Frailejon et de Lepechinia

Les extraits neutres et acides de la Frailejon ont montré des activités intéressantes sur au moins deux des souches étudiées. L'acide kaurénique (1), le Kaurénol (2) ainsi que leurs dérivés ont donc été testés (Tableau 54)

		4M6	D41	TC8
1	CE <sub>50</sub> (μM)	159,3 ± 59,2	73,7 ± 7	153,0 ± 59,1
	Pente	Faible	Faible	Faible
	R <sup>2</sup>	0,93 ± 0,06	0,91 ± 0,04	0,89 ± 0,07
2	CE <sub>50</sub> (M)	122,7 ± 11,3	85,3 ± 6,4	>250
	Pente	Faible	Faible	
	R <sup>2</sup>	0,90 ± 0,1	0,9 ± 0,04	
3	CE <sub>50</sub> (μgM)	>250	>250	>250
4	CE <sub>50</sub> (μgM)	>250	>250	>250
6	CE <sub>50</sub> (μM)	>250	>250	>250
KS	CE <sub>50</sub> (μM)	>250	>250	>250
KG	CE <sub>50</sub> (μm)	>250	>250	>250
Lapchol	CE <sub>50</sub> (M)	335 ± 10,1	>500	>500
	Pente	Faible		
	R <sup>2</sup>	0,93 ± 0,06		

Tableau 54 : CE<sub>50</sub> des produits naturels purifiés du Frailejon sur trois souches de bactéries marines

Aucun des produits dérivés de l'acide kaurénique ou du kaurénol n'a montré d'activité sur les souches étudiées. Le kaurénol, par contre, montre une bonne activité sur la D41 et une activité moyenne pour la 4M6, alors que l'acide kaurénique n'est efficace que sur la première de ces deux souches et moyennement actif sur les deux autres souches. L'ANOVA deux facteurs a révélé qu'il existe bien des différences entre les souches mais pas entre les biocides. Des différences significatives ( $p < 0,05$ ) et très significatives ( $p < 0,01$ ) sont observées entre les deux *Pseudoalteromonas* pour la molécule 1 et 2, puisque la souche TC8 n'est que moyennement affecté par l'acide kaurénique et pas du tout par le Kaurénol faisant de cette bactérie la souche la plus résistante à cette molécule. Pour ces molécules, la souche la plus sensible est la D41. Le post test de Bonferroni a également montré des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre la 4M6 et la D41 pour l'acide kaurénique et entre la 4M6 et la TC8 pour le kaurénol. Cependant, les écarts-types obtenus pour la molécule 1 sont très importants. Cela pourrait être dû à la mauvaise solubilité des produits. Une fois de plus, les pentes des molécules observées pour les différentes souches sont toutes faibles.

Un test d'inhibition de croissance et de toxicité (résazurine) a aussi été effectué pour les substances 1 et 2. Aucune des deux molécules n'a affecté la croissance et par conséquent la viabilité des trois souches en dessous de 250  $\mu\text{M}$ , valeur maximale testée. L'activité d'inhibition de l'adhésion de ces molécules ne semble donc pas liée à une toxicité sur ces bactéries mais à un mécanisme plus spécifique agissant sur l'adhésion.

## **VI. Conclusion**

### **VI. 1. Les extraits bruts**

Sur l'ensemble des extraits récupérés sur diverses parties de plantes (graines, feuilles, tiges ou plantes) et récoltés dans plusieurs provinces du Venezuela, seulement une petite quantité (13 extraits sur la soixantaine testés) ont montré une activité en antibiogramme à une forte concentration (10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), sur plusieurs souches de bactéries pathogènes. Afin de déterminer plus précisément cette efficacité, ces produits ont été testés en milieu liquide en microplaques pour déterminer leur capacité d'inhibition de croissance. Les études préliminaires de ces extraits ont été effectuées sur des bactéries à Gram positif et négatif. La bactérie à Gram négatif (EC) utilisée pour réaliser le criblage s'est avérée résistante à toutes les molécules. Il serait donc intéressant d'étudier d'autres bactéries présentant cette même caractéristique, afin de déterminer si l'efficacité des extraits est la même entre les deux types bactériens (Gram positif et négatif).

Les résultats obtenus pour les deux bactéries à Gram positif (BS et SA) étaient assez différents, exceptés pour l'extrait DD2. En effet, il est apparu que SA est généralement moins sensible aux produits que BS, sauf pour LCHA qui s'est montré très efficace contre cette dernière. Une étude plus approfondie pourrait être envisagée afin de préciser le potentiel des composés purs constituant cet extrait.

Les données obtenues par l'antibiogramme ont, généralement, bien été confirmées par les tests d'inhibition de croissance en milieu liquide en microplaque. Cependant le DD2, le L et le LCHA qui ne présentaient pas de halo plus importants que les autres extraits se sont révélés particulièrement efficaces sur SA. Concernant la souche BS, on pouvait s'attendre à ce que le LCH présente une forte activité puisqu'il possédait l'un des plus grands halos d'inhibition ( $\sim 1$  cm) et inversement pour l'extrait DD2 pour lequel le plus faible halo d'inhibition a été trouvé ( $\sim 0,7$ ). Or cela n'a pas été le cas. Il semble donc que le criblage effectué par la méthode de diffusion doit être considéré avec précaution. Ces différences peuvent venir du fait que certains extraits diffusent mal à travers le papier empêchant ainsi de voir leurs effets. De plus le papier utilisé lors des tests n'était pas du papier filtre mais du

papier ordinaire, ce qui a pu augmenter les problèmes de diffusion mais également de quantité réelle de solvant adsorbée par ce dernier.

La CSEO déterminée pour ces extraits a permis de voir la concentration maximale supportée par les bactéries avant perturbation de leur viabilité. Au vu des résultats obtenus, il est possible que les extraits LBHH pour BS et surtout LCHA pour SA soient particulièrement intéressants du fait d'avoir une toxicité plus faible que les  $CI_{50}$ , pouvant indiquer un possible effet bactériostatique plutôt que bactéricide. Mais, là encore, une analyse plus détaillée devrait être envisagée afin de pouvoir déterminer la  $CL_{50}$  ainsi que la  $CE_{50}$  afin d'obtenir l'indice de sélectivité permettant de connaître plus en détail leur toxicité.

D'autres études effectuées sur ce même type de plantes ont montré que des extraits aqueux et méthanolique de la plante Divi-Dive (*Caesalpinia coriaria*) étaient capables d'inhiber la croissance de SA, EC et PA, avec, une fois de plus, une plus grande sensibilité de SA (Mohana & Raveesha et al. 2008). Des extraits méthanolique, éthanolique ou encore aqueux issus de *Solanum xanthocarpum* (autre espèce de *Solanum* que celle utilisée pour notre étude) ont montré une inhibition de croissance par la méthode de diffusion (en puits en milieu gélosé) pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Salar & Suchitra 2009). Dans cette étude, comme dans la notre, la bactérie à Gram positif semble plus sensible. Une autre analyse par diffusion sur agar a été effectuée avec ces mêmes bactéries ainsi que sur la souche *Bacillus subtilis*, sur des extraits éthanoliques de *Lepechinia meyenii* (Walp.). Une activité antibactérienne a été observée avec de nouveau une plus forte sensibilité pour cette souche à Gram positif (Rojas et al. 2003). Il apparaît tout de même que la majorité des extraits montrant une activité étaient issus de *Lepechinia*. Cette plante a semblé particulièrement efficace contre *Bacillus*.

Les souches marines, quant à elles, ont montré une plus grande sensibilité que les souches pathogènes à ces divers extraits, étant donné que des extraits issus de *Lepechinia* mais également de *Solanum*, d'*Ocotea*, de *Munnozia* ainsi que de *Divi-Dive* ont montré des activités anti-adhésion intéressantes. Ces plantes peuvent être considérées comme ayant un potentiel d'inhibition d'adhésion intéressant pour la découverte de nouvelles substances actives, en particulier les extraits DD2, LBHH ou encore OMM qui ont dévoilé des efficacités proches de celle du TBTO sur la quasi-totalité des souches testées. Il serait donc intéressant de purifier ces produits afin de déterminer la ou les substances présentant un effet inhibiteur et déterminer par la suite leur toxicité.

## VI. 2. Les composés purs du frailejon

L'acide kaurénique et ses dérivés se retrouvent dans plusieurs familles de plantes vivant en Amérique Latine qui sont généralement connues pour leur activité antimicrobienne. C'est pourquoi ces produits purs ont directement été testés sur les souches pathogènes. Des études réalisées avec cette molécule mais isolée de la plante *Gnaphalium* ont montré une inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* (Villagómez-Ibarra et al. 2001). Une autre étude réalisée sur l'acide kaurénique isolé de *Espeleletopsis muiska* (autre type de frailejon) a montré une activité antimicrobienne contre SA et BS avec des valeurs de concentrations minimales inhibitrices relativement faibles (23 µg/ml et 16 µg/ml respectivement). Il apparaît par ailleurs dans cette étude que *Bacillus* est plus sensible que *Staphylococcus* (Ramírez Martha et al. 2000), tout comme lors de notre étude.

Les bio-essais anti-adhésion réalisés sur les souches pathogènes se sont avérés peu concluants pour des raisons essentielles de conditions de manipulation et de logistique.

En ce qui concerne les souches marines, aucune étude ne rapporte leur utilisation comme cible. Par conséquent les extraits neutres et acides du Frailejon ont d'abord été testés. Il s'avère que ces deux extraits affectent bien l'adhésion des bactériens marines, excepté pour la TC8 qui montrait peu ou pas d'inhibition pour ces deux fractions, et qui n'a pas non plus été affectée par les produits purs issus de ces fractions.

Les résultats obtenus sur les composés purifiés ont ensuite été décevants. En effet, seule la D41 a montré une inhibition de croissance satisfaisante pour l'acide kaurénique et le Kaurénol (CE<sub>50</sub> respective de 73,7 ± 7 et de 85,3 ± 6,4). Par contre les résultats obtenus pour la 4M6 sont assez surprenant, puisque cette souche s'est révélée plus sensible que la D41 pour les fractions A et N. On pouvait donc s'attendre à trouver des CE<sub>50</sub>, proches voire même plus faibles que celle trouvées pour la D41 or cela n'a pas été le cas. Cependant, il est possible que cette souche bactérienne soit plutôt affectée par d'autres molécules présentes dans ces deux fractions, comme par exemple l'acide grandiflorique présent en grande quantité dans la fraction acide, ou encore le kaurénal et d'autres composés aliphatiques présents dans la fraction neutre. Malheureusement, ils n'ont pas été purifiés. On ne peut pas exclure non plus que des synergies entre molécules moyennement actives individuellement aient induit les fortes activités des extraits complexes. Pour finir, ces molécules sont difficiles à solubiliser, même dans du DMSO 100%. Pour essayer de remédier à cette contrainte, le test par évaporation (cf. Chapitre II V.1.4) a été réalisé une fois au laboratoire ABCN (Venezuela) sur les souches pathogènes. Néanmoins, les résultats obtenus n'ont pas

été très concluants. Il serait peut être intéressant de refaire les bio-essais sur les souches marines avec cette méthode d'évaporation des solvants.

### RESUME

- \_ Importance de cibler les plantes à analyser
- \_ Bien choisir la méthode de criblage permettant d'identifier les molécules intéressantes
- \_ Les souches pathogènes semblent plus résistantes que les souches marines aux extraits bruts de plantes du Venezuela alors qu'elles réagissent à une plus large variété de produits dérivés issus de la Frailejon.



# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Dans le cadre de la protection de « l'Homme et l'environnement », de fortes réglementations internationales se sont mises en place pour l'utilisation et la mise sur le marché des produits biocides. Par conséquent, la recherche de nouvelles molécules actives en antifouling, non toxiques pour l'environnement marin, peut être considérée comme un challenge difficile mais urgent. L'objectif de cette étude était de développer un bio-essai en microplaque permettant un criblage rapide des substances (naturelles ou synthétisées) ou des revêtements potentiellement actifs sur l'adhésion des bactéries marines. Le choix de ces organismes cibles a été lié à la fois au fait qu'ils soient les premiers organismes à coloniser les surfaces mais aussi à leur capacité à « réguler » au sens large le macrofouling (eg Qian et al. 2007). Ce test est une adaptation de celui mis en place par Leroy et al. (2007) lors de son étude sur l'utilisation d'enzyme comme substances antifouling, mais également de ceux réalisés par Stafslie et al. (2006, 2007a, b) sur des revêtements AF. Les modifications ont d'abord été apportées dans la phase initiale de culture des souches et d'ensemencement de la microplaque. Nous avons choisi de faire croître les bactéries en milieu liquide et non solide puis d'ensemencer les bactéries en début de phase stationnaire à une densité choisie pour optimiser la sensibilité du bio-essai. De plus, il a été décidé de travailler sur des biofilms présentant des temps d'adhésion plus importants (entre 15 et 24h d'adhésion en microplaque) afin de minimiser les perturbations par les étapes de rinçage lors de la révélation. Même si la majorité des expériences menées dans le cadre de ce travail sont aussi basées sur l'utilisation du DAPI comme marqueur cellulaire, la version optimisée du bio-essai, qui était utilisée notamment dans l'étude des revêtements, est basée sur l'utilisation d'autres fluorochromes (SYTO<sup>®</sup>) qui présentent plusieurs avantages (spécificité, réduction du nombre d'étape). Enfin, même si l'étude reste préliminaire, il nous a semblé important de pouvoir confronter les résultats de notre bio-essai à la réalité du biofouling *in situ*.

L'avantage de ce test en plus d'être rapide et relativement peu onéreux est qu'il permet de comparer l'activité de nombreuses molécules sur plusieurs bactéries de façon reproductible et d'obtenir des classes d'activités. Lors de cette étude, il a été mis en évidence que toutes les souches ne possédaient pas la même sensibilité aux divers biocides testés et que cela était non seulement indépendant des lieux et du support d'isolement mais également de leur taxinomie ou de leur hydrophobicité. De plus, il a été montré que la capacité des souches à adhérer n'est pas la même d'une bactérie à l'autre. Il est probable que cela soit lié à la présence de substances exopolymériques et/ou de flagelle qui permettent la formation ou la consolidation des biofilms. Il semble bien que les souches TC8 et D41, qui

possèdent la meilleure reproductibilité d'adhésion, utilisent préférentiellement la nage ce qui indique la présence d'un flagelle. Les conclusions semblent moins évidentes pour les autres souches en particulier pour la 4M6, qui présente une forte capacité pour le swimming et une reproductibilité de l'adhésion moyenne en microplaque. Il est probable aussi que l'aptitude des souches à adhérer et à former des biofilms soit dépendante de la nature du substrat.

Le choix du fluorochrome peut être un obstacle à la découverte de nouvelles molécules. Il est apparu que le marquage au DAPI n'était pas toujours approprié étant donné qu'il se fixe de manière aspécifique à de nombreux extraits bruts et revêtements, empêchant l'évaluation de leur potentiel. De plus, les étapes de perméabilisation et d'extraction sont longues et peuvent engendrer des biais lors de la lecture. L'extraction avec un solvant prend en compte les bactéries adhérentes sur les parois des puits et peut donc engendrer la surestimation de la densité bactérienne dans le puits. Ceci est particulièrement gênant lorsque le bio-essai est réalisé en « coating » (molécules et revêtements). C'est pourquoi il est intéressant d'utiliser d'autres fluorochromes tels que les SYTO<sup>®</sup> comme cela a été fait dans l'étude sur les peintures antifouling ou encore pour les extraits bruts d'extraits de plantes. Mais il serait intéressant de comparer d'autres fluorochromes afin de déterminer ceux qui présentent les interactions les plus faibles avec les molécules et les revêtements. La transformation de souches par GFP (ou autre système comparable) serait également une piste intéressante en terme de marquage pour les études en microplaque.

Les bio-essais développés sur les biofilms plurispécifiques n'ont pas permis de conclure ni sur les interactions entre souches, ni sur l'effet des molécules modèles sur ces interactions. En effet, la technique dite de pré-marquage semble impacter très fortement les bactéries et induire de gros problèmes de reproductibilité. Il semble cependant que la sensibilité des bactéries peut varier en fonction des souches auxquelles elles sont associées. Cela ne semble pas illogique car l'on sait qu'il existe des interactions entre les organismes constituant les biofilms. Même si les bactéries cohabitent entre elles sans effet visible sur leur adhésion, il est encore possible qu'elles influent sur certaines propriétés intrinsèques à chacune d'elle comme la résistance aux biocides. Mais d'autres études devront être effectuées en modifiant probablement la méthode de marquage afin de pouvoir déterminer réellement ce qui se passe au sein de la microplaque lorsque des biofilms mixtes sont constitués, en utilisant des marqueurs protéiques de type GFP. De plus, il pourrait être pertinent de complexifier encore ces biofilms mixtes en y ajoutant une souche de diatomée.

Au cours des différents bio-essais réalisés, il est clairement apparu que la souche TC4 était la plus résistante contrairement à la 4M6 qui a montré la plus grande sensibilité à

la majorité des biocides. Le TFA Z est la molécule qui a présenté le plus grand intérêt du fait de posséder une activité anti-adhésion intéressante et aucune toxicité sur nos souches de bactéries marines. Les autres molécules ayant montré un potentiel anti-adhésion intéressant comme certains extraits bruts de plantes terrestres ou encore le Dictyol C issu de *Dictyota* sp. devront être soumis à d'autres analyses afin de confirmer leur potentiel.

Dans le but d'avoir une première approche de la représentativité du bio-essai en laboratoire, une comparaison a été effectuée entre l'inhibition de l'adhésion *in vitro* de cinq revêtements antifouling sur des biofilms mono-spécifiques de trois souches de bactéries marines et l'efficacité *in situ* par l'étude des biofilms naturels. Des tendances ont bien été mises en évidence entre ces deux expériences pour certains revêtements comme pour intersleek 757 qui ne présente aucune activité antifouling en immersion statique et en laboratoire, d'autres peintures telles que l'A3S se sont révélées actives dans les deux cas. Mais toutes les peintures présentaient une forte efficacité contre les bactéries en laboratoire alors que, sur les biofilms naturels, des différences d'activité ont pu être mis en évidence de façon beaucoup plus fine. Ces différences portaient sur les composantes microbiennes des biofilms (bactéries, pico-organisme, nanoeucaryote et diatomées). L'analyse de ces derniers a par ailleurs permis de décrire les communautés microbiennes de biofilms sur peintures antifouling pour la première fois, notamment grâce à l'utilisation de la cytométrie en flux qui n'a pas encore été utilisée dans ce contexte. La technique d'empreinte moléculaire (PCR-DGGE) a aussi permis de mettre en évidence clairement des structures de population de procaryotes différentes, probablement liées en partie à l'effet sélectif des biocides. Ces mêmes conclusions ont aussi pu être tirées de l'étude des populations de diatomées. Par contre, il est difficile de conclure sur la spécificité des biocides qui sont en « cocktails » dans les peintures commerciales étudiées. D'autres études intégrant notamment l'identification des pico-organismes hétérotrophes et autotrophes par clonage –séquençage devront être entreprises en intégrant les variations spatio-temporelles de ce processus de biofouling. Par rapport aux bio-essais, il est évident que les deux études sont complémentaires et indispensables pour la valorisation de nouveaux produits antifouling.

Le bio-essai réalisé en microplaques permet donc une identification rapide des molécules potentiellement actives sur les bactéries malgré les problèmes de solubilité et d'instabilité des molécules. A partir de cette analyse d'autres études vont pouvoir être effectuées. Une amélioration du bio-essai peut être envisagée, comme l'utilisation d'autres marqueurs ou la détermination des effets des différents lavages sur l'adhésion.

Afin de mieux cerner la sensibilité des souches bactériennes aux divers biocides, il pourrait être intéressant d'appliquer cette étude à d'autres bactéries issues de régions tropicales ou arctiques, ainsi que de comparer des souches isolées de zones contaminées (telles que les ports) à celles isolées dans des milieux protégés. Il est aussi possible que la sensibilité des souches soit différente du fait qu'elles soient continuellement exposées à certains biocides, pouvant contribuer au développement de souches plus résistantes aux divers biocides utilisés. Il est probable également que certains macro-organismes non épiphytes soient obligés de produire plus voire même d'autres métabolites secondaires pour limiter l'adhésion des micro-organismes présents en plus grand nombre lors des périodes chaudes. Ce phénomène peut également avoir un impact sur les micro-organismes présents à cette période, leur permettant peut être de mieux résister à certains produits naturels.

Une fois que les substances potentiellement actives ont été déterminées en laboratoire sur plusieurs souches bactériennes, il serait intéressant de déterminer leur toxicité sur divers organismes non cibles. En effet ce n'est pas parce qu'une molécule est extraite d'un organisme présent dans le milieu naturel qu'elle ne pourra pas être dangereuse pour l'environnement. Il est fort probable qu'à fortes doses ces composés deviennent nuisibles. C'est pourquoi il peut être intéressant de déterminer la toxicité de ces substances sur plusieurs organismes sensibles aux changements environnementaux comme par exemple les organismes filtreurs capables d'accumuler une grande quantité de toxines ainsi que des organismes de niveaux trophiques élevés comme les poissons. Une fois la toxicité de ces produits déterminés, il faudrait les intégrer dans des revêtements, les tester en laboratoire et les immerger dans le milieu naturel afin de voir comment ils agissent au sein d'une matrice et si leur efficacité reste intéressante. Un couplage de molécules naturelles montrant des activités sur des souches ou des organismes différents pourrait aussi être envisagé afin de voir si les biocides se complètent et si le mélange agit à plus large spectre que les produits seuls.

# **BIBLIOGRAPHIE**



- Abarzua S, Jakubowski S, Eckert S, Fuchs P (1999) Biotechnological Investigation for the Prevention of Marine Biofouling II. Blue-Green Algae as Potential Producers of Biogenic Agents for the Growth Inhibition of Microfouling Organisms. *Botanica Marina* 42:459-465
- Acord J, Maskell J, and Sefton A (2005) A rapid microplate method for quantifying inhibition of bacterial adhesion to eukaryotic cells. *Journal of Microbiological Methods* 60:55-62
- Afsar A, deNys R, and Steinberg PD (2003) The effects of Foul-release coatings on the settlement and behaviour of cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite* Darwin. *Biofouling* 19:105-110
- Alakomi HL, Mättö J, Virkajärvi I, and Saarela M (2005) Application of a microplate scale fluorochrome staining assay for the assessment of viability of probiotic preparations. *Journal of Microbiological Methods* 62:25-35
- Albornoz AM (1997) *Medicina tradicional herbaria*. Instituto Farmacoterapico Latino SA division de fitoterapia y productos naturales. 564p
- Allion A (2004) *Environnement des bacteries et sensibilité aux biocides*. Thèse de doctorat, spécialité sciences alimentaires Université de Lyon
- Almeida E, Diamantino TC, and de Sousa O (2007) Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings* 59:2-20
- Álvarez LME . IMG, Echeverry L. Harold Mauricio (2005) Efecto antibacteriano in vitro de *Austroeupeatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia amarga*) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (*Clavo de laguna*). *Biosalud* 14:46-55
- Alzieu C (2000) Environmental impact of TBT: the French experience. *The Science of The Total Environment* 258:99-102
- An YH, Friedman RJ (1997) Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 30:141-152
- Angarano MB, McMahon RF, Hawkins DL, and Schetz JA (2007) Exploration of structure-antifouling relationships of capsaicin-like compounds that inhibit zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) macrofouling. *Biofouling* 23:295-305
- Anton C., Camps M., Davy R., Lafond S., Tanguy L., Horatius L., Delesmont R., Briand J.-F., Quiniou F., Bressy C. & Blache Y. (2010) ECOPAINT PACA Project: Antifouling activity of biocidal compounds through bioassays and field immersion test. 15<sup>th</sup> International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Newcastle, UK, Juillet 2010.

- Arrhenius A, Backhaus T, Grönvall F, Junghans M, Scholze M, and Blanck H (2006) Effects of Three Antifouling Agents on Algal Communities and Algal Reproduction: Mixture Toxicity Studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50:335-345
- Augustin M, Ali-Vhemas T (2004) Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7:55-64
- Auty MAE, Gardiner GE, McBrearty SJ, O'Sullivan EO, Mulvihill DM, Collins JK, Fitzgerald GF, Stanton C, and Ross RP (2001) Direct *In Situ* Viability Assessment of Bacteria in Probiotic Dairy Products Using Viability Staining in Conjunction with Confocal Scanning Laser Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 67:420-425
- Bao W, Lee O, Chung H, Li M, and Qian P (2010) Copper affects biofilm inductiveness to larval settlement of the serpulid polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *Biofouling*: 26:119 - 128
- Barbosa JP, Fleury BG, Da Gama BAP, Teixeira VL, and Pereira RC (2007) Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota paffii* (Phaeophyta, Dictyotales). *Biochemical systematics and ecology* 35:549-553
- Barreto S, Zambrano M, and Araque M (2009a) Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilms formation. *Investigacion Clinica* 50:221-22
- Barrios C, Xu Q, Cutright T, and Newby B (2005) Incorporating zosteric acid into silicone coatings to achieve its slow release while reducing fresh water bacterial attachment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41:83-93
- Bazes A, Silkina A, Defer D, Bernède-Bauduin C, Quéméner E, Braud J-P, and Bourgougnon N (2006) Active substances from *Ceramium botryocarpum* used as antifouling products in aquaculture. *Aquaculture* 258:664-674
- Bec B, Collos Y, Souchu P, Vaquer A, Lautier J, Fiandrino A, Benau L, orsoni V, and Laugier T (2011) Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquatic microbial ecology* 63:29-45
- Becker K (1998) Detachment studies on microfouling in natural biofilms on substrata with different surface tensions. *International Biodeterioration & Biodegradation* 41:93-100

- Beech IB, Sunner JA, and Hiraoka K (2005) Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology* 8:157-168
- Bellas J (2006) Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Science of The Total Environment* 367:573-585
- Bellon-Fontaine MN, Rault J, and 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. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7:47-53
- Beveridge CM, Parr ACS, Smith MJ, Kerr A, Cowling MJ, and Hodgkiess T (1998) The effect of benzalkonium chloride concentration on nine species of marine diatom. *Environmental Pollution* 103:31-36
- Bhattarai H, Ganti V, Paudel B, Lee Y, Lee H, Hong Y-K, and Shin H (2007) Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:243-249
- Bhosale SH, Nagle VL, and Jagtap TG (2002) Antifouling Potential of Some Marine Organisms from India Against Species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Marine Biotechnology* 4:111-118
- Blanchot J, Guillon I, Partensky F, Simon H, and Vaniot D (1998) Le petit peuple du grand large. *Biofutur* 1998:22-23
- Bodet C, Epifano F, Genovese S, Curini M, and Grenier D (2008) Effects of 3-(40-geranyloxy-30-methoxyphenyl)-2-trans propenoic acid and its ester derivatives on biofilm formation by two oral pathogens, *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mutans*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43:1612-1620
- Bosch JA, Veerman ECI, Turkenburg M, Hartog K, Bolscher JGM, and Nieuw Amerongen AV (2003) A rapid solid-phase fluorimetric assay for measuring bacterial adherence, using DNA-binding stains. *Journal of Microbiological Methods* 53:51-56
- Boschin F, Boutigny H, and Delcourt-Debruyne E (2004) Maladies gingivales induites par la plaque. *Dentisterie* 1:462-480
- Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, Mitov I, and Krastev Z (2005) Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology* 54:481-483
- Boyd KG, Adams DR, and Burgess JG (1999) Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces. *Biofouling* 14:227 - 236

- Braithwaite RA, McEvoy LA (2004) Marine Biofouling on Fish Farms and Its Remediation. *Advances in Marine Biology* 47: 215-252
- Bravo MO, Hernández NE, Tereschuk ML, Romero CA, L.R aA (2004) *Minthostachys Mollis* Griseb y *Lepechinia Meyenii* (Walp) Epling. actividad antimicrobiana de sus extractos, determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. *Revista del CIZAS* 5:7-23
- Bressy C, Hellio C, Marechal J, Tanguy B, and Margailan A (2010) Bioassays and field immersion test: a comparison of the antifouling activity of copper-free poly(methacrylic)-based coatings containing tertiary amines and ammonium salt groups. *Biofouling* 7:769-777
- Breusegem SY, Clegg RM, and Loontjens FG (2002) Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)<sub>4</sub> DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex. *Journal of Molecular Biology* 315:1049-1061
- Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M, Romagnoli C, and Sacchetti G (2004) Chemical composition and biological activities of *Isphingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry* 84:415-421
- Briand J-F (2009) Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* 25:297 - 311
- Briand J.-F., Djeridi I., Jamet D., Coupé S., Bressy C., Le Berre B., Rimet F., Bouchez A. & Blache Y. (2010) What is the influence of the nature of submerged artificial surfaces on the structure of microbial biofilms communities ? 15<sup>th</sup> International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Newcastle, UK, Juillet 2010.
- Brown CJ (2005) Epifaunal colonization of the Loch Linnhe artificial reef: Influence of substratum on epifaunal assemblage structure. *Biofouling* 21:73-85
- Bruinsma GM, van der Mei HC, and Busscher HJ (2001) Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22:3217-3224
- Burgess JG, Boyd KG, Armstrong E, Jiang Z, Yan L, Berggren M, May U, Pisacane T, Granmo A, and Adams DR (2003) The Development of a Marine Natural Product-based Antifouling Paint. *Biofouling* 19:197 - 205
- Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ, and Kjelleberg S (2006) Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial

- Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3916-3923
- Burton E, Yakandawala N, LoVetri K, and Madhyastha MS (2007) A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34:1-4
- Camacho LLJ (2008) Efectos antibacteriales y antifungales de los extractos acuosos y aceites esenciales de plantas obtenidas en los estados Meridia y Barinas. These doctorale à l'université de Merida (Venezuela)
- Cassé F, and Swain GW (2006) The development of microfouling on four commercial antifouling coatings under static and dynamic immersion. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57:179-185
- Cassé F, Stafslie SJ, Bahr JA, Daniels J, Finlay JA, Callow JA, and Callow ME (2007) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings V. Application of a spinning water-jet for the semi-high throughput assessment of the attachment strength of marine fouling algae. *Biofouling* 23:121 - 130
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, and Buret A (1999) The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 37:1771-1776
- Cerón Martínez CE (2006) Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*:285-293
- Chah KF, Muko KN, and Oboegbulem SI (2000) Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. *Fitoterapia* 71:187-189
- Chaieb K, Zmantar T, Souiden Y, Mahdouani K, and Bakhrouf A (2010) XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis* 50:1-5
- Chambers LD, Stokes KR, Walsh FC, and Wood RJK (2006) Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology* 201:3642-3652
- Champ MA (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sciences of Total Environment* 258:21-71
- Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, and Bernardi T (2007) A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 68:605-612

- Chelossi E, and Faimali M (2006) Comparative assessment of antimicrobial efficacy of new potential biocides for treatment of cooling and ballast waters. *Science of The Total Environment* 356:1-10
- Chiu JMY, Zhang R, Wang H, Thiagarajan V, Qian P-Y (2008) Nutrient effects on intertidal community : from bacteria to invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 358:41-50
- Cho JY, Kwon E-H, Choi J-S, Hong S-Y, Shin H-W, and Hong Y-K (2001) Antifouling activity of seaweed extracts on the green alga *Enteromorpha prolifera* and the mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Applied Phycology* 13:117-125
- Chung HC, Lee OO, Huang Y-L, Mok SY, Kolter R, and Qian P-Y (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
- Clare AS, Rittschof D, Gerhart DJ, Hooper IR, and Bonaventura J (1999) Antisettlement and Narcotic Action of Analogues of Diterpene Marine Natural Product Antifoulants from Octocorals. *Marine Biotechnology* 1:427-436
- Coenye T, and Nelis HJ (2010) *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 83:89-105
- Coleman AW (1980) Enhanced detection of bacteria in natural environments by fluorochrome staining of DNA. *Limnology and Oceanography* 25:949-951
- Collier JL (2000) Flow cytometry and the single cell in phycology. *Journal of Phycology* 36:628-644
- Compère C (1999) Biofilms en milieu marin. *Techniques Sciences Méthodes* 11:48-54
- Compère C, Bellon-Fontaine M-N, Bertrand P, Costa D, Marcus P, Poleunis C, Pradier C-M, Rondot B, and Walls MG (2001) Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling* 17:129 - 145
- Conlan SL, Mutton RJ, Aldred N, and Clare AS (2008) Evaluation of a fully automated method to measure the critical removal stress of adult barnacles. *Biofouling* 24:471-48
- Cooksey KE, and Wigglesworth-Cooksey B (1995) Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aquatic Microbial Ecology* 9:87-96
- D'Souza F, Bruin A, Biersteker R, Donnelly G, Klijnstra J, Rentrop C, and Willemsen P (2010) Bacterial assay for the rapid assessment of antifouling and fouling release properties of coatings and materials. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37:363-370

- Da Gama BAP, Pereira RC, Soares AR, Teixeira VL, and Yoneshigue-Valentin Y (2003) Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling* 19:161-169
- Dafforn KA, Lewis JA (2011) Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin* 62:453-465
- Dahm B, and Blanck H (1996) Toxic effects of the antifouling agent irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Marine Pollution Bulletin* 32:342-350
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 66:467-475
- 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. *Applied Environmental Microbiology* 68:496-504
- Davis AR, and Wright AE (1990) Inhibition of larval settlement by natural products from the ascidian, *Eudistoma olivaceum* (Van Name) *Journal of Chemical Ecology* 16:1349-1357
- Das P, Mukherjee S, and Sen R (2009) Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71:183-186
- de Nys R, and Steinberg PD (2002) Linking marine biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13:244-248
- De Philippis R, Faraloni C, Sili C, Vincenzini M (2005) Populations of exopolysaccharide-producing cyanobacteria and diatoms in the mucilaginous benthic aggregates of the Tyrrhenian Sea. *Sciences of Total Environment* 353:360-368
- Dheilly A (2007) Biofilms bactériens marins multi-espèces: mise en évidence d'un effet antagoniste. Thèse de doctorat, spécialité sciences biologiques: Université de Bretagne-Sud pp125
- Dheilly A, Soum-Souterre E, Klein GL, Bazire A, Compere C, Haras D, and Dufour A (2010) Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. Strain 3J6. *Applied and Environmental Microbiology* 76:3452-3461

- Djordjevic D, Wiedmann M, and McLandsborough LA (2002) Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68:2950-2958
- Dobretsov S, and 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, and Qian P-Y (2005) Antibacterial and anti-diatom activity of Hong Kong sponges. *Aquatic Microbial Ecology* 38:191-201
- Dobretsov S, Dahms H-U, and Qian P-Y (2006) Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling* 22:43 - 54
- Dobretsov S, H-U D, YiLi H, Wahl M, Qian P-Y (2007) The effect of quorum-sensing blockers on the formation of marine microbial communities and larval attachment. *FEMS Microbiology Ecology* 60:177-188
- Domart-Coulon I, Auzoux-Bordenave S, Doumenc D, and Khalanski M (2000) Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures. *Toxicology in Vitro* 14:245-251
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8:881-890
- Donlan RM, Costerton J (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15:167-193
- Donlan RM, Piede JA, Heyes CD, Sanii L, Murga R, Edmonds P, El-Sayed I, and El-Sayed MA (2004) Model System for Growing and Quantifying *Streptococcus pneumoniae* Biofilms In Situ and in Real Time. *Applied and Environmental Microbiology* 70:4980-4988
- Dorigo U, Volatier L, and Humbert J-F (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Research* 39:2207-2218
- Dunne WM Jr (2002) Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately *Clinical Microbiology Reviews* 15:155-166
- Dworjanyn SA, de Nys R, P.G S (2006) Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series* 318:153-163
- Evans SM, Birchenough AC, and Brancato MS (2000) The TBT Ban: Out of the Frying Pan into the Fire? *Marine Pollution Bulletin* 40:204-211

- Faimali M, F G, Terlizzi A, Chiantore M, and Cattaneo-vietti R (2004) The interplay of substrate nature and biofilm formation in regulating *Balanus amphitrite* Darwin, 1854 larval settlement
- Fay F, Linossier I, Carreau D, Dheilily I, Silkina A, Vallée-Réhel K (2010) Booster biocides and microfouling. *Biofouling* 26:787-798
- Fernández-Alba AR, Hernando MD, Piedra L, and Chisti Y (2002) Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Analytica Chimica Acta* 456:303-312
- Filloux A, and Vallet I (2003) Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine & Sciences* 19:77-83
- Finnie AA, and Williams DN (2010) *Paint and Coatings Technology for the Control of Marine Fouling*, Chapitre 13 Wiley-Blackwell
- Finlay JA, Fletcher BR, Callow ME, and Callow JA (2008) Effect of background colour on growth and adhesion strength of *Ulva* sporelings. *biofouling* 24:219-225
- Fusetani N (2004) Biofouling and antifouling. *Natural Product Reports* 21:94-104
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, and Stoodley P (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 13:34-40
- Galindo L, de Moraes Pultrini A, and Costa M (2010) Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *Journal of Natural Medicines* 64:436-441
- Ganti VS, Kim KH, Bhattarai H, and Shin HW (2006) Isolation and characterisation of some antifouling agents from the brown alga *Sargassum confusum*. *Journal of asian natural products research* 8:309-315
- Gardel CL, Mekalanos JJ (1996) Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infection and Immunity* 64:2246-2255
- Gasol JM, Zweifel UL, Peters F, Fuhrman JA, and Hagstrom A (1999) Significance of Size and Nucleic Acid Content Heterogeneity as Measured by Flow Cytometry in Natural Planktonic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4475-4483
- Gentry MK, and Dalrymple JM (1980) Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella toxin*. *Journal of Clinical Microbiology* 12:361-366
- Genzer J, and Efimenko K (2006) Recent developments in superhydrophobic surfaces and their relevance to marine fouling: a review. *Biofouling* 22:339 - 360

- Gil F, De la Iglesia R, Mendoza L, Gonzá'lez B, and Wilkens M (2005) Soil bacteria are differentially affected by the resin of the medicinal plant *Pseudognaphalium vira vira* and its main component kaurenoic acid. *Microbial Ecology* 52: 10-18
- Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallee-Rehel K, and Haras D (2003) Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-attached Marine Bacteria. *Biofouling* 19:307-313
- Gregg MD, and Hallegraeff GM (2007) Efficacy of three commercially available ballast water biocides against vegetative microalgae, dinoflagellate cysts and bacteria. *Harmful Algae* 6:567-584
- Gregori G (2001) Ultraplancton dans la baie de Marseille: Séries temporelles, viabilité bactérienne et mesure de la respiration par cytipmétrie en flux. Thèse de doctorat spécialité: sciences de l'environnement marin, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille.
- Guenther J, Wright AD, Burns K, and De Nys R (2009) Chemical antifouling defences of sea stars: effects of the natural products hexadecanoic acid, cholesterol, lathosterol and sitosterol
- Hallers-Tjabbes CCT, Walmsley S (2010) Consequences of Antifouling Systems – An Environmental Perspective, Chapitre 17. Wiley-Blackwell
- Hall-Stoodley L, and Stoodley P (2002) Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology* 13:228-233
- Hamadi F, and Latrache H (2008) Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 65:134-139
- Hannig C, Hannig M, Rehmer O, Braun G, Hellwig E, and Al-Ahmad A (2007) Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. *Archives of Oral Biology* 52:1048-1056
- Haras D (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Materiaux et Techniques* 93:27-41
- Harder T, lam C, and Qian P-Y (2002) Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by marine biofilms: an investigation of monospecific diatom films as settlement cues. *Marine Ecology Progress Series*. 229:105-112
- Harvey J, Keenan KP, and Gilmour A (2007) 'assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *food microbiology* 24:380-39

- Hellio C, De La Broise D, Dufossé L, Le Gal Y, and Bourgoignon N (2001) Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine Environmental Research* 52:231-247
- Hellio C, Marechal J-P, Véron B, Bremer G, Clare A, and Le Gal Y (2004) Seasonal Variation of Antifouling Activities of Marine Algae from the Brittany Coast (France). *Marine Biotechnology* 6:67-82
- Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews* 36:478-503
- Henrikson AA, and Pawlik JR (1995) A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 194:157-165
- Heydorn A, Ersboll B, Kato J, Hentzer M, Parsek MR, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Molin S (2002) Statistical Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility, Cell-to-Cell Signaling, and Stationary-Phase Sigma Factor Expression. *Applied Environmental Microbiology* 68:2008-2017
- Hillebrand H, Dürselen C-D, Kirschtel D, Pollinger U, and Zohary T (1999) Biovolume calculation for pennak and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35:403-424
- Holmström C, Rittschof D, and Kjelleberg S (1992) Inhibition of Settlement by Larvae of *Balanus amphitrite* and *Ciona intestinalis* by a Surface-Colonizing Marine Bacterium *Applied Environmental Microbiology* 58:2111-2115
- Hori K, and Matsumoto S (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* 48:424-434
- Huang S, and Hadfield MG (2003) Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Ecology Progress Series* 260:161-172
- Huggett MJ, Nedved BT, and Hadfield MG (2009) Effects of initial surface wettability on biofilm formation and subsequent settlement of *Hydroides elegans*. *Biofouling* 25:387-399
- Huigens III RW, Richards JJ, Parise G, Ballard E, Zeng W, and Deora R, and Melander C (2007) Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with bromoageliferin analogues. *Journal of American Chemical Society* 129:6966-6967

- Hung OS, Thiyagarajan V, Zhang R, Wu RSS, and Qian PY (2007) Attachment of *Balanus amphitrite* larvae to biofilms originating from contrasting environments. *Marine Ecology Progress Series* 333:229-242
- Hutchinson N, Nagarkar S, Aitchison JC, A aWG (2006) Microspatial variation in marine biofilm abundance on intertidal rock surfaces. *Aquatic Microbial Ecology* 42:187-197
- Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, and Shirtliff ME (2006) Effect of Farnesol on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:1463-1469
- Jones P, Cottrell M, Kirchman D, and Dexter S (2007) Bacterial Community Structure of Biofilms on Artificial Surfaces in an Estuary. *Microbial Ecology* 53:153-162
- Kerr A, Cowling MJ, Beveridge CM, Smith MJ, Parr ACS, Head RM, Davenport J, and Hodgkiess T (1998) The early stages of marine biofouling and its effect on two types of optical sensors. *Environment International* 24:331-343
- Kirov SM (2003) Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 224:151-159
- Kirov SM, Castrisios M, and Shaw JG (2004) *Aeromonas Flagella* (Polar and Lateral) Are Enterocyte Adhesins That Contribute to Biofilm Formation on Surfaces. *Infection and Immunity* 72:1939-1945
- Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, and Kokoska L (2005) Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callaria district. *Journal of Ethnopharmacology* 99:309-312
- Kobayashi N, and Okamura H (2002) Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Marine Pollution Bulletin* 44:748-751
- Kogure K, Ikemoto E, and Morisaki H (1998) Attachment of *Vibrio alginolyticus* to Glass Surfaces Is Dependent on Swimming Speed. *Journal of Bacteriology* 180:932-937
- Konstantinou IK, and Albanis TA (2004) Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International* 30:235-248
- Kristensen JB, Meyer RL, Laursen BS, Shipovskov S, Besenbacher F, and Poulsen CH (2008) Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biotechnology Advances* 26:471-481
- Kuda T, and Yano T (2003) Colorimetric alamarBlue assay as a bacterial concentration and spoilage index of marine foods. *Food Control* 14:455-461

- Kuda T, Shimizu K, and Yano T (2004) Comparison of rapid and simple colorimetric microplate assays as an index of bacterial count. *Food Control* 15:421-425
- Kumar CG, Anand SK (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42:9-27
- Kwong TFN, Miao L, Li X, and Qian P-Y (2006) Novel Antifouling and Antimicrobial Compound from a Marine-Derived Fungus *Ampelomyces* sp. *Marine biotechnology* 8:634-640
- Lam C, Harder T, and Qian P-Y (2005) Growth conditions of benthic diatoms affect quality of extracellular polymeric larval settlement cues. *Marine Ecology Progress Series* 294:109-116
- Lau SCK, Thiyagarajan V, Cheung SCK, and 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
- Lebaron P, Servais P, Agogue H, Courties C, and Joux F (2001) Does the High Nucleic Acid Content of Individual Bacterial Cells Allow Us To Discriminate between Active Cells and Inactive Cells in Aquatic Systems? *Applied and Environmental Microbiology* 67:1775-1782
- Lee J-W, Nam J-H, Kim Y-H, Lee K-H, and 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 OO, and Qian P-Y (2002) Chemical control of bacterial epibiosis and larval settlement of *Hydroides elegans* in the red sponge *Mycale adherens*. *Biofouling* 19 Suppl:171-180
- Lee OO, Lau SCK, and Qian P-Y (2006) Defense against epibiosis in the sponge *Mycale adhaerens*: modulating the bacterial community associated with its surface. *Aquatic Microbial Ecology* 43:55-65
- Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Rochet MJ, Compere C, and 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 C, Ghillebaert F, Compere C, and Combes D (2008) Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling* 24:11 - 22
- Longnecker K, Sherr BF, and Sherr EB (2005) Activity and Phylogenetic Diversity of Bacterial Cells with High and Low Nucleic Acid Content and Electron Transport

- System Activity in an Upwelling Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology* 71:7737-7749
- Löschau M, and Kratke R (2005) Efficacy and toxicity of self-polishing biocide-free antifouling paints. *Environmental Pollution* 138:260-267
- Maréchal J-P, Culioli G, Hellio C, Thomas-Guyon H, Callow ME, Clare AS, and Ortalo-Magné A (2004) Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetia marina* and *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313:47-62
- Martins JD, Jurado AS, Moreno AJM, and Madeira VMC (2005) Comparative study of tributyltin toxicity on two bacteria of the genus *Bacillus*. *Toxicology in Vitro* 19:943-949
- Melander C, Moeller PDR, Ballard TE, Richards JJ, Huigens Iii RW, and Cavanagh J (2009) Evaluation of dihydrooroidin as an antifouling additive in marine paint. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:529-532
- Meral G, and Karabay U (2002) In vitro antibacterial activities of three *Hypericum* species from west anatolia. *Turkish electronic journal of biotechnology*: 6-10
- Mitbavkar S, and Anil AC (2008) Seasonal variations in the fouling diatom community structure from a monsoon influenced tropical estuary. *Biofouling* 24:415-426
- Mitik-Dineva N, Wang J, Truong VK, Stoddart PR, Malherbe F, Crawford RJ, and Ivanova EP (2009) Differences in colonisation of five marine bacteria on two types of glass surfaces. *Biofouling* 25:621 - 631
- Mittelman MW, Packard J, Arrage AA, Bean SL, Angell P, and White DC (1993) Test systems for determining antifouling coating efficacy using on-line detection of bioluminescence and fluorescence in a laminar-flow environment. *Journal of Microbiological Methods* 18:51-60
- Mohana DC, Satish S, and Raveesha KA (2008) Antibacterial Evaluation of Some Plant Extracts Against Some Human Pathogenic Bacteria. *Advances in Biological Research* 2:49-55
- Molina-Torres J, Garcia-Chávez A, and Ramirez-Chávez E (1999) Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology* 64:241-248
- Molino PJ, and Wetherbee R (2008) The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling* 24:365-379

- Molino PJ, Campbell E, and Wetherbee R (2009a) Development of the initial diatom microfouling layer on antifouling and fouling-release surfaces in temperate and tropical Australia. *Biofouling* 25:685 - 694
- Molino PJ, Chids S, M.R EH, Carey JM, Burgman MA, R. W (2009b) Development of the primary bacterial microfouling layer on antifouling and fouling release coatings in temperate and tropical environments in Eastern Australia. *Biofouling* 25:149-162
- Morán Xosé AG, Bode A, Suárez Luis Á, and Nogueira E (2007) Assessing the relevance of nucleic acid content as an indicator of marine bacterial activity. *Aquatic Microbial Ecology* 46:141-152
- Nancharaiah YV, Venugopalan VP, Wuertz S, Wilderer PA, and Hausner M (2005) Compatibility of the green fluorescent protein and a general nucleic acid stain for quantitative description of a *Pseudomonas putida* biofilm. *Journal of microbiological methods* 60:179-187
- Nataro J, and Kaper J (1998) Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201
- Nayar S, Goh BPL, and Chou LM (2005) Settlement of marine periphytic algae in a tropical estuary. *Estuarine, coastal and shelf science* 64:241-248
- Nylund GM, Gribben PE, de Nys R, and Pavia H (2007) Surface chemistry versus whole-cell extracts: antifouling tests with seaweed metabolites. *Marine ecology progress series* 329:73-84
- O'Toole GA, and Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30:295-304
- Okino T, Yoshimura E, Hirota H, and Fusetani N (1996) New Antifouling Kalihipyranes from the Marine Sponge *Acanthella cavernosa*. *Journal of Natural Products* 59:1081-1083
- Omae I (2003) General Aspects of Tin-Free Antifouling Paints. *Chemical Reviews* 103:34-31
- Ortega-Morales B, Chan-Bacab M, Miranda-Tello E, Fardeau M-L, Carrero J, and Stein T (2008) Antifouling activity of sessile bacilli derived from marine surfaces. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35:9-15
- Ortlepp S, Sjögren M, Dahlström M, Weber H, Ebel R, Edrada R, Thomas C, Schupp P, Bohlin L, and Proksch P (2007) Antifouling Activity of Bromotyrosine-Derived Sponge Metabolites and Synthetic Analogues. *Marine biotechnology* 9:776-785

- Park SR, Kang YH, and Choi CG (2011) Biofilm: A crucial factor affecting the settlement of seaweed on intertidal rocky surfaces. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 91:163-167
- Pascaud A, Amellal S, Soulas M-L, and Soulas G (2009) A fluorescence-based assay for measuring the viable cell concentration of mixed microbial communities in soil. *Journal of Microbiological Methods* 76:81-87
- 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*. *Environmental Microbiology* 5:338-349
- Patil JS, and Anil AC (2005) Biofilm diatom community structure: Influence of temporal and substratum variability. *Biofouling* 21:189 - 206
- Peeters E, Nelis HJ, and Coenye T (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* 72:157-165
- Pelletier E, Bonnet C, and Lemarchand K (2009) Biofouling Growth in Cold Estuarine Waters and Evaluation of Some Chitosan and Copper Anti-Fouling Paints. *International Journal of Molecular Sciences* 10:3209-3223
- Pettitt ME, Henry SL, Callow ME, Callow JA, and Clare AS (2004) Activity of Commercial Enzymes on Settlement and Adhesion of Cypris Larvae of the Barnacle *Balanus amphitrite*, Spores of the Green Alga *Ulva linza*, and the Diatom *Navicula perminuta*. *Biofouling* 20:299 - 311
- Piola RF, Dafforn KA, and Johnston EL (2009) The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* 25:633 - 644
- Pitts B, Hamilton MA, Zilver N, and Stewart PS (2003) A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods* 54:269-276
- Pradier CM, Rubio C, Poleunis P, Bertrand P, Marcus P, and Compère C (2005) Surface Characterization of Three Marine Bacterial Strains by Fourier Transform IR, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Time-of-Flight Secondary-Ion Mass Spectrometry, Correlation with Adhesion on Stainless Steel Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry B* 109:9540-9549
- Prakash Singh M (2006) Rapid test for distinguishing membrane-active antibacterial agents. *Journal of Microbiological Methods* 67:125-130

- Praud-Tabaries A, Dombrowsky L, Bottzek O, Briand J-F, and Blache Y (2009) Synthesis of a polyprenyl-type library containing 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles with anti-biofilm activities against *Pseudoalteromonas* sp. *Tetrahedron Letters* 50:1645-1648
- Prokopovich P, and Perni S (2009) An investigation of microbial adhesion to natural and synthetic polysaccharide-based films and its relationship with the surface energy components. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20:195-202
- Qian P-Y, Dobretsov S, Dahms HU, and Pawlik J (2006) Antifouling activity and microbial diversity of two congeneric sponges *Callyspongia* spp. from Hong Kong and the Bahamas. *Marine Ecology Progress Series* 324:151-165
- Qian P-Y, Xu Y, and Fusetani N (2010) Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* 26:223-234
- Qian PY, Lau S, Dahms HU, Dobretsov S, and Harder T (2007) Marine Biofilms as Mediators of Colonization by Marine Macroorganisms: Implications for Antifouling and Aquaculture. *Marine Biotechnology* 9:399-410
- Railkin AI (2004) Marine biofouling: Colonization processes and defenses. CRC Press:1-303
- Ramasamy MS, and Murugan A (2007) Fouling deterrent chemical defence in three muricid gastropod egg masses from the Southeast coast of India. *Biofouling* 23:259 - 265
- Ramírez Martha B, Tellez Alba N, and Torrenegra Rubén D (2000) Chemical study of *Espeletiopsis muiska* Cuatr (Cuatr) and evaluation of its antimicrobial activity. *Revista Latinoamericana de Química* 28:119-124
- Rao D, Webb JS, and Kjelleberg S (2005) Competitive Interactions in Mixed-Species Biofilms Containing the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1729-1736
- Ren D, Simis JJ, and Wood TK (2002) Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Letters in Applied Microbiology* 34:293-299
- Richards JJ, Ballard TE, Huigens III RW, and Melander C (2008) Synthesis and Screening of an Oroidin Library against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *ChemBioChem* 9:1267-1279
- Rios JL, Recio MC, and Villar A (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23:127-149

- Rittschof D (2000) Natural product antifoulants : One perspective on the challenges related to coatings development. *biofouling* 15:119-127
- Rittschof D, Hooper IR, Branscomb ES, Costlow JD (1985) Inhibition of barnacle settlement and behavior by natural products from whip corals, *Leptogorgia virgulat*; (Lamarck, 1815). *Journal of Chemical Ecology* 11:551-563
- Rivas L, Dykes GA, and Fegan N (2007) A comparative study of biofilm formation by *Shiga* toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *Journal of Microbiological Methods* 69:44-51
- Roberts SK, Wei GX, and Wu CD (2002) Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 35:552-556
- Rojas de Arias A, Inchausti A, Ascurrat M, Fleitas N, Rodriguez E, and Fournet A (1994) *In vitro* Activity and Mutagenicity of Bisbenzylisoquinolines and Quinones Against *Trypanosoma- cruzi* Trypomastigotes. *phytotherapy research* 8:141-144
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, and Lock O (2003) Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 88:199-204
- Rood JJ, and Cole ST (1991) Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55:621-648
- Rubio C, (2002) Compréhension des mecanismes d'adhesion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyen de prevention. Thèse de doctorat, spécialité metallurgie et materiaux, Université de Paris VI
- Rudney JD, and Staikov RK (2002) Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human saliva in relation to indices of caries, dental plaque and periodontal disease. *Archives of Oral Biology* 47:347-359
- Ruiz Y, Rodríguez J, Arvelo F, Usubillaga A, Monsalve M, Diez N, and Galindo-Castro I (2008) Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. *Phytochemistry* 69:432-438
- Saadatian-Elahi M, Teyssou R, and Vanhems P (2008) *Staphylococcus aureus*, the major pathogen in orthopaedic and cardiac surgical site infections: A literature review. *International journal of surgery (London, England)* 6:238-245
- Salar RK, Suchitra (2009) Evaluation of antimicrobial potential of different extracts of *Solanum xanthocarpum* Schard. and Wendl. *African Journal of Microbiology Research* 3:97-100

- Salta M, Wharton JA, Stoodley P, Dennington SP, Goodes LR, Werwinsky S, Mart U, Wood RJK, and Stokes KR (2010) Designing biomimetic antifouling surfaces. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 368:4729-4754
- Sandberg M, Määttänen A, Peltonen J, Vuorela PM, and Fallarero A (2008) Automating a 96-well microtitre plate model for *Staphylococcus aureus* biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32:233-240
- Sarker SD, Nahar L, and Kumarasamy Y (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42:321-324
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184:1140-1154
- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeeb LAH, Davies DG, Gilbert P (2004) Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAOI Biofilm. *Journal of Bacteriology* 186:7312-7326
- Scanlan DJ, and West NJ (2002) Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology* 40:1-12
- Scardino AJ, and de Nys R (2011) Mini review: Biomimetic models and bioinspired surfaces for fouling control. *biofouling* 27:73-86
- Schauer M, Massana R, and Pedro-alio C (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiology ecology* 33:51-99
- Schmitt TM, Lindquist N, and Hay ME (1998) Seaweed secondary metabolites as antifoulants: effects of *Dictyota* spp. diterpenes on survivorship, settlement, and development of marine invertebrate larvae. *Chemoecology* 8:125-131
- Selvin J, and Lipton AP (2004) Antifouling activity of bioactive substances extracted from *Holothuria scabra*. *Hydrobiologia* 513:251-253
- Sepcic K, and Turk T (2006) 3-Alkylpyridinium compounds as potential non-toxic antifouling agents. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 42:105-124
- Sera Y, Iida S, Adachi K, and Shizuri Y (2000) Improved Plate Assay for Antifouling Substances Using Blue Mussel *Mytilus edulis galloprovincialis*. *Marine Biotechnology* 2:314-318

- Shakeri S, kermanshahi RK, Moghaddam MM, and Emtiaz G (2007) Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. *Biofouling* 23:79-86
- Sherr EB, Sherr BF, and Longnecker K (2006) Distribution of bacterial abundance and cell-specific nucleic acid content in the Northeast Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 53:713-725
- Singh S, Taneja M, and Majumdar DK (2007) Biological activities of *Ocimum sanctum* L. fixed oil- An overview. *Indian Journal of Experimental Biology* 45:403-412
- Sieburth JM, Smetacek V, J. L (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnology and Oceanography* 23:1256-1263
- Silva-Aciare F, and Riquelme C (2008) Inhibition of attachment of some fouling diatoms and settlement of *Ulva lactuca* zoospores by film-forming bacterium and their extracellular products isolated from biofouled substrata in Northern Chile. *Electronic Journal of Biotechnology* 11:1-11
- Simões M, Simões LC, and Vieira MJ (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43:573-583
- Smith MJ, Adam G, Duncan HJ, and Cowling MJ (2002) The Effects of Cationic Surfactants on Marine Biofilm Growth on Hydrogels. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 55:361-367
- Smyrniotopoulos V, Abatis D, Tziveleka L-A, Tsitsimpikou C, Roussis V, Loukis A, and Vagias C (2003) Acetylene Sesquiterpenoid Esters from the Green Alga *Caulerpa prolifera*. *Journal of Natural Products* 66:21-24
- Stafslie S, Daniels J, Chisholm B, and Christianson D (2007a) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings III. Utilisation of a high-throughput multiwell plate screening method to rapidly assess bacterial biofilm retention on antifouling surfaces. *Biofouling* 23:37 - 44
- Stafslie S, Daniels J, Mayo B, Christianson D, Chisholm B, Ekin A, Webster D, and Swain G (2007b) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings IV. A high-throughput bacterial biofilm retention and retraction assay for screening fouling-release performance of coatings. *Biofouling* 23:45 - 54
- Stafslie SJ, Bahr JA, Feser JM, Weisz JC, Chisholm BJ, Ready TE, and Boudjouk P (2006) Combinatorial materials research applied to the development of new surface coating I:

- A multiwell plate screening method for the high-throughput assessment of bacterial biofilm retention on surfaces. *Journal of Combinatorial Chemistry* 8:156-162
- Stanley NR, Lazazzera BA (2005) Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- $\gamma$ -dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology* 57:1143-1158
- Stathmann M, Wingender J, and Flemming HC (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of microbiological methods* 50:237-248
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, and Svabic-Vlahovic M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40:175-179
- Stomp M, Huisman J, Vörös L, Pick FR, Laamanen M, Haverkamp T (2007) Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *ecology letters* 10:290-298
- Stupak ME, García MT, and Pérez MC (2003) Non-toxic alternative compounds for marine antifouling paints. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52:49-52
- Suihko ML, Alakomi HL, Gorbushina A, Fortune I, Marquardt J, Saarela M (2007) Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments. *Systematic and Applied Microbiology* 30:494-508
- Svane I, Cheshire A, and Barnett J (2006) Test of an antifouling treatment on tuna fish-cages in Boston Bay, Port Lincoln, South Australia. *Biofouling* 22:209-219
- Tang Y, Finlay JA, Kowalke GL, Meyer AE, Bright FV, Callow ME, Callow JA, Wendt DE, and Detty MR (2005) Hybrid xerogel films as novel coatings for antifouling and fouling release. *Biofouling* 21:59-71
- Targett NM, Bishop SS, McConnell OJ, and Yoder JA (1983) Antifouling agents against the benthic marine diatom *Navicula salinicola* Homarine from the *gorgonians* *Leptogorgia virgulata* and *L. setacea* and analogs. *Journal of Chemical Ecology* 9:817-829
- Terlizzi A, Frascetti S, Gianguzza P, Faimali M, and Boero F (2001) Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 11:311-317
- Thomas KV (2001) The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: A review. *Biofouling* 17:73 - 86

- Thomas KV, Mchugh M, Waldoek M (2002) Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Sciences of Total Environment* 293:117-127
- Thompson R, Norton T, and Hawkins S (1998) The influence of epilithic microbial films on the settlement of *Semibalanus balanoides* cyprids – a comparison between laboratory and field experiments. *Hydrobiologia* 375-376:203-216
- Thyssen M, Lefevre D, Caniaux G, Ras J, Fernandez C, and Denis M (2005) Spatial distribution of heterotrophic bacteria in the northeast Atlantic. *Journal of Geophysical Research* 110:11-16
- Tsoukatou M, Hellio C, Vagias C, Harvala C, and Roussis V (2002) Chemical Defense and Antifouling Activity of Three Mediterranean Sponges of the Genus *Ircinia*. *Zeitschrift für Naturforschung* 57:161-171
- Turner A (2010) Marine pollution from antifouling paint particles. *Marine Pollution Bulletin* 60:159-171
- Utermohl H (1958) Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik. *Theor Angew Limnol*:37-38
- van Wezel AP, and van Vlaardingen P (2004) Environmental risk limits for antifouling substances. *Aquatic Toxicology* 66:427-444
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, and Attfield PV (2000) Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods* 243:191-210
- Vesterlund S, Paltta J, Karp M, and Ouwehand AC (2005) Measurement of bacterial adhesion--in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* 60:225-233
- Viana G, Medeiros A, Lacerd A, Lea L and Vale T (2004) Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology* 4:1-7
- Viccini LF, Silva PS, de Almeida MV, Saraiva MF, Peixoto PHP, Salimena FRG, Diniz R, Rodrigues BL, Scowen I, Edwards HGM, and de Oliveira LFC (2008) Ipolamiide and fulvoipolamiide from *Stachytarpheta glabra* (Verbenaceae): A structural and spectroscopic characterization. *Journal of Molecular Structure* 875:27-31
- Videla HA, Guimet PS, de Saravia SG (2000) Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46:335-341

- Villa F, Giacomucci L, Polo A, Principi P, Toniolo L, Levi M, Turri S, and Cappitelli F (2009) N-vanillylnonanamide tested as a non-toxic antifoulant, applied to surfaces in a polyurethane coating. *Biotechnology Letters* 31:1407-1413
- Villagómez-Ibarra JR, Sánchez M, Espejo O, Zúñiga-Estrada A, Torres-Valencia JM, and Joseph-Nathan P (2001) Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia* 72:692-694
- Villeneuve A., Montuelle B., Bouchez A. (2010) Effects of flow regime and pesticides on periphytic communities: Evolution and role of biodiversity. *Aquatic Toxicology* 102:123-133
- Wahl M (1989) Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58:175-189
- Wahl M, Mark O (1999) The predominantly facultative nature of epibiosis: experimental and observational evidence. *Marine Ecology Progress Series* 187:59-66
- Watermann BT, Daehne B, Sievers S, Dannenberg R, Overbeke JC, Klijnstra JW, and Heemken O (2005) Bioassays and selected chemical analysis of biocide-free antifouling coatings. *Chemosphere* 60:1530-1541
- Webster DC, and Chisholm BJ (2010) New directions in antifouling technology, Chapitre 25 Wiley-Blackwell
- Webster NS, and Negri AP (2006) Site-specific variation in Antarctic marine biofilms established on artificial surfaces. *Environmental Microbiology* 8:1177-1190
- Wei GX, Campagna AN, and Bobek LA (2006) Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57:1100-1109
- Wieczorek SK, and Todd CD (1998) Inhibition and facilitation of settlement of epifaunal marine invertebrate larvae by microbial biofilm cues. *Biofouling* 12:81-118
- Williams SC, Hong Y, Danavall DCA, Howard-Jones MH, Gibson D, Frischer ME, and Verity PG (1998) Distinguishing between living and nonliving bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods* 32:225-236
- Wimpenny J, Manz W, and Szewzyk U (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 24:661-671
- Winter C, Kerros ME, and Weinbauer MG (2009) Seasonal and depth-related dynamics of prokaryotes and viruses in surface and deep waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 56:1972-1982

- Xu Q, Barrios C, Cutright T, and Newby B-mZ (2005) Assessment of Antifouling Effectiveness of two Natural Product Antifoulants by Attachment Study with Freshwater Bacteria. *Environmental Science and Pollution Research* 12:278-284
- Xu Y, He H, Schulz S, Liu X, Fusetani N, Xiong H, Xiao X, and Qian P-Y (2010) Potent antifouling compounds produced by marine *Streptomyces*. *Bioresource Technology* 101:1331-1336
- Yebra DM, Kiil S, and 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
- Zardus JD, Nedved BT, Huang Y, Tran C, and Hadfield MG (2008) Microbial Biofilms Facilitate Adhesion in Biofouling Invertebrates. *Biological Bulletin* 214:91-98
- Zhou JL (2008) Occurrence and persistence of antifouling biocide Irgarol 1051 and its main metabolite in the coastal waters of Southern England. *Science of The Total Environment* 406:239-246
- Zobell CE (1943) The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *The Journal of Bacteriology* 46:39-56

# **ANNEXES**



## ANNEXE I

### I. MILIEU DE CULTURE POUR LES BACTERIES MARINES

#### I.1. Vaatanen Nine Salt Solution (VNSS) et VNSS agar (Mårdén et al., 1985)

Produit	g.l <sup>-1</sup>
Peptone	1,00
Extrait de levure	0,50
Glucose	0,50
Amidon soluble	0,50
Cristal de sulfate ferreux déshydraté	0,01
Sodium hydrogénophosphate	0,01

Ces composants ont été dissous dans du NSS (Nine-Salt Solution) préalablement préparé et stocké après autoclavage.

Produits	g.l <sup>-1</sup>
NaCl	17,6
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,47
NaHCO <sub>3</sub>	0,08
KCl	0,25
KBr	0,04
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,87
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,41
SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01

#### I.2. Marine Broth (MB) et MB agar (MA)

Produit	g.l <sup>-1</sup>
Peptone	5
Extrait de levure	1
NaCl	19,4500

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,2400
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,1600
KCl	0,5500
KBr	0,0800
MgCl <sub>2</sub>	5,9000
CaCl <sub>2</sub>	1,8000
SrCl <sub>2</sub>	0,0340
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0220
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	0,1000
NaF	0,0024
(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	0,0016
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,0080

### I.3. LB agar

Produit	g.l <sup>-1</sup>
Tryptone	10
Extrait de levure	5
NaCl	20

## II. MILIEU DE CULTURE POUR LES BACTERIES NON MARINES

### II.1. Brain Heart Infusion (BHI)

Produit	g.l <sup>-1</sup>
Infusion de cœur de boeuf	200
Infusion de cerveau de vau	250
Phosphate disodique	2,5
Glucose	2,0
Peptone	10,0
Chlorure de sodium	5,0

## II.2. Mueller Hinton II Agar (MHAI)

Produit	g.l <sup>-1</sup>
Extrait de bœuf	2,0
Hydrolysate acide de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	17,5

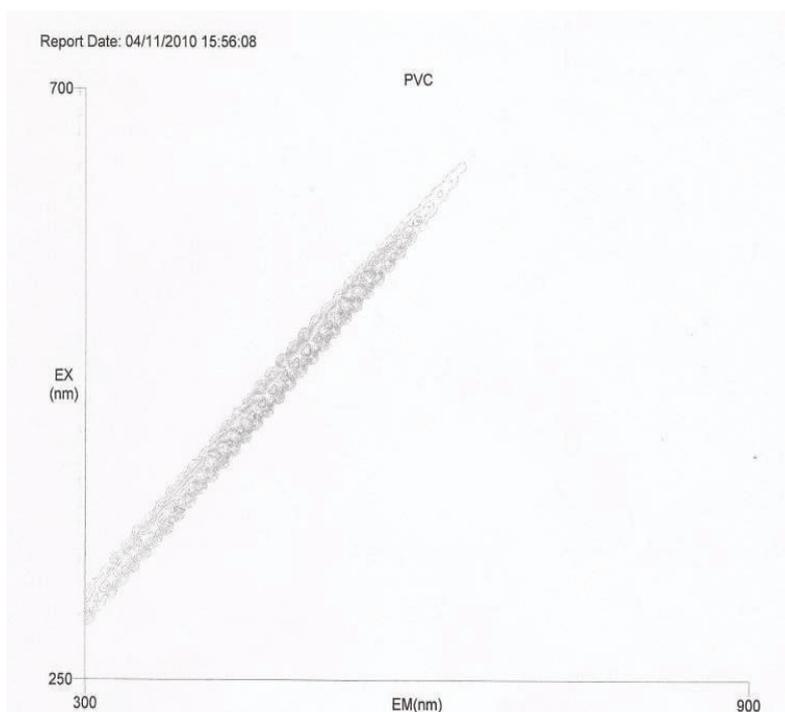
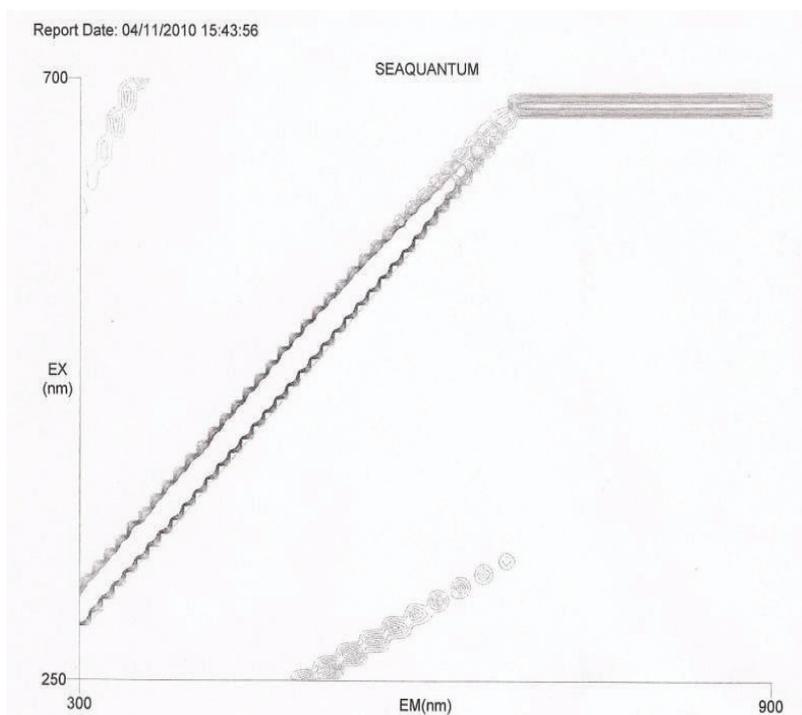
## III. Eau de mer artificielle (ASW : Artificial Sea Water)

Produit	mg.l <sup>-1</sup>
Cl	19251,00
Na	10757,00
SO <sub>4</sub>	2659,00
Mg	1317,00
K	402,00
Ca	398,00
HCO <sub>3</sub>	192,00
Sr	8,60
B	5,60
I	0,22
Li	0,18
Elément trace	0,50



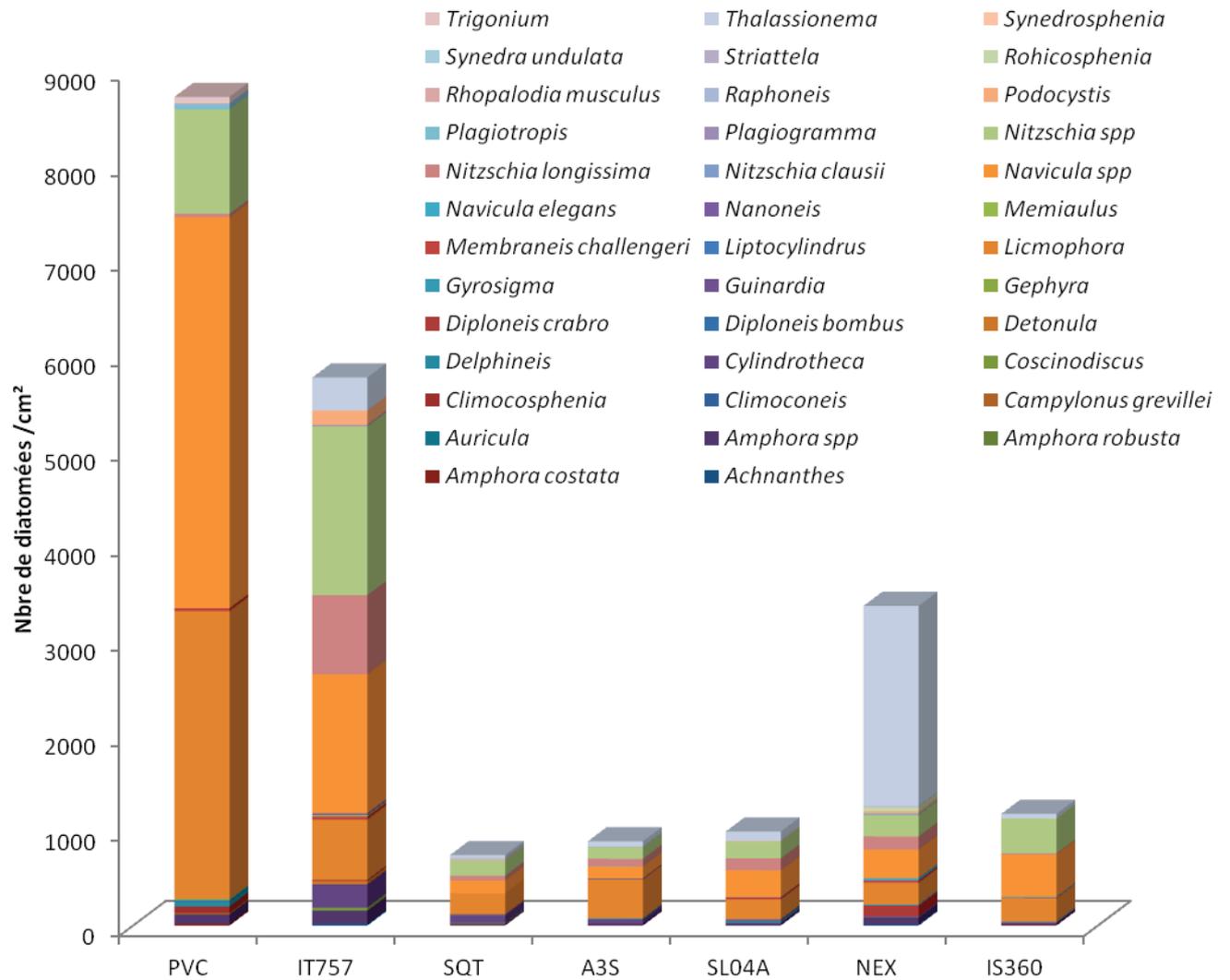
### ANNEXE III

#### Autofluorescence des peintures déterminées par spectrophotométrie 3D

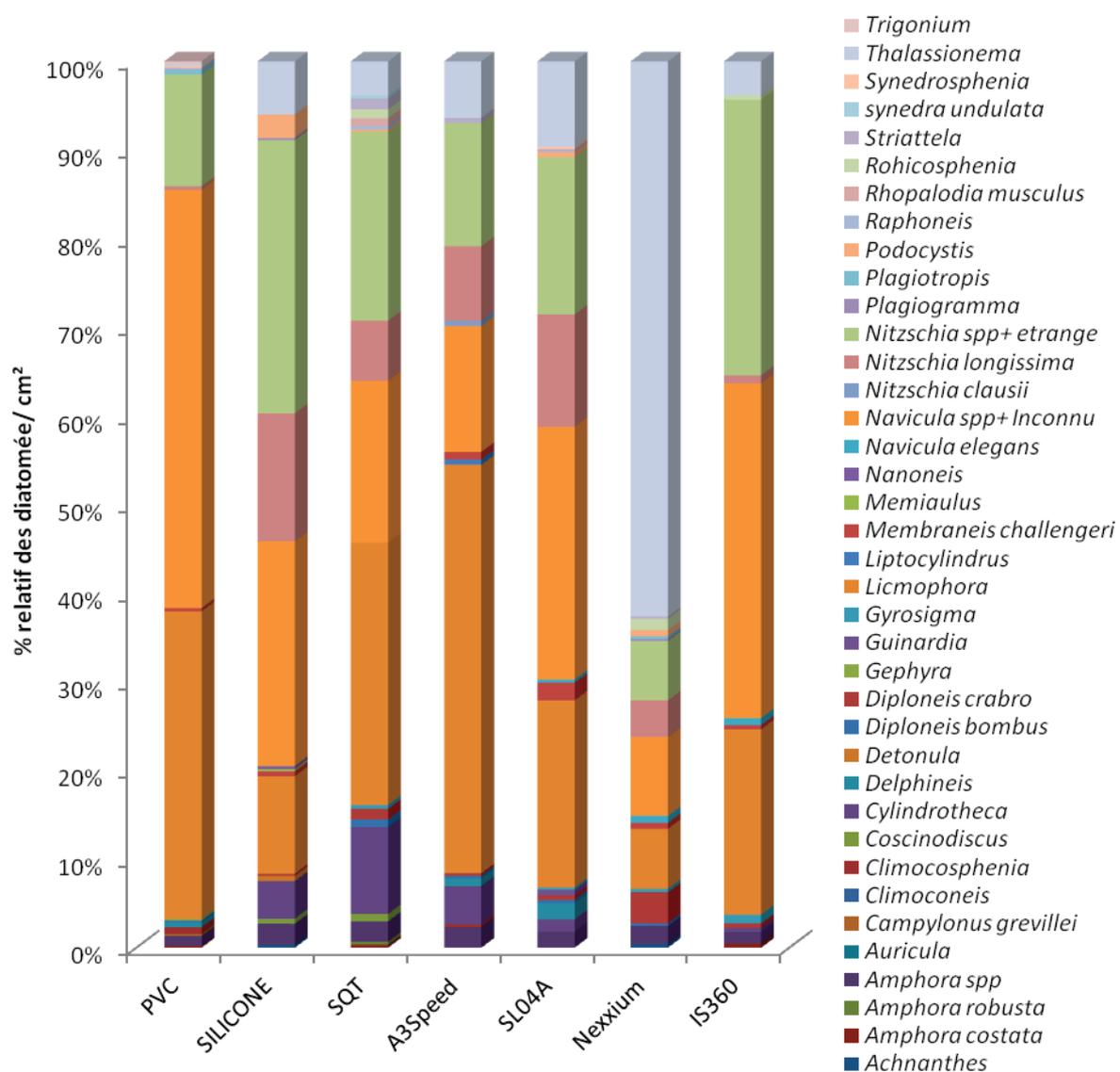


## ANNEXE IV

### I Abondance totale des diatomées présentes sur les sept supports immergés



## II Abondance relative (en %) des diatomées présentes sur les sept supports immergés



## ANNEXE V

**Laboratoire microbiologie du Venezuela :** Appareil permettant le lavage plus le passage a l'autoclave des divers ustensiles (cônes, pipette en verre...)



**Spectrophotomètre digital et spectrofluoromètre**



## ANNEXE VI

**Plante récoltée pour l'extraction des acide kaurénique et du kaurénol :**



*Espeletia schulzii*

**Plante traditionnellement récoltée pour l'extraction par le laboratoire :**

***Espeletia semiglobulata***





## ABSTRACT

Any surface immersed in water is rapidly colonized by a lot of micro-and macroscopic organisms. Sequential and complex phenomenon known as biofouling, lead to major economic and ecological damages, particularly in the marine environment. The recent ban of toxic substances used as biocides in antifouling coatings for ship hulls notably, has relaunched searching for new molecules antifouling environmentally friendly.

The objective of this thesis was to develop and initiate the study of the representativeness of a bioassay allow to assess the potential of molecules and antifouling coatings on "biofilms" mono and multi-species microplate using of fluorochromes. It was decided to focus on the primary biofilm because it is possible that the elimination or limitation of the latter reduce biofouling. Five strains of marine bacteria pioneers, isolated from the Bay of Toulon and Brittany, were used to compare the effectiveness of a settlement of commercial and natural molecules. Two derivatives of natural substances Marine (TFA E and Z) showed significant activity associated with a lack of toxicity in bacteria, suggesting a specific anti-adhesion mechanism. In addition, differences in sensitivity between strains have confirmed the importance of making the bioassay with a various bacteria.

To see if the data obtained in the laboratory showed what happens in the natural environment, a comparison between the results of the bioassay in microplate applied to six coatings and biofilms isolated on the same paint immersed for a month in the Bay of Toulon (analyzed by flow cytometry, microscopy and PCR-DGGE) was performed. Quantitative analysis suggested a correlation in between approaches although the absence of effectiency intermediate coating and the number of tested systems limit our conclusions

Keywords: Bofouling, Primary biofilm, Marine bacteria, Anti-adhesion, Toxicity, commercial and natural antifouling, Microplate, Diatoms.



## RESUME

Tout support immergé dans l'eau est rapidement colonisé par de nombreux organismes micro- et macroscopiques. Ce phénomène séquentiel et complexe appelé biofouling est à l'origine de nombreux préjudices économiques et écologiques, notamment dans le milieu marin. L'interdiction récente de certaines substances toxiques, utilisées comme biocides dans les revêtements antifouling des coques de bateaux notamment, a relancé l'intérêt de rechercher de nouvelles molécules antifouling respectueuses de l'environnement.

L'objectif de cette thèse a été de développer et d'amorcer l'étude de la représentativité d'un bio-essai permettant d'évaluer le potentiel antifouling de molécules et de revêtements sur des « biofilms » mono et plurispécifiques *in vitro* en microplaques grâce à l'utilisation de fluorochromes. Le choix a été fait de se focaliser sur le biofilm primaire car il est envisagé que l'élimination ou la limitation de ce dernier réduisent le biofouling. Cinq souches de bactéries marines pionnières, isolées de la Rade de Toulon et en Bretagne, ont été utilisées afin de comparer l'efficacité anti-adhésion de molécules commerciales et naturelles. Deux dérivés de synthèse de substances naturelles marines (TFA E et Z) ont présenté une activité significative associée à une absence de toxicité sur bactéries, suggérant ainsi un mode d'action anti-adhésion spécifique. En outre, les différences de sensibilité entre souches ont confirmée l'importance de réaliser le bio-essai avec un panel diversifié de bactéries.

Afin de voir si les données obtenues en laboratoire reflétaient ce qui se produit dans le milieu naturel, une comparaison entre les résultats du bio-essai en microplaque appliqué à six revêtements et les biofilms qui ont colonisés ces mêmes peintures immergées un mois dans la Rade de Toulon (analysés par cytométrie de flux, microscopie et PCR-DGGE), a été effectuée. Les analyses quantitatives ont suggéré une cohérence entre les deux approches même si l'absence de revêtement d'efficacité intermédiaire et le nombre de systèmes testés limite la portée de nos conclusions.

Mots-clés : Biofouling, biofilm primaire, bactéries marines, anti-adhésion, toxicité, antifouling commerciaux et naturels, microplaque, bio-essai, diatomées

