



HAL
open science

Contribution à l'étude de l'organisation et des propriétés mécaniques d'exopolymères de matrice de biofilms modèles

Pierre Lembré

► **To cite this version:**

Pierre Lembré. Contribution à l'étude de l'organisation et des propriétés mécaniques d'exopolymères de matrice de biofilms modèles. Sciences agricoles. Université de Cergy Pontoise, 2012. Français. NNT : 2012CERG0612 . tel-00844745

HAL Id: tel-00844745

<https://theses.hal.science/tel-00844745>

Submitted on 27 Nov 2014

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.



Ecole Doctorale Science et Ingénierie

De l'université de Cergy-Pontoise

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'université de Cergy-Pontoise

Spécialité : Biologie, Santé, Médecine.

Contribution à l'étude de l'organisation et des propriétés mécaniques

d'exopolymères de matrices de biofilms modèles

Par

Pierre Lembré

Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellule EA 1391

Soutenue le Jeudi 22 Novembre 2012

Devant un jury composé de

E. NEUHAUSER	Professeur à l'Université d'Auch	Rapporteur
T. JOUENNE	Directeur de Recherche CNRS, Rouen	Rapporteur
R. BRIANDET	Charger de Recherche INRA, Jouy en Josas	Examinateur
O. GALLET	Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise	Examinateur
C. VENDRELY	Maitre de Conférences à l'Université de Cergy-Pontoise	Co-Encadrante
P. DI MARTINO	Professeur à l'Université de Cergy-Pontoise	Directeur de thèse

Remerciements

Ces travaux ont eu lieu au sein du laboratoire ERRMECe EA 1391 de l'université de Cergy-Pontoise sous la direction scientifique de Patrick Di Martino.

Je tiens à remercier Patrick Di Martino pour son aide lors de l'encadrement de ce sujet de thèse. Je le remercie aussi pour la confiance qu'il m'a accordée pour mener à bien ce projet scientifique. Je tiens à remercier aussi Charlotte Vendrely pour son aide et sa bienveillance sur l'ensemble de ce travail.

Je tiens à remercier Madame Elisabeth Neuhauser, Professeur des universités (Université d'Auch), Messieurs Thierry Jouenne, Directeur de recherche CNRS (Université de Rouen), Romain Briandet, Chargé de Recherche INRA (MICALIS Jouy-en-Josas), Olivier Gallet, Professeur des universités (Université de Cergy-Pontoise), qui me font l'honneur d'évaluer ces travaux.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Véronique Larreta-Garde, Professeur des universités pour son accueil au sein du laboratoire ERRMECe pendant ces années.

Je remercie également Monsieur Alexandre Chenal, Chargée de Recherche (Institut Pasteur), pour son aide et son accueil au sein du laboratoire : Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaire de l'institut Pasteur.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant aidé au cours de ces trois années :

Les membres du laboratoire ERMMECe pour leur sympathie et nos longues discussions scientifiques (ou non). Au sein du laboratoire, je tiens à remercier particulièrement les doctorants : Céline, Julien, Marie-Cécile, Baligh, Laurent, Ludovic, Rumezya, Elodie, pour leur bonne humeur et leur aide constante.

J'aimerais aussi remercier toute l'équipe de l'institut des Etudes Doctorales de Cergy-Pontoise pour leur aide et leur bienveillance envers les doctorants, et les bons moments que j'ai passés en leur compagnie dans les différents conseils et manifestations. J'ajoute un grand merci à Marie-Dominique Pujol et Claude Forsan pour leurs bons conseils et leur aide.

Je tiens à remercier particulièrement ma femme et ma famille, pour m'avoir supporté pendant ces trois ans.

Enfin, j'aimerais finir par remercier toutes les personnes que j'ai eues la chance de croiser pendant ces années chez les DUCs.

A tous un grand **Merci**

Avant Propos

Les travaux décrits dans cette thèse ont été effectués au sein du laboratoire ERRMECe (EA1392) de l'université de Cergy-Pontoise. Ils sont le reflet d'une approche transdisciplinaire de la caractérisation de matrices de polymères de nature biologique. Ces travaux font appel à mes connaissances dans les domaines de la biologie, de la biochimie, de la microbiologie, et de la physico-chimie des polymères.

Dans ce manuscrit, dans un premier temps les connaissances actuelles sur les biofilms bactériens, en particulier les biofilms de trois groupes bactériens différents : les *Enterobacteriaceae*, les *Pseudomonales*, et les *Staphylococcus*. Puis nous exposerons l'état des avancées des travaux sur la compréhension du rôle de constituants essentiels des biofilms : les polysaccharides, les protéines et l'ADN. Enfin nous terminerons cette revue bibliographique par la présentation des connaissances sur les propriétés mécaniques des biofilms bactériens.

Après avoir présenté les méthodes utilisées lors de ce travail, nous tenterons, dans la partie résultats, d'apporter une explication quant aux rôles de différents polymères, tels que des protéines et en particulier des fibres de type amyloïde ou des exopolysaccharides, dans la structuration en biofilm. En utilisant des matrices de polymère simples, constituées d'un ou plusieurs éléments présents dans certains biofilms, ces travaux aident à la compréhension des phénomènes physico-chimiques ayant lieu au sein de ces structures.

Enfin, dans une dernière partie, nous discuterons de ces résultats, avant de conclure et de présenter des perspectives que peuvent apporter ces travaux quant à la compréhension de ce système complexe qu'est le biofilm bactérien.

Sommaire

Avant-propos	p 3
Sommaire	p 4
Liste des tableaux et figures	p 8
Liste des abréviations	p 14
Chapitre I Introduction Bibliographique	p 18
Sommaire chapitre I.....	p 19
I) Définition et mécanisme de formation du biofilm.....	p 20
II) Espèces bactériennes « modèles » majeures pour l'étude des biofilms	p 24
II.1) <i>Escherichia coli</i> et <i>Salmonella enterica</i>	p 24
II.1.1) <i>Escherichia coli</i>	p 24
II.1.2) <i>Salmonella enterica</i>	p 28
II.2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p 30
II.3) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	p 33
III) Composition de la matrice du biofilm	p 36
III.1) Les polysaccharides	p 36
III.1.1) L'alginate	p 37
III.1.2) La cellulose	p 40
III.1.3) Le poly-N-acétylglucosamine.....	p 41
III.1.4) Autres sucres de la matrice	p 43
III.2) Les protéines de structure	p 44
III.2.1) Les fibres amyloïdes	p 44
III.2.2) Les protéines de la famille de Bap (Biofilm associated protein)	p 50
III.2.3) Les protéines de la famille des adhésines et pili	p 52
III.2.3.1) Adhésines et pili chez <i>Escherichia coli</i>	p 52
III.2.3.2) Adhésines et pili chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p 54
III.2.3.3) Adhésines et pili chez les <i>Staphylococcus</i>	p 55
III.2.4) Les autres protéines ayant un rôle dans la structuration du biofilm ..	p 57
III.3) Les enzymes	p 58
III.4) L'ADN extracellulaire.....	p 60

III.5) Les lipides.....	p 61
IV) Propriétés mécaniques des biofilms	p 63
But et objectifs de la thèse.....	p 68
Chapitre II Matériels et méthodes	p 71
Sommaire chapitre II	p 72
I) Formation et étude des fibres amyloïdes	p 73
I.1) Criblages des souches	p 73
I.2) Choix des peptides	p 74
I.3) Formation de fibres amyloïdes	p 77
I.4) Test de fluorescence en présence de thioflavine T	p 77
I.5) Spectroscopie d'absorbance du rouge Congo	p 79
I.6) Spectroscopie infrarouge.....	p 80
I.7) Microscopie à force atomique	p 82
I.8) Microscopie à lumière polarisée	p 83
I.9) Test d'adhérence des bactéries aux peptides immobilisés	p 84
I.10) Détermination de la quantité d'ATP	p 85
II) Biofilms modèles monomicrobiens	p 85
II.1) Conditions de culture	p 85
II.2) Cinétique de formation	p 86
II.3) Marquage des biofilms.....	p 86
II.4) Visualisation par microscopie confocale	p 87
II.5) Rhéologie des biofilms	p 88
III) Réalisation et caractérisation de matrices artificielles	p 89
III.1) Matrices à base d'alginate	p 89
III.2) Matrices à base de méthyle-cellulose	p 90
III.3) Rhéologie des gels	p90
III.4) Matrices à base de peptide amyloïdes	p 92

II.3) Rôle potentiel pour l'adhérence des fibres amyloïdes	p 144
III) Matrices artificielles	p 150
III.1) Matrices d'alginate	p 150
III.1.1) Gels d'alginate seul.....	p 151
III.1.2) Gels mixtes alginate et histone H2a.....	p 153
III.1.3) Gels mixtes alginate et peptides.....	p 155
III.1.3.1) Gel mixte alginate et peptide Q.....	p 155
III.1.3.2) Gel de peptide amyloïde R2Tseul	p 157
III.1.3.3) Gel mixte alginate et peptide amyloïde R2T.....	p 159
III.1.3.4) Gel mixte alginate et peptide amyloïde R13T.....	p 161
III.2) Matrices de Méthyle-cellulose.....	p 163
III.2.1) Gel de Méthyle-cellulose seule.....	p 163
III.2.2) Gel de Méthyle-cellulose et peptides.....	p 165
III.2.2.1) Gel mixte Méthyle-cellulose et peptide Q	p 165
III.2.2.2) Gel mixte de Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R5	p 167
III.2.2.3) Gel mixte de Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R5T.....	p 169
III.2.2.4) Gel mixte de Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R13T.....	p 171
 Chapitre IV Discussion	 p 175
Chapitre V Conclusion et perspectives	p 183
Chapitre VI Références bibliographiques	p186
Chapitre VII Annexes.....	p 208

Liste des Tableaux et figures

Partie I Introduction Bibliographique

Figure I.1 : Grandes étapes de formation d'un biofilm bactérien.	p 21
Figure I.2 : Schéma des différentes zones d'un biofilm mature.	p 23
Figure I.3: Micrographie électronique d' <i>E. coli</i>	p 25
Figure I.4 : Schéma des étapes d'adhérence lors de la formation de biofilm par <i>E. Coli</i>	p 26
Figure I.5 : Image en microscopie confocale d'un biofilm D' <i>Escherichia coli</i> mature.....	p 27
Figure I.6 : Colonie rdar de <i>S. enterica</i> sur gélose LB au rouge Congo.	p 29
Figure I.7 : Micrographie électronique de <i>S. typhimurium</i> organisée en biofilm.	p 29
Figure I.8 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de <i>S. enterica</i> mature.....	p 30
Figure I.9 : Micrographie électronique de <i>P. aeruginosa</i>	p 31
Figure I.10 : Schéma des étapes d'adhérence de <i>P. aeruginosa</i>	p 32
Figure I.11 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> mature.....	p 33
Figure I.12 : Micrographie électronique de <i>S. epidermidis</i>	p 34
Figure I.13 : Premières étapes de formation du biofilm par <i>S. epidermidis</i>	p 35
Figure I.14 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de <i>S. epidermidis</i>	p 36
Figure I.15 :Structure de l'alginate.	p 37
Figure I.16 : Schéma de la biosynthèse de l'alginate chez <i>P. aeruginosa</i>	p 38
Figure I.17 : Schéma de l'exportation de l'alginate chez <i>P. aeruginosa</i>	p 39
Figure I.18 Modèle de la boîte à œuf de Grant.	p 39
Figure I.19 : Structure de la cellulose	p 40
Figure I.20 : Schéma de la biosynthèse de la cellulose chez <i>E. coli</i>	p 41
Figure I.21 : Structure du PNAG	p 42
Figure I.22 :Schéma de la biosynthèse du PNAG chez <i>S. epidermidis</i>	p 42
Figure I.23 : Structure de l'acide teichoïque.	p 43
Figure I.24 : Structure de l'acide colanique	p 44
Figure I.25 : Image en microscopie électronique d'une fibre amyloïde.	p 45
Figure I.26 : Photographie d'une gélose YESCA.	p 46

Figure I.27 : Composition en acides aminés de CsgA.	p 47
Figure I.28 : Schéma d'une structure en hélice- β	p 48
Figure I.29 : Schéma de l'organisation de la protéine FapC.....	p 48
Figure I.30 :Micrographie électronique de <i>S. aureus</i> présentant des fibres.....	p 49
Figure I.31 : Alignements des séquences protéiques des différents PSMs de <i>S. aureus</i>	p 50
Figure I.32 : Schéma de la séquence en acides aminés de Bap.....	p 51
Figure I.33 : Pili de type I à la surface d' <i>E. coli</i>	p 53
Figure I.34 : Image en microscopie électronique des pili de type IV et du flagelle de <i>P. aeruginosa</i>	p 55
Figure I.35 : Schéma de l'assemblage des MSCRAMMS sur le peptidoglycane.....	p 56
Figure I.36 :.Système de sécrétion de type V chez <i>E. coli</i>	p 57
Figure I.37 :Image en microscopie confocale d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	p 60
Figure I.38 :Structure d'un rhamnolipide.....	p 61
Figure I.39 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> de 7 jours. ...	p 62
Figure I.40 :Mesure du G' et G'' d'un biofilm de membrane de filtration en oscillation	p 64
Figure I.41 :Courbe de rhéofluidification de la cellulose en fonction de la contrainte appliquée.	p 65
Figure I.42 :Test de Creep d'un biofilm de <i>S. mutans</i>	p 66
Figure I.43 : Biofilm de <i>S. enterica</i> en absence de flux et sous un flux laminaire.	p 67

Partie II Matériels et méthodes

Tableau II.1 : Composition des géloses Yesca.....	p 73
Tableau II.2 : Souches utilisées pour le test phénotypique sur gélose YESCA.....	p 74
Tableau II.3 : Listes des peptides utilisés.....	p 76
Figure II.4 : Structure de la Thioflavine T.	p 77
Figure II.5 : Principe de l'émission de fluorescence (Diagramme de Jablonski).....	p 78
Figure II.6 : Spectres d'émission de fluorescence de 20 μ M de thioflavine T.	p 78
Figure II.7 : Structure du rouge Congo.	p 79
Figure II.8 : Spectre d'absorption du rouge Congo à 100 μ M.	p80
Figure II.9 : Types de vibration des molécules soumises à un rayonnement infrarouge.	p 81

Figure II.10 : Schéma des principaux composants d'un microscope à force atomique.	p 82
Tableau II.11 : Spécificités et fluorochromes des lectines utilisées.....	p 87
Tableau II.12 : Marqueurs utilisés pour la caractérisation de biofilm en microscopie.	p 88
Figure II.13 : Courbe de Creep standard d'un matériau viscoélastique.	p 89
Figure II.14 : Courbe classique de gélification en mode oscillatoire à température constante.....	p 91
Figure II.15 : Courbe classique de gélification en mode oscillatoire en fonction de la température.....	p 92

Partie III Résultats

Figure III.1 : Image en microscopie à épifluorescence de trois triplets de marquage de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> NK.125502	p 98
Figure III.2 : Image en microscopie à épifluorescence de trois triplets de marquage de biofilm de <i>S. epidermidis</i> CIP 53.124	p 99
Figure III.3 : Image en microscopie à épifluorescence de trois triplets de marquage de biofilm de <i>S. enterica</i> CIP 58.58.....	p 100
Figure III.4 : Image en microscopie à épifluorescence de 3 heures.	p 102
Figure III.5 : Image en microscopie à épifluorescence de 6 heures.	p 103
Figure III.6 : Image en microscopie à épifluorescence de 9 heures.	p 104
Figure III.7 : Image en microscopie à épifluorescence de 12 heures.	p 105
Figure III.8 : Image en microscopie à épifluorescence de 24 heures.	p 106
Figure III.9 : Image en microscopie à épifluorescence de 30 heures.	p 107
Figure III.10 : Image en microscopie à épifluorescence de 48 heures.	p 108
Figure III.11 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de <i>P. aeruginosa</i>	p 110
Figure III.12 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de <i>P. aeruginosa</i> vue des coupes.....	p 111
Figure III.13 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de <i>S. epidermidis</i>	p 112
Figure III.14 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de <i>S. epidermidis</i> vue des coupes.....	p 113
Figure III.15 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de <i>S. enterica</i> ...	p 114

Figure III.16 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de <i>S. enterica</i> vue des coupes.....	p 115
Figure III.17 : Suivit du G' et du G'' d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> de 10 jours en fonction de la contrainte appliquée.	p 116
Figure III.18 : Test de Creep d'un biofilm de 10 jours de <i>P. aeruginosa</i>	p 117
Figure III.19 : Test de Creep d'un biofilm de 10 jours de <i>S. enterica</i>	p 118
Figure III.20 : Test de Creep d'un biofilm de 10 jours de <i>S. epidermidis</i>	p 119
Tableau III.21 : Phénotypes sur gélose Yesca de différentes souches d' <i>E.coli</i>	p 121
Tableau III.22 : Tableau de la répartition du phénotype RC+ et RC- en fonctions des espèces bactériennes testées.	p 122
Figure III.23 : Score Tango de la protéine CsgA d' <i>Escherichia coli</i>	p123
Figure III.24 : Score Tango de la protéine FapC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	p 125
Figure III.25 : Score Tango de la protéine Bap de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	p 126
Figure III.26 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide Q	p 127
Figure III.27 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide R5.....	p 128
Figure III.28 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide R5T	p 129
Figure III.29 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide R2T	p 130
Figure III.30 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide R13T ..	p 131
Figure III.31 : Spectre d'absorbance du rouge Congo en présence du peptide Q.....	p 132
Figure III.32 : Spectre d'absorbance du rouge Congo en présence des peptides R5 et R5T.....	p 133
Figure III.33 : Photographie des milieux réactionnels contenant du rouge Congo, et les peptides R5 et R5T incubés dans différentes conditions de pH.....	p 134
Figure III.34 : Spectre d'absorbance du rouge Congo en présence du peptide R2T.....	p 135
Figure III.35 : Spectre d'absorbance du rouge Congo en présence du peptide R13T.....	p 135
Figure III.36 : Spectres d'absorption infrarouge et leurs dérivés secondes des peptides Q, R5, R5T, R2T, et R13T	p 136
Figure III.37 : Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt du peptide R5 sur lame de verre en présence de rouge Congo avec un microscope à lumière polarisée classique.....	p 138
Figure III.38 : Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt du peptide R5 sur lame de verre en présence de rouge Congo avec un microscope confocal.....	p 139
Figure III.39 : Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt du peptide R5T	p 140

Figure III.40 : Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt du peptide R13T.....	p 141
Figure III.41 : Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt du peptide R2T.....	p 142
Figure III.42 : Images en microscopie à force atomique des peptides Q, R5, R5T, R2T et R13T sur lame de verre	p 143
Tableau III.43 : Tailles moyennes des fibres observées en microscopie à force atomique	p 144
Figure III.44 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes en sur une surface de polystyrène ou différentes concentration de peptide Q sont déposées.....	p 145
Figure III.45 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes en sur une surface de polystyrène ou différentes concentration de peptide R5 sont déposées.	p 146
Figure III.46 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes en sur une surface de polystyrène ou différentes concentration de peptide R5T sont déposées.....	p 147
Figure III.47 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes en sur une surface de polystyrène ou différentes concentration de peptide R2T sont déposées.....	p 147
Figure III.48 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes en sur une surface de polystyrène ou différentes concentration de peptide R13T sont déposées.....	p 148
Figure III.49 : Résultats des tests de corrélation de Spearman et de Kendall	p 149
Figure III.50 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75%.	p 151
Figure III.51 : Courbe de Creep de l'alginate 0,75%.	p 152
Figure III.52 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75% en présence de 0,5% d'histone H2a.	p 153
Figure III.53 : Courbe de Creep de l'alginate 0,75% en présence d'histone H2a à 0,5%... p 154	
Figure III.54 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75% en présence de 0,5% de peptide Q.	p 156
Figure III.55 : Courbe de Creep de l'alginate 0,75% en présence du peptide Q à 0,5% p 157	
Figure III.56 : Module élastique et visqueux d'une solution de 1mM de peptide R2T en oscillation.	p 158
Figure III.57 : Courbe de Creep du peptide R2T à 1mM.....	p 158
Figure III.58 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75% en présence de 0,5% de peptide R2T.....	p 159
Figure III.59 : Courbe de Creep de l'alginate 0,75% en présence du peptide R2T à 0,5% p 160	
Figure III.60 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75% en présence de 0,5% de peptide R13T.....	p 161

Figure III.61 : Courbe de Creep de l'alginate 0,75% en présence du peptide R13T à 0,5%.....	p 162
Figure III.62 : Courbe de gélification en oscillation de la méthyle-cellulose à 0,75%.....	p 164
Figure III.63 : Courbe de Creep de la méthyle-cellulose à 0,75%.....	p 164
Figure III.64 : Courbe de gélification en oscillation de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide Q à 0,5%	p 166
Figure III.65 : Courbe de Creep de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide Q à 0,5%.....	p 167
Figure III.66 : Courbe de gélification en oscillation de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide R5 à 0,5%	p 168
Figure III.67 : Courbe de Creep de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide R5 à 0,5%.....	p 169
Figure III.68 : Courbe de gélification en oscillation de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide R5T à 0,5%	p 170
Figure III.69 : Courbe de Creep de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide R5T à 0,5%.....	p 171
Figure III.70 : Courbe de gélification en oscillation de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide R13T à 0,5%	p 172
Figure III.71 : Courbe de Creep de la méthyle-cellulose à 0,75% en présence du peptide R13T à 0,5%.....	p 172
Tableau III.72 : Tableau récapitulatif des propriétés mécaniques des différentes matrices	p 174

Partie IV Discussions

Tableau IV.1 : Résumé des résultats obtenus pour la caractérisation de peptide.....	p 177
---	-------

Partie V Conclusions et perspectives

Figure V.1 : Image en microscopie confocale d'un gel de 0,75% d'alginate et 0,5% de R2T.....	p 184
--	-------

Partie VI Annexe

Annexe 1 : Phénotype des souches sur gélose YESCA	p 209
Annexe 2 : Coupes en microscopie confocale du biofilm de 10 jours de <i>P. aeruginosa</i>	p 213
Annexe 3 : Coupes en microscopie confocale du biofilm de 10 jours de <i>S. epidermidis</i> ...	p 214
Annexe 4 : Coupes en microscopie confocale du biofilm de 10 jours de <i>S. enterica</i>	p 215

Liste des abréviations

Aap : accumulation associated protein
A par m² : Ampère par mètre carré
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNe : acide désoxyribonucléique extracellulaire
Ag43 : antigène 43
AH : Lectine d'*Arachis hypogaea*
AI-2 : Autoinducteur-2
A. vinelandii : *Azotobacter vinelandii*
AMP: Adénosine mono-phosphate
ATP: Adénosine tri-phosphate
Bap: Biofilm associated protein
bcs : bacterial synthesis locus
Bhp : Bap-homologue-protein
BS : Lectine de *Bandeiraea simplicifolia*
CA : Concanavaline A
CIP : Collection Institut Pasteur
CW TA: acide teichoïque associé à la paroi cellulaire
Cup : chaperon-usher-pathway
Da : Dalton
DAPI : Diamino-4,6-phénylindol-2-dichlorhydrate
DO₆₀₀ : Densité optique à 600 nm
EA : équipe d'accueil
EAGGEC : *Escherichia coli* entéroagréatifs
EC TA : acide teichoïque extracellulaire

E. coli : *Escherichia coli*

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragiques

EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasifs

EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogènes

F6P: fructose-6-phosphate

Fbe : Fibrinogen binding protein

FITC: Isothiocyanate de fluoresceine

Fuc : fucose

G' : module de conservation

G'' : module de perte

G* : module complexe

Gal : galactose

G-bloc: Bloc d'acide guluronique

GDP-mannose : guanidine-di-phosphate-mannose

GDP-mannuronate: guanidine-di-phosphate-mannuronate

Glc : glucose

Hz : Hertz

ica : InterCellular Adhesion

ICSP : Comité international de la systématique des procaryotes

ITU: Infection du tractus urinaire

kDa : Kilo Dalton (1000 Dalton)

LB : Luria-Bertani

LE: Lectine de *Lycopersicon esculentum*

LPS : Lipopolysaccharide

M1P : mannose-1-phosphate

M6P : mannose-6-phosphate

M-Bloc : Bloc d'acide mannuronique

M-cellulose : Méthyle-cellulose

MG-bloc : bloc mixte d'acide mannuronique et guluronique

MOI : Organisation maritime internationale

MSCRAMMs: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules

Na₄EDTA : sel d'acide éthylène diamine tétraacétique-tetra-sodum

Pa :Pascal

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PFA : paraformaldéhyde

P. fluorescens: *Pseudomonas fluorescens*

PIA: poly-intercellular adhésine ou PNAG

PNAG : Poly-N-acétyl-glucosamine

PNA : Peanut agglutinin

PSMs: phénol soluble modulin

P. putida: *Pseudomonas putida*

PVC: polychlorure de vinyle

Pyr: pyruvate

Q : Peptide QFGGGN

R2T : peptide NNLAIVTA

R5: sous unité de CsgA et peptide SSVNVTQVGFGNNATAHQY

R5T: peptide SVNVTQVGFG

R13T: peptide STVTVTF

RC: rouge Congo

rdar : Red dry and rough

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

Sdr : famille des sérines aspartates adhésines

S. enterica: *Salmonella enterica*

S. epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*

S. typhimurium: Salmonella typhimurium

tafi : thin aggregative fimbriae

THT : thioflavine T

TRITC : TetramethylRhodamineIsoThioCyanate

TS : Trypticase soja

UE : Lectine d'*Ulex europaeus*

W par m² : Watt par mètre carré

η : viscosité

τ : contrainte

Chapitre I : Introduction Bibliographique

Sommaire : Introduction Bibliographique

Chapitre I : Introduction Bibliographique	18
I) Définition et mécanismes de formation de biofilm.	20
II) Espèces bactériennes « modèles » majeures pour l'étude des biofilms.	24
II.1) <i>Escherichia coli</i> et <i>Salmonella enterica</i>	24
II.1.1) <i>Escherichia coli</i>	24
II.1.2) <i>Salmonella enterica</i>	28
II.2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
II.3) <i>Staphylococcus epidermidis</i>	33
III) Composition de la matrice du biofilm	36
III.1) Les polysaccharides.....	36
III.1.1) L'alginat.....	37
III.1.2) La cellulose.....	40
III.1.3) Le poly-N-acétylglucosamine.....	41
III.1.4) Autres sucres de la matrice	43
III.2) Les protéines de structure.....	44
III.2.1) Les fibres amyloïdes	44
III.2.2) Les protéines de la famille Bap (Biofilm associated Protein).	50
III.2.3) Les protéines de la famille des adhésines et pili.....	52
III.2.3.1) Adhésines et pili chez <i>Escherichia coli</i>	52
III.2.3.2) Adhésines et pili chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
III.2.3.3) Adhésines et pili chez les <i>Staphylococcus</i>	55
III.2.4) Les autres protéines ayant un rôle dans la structuration du biofilm.	57
III.3) Les enzymes.	58
III.4) L'ADN extracellulaire.....	60
III.5) Les lipides	61
IV) Propriétés mécaniques des biofilms.....	63
But et objectifs de la thèse.....	64

I) Définition et mécanismes de formation de biofilm.

Le biofilm a été défini pour la première fois en 1978 par J. W Costerton (Costerton J W et col, 1978). Depuis la définition du biofilm a évolué, et maintenant il peut être qualifié de communauté de microorganismes encapsulée dans une matrice auto-induite de polymères extracellulaires et présente à une interface, qu'elle soit solide/liquide, solide/air, ou bien liquide/air.

Pour l'activité humaine, les biofilms bactériens peuvent être soit souhaités, soit constituer un problème technologique ou sanitaire. Ainsi, des biofilms peuvent être bénéfiques et permettre la production industrielle de nombreux composés biologiques comme l'insuline ou des facteurs de croissance, la dépollution des eaux usées ou des sols (Halan B, et col, 2012 ; Ras M, et col, 2008). Les biofilms bactériens peuvent produire de l'énergie grâce à leur caractère électroactif (Delaney G M, et col, 1984 ; Allen R M, et col, 1993 ; Erable et col, 2009). Par exemple, les biofilms formés par l'espèce *Shewanella oneidensis* fournissent une puissance de 4,31 W par m² de biofilm (Rabaey K, et col, 2004), et un biofilm marin naturel peut fournir un courant de 0,7 W par m² (Erable B, et col, 2009).

Cependant, dans ce même domaine industriel, les biofilms sont souvent un problème technologique. Par exemple, le biofouling marin (présence de biofilm sur les bateaux) entraîne une corrosion rapide des coques de bateaux, ainsi qu'une surconsommation de carburant (rapport de l'organisation maritime internationale, MOI). Dans un autre domaine, les biofilms peuvent colmater les membranes de filtration d'eau potable limitant leurs capacités de filtration (Ahmed Houari, Doctorat de l'université de Cergy-Pontoise, 2009). Dans le domaine sanitaire, la présence de biofilms au sein du système de distribution d'eau peut entraîner de graves problèmes de santé publique comme la fièvre de Pontiac et surtout la légionellose (Jean-Louis Roubaty, 2001). La structuration en biofilm de certaines espèces bactériennes est un problème d'hygiène et de santé majeur, tant dans les hôpitaux, qu'en médecine de ville et dans l'industrie agroalimentaire. On peut citer parmi les infections à biofilms ou les infections consécutives à une contamination par des biofilms les plus communes, les infections à Staphylocoques sur prothèse, cathéter et matériaux implantés, les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections à *Listeria monocytogenes* après consommation d'aliments contaminés (Parra-Ruiz J et col, 2012, Fothergill J L, et col, 2012, Habimana O, et col, 2009). Les infections à biofilm font partie des maladies les plus difficiles à traiter car les bactéries

organisées en biofilms présentent une résistance accrue aux antibiotiques qui ont du mal à diffuser en son sein (Stewart P H, et col, 2001). Ces problèmes de diffusion des antibiotiques sont dus à la présence de la gangue protectrice que forme la matrice. Le réseau d'exopolymères forme un maillage qui constitue un frein au passage de molécules d'une taille supérieure à celle des mailles. Par ailleurs, la matrice a des propriétés électro-négatives et fixe les molécules chargées positivement comme les aminosides (Stewart P H et Costerton J W, 2001). De plus, on sait aujourd'hui que d'autres mécanismes de résistance aux antimicrobiens sont liés à l'organisation des bactéries en biofilm du fait notamment d'un phénotype biofilm spécifique et de la présence de cellules persistantes (Kim Lewis, 2010 ; Bridier A, et col, 2011). Les stratégies envisagées à l'heure actuelle pour lutter contre les biofilms visent à empêcher ou ralentir la formation du biofilm.

La formation du biofilm est un processus complexe qui s'effectue en plusieurs étapes : (Figure I.1)

-En premier lieu, se produit un phénomène d'adhérence de cellules à une surface, ou de leur regroupement à une interface.

-Puis, a lieu le recrutement d'autres cellules à partir du site de la première adhésion.

-L'étape suivante est une étape de maturation avec la production de la matrice et un grand nombre de divisions cellulaires.

-Et enfin une étape de détachement, afin d'aller coloniser de nouvelles surfaces.

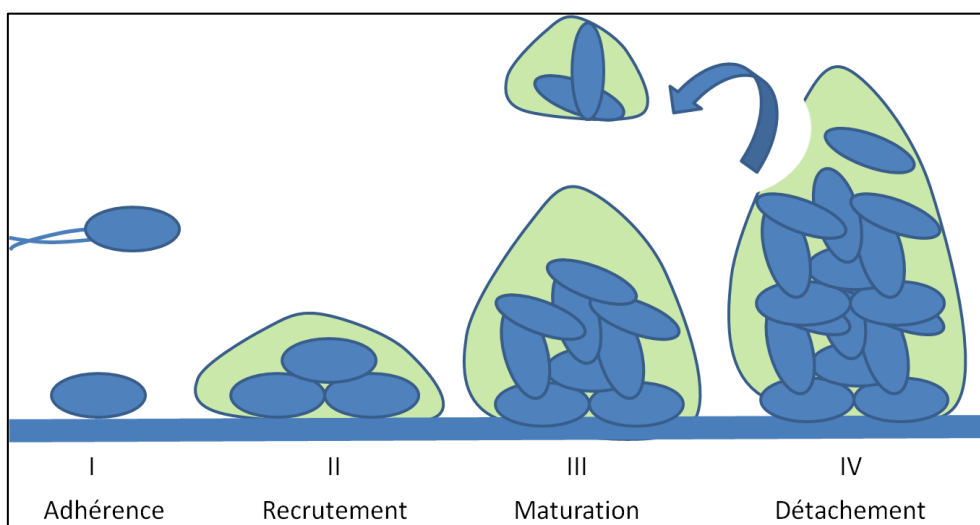


Figure I.1 : Grandes étapes de formation d'un biofilm bactérien.

La matrice du biofilm est constituée de 3 composants majeurs (Sutherland I W, 2001) : des polysaccharides, des protéines, et des acides nucléiques qui vont avoir un rôle plus ou moins important selon la zone de la matrice du biofilm. En effet, un biofilm mature est très hétérogène et est composé de quatre zones principales (Figure I.2). La première est la zone en contact avec le support (Figure I.2, zone d'adhérence). Les cellules bactériennes adhèrent au support grâce à un grand nombre d'appendices et de polymères présents à la surface de la cellule. Par exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, le flagelle joue un rôle important dans les interactions avec la surface (Toutain C M et col, 2007). Chez *Staphylococcus epidermidis*, l'autolysine AltE est primordiale pour l'attachement des bactéries aux surfaces (Heilmann C, et col, 1997). Les différents facteurs d'adhérence de quatre espèces bactériennes : *Escherichia coli*, *Salmonella Enterica sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis* sont détaillés dans la Partie II.

La base du biofilm est en général une zone très dense en cellules (Figure I.2, rectangle Base du biofilm). Plusieurs études dont celle de l'équipe de Witchurch sur les biofilms de *P. aeruginosa* ont montré que cette zone était riche en ADN extracellulaire (ADNe) (C B Witchurch et col, 2002). Le rôle de l'ADNe sera détaillé dans la Partie III.3.

Le cœur du biofilm est la zone la plus dense en polymères (Figure I.2, rectangle cœur du biofilm). Dans cette zone, les exopolymères forment un réseau aux propriétés viscoélastiques (Houari A, et col, 2008). Les interactions entre les polymères et les cellules permettent de maintenir la cohésion de l'ensemble.

Enfin, la dernière zone du biofilm est une zone de détachement des microorganismes (Figure I.2, rectangle zone de détachement). Cette zone est plus riche en enzymes qui permettent aux cellules microbiennes de s'échapper de la structure et de coloniser de nouvelles surfaces. Les bactéries de la zone de détachement subissent des changements phénotypiques pour leur retour à l'état planctonique comme l'expression des flagelles (Sauer K, et col, 2004).

L'ensemble de cette matrice est parcouru par un grand nombre de canaux, permettant la diffusion d'eau d'ions, d'oxygène et de nutriments.

II) Espèces bactériennes « modèles » majeures pour l'étude des biofilms.

Un grand nombre d'espèces bactériennes sont étudiées pour leur capacité à former des biofilms (Yang L, et col, 2011). Nous nous attarderons sur quelques espèces en particulier parmi les familles les plus étudiées : *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* parmi les *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* chez les *Pseudomonadaceae* et enfin *Staphylococcus epidermidis* parmi les *Micrococaceae*.

II.1) *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*

L'une des bactéries les plus étudiées à travers le monde est l'espèce *Escherichia coli*. C'est historiquement l'espèce bactérienne à partir de laquelle les outils de biologie moléculaire ont été développés (Ian Hunt, 2005). De même, l'espèce voisine *Salmonella enterica* est principalement étudiée à cause de la place importante qu'elle occupe en pathologie infectieuse humaine et animale (Monack D M, et col, 2004). Ces deux espèces sont des bacilles à coloration de Gram négative, anaérobies facultatives. Elles sont mobiles grâce à la présence d'une ciliature péritriche. Elles sont principalement retrouvées dans le système digestif des animaux, mais sont aussi capables de se développer dans des aliments et de subsister dans l'environnement. La persistance de ces espèces dans l'environnement et dans la flore digestive est souvent associée à la formation de biofilm (Monack D M, et col, 2004).

II.1.1) *Escherichia coli*

E. coli constitue la majeure partie de la flore aérobie digestive ; on estime qu'elle représente environ 90% de cette flore (Tenailon O, et col 2010). Bien qu'étant un hôte normal du tractus intestinal, certaines souches particulières d'*E. coli* sont connues pour engendrer différents types de pathologies classées soit en infections digestives, soit en infections extra-intestinales (Schmidt M A, 2010). Parmi les infections digestives, on distingue les infections causées par les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), entéro-hémorragiques (EHEC), entéro-agrégatifs (EAGGEC) et entéro-invasifs (EIEC). D'autres souches d'*E. coli* sont impliquées dans des pathologies digestives non infectieuses comme la maladie de Crohn

(Darfeuille-Michaud et col 1998, Man et col, 2011). A part les EIEC, tous les autres pathovars intestinaux d'*E. coli* expriment des facteurs d'adhérence essentiels à leur pouvoir pathogène (Beloin C et col, 2010). Les infections extra-intestinales à *E. coli* les plus fréquentes sont les infections du tractus urinaires (ITU), principalement des cystites et des pyélonéphrites (Ejrnæs K, 2011). La formation de biofilm est connue comme un élément essentiel du développement de ces maladies (Ponnusamy P et col, 2011).

Au delà des différents pathovars décrits chez *E. coli*, chacun possédant un répertoire de facteurs de virulence particulier et donc ayant un comportement spécifique au cours du développement d'une infection, il existe un comportement type au sein de l'espèce pour l'adhérence et la formation de biofilm sur des surfaces abiotiques. La formation de biofilm chez *E. coli* a principalement été étudiée sur des souches de laboratoire non pathogènes (Pratt et Kolter R 1998, Prigent-Combaret et col, 1999, Ghigo et al. 2001, Di Martino et al. 2002, Reisner et al. 2003). Ainsi, le biofilm d'*E. coli* se développe en trois phases principales qui sont : l'adhérence, la formation de microcolonies et la maturation.

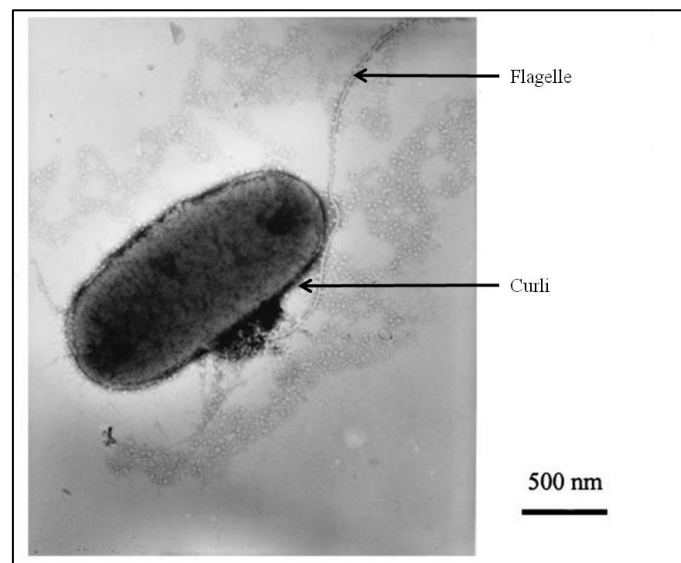


Figure I.3 : Micrographie électronique d'*E. coli* (Prigent-Combaret et col, 1999)

L'étape d'attachement des cellules à la surface est contrôlée par un grand nombre de facteurs d'adhérence. Cinq d'entre eux sont connus pour avoir un rôle majeur lors de l'adhérence à une surface abiotique : le facteur F de conjugaison (Ghigo J M, 2001), les pili de type 1 (Pratt LA et Kolter R, 1998), le flagelle (Pratt L A et Kolter R, 1998), l'antigène 43

(Kjaergaard K et col, 2000), et les curli (Pringent-Combaret C et col, 1999 ; 2001) (Figure I.3).

L'adhérence sur la surface est réalisée en plusieurs étapes : la première est généralement une attraction des cellules bactériennes à la surface grâce au chimiotactisme. En effet, la concentration en nutriments est souvent plus importante sur une surface que dans le milieu, ce qui déclenche une nage orientée des *E. coli* vers la surface par le biais du flagelle. L'attachement sur la surface est réalisée grâce aux flagelles et pili. Ces appendices protéiques entrent en interaction avec le support, cette étape est appelée l'adhérence irréversible. Ensuite, le pili de type F permet le recrutement de populations réceptrices au site d'adhérence augmentant la rapidité de colonisation. L'antigène 43 permet une autoagrégation bactérienne qui augmente également la colonisation. Les curli interviennent aussi dans l'adhérence de la bactérie aux surfaces. En effet, des études menées sur des souches n'exprimant pas ces facteurs d'adhérence ont montré que les bactéries n'exprimant pas la protéine CsgA (sous unité majeure de la structure) étaient incapables de former un biofilm sur des surfaces de téflon (Austin J W et col, 1998). De plus, il a été montré que la production de curli permettait l'obtention de biofilm beaucoup plus important qu'en son absence (Kikuchi T et col, 2005), prouvant ainsi son rôle dans la structuration des biofilms matures. Enfin, les pili de type I, d'autres protéines d'adhérence et les polysaccharides viennent consolider l'ensemble, et la maturation du biofilm commence (Figure I.4).

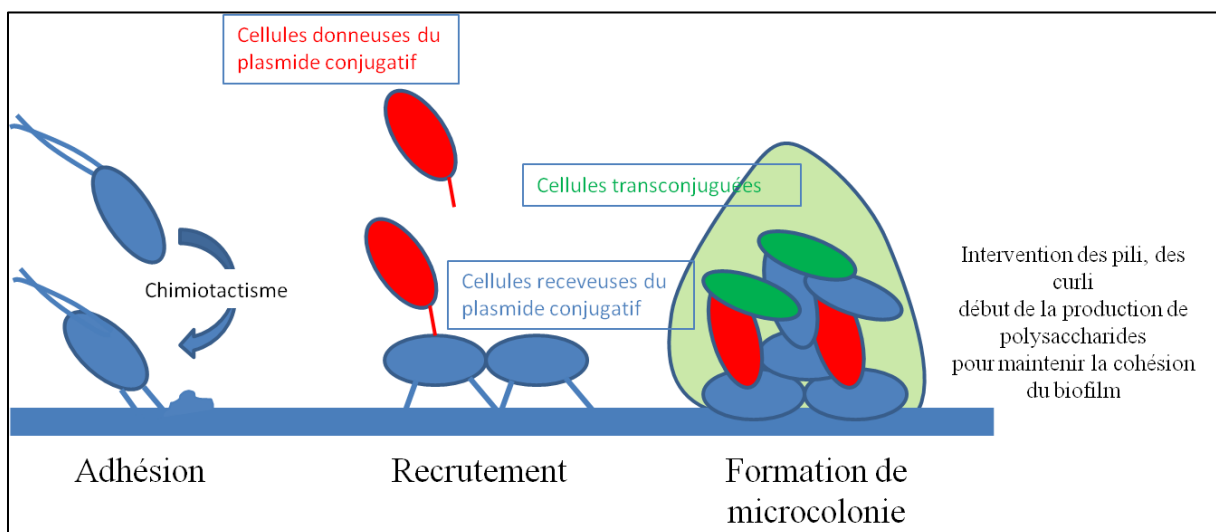


Figure I.4 : Schéma des étapes d'adhérence lors de formation du biofilm par *E. coli*.

De plus, la communication intercellulaire (quorum sensing) joue un rôle important dans la formation de biofilm par *E. coli* pour les souches n'hébergeant pas de plasmide conjugatif. En effet, l'autoinducteur 2 (AI-2), une molécule du quorum sensing intervient dans

la régulation de l'expression du flagelle et du chimiotactisme (Wood T K, 2007) ce qui stimule la mobilité (Gonzales Barrios et al. 2006, Reisner et al. 2003) et la colonisation d'une surface. De même, l'indole, produit de l'activité de l'enzyme tryptophanase, stimule l'adhérence d'*E. coli* aux cellules épithéliales et la formation de biofilm sur polystyrène (Di Martino et col, 2002). L'indole agit comme une molécule de signalisation qui intervient indépendamment du quorum sensing pour stimuler la formation de biofilm (Di Martino et al. 2003, Collet et al. 2007) et induire le phénotype « persister » (Vega et al. 2012).

La deuxième étape est la formation de microcolonies par la croissance des cellules adhérentes (Reisner A et col, 2003). Ces microcolonies sont composées d'une dizaine de cellules et sont assez irrégulières.

Enfin, la dernière étape est la maturation du biofilm. Cette phase dure environ 20 heures en milieu Luria-Bertani à 30°C avec un flux de 3 ml par heure jusqu'à l'établissement d'une structure d'environ 70 à 80µm de hauteur et qui résiste à des forces de flux (Weiss-Muszkat M, 2010). Lors de cette étape, les cellules bactériennes produisent la majeure partie de la matrice qui les englobe. Celle-ci est alors composée d'exopolymères parcourue par des canaux dans lesquels les bactéries peuvent se déplacer (Weiss-Muszkat M, 2010).

Tout comme les souches de laboratoire, les souches pathogènes d'*E. coli* sont capables de former un biofilm non seulement *in vivo* au cours d'une infection mais également *in vitro*. Ainsi, une souche sauvage d'*E. coli* EPEC produit un biofilm de type « champignon » en 48 h sur le verre en milieu LB (Weiss-Muszkat M, 2010) (Figure I.5).

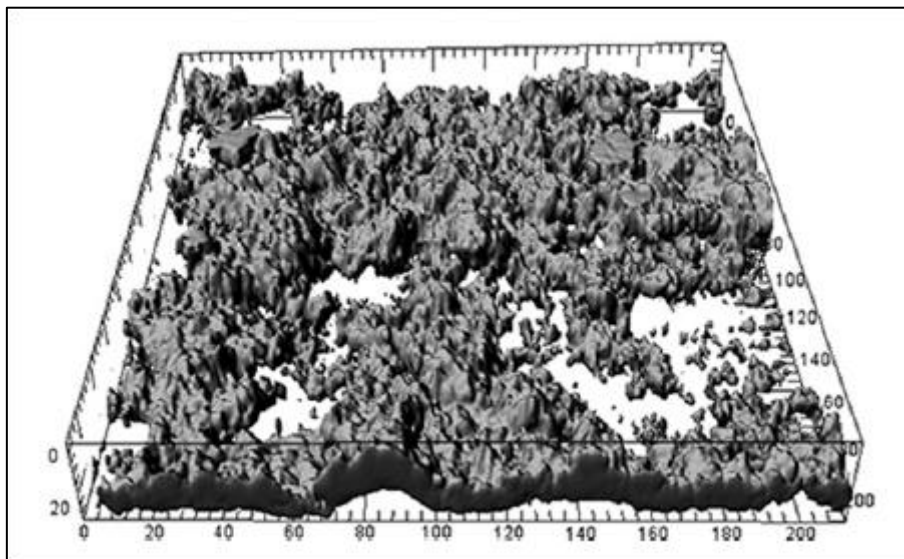


Figure I.5 : Image en microscopie confocale d'un biofilm d'*Escherichia coli* mature sur lame de verre en 48h et en milieu LB (Weiss-Muszkat M, 2010)

II.1.2) *Salmonella enterica*

Les Salmonelles sont des Entérobactéries très proches des *Escherichia*. En effet, les deux genres bactériens possèdent plus de 95% d'identité de séquence d'ADN (Fukushima M, et col, 2002).

Les Salmonelles ont une classification particulière. Des travaux (Le Minor et Popoff, 1987) ont permis de montrer que le genre *Salmonella* n'était composé que de trois espèces distinctes : *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, et *Salmonella subterranea*. La classification des salmonelles a donc été revue en 2005 et la commission du comité international de systématique des Procaryotes (ICSP) a adopté la nomenclature ne comprenant que trois espèces de salmonelles et des sous espèces. Par exemple, *Salmonella typhimurium* a été renommée *Salmonella enterica subsp typhimurium*.

Salmonella enterica est un pathogène intestinal infectant le monde animal. Il est capable de former des biofilms sur les surfaces biologiques et abiotiques qu'il rencontre (Anil K. Mangalappalli-Illathu et col, 2008). D'ailleurs, les infections à Salmonelles sont souvent associées à la formation de biofilm. Par exemple, dans le cadre de gastroentérite provoquée par *Salmonella enterica*, il y a formation de biofilm sur les cellules épithéliales intestinales (Esteves C L C, et col, 2005). Les salmonelles sont régulièrement impliquées dans des toxi-infections alimentaires (TIAC) qui sont à l'origine d'environ trois épidémies massives par an en France (données entre 2002 et 2008) et ont une incidence de 9 pour 100 000 habitants (Jourdan Da Silva N, 2010). Lors de ces TIACs, des biofilms à Salmonelle sont présents sur les surfaces de la chaîne de production des aliments contaminés à l'origine des infections.

Les souches de Salmonelles capables de former un biofilm ont un phénotype particulier sur les géloses LB contenant du rouge Congo. Ce phénotype est appelé rdar (red dry and rough) (Figure I.6).



Figure I.6 : Colonie rdar de *S. enterica* sur gélose LB au rouge Congo incubé à 28°C (D'après Monteiro C et col, 2011)

Il est dû à la présence de cellulose et de fimbriae à la surface des cellules (Romling U et col, 1998, 2000) (Figure I.7). Les fimbriae ou pili sont des appendices protéiques de type adhésine présents à la surface de la cellule bactérienne. Plusieurs types de pili sont présents à la surface de *Salmonella*. En particulier, les pili de type I ont été les premiers décrits et permettent l'adhérence aux erythrocytes et aux levures (Korhonen T K, et col, 1980). Ces structures mesurent jusqu'à 1 μm de long pour un diamètre de 6 nm. La protéine piline a un poids moléculaire de 21 000 Da. Le deuxième type de fimbriae est le tafi (thin aggregative fimbriae), de même nature que le curli d'*E. coli*. Leur structure et leur rôle dans l'établissement du biofilm sont détaillés dans la partie III.2.2.

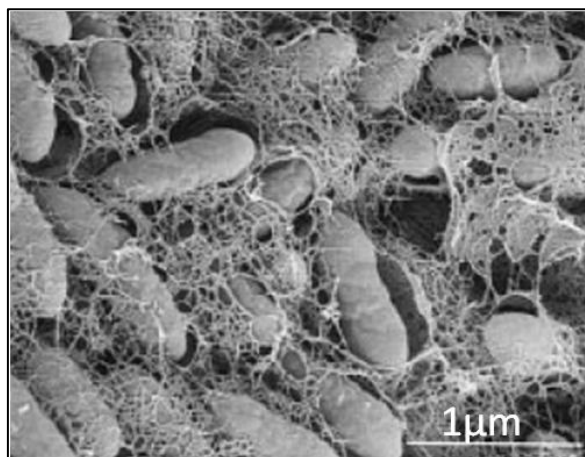


Figure I.7: Micrographie électronique de *S. typhimurium* organisée en biofilm à la surface d'une gélose LB (Romling U et col, 2000)

La formation de biofilm par *Salmonella* s'effectue en plusieurs étapes similaires à celles des biofilms d'*E. coli*, une surface pouvant être complètement colonisée *in vitro* en 24 h

(Jonas K, et col, 2007). Lors de l'étude de Grantcharova (Grantcharova N, et col, 2010), réalisée sur des lames de mica, en milieu Luria-Bertani sans sel et à 28°C, on ne peut observer que des cellules bactériennes adhérentes de manière non structurée à la surface après 4 h d'incubation. La formation d'agrégats bactériens en trois dimensions se produit en 16 h. Enfin, en 24 h, une structure en 3 dimensions confluyente entre toutes les colonies est créée. Le biofilm est alors bien établi (Figure I.8).

Différents acteurs jouent des rôles importants dans les étapes de formation du biofilm. Les pili et le flagelle jouent un rôle particulier dans les premières étapes d'adhérence. La cellulose est un polysaccharide majeur pour la structuration du biofilm. Enfin, les molécules du quorum sensing tels que les homoserine lactones jouent un grand rôle lors des dernières étapes de maturation et de dissémination du biofilm (Jimenez-Gomez P, et col 2007).

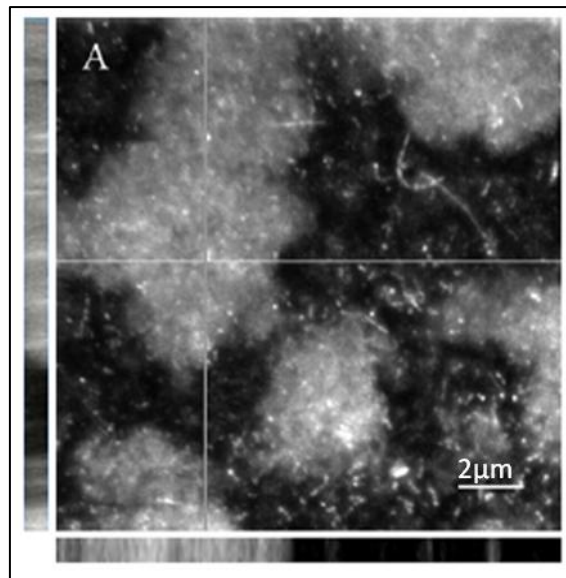


Figure I.8 :Image en microscopie confocale d'un biofilm de *Salmonella enterica* mature (Grantcharova N, 2010)

II.2) *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa, *P. fluorescens* et *P. putida* constituent le groupe des *Pseudomonas* fluorescents au sein de la famille des *Pseudomonadaceae*. Ce sont des bacilles Gram-, aérobies stricts, de taille de l'ordre du micromètre de long, mobiles par ciliature polaire. Selon les espèces, les *Pseudomonas* sont capables de se développer dans une gamme

de température allant de 4°C à 44°C (J.L Avril, Bactériologie Clinique, 2000). Ce sont des bactéries ubiquitaires que l'on rencontre dans les sols, sur les végétaux et dans les eaux douces et marines. Parmi les *Pseudomonas* fluorescents, quelques rares souches de *P. fluorescens* peuvent être isolées d'infections humaines et seule l'espèce *P. aeruginosa* est réellement pathogène pour l'homme. C'est l'une des bactéries majeures infectant les patients atteints de mucoviscidose. Les souches isolées dans des cas de mucoviscidose sont dites mucoïdes. Les souches mucoïdes sont des souches de *Pseudomonas* ayant subi des mutations qui induisent une surproduction de polysaccharides comme l'alginate mais aussi des polymères de sucres riches en mannose et en galactose nommés *psl* et *pel* (Ryder C et col, 2007). Les *Pseudomonas* sont aussi responsables chez l'homme d'infections locales dans les plaies, l'œil, ou encore l'oreille, mais aussi d'infections urinaires, de septicémies, et de méningites (J.L Avril, Bactériologie Clinique, 2000). De nombreuses infections à *Pseudomonas* se développent chez les personnes immunodéprimées, *P. aeruginosa* étant le troisième agent étiologique impliqué dans les infections nosocomiales après *E. coli* et *S. aureus* (Amazian Ket col, 2010).

P. aeruginosa et *P. fluorescens* peuvent coloniser un grand nombre de surfaces telles que : le verre, des polymères composés d'acétobutyrate de cellulose et de poly-diméthylsiloxane (Lembré P, et col, Biomicroworld 2009), du polystyrène recouvert de fibronectine humaine, les cellules humaines respiratoires, des racines de plante, les cellules nerveuses, etc (Rebière-Huët et col, 1999, Di Martino 2001, Gagnière et Di Martino 2004, Cossard et col. 2005, Pimenta et col, 2006, Picot L et col, 2001), et ce grâce à des appendices de type pili et flagelle (Figure I.9)

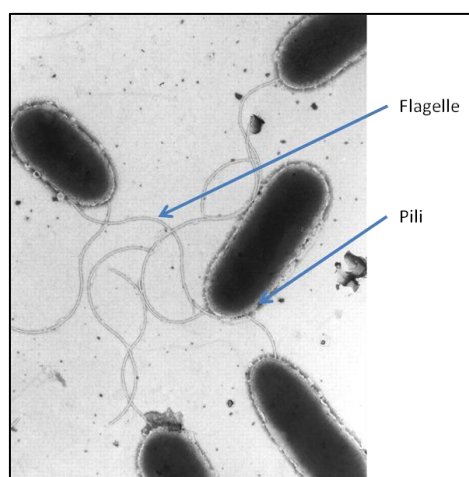


Figure I.9 : Micrographie électronique de *P. aeruginosa* (Garrett E S, 1999).

Les biofilms de *P. aeruginosa* s'établissent en plusieurs étapes.

La première, l'adhérence au support nécessite deux appendices protéiques majeurs : le flagelle, et le pili de type IV (Toutain C M, 2007 ; Vallet I, 2001, Figure II.2.1). Le flagelle permet à la bactérie de se déplacer dans le milieu liquide ainsi que de reconnaître des aspérités du support d'une centaine de nanomètres. Sur les surfaces biologiques, les pili de type IV permettent l'adhérence bactérienne aux récepteurs cellulaires (Van Schaik E J, et col 2005).

Ces pili permettent aussi aux bactéries de se déplacer par un mouvement appelé « twitching » et de former, dans une seconde étape, des microcolonies par regroupement des cellules (Figure I.10). Ce type de mobilité correspond à un mode de déplacement particulier : les pili de type IV s'ancrent à la surface, puis ils se rétractent, provoquant ainsi le déplacement de la bactérie.

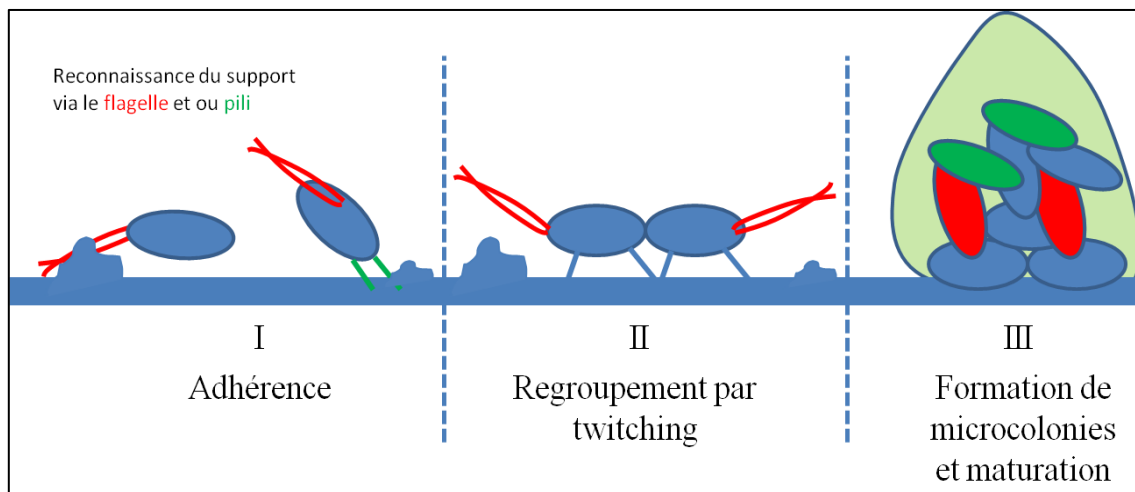


Figure I.10 : Schéma des étapes d'adhérence de *P. aeruginosa*.

Après la formation de microcolonies, la matrice d'exopolymères commence à être sécrétée. Les principaux polymères dont l'ADN extracellulaire, l'alginate, les protéines associées aux biofilms (Bap et FapC) sont produits. L'ADN extracellulaire (ADNe) pourrait jouer un rôle primordial dans les premières étapes de l'établissement de la matrice (Whitchurch C B et col, 2002 ; Matsukawa M et col, 2004) en permettant la migration et l'adhérence des cellules bactériennes. En effet, les résultats de l'étude d'Allesen-Holm et collaborateurs, semblent suggérer que l'ADNe sert de point d'accroche au pili de type IV de *P. aeruginosa*. L'interaction entre le pili de type IV et l'ADNe permettrait alors la reptation par twitching de la bactérie (Allesen-Holm et col, 2006).

La structure ainsi établie grossit et forme un amas dense après 24 h de culture *in vitro* (Allesen-Holm et col, 2006). Elle prend la forme caractéristique de « champignon » une fois le biofilm arrivé à maturité (Figure I.11). Après 48 h de culture, en condition de carence nutritionnelle, des cellules bactériennes du centre du biofilm changent de phénotype et recommencent à exprimer les protéines de production du flagelle et à produire plusieurs exoenzymes dont l'alginate lyase. L'action combinée des déplacements bactériens et des enzymes permet une hydrolyse des polymères de la matrice et une partie du biofilm peut alors se détacher permettant ainsi la colonisation d'autres surfaces.

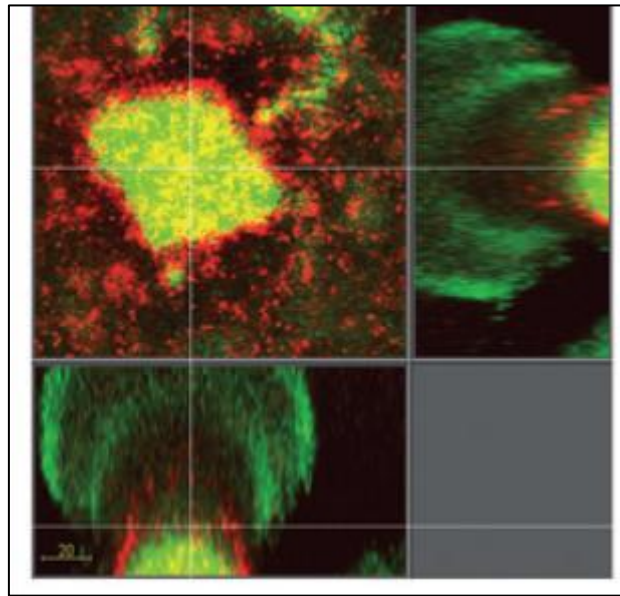


Figure I.11 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de *P. aeruginosa* mature sur une surface de plexiglas en milieu minimum avec glucose. Les cellules de *P. aeruginosa* expriment la green fluorescence protein (en vert) et les cellules mortes sont marquées avec le propidium iodide (en rouge).
(Allesen-Holm M, 2006)

II.3) *Staphylococcus epidermidis*

Les Staphylocoques font partie de la famille des *Micrococcaceae*. Ce sont des coques Gram+ regroupés en amas, non sporulés, catalase positif, anaérobies facultatifs, immobiles et de petite taille (Figure I.12). Ils sont commensaux de la peau de l'homme et, à part l'espèce pathogène *S. aureus*, les Staphylocoques à coagulase négative sont des pathogènes opportunistes. Les Staphylocoques et *S. aureus* en particulier sont des contaminants de produits alimentaires (laitages, conserves salées). Ils sont capables de coloniser aussi bien les surfaces biologiques comme la peau (Mark E. Shirtliff et col, 2002), que des surfaces

synthétiques comme le polystyrène et des matériels implantés comme des valves cardiaques et des sondes médicales (O’Gara, J.P, 2007, Benard L, et col, 2008, Houari A, et col, 2007).

S. epidermidis est une espèce commensale cutanée habituellement non pathogène mais c’est un agent important d’infections chez les patients immunodéprimés ou chez des personnes qui ont des implants (cathéters, stimulateurs cardiaques, prothèses) (Veenstra G J C, et col, 1996). *S. epidermidis* est responsable d’infections cutanées, nasales, et urinaires. Il a la capacité d’adhérer et de former des biofilms sur les surfaces qu’il rencontre et notamment à la surface d’implants et de prothèses médicales (Veenstra G J C, et col, 1996). La formation de biofilm est l’élément central du pouvoir pathogène de *S. epidermidis*, en particulier pour les infections sur matériel implanté.

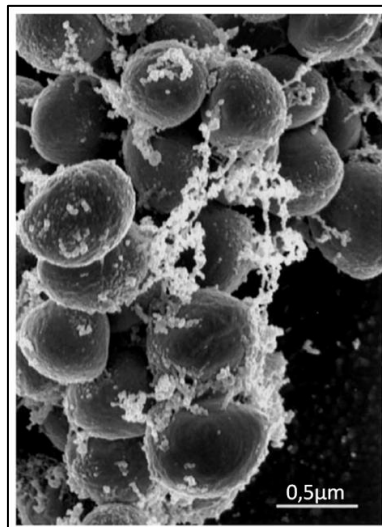


Figure I.12 : Micrographie électronique de *S. epidermidis* cultivé en milieu trypticase soja et fixé au glutaraldéhyde (Vuong C, 2003)

L’adhérence de *S. epidermidis* à une surface est favorisée par plusieurs facteurs. Par exemple, les protéines SSP1 (280 kDa) et SSP2 (250 kDa) sont des protéines formant des structures filamenteuses mimant le rôle des pili d’*E. coli* (Veenstra G J C, et col, 1996, Von Eiff C, et col, 2002). Ces protéines sont présentes en cluster à la surface de la cellule et leur clivage diminue drastiquement la colonisation du polystyrène (Veenstra G J C, et col, 1996, Von Eiff C, et col, 2002). D’autre part, différentes protéines de surface jouent un rôle dans l’adhérence de *S. epidermidis* à la matrice extracellulaire humaine, notamment pour l’adhérence à des implants après la formation d’un film de conditionnement (von Eiff et al 2002). Il s’agit de la protéine Fbe (fibrinogen binding protein)(Nilsson et al. 1998), et des protéines SdrG, SdrF et SdrH (McCrea et al 2000). Fbe, SdrG, SdrF et SdrH appartiennent à la famille des protéines de surface ancrées à la paroi contenant une répétition sérine-aspartate

(famille Sdr) (von Eiff et al 2002). Les protéines de la famille Sdr interagissent avec des protéines de la matrice extracellulaire des mammifères. L'autolysine AtlE participe également à l'adhérence de *S. epidermidis* (Heilmann C et al, 1997 ; Vuong et al 2003). Enfin, l'acide téichoïque de la paroi cellulaire interagit avec la fibronectine ce qui participe également à l'adhérence de *S. epidermidis* (Hussain et al 2001). Après l'adhérence sur la surface, la formation de microcolonies peut commencer, suivie de la production de la matrice (Figure I.13).

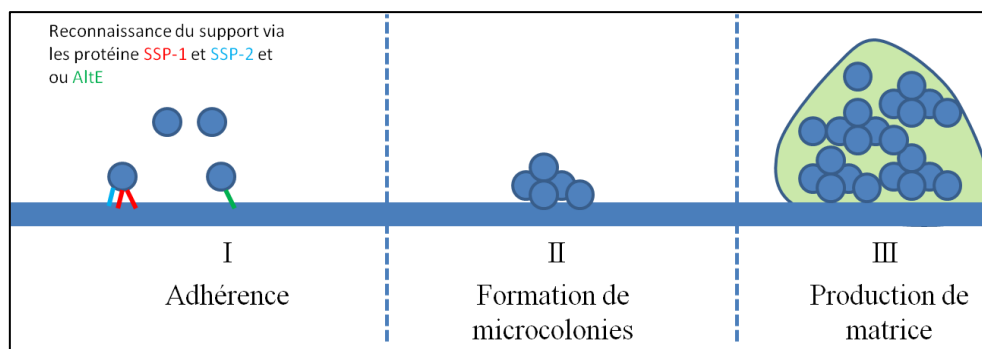


Figure I.13 : Premières étapes de formation du biofilm par *Staphylococcus epidermidis*.

Une fois l'adhérence à la surface réalisée, le biofilm de *S. epidermidis* se développe en faisant intervenir un grand nombre de polymères différents comme l'acide teichoïque, le poly-N-acétylglucosamine, les protéines Aap et Bap. Le biofilm mature s'installe assez rapidement en 24 à 48 heures (Figure I.14). La structure et le rôle des protéines Aap et Bap dans la formation de biofilm par *S. epidermidis* sont décrits dans la partie III.2.2.

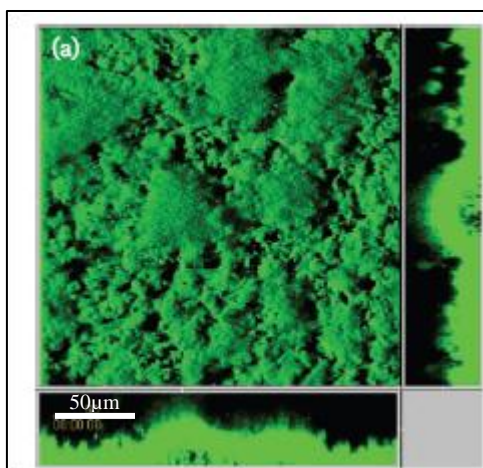


Figure I.14 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de 2 jours de S. epidermidis sur une surface de plexiglas sous un flux de $0,2 \text{ mm.s}^{-1}$ de milieu Trypticase soja agrémenté de 0,25% de glucose à 37°C (Qin Z, 2007)

Dans cette première partie, nous avons détaillé la formation de biofilm par différentes espèces bactériennes. Nous allons maintenant nous focaliser sur les différents constituants de la matrice des biofilms, et qui pourraient jouer un rôle important.

III) Composition de la matrice du biofilm

La matrice du biofilm est un système complexe. Celle-ci est composée à 90% d'eau et possède de nombreux canaux pouvant transporter les différents éléments nutritifs et l'oxygène nécessaires aux bactéries du biofilm. Quatre grandes classes de biopolymères sont présentes dans la matrice : les polysaccharides, les protéines (de structure et des enzymes), de l'ADN, et des lipides. Tous ces composés semblent essentiels à la formation du biofilm, car tous présents dans la matrice du biofilm.

III.1) Les polysaccharides

Les polysaccharides représentent de 2 à 5% de la matrice du biofilm en poids humide (Ian W. Sutherland, 2001). Chaque genre, voire espèce bactérienne possède un polysaccharide qui lui est propre. Ici, nous nous proposons d'étudier les polymères osidiques les plus répandus au sein des biofilms bactériens en nous focalisant sur les principaux polysaccharides

produits par les espèces modèles majeures pour l'étude des biofilms : *P. aeruginosa*, *E. coli*/*S. enterica* et *S. epidermidis*.

III.1.1) L'alginat

L'un des composants majoritaires de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* (Linker et col, 1964) est l'alginat. L'alginat est également produit par d'autres espèces bactériennes comme *A. vinelandii* (Gorin et col, 1966). L'alginat est un exopolysaccharide de haut poids moléculaire (10^4 à 10^6 kDa). Il est composé d'un enchaînement d'acide β -D-mannuronique (M) et de son épimère en C5 : l'acide α -L-gulononique (G) (Gacesa P, 1998) (Figure I.15).

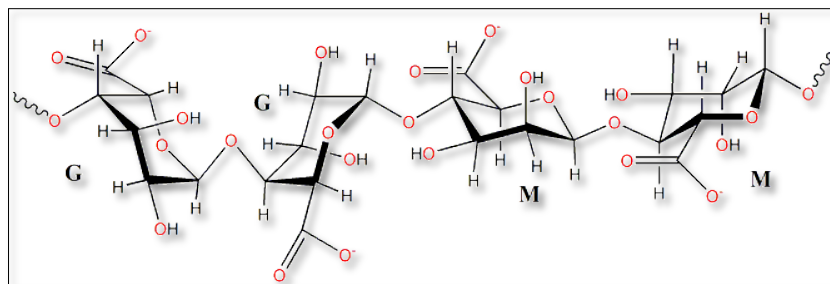


Figure I.15: Structure de l'alginat.

En règle générale, l'alginat est constitué de blocs de monomères. Il forme alors des régions constituées de mannuronate (M-bloc) et des régions constituées de guluronate (G-Bloc). Il existe aussi de rares régions où les deux monomères sont mélangés (MG-bloc). L'absence de long G-bloc est une caractéristique de l'alginat produit par *P. aeruginosa*. En effet, l'acide mannuronique est épimérisé en acide guluronique en dehors de la cellule bactérienne par l'enzyme : AlgG. Cela rend quasiment impossible la présence de grands blocs d'acide guluronique (Sabra et col, 2001).

Les gènes responsables de la biosynthèse de l'alginat chez *P. aeruginosa* sont portés par le chromosome bactérien. Il y a 24 gènes impliqués dans la production et la sécrétion de celui-ci (Gacesa P, 1998). Huit sont impliqués dans sa sécrétion (Figure I.17) et 12 dans sa biosynthèse (Remminghorst U. et col, 2006) (Figure I.16). Les 4 gènes restant sont eux impliqués dans la régulation de la synthèse. L'organisation des protéines d'exportation et de synthèse de l'alginat est complexe.

La première étape de formation de l'alginate est la synthèse de l'acide mannuronique. La formation de celui-ci comporte cinq réactions successives : le glucose-6-phosphate est transformé en fructose-6-phosphate (F6P), le F6P est ensuite modifié en mannose-6-phosphate (M6P), le M6P est alors épimérisé en mannose-1-phosphate (M1P), et transformé en guanidine-di-phosphate-mannose (GDP-mannose), enfin le GDP-mannose est doublement oxydé par la protéine AlgD, celui-ci devient alors du GDP-mannuronate qui est exporté vers la protéine Alg8.

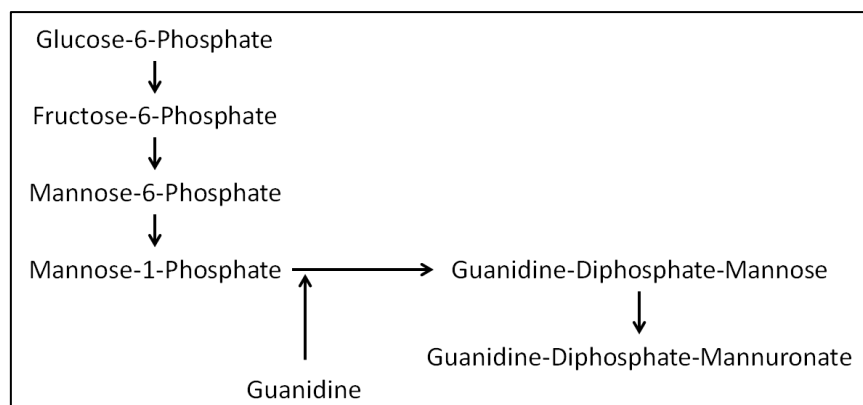


Figure I.16: Schéma de la biosynthèse de l'alginate chez *P. aeruginosa*.

La protéine Alg8 permet l'export de l'acide mannuronique dans le périplasme. Il est ensuite pris en charge par un complexe de protéines chaperonnes composées de : AlgL, AlgG, AlgK, Alg44, AlgX et MucD permettant sa polymérisation. La porine AlgE permet son excrétion dans le milieu extérieur. Enfin, un complexe d'enzymes permet l'épimérisation de l'acide mannuronique en acide guluronique. Chez *A. vinelandii*, cette étape peut être réalisée par sept enzymes différentes nommées AlgE1-7 (Ertesvag H et col, 1999).

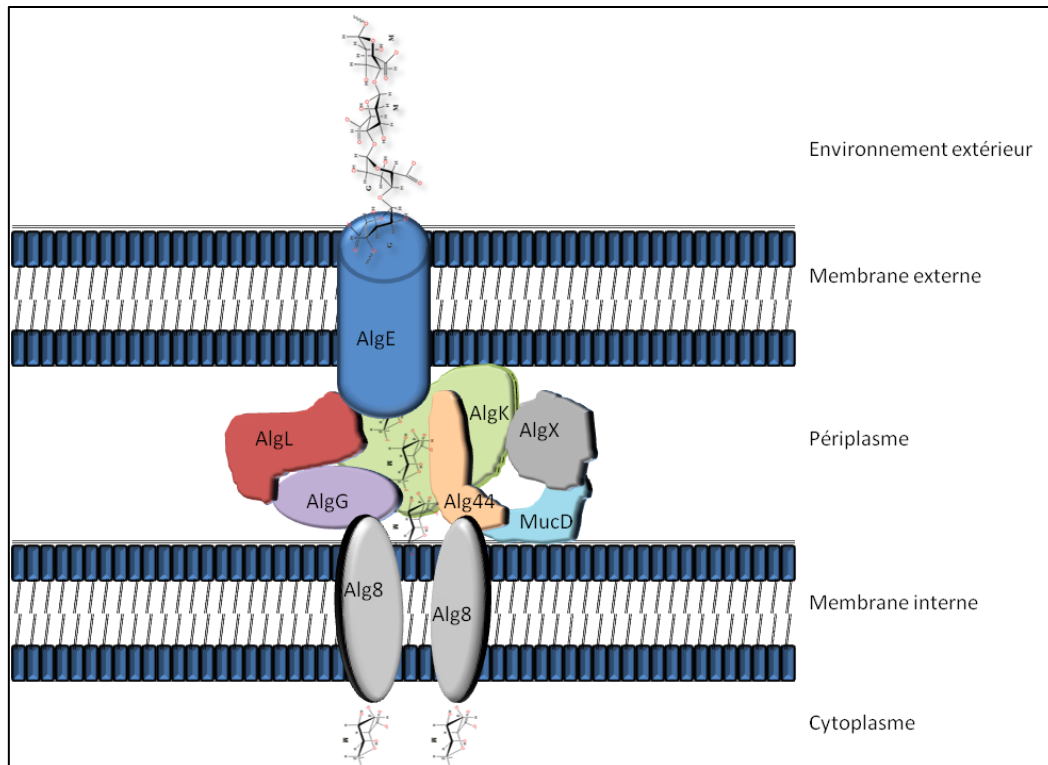


Figure I.17: Schéma de l'exportation de l'alginate chez *P. aeruginosa*.

L'alginate peut former un gel *in vitro* en présence de cation divalent comme le calcium. La structure ainsi formée est appelée « boîte à œuf de Grant » (Stokke et col, 2000) (Figure I.18). Le gel d'alginate est formé par la présence de liaisons ioniques entre les résidus d'acide guluronique et les ions divalents. Les propriétés mécaniques du gel obtenu sont alors dépendantes de la quantité de résidus G présents dans le polymère.

Cette gélification peut avoir lieu en présence de calcium et d'un autre polymère de nature protéique comme la gélatine (Doumèche B. et col, 2007). Lors de ces travaux, le gel d'alginate se forme suivant un relargage progressif de calcium dans le milieu et la formation du gel peut être suivie par rhéologie en fonction du temps.

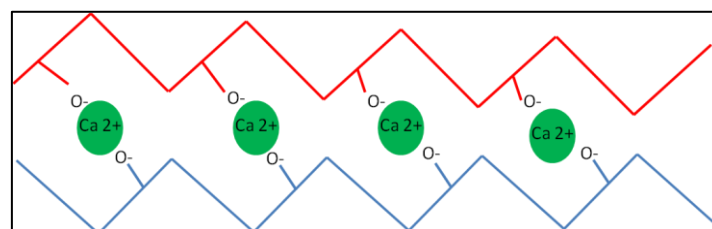


Figure I.18 : Modèle de la boîte à œuf de Grant

III.1.2) La cellulose

La cellulose est l'un des composants les plus répandus à la surface de la planète. Elle est retrouvée dans tout le monde vivant : les plantes, mais aussi chez de nombreuses espèces bactériennes comme *Salmonella*, *Escherichia*, *Acetobacter*, *Agrobacter* et *Rhizobium* (Zogaj X et col, 2001).

Salmonella et *E. coli* produisent de la cellulose lors de la formation de leur biofilm. Celle-ci constitue alors un composé primordial de la structuration en biofilm (Solano C. et col, 2002). La cellulose est un polymère de glucose linéaire relié par des liaisons β -1-4 (Figure I.19). Elle peut se structurer en fibres grâce à des liaisons hydrogènes entre les différentes chaînes de glucose.

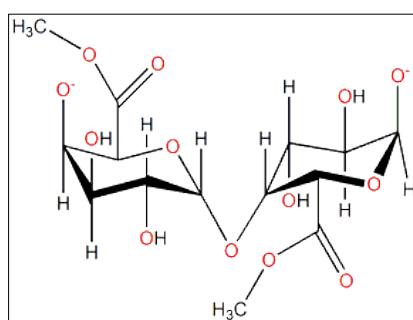


Figure I.19: Structure de la cellulose

Les gènes impliqués dans la production de la cellulose chez *E. coli* et *S. typhimurium* sont organisés en un opéron et sont appelés *bcs* (bacterial cellulose synthesis) (Romling U, 2005). Cet opéron est composé de quatre gènes : *bcsA*, *bcsB*, *bcsC*, et *bcsZ*. L'expression de ces gènes est régulée par la protéine AgfD. Celle-ci est une protéine de régulation majeure dans la formation de biofilm. Elle régule aussi bien la production de cellulose que celle des curli, un facteur d'adhérence primordial à la formation de biofilm (X Zogaj et col, 2001). La protéine BcsA est la cellulose synthase, elle est enchâssée dans la membrane interne de la bactérie. BcsB jouerait le même rôle (Ross P et col, 1991). Le complexe des protéines BcsG, C, E, F serait impliqué dans l'export de la cellulose mais la fonction exacte des protéines n'est pas encore connue. Enfin, la protéine BcsZ est une cellulase permettant d'hydrolyser les assemblages de cellulose, augmentant son excrétion (Figure I.20).

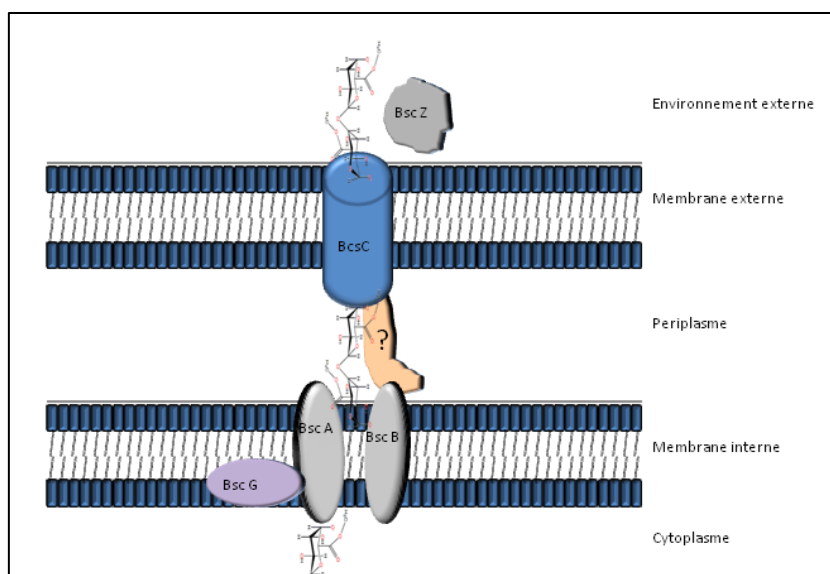


Figure I.20 : Schéma de labiosynthèse de la cellulose chez *E. coli*.

La cellulose peut former un gel en fonction des conditions environnementales. Elle est sous forme liquide à 20°C et sa gélification est obtenue à température élevée (au delà de 50°C) ou faible (en deçà de 10°C)(Weng L et col, 2004 ; Cai J et col 2006).Après gélification, la cellulose reste à l'état de gel à température ambiante. La capacité de la cellulose à former un gel peut expliquer une partie des propriétés mécaniques des biofilms des espèces produisant ce polymère.

III.1.3) Le poly-N-acétylglucosamine

Le poly-N-acétylglucosamine ou PNAG, également appelé PIA est un polymère de glucose nécessaire à l'adhérence et à la formation de biofilm de certaines espèces bactériennes. Ce polymère a été décrit chez le genre *Staphylococcus* (Mack D et col 1996)et chez certains *E. coli* (Cerca N et col, 2007). Le PNAG est un homoglycane linéaire composé de β -1,6-N- acétylglucosamine avec environ 20% des liaisons OH déacétylés. De plus, il possède des liaisons amine chargées positivement (Figure I.21).

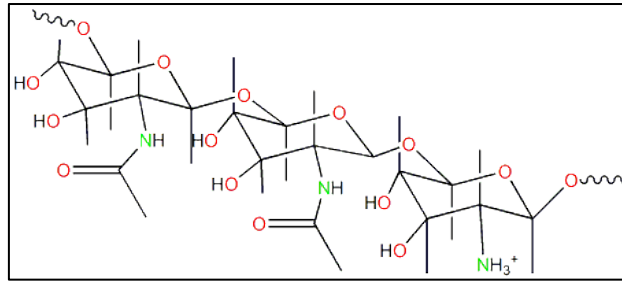


Figure I.21: Structure du PNAG.

Les gènes impliqués dans la biosynthèse du PNAG sont organisés en opéron et sont nommés *ica* (InterCellular Adhesion). Cet opéron est composé de quatre gènes de synthèse, *icaADBC*, et d'un gène de régulation *icaR* (Heilmann C et col, 1996 ; Gerke C et col, 1998). La protéine IcaA est une N-acétyl-glucosaminetransférase qui requiert la protéine IcaD pour une bonne activité. Le complexe IcaA/IcaD peut alors produire un polymère d'une longueur d'environ 20 résidus. La protéine IcaC permet alors l'assemblage de ces chaînes, ce qui conduit à la production de PNAG (Figure I.22).

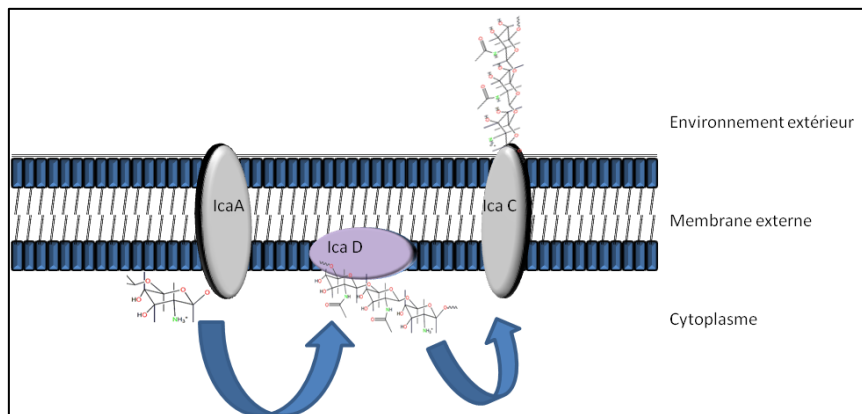


Figure I.22 : Schéma de la biosynthèse du PNAG chez *S. epidermidis*.

Le PNAG sert à former une matrice de protection autour des cellules et permet la cohésion des cellules bactériennes les unes aux autres (Mack D et col 1996 ; Cerca N et col, 2007). Une étude a aussi montré la capacité du PNAG de se lier à l'ADN extracellulaire par ses charges positives, renforçant la structure du biofilm (Izano E A et col, 2008).

III.1.4) Autres sucres de la matrice

Certaines souches d'une même espèce peuvent sécréter différents sucres pour former la matrice du biofilm.

Par exemple, les souches mucoïdes de *P. aeruginosa* forment un biofilm avec de l'alginate comme composant majoritaire, mais si les gènes de biosynthèse de l'alginate sont défectueux, la souche reste malgré tout mucoïde (Ryder C et col, 2007). Dans ce cas, deux autres polymères de sucre permettent de conférer le phénotype mucoïde. Le premier est synthétisé grâce au cluster *pel*. Celui-ci code pour un polymère de sucre riche en glucose. Ce polymère sert principalement à la formation de pellicule à l'interface liquide/air (Friedman L et Kolter R, 2004a), mais aussi à la formation de biofilm sur les surfaces. Le deuxième est synthétisé grâce au cluster *psl*. Celui-ci permet la production d'un polymère riche en mannoses et en galactoses (Friedman L et Kolter R, 2004b).

D'autre part, la matrice du biofilm de *S. enteritidis* en absence de force de flux est principalement composée de dérivés du glucose pour sa partie osidique. Par contre, en présence de force de flux, la quantité de L-fucose présent dans la matrice augmente (Mangalappalli-Ilathu A K, et col, 2007). La proportion de L-fucose passe alors de 11% des motifs sucrés à environ 30%.

Dans le cas de *S. epidermidis*, des polymères osidiques différents du PNAG sont présents dans la matrice du biofilm comme par exemple l'acide teichoïque (Sadovskaya I et col, 2004). Il existe deux types d'acide teichoïque : l'acide teichoïque associé à la membrane bactérienne (CW TA) et l'acide teichoïque extracellulaire (EC TA). L'EC TA est un $\beta(1,3)$ -poly (glycérolphosphate), avec la position 2 substituée par des groupements α -glucose, α -N-acétylglucose, D-alanine ou par du α -glucose-6-alanine (Figure III.1.4.1).

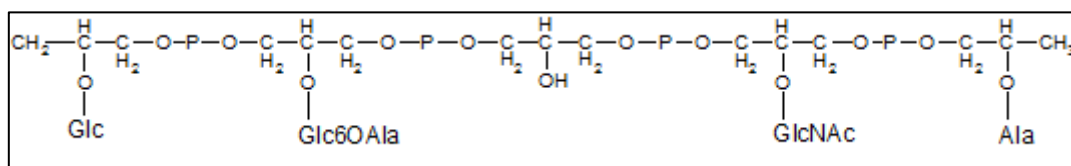


Figure I.23 : Structure de l'acide teichoïque.

Chez *E. coli*, un autre polymère de sucre est régulièrement trouvé dans la matrice du biofilm. Il s'agit de l'acide colanique (Danese P N et col, 2000) qui est composé de galactose (Gal), de pyruvate (Pyr), de fructose (Fuc) et de glucose (Glc) (Figure III.1.4.2).

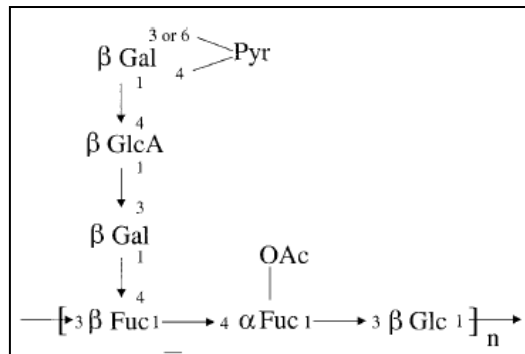


Figure I.24 : Structure de l'acide colanique.

III.2) Les protéines de structure

Les protéines représentent de 1 à 2% de la matrice du biofilm en poids humide (90% d'eau) (Ian W. Sutherland, 2001). Chaque genre, voire chaque espèce bactérienne possède quelques protéines de matrice qui lui sont propre. Ici, nous proposons d'étudier quelques-unes des protéines de structure les plus abondantes dans la matrice du biofilm en nous focalisant sur les grandes familles de protéines impliquées dans la formation de biofilms : les fibres amyloïdes, les protéines de la famille Bap (biofilm associated protein), les adhésines et pili, et enfin d'autres protéines associées à la membrane cellulaire ayant un rôle dans la structuration en biofilm.

III.2.1) Les fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes sont naturellement présentes dans de nombreux biofilms naturels et artificiels, poly et mono-microbiens (Blanco et al. 2012, Larsen P et col, 2007). Elles sont présentes chez différentes familles et divers genres bactériens comme les *Enterobacteriaceae* (Cherny I et col, 2005 ; Wang X, et col, 2008a), les *Micrococaceae* (Claessen D, et col, 2003), les *Streptomyces*, les *Actinobacter* (Fowler D M, 2007), et ont été décrites plus récemment chez les *Pseudomonales* (Dueholm M S, et col, 2010).

Les fibres amyloïdes sont une structure quaternaire de protéines fibreuses (Fowler D M, et col, 2007). Elles sont formées par auto-assemblage des protéines et stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les feuilletts β les constituants. Les structures ainsi formées mesurent de 10 nm à quelques micromètres de longueur pour un diamètre d'une dizaine de nanomètres

(Larsen P et col, 2007) (Figure I.25). Ces structures sont connues pour être souvent associées chez les mammifères à des maladies neurologiques dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, et les encéphalopathies spongiformes transmissibles (Dobson C M, 2003). Ces structures peuvent aussi avoir une importance dans des processus physiologiques comme : les biofilms et les corps d'inclusion cellulaire. On parle aujourd'hui de fibres amyloïdes fonctionnelles.

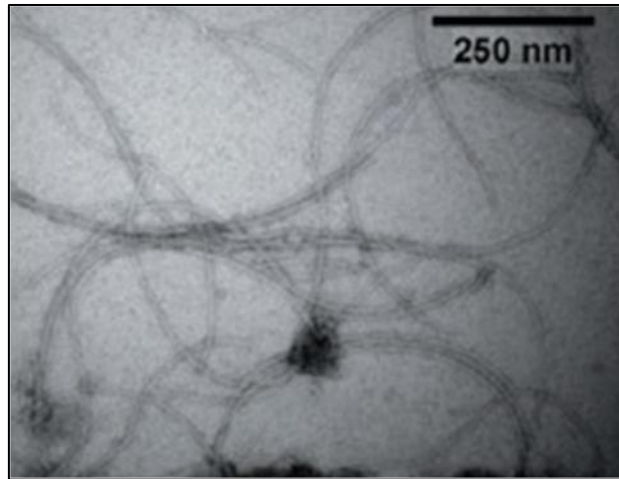


Figure I.25 : Image en microscopie électronique d'une fibre amyloïde issue de la protéine *FapC* de *P. aeruginosa* (d'après, Dueholm M S, et col 2010)

La plupart des fibres amyloïdes sont insolubles dans l'eau et résistent à un grand nombre de traitements de dénaturation (Chapman M R, et col, 2002). Elles semblent intervenir dans les premières étapes de formation du biofilm lors de l'adhérence cellulaire à la surface comme le suggère leurs rôles chez *E. coli* (Barnhart M M, et Chapman M R, 2006). Les fibres amyloïdes exprimées par *E. coli* forment des pili enchevêtrés dénommés curli (Figure I.25). La protéine majeure ou curline, est la protéine CsgA chez *E. coli*, de poids moléculaire de 15 kDa (Cherny I, et col 2005 ; Wang et col, 2007 ; 2008ab) et AfgA chez *S. enterica* de 15 kDa aussi (Withe A P, 2001). Les curli promeuvent la formation de biofilm car ils sont en partie responsables des interactions cellules-surfaces, mais aussi cellules-cellules (Vidal O et col, 1998, Uhlich G A, et col 2006). Les curli permettent ainsi la fixation des bactéries à différentes protéines humaines comme la fibronectine, la laminine ou encore le plasminogène (Barnhart M M, et Chapman M R, 2006). Des fibres amyloïdes étant aussi présentes dans les biofilms matures, on peut aussi suspecter qu'elles jouent un rôle bien au-delà des étapes initiales de la formation du biofilm (White A P, et col, 2006 ; Larsen P, et col, 2008 ; Blanco L P et col, 2012).

L'assemblage des curli se produit spontanément à la surface bactérienne. Une complémentation (assemblage du curli sur la cellule n'exprimant pas CsgA) est possible entre une souche n'exprimant pas la protéine majeure CsgA, mais les protéines mineures constituant le reste de la machinerie, et une souche n'exprimant que CsgA (Wang X, et col, 2008a). Plusieurs protéines sont impliquées dans la production et la mise en place du curli. La protéine CsgB permet l'assemblage et l'ancrage du curli à la surface de la cellule (Chapman M R, et col, 2002). L'expression des protéines CsgA et CsgB est sous le contrôle d'une protéine de régulation CsgD. Celle-ci semble avoir un rôle clé dans un grand nombre de processus conduisant à l'apparition du phénotype biofilm, tel que la production de cellulose et de la protéine Bap (Latasa C, et col, 2006). L'expression de ces curli donne un morphotype particulier aux colonies sur gélose YESCA : le phénotype rdar (red, dry, and rough) (White A P, et col, 2006) qui rend les souches rouges et rugueuses et facilement identifiables (Figure I.26).

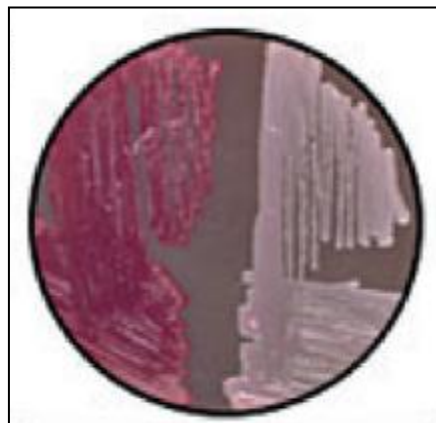


Figure I.26 : Photographie d'une gélose Yesca incubée 24h à 28°C en présence de deux souches d'Escherichia coli. À gauche : souche produisant des curli, à droite : souche ne produisant pas de curli. (D'après Epstein E A, 2008).

La protéine CsgA est composée d'une séquence signal (acides aminés 1-20), d'une partie non organisée nommée N22 (acides aminés 21-42), et de plusieurs séquences répétées nommées R1 (acides aminés 43-65), R2 (acides aminés 66-87), R3 (acides aminés 88-110), R4 (acides aminés 111-132), R5 (acides aminés 133-151) (Figure I.27).

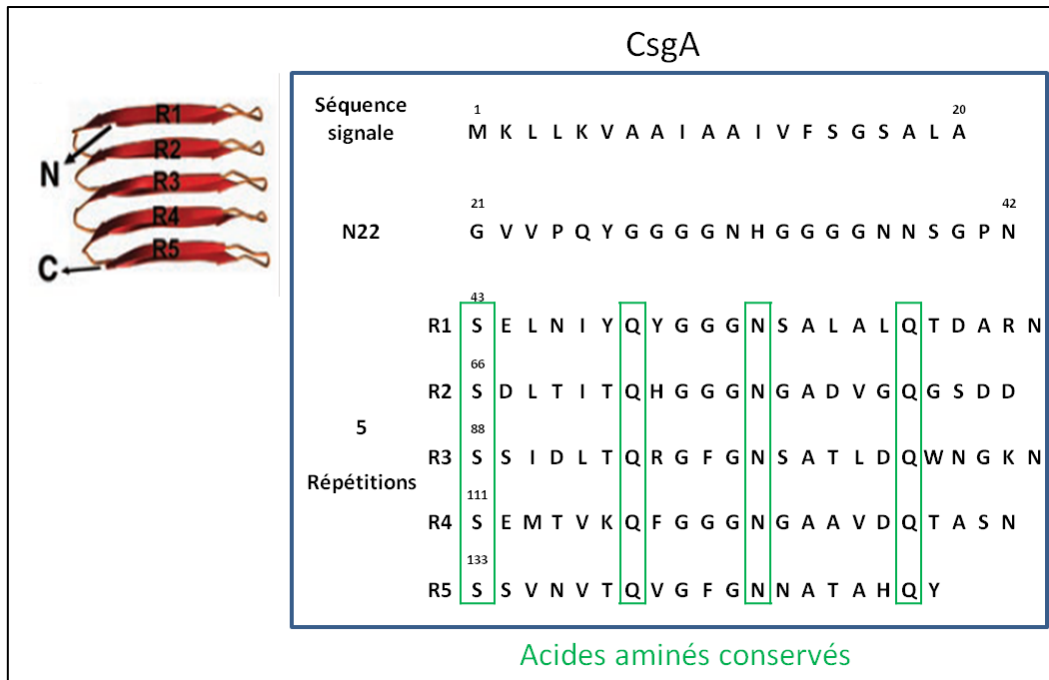


Figure I.27 : Composition en acides aminés de CsgA et modèle d'organisation des domaines R1 à R5 dans la fibre.
(D'après Wang X et Chapman M R, 2008)

Les domaines R1, R2, R3, R4 et R5 s'organisent en feuillets β parallèles pour former les fibres amyloïdes (Figure I.27) (Cherny I, et col, 2005). La structure filamenteuse ainsi formée a une longueur de 10 μ m. Cherny et col ont aussi montré que la protéine CsgA possède des motifs de répétition similaires à la protéine PrP du prion. En utilisant des fragments particuliers de la protéine CsgA (de 6 acides aminés : QFGGGN et QHGGGN) ces auteurs ont montré que ces motifs étaient responsables de la formation de fibres. L'équipe de Chapman (Wang X et col, 2007) a montré en 2007 que l'apparition de fibres amyloïdes formées par CsgA pouvait être mesurée par un test à la thioflavine T (THT). Ce test permet d'observer la présence de liaisons entre feuillets β . De plus, ces auteurs ont montré que les sous unités R1, R3 et R5 pouvaient isolément former des fibres de nature amyloïde. Enfin, l'équipe de Shewmaker et collaborateurs a montré en 2009 (Shewmaker F, et col, 2009), que la structure des fibres formées par CsgA et CsgB était bien un empilement de feuillet β mais que la structure des fibres issues de CsgA, correspondrait plutôt à un modèle d'hélice β (Figure I.28). Cette hélice est composée par un empilement de feuillets β , reliés par des parties non organisées.

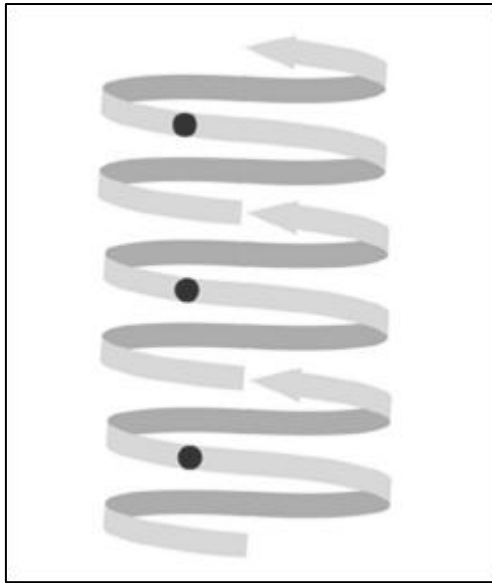


Figure I.28 : Schéma d'une structure en hélice β .
(D'après Shewmaker et col, 2009)

Les *Pseudomonas* peuvent aussi former des structures de type amyloïde. Elles sont composées de la protéine FapC de 24 KDa (Dueholm M S, st col, 2010), qui comprend 8 domaines distincts (Figure I.29) : le peptide signal, une séquence N-terminale de 61 acides aminés, un premier motif de répétition nommé R1, un deuxième motif répété nommé L1, une séquence C-terminale de 14 acides aminés. La séquence R1 de 37 acides aminés est répétée trois fois, alors que la séquence L1 de 28 acides aminés est répétée deux fois.

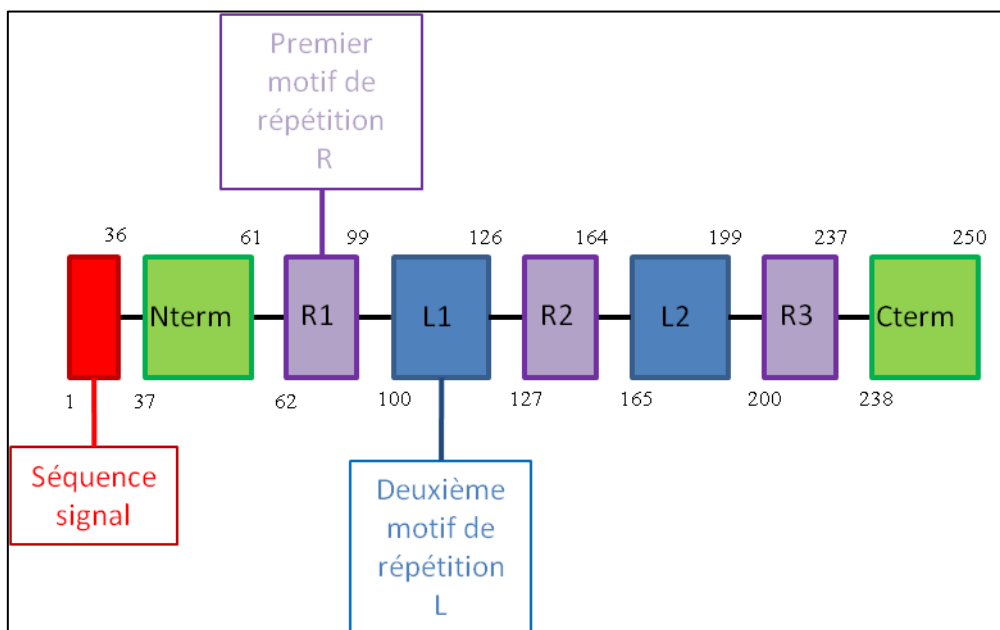


Figure I.29 : Schéma de l'organisation de la protéine FapC.

Ces structures amyloïdes participent à la formation du biofilm. En effet, l'expression de la protéine FapC chez une souche ne formant pas normalement de biofilm permet une structuration en biofilm (Dueholm M S et col, 2010).

D'autres petits peptides comme les PSMs (Phenol-Soluble Modulins) de 20 à 40 acides aminés sont présents dans la matrice du biofilm de *S. aureus*. Ces peptides, sous leurs formes courtes d'environ 20 acides aminés, augmentent l'adhérence aux surfaces. En revanche, leurs formes longues d'environ 40 acides aminés permettent le détachement du biofilm (Otto M, 2008). L'équipe de Schwartz et collaborateurs, a montré que ces PSMs peuvent former des structures fibrillaires liées à la surface de la cellule (Schwartz, K, et col, 2012), structures qui ressemblent fortement aux curli (Figure I.30) présentés dans le paragraphe précédent.

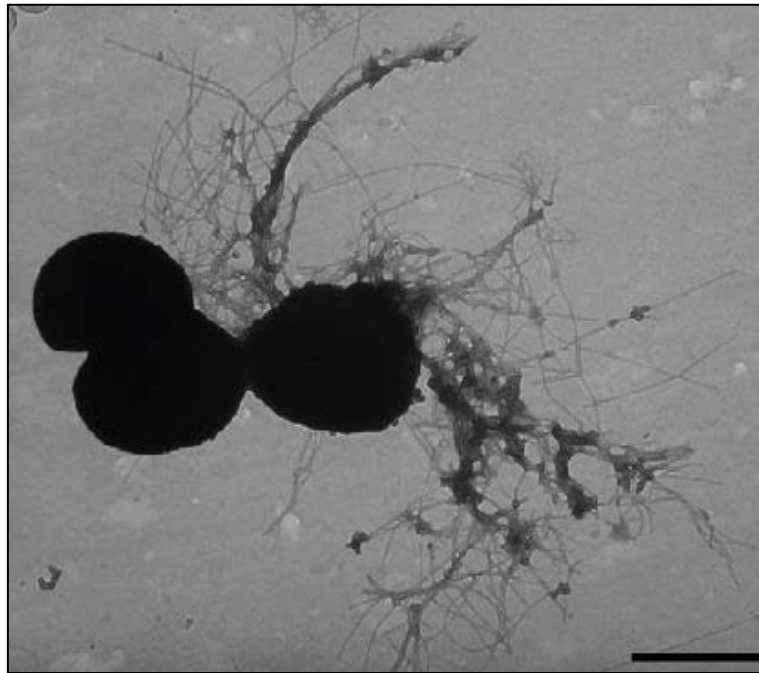


Figure I.30 : Micrographie électronique de S. aureus présentant des fibres composées de PSMs. Labarre d'échelle est de 1 μ m(d'après Schwartz K, et col, 2012)

Les fibres sont composées de six petits peptides différents nommées α -PSM1, α -PSM2, α -PSM3, α -PSM4, β -PSM1, et β -PSM2. Les peptides de type α -PSM comprennent environ 20 acides aminés, alors que les β -PSM sont composés de plus de 40 acides aminés (Figure I.31).

	1	10	20	30	40
α -PSM1	MGI I	AGI I KVI	KS LI EQFT	GK	
α -PSM2	MGI I	AGI I KFI	KGLI EKFT	GK	
α -PSM3	ME F VAKLF	KFF KDLL	GKFL GNN		
α -PSM4	MAI VGT I I	KI I KAI I	DI FAK		
β -PSM1	ME GL FN AI	KDT VT AAI	NNDGAKL GT S I	VSI VENG VGL L	GKLF GF
β -PSM2	MT GL AE AI	ANT VQAAQ	QHDS VKL GT S I	VDI VANG VGL L	GKLF GF

Figure I.31 : Alignements des séquences protéiques des différents PSMs de *S. aureus*.
(D'après Schwartz K, et col, 2012)

Ces fibres de PSMs s'assemblent spontanément en solution. L'équipe de Schwartz a aussi montré que ces fibres sont de nature amyloïde. Leur diamètre est de l'ordre de 12 nm, pour une longueur pouvant dépasser le micromètre. Ces auteurs ont aussi montré que les mutants ne produisant pas ces fibres forment un biofilm pouvant être dégradé par la protéinase K, la DNase1 et la dispersin B, ce qui n'est pas le cas pour les biofilms des souches sauvages. Ces travaux prouvent ainsi que ces fibres de nature amyloïde aident à la conservation de l'intégrité de la structure biofilm chez *S. aureus*.

III.2.2) Les protéines de la famille Bap (Biofilm associated Protein).

Lors de la maturation du biofilm, différentes protéines jouent un rôle de structuration. Les plus importantes sont les protéines Aap et Bap.

Aap (Accumulation associated protein) est une protéine de 230 à 280 kDa responsable de l'agrégation des *Staphylococcus epidermidis*. Cette protéine est très similaire aux protéines SSP-1 et SSP-2 des adhésines de *S. aureus* (Banner M A, et col, 2007), mais aussi à la protéine BAP de par sa taille et son organisation. La protéine Aap a la capacité de former des fibres d'une centaine de nanomètres à la surface des cellules bactériennes et de permettre une augmentation de l'hydrophobicité de la surface. Les mécanismes d'assemblage de cette protéine à la surface de la cellule bactérienne ne sont pas encore décrits à ce jour.

La protéine Bap (Biofilm-associated protein) ou Bhp (Bap-homologue-protein) est elle aussi impliquée dans la cohésion cellule-cellule et la formation de biofilm (Cucarella C, et col, 2001). Cette protéine de *S. aureus* d'environ 240 kDa, est composée d'un peptide signal, d'un premier motif de répétition, d'une séquence non organisée et de 13 répétitions d'une

séquence de 86 acides aminés (Figure I.32). D'après le logiciel Coiled-Coil, cette région de la protéine est prédite comme formant un assemblage de 7 feuillets β (Latasa C et col, 2006). De plus, la présence de motifs de répétition et de feuillet β rappelle la structure des protéines FapC de *P. aeruginosa* et CsgA d'*E. coli*. En revanche aucune étude ne montre que cette protéine forme des fibres à la surface de la bactérie. Plusieurs homologues de la protéine Bap ont été identifiés chez un grand nombre de genres bactériens : *Streptococaceae* (Stalhammar-Carlemalm M et col, 1999), *Enterococaceae* (Lund B, et col, 2003), les Pseudomonales (Hinsa S M, et col 2003), ou encore les *Enterobacteriaceae* (Latasa C, et col, 2005 ; Roux A, et col, 2005).

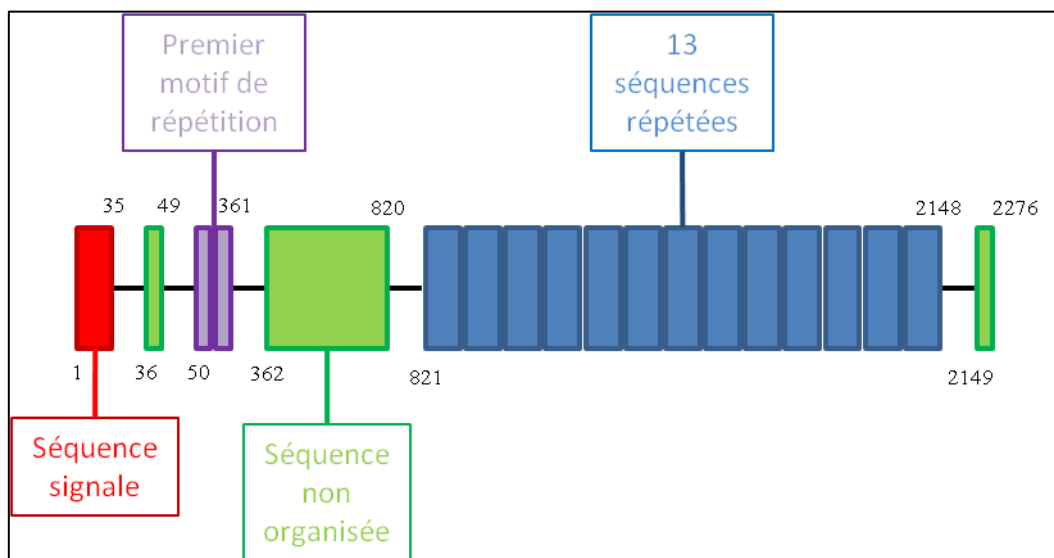


Figure I.32 : Schéma de la séquence en acides aminés de Bap

Il semblerait que cette protéine ait un rôle très important dans le monde bactérien pour la formation de biofilm (Lasa I et Penades J R, 2006). L'étude de Bap de *S. aureus* a montré que cette protéine avait un rôle aussi bien dans l'adhérence de la bactérie à la surface, que dans la cohésion des cellules. De plus, la présence de cette protéine augmente sensiblement la présence de l'exopolysaccharide PNAG (Cucarella C, et col, 2004).

Chez *S. enterica* serovar *enteritidis*, deux exoprotéines, BapA et SiiE, homologues de Bap de *S. aureus*, permettent aussi une augmentation de la formation de biofilm (Latasa C et col, 2005). La protéine SiiE ne semble pas avoir d'effet sur la formation de biofilm par *S. enterica*. En revanche, la protéine BapA de 386 kDa est indispensable à la formation de pellicules à l'interface air/liquide (Latasa C et col, 2005). De plus, sa synthèse est régulée de la même manière que celle des curli. Elle fait intervenir CsgD, le régulateur de la synthèse des curli et de la cellulose qui contrôle aussi une grande partie des gènes exprimés dans le

phénotype biofilm. Le fait que BapA soit contrôlée par cette protéine montre aussi son implication dans la formation du biofilm.

Enfin, citons en dernier exemple la protéine Bap d'*Acinetobacter baumannii* qui est une protéine de 854 kDa contenant des séquences répétées homologues à celles de la protéine Bap de *S. aureus* (Loehfelm T W, et col, 2008). La délétion de cette protéine dans le génome de la bactérie par insertion d'un transposon, entraîne une chute drastique de la capacité de la bactérie à former un biofilm épais sur une surface de polystyrène (Loehfelm T W, et col, 2008).

III.2.3) Les protéines de la famille des adhésines et pili

Une des autres familles de protéines ayant un rôle dans la formation de biofilm sont les adhésines et les pili. Les adhésines sont des protéines permettant l'accroche de la bactérie sur une surface ou un polymère. Les pili quant à eux peuvent être pourvus d'adhésine, mais peuvent aussi permettre un lien entre cellules. Dans cette partie, nous détaillerons les pili et adhésines de 3 espèces bactériennes : *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*.

III.2.3.1) Adhésines et pili chez Escherichia coli.

De nombreux pili et fimbriae sont impliqués dans l'adhérence et la formation de biofilm d'*E. coli* sur des surfaces. Parmi ces structures filamenteuses de surface, les plus couramment exprimées sont les pili de type F et les pili de type I quelque soit l'origine des souches, et plus spécifiquement les pili de Pap pour les souches uropathogènes (Uhlen B E, et col, 1985).

Le facteur F ou pilus F est décrit depuis longtemps comme élément nécessaire à la formation de ponts cytoplasmiques interbactériens impliqués dans la transmission de matériel génétique par conjugaison (Sherwood L, et col, 2010). Depuis plus récemment, il a été montré que le pilus de type F intervient également dans l'adhérence bactérienne aux supports mais aussi dans la cohésion du biofilm (Molin et col, 2003). En effet, cette structure protéique reliant deux individus permet de rendre le biofilm plus cohésif et donc stabilise la structure

(Molin et col, 2003). Les bactéries nommées F+ sont celles possédant le plasmide F. Celui-ci code pour l'opéron *tra*. La protéine *traA* est la piline permettant les ponts entre la souche donneuse F+ et la souche réceptrice F- (Ghigo JM, 2001).

Dans la famille des adhésines, les pili de type I d'*E. coli* et de la plupart des *Entérobactéries* sont impliqués dans l'adhérence à des surfaces biologiques et abiotiques variées. Ces pili interagissent avec les résidus mannoses de récepteurs cibles de l'adhérence via l'adhésine FimH (Pratt L A, et col, 1998). Ils servent aussi à l'accroche de la cellule bactérienne à la surface. Le blocage de l'adhésine FimH via du mannose empêche l'adhérence d'*E. coli* sur une surface de polychlorure de vinyle (PVC) car l'adhésine du pili se retrouve bloquée (Pratt L A, et col, 1998). L'interaction de celui-ci avec la surface active les voies de signalisation et de régulation de la synthèse des exopolysaccharides (Otto K, et col, 2004). Lors du contact des pili de type I avec une surface, il y a une diminution de la production de la protéine de régulation OmpX (Otto K, et col, 2004). Cette protéine de régulation permet de bloquer la production d'exopolysaccharides. La baisse de sa concentration permet alors l'expression des protéines de synthèse des sucres. Une cellule bactérienne produit à sa surface environ 100 à 500 pili de diamètre de 5 à 7 nm et de longueur de 0,2 à 2 μm (Figure I.33) (Hanson MS et col, 1988 ; Pratt LA et col, 1998 ; Beloin C et col, 2010).

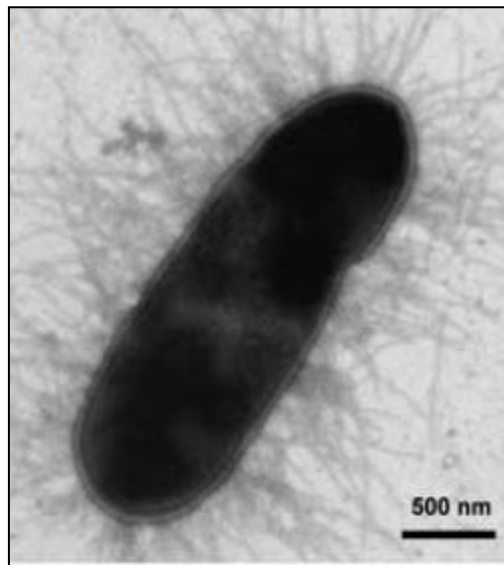


Figure I.33 : Pili de type I à la surface d'*E. coli*.
(D'après Lane MC, et Mobley HLT, 2007)

III.2.3.2) Adhésines et pili chez Pseudomonas aeruginosa.

Plusieurs protéines ont été identifiées comme jouant un rôle majeur dans l'établissement du biofilm chez les *Pseudomonas*, en particulier dans les étapes initiales d'adhérence et de formation de microcolonies, mais aussi dans les étapes de détachement du biofilm.

Le flagelle joue un rôle primordial dans l'étape d'adhérence à la surface. C'est une structure multiprotéique polarisée qui est le moteur de la bactérie pour la nage et donc le rapprochement de la surface. De plus, celui-ci permet à la bactérie de reconnaître certains récepteurs cellulaires (comme le TLR5 et TLR2) et de s'y fixer (Kipnis E, et col, 2006). Le flagelle participe aussi à la formation du biofilm en aidant l'adhérence bactérienne. Les souches dépourvues de ce moyen de déplacement ne colonisent que très lentement une surface de PVC (O'Tool G A, et Kolter R, 1998). Mais le flagelle n'est pas exprimé à tous les stades de la formation du biofilm. Après l'adhérence, les cellules perdent leurs capacités à produire le flagelle. Cela est dû à la répression de l'expression de ses protéines constitutives telles que flgD, flgE et fliD (Witheley M et col, 2001). En revanche, lors du détachement du biofilm, provoqué par une alcalinisation du milieu ou la présence de sucre, la protéine fliC est réexprimée permettant ainsi la synthèse du flagelle pour repasser à un mode de vie planctonique (Sauer K et col, 2004).

Comme le flagelle, les pili servent à l'adhérence bactérienne au support, notamment les pili de type IV. Ces appendices protéiques ont un diamètre de l'ordre de 5 à 7 nm pour une longueur pouvant aller jusqu'à plusieurs micromètres (Figure I.34). La protéine PilA ou piline de 15 KDa est la protéine majoritaire qui constitue cette structure et qui a la fonction d'adhésine. Cette protéine se fixe sur les motifs N-acétylgalactosamine- β -1,4-galactose (L Salman et Prince A, 1993). Le rôle des pili dans la formation du biofilm de *P. aeruginosa* est de permettre un déplacement sur la surface de type « twitching » (Vallet I, 2001 ; Giltner C L, et col, 2010). Le pilus adhère à la surface puis, en se rétractant à l'intérieur de la cellule permet son déplacement. Ces pili permettent aussi la liaison entre les cellules.

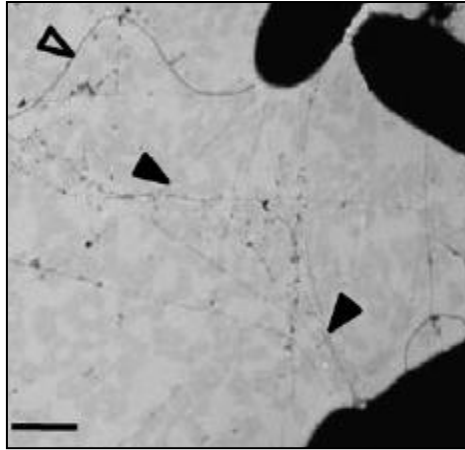


Figure I.34 : Image en microscopie électronique des pili de type IV (flèche noire) et du flagelle (flèche blanche) de *P. aeruginosa* (barre d'échelle 500nm).
(D'après Giltner C L, et col, 2010)

D'autres pili sont présents à la surface de *P. aeruginosa*. La famille des Fimbriae de type Cup (Chaperon-usheer-pathway) est aussi exprimée (Mikkelsen H, et col, 2011). Ils sont composés de trois éléments distincts. Les premiers éléments sont les protéines de structure du pili : Cup B, CupC, CupD, ou CupE. Le deuxième élément est la protéine chaperon permettant la protection de l'unité de structure, et le dernier élément est la protéine permettant la mise en place du pili à la surface de la cellule bactérienne (Mikkelsen H, et col, 2011). La voie de synthèse des clusters cup est contrôlée en partie grâce à une molécule clé de la régulation de la synthèse bactérienne : le glucose di-phosphate cyclique (Kulasekara H D, et col, 2005). Cette molécule sert de second messenger dans un grand nombre de voies de signalisation bactérienne.

III.2.3.3) Adhésines et pili chez les *Staphylococcus*.

Les protéines SSP-1 et SSP-2 font partie des adhésines de *S. epidermidis*. Il a été montré que ces protéines d'environ 220 kDa s'assemblent à la surface pour former des structures similaires à des fimbriae (Timmerman C P, et col, 1991). Les études de Veenstra et collaborateurs montrent que ces fimbriae sont primordiales pour l'attachement de *S. epidermidis* sur les surfaces de polystyrène (Veenstra G J C, et col, 1996). En revanche, l'assemblage de ces fimbriae à la surface de la cellule n'est pas encore décrit.

L'attachement des *Staphylococcus* à la matrice extracellulaire humaine est réalisé par le biais des protéines MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules). Cette famille de protéines confère aux bactéries la capacité de se lier au fibrinogène, à la fibronectine, ainsi qu'à une grande variété de matrices protéiques (Patti J M, et col, 1994). Ces protéines sont en général composées de trois domaines distincts : un domaine servant à la reconnaissance et à la fixation au substrat tel que la fibronectine, un domaine s'étendant sur la paroi cellulaire contenant des séquences répétées, et enfin, un domaine responsable de l'attachement covalent ou non de la protéine à la cellule bactérienne. Cet ancrage covalent sur le peptidoglycane est permis par des enzymes appelées sortase. La principale sortase des *Staphylococcus* est la SortaseA (Marraffini L A, et col, 2006) (Figure I.35). La famille de protéines Sdr sont notamment constituées de cette structure à 3 domaines : elles possèdent une séquence signal, un domaine contenant des répétitions du dipeptide sérine-aspartate, et un segment hydrophobe (McCrea K W, et col, 2000).

Certaines MSCRAMMs ne sont pas reliées covalamment à la surface bactérienne comme par exemple, l'autolysine AltE de 148 kDa qui permet l'adhérence de *S. epidermidis* à la vitronectine. Cette enzyme a un double rôle : celui de remodelage de la paroi cellulaire, mais aussi celui d'adhésine. Aussi AltE est classée dans la famille des autolysines/adhésines (Heilmann C, et col, 1997). De par sa faculté à lyser les cellules, AltE a un rôle dans la présence d'ADN extracellulaire au sein du biofilm, en libérant les acides nucléiques cellulaires dans le milieu (Qin Z et col, 2007).

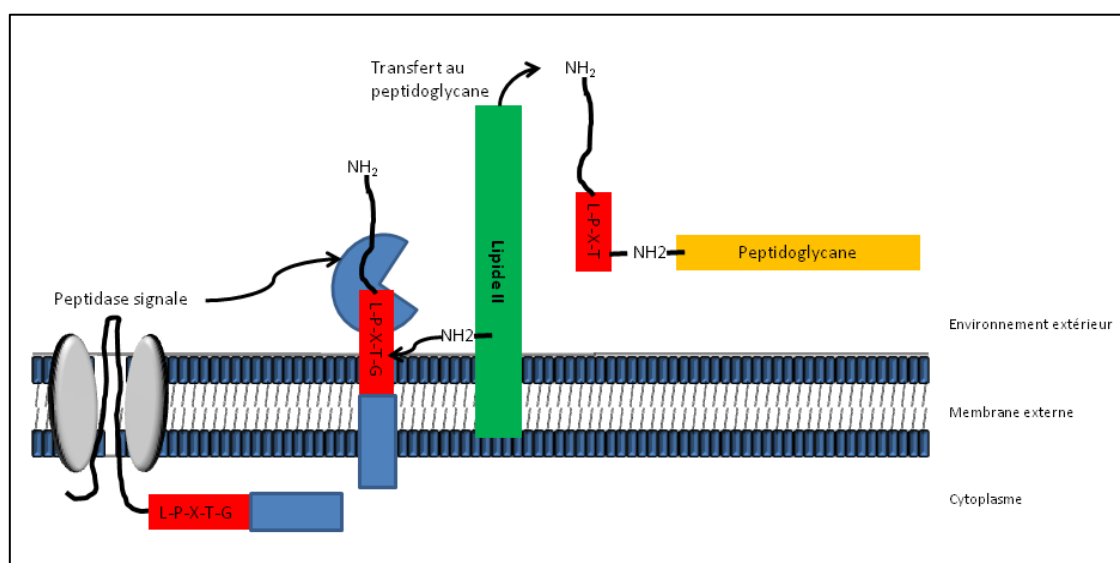


Figure I.35: Schéma de l'assemblage des MSCRAMMS sur le peptidoglycane.

III.2.4) Les autres protéines ayant un rôle dans la structuration du biofilm.

D'autres protéines de surface ne formant pas de structures filamenteuses sont également impliquées dans la formation de biofilm de nombreuses souches d'*E. coli* (Henderson I R et col, 2004). Parmi ces protéines, on trouve la famille des autotransporteurs.

Cette famille de protéines est capable de s'exporter sur la membrane externe des bactéries de manière autosuffisante et sans apport d'énergie, selon un système de sécrétion de type V (Henderson I R et col, 2004) (Figure I.36). La protéine Sec de la membrane interne permet l'export de la protéine devant s'ancrer sur la membrane interne. L'adhésine peut ensuite être clivée ou rester sur accrochée à la protéine. Cette grande famille de protéines est divisée en trois classes différentes en fonction de l'activité biologique qu'ont ces protéines dans le milieu extérieur : les protéases, les estérases, et les adhésines. Dans cette partie, nous ne détaillerons que les autotransporteurs de la famille des adhésines chez les Entérobactéries, les estérases et les protéases ne participant pas à l'établissement du biofilm.

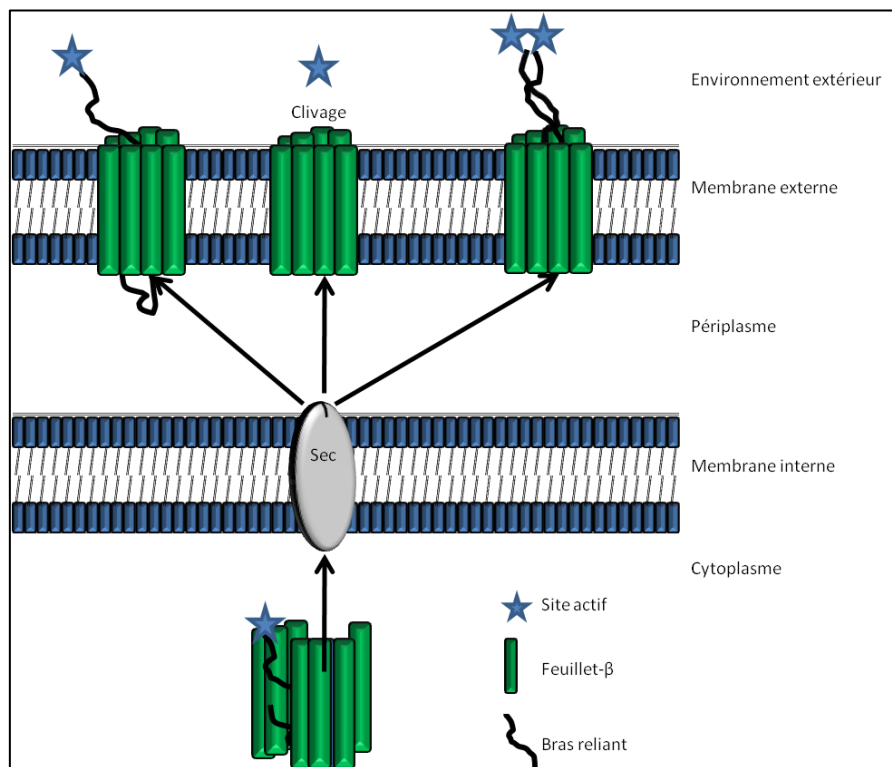


Figure I.36 : Système de sécrétion de type V chez *E. coli*.
(Adaptée d' Henderson I R et col, 2004)

Un des premiers autotransporteurs décrit est l'antigène 43 (Ag43) d'*E. coli* qui augmente l'adhésion entre bactéries (Klaergaard K et col, 2000). Il semble avoir un rôle important dans la maturation du biofilm, aussi bien sur des surfaces abiotiques que sur des cellules eucaryotes (Danese PN, et col 2000b). D'autres autotransporteurs similaires à l'Ag43 sont codés par les gènes de la famille *flu* (Roux A, et col, 2005). Deux autres autotransporteurs plus distants, les protéines AidA et TibA, sont également impliqués dans la formation de biofilm chez *E. coli* (Sherlock et col, 2004). Ces protéines ont environ 25% de séquences identiques avec l'antigène 43 (Sherlock et col, 2004, 2005). Elles permettent une autoaggrégation des souches les produisant, mais aussi des interactions avec d'autres espèces bactériennes (Kjaergaard K, et col, 2000) et de polymères grâce à leurs glycosylations (Benz I, et col, 2001). Les glycosylations portées par ces protéines sont ajoutées après la traduction sous forme d'une suite de 19 heptoses consécutifs.

III.3) Les enzymes.

Les enzymes sont naturellement présentes dans les biofilms bactériens (Kaplan J, B, et col 2002, Baty AM, et col, 2000, Gjermansen M et col, 2010). Celles-ci ont différents rôles de structuration, de nutrition, mais aussi de dégradation permettant ainsi aux micro-organismes de se détacher puis de coloniser de nouvelles surfaces.

Les enzymes de structuration sont sécrétées lors des phases précoces de formation du biofilm. Par exemple, la glycosyltransférase Gtfs de *Streptococcus mutans* permet la création de films de sucres sur les surfaces permettant l'adhérence des cellules sur une surface où elles ne pouvaient pas s'accrocher (Bowen W H, et col, 2009). Il existe aussi des enzymes permettant l'accroche de protéines produites au sein de la cellule sur la matrice qui l'entoure. C'est le cas de la SortaseA de *S. epidermidis*. Elle permet l'accroche d'une vingtaine de protéines à la surface de la paroi cellulaire (Marraffini L A, et col, 2006). De plus, chez *P. putida* la cystéine protéase nommée LapG permet la maturation de l'adhésine LapA servant à l'accroche de la bactérie à un polysaccharide encore non identifié de la matrice du biofilm (Gjermansen M et col, 2010). Mais aussi comme vu dans la partie III.2.3, les enzymes/adhésines de la famille des MSCRAMMs permettent l'accroche des protéines au peptidoglycane.

Les enzymes de dégradation apparaissent lors des phases tardives de maturation du biofilm. Lors de cette étape de dissémination, un grand nombre d'hydrolases sont sécrétées. Ces hydrolases sont souvent répertoriées en trois classes différentes : les saccharidases, les protéases, et les désoxyribonucléases.

Une des saccharidases la plus étudiée est la Dispersine B. Cette enzyme de 42 kDa découverte chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* permet l'hydrolyse du poly-N-acétylglucosamine (Kaplan J B, et col, 2003). Cette enzyme peut aussi avoir un effet sur les biofilms d'autres espèces comme *S. epidermidis* (Kaplan J B, et col, 2004a), ou *A. pleuropneumoniae* (Kaplan J B, et col, 2004b). Une variation de la température serait à l'origine de la production de cette enzyme (Kaplan J B, et col, 2002), car une augmentation de celle-ci de 32°C à 36°C entraîne la dispersion des cellules attachées à la surface.

Chez *P. aeruginosa*, l'enzyme de dégradation la plus étudiée est l'alginate lyase. Cette enzyme coupe les liaisons β 1-4 des motifs aux extrémités du polymère (Doumèche B, et col, 2007) permettant la dégradation de la matrice d'alginate. Cette protéine de 34 kDa est produite au sein du biofilm, dans les phases tardives. Une baisse de l'apport en nutriments serait la cause de sa surexpression entraînant ainsi la libération des bactéries dans leur environnement (Ott M C et col, 2001)

Enfin, d'autres saccharidases ont été étudiées pour leur capacité à dégrader la matrice du biofilm. Parmi celles-ci, on peut noter : une chitinase de *Pseudoalteromonas sp* (Baty AM, et col, 2000), une « disaggregatase » dégradant les polymères de N-acetylgalactosamine de *Methanosarcina mazei* (Xun L Y, et col, 1990), une endo- β -1,4-mannase de *Xanthomonas campestris* (Dow J M, et col, 2003), et une exopolysaccharide-lyase de *P. fluorescens* (Allison D G, et col, 1998). Ces enzymes permettent la dispersion des bactéries du biofilm.

Chez *S. aureus*, deux protéases différentes ont été identifiées : l'aureolysine et SPL. L'inactivation de ces deux enzymes entraîne une augmentation de la taille du biofilm formé par ces souches, ainsi qu'une diminution du nombre de bactéries planctoniques (Boles B R et col, 2008).

Les désoxyribonucléases jouent aussi un rôle important dans le biofilm. Il a été montré que la thermonucléase de *S. aureus* est très importante pour la structuration en biofilm. En effet, une inhibition de celle-ci par mutation entraîne une plus forte prolifération du biofilm (Man E E, et col, 2009).

La machinerie cellulaire entière est potentiellement présente dans la matrice du biofilm, de par la présence de cellules mortes lysées en son sein (Allesen-Holm M, et col,

2006). Ces débris cellulaires, en particulier les membranes et les parois, ainsi que l'ADN, peuvent aussi jouer un rôle important dans le contenu de la matrice.

III.4) L'ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) est impliqué dans la structuration en biofilm, surtout dans les premières étapes de maturation. L'ADN extracellulaire est retrouvé dans les biofilms d'un grand nombre d'espèces comme chez *P. aeruginosa* (Witchurch CB et col, 2002), chez *Enterococcus faecalis* (Thomas V C, et col, 2008), chez *Staphylococcus aureus* et *epidermidis* (Man E E, et col, 2009), mais aussi chez des bactéries aquatiques (Bockelmann U, et col, 2006). Chez ce type de bactéries, l'ADN extracellulaire forme un réseau dense visible en microscopie. Chez toutes ces espèces bactériennes, l'ajout de la DNaseI (enzyme de dégradation de l'ADN) dans le milieu de culture entraîne une très forte diminution de la quantité de biofilm.

De plus, chez *P. aeruginosa*, il a été montré que l'ADNe est indispensable à la structure de type champignon (Witchurch CB et col, 2002). Dans ce cas, il est surtout retrouvé à la base de la structure (Witchurch CB et col, 2002) (Figure I.37).

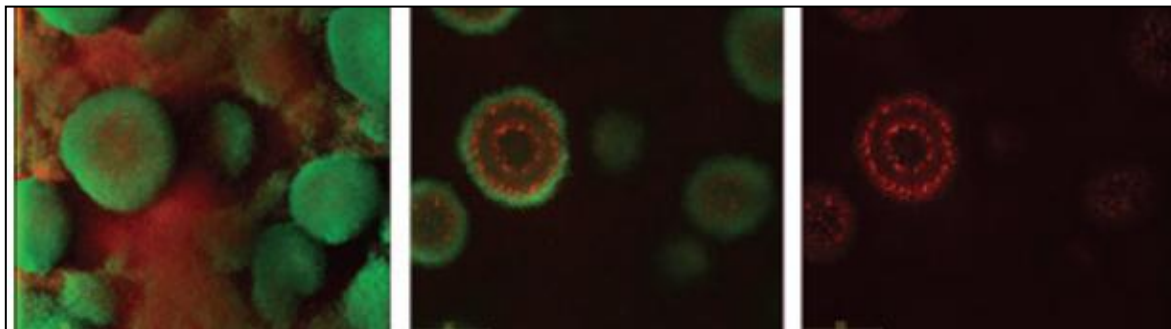


Figure I.37 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de *P. aeruginosa* (Vert : cellule contenant de la GFP, rouge : ADN extracellulaire, Image de droite : vue du dessus, image centrale : coupe du centre de la structure, image de gauche : même coupe avec le marquage de l'ADNe seul ; d'après Allesen-Holm M, et col, 2006).

Chez cette espèce, l'ADNe est identique à l'ADN chromosomique. Celui-ci proviendrait de la lyse programmée des cellules bactériennes. Cette lyse est due à la présence d'un prophage dans le génome de cette espèce qui peut être activé via la voie de signalisation du quorum

sensing (Allesen-Holm M, et col, 2006). L'ADNe a alors un rôle dans l'interaction cellule-cellule (Witchurch C B, et col, 2002 ; Nemoto K, et col, 2003). Cette interaction s'établit par les pili de type IV de *Pseudomonas* (Van Schaik E J, et col 2005). Le pilus interagit d'une manière spécifique avec l'ADNe. Cette liaison nécessite une structuration quaternaire du pilus qui se fixe de manière préférentielle sur les bases pyrimidiques de l'ADNe.

De même, il a été montré que l'ADNe joue un rôle important dans la formation de biofilm par *S. aureus* et *S. epidermidis* (Qin Z et col, 2007 ; Rice K C et col, 2007). Il provient de la lyse de cellules du biofilm. Cette lyse est engendrée par l'autolysine AltE et régulée par la protéine CidA. L'ADNe joue un rôle dans les premières phases de développement du biofilm. En effet, un traitement par la DNase I lors de la phase d'adhérence des cellules sur la surface inhibe fortement l'adhérence et donc la formation de biofilm (Qin Z et col, 2007).

III.5) Les lipides

Les membranes bactériennes ainsi que les débris cellulaires apportent un grand nombre de lipides dans la composition du biofilm. Les lipopolysaccharides des bactéries gram- ainsi que les rhamnolipides (Figure I.38) et glycolipides permettent, de par leur nature amphiphile, des interactions avec un grand nombre de polymères de la matrice (Davey M E, et col, 2003).

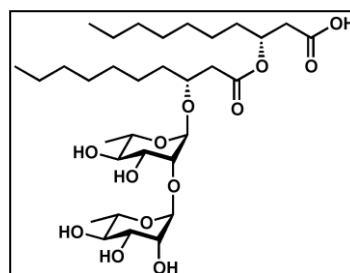


Figure I.38 : Schéma de la structure d'un rhamnolipide.

Il a été montré que les rhamnolipides jouent un rôle important dans la formation de biofilm de *P. aeruginosa* (Verstraeten N et col, 2008). Deux explications sont possibles quant au rôle de ceux-ci dans la structuration en biofilm (Abdel-Mangoud A M, et col 2010). La première est que les rhamnolipides induisent la sécrétion du lipopolysaccharides (LPS), ce qui augmente l'hydrophobicité de la surface et par conséquent l'adhérence de la bactérie (Al-Tahhan et col, 2000). La deuxième hypothèse est que les rhamnolipides servent à déstabiliser localement la structure de la matrice. Cette déstabilisation locale induit la formation de

canaux d'eau au sein de la matrice (Davey M E, et col, 2003), et permet aussi de casser les interactions entre les cellules, les polymères et la surface, jouant un rôle dans la dissémination des bactéries (Boles B R, et col, 2005). Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles. Ils permettent la solubilisation de molécules aussi bien hydrophiles qu'hydrophobes. Cela permet donc de casser les interactions de types polaires ou apolaires au sein de la matrice, entraînant sa déstabilisation.

Le LPS joue un rôle très important dans la cohésion du biofilm. (Lau P C Y, et col 2009). L'absence de core O entraîne une augmentation de l'adhésion et de la cohésion des cellules entre elles chez *P. aeruginosa*. En revanche, cette modification du core O déforme le biofilm. Il devient alors moins lisse et plus poreux (Figure I.39). L'étude des propriétés rhéologiques de ces structures corrèle ces observations. Les biofilms formées par les souches de *P. aeruginosa* déficientes dans la production du core O du LPS sont moins visqueux et moins élastiques que ceux de la souche sauvage (Lau P C Y, et col 2009).

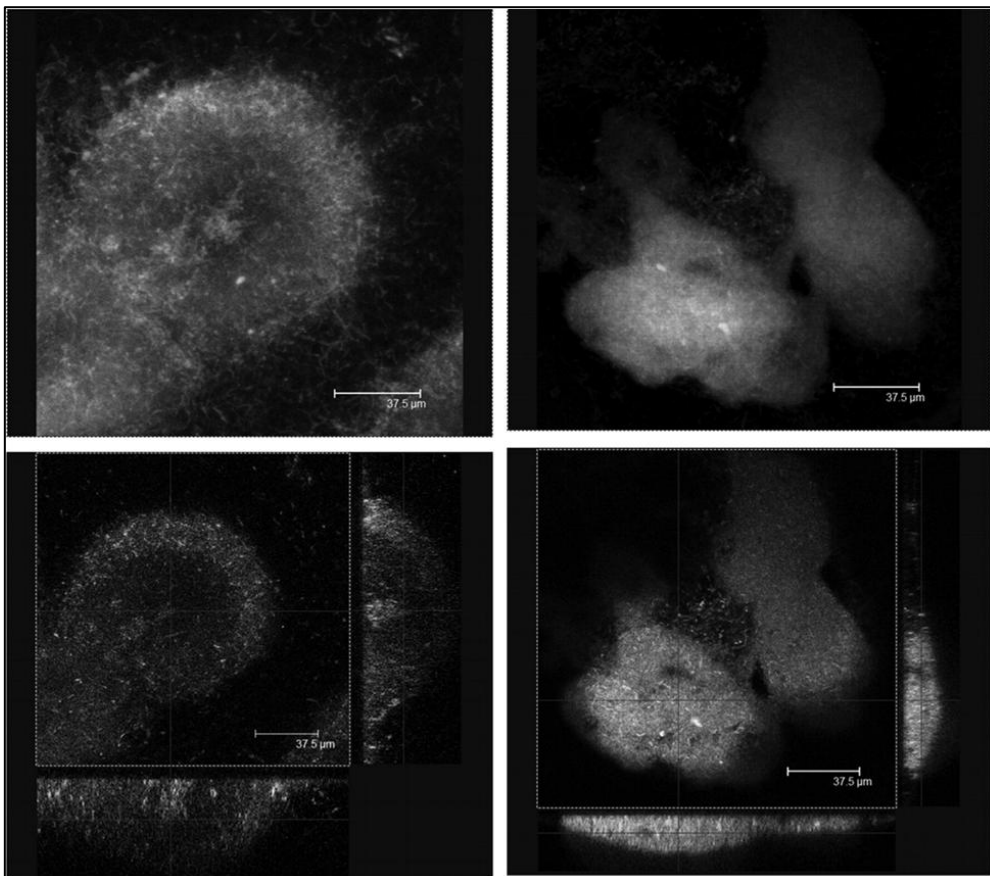


Figure I.39 : Image en microscopie confocale de biofilm de 7 jours de *P. aeruginosa* sur du polycarbonate en bouillon TS à un flux de 1ml/min. Images de droite : vue du dessus et en coupe d'une souche produisant un LPS intact. Image de gauche : vue du dessus et en coupe d'une souche produisant un LPS tronqué du core O. (D'après Lau P C Y, et col, 2009).

IV) Propriétés mécaniques des biofilms

Un biofilm possède des propriétés mécaniques nécessaires à son maintien et à sa déformation sous contrainte. Il est composé de deux phases différentes, chaque phase participant aux propriétés mécaniques de l'ensemble : une phase élastique correspondant au réseau de polymères qui forme la matrice dans laquelle sont enchâssées les cellules, et une phase visqueuse constituée par l'eau présente dans les canaux qui le traversent. Ainsi, un biofilm est de nature viscoélastique qu'il soit naturel ou formé *in vitro*, mono ou polymicrobien (Shaw T, et col, 2004 ; Stoodley P, et col, 1999 ; Houari A et col, 2008, Towler B W et col, 2005).

Il a été suggéré qu'un biofilm peut être assimilé à une structure de type gel de polymère poreux (Christensen B E et Characklis W W, 1990). En effet, cette structure est capable de se déformer sans se rompre, et de permettre la diffusion de molécules de plus ou moins grande taille en son sein. Ce modèle a été conforté par des études de diffusion (de Beer D, et Stoodley P, 1995). Des travaux plus récents d'analyse en rhéologie dynamique des propriétés mécaniques de biofilms modèles monospécifiques et de biofilms complexes formés sur des membranes de nanofiltration ont confirmé et précisé ce comportement de matériau gélifié (Houari A et col, 2008 ; Vinogradov A M, et col, 2004). Ce type d'étude permet de mesurer les modules de conservation (G') et de perte (G'') du matériau. Le G' d'un matériau caractérise sa capacité à stocker de l'énergie, alors que le G'' montre la dissipation de l'énergie au sein de celui-ci, le tout sous contrainte dynamique. Un matériau parfaitement élastique répond en phase avec la contrainte. C'est-à-dire que la déformation de celui-ci est immédiate à l'application de la contrainte. En revanche, une solution parfaitement visqueuse, sous oscillation répondra avec un décalage de phase de 90° avec la contrainte. La réponse visqueuse d'une solution est plus longue à se mettre en place comparée à la réponse élastique. Un matériau viscoélastique, tel qu'un gel, aura ces deux types de réponses lorsqu'il est soumis à une contrainte. (Figure I.40)

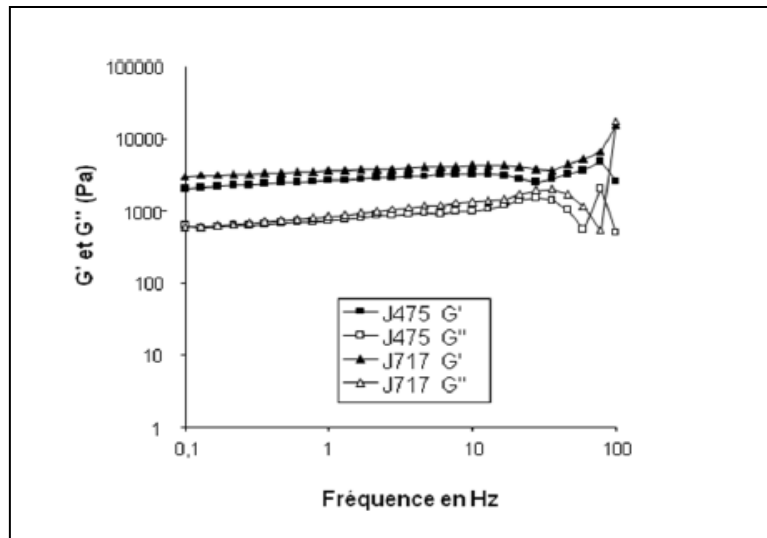


Figure I.40 : Mesure du G' et du G'' d'un biofilm de membrane de filtration en oscillation en fonction de la fréquence d'oscillation (D'après Houari A, 2009)

Par exemple, pour les biofilms NF, sous oscillation, les modules de conservation sont supérieurs au module de perte sur toute une large gamme de fréquences d'oscillation (Figure I.40). Cela démontre que ces biofilms réagissent comme un gel physique de polymères très élastiques (Kavanagh G N, et col, 1998). Le microenvironnement physico-chimique au sein des biofilms permet la transition sol/gel des exopolymères produits (Draget K, I, et col, 1998, Houari et al. 2008). L'état de gel de la matrice permet de résister à de fortes forces de flux et, en présentant une porosité suffisante, permet l'écoulement de nutriments à l'intérieur du biofilm et l'alimentation des cellules bactériennes.

Différents arguments apportés par la littérature suggèrent que les exopolysaccharides jouent un rôle dominant dans les propriétés mécaniques des biofilms. Certains polysaccharides, comme l'alginate, sont connus pour réaliser en solution des gels physiques de polymères élastiques (Draget et al. 1998). La gélification de l'alginate est obtenue *in vitro* en présence de cations divalents comme le calcium (Stokke et col, 2000). Ainsi, les propriétés visqueuses et élastiques de gels d'alginate purifiés sont analogues à celles de biofilms. Une souche de *P. aeruginosa* surexprimant des alginates présente un aspect mucoïde que ne présente pas la même souche isogénique incapable de produire des alginates. Un biofilm est un matériau rhéofluidifiant, c'est-à-dire que sa viscosité diminue avec l'augmentation des forces appliquées sur la structure (Houari A et col, 2008). La rhéofluidification de gels de polysaccharides comme la cellulose a déjà été montrée en laboratoire (Cancela M A, et col, 2005) (Figure I.41). Avec une accélération du cisaillement,

les chaînes de cellulose s'alignent dans le sens du cisaillement diminuant la viscosité de la solution.

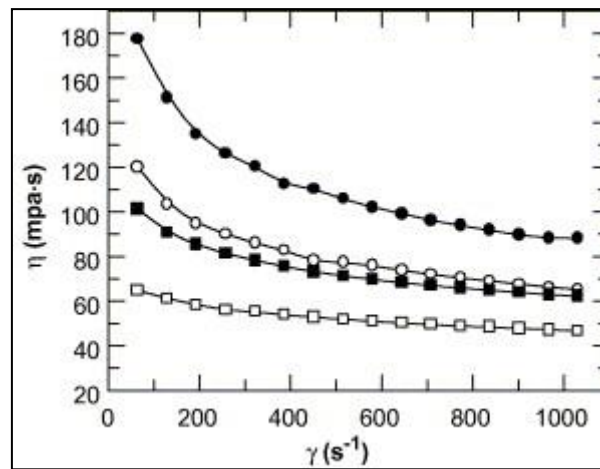


Figure I.41 : Courbe de rhéofluidification de la cellulose en fonction de la contrainte appliquée sur l'échantillon (Rond : noir 40% de sucre à 25°C, blanc 0% de sucre à 25°C, carré: noir 40% de sucre à 40°C, blanc 0% de sucre à 40°C (D'après Cancela M A, et col, 2005)

Ce type de déformation et d'alignement des chaînes de polymères est une des explications de la déformation de biofilms mixtes obtenus *in vitro* et de biofilms complexes formés sur des membranes de nanofiltration (Towler B W et col, 2005, Houari et al. 2008). En plus de l'alignement des chaînes de polymères dans le sens du cisaillement, d'autres phénomènes peuvent expliquer ces propriétés rhéofluidifiantes. Lors de l'application d'une contrainte, des liens entre les polymères de la matrice peuvent se rompre fluidifiant la structure. Mais aussi, les particules peuvent se défloculer entraînant une perte irréversible des propriétés mécaniques. Cette dernière hypothèse est moins probable car la déformation des biofilms est réversible en cisaillement (Houari et al. 2008).

Si tout biofilm est de nature viscoélastique, les valeurs d'élasticité et de viscosité peuvent être très variables pour des biofilms différents (Witchurch C B, et col, 2002, Towler B W et col, 2003 ; Vinogradov A M, et col, 2004 ; Houari et al. 2008). Ces 2 paramètres peuvent être déterminés par un test de Creep en rhéologie (Figure I.42) et montrer que ces différences d'élasticité et de viscosité entre biofilms peuvent s'expliquer par une variabilité dans la nature et la concentration en polymères présents dans leurs matrices. Par exemple, la composition en monomères de l'alginate issu d'algues ou de l'alginate produit par les *Pseudomonas* varie (Schürks et al 2002). Le nombre de blocs d'acide guluronique est plus important chez l'algue, que pour les *Pseudomonas*. L'acide guluronique permettant la

formation de gel par fixation d'ions calcium, l'augmentation de ces résidus augmente l'élasticité du gel.

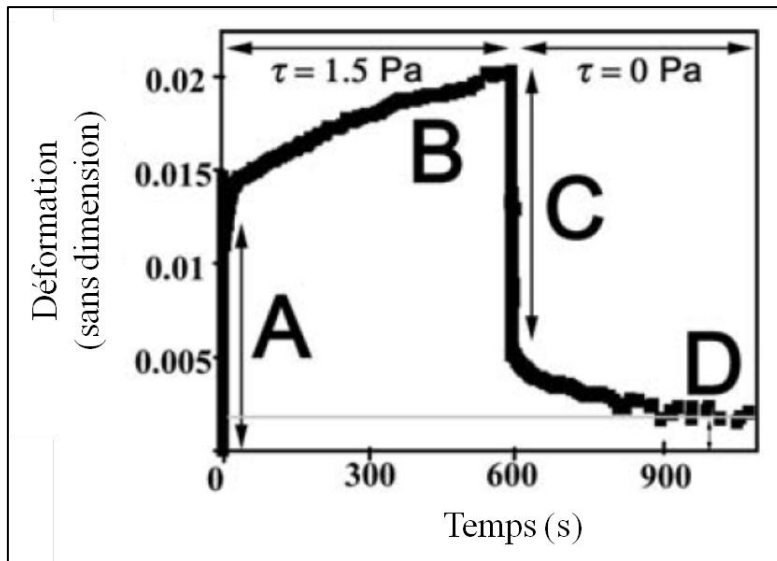


Figure I.42 : Test de Creep d'un biofilm de *S. mutans* (d'après Vinogradov et col, 2004)

Les biofilms dans des environnements différents peuvent être exposés à un très large éventail de conditions hydrodynamiques qui affectent grandement la composition de la matrice et la structure du biofilm (Stoodley P, et al. 1999). Le taux de cisaillement détermine le taux d'érosion des cellules et de la matrice du biofilm constitué : c'est le détachement sous contraintes mécaniques. L'écoulement de la phase visqueuse du biofilm ainsi que sa déformation élastique permettent de s'adapter aux variations des contraintes hydrodynamiques jusqu'à un certain seuil de rupture. Les contraintes de cisaillement à laquelle un biofilm est exposé au cours de sa formation affectent également sa morphologie et son comportement dynamique. Les biofilms cultivés sous cisaillement élevé sont plus fortement fixés au support et ont une matrice d'exopolysaccharides différente et plus résistante que ceux cultivés sous faible force de cisaillement (Stoodley P, et col. 2002 ; Simoes M, et col, 2005).

De plus, la densité du biofilm peut être influencée par les forces de cisaillements du fluide qui le traverse pendant sa croissance (Vieira M J, et col, 1993). Par exemple, les biofilms de *Pseudomonas* cultivés sous un flux laminaire forment un monticule hémisphérique, à partir de microcolonies isotropes à la surface (Stoodley P, et col, 2002). En présence d'un flux turbulent, les microcolonies sont allongées dans la direction de l'aval pour former des structures filamenteuses. Ces biofilms allongés sont fixés sur la lame de verre par

une tête en amont mais les queues peuvent osciller avec le flux. Ainsi, il est clair que les conditions hydrodynamiques influencent non seulement la structure des biofilms (Figure I.43), mais aussi leurs propriétés mécaniques, que ce soit au cours de leur formation ou ultérieurement tout au long de leur vie.

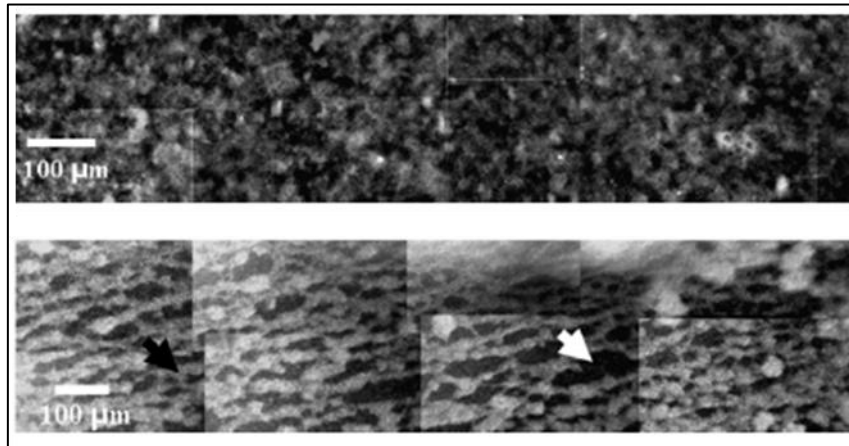


Figure I.43 : Biofilm de S. enterica formé sur des lames de verre en absence de force de flux, (image du haut), et sous un flux laminaire (image du bas). (D'après Mangalappalli-Illathu A K, et col, 2008)

But et objectifs de la thèse.

La composition et l'organisation de la matrice du biofilm restent encore mal connues à l'heure actuelle. Si chaque biofilm a sa propre composition en fonction des microorganismes présents mais aussi en fonction des propriétés de la phase aqueuse au contact de laquelle il se forme (température, forces de flux, concentration en nutriments), il semble que de grandes règles universelles régissent l'organisation, la structuration et les propriétés de la matrice d'un biofilm d'une manière générale. Ainsi, un biofilm est toujours un matériau viscoélastique constitué d'un réseau d'exopolymères de nature variable qui constitue le lieu de vie de communautés cellulaires elles aussi diverses. L'universalité des propriétés viscoélastiques des biofilms illustrée par l'universalité de leur temps de relaxation élastique ne doit pas faire oublier la diversité de leur viscosité, de leur élasticité et de leur morphologie. D'ailleurs, un biofilm est une structure dynamique en perpétuelle évolution en fonction de l'évolution de son environnement.

L'ensemble de l'étude bibliographique précédente nous a permis d'identifier différents polymères jouant un rôle dans la structuration d'un biofilm. Deux catégories d'exopolymères, les polysaccharides et les protéines, semblent avoir un rôle capital dans ce processus.

Parmi les exopolysaccharides, l'alginate et la cellulose constituent deux polymères modèles aux propriétés différentes ayant un rôle central dans la structuration et les propriétés mécaniques de biofilms d'espèces bactériennes variées. La possibilité de disposer de ces molécules à l'état pur et leurs propriétés de gélification *in vitro* permettent l'étude de leur organisation en réseau et de leurs propriétés mécaniques.

Parmi les protéines constitutives de la matrice des biofilms, les fibres amyloïdes de par leur caractère universel, doivent avoir un rôle majeur dans la formation et les propriétés de la structure biofilm, et notamment lors de différentes étapes de la constitution du biofilm. Leur rôle dans l'adhérence à la surface semble relativement bien établi. En revanche, leur apport dans les phases de maturation n'est pas encore connu. Ainsi, aucune propriété de gélification n'a été montrée pour des fibres amyloïdes impliquées dans ces biofilms. L'hypothèse émise au début de ces travaux de thèse est que les fibres amyloïdes seraient un élément important de la définition des propriétés mécaniques de la matrice des biofilms et donc de leur cohésion. Si les protéines amyloïdes bactériennes ne sont pas disponibles commercialement, la démonstration dans la littérature que des peptides synthétiques issus de ces protéines reproduisent leurs propriétés d'auto-assemblage (Cherny I, et col, 2005) nous a permis

d'envisager l'étude de leur organisation en réseau et de leurs propriétés mécaniques. Un outil bioinformatique nous a notamment permis d'identifier des peptides synthétiques issus de différentes protéines bactériennes présentes dans des biofilms potentiellement capables de former des fibres amyloïdes.

La matrice d'un biofilm est toujours constituée d'un mélange de polysaccharides et de protéines, la proportion relative de chacun de ces polymères étant dépendante de la charge en carbone et en azote de la phase aqueuse (Sponza D T, 2004). Par ailleurs, des travaux menés au sein du laboratoire ERRMECe ont montré que des alginates peuvent réaliser une transition sol/gel *in vitro* en présence d'un autre polymère de nature protéique comme la gélatine et de calcium (Doumèche B. et col, 2007).

Le but de cette étude est, à partir d'espèces bactériennes et d'exopolymères modèles en lien avec ces espèces, de produire *in vitro* des biofilms monomicrobiens et des matrices de biofilms artificielles simplifiées afin d'approfondir les connaissances du rôle de ces polymères dans la structuration en biofilm et leur contribution aux propriétés mécaniques du matériau biofilm.

Notre modèle est basé sur le choix de 3 souches d'espèces bactériennes différentes majeures pour l'étude des biofilms, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. epidermidis*, de deux polysaccharides en rapport avec deux de ces espèces, l'alginate et la cellulose, d'une protéine histone abondante dans l'ADNet de peptides issus de protéines entrant dans la constitution de biofilms par ces espèces, formant ou non des fibres amyloïdes. La combinaison de ces différents polymères nous permettra de construire des matrices modèles, dont l'analyse des propriétés aussi bien morphologiques, physico-chimiques, que mécaniques, nous permettra de comprendre le rôle de ces constituants au sein de biofilms.

La caractérisation des biofilms et des matrices reconstituées se fera grâce à des techniques basées sur des principes de biophysiques telles que la rhéologie ou la spectroscopie infrarouge mais aussi sur des techniques d'imageries telles que la microscopie en lumière polarisée, la microscopie à force atomique, la microscopie confocale à balayage laser afin de corréler les données de l'analyse mécanique, aux données issues de l'observation de structures particulières de matrices artificielles ou de biofilms de laboratoire.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Sommaire

Chapitre II : Matériel et méthodes.....	71
I) Formation et étude des fibres amyloïdes	73
I.1) Criblages des souches	73
I.2) Choix des peptides	74
I.3) Formation de fibres amyloïdes.	77
I.4) Test de fluorescence en présence de thioflavine T	77
I.5) Spectroscopie d'absorbance du rouge Congo	79
I.6) Spectroscopie infrarouge	80
I.7) Microscopie à force atomique.....	82
I.8) Microscopie à lumière polarisée.	83
I.9) Test d'adhérence des bactéries aux peptides immobilisés.	84
I.10) Détermination de la quantité d'ATP.	85
II) Biofilms modèles monomicrobiens.....	85
II.1) Conditions de culture.....	85
II.2) Cinétique de marquage.....	86
II.3) Marquage des Biofilms.....	86
II.4) Visualisation par microscopie confocale.....	87
II.5) Rhéologie des biofilms	88
III) Réalisation et caractérisation de matrices artificielles.	89
III.1) Matrices à base d'alginate	89
III.2) Matrices à base de méthyle-cellulose.....	90
III.3) Rhéologie des gels.....	90
III.4) Matrices à base de peptides amyloïdes.	92

I) Formation et étude des fibres amyloïdes

I.1) Criblages des souches

Afin de déterminer si certaines souches produisent des protéines de nature amyloïde, un criblage sur gélose Yesca est réalisé (composition dans le tableau I.1.1). Cette gélose est spécifique car elle contient du rouge Congo permettant d'obtenir des colonies rouges s'il y a production par la bactérie de protéines de type amyloïde.

Produits	Quantité pour 100 ml
Bacto-agar (Difco,USA)	2 g
Caséine (Difco,USA)	1 g
Extrait de levure (Difco,USA)	0,1 g
Rouge Congo (Sigma,France)	2 mg
Bleue de Coomassie (Biorad, France)	1 mg
Eau 18 MΩ	100 ml

Tableau II.1 : Composition des géloses Yesca.

Les géloses sont ensemencées avec les différentes souches par stries et incubées pendant 24h à 26°C.

Les souches testées lors de cette étude proviennent de différentes sources répertoriées dans le tableau II.2.

Espèces		Dénomination	remarques	référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souches laboratoires	PAO1 CIP 104 116	Souche de plaie infectée	Stanier RY et col 1966
		PA NK 125502	Souche de patient atteint de mucoviscidose	Gagnière H et col, 2004
		<i>PAK et PAK NIG</i>		Chi et col. 1991
	Souches hospitalières	PA 61964 à PA 99833	Hôpital d'Orléans	Di Martino P, et col 2002
<i>Pseudomonas fluorescences</i>	Souches hospitalières	PF 74508	Isolat clinique	Di Martino P, 2001
	Souches laboratoires	PF CIP 6913	Filtre d'eau potable	Hugh R, et col 1964
		WCS 53 65 ZK 8334	Souche utilisée comme agent de biocontrôle	Geels et col. 1983
	Souches environnementales	SMD 31 et FFD16	Issue de la rhizosphère	Cossard E et col 2005
		MF0	Issue d'un lait cru contaminé	Di Martino P. et col, 2000

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souches hospitalières			
	Souches hospitalières de référence	IA 565		Gerlach, G F, et col 1988
<i>Klebsiella ocytocae</i>	Souches hospitalières	KO	Hôpital d'Orléans	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Souches laboratoires	CIP 6.509	Institut Pasteur	
	Souches laboratoires	CIP 53.124	Institut Pasteur	
<i>Salmonella enterica</i>	Souches laboratoires	CIP 58.58	Institut Pasteur	Skermann V B D, et col 1980
<i>Escherichia coli</i>		K12		
		XL1-blue		
	Souches laboratoires	(HFR) CIP 1041030	Institut Pasteur	Hegeman GD et col 1970
	Souches laboratoires	PHL804 et PHI Kan ^r	<i>E. coli</i> K12 délété du gène <i>csgA</i>	Dorel C. et col. 1999
		MG 1655		
	Souches laboratoires	3714 et 3714 PMD6	Souches recombinantes Indole – et indole+	Di Martino P et col 2002
	Souches laboratoires	3720 et 3720 PMD6	Souches recombinantes indole+	Di Martino P et col 2002
	Souches laboratoires	JM109		
	Souches laboratoires	CIP 52.167	Institut Pasteur	Orskov F, 1951
	Souches laboratoires	CIP 52.172	Institut Pasteur	Orskov F, 1951
	Souches hospitalières	K1 S0 à S83	CHR Pontoise	
	Souches hospitalières	EC XX	Infections urinaires CHU Garches	

Tableau II.2 : Souches utilisées pour le test phénotypique sur gélose YESCA.

I.2) Choix des peptides

Afin d'étudier la formation de fibres amyloïdes chez *E. coli*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa*, les protéines CsgA, Bap et FapC exprimées respectivement par chacune de ces espèces bactériennes ont été choisies. En effet, ces protéines sont décrites comme formant des fibres amyloïdes (Cherny I, et col 2005 ; Dueholm M S, et col, 2010) (et voir chapitre 1). Ne pouvant travailler avec les protéines entières, nous avons choisi de travailler avec des peptides

synthétiques correspondant à une partie de la séquence de ces protéines qui pourrait être importante pour la formation de fibres. Ces fragments de séquences des protéines CsgA, Bap et FapC ont été choisis grâce au le logiciel de prédiction d'agrégation de protéines et de formation de fibres amyloïdes nommé TANGO (Fernandez-Escamilla et col, 2004, Linding R et col, 2004, Rousseau F et col, 2006). Ce logiciel calcule pour une séquence protéique un score de prédiction de formation d'agrégats riches en feuillets β en fonction de :

- différents paramètres de la séquence protéique (présence de charges électrostatiques, de résidus hydrophiles ou hydrophobes, de cycles aromatiques, de sites de méthylation).
- la nature du solvant (présences d'ions et leur molarité, pH de la solution) pour cette étude pH 7,4 et 200 mM de sel.

Le score TANGO ainsi obtenu est le reflet de la probabilité de s'agréger et de former des fibres dans les conditions demandées. Le seuil de probabilité au delà duquel le peptide choisi a de fortes chances de former des fibres de nature amyloïde est de 5%, soit un score TANGO de 0.5.

Les séquences des protéines CsgA, FapC, et Bap sont issues des bases de données GenBank et Swiss-Prot. Leurs codes d'accèsion sont :

CsgA (*E coli*): UniProtKB/Swiss-Prot: P28307.3 (Olsen A, et col, 1993)

Bap (*S. epidermidis*): GenBank: AAY28519.1, (Tormo M A et col, 2005)

FapC (*P. aeruginosa*): GenBank: ACOQ01000001.1 (Dueholm M S et col, 2010)

Le logiciel TANGO est conçu pour pouvoir accepter des séquences de 500 acides aminés maximum. Les protéines CsgA et FapC possédant 143 et 250 acides aminés respectivement, nous avons pu procéder à leur analyse complète, sans fragmentation de leur séquence dans le logiciel. Leurs sous unités connues ont aussi été analysées séparément, ces séquences étant assimilées comme celles responsables de la formation de fibres. La protéine Bap étant plus longue, avec 2276 acides aminés, son analyse a nécessité un découpage de sa séquence en fragments de 500 acides aminés, puis une analyse tous les 60 acides aminées afin d'obtenir un score TANGO pour chacune des séquences de recoupement. Ce découpage permet d'obtenir une cartographie précise du score TANGO de la protéine. Cinq peptides différents ont ainsi été identifiés et utilisés dans ce travail (Tableau II.3) :

-Trois peptides sont issus de CsgA :

- R5 (Cherny I, et col 2005), issu de la sous unité R5 complète de CsgA (SSVNVTQVGFGNNATAHQY)
- R5T qui est la sous unité R5 tronquée (SVNVTQVGFG)
- Q (Cherny I, et col 2005) qui est une partie de la sous unité R4 (QFGGGN),

-Un peptide provient de FapC : R2T (NNLAIVTA).

-Le dernier est issu de Bap : R13T (STVTVTF),

Nom du peptide	Espèce bactérienne correspondante	Nom de la protéine d'origine	Position dans la séquence dans la protéine et séquence du peptide	Score TANGO
R5	<i>E. coli</i>	CsgA	133-151 SSVNVTQVGFGNNATAHQY	1,56
R5T	<i>E. coli</i>	CsgA	134-143 SVNVTQVGFG	11,36
Q	<i>E. coli</i>	CsgA	117-122 QFGGGN	0
R2T	<i>P. aeruginosa</i>	FapC	157-164 NNLAIVTA	316,31
R13T	<i>S. epidermidis</i>	Bap	879-884 STVTVTF	77,77

Tableau II.3 : Liste des peptides utilisés : place dans la protéine, séquence et score TANGO.

Ces cinq peptides ont été produits par la société PROTEOGENIX (Proteogenix SAS, France). Les peptides sont reçus avec un degré de pureté supérieur à 95% et sous forme de lyophilisats.

I.3) Formation de fibres amyloïdes.

La formation des fibres a été réalisée comme suit :

Les peptides lyophilisés sont réhydratés avec 500 μl d'eau distillée 18m Ω pour une concentration finale d' 1 mM. 100 μl de solution de peptide sont alors incubés dans différents milieux : dans l'eau 18m Ω , dans du tampon Tris/HCl 200 mM à pH 7,4 (Fisher scientific, USA), dans du tampon acétate 200 mM à pH 4 (Fisher scientific, USA), dans du tampon acétate 200 mM à pH 6 (Fisher scientific, USA), et dans du tampon carbonate à 200 mM et pH 9 pour une concentration finale de 100 μM (Fisher scientific, USA). Le pH des solutions est ensuite vérifié et les mélanges sont ensuite incubés de 30 minutes, 3 heures et 3 jours à température ambiante et sous agitation à 240 rotations par minutes (rpm) sur un agitateur orbital KS130 (IKA, Allemagne). Puis les échantillons sont analysés par les méthodes suivantes.

I.4) Test de fluorescence en présence de thioflavine T

La thioflavine T est un cation benzothiazole qui est une molécule amphiphile. Sa structure est formée d'une partie hydrophobe : un groupement diméthylamine substitué par un phényl et une partie polaire : un noyau benzothiazole chargé (Figure II.4).

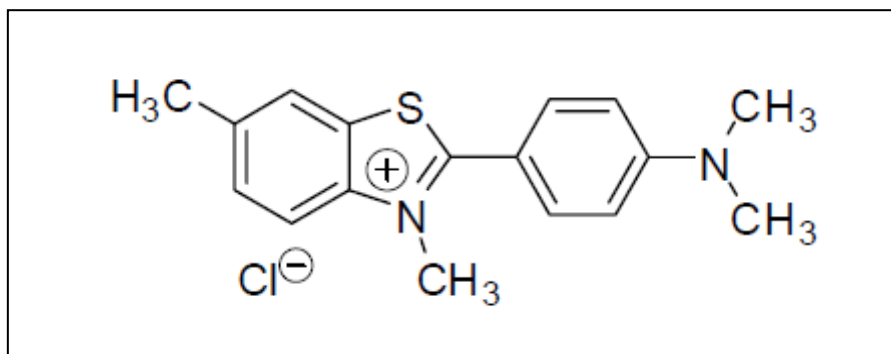


Figure II.4 : Structure de la thioflavine T (THT)

La thioflavine T en solution émet de la fluorescence. La fluorescence est un phénomène d'état d'excitation des molécules et de variation de niveaux d'énergie. Une molécule fluorescente est une molécule capable d'absorber l'énergie d'un faisceau lumineux qu'elle reçoit à une longueur d'onde précise, ce qui va créer un état électronique excité appelé S1. Afin de revenir

à un niveau d'énergie plus stable/basal S0, la molécule doit perdre ce surplus d'énergie. Pour cela, elle émet un photon qui est de plus faible énergie que celui reçu. Ce décalage est le phénomène appelé relaxation vibrationnelle. L'énergie incorporée dans les changements d'état vibrationnel ne peut être restituée. La longueur d'onde de la lumière fluorescente émise sera donc plus élevée (Figure II.5).

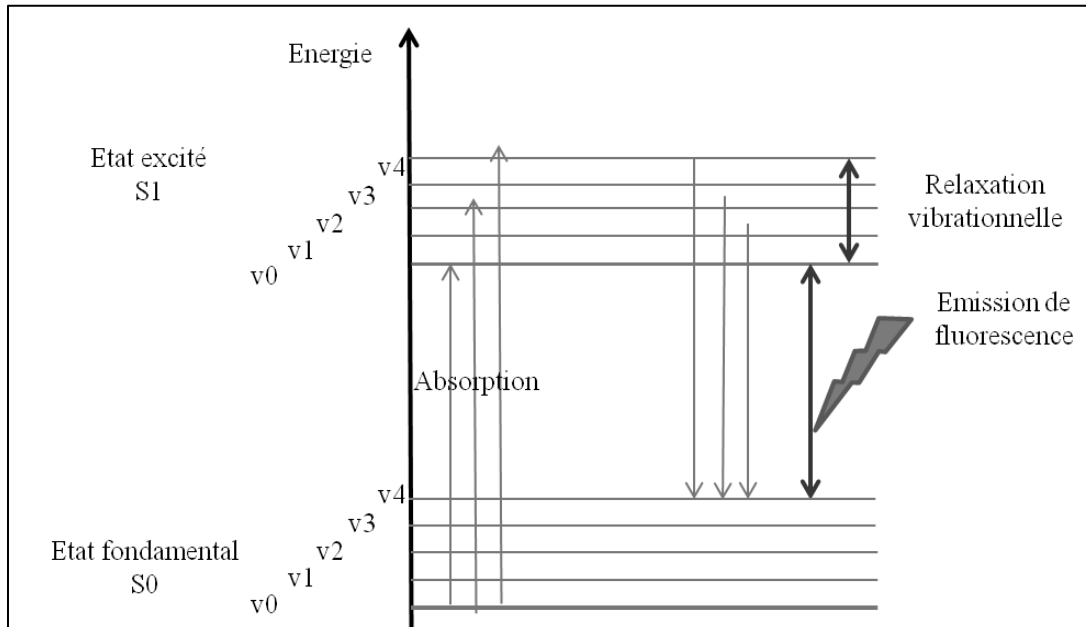


Figure II.5 : Principe de l'émission de fluorescence (Diagramme de Jablonski).

La thioflavine T se fixe aux fibres de nature amyloïde (LeVine H, 1999). En présence de celles-ci, l'émission de fluorescence de la THT est multipliée de 5 à 50 fois avec un maximum d'émission de fluorescence à 482 nm après excitation à 450 nm. (Figure II.6).

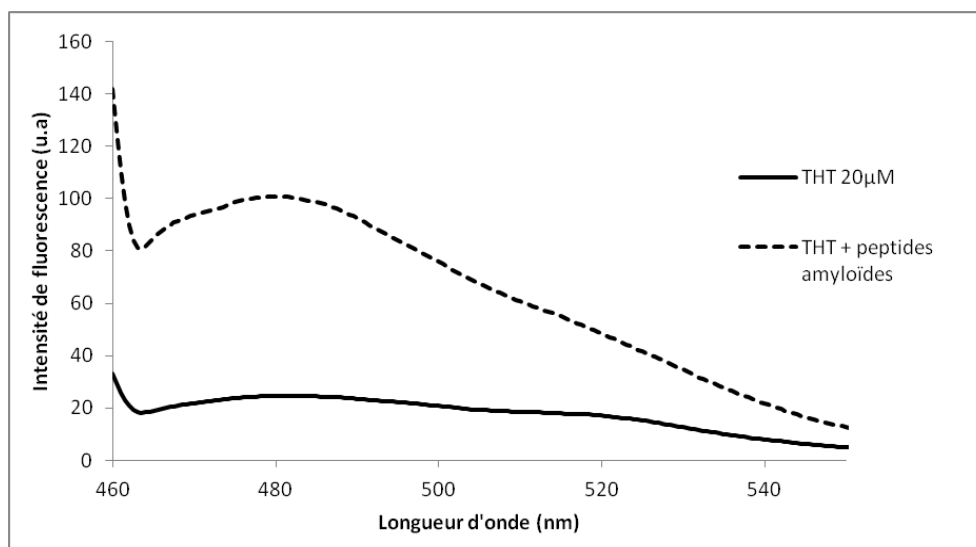


Figure II.6 : Spectres d'émission de fluorescence de 20 µM de thioflavine T (THT), après excitation à 450 nm en présence ou non de peptides amyloïdes.

On peut donc suivre la formation de fibres amyloïdes par une protéine en mesurant la fluorescence à 482 nm émise par la thioflavine T en présence de ces fibres.

Pour nos expériences, 20 μM de solution de peptide sont mélangés avec une solution de thioflavine T (Sigma-Aldrich, France) à une concentration de 20 μM en tampon Tris/HCl 200 mM à pH 7,4 (Fisher scientific, USA), dans un volume final de 1 ml après 30 minutes, 3 heures ou 3 jours d'incubation sous agitation. L'émission de fluorescence de la thioflavine T à 482 nm est mesurée après excitation à 450 nm grâce à un spectrofluorimètre LS 50B (Perking-Elmer, USA). Le trajet optique est de 1 cm et 3 spectres sont accumulés à chaque expérience.

I.5) Spectroscopie d'absorbance du rouge Congo

Le rouge Congo est une molécule composée de deux azobenzènes (Figure II.7). Cette molécule amphiphile a la capacité de se fixer aux fibres amyloïdes (Klunk W E, et col, 1999).

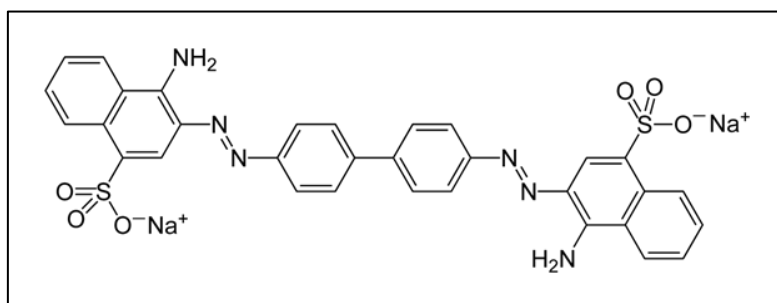


Figure II.7 : Structure chimique du rouge Congo.

Le rouge Congo en solution a un spectre d'absorbance avec un maximum à 490 nm (Figure II.8). En présence de fibres de nature amyloïde, celui-ci se fixe sur le peptide et on observe un décalage de l'absorbance pour un maximum aux alentours de 540 nm.

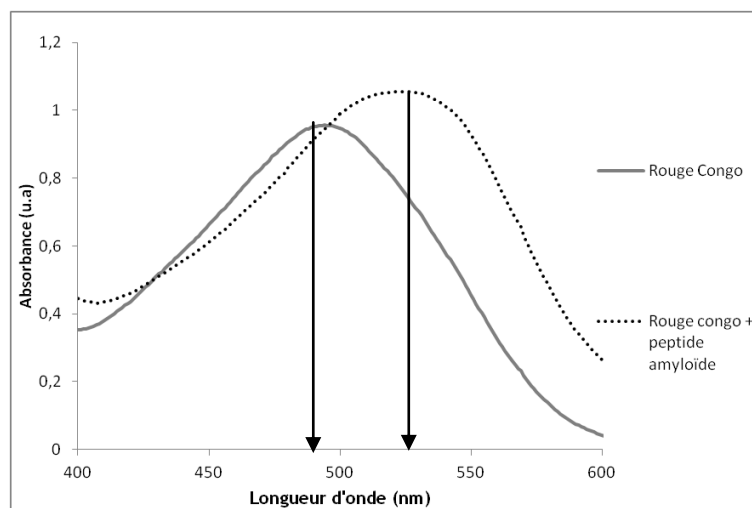


Figure II.8 : Spectre d'absorption du rouge Congo à 100 μM , en présence ou non de peptide amyloïde.

Les peptides Q, R5, R5T, R2T et R13T, ont été testés par cette technique. 100 μM des différents peptides incubés pendant trois jours dans les différents tampons ont été ajoutés à 100 μM de rouge Congo (Sigma-Aldrich, France), pour un volume final de 1 ml en tampon tris 200mM pH 7,4. Après incubation pendant 2 heures, le spectre d'absorption de chaque solution a été mesuré dans une cuve en Quartz (trajet optique d'un centimètre) à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon Xs Secoman (Bioserve, France).

I.6) Spectroscopie infrarouge

Toute liaison chimique vibre lorsqu'elle reçoit une source d'énergie telle qu'un rayonnement infrarouge. De plus, chaque liaison chimique vibre à un nombre d'onde qui lui est propre. Pour vibrer, la liaison va absorber une partie de l'énergie contenue dans le rayonnement. Celui-ci va donc perdre en intensité après avoir percuté la liaison chimique. C'est sur ce principe que se base la spectroscopie infrarouge. Un rayonnement infrarouge est envoyé à différents nombres d'onde sur l'échantillon et le signal ayant traversé l'échantillon est mesuré. Une baisse de l'intensité du rayonnement est synonyme de vibration d'une ou de plusieurs liaisons chimiques. Il existe plusieurs modes vibrationnels selon si ces vibrations sont dues à des élongations, et des déformations dans le plan et hors du plan (Figure II.9).

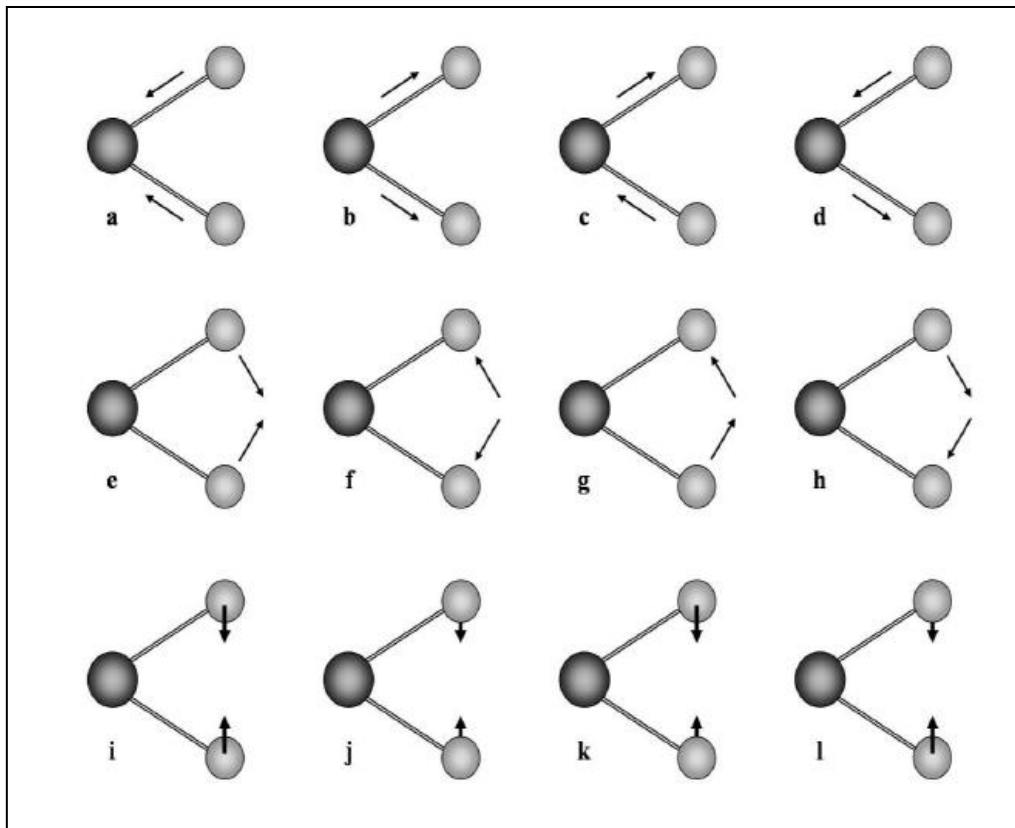


Figure II.9 : Types de vibration des molécules soumises à un rayonnement infrarouge : élongation symétrique (a, b), asymétrique (c, d), déformation dans le plan : symétriques (e, f) et asymétriques (g, h), et enfin déformation hors du plan, symétriques (i, j) et asymétriques (k, l).

La partie du spectre infrarouge des molécules nous intéressant le plus correspond aux nombres d'onde compris entre 1600 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} . Cette partie du spectre, appelée la bande amide I, correspond aux vibrations (d'élongation) des liaisons C=O de la chaîne principale des protéines. Ces liaisons étant impliquées dans les liaisons hydrogène stabilisant les structures secondaires des protéines, la correspondance entre la fréquence ou nombre d'onde de la bande amide I et les différents éléments de structure secondaire a pu être établie et cette méthode va nous permettre d'analyser le contenu en structure secondaire des protéines (Byler D M, et col, 1986).

Les peptides lyophilisés R5, R5T, Q, R13T, et R2T sont dissouts dans 1 ml d'oxyde de deutérium (D_2O) (Eurisotop, France) à une concentration 20 et de 40 mg/ml et incubés 3 jours à température ambiante. Le D_2O permet de diminuer le bruit de fond sur les spectres. En effet,

celui-ci absorbe moins le rayonnement infrarouge aux alentours de la bande amide I que l'eau H₂O (Venyaminos S Y, et col, 1997).

15 µl de solution de peptide sont ensuite déposés entre deux fenêtres de CaF₂ et les spectres infrarouges sont obtenus avec un spectromètre infrarouge FTIR Jasco 6100 (Jasco, Japon), sur une gamme de longueur d'onde de 7000 à 800 cm⁻¹. Le nombre de spectres accumulés est de 512, et le trajet optique est de 100 µm. Les spectres sont ensuite analysés grâce au logiciel Curve Fitting (Jasco, Japon).

I.7) Microscopie à force atomique.

Un microscope à force atomique a été utilisé en mode tapping. Celui-ci est principalement utilisé pour analyser les surfaces de matériaux. Il fait partie des microscopes à sonde locale, c'est-à-dire que l'échantillon est imagé point par point. Une pointe très fine est située au bout d'un levier. Si la pointe s'approche de la surface, une interaction peut se créer entre celle-ci et la surface. Cette interaction va courber le levier. C'est cette courbure, dépendante de l'interaction, qui est mesurée grâce à un laser et un photo-détecteur (Figure II.10). Cette mesure est réalisée par déplacement de la pointe en tout point de l'échantillon. On obtient alors une image de la topographie de la surface.

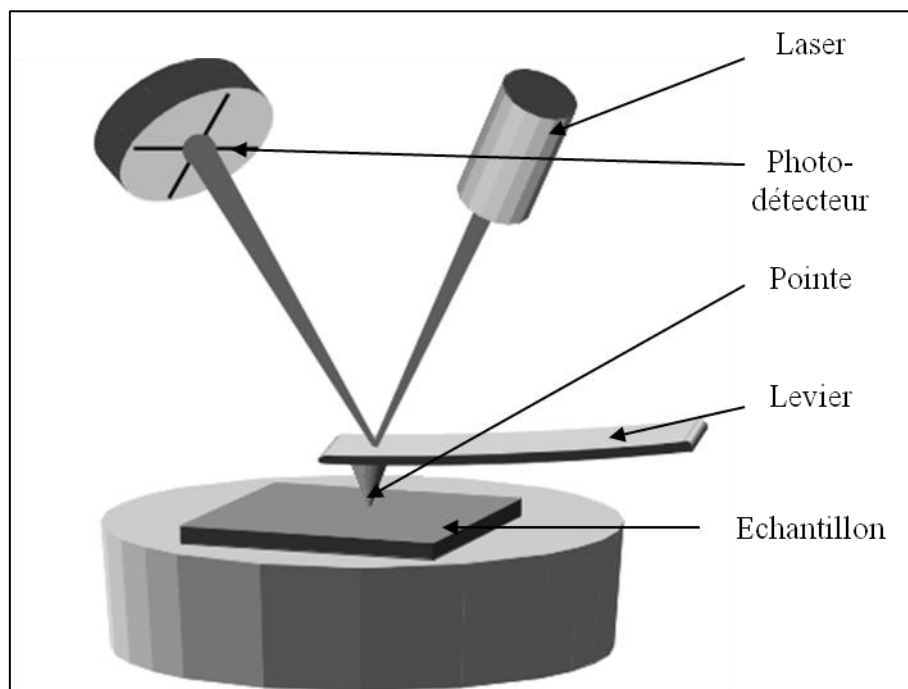


Figure II.10 : Schéma des principaux composants d'un microscope à force atomique.

Les fibres amyloïdes sont analysées après dépôt de solutions de peptides à la surface de lames de verre. Dans un premier temps, les lames de verre sont nettoyées par immersion dans de l'eau 18mΩ et incubées 10 minutes dans un bain de sonication Branson (Branson, USA). L'eau est retirée, renouvelée et l'étape est répétée 2 fois. Les lames sont séchées et préservées de la poussière.

Les peptides incubés 3 jours dans de l'eau 18mΩ, sous agitation à 240 RPM et sont dilués dans de l'eau 18mΩ au 1/100^{ème} pour une concentration finale de 10 μM. Puis 10μl sont déposés et étalés sur les lames de verre nettoyées. Les images sont obtenues grâce à un microscope atomique Dimension 3100 (Digital instrument, Veeco, USA) en mode tapping, et analysées grâce au logiciel ImageJ développé par le NIH (Schneider C A, et col, 2012).

I.8) Microscopie à lumière polarisée.

Le rouge Congo possède des propriétés optiques particulières en présence de fibres amyloïdes. Celui-ci se fixe sur les fibres et devient alors biréfringent. La biréfringence est due à un changement de milieu dans lequel passe le faisceau de lumière. Dans ce cas ici, c'est la présence de fibres fixées au rouge Congo qui entraîne une anisotropie du milieu, et conduit à la biréfringence du rouge Congo. Il devient alors vert brillant lorsqu'il est éclairé par une lumière polarisée.

Un microscope à lumière polarisée a été utilisé pour imager la présence de fibres de type amyloïde. Pour cela, 150 μL des différents peptides (R5, R5T, Q, R2T et R13T) ont été déposés sur une lame de verre. Puis 150 μL de rouge Congo à une concentration de 100μM sont ajoutés et les lames sont mises à sécher. Les échantillons sont ensuite observés sur un microscope à lumière polarisée Olympus BX60 (Olympus, Japon).

Afin d'améliorer la qualité des images obtenues, les mêmes échantillons ont été observés avec un microscope confocal en mode lumière polarisée. Les lames sont placées sous un microscope confocal LSM710 (Carl Zeiss, Allemagne). Les échantillons sont excités avec 3 raies lasers différentes, à 488 nm, à 581 nm, et 633 nm. Les observations sont faites à l'objectif X20 et la lumière transmise à travers l'échantillon est collectée par un photomultiplicateur. Une image avec chacun des lasers est ainsi obtenue. Ces images

obtenues dans les canaux bleu, rouge et vert, reflètent la capacité de l'échantillon à absorber ou dévier les longueurs d'ondes de ces couleurs. En fusionnant ces images avec le logiciel ImageJ (Schneider C A, et col, 2012), on peut reconstituer une image en couleur fidèle à ce qui est observé à l'oculaire.

I.9) Test d'adhérence des bactéries aux peptides immobilisés.

Trois souches bactériennes ont été utilisées pour les tests d'adhérence. La souche *P. aeruginosa* NK 125502, est une souche mucoïde isolée d'un patient atteint de mucoviscidose (Di Martino P, et col, 2000). Les souches *Staphylococcus epidermidis* CIP 53.124, et *Salmonella enterica* CIP 58.58 proviennent de la collection de l'institut Pasteur (institut Pasteur, Paris, France).

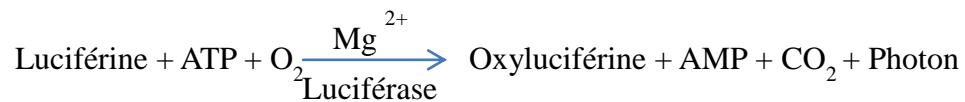
Une pré-culture de nuit des différentes souches est réalisée à 26°C en bouillon Trypticase soja (TS) (Difco, USA). La densité optique à 600 nm (DO_{600}) est alors mesurée par un spectrophotomètre Genesys 20 (Thermospectronic, USA), puis la pré-culture est diluée avec du bouillon TS pour l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,01.

50µL des solutions de peptides à différentes concentrations de 0 mM à 1 mM sont déposés dans des puits d'une plaque 96 puits (Corning, USA). Le liquide est évaporé en condition stérile et les plaques sont stockées à 4°C.

200 µl de suspension bactérienne calibrée sont déposés dans chaque puits contenant les peptides immobilisés. Les plaques sont alors incubées 3 heures à 26°C afin de permettre l'adhérence bactérienne. Après cette incubation, les puits sont vidés et rincés 2 fois avec de l'eau physiologique stérile (NaCl 9 ‰) (Fisher scientific, USA). Après rinçage, les plaques remplies d'eau physiologique (100 µL par puits) sont placées en bain de sonication pendant 10 minutes à une fréquence de 20 kHz et dans la glace (Branson, UK). Après cette première étape, le contenu de chaque puits est recueilli, et un deuxième cycle de 10 minutes de sonication est réalisé après nouvel ajout de 100µl d'eau physiologique stérile. Les lysats issus des deux étapes successives de sonication sont rassemblés pour chaque puits et conservés à -20°C jusqu'au dosage de l'ATP.

I.10) Détermination de la quantité d'ATP.

L'adhérence bactérienne est déterminée par mesure de l'ATP dans les lysats cellulaires grâce à un kit commercial (ATP determination KIT, Invitrogen, USA). La réaction se base sur la production de lumière par oxydation de la luciférine par la luciférase :



La quantité de photons émise est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans le milieu réactionnel.

30 µl de lysat cellulaire sont ajoutés à 270 µl de solution de réaction. La lumière émise par la réaction d'hydrolyse de l'ATP est mesurée par un luminomètre Sirius (Berthold, France). La quantité d'ATP présente dans le milieu est déterminée grâce à une gamme étalon de quantité d'ATP connue (0,03 à 30 pmoles).

II) Biofilms modèles monomicrobiens.

II.1) Conditions de culture

Les trois souches *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 sont ensemencées pour la nuit dans du bouillon TS et incubées à 26°C. Après au minimum 15 heures de culture, la DO_{600nm} des différentes pré-cultures est mesurée, et celles-ci sont diluées pour l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,01. Dans des plaques 24 puits (Corning, USA), sont déposées des lamelles de verre stériles de diamètre 12 mm puis 2 ml de suspension bactérienne calibrée. Les plaques sont alors incubées à 26°C. Après trois heures d'adhérence, les puits sont vidés et rincés deux fois avec de l'eau physiologique stérile (NaCl 9 ‰). Puis 2 ml de bouillon TS sont ajoutés et les plaques sont à nouveau incubées à 26°C pour une durée de 24 heures, 48 heures ou 10 jours, avec un renouvellement de milieu de culture toutes les 12 heures.

II.2) Cinétique de marquage.

Plusieurs temps de croissances intermédiaires ont été visualisés. Une cinétique de marquage des biofilms a été réalisée pour les temps courts de croissance. Lors de ces cinétiques, un marquage du biofilm a été réalisé toute les 3 heures de 3 heures à 12 heures, et aux temps 24 heures, 30 heures, 36 heures et 48 heures. Les biofilms des trois souches bactériennes ont ainsi été suivis. Les marquages ont été effectués comme décrit dans le paragraphe suivant.

Les images ont été obtenues grâce à un microscope à épifluorescence droit Leica DMBL (Leica, Autriche).

II.3) Marquage des Biofilms

Pour visualiser la matrice et les cellules des biofilms modèles monomicrobiens, plusieurs sondes fluorescentes différentes ont été utilisées : un marqueur de l'ADN double brin : le Diamino-4,6-phénylindol-2 dichlorhydrate (DAPI) (Clinisciences, France); un marqueur protéique : le Sypro Ruby (Invitrogen, France); et des marqueurs de polysaccharides : des lectines couplées à la TetramethylRhodamineIsoThioCyanate (TRITC) (Clinisciences, France), ou à l'IsoThioCyanate de Fluoresceine (FITC) (Clinisciences, France). Le tableau II.11 montre les différentes lectines utilisées ainsi que les motifs sucrés spécifiquement reconnus.

Lectines	Fluorochrome conjugué	Motifs marqués
Peanut agglutinin (PNA), <i>Arachis hypogaea</i> (AH)	TRITC	N-acétyl- β -galactosamine
<i>Bandeiraea simplicifolia</i> (BS)	TRITC	β -galactose et N-acétyl- β -galactosamine
Concanavaline A	FITC	α -D-mannose et

(CA)		α -D-glucose
<i>Ulex europaeus</i> (UE)	TRITC	β -L fucose
<i>Lycopersicon esculentum</i> (LE)	FITC	N-acétyl-glucosamine

Tableau II.11 : Spécificités et fluorochromes des lectines utilisées.

Les lamelles de verre portant les biofilms sont prélevées afin de réaliser un marquage du biofilm à leur surface. Les biofilms sont marqués selon une adaptation du protocole décrit par Doumèche et col. (Doumèche et col. 2007a). Les lamelles sont alors lavées 2 fois délicatement avec de l'eau physiologique stérile. Ensuite le biofilm est fixé grâce à une solution de paraformaldéhyde (PFA) 3% (Sigma-Aldrich, France) pendant 12 heures en chambre humide. Après l'incubation avec le PFA, les lamelles sont lavées deux fois avec de l'eau 18M Ω puis incubées 20 minutes en chambre noire à température ambiante avec 100 μ l de Sypro Ruby. Après deux lavages avec de l'eau distillée stérile, les lamelles sont incubées 20 minutes dans les mêmes conditions dans une solution de DAPI à une concentration de 0,1 μ g/ml. Puis suite à deux rinçages avec de l'eau distillée stérile, une solution de lectine (Tableau II.11) à une concentration de 100 μ g/ml est ajoutée et laissée incuber 20 minutes. Après ces marquages, les lamelles sont rincées une dernière fois en eau distillée stérile, et sont montées sur des lames de verre grâce à du Mowiol (Fisher scientific, USA). Les triplets de marqueurs utilisés sont :

- Soit le DAPI, avec le SYPRO Ruby, et une lectine couplée à la FITC
- Soit le DAPI, avec deux lectines, une couplée à la FITC, l'autre à la TRITC.

II.4) Visualisation par microscopie confocale.

Après marquage, les images sont obtenues avec un microscope confocal LSM710 (Carl Zeiss, Allemagne). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents fluorophores sont répertoriées dans le tableau II.12.

Fluorochrome	Longueur d'onde maximale d'excitation (nm)	Longueur d'onde minimale d'émission (nm)
DAPI	362	461
TRITC	552	578
FITC	495	520
Sypro Ruby	410	610

Tableau II.12 : Marqueurs utilisés pour la caractérisation de biofilm en microscopie.

Les lasers utilisés sont produits par une lampe argon pour l'excitation du DAPI (émission à 405 nm), et trois diodes émettant à 488 nm, 561 nm et 633 nm pour le FITC, le TRITC et le Sypro ruby. Les fenêtres d'acquisition de la lumière émise sont réglées selon les spectres d'émission des différents fluorochromes obtenus en mode spectral du microscope. Aussi pour le DAPI, la fenêtre se situe entre 410 et 480 nm, pour la FITC, elle se situe entre 494 et 550 nm, pour le Sypro ruby entre 600-735 nm. La vitesse d'acquisition est 25,2 μ s/pixel, et la taille de l'image est de 512X512 pixels. Les images sont ensuite transférées sur ImageJ pour le traitement des données.

II.5) Rhéologie des biofilms

Des biofilms monomicrobiens sont analysés en rhéologie avec un rhéomètre cône/plateau de type MCR 301 (Anton Paar, Autriche). Pour cela, des biofilms de 10 jours (voir II.1) sont formés dans des nacelles adaptables sur le rhéomètre. Le diamètre du cône est de 25 mm. Un test de Creep est alors réalisé. Il est composé de deux étapes. Au cours de la première, une contrainte de 0,5 Pa à une fréquence de 1 Hz est appliquée sur l'échantillon pendant 1000 secondes. On observe alors la déformation du biofilm. Ensuite, lors de la deuxième étape qui dure également 1000 secondes, la contrainte est relâchée, et on obtient alors la courbe de relaxation du biofilm. Un modèle de courbe de creep classique est présenté en figure II.13.

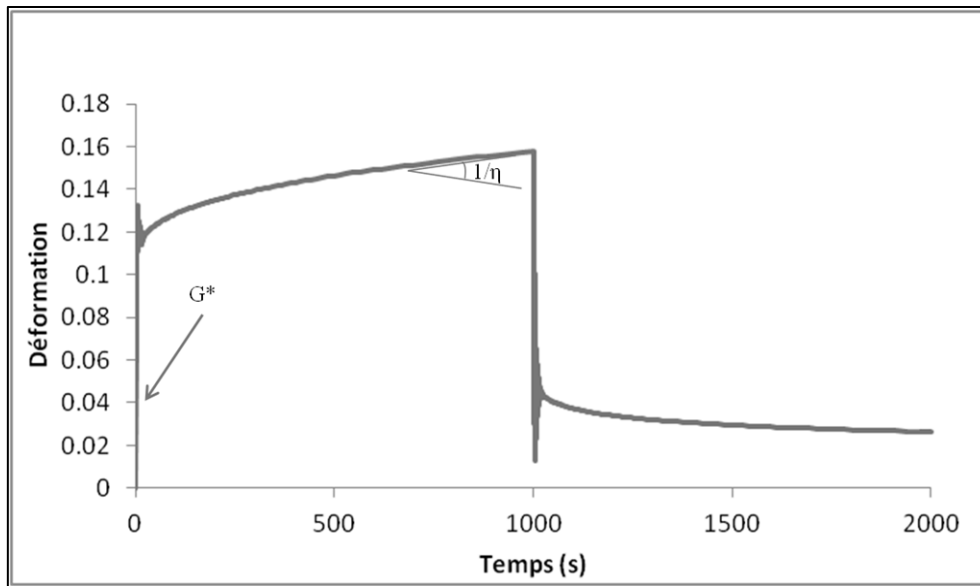


Figure II.13 : Courbe de creep standard d'un matériau viscoélastique.

A partir de ces courbes de rhéologie, plusieurs paramètres peuvent être extraits :

- Le module complexe G^* qui est l'inverse de la compliance au début de l'expérience.
- La viscosité η qui est l'inverse du coefficient directeur de la pente de la déformation en fin de test de contrainte.

III) Réalisation et caractérisation de matrices artificielles.

Afin d'étudier le rôle des différents constituants de la matrice des biofilms, plusieurs types de matrices synthétiques ont été réalisées. Des matrices sont composées d'un polysaccharide capable de gélifier (l'alginate ou la méthyle-cellulose) et de différentes protéines (fibres amyloïdes ou histones). Des matrices entièrement protéiques à base de peptides amyloïdes ont aussi été étudiées pour les peptides capables de gélifier seuls en solution.

III.1) Matrices à base d'alginate

Un des types de matrice étudié est à base d'alginate. Comme nous l'avons vu lors de l'introduction bibliographique, l'alginate peut former un gel dans certaines conditions.

Ici, l'alginate gélifie suivant le protocole mis au point par Doumèche et col en 2007 (Doumèche B, et col, 2007b). Dans un premier temps, une solution de 200 mM de glycine (Fischer, USA), 80 mM de chlorure de calcium CaCl_2 (Riedel de Haen, Allemagne) et 70 mM de sel d'acide éthylène diamine tétraacétique-tetra-sodium (Na_4EDTA , Accros organics, France) est réalisée et ajustée à pH 9 avec une pastille de soude (NaOH, Fischer, USA). Puis sont ajoutées différentes concentrations d'alginate de haute viscosité (Sigma-Aldrich, France) allant de 0,1% à 4% en masse/volume finale et enfin 210 mM de δ -gluconolactone (Fluka, France). A pH basique, la lactone n'est pas stable. Elle s'hydrolyse en acide gluconique acidifiant le milieu. Cette acidification permet la relargage du calcium chélaté par l'EDTA, qui est remplacé par les protons. Le calcium permet ensuite la gélification de l'alginate (voir partie III.1.1 de l'introduction bibliographique).

L'ajout de protéine dans le milieu est réalisé avant l'étape d'ajout de la lactone. Plusieurs types de protéines ont été testées : des histones de thymus de veau (Sigma-aldrich, France), et les peptides R2T, R13T, et Q (voir paragraphe I.2).

Les solutions sont coulées avant gélification dans des moules adaptables pour rhéomètre.

III.2) Matrices à base de méthyle-cellulose.

Un deuxième type de matrice à base d'un autre polysaccharide, la méthyle-cellulose (M-cellulose) a été étudié. La méthyle-cellulose a été utilisée car celle-ci contrairement à la cellulose est soluble dans les solutions aqueuses.

La première étape pour la formation de gel est la préparation de solutions de méthyle-cellulose de 0,5% à 4% m/v (Sigma-Aldrich, France) dans du tampon Tris/HCl à 200 mM (Fisher, USA) à pH 7,4. Puis les peptides R5, R5T, Q ou R13T sont ajoutés aux mélanges à une concentration de 0,5% (m/v). Les solutions sont ensuite coulées dans des moules pour l'analyse en rhéologie.

III.3) Rhéologie des gels.

La rhéologie est l'étude de la déformation des matériaux et des fluides sous une contrainte. Les études en rhéologie permettent de déterminer différents paramètres de résistance et d'écoulement d'un fluide ou d'un matériau. Les paramètres régulièrement étudiés sont les modules de perte ou visqueux (G'') et de conservation ou élastique (G'). Une déformation mettant en jeu un module visqueux peut être approximée à la déformation d'un piston sous l'effet d'une contrainte, l'énergie est diffusée lentement au sein du liquide du piston induisant une déformation irréversible. Une déformation de type élastique est celle d'un ressort. Celui-ci se déforme immédiatement sous la contrainte, puis si celle-ci n'est pas trop forte à son arrêt restituer l'énergie emmagasinée en reprenant sa forme initiale. Les gels ont par définition un comportement viscoélastique, c'est-à-dire qu'ils ont les deux types de réponse à une contrainte, la première immédiate : la déformation élastique, la deuxième plus lente : la déformation visqueuse.

Deux types d'analyse en rhéologie sont effectués sur les matrices artificielles sur un rhéomètre MCR 301 (Anton Paar, Autriche).

La première analyse est un test de gélification en mode oscillatoire. Le support dans lequel est placée la matrice sert de plan. Un cône de 25 mm est utilisé pour obtenir les valeurs rhéologiques. En mode oscillatoire, une déformation est appliquée sur l'échantillon en cours de gélification de manière sinusoïdale. Celle-ci est imposée à 1%, c'est-à-dire que le rhéomètre imposera une déformation d'1% de l'échantillon et celle-ci à une fréquence de 1 Hz. Les modules de conservation (G') et de perte (G'') peuvent alors être mesurés en fonction de deux paramètres : le temps et la température. Une courbe classique de gélification en fonction du temps à température constante est présentée en figure II.14 et fonction d'une rampe de température en figure II.15.

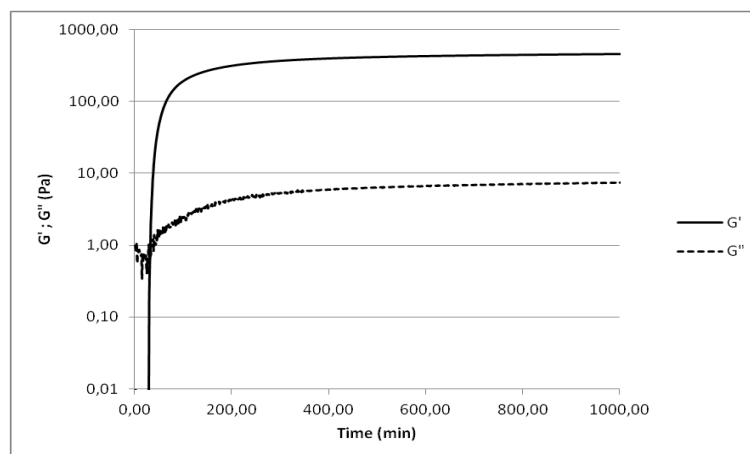


Figure II.14 : Courbe classique de gélification en mode oscillatoire à température constante.

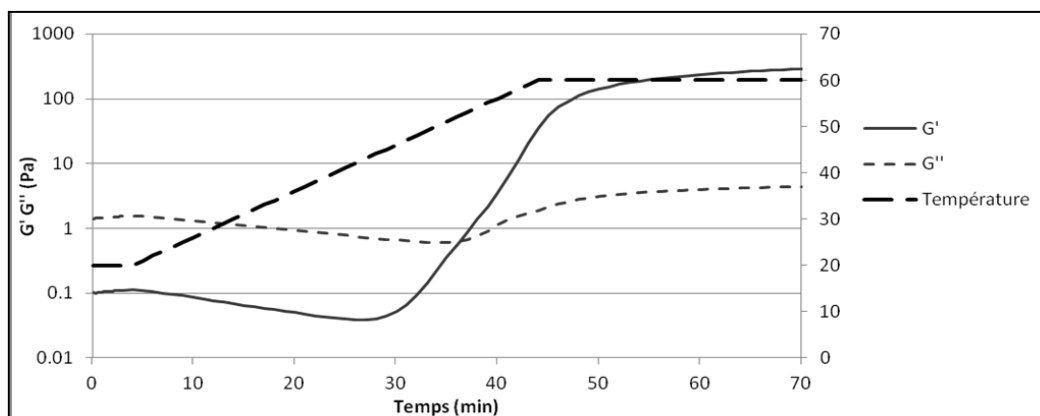


Figure II.15 : Courbe classique de gélification en mode oscillatoire en fonction du temps et de la température.

Le deuxième test effectué est un test de Creep. Pour les gels d'alginate, ce test s'effectue sous une contrainte de 2,5 Pa et à température de 26°C. Pour les gels de méthyle-cellulose, le test s'effectue avec une contrainte de 5 Pa et une température de 60°C afin de maintenir la structure gel de la méthyle-cellulose.

III.4) Matrices à base de peptides amyloïdes.

A température ambiante et à une concentration de 1 mM, le peptide R2T forme spontanément un gel dans l'eau. Cette concentration est alors utilisée pour déterminer les paramètres rhéologiques des gels ainsi formés. Pour cela, 1 ml de solution de peptide à 1mM est déposé sur le support de rhéologie et une analyse de gélification en mode oscillatoire ainsi qu'un test de Creep sont réalisés comme décrit précédemment.

Chapitre III : Résultats

Sommaire Chapitre III

Chapitre III Résultats	p 93
Sommaire Chapitre III	p 94
I) Biofilms modèles monomicrobiens	p 96
I.1) Structures et compositions de biofilms de 48 Heures	p 97
I.1.1) Biofilms de 48 heures de <i>P. aeruginosa</i> NK125502	p 97
I.1.2) Biofilms de 48 heures de <i>S. epidermidis</i> CIP 43.124	p 98
I.1.3) Biofilms de 48 heures de <i>S. enterica</i> CIP 58.58	p 100
I.2) Cinétique de formation de biofilms de 3 heures à 48 heures	p 101
I.3) Biofilms à 10 jours	p 109
I.3.1) Biofilm de 10 jours de <i>P. aeruginosa</i>	p 110
I.3.2) Biofilm de 10 jours de <i>S. epidermidis</i>	p 112
I.3.3) Biofilm de 10 jours de <i>S. enterica</i>	p 113
I.4) Propriétés mécaniques des biofilms de 10 jours	p 116
I.4.1) Propriétés mécaniques d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	p 117
I.4.2) Propriétés mécaniques d'un biofilm de <i>S. enterica</i>	p 118
I.4.3) Propriétés mécaniques d'un biofilm de <i>S. epidermidis</i>	p 118
I) Fibres amyloïdes	p 120
I.1) Choix des peptides	p 120
I.1.1) Criblage des souches	p 120
I.1.2) Etude <i>in silico</i> de CsgA	p 123
I.1.3) Etude <i>in silico</i> de FapC	p 124
I.1.4) Etude <i>in silico</i> de Bap	p 126
I.2) Formation de fibres	p 127
I.2.1) Caractérisation biochimique de la formation de fibres	p 127
I.2.2) Caractérisation de la formation des fibres par imagerie	p 137
I.2.2.1) Etude de la biréfringence du rouge Congo lié au peptide R5 par microscopie confocale. Comparaison avec la technique de référence	p 137
I.2.2.2) Etude de la biréfringence du rouge Congo liée aux peptides R5T, R2T, et R13T par microscopie confocale	p 140

I.2.2.3) Etude de la structure des assemblages de peptides par microscopie à force atomique	p 143
I.3) Rôle potentiel des fibres amyloïdes pour l'adhérence bactérienne	p 144
III) Matrices artificielles	p 150
III.1) Matrices d'alginate	p 150
III.1.1) Gels d'alginate seuls	p 151
III.1.2) Gels mixtes d'alginate et histone H2a	p 153
III.1.3) Gels mixtes alginate et peptides.....	p 155
III.1.3.1) Gel mixte alginate et peptide Q.....	p 155
III.1.3.2) Gel de peptide amyloïde R2T	p 157
III.1.3.3) Gel mixte alginate et peptide amyloïde R2T.....	p 158
III.1.3.4) Gel mixte alginate et peptide amyloïde R13T.....	p 161
III.2) Matrices de Méthyle-cellulose.....	p 163
III.2.1) Gel de Méthyle-cellulose seule.....	p 163
III.2.2) Gel de Méthyle-cellulose et peptides.....	p 165
III.2.2.1) Gel mixte Méthyle-cellulose et peptide Q	p 165
III.2.2.2) Gel mixte de Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R5	p 167
III.2.2.3) Gel mixte de Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R5T.....	p 169
III.2.2.4) Gel mixte de Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R13T.....	p 171

Dans la partie introductive, nous avons vu que la matrice des biofilms est constituée d'un ensemble d'exopolymères parmi lesquels les polysaccharides et les protéines jouent un rôle majeur. L'hypothèse émise au début de ces travaux de thèse est que les fibres amyloïdes jouent un rôle essentiel dans l'organisation et la structure de la matrice des biofilms. Nous avons entrepris d'étudier des « objets » biologiques de complexité croissante, mimant des éléments de la matrice de biofilms ou reconstituant des biofilms monomicrobiens de laboratoire. Ce chapitre résultat est divisé en trois parties. La première partie de cette étude concerne l'étude du développement de biofilm bactérien mono-espèce. Lors de cette partie, la matrice du biofilm de trois souches différentes a été caractérisée par imagerie, grâce à différentes sondes fluorescentes. La deuxième partie de cette étude concerne l'étude d'un des éléments des biofilms, les fibres de nature amyloïde. L'obtention de fibre de nature amyloïde permettra leur inclusion dans des matrices synthétiques afin de comprendre comment elles en modulent les propriétés mécaniques.

La première partie de cette étude est consacrée à la caractérisation de biofilms bactériens mono-espèces. Dans un premier temps, un suivi de la présence de différents motifs osidiques au sein de la matrice a été réalisé par microscopie. Puis des biofilms plus matures ont été caractérisés par deux approches différentes : par imagerie et par rhéologie.

I) Biofilms modèles monomicrobiens

Dans cette partie des travaux, nous allons nous intéresser à la caractérisation de biofilms bactériens. Pour cette étude, nous avons utilisé trois souches distinctes : *P. aeruginosa* NK 125202, *S. epidermidis* CIP 53.124, et *S. enterica* CIP 58.58. Dans un premier temps, nous allons identifier les lectines les plus efficaces pour marquer la matrice polysaccharidique du biofilm et donc pour permettre sa visualisation. Ensuite, nous étudierons comment évolue le biofilm des trois souches pendant 48 heures de culture. Enfin, nous terminerons cette analyse par l'observation de biofilms de 10 jours, ainsi que l'étude des propriétés mécaniques de ces biofilms plus âgés.

1.1) Structure et composition de biofilms de 48 heures

La première analyse réalisée est un marquage par différentes lectines de biofilms de 48 heures des trois souches. Les lectines reconnaissent spécifiquement des motifs saccharidiques et s'y fixent. Chaque lectine reconnaît un répertoire de motifs saccharidiques. L'analyse des images des biofilms, après marquages par des lectines différentes va nous permettre de déterminer les motifs osidiques présents au sein des biofilms des trois souches testées et d'en apprécier l'abondance. Lors de cette étude, cinq lectines différentes ont été utilisées : Peanut agglutinin (PNA), *Bandeiraea simplicifolia* agglutinine (BS), Concanavaline A agglutinine(CA), *Ulex europaeus* agglutinine (UE), *Lycopersicon esculentum* agglutinine(LE) (cf. chapitre 2 partie II.3). Les couples de lectines utilisées sont basées sur la publication de B. Doumèche et col, 2007.

1.1.1) Biofilms de 48 heures de *P. aeruginosa* NK125502

Les images du marquage au DAPI du biofilm de *P. aeruginosa* NK 125502 montrent que celui-ci est plus étendu et dense à 48 heures (Figure III.30). De gros amas de cellules sont visibles sur la lame de verre. Le marquage par les lectines montre des disparités en fonction de la lectine utilisée. La lectine LE marque très fortement la matrice du biofilm, tandis que les lectines AH, BS et UE semblent ne marquer que très peu la matrice. Les lectines CA, quant à elles marquent le biofilm d'une manière intermédiaire, moins fortement que la lectine LE mais plus fortement que les lectines AH, BS et UE. Ces résultats sont assez surprenants car la souche *P. aeruginosa* NK 125 502 a été isolée des poumons d'un patient atteint de mucoviscidose et est donnée comme étant mucoïde. On s'attendait donc à observer un marquage du biofilm plus intense par la lectine CA pouvant reconnaître l'alginate. Cela dit, les colonies isolées sur milieu gélosé obtenues par repiquage de cette souche ne révèlent pas un fort caractère mucoïde. La surexpression des alginates s'est peut-être atténuée lors de la conservation de cette souche au laboratoire. Par ailleurs, on observe des variations dans le niveau de marquage du biofilm par la lectine CA selon l'échantillon (Figure III.1). Dans l'exemple d'une association AH + CA, l'intensité de marquage CA bien que relativement faible est plus intense que dans le cas d'un double marquage BS + CA.

Le motif osidique semblant être le plus présent est donc ici le tri-N-acétyl-glucosamine.

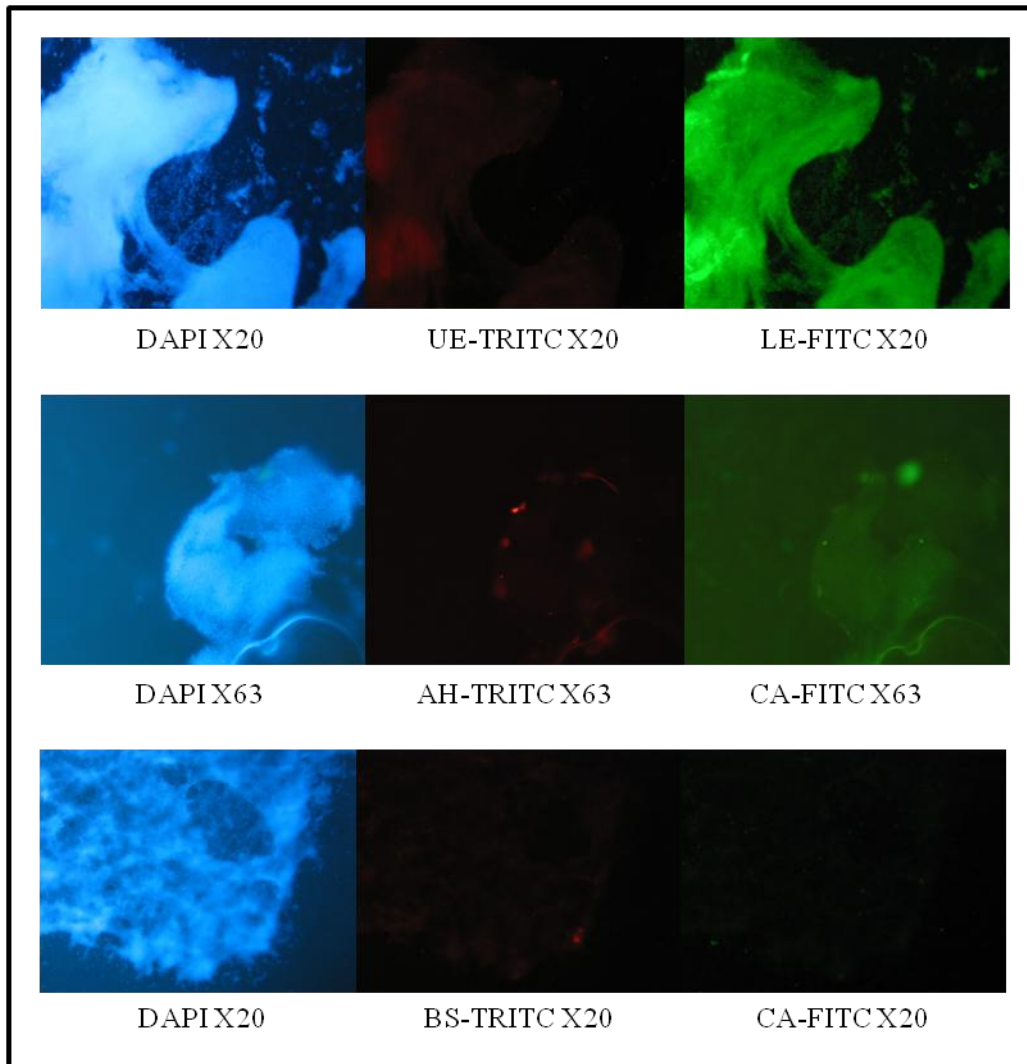


Figure III.1) Image en microscopie à épifluorescence de trois triples marquages de biofilm de *P. aeruginosa* NK 125 502 incubés 48 heures sur lame de verre à une température de 26°C.

Les structures de matrice marquées par la lectine LE semblent former des structures en réseau au sein du biofilm. Par contre, toutes les autres lectines présentent soit un marquage très localisé soit un marquage diffus de l'ensemble de la matrice.

1.1.2) Biofilms de 48 heures de S. epidermidis CIP53.124

Les images obtenues avec le marquage au DAPI des biofilms de *S. epidermidis* CIP 53.124 de 48 heures à 26 °C sur lame de verre montrent que le biofilm formé est assez abondant (Figure III.2). Comme pour *P. aeruginosa* NK125502, la lectine LE marque fortement la matrice du biofilm formé par *S. epidermidis* CIP 53.124. De plus, deux autres lectines ont assez fortement marqué le biofilm : les lectines, CA, et dans une moindre mesure,

UE. En revanche, les lectines AH et BS ne semblent pas marquer ce biofilm. Le marquage du biofilm par la lectine LE n'est pas surprenant. En effet, il est connu qu'un des exopolysaccharides servant à la structuration du biofilm des *Staphylococci* est le PNAG (Poly-N-acétyl-glucosamine), polysaccharide reconnu par la lectine LE.

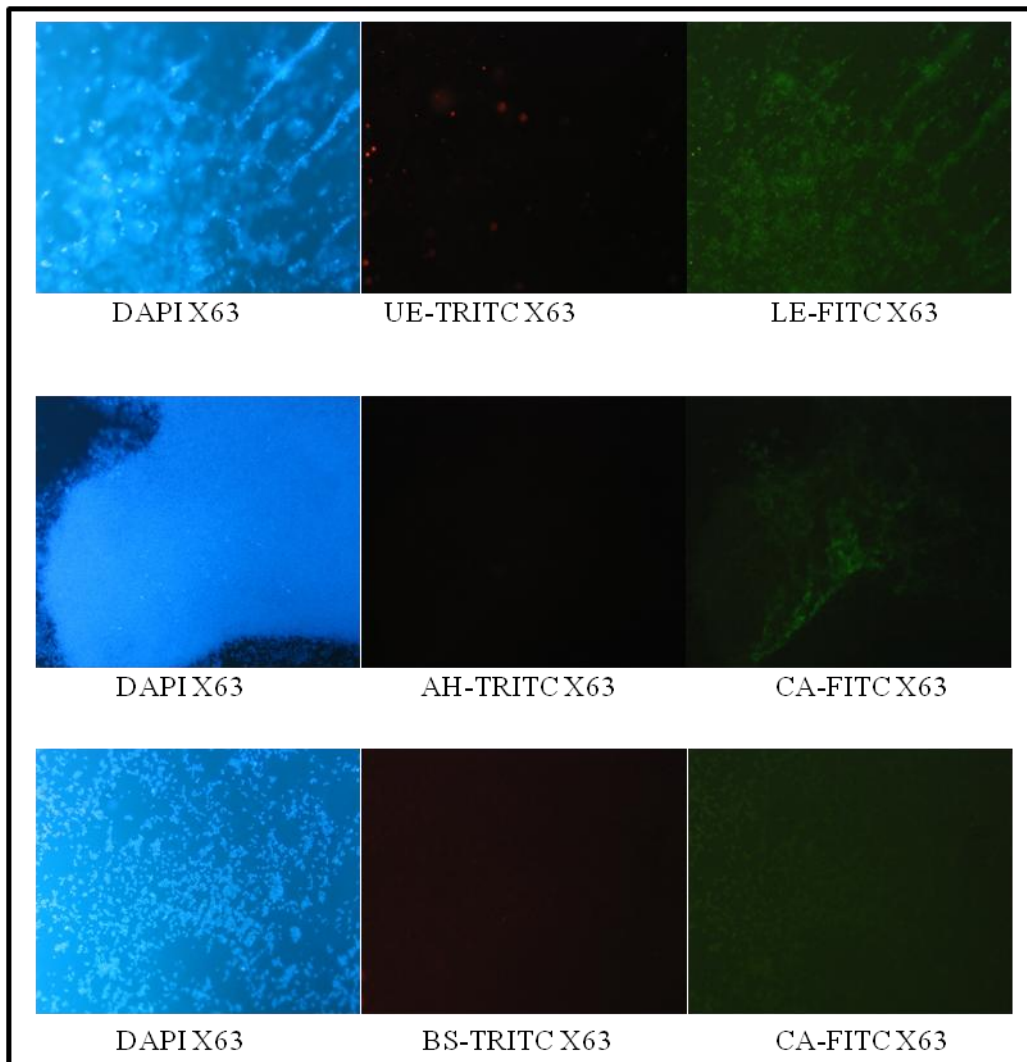


Figure III.2) Image en microscopie à épifluorescence de trois triples marquages de biofilm de *S. epidermidis* CIP 53.124 incubés 48 heures sur lame de verre à une température de 26°C.

Le marquage par les lectines LE et CA semblent suivre un réseau au sein de la matrice. Le marquage par la lectine UE semble être ponctiforme. Seules de petites zones du biofilm sont marquées par cette lectine. Le L-fucose serait donc présent en des zones particulières et limitées de la structure.

I.1.3) Biofilms de 48 heures de S. enterica CIP58.58

Les biofilms formés par *S. enterica* CIP 58.58 en 48 heures sur lame de verre à 26 °C semblent moins gros que ceux formés par les souches de *P. aeruginosa* et *S. epidermidis* étudiées (Figure III.3). Le marquage de lectine le plus intense semble être celui de la lectine LE. Les marquages les plus intenses avec la lectine UE semblent être non-spécifiques. Les lectines UE et CA donnent des signaux relativement importants bien que plus faibles que les signaux obtenus avec la lectine LE. Le marquage obtenu avec les lectines AH et BS apparaît très faible voir absent.

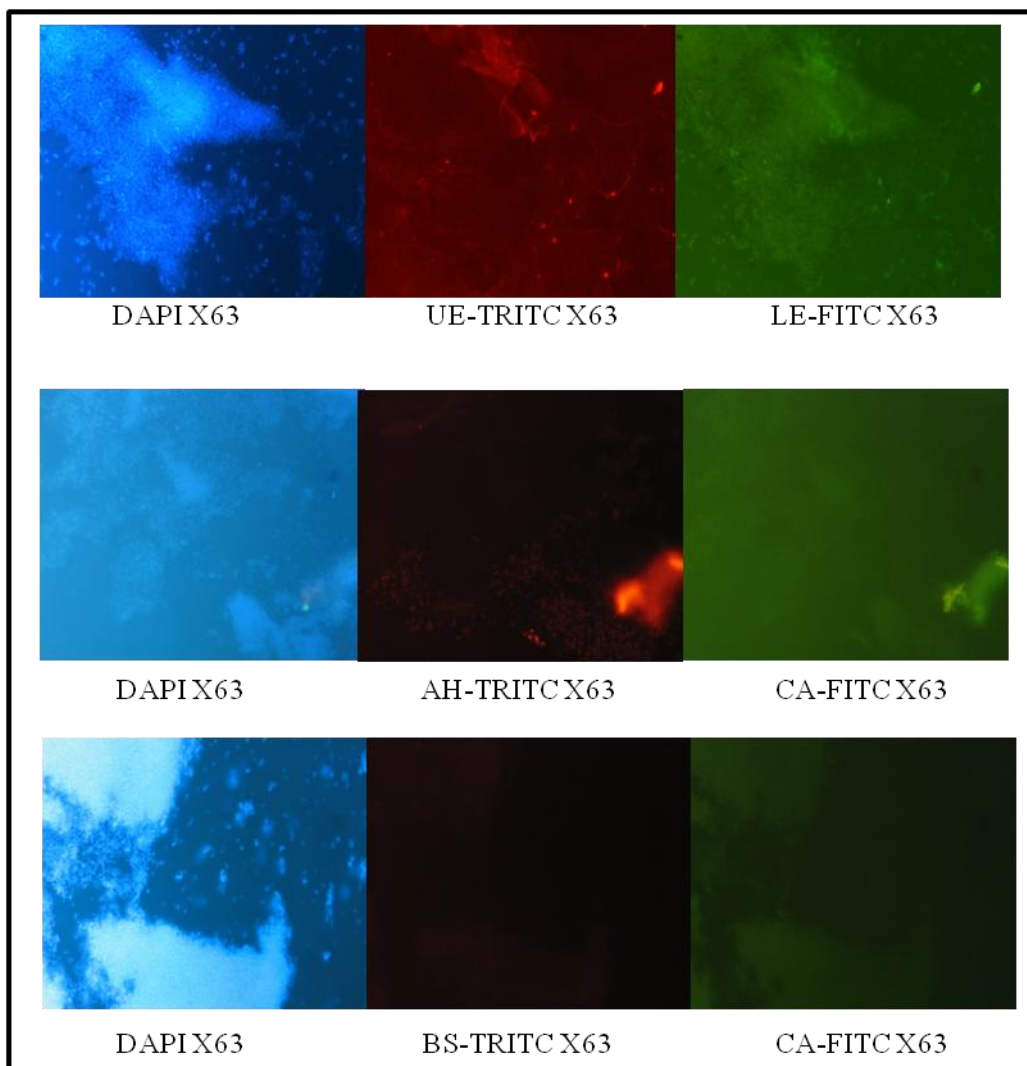


Figure III.3) Image en microscopie à épifluorescence de trois triples marquages de biofilm de S. enterica CIP 58.58 incubés 48 heures sur lame de verre à une température de 26°C.

Les lectines LE, CA et UE marquent le biofilm de manière relativement diffuse. C'est avec la lectine LE que le marquage est le plus uniforme.

De l'ensemble de ces résultats, nous pouvons observer que la lectine LE marque fortement les biofilms des souches bactériennes des trois espèces étudiées. Le motif N-acétyl-glucosamine semble être un motif présent dans les matrices des trois souches. Ce résultat n'est pas surprenant car le peptidoglycane de la paroi bactérienne en est composé. Cela dit, d'autres molécules que le peptidoglycane doivent être marqués par la lectine LE, le marquage de la matrice étant observé bien au delà des cellules bactériennes. La lectine UE semble elle aussi marquer l'ensemble des biofilms des trois souches même si l'intensité et la densité de marquage varient d'une souche à l'autre. Nous avons donc décidé de continuer l'ensemble des marquages utilisés dans cette étude des biofilms avec les deux lectines LE et UE associées à un marquage DAPI.

Après avoir choisi la nature des lectines utilisées, nous nous sommes intéressés à la cinétique de formation de biofilm par les trois souches étudiées.

1.2) Cinétique de formation de biofilm de 3 heures à 48 heures.

La cinétique d'apparition de biofilm sur une surface peut permettre de mieux en comprendre la structuration. En effet, lors de la formation de biofilm, les polysaccharides exprimés peuvent changer au cours du temps. Nous avons analysé la cinétique d'apparition du biofilm des souches *P. aeruginosa* NK 125 502, *S. epidermidis* CIP 53.124, et *S. enterica* CIP 58.58 après 3, 6, 9, 12, 24, 30 et 48 heures d'incubation. Les images ainsi obtenues donneront une idée de la répartition cellulaire ainsi que de la présence et de l'abondance d'une matrice de polysaccharides.

La première étape de formation du biofilm est observée par microscopie après 3 heures d'incubation à 26°C. Cette étape correspond au temps de l'adhérence bactérienne et de formation des premières microcolonies (Figure III.4). Sur les images du marquage DAPI, on peut observer pour *P. aeruginosa* NK 125502 l'adhérence sur la surface de bactéries isolées, mais aussi, la formation de quelques microcolonies. Pour *S. epidermidis* CIP 53.124, le nombre de cellules fixées sur la surface est bien inférieur. En revanche, les cellules observables sont toutes regroupées en petits amas. Pour la souche *S. enterica* CIP 58.58, le

nombre de cellules fixées sur la surface semble intermédiaire entre celui de *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*. De même, de petits amas cellulaires sont observés sur la surface.

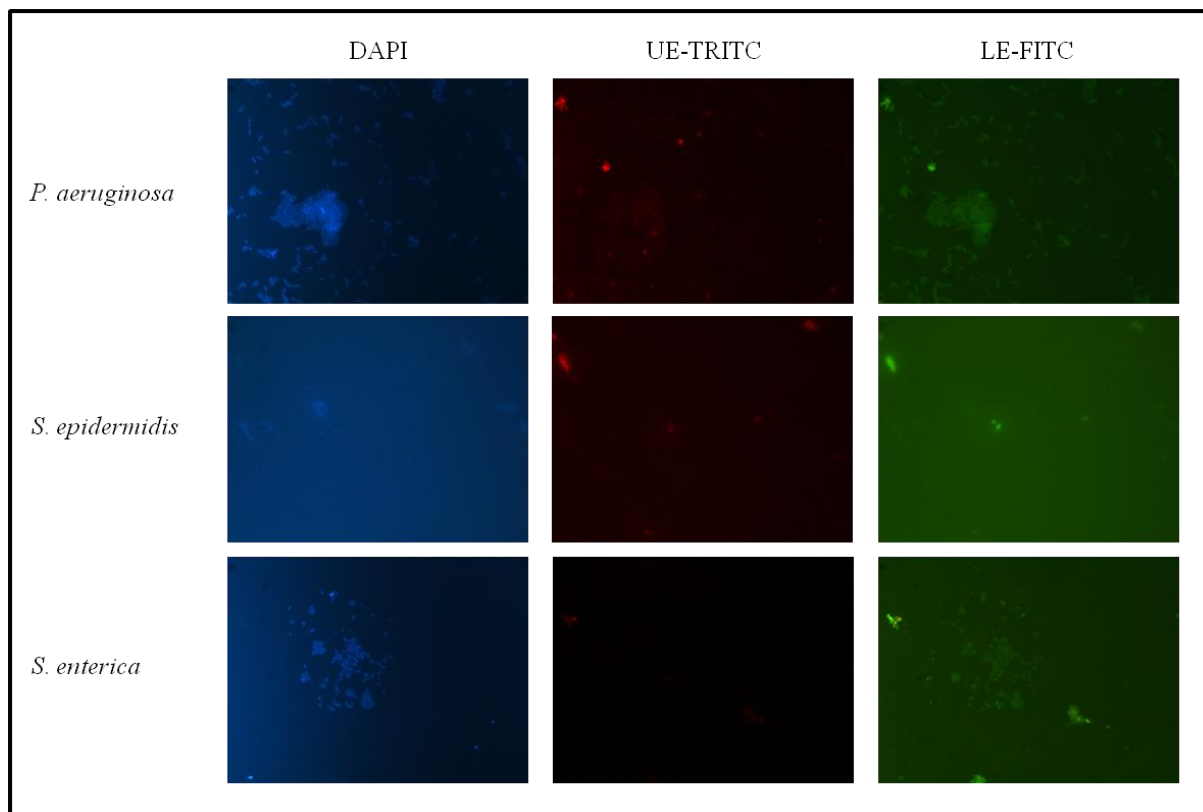


Figure III.4) Image en microscopie à épifluorescence à l'objectif X63 de triples marquages (DAPI, UE-TRITC, LE-FITC) de lames de verre incubées pendant 3 heures en présence de chacune des 3 souches bactériennes *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53.124, *S. enterica* CIP 58.58 à 26°C.

Le marquage par les lectines nous apporte plusieurs renseignements supplémentaires (Figure II.1.a.1.1). Tout d'abord pour *S. epidermidis* CIP 53.124, ces marquages sont faibles. Pour la souche de *P. aeruginosa* NK 125502 et *S. enterica* CIP 58.58, les marquages observés sont plus intenses, en particulier avec la lectine LE. Pour toutes les souches, le marquage par la lectine LE suit le contour des cellules. Pour les trois souches, le marquage par la lectine UE est plus faible.

L'observation suivante est l'étape après 6 heures d'incubation (Figure III.5). Les images obtenues avec le marquage au DAPI montrent que la taille du biofilm de *P. aeruginosa* NK 125502 et de *S. epidermidis* CIP 53.124 a fortement augmenté entre 3 et 6 heures d'incubation. Il y a une croissance des microcolonies ainsi qu'une augmentation du nombre de celles-ci. La croissance la plus forte est observée avec *P. aeruginosa*. De grosses microcolonies sont observables sur la lame de verre et très peu de bactéries isolées sont

présentes. Pour *S. enterica* CIP 58.58, la croissance des microcolonies ainsi que l'augmentation de leur nombre est faible.

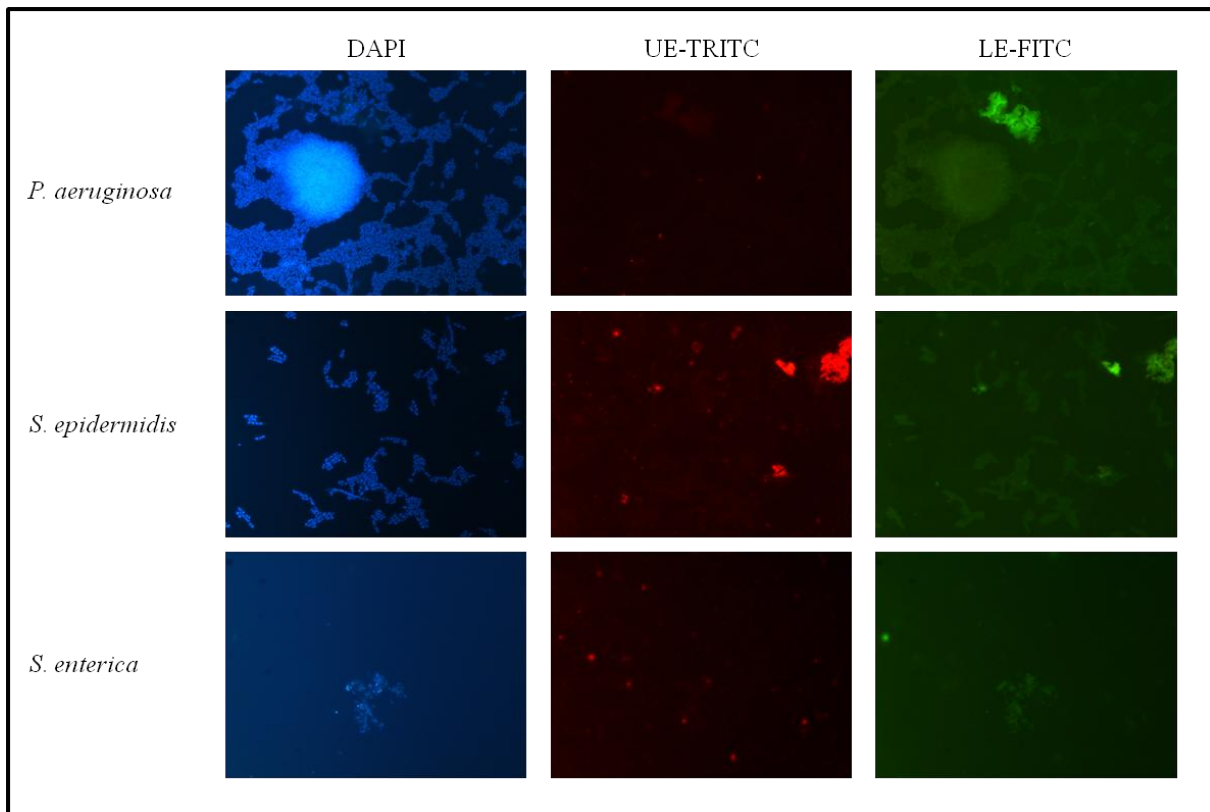


Figure III.5) Image en microscopie à épifluorescence à l'objectif X63 de triples marquages (DAPI, UE-TRITC, LE-FITC) de lames de verre incubées pendant 6 heures en présence de chacune des 3 souches bactériennes *P. aeruginosa* NK 125 502, *S. epidermidis* CIP 53.124, *S. enterica* CIP 58.58 à 26°C.

Le marquage des structures par les lectines UE et LE, nous montre pour les souches *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 un marquage essentiellement du pourtour cellulaire. Ce marquage est un peu plus intense que celui du temps 3 heures, en particulier pour *S. epidermidis*. Pour la souche *P. aeruginosa* NK125502, le marquage par la lectine UE reste très faible. Il semblerait que le L-fucose soit quasi absent des structures observées. En revanche, le marquage par la lectine LE est fort. De plus, celui-ci semble ne plus se limiter au pourtour de la cellule, en étant un peu plus diffus au sein de la structure observée.

L'observation des images obtenues après 9 heures d'incubation montre en DAPI une forte croissance des structures pour l'ensemble des souches étudiées (Figure III.6). Pour les souches de *S. epidermidis* CIP 53.124 et de *S. enterica* CIP 58.58 de gros regroupements cellulaires sont observables. Les structures observées ne semblent pas se propager en épaisseur. En revanche, la surface est de plus en plus couverte. Par contre, pour la souche *P. aeruginosa* NK 125502, la structure semble grossir dans toutes les directions y compris en

épaisseur. Cette croissance en épaisseur pourrait correspondre à la formation de structures en champignon. Il y a un fort essor du biofilm pendant cette étape.

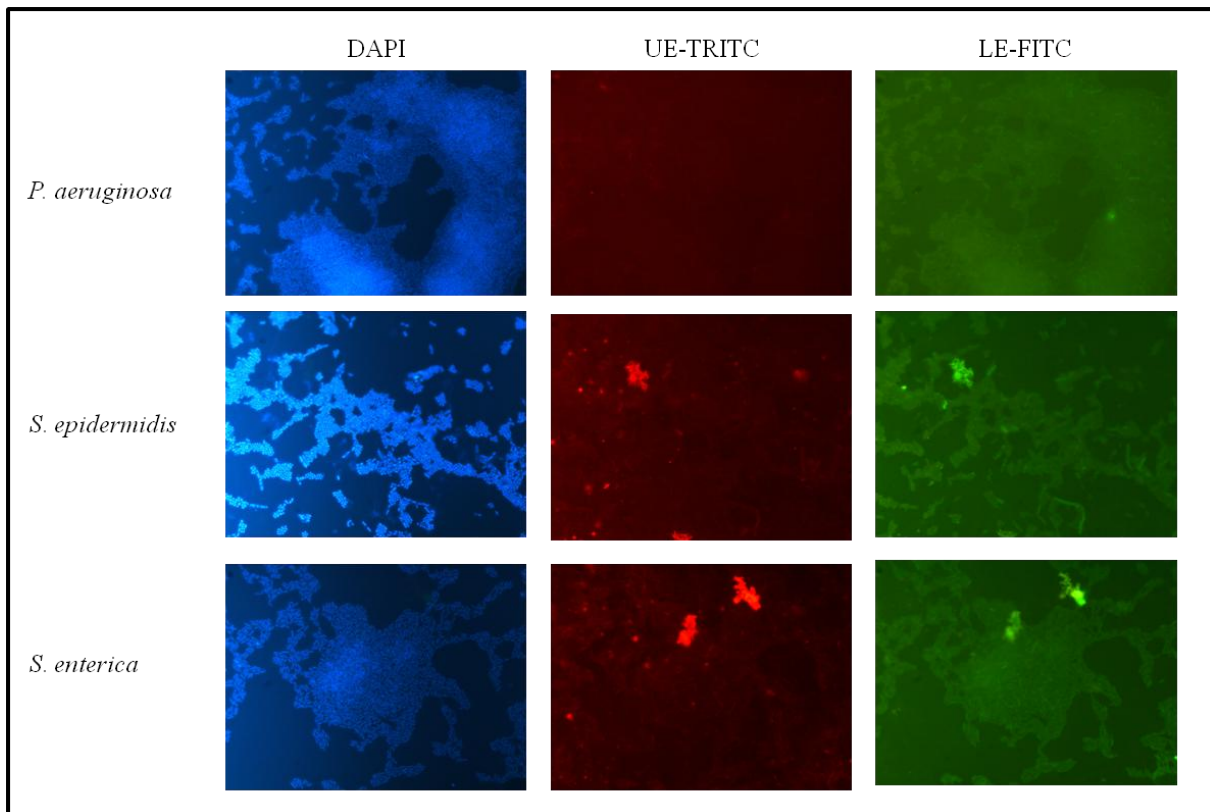


Figure III.6) Image en microscopie à épifluorescence à l'objectif X63 de triples marquages (DAPI, UE-TRITC, LE-FITC) de lames de verre incubées pendant 9 heures en présence de chacune des 3 souches bactériennes *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53.124, *S. enterica* CIP 58.58 à 26°C.

Le marquage du biofilm de la souche *P. aeruginosa* NK 125502 par la lectine UE, reste très faible. Un marquage de fond diffus semble tout de même observable. En revanche, le marquage par la lectine LE est quant à lui beaucoup plus intense. En plus du pourtour cellulaire, une partie du marquage semble diffus laissant penser qu'il se répartit au sein de la matrice. Pour les souches *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58, le marquage par les lectines semble équivalent en intensité entre UE et LE. Par contre le type de structure marqué semble différent entre les deux lectines : la lectine LE est co-localisée en grande partie avec les cellules, alors que la lectine UE semble beaucoup plus diffuse, avec des zones acellulaires marquées.

En 12 heures d'incubation, les structures observables avec un marquage DAPI ont changé (Figure III.7). Pour la souche *P. aeruginosa* NK125502, la lame de verre semble

totallement recouverte par le biofilm. En revanche, pour les souches *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 les structures ont l'air d'avoir très peu évolué, voir même légèrement régressé dans le cas de *S. epidermidis* CIP 53.124.

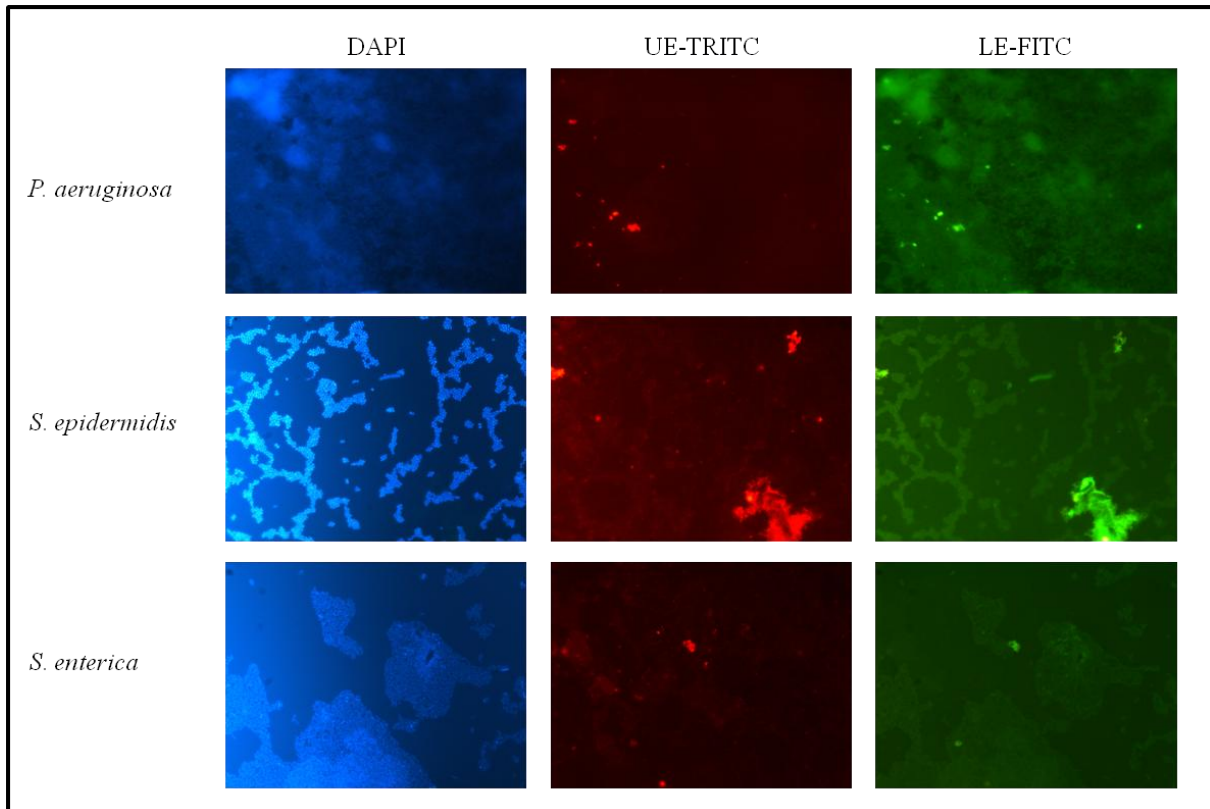


Figure III.7) Image en microscopie à épifluorescence à l'objectif X63 de triples marquages (DAPI, UE-TRITC, LE-FITC) de lames de verre incubées pendant 12 heures en présence de chacune des 3 souches bactériennes *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53.124, *S. enterica* CIP 58.58 à 26°C.

Les images des marquages avec les différentes lectines montrent que le résidu N-acétylglucosamine est très fortement présent dans le biofilm de *P. aeruginosa* NK 125502 à 12 heures d'incubation. Le marquage des biofilms de 12 heures de *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 reste quand à lui plus faible, mais analogue au marquage observé après 9 heures d'incubation. Ainsi, le marquage par la lectine LE suit principalement les contours cellulaires, et le marquage par la lectine UE est plus diffus mais s'étend dans des zones acellulaires semblant être non spécifique pour les zones les plus intenses.

A 24 heures d'incubation, la biomasse formée par les souches *P. aeruginosa* NK 125502 et *S. epidermidis* CIP 53.124 semble avoir très peu évolué (Figure III.8). En revanche les structures cellulaires formées par *S. enterica* CIP 58.58 semblent être plus épaisses

qu'après 12 heures d'incubation. Pour *P. aeruginosa* NK 125502, ces structures sont toujours de grande taille dans les trois dimensions, et pour *S. epidermidis* CIP 53.124, il n'y a toujours pas de croissance du biofilm en épaisseur.

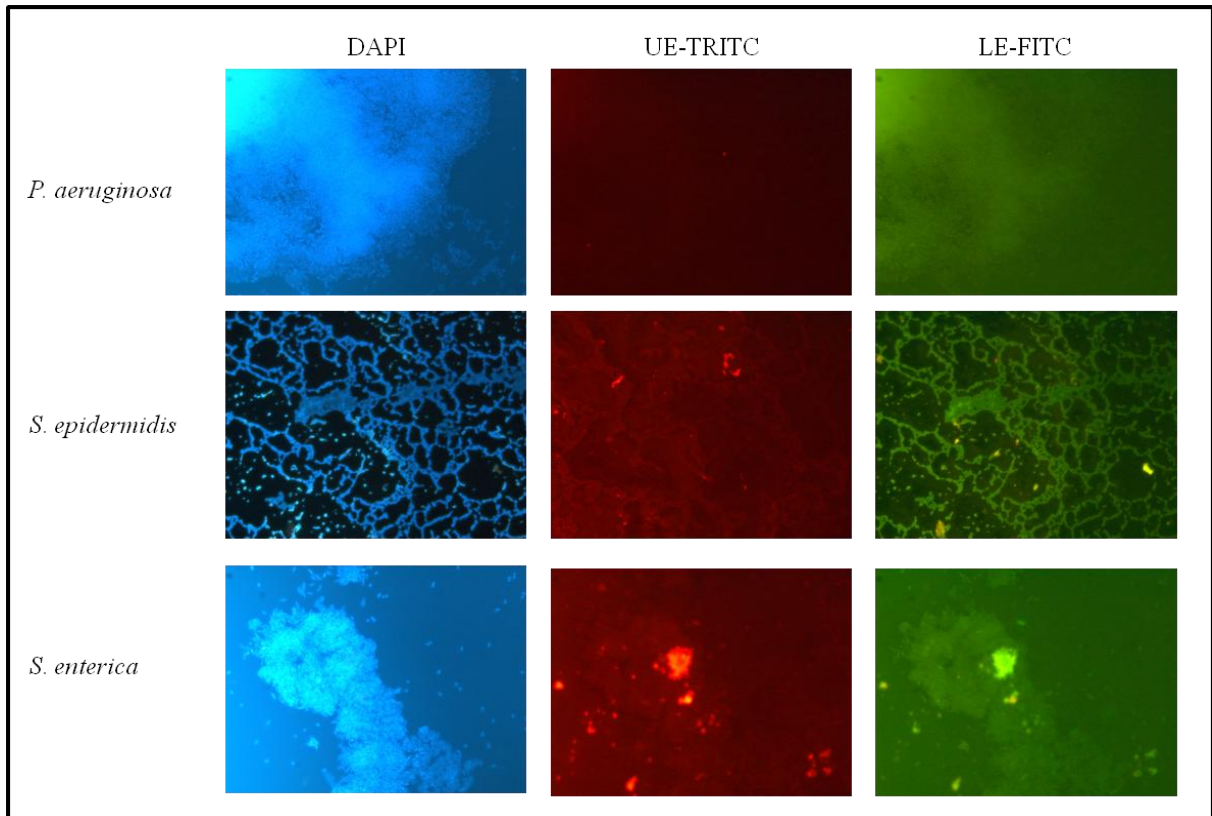


Figure III.8) Image en microscopie à épifluorescence à l'objectif X63 de triples marquages (DAPI, UE-TRITC, LE-FITC) de lames de verre incubées pendant 24 heures en présence de chacune des 3 souches bactériennes *P. aeruginosa* NK125502, *S. epidermidis* CIP 53.124, *S. enterica* CIP 58.58 à 26°C.

Le marquage par les lectines LE et UE du biofilm de *P. aeruginosa* NK 125502 semble ne pas avoir évolué par rapport au temps 12 heures. Celui-ci est très intense pour la lectine LE et quasi absent pour la lectine UE. De même, pour le marquage des structures observées pour *S. epidermidis* CIP 53.124, le marquage par la lectine LE reste cantonné aux contours cellulaires. En revanche, le marquage par la lectine UE semble devenir plus ponctiforme qu'à 12 heures d'incubation. Enfin, pour les structures observées pour la souche *S. enterica* CIP 58.58 le marquage par les lectines UE et LE est beaucoup plus intense et diffus. Les deux motifs osidiques reconnus par ces lectines (N-acétyl-glucosamine et L-fucose) seraient donc plus présents dans la matrice du biofilm et de façon dispersée.

Après 30 heures d'incubation, les biofilms de *P. aeruginosa* NK 125502 et *S. epidermidis* CIP 53.124 deviennent trop importants pour être imagés à l'objectif X63. Aussi, les structures sont ensuite observées à l'objectif X20. Les images des biofilms marqués au

DAPI ainsi obtenues (Figure III.9) montrent pour *P. aeruginosa* NK125502, des structures denses en cellules et très étendues. Pour *S. epidermidis* CIP 53.124, on n'observe toujours pas de croissance en épaisseur mais un grand nombre de microcolonies interconnectées sont présentes. Pour *S. enterica* CIP 58.58, nous pouvons continuer à imager au grossissement x63 et les structures observées sont plus épaisses qu'aux temps précédents.

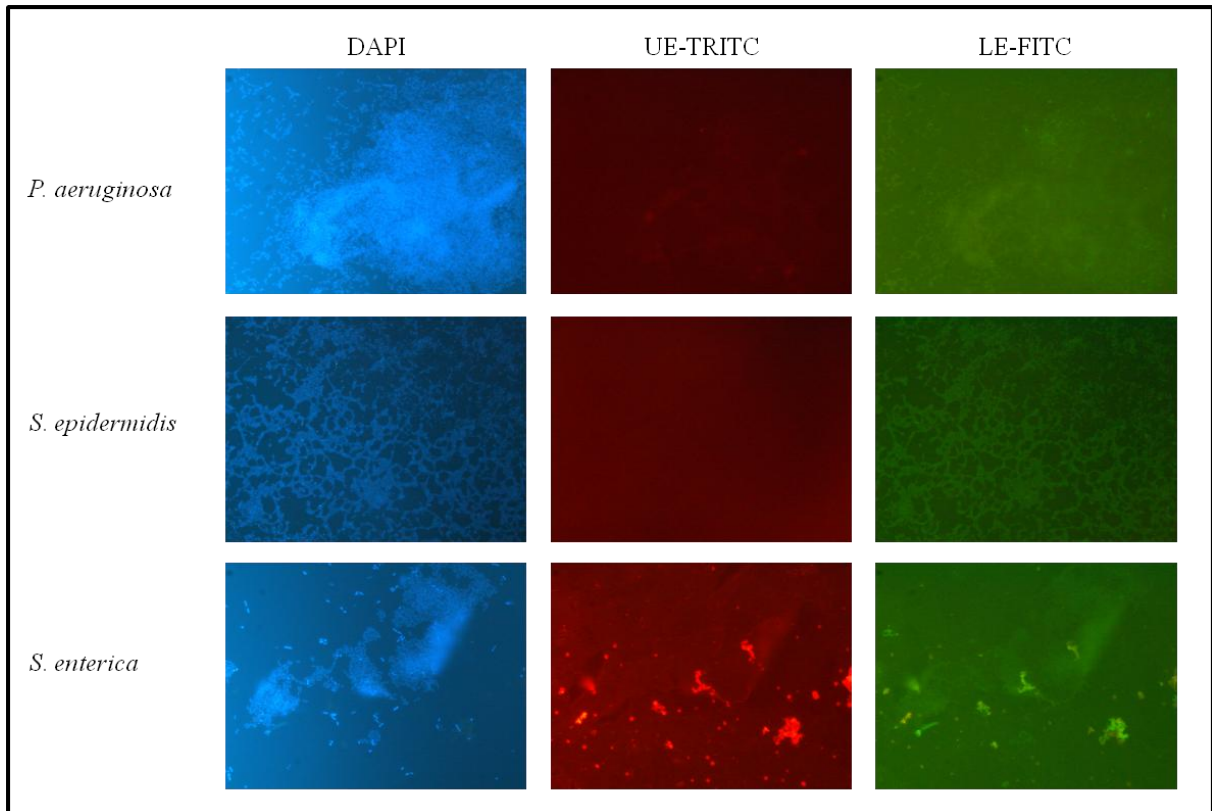


Figure III.9) Image en microscopie à épifluorescence de triples marquages (DAPI, UE-TRITC, LE-FITC) de lames de verre incubées pendant 30 heures en présence de chacune des 3 souches bactériennes *P. aeruginosa* NK 125502 objectif X20, *S. epidermidis* CIP 53.124 objectif X20, *S. enterica* CIP 58.58 objectif X63, à 26°C.

Les marquages avec les lectines LE et UE pour *P. aeruginosa* NK 125502 et *S. enterica* CIP 58.58 semblent plus diffus que pour les temps plus courts. Pour *S. epidermidis* CIP 53.124 le marquage avec la lectine LE reste restreint au pourtour des cellules. Quant au marquage avec la lectine UE, il semble ne pas être présent.

Pour finir cette cinétique, nous avons réalisé un biofilm de 48 heures. Toutes les images ont été effectuées avec l'objectif x20, les biofilms s'étant fortement développés. Les images obtenues en DAPI (Figure III.10) pour la souche *P. aeruginosa* NK125502 montrent la présence de grosses structures de forme sphérique sur la surface de la lamelle de verre. Pour la souche *S. epidermidis* CIP 53.124, le biofilm n'a pas grossi en épaisseur mais s'est étendu.

Enfin, la souche *S. enterica* CIP 58.58 forme des structures plus grosses et étendues qu'à 30 heures.

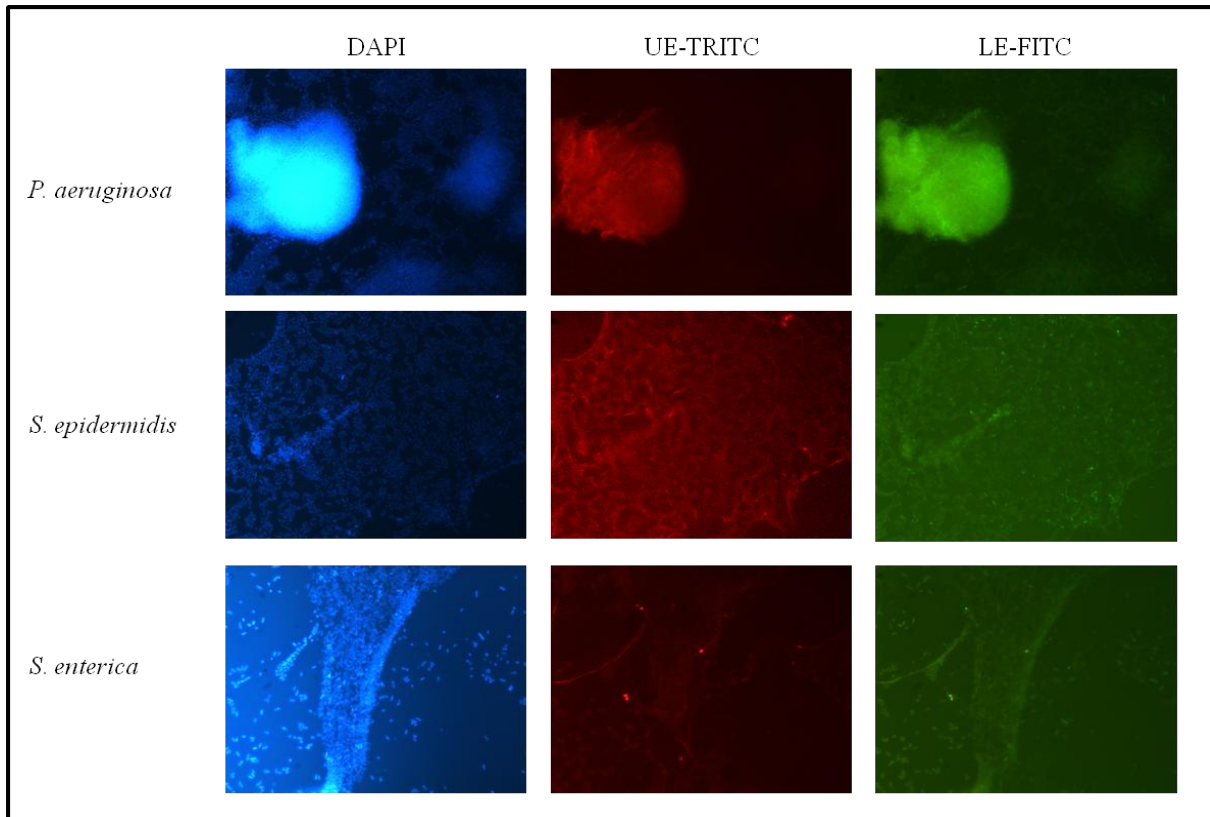


Figure III.10) Images en microscopie à épifluorescence à l'objectif X20 de triples de marquages (DAPI, UE-TRITC, LE-FITC) de lames de verre incubées pendant 48 heures en présence de chacune des 3 souches bactériennes *P. aeruginosa* NK125502, *S. epidermidis* CIP 53.124, *S. enterica* CIP 58.58 à 26°C.

Les biofilms de la souche *P. aeruginosa* NK 125502 montrent un marquage très important par les lectines LE et UE. Ainsi, le réseau d'exopolymères de matrice s'est développé et diversifié. Pour la souche de *S. epidermidis* CIP 53.124, le marquage par la lectine UE est présent. Il semble quand à lui plus diffus et sous forme filamenteuse. Le marquage par la lectine LE de cette même structure semble suivre le contour cellulaire. Enfin, pour la souche *S. enterica* CIP 58.58 le marquage par les deux lectines présente une intensité plus forte dans des zones en périphérie du biofilm. Ce marquage semble former un réseau autour de la structure.

De l'ensemble de cette cinétique nous pouvons retirer plusieurs informations. La souche *P. aeruginosa* NK125502 forme un biofilm déjà dense en 48 heures sur lame de verre et à 26°C. Les deux motifs sucrés ont une cinétique d'apparition différente au sein du biofilm. La N-acétyl-glucosamine semble présente autour des cellules dans les premières heures, puis de manière plus diffuse jusqu'à 30 heures, et enfin semble commencer à former des structures

remarquables à 48 heures. Le L-fucose quand à lui semble n'être que très peu présent avant 48 heures. Par contre, il est très présent à 48 heures et semble être localisé au niveau de structures filamenteuses particulières au sein de la matrice. Les biofilms formés par *S. epidermidis* CIP 53.124 sont moins denses que ceux de *P. aeruginosa*. De plus, la souche utilisée semble former des structures s'étalant sur la surface plutôt que de croître en épaisseur. De plus, les lectines UE et LE semblent marquer la structure formée à chaque étape. Ces marquages suivent en général majoritairement le contour cellulaire. Le L-fucose et la N-acétylglucosamine seraient liés à la cellule bactérienne. Ceci pour la N-acétylglucosamine n'est pas surprenant car il est dans la composition du peptidoglycane. Enfin, pour la souche *S. enterica* CIP 58.58, la formation de grosses structures sur lame de verre n'a pas été démontrée. Malgré cela, les structures présentes sont marquées par les deux lectines LE et UE. De plus, l'apparition de structures plus complexes au sein de la matrice après 30 heures de culture, laissent à penser que le biofilm continue son développement.

Les structures observées à 48 heures de culture ne sont pas assez épaisses et couvrantes pour une caractérisation en rhéologie. Nous avons donc décidé de préparer une culture de biofilms sur 10 jours afin de pouvoir analyser la texture de ces biofilms.

1.3) Biofilms à 10 jours

Des biofilms de 10 jours ont été formés sur des lames de verre afin de visualiser leur structure, estimer la présence de polysaccharides et de protéines au sein des différents biofilms et déterminer la faisabilité de l'étude de leurs propriétés rhéologiques. Pour cela, les lames de verre sont incubées en milieu TS à 26°C et au bout de 10 jours, les cellules bactériennes sont marquées au DAPI, au Sypro Ruby et avec la lectine LE puis imagées à différentes profondeurs. Nous avons choisi la lectine LE qui est la plus efficace pour le marquage des exopolysaccharides de matrice des biofilms des différentes espèces étudiées. Nous avons utilisé le DAPI pour visualiser les cellules et un marquage Sypro Ruby permettant de visualiser les protéines de matrice du biofilm. La visualisation des protéines et des polysaccharides majoritaires des matrices de biofilms permettra d'apporter des éléments de comparaison avec les matrices artificielles dont l'étude est présentée en partie III.

1.3.1) Biofilm de 10 jours de P. aeruginosa

Les images obtenues en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de la souche *P. aeruginosa* NK 125502 marqué au DAPI, Sypro Ruby et lectine LE, montrent plusieurs grosses structures à la surface de la lame de verre. Ces structures d'environ 150 μm par 200 μm sont d'une épaisseur maximale d'environ 22 μm . Un exemple d'une de ces structures est présenté dans la Figure III.11. L'épaisseur de ces structures est peut être sous évaluée car la technique de montage par lamelle renversée sur une goutte de mowiol peut écraser l'échantillon. De plus, les biofilms analysés ont subi des rinçages successifs lors des changements de milieu ce qui a pu occasionner des décrochages partiels de biomasse. La surface du biofilm est irrégulière avec des petits dômes et des zones en léger creux même si globalement elle est relativement plane. Les bords de l'ensemble ne sont pas réguliers et des cellules isolées sont visibles en périphérie.

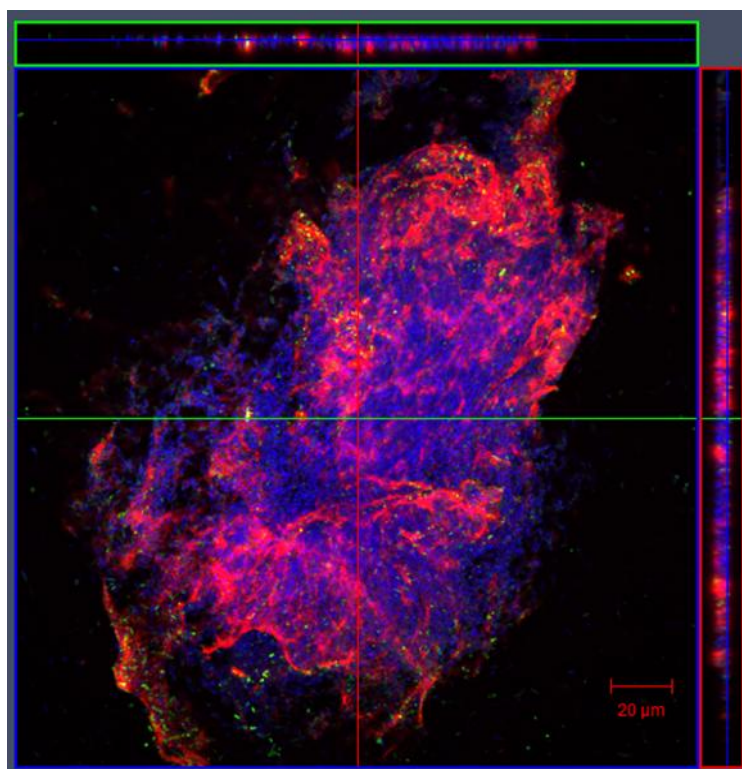


Figure III.11) Image en microscopie confocale d'un biofilm de P. aeruginosa NK 125502 de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC.

Les marquages des protéines et des polysaccharides sont répartis de manière non uniforme dans le biofilm. Certaines zones sont plus fortement marquées que d'autres, notamment par le Sypro Ruby. Les protéines semblent former un réseau de filaments au sein de la matrice. Le

marquage des polysaccharides par la lectine LE est assez faible. Ce résultat est assez surprenant car les biofilms plus jeunes étaient fortement marqués par cette lectine. Les polysaccharides marqués semblent organisés en structures ponctiformes et en petits filaments. Les coupes successives au sein de cette structure permettent d'apprécier la répartition des différents éléments marqués dans l'épaisseur du biofilm (Figure III.12). Les coupes détaillées pour chaque fluorochrome utilisés sont présentés en annexe 2. Les protéines sont réparties sur toute l'épaisseur du biofilm, ce qui n'est pas le cas pour les cellules et les polysaccharides marqués. On peut ainsi observer qu'une couche de protéines est disposée à la base du biofilm. Cette couche semble dépourvue de cellules et de résidus N-acétyl-glucosamine. Puis des couches contenant des cellules, des protéines et des polysaccharides forment le cœur du biofilm. Enfin des protéines semblent former un réseau à la surface du biofilm, formant une couche dépourvue de cellule et de résiduN-acétyl-glucosamine.

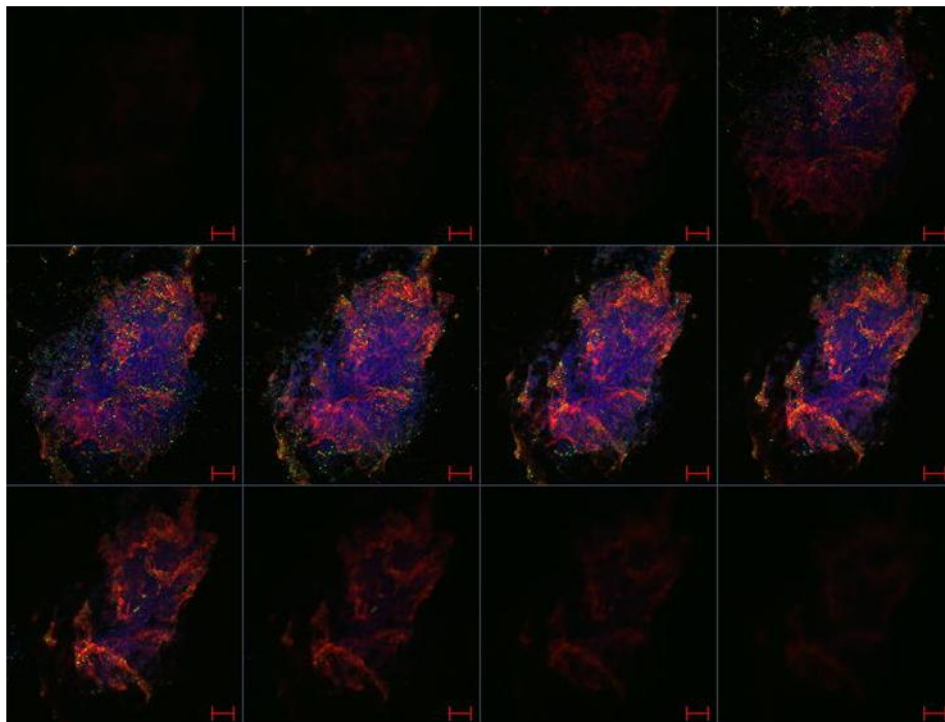


Figure III.12 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de P. aeruginosa de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC, les coupes réalisées sont espacées de deux microns (barre d'échelle 20 μ m, l'image en haut à gauche est la surface de verre et celle en bas à droite est le haut de la structure).

1.3.2) Biofilm de 10 jours de S. epidermidis

En dix jours d'incubation, le biofilm formé par *S. epidermidis* CIP 53.124 semble recouvrir la quasi-totalité de la lame de verre. La taille de la structure ne peut donc par conséquent pas être mesurée, mais son épaisseur est d'environ 40 μm (Figure III.13). On n'observe plus de bactéries isolées sur la surface de verre. La répartition des différents marqueurs dans la profondeur du biofilm semble plus homogène que pour les autres souches bactériennes. Certaines zones du biofilm, montrent des excroissances en forme de dôme de 20 à 30 μm de hauteur surplombant une base complètement recouverte de cellules.

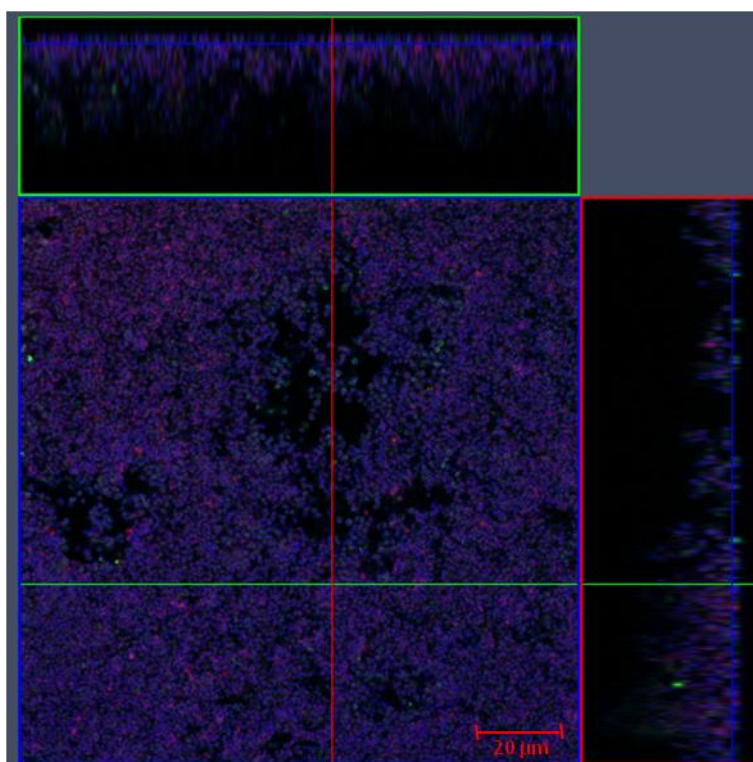


Figure III.13 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de S. epidermidis CIP 53.124 de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC.

L'analyse des différentes coupes au sein du biofilm, montre que les cellules sont présentes de la base à la surface du biofilm (Figure III.14) (voir aussi les coupes détaillées en annexe 3). De plus, le marquage des protéines semble être juxtaposé au marquage des cellules, même si un marquage plus intense par le Sypro Ruby est observé en surface, particulièrement au niveau des dômes. De même, le marquage avec la lectine LE reste sur le pourtour des cellules. Même si ce marquage est visible dans toute la profondeur du biofilm, il semble plus intense dans la moitié basse de la structure. En revanche, et contrairement aux structures précédentes, il ne semble pas y avoir une prédominance ni des protéines ni des résidus N-acétyl-

glucosamine. Il n'y a pas marquage de structures filamenteuses faisant apparaître un réseau de protéines ou de polysaccharides au sein du biofilm.

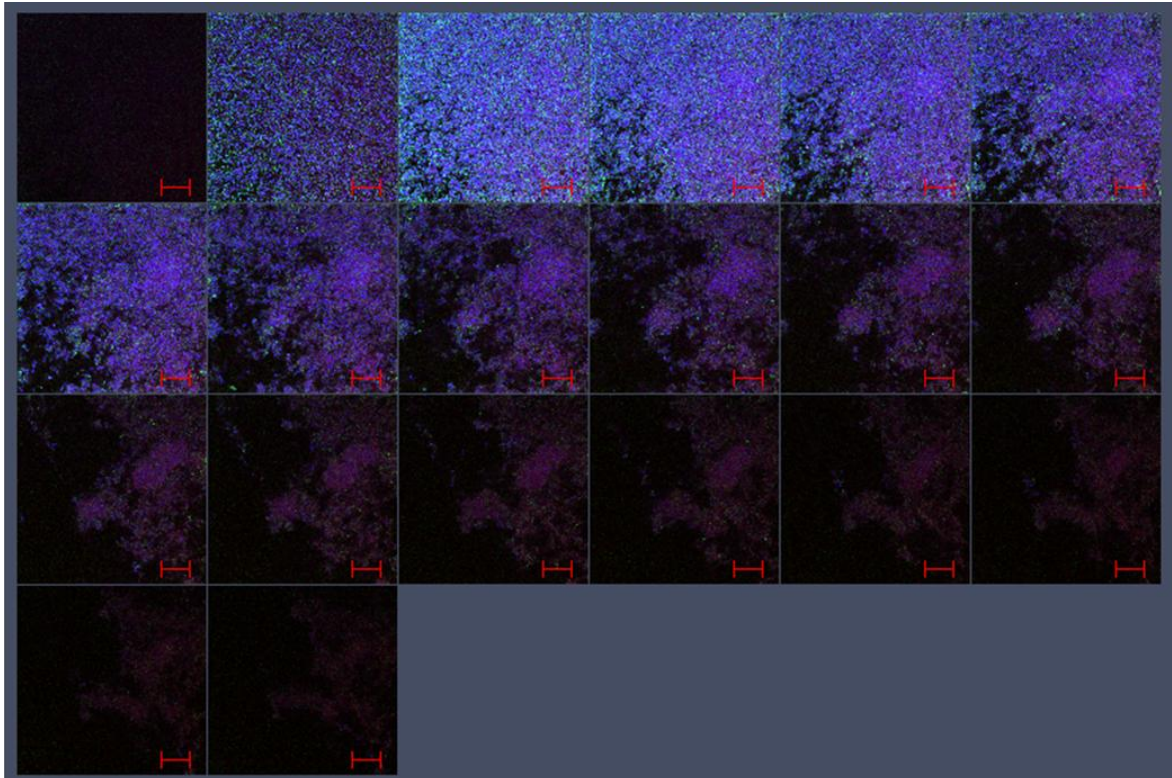


Figure III.14 : Image en microscopie confocale d'un biofilm de *S. epidermidis* CIP 53.124 de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE. Les coupes réalisées sont espacés de 2 μm (barre d'échelle 20 μm).

1.3.3) Biofilm de 10 jours de *S. enterica*

Les images obtenues en microscopie confocale d'un biofilm de 10 jours de *S. enterica* CIP 58.58 marqué au DAPI, Sypro Ruby et lectine LE, montrent plusieurs grosses structures à la surface de la lame de verre. Ces structures ont une longueur d'environ 270 μm pour une largeur de 230 μm . Un exemple d'une de ces structures est présenté dans la Figure III.15. L'épaisseur de cette structure est d'environ 34 μm . Les bords du biofilm semblent réguliers et bien délimités. Très peu de cellules isolées sont visibles en périphérie. Les différents marquages ne sont pas présents de manière uniforme sur l'ensemble de la structure. Les zones vers la surface et vers la base du biofilm sont fortement marquées par le Sypro Ruby contrairement au cœur du biofilm qui semble contenir moins de protéines. Les protéines semblent former un réseau de filaments parfois très dense au sein de la matrice. Le marquage des polysaccharides par la lectine LE est relativement faible. Les polysaccharides marqués semblent organisés en structures ponctiformes et globulaires. On peut voir que la surface de la

structure semble relativement plate. Cela peut aussi être dû à la technique de montage utilisée pour l'imagerie comme indiqué pour *P. aeruginosa*.

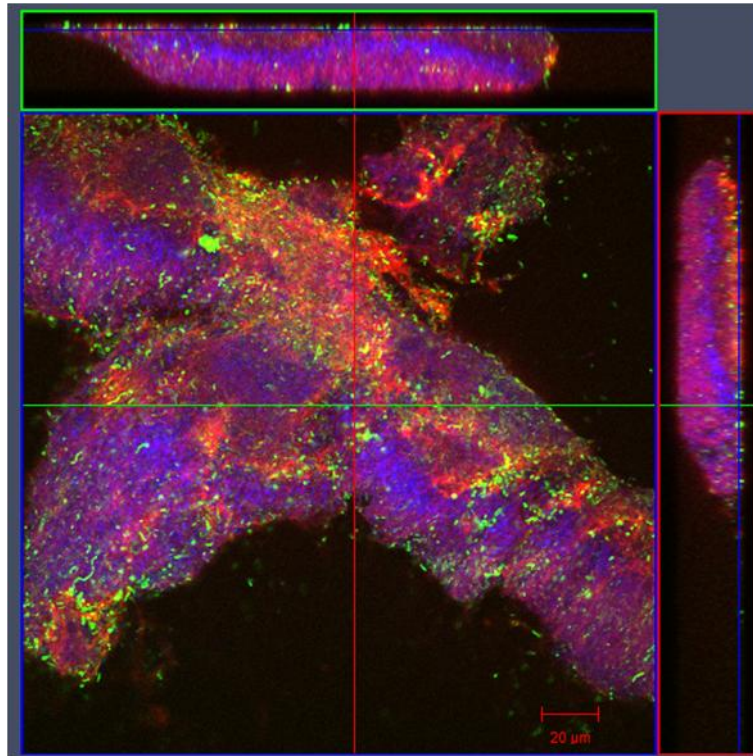


Figure III.15 Image en microscopie confocale d'un biofilm de *S. enterica* CIP 58.58 de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC.

L'analyse des différentes coupes dans la profondeur de la structure montre que, comme pour *P. aeruginosa*, un ensemble dense de protéines est en interaction avec à la surface de la lame de verre (les coupes détaillées pour chaque fluorochrome utilisé sont présentés en annexe 2). En rentrant dans le biofilm, les cellules bactériennes apparaissent ainsi qu'un marquage assez faible par la lectine LE (Figure III.16). Au centre du biofilm, on peut observer une zone très dense en cellules bactériennes qui est moins riche en exopolymères marqués. On retrouve un réseau dense de protéines en remontant vers la surface du biofilm. Comme pour *P. aeruginosa*, on ne retrouve pas ou très peu de cellules à la surface de la structure.

En résumé, le biofilm formé en 10 jours par *S. enterica* CIP 58.58 sur lame de verre à 26°C est très riche en protéines. Les protéines semblent s'organiser en un réseau à l'intérieur de la matrice mais aussi de manière très dense à ses extrémités. Le marquage avec la lectine LE sur l'ensemble de la structure est assez peu présent. Les résidus N-acétyl-glucosamine seraient présents principalement dans une zone en profondeur proche de la base du biofilm mais pas directement en contact avec le support.

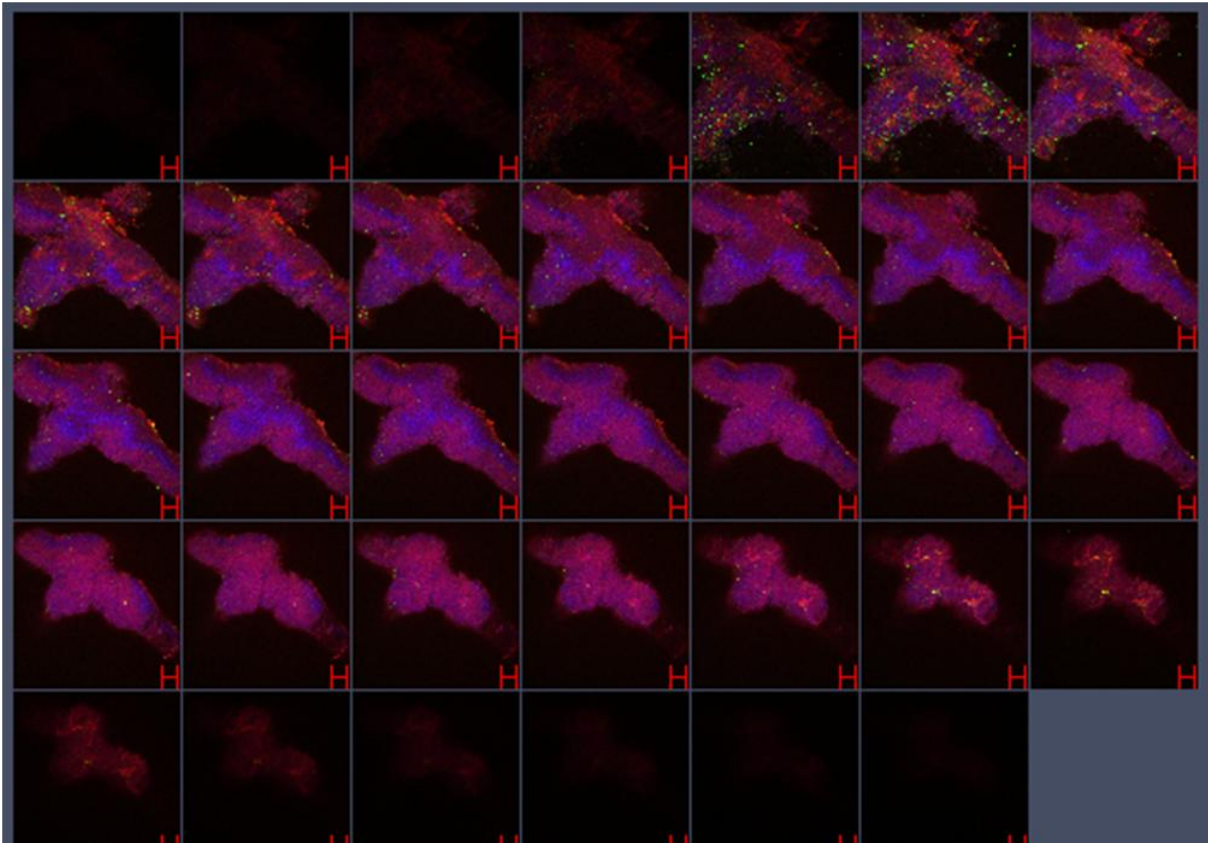


Figure III.16 Image en microscopie confocale d'un biofilm de *S. enterica* CIP 58.58 de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC. Les coupes réalisées sont espacées d'1 µm (barre d'échelle 20 µm).

Nous allons maintenant étudier les propriétés mécaniques des biofilms de 10 jours formés dans les mêmes conditions que pour l'imagerie c'est-à-dire sur une surface de verre à 26°C et en bouillon TS.

En résumé, après dix jours d'incubation à 26°C, deux types de structures de biofilms sont observées. Les souches *S. enterica* CIP 58.58 et *P. aeruginosa* NK125502 forment un biofilm qui s'organise en des îlots répartis sur la surface de la lame de verre dont la matrice est riche en protéines formant un réseau de filaments extracellulaires. Pour ces deux biofilms plus âgés, la glucosamine est beaucoup moins présente que sur les temps courts d'incubation. La souche *S. epidermidis* CIP 53.124 forme un biofilm dense en cellules, plus uniformément réparti sur la surface de la lame de verre dans lequel les protéines et les résidus N-acétylglucosamine englobent les cellules individuellement.

I.4) Propriétés mécaniques des biofilms de 10 jours

Les différents biofilms de 10 jours des 3 souches *P. aeruginosa* NK 125502, *S. enterica* CIP 58.58 et *S. epidermidis* CIP 53.124 ont été analysés en rhéologie. Les tests de Creep effectués sur ces biofilms ont été réalisés à une température de 26 °C et sous une contrainte faible de 0,1 Pa. En effet, en amont de ces résultats, des mises au point ont été effectués afin de déterminer la contrainte optimale à utiliser. Par exemple, un test de balayage de contrainte sur un biofilm de *P. aeruginosa* a permis de montrer que les propriétés mécaniques du biofilm s'effondraient au delà d'une contrainte de 0, 1 Pa (Figure III.17).

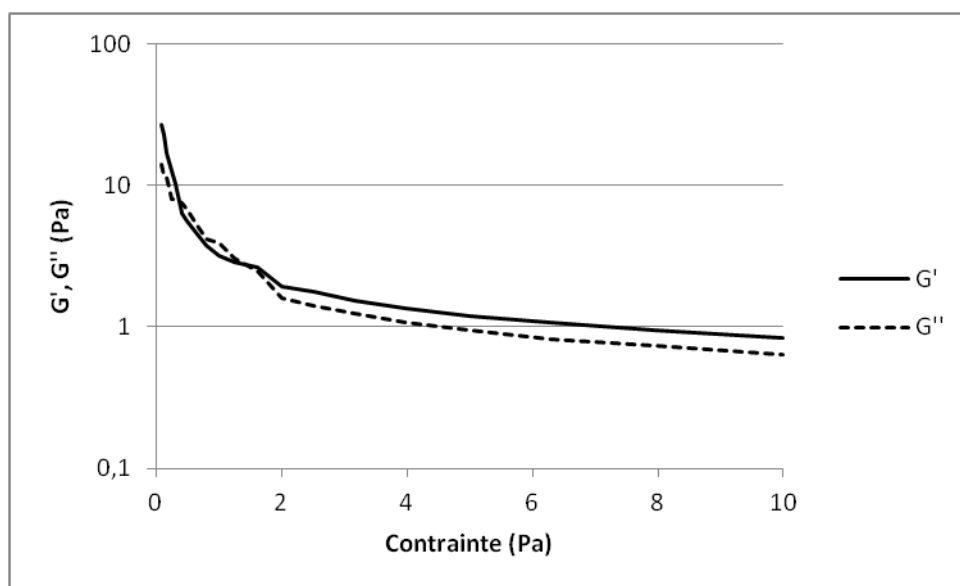


Figure III.17 : Variations des modules G' et G'' d'un biofilm de *P. aeruginosa* de 10 jours en fonction de la contrainte appliquée sur l'échantillon.

1.4.1) Propriétés mécaniques d'un biofilm de *P. aeruginosa*

Le test de Creep réalisé avec un biofilm de *P. aeruginosa* NK 125502 de 10 jours montre un comportement viscoélastique typique avec deux réponses successives sous la contrainte de 0,1 Pa (Figure III.18). La première réponse est une déformation élastique immédiate, et la seconde réponse est une déformation de nature visqueuse de 200 à 1000 secondes de test. Le module de cisaillement complexe G^* calculé est de 3,9 Pa. La viscosité apparente η entre 600 et 1000 secondes est de $4,2 \times 10^3$ Pa.s (Tableau III.72, p174). Ces deux paramètres sont relativement faibles ce qui peut être dû au fait que les biofilms formés ne sont soumis à aucune contrainte mécanique pendant leur formation.

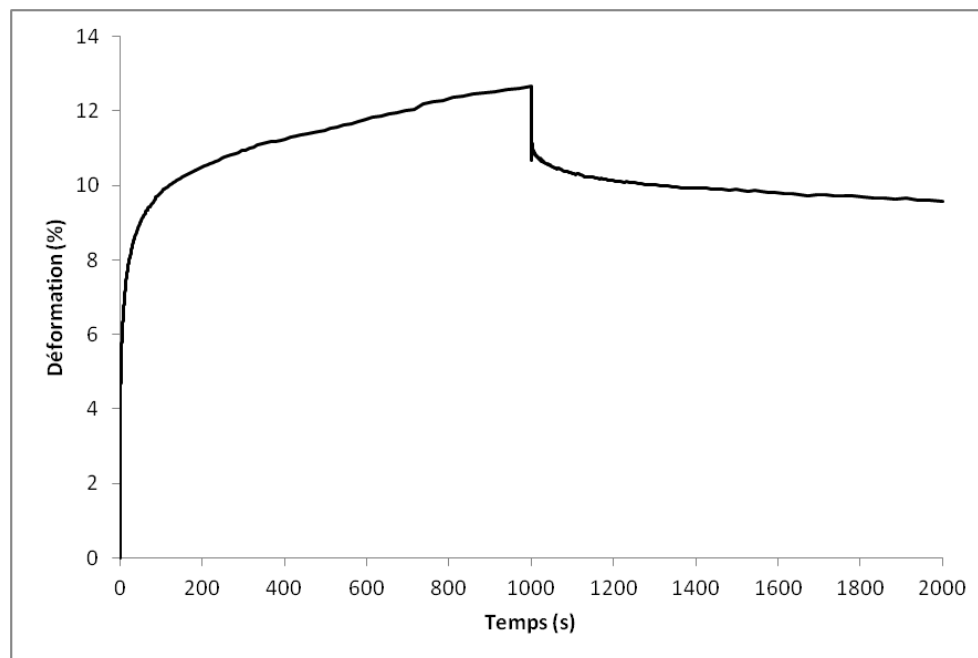


Figure III.18 : Test de Creep d'un biofilm de 10 jours de *P. aeruginosa* NK 125502 sur lame de verre à 26°C et sous une contrainte τ de 0,1 Pa.

Après arrêt d'application de la contrainte (de 1000 à 2000 s), on observe une relaxation élastique immédiate suivie d'une relaxation visqueuse plus lente. On observe également une déformation irréversible d'environ 10%.

1.4.2) Propriétés mécaniques d'un biofilm de *S. enterica*

Le test de Creep réalisé avec un biofilm de *S. enterica* CIP 58.58 révèle également un comportement viscoélastique (Figure III.19). La déformation élastique de celui-ci est légèrement plus élevée que celle de *P. aeruginosa* atteignant les 10 %. Le module de cisaillement complexe G^* calculé est alors de 2,25 Pa, soit légèrement plus faible que celui de *P. aeruginosa* dans les mêmes conditions. La déformation visqueuse du biofilm est quant à elle légèrement moins élevée que celle de *P. aeruginosa*, la viscosité η calculée étant de $6,9 \times 10^3 \text{Pa.s}$ (Tableau III.72, p174).

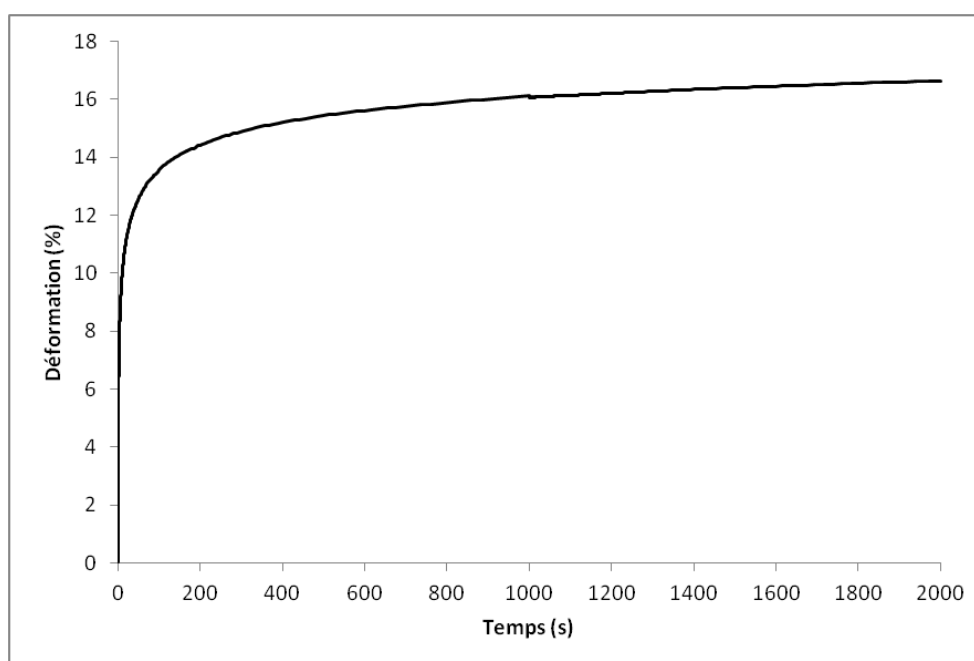


Figure III.19 Test de Creep d'un biofilm de 10 jours de *S. enterica* CIP 58.58 sur lame de verre à 26°C et sous une contrainte τ de 0,1 Pa.

En revanche, il n'y a pas de relaxation marquée du biofilm après arrêt de la contrainte au delà de 1000 s. Le biofilm continue donc à s'écouler même après arrêt de la contrainte.

1.4.3) Propriétés mécaniques d'un biofilm de *S. epidermidis*

Comme les deux biofilms précédents, le biofilm de *S. epidermidis* CIP 53.124 révèle un caractère viscoélastique sous une contrainte de 0,1 Pa (Figure III.20). Cependant, la

déformation élastique de celui-ci est 10 fois plus faible que la déformation du biofilm de *S. enterica* sous la même contrainte. Le module de cisaillement complexe G^* calculé est de 10,3 Pa. La déformation visqueuse reste très faible. La viscosité calculée est beaucoup plus élevée par rapport aux biofilms de *P. aeruginosa* NK125502 et *S. enterica* CIP 58.58 puisqu'elle est égale à $3,6 \times 10^6$ Pa.s (Tableau III.72, p174).

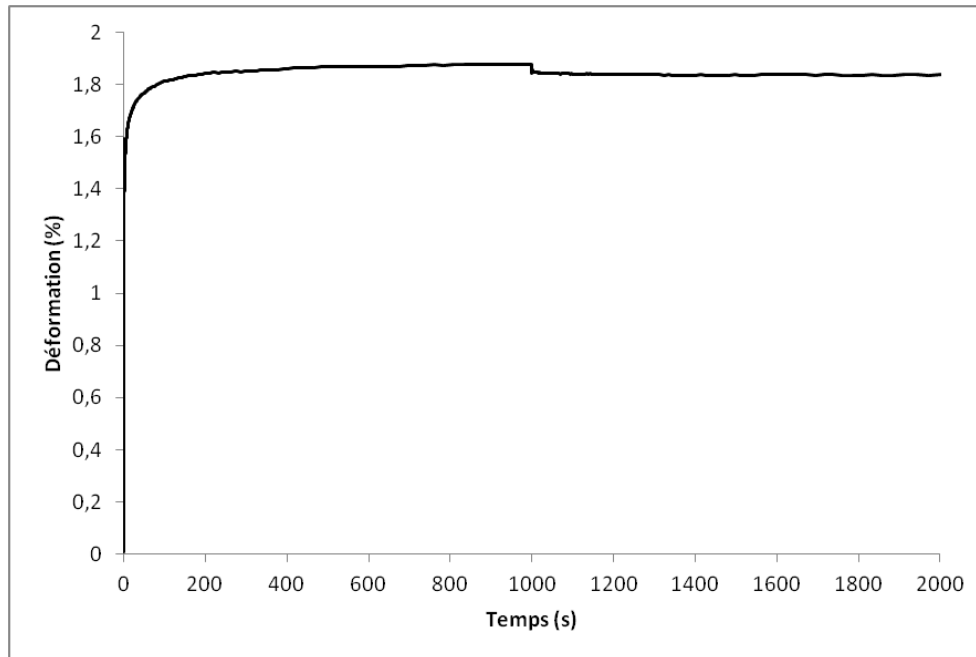


Figure III.20 : Test de Creep d'un biofilm de 10 jours de *S. epidermidis* sur lame de verre à 26°C et sous une contrainte τ de 0,1 Pa.

En revanche, la relaxation du biofilm après arrêt de l'application de la contrainte est très faible. On distingue néanmoins une relaxation élastique immédiate mais limitée suivie d'une relaxation visqueuse. Une très importante déformation irréversible est observée.

Les résultats obtenus par imagerie montrent que les biofilms formés *in vitro* avec les souches *P. aeruginosa* NK125502, *S. enterica* CIP 58.58 et *S. epidermidis* CIP 53.124 possèdent des matrices constituées de protéines et de polysaccharides. Ces polymères sont répartis de manière non uniforme au sein de la structure. Après 10 jours d'incubation, les propriétés mécaniques de ces biofilms ont pu être déterminées et les paramètres de viscoélasticité mesurés. Afin de modéliser le comportement de la matrice de ces biofilms, nous avons ensuite construit des matrices simples à base de polysaccharides gélifiés et de protéines en rapport avec les exopolymères pouvant être produits par chacune de ces espèces. L'objectif est de mieux comprendre quels peuvent être les apports de ces macromolécules dans la structuration en biofilm.

La deuxième partie de cette étude est consacrée à la recherche de protéines potentiellement capables de former des fibres de nature amyloïde au sein de la matrice des biofilms. Cette partie a pour objectifs : la caractérisation de souches produisant ce type de protéine dans leur matrice, la caractérisation de peptides amyloïdes afin de les utiliser dans des matrices synthétiques, et enfin, déterminer si la structure amyloïde a un rôle dans l'adhérence bactérienne et la structuration du biofilm.

II) Fibres amyloïdes

II.1) Choix des peptides

II.1.1) Criblage des souches

Nous avons testé un grand nombre de souches pour leurs capacités à agglomérer le rouge Congo par croissance sur les géloses YESCA. Nous avons ainsi identifié plusieurs souches bactériennes formant des colonies rouges sur ce type de gélose. Ces colonies sont appelées RC+. Un exemple des différents phénotypes observés est présenté dans le tableau III.21. Les résultats phénotypiques de toutes les souches testées sont présentés en annexe 1. L'observation des géloses nous a conduit à séparer plusieurs phénotypes distincts : le phénotype RC +++ présentant des colonies rouge vif à rouge foncé, le phénotype RC+ présentant des colonies rouges, le phénotype RC +/-, où les extrémités des colonies fixent le rouge Congo mais pas le centre, et enfin le phénotype RC- où les colonies ne présentent aucune coloration. De plus, la taille des colonies n'influence pas l'intensité de fixation du rouge Congo et les différents phénotypes ont été observés pour trois repiquages indépendants.





Souche	Phénotype	Photographie
<i>E. coli</i> 346	RC +++	
<i>E. coli</i> 418	RC +	
<i>E. coli</i> 752	RC +/-	
<i>E. coli</i> 398	RC -	

Tableau III.21 : Phénotypes de différentes souches d'*E. coli* sur gélose Yesca.

Lors de cette étude phénotypique, nous avons identifié 87 souches capables d'agglomérer le rouge Congo par croissance sur gélose YESCA (phénotype RC+/-, RC+, RC++ ou RC+++) sur 196 testées, soit un rapport de 44,4%. Lors de cette étude, 7 *Pseudomonas fluorescens*, 56 *Pseudomonas aeruginosa*, 108 *E. coli*, 14 *Klebsiella pneumoniae*, 8 *Klebsiella ocytoca*, deux *S. epidermidis*, une *Salmonelle enterica* (Tableau III.22). Sur les 108 *E. coli* issues d'isolat clinique de patients atteints d'infection urinaire, 42% des souches ont un phénotype RC+++ et RC+, 10% RC+/- et 48 % des souches ont un phénotype RC-. Parmi les souches issues d'isolat clinique de *Pseudomonas fluorescens*, 42,8% des souches testées agglomèrent le rouge Congo. Pour les souches de *P. aeruginosa*, 59,6 % des souches sont

positives au rouge Congo. Les *S. epidermidis* testées et la salmonelle ont un phénotype RC+. Ces résultats ne sont pas surprenants pour les souches des familles *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonaceae*: *Escherichia*, *Salmonella* et *Klebsiella*. En effet, l'étude bibliographique montre que ces espèces produisent des pili de types amyloïde. Le phénotype RC+ indique que pour plus de 44% des souches produisent ces fibres dans ces conditions. En revanche, pour les *Staphylococcus* testés ce résultat est plus surprenant. En effet, il n'y a pas référence bibliographique montrant une agglomération du rouge Congo par des colonies issues de ce genre bactérien.

		Nombre de souches RC +/- +///++	Nombre de souche RC-	Total	% de souche positive
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	45	63	108	41 %
	<i>Salmonella enterica</i>	1	0	1	100 %
	<i>Klebsiella ocytoca</i>	1	7	8	12,5 %
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	13	14	7%
<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	4	7	42,8 %
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34	23	57	59,6 %
<i>Micrococaceae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	0	2	100 %
	Total	87	109	196	44,4 %

Tableau III.22 : Tableau de la répartition du phénotype RC+ et RC- en fonction des espèces bactériennes testés.

L'importance de l'incidence de la capacité à fixer le rouge Congo laisse présager de la potentialité à produire des fibres amyloïdes. Après l'analyse de la bibliographie, nous avons choisi une protéine amyloïde pour chacune des espèces *E. coli* et apparentées, *P. aeruginosa* et apparentées et *S. epidermidis*. Si le choix de CsgA pour *E. coli*, et de FapC pour *P. aeruginosa* a été naturel, ces protéines étant les seules protéines amyloïdes décrites chez ces

espèces, le choix de Bap pour *S. epidermidis* a été basé sur une hypothèse, aucune protéine amyloïde n'étant décrite pour cette espèce jusqu'à présent.

II.1.2) Etude *in silico* de CsgA

La protéine CsgA est décrite dans la littérature comme étant capable de former des fibres de nature amyloïde. Nous avons donc décidé d'analyser le score TANGO de la protéine CsgA entière et de chacune des 5 séquences répétées R1, R2, R3, R4 et R5 qui la composent. (Figure III.23). Le logiciel TANGO permet de calculer une probabilité pour un peptide de s'agréger par des feuillettes β intermoléculaires, donc d'éventuellement former des fibres amyloïdes (cf matériels et méthodes). Ceci nous a permis d'identifier les peptides modèles que nous allons utiliser dans notre étude.

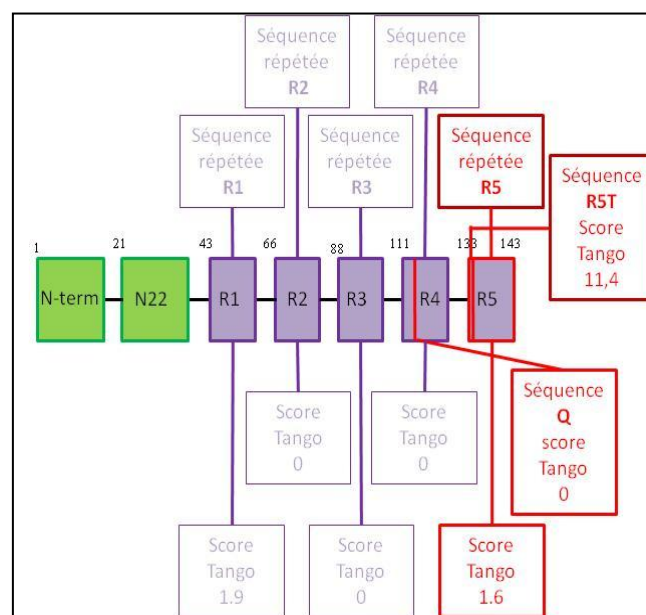


Figure III.23 Score TANGO de la protéine CsgA d'*Escherichia coli*. Les chiffres présents au dessus des blocs correspondent à la position de l'acide aminé dans la protéine.

La protéine CsgA a un score TANGO de 5,90. Ce score reflète une forte probabilité de formation de fibres de type amyloïde dans un tampon à pH 7 avec 200mM de sels. Ces résultats prédictifs sont en accord avec l'étude de Wang X et collaborateur en 2007 qui ont montré que les sous unités de CsgA formaient des fibres de nature amyloïde. En revanche, il est surprenant de voir que les scores TANGO des sous-unités R2, R3, et R4 soient nuls car il a été montré que celles-ci formaient aussi des fibres de natures amyloïdes (Cherny I, et col, 2005).

Nous avons aussi identifié trois séquences particulières: les peptides nommés R5, R5T et Q. Nous avons choisi le peptide Q car ce peptide est la séquence consensus de la protéine CsgA déterminé par Cherny et col en 2005 pour la formation de fibres. Ce peptide a un score TANGO de 0 dans les conditions de pH et de salinité paramétrées pour le test. D'autre part, nous avons également effectué notre étude sur la sous unité R5 complète pour avoir un témoin positif et une molécule comparable à celle utilisée dans la publication de Wang et col en 2007. Enfin, parmi les séquences testées, la séquence R5T est la séquence ayant le score TANGO le plus élevé au sein de CsgA. Ainsi, le peptide R5T sera le modèle de formation de fibres avec un nombre réduit d'acides aminés. L'utilisation de cette séquence plus courte, permet de ne travailler que sur la partie de la protéine formant des fibres. Les trois peptides retenus sont donc :

- R5, de séquence : SSVNVTQVGFGNNATAHQY
- R5T, de séquence : SVNVTQVGFG
- Q, de séquence : QFGGGN

II.2.3) Etude in silico de FapC.

L'étude *in silico* de la protéine FapC grâce au logiciel TANGO a permis d'identifier plusieurs séquences particulières internes à la protéine pouvant être importante pour son agrégation sous forme de fibres. Tout d'abord, le score TANGO de la protéine entière est assez élevé (379,2). Ce score est en adéquation avec le fait que cette protéine a déjà été identifiée comme pouvant former des fibres amyloïdes (Dueholm M S, et col, 2010).

L'étude de la séquence protéique de FapC (Figure III.24) montre aussi que le premier motif de répétition R1 n'est pas prédit comme capable de former des fibres. En revanche, les séquences correspondant aux motifs L1 et R2, ont-elles un score TANGO élevé, respectivement 276 et 137. La séquence L2 a un score TANGO nul, ce qui peut être lié au fait que les répétitions en son sein par rapport à L1 sont imparfaites et que ces modifications soient sur des acides aminés clés pour la formation de fibres. Un octapeptide particulier de la séquence R2 a attiré notre attention car il possède le score TANGO le plus élevé de toutes les

séquences internes à la protéine FapC testées. Nous continuerons donc notre étude avec ce peptide issu de FapC, de 8 acides aminés, nommé R2T et de séquence : NNLAIVTA.

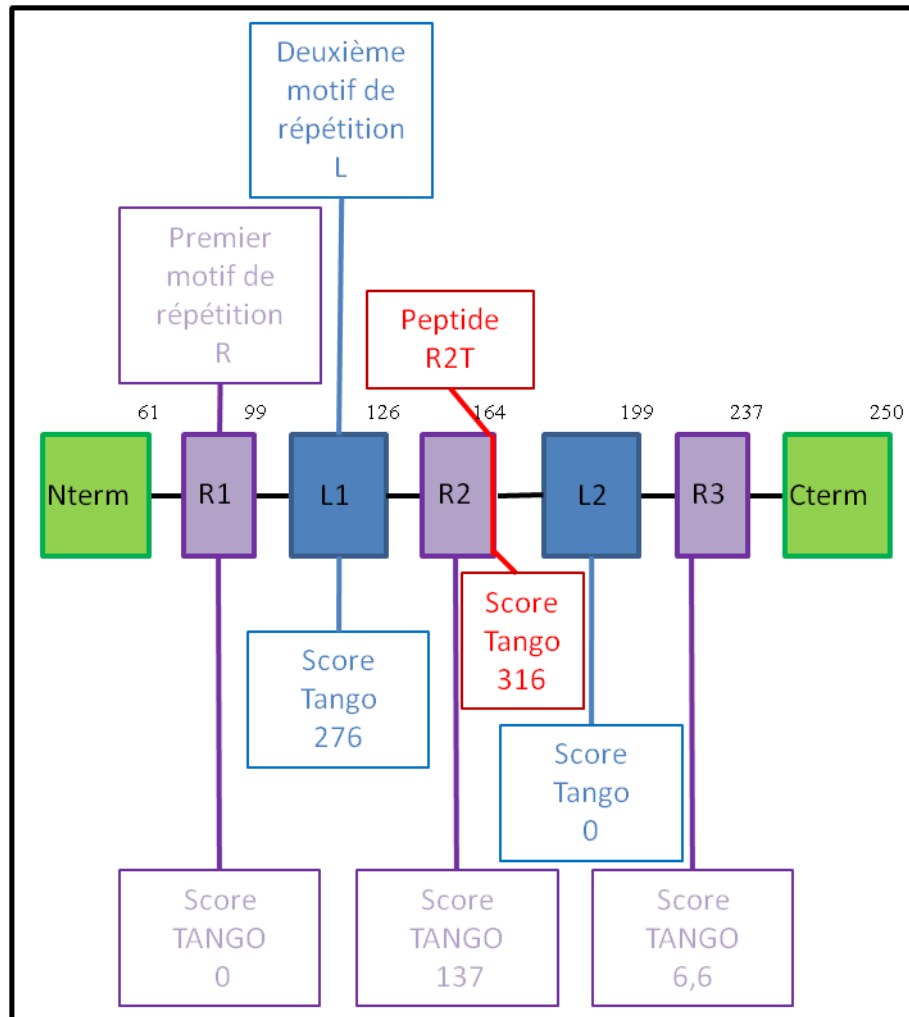


Figure III.24 : Score TANGO de la protéine FapC de *P. aeruginosa*

II.2.4) Etude *in silico* de Bap.

L'analyse TANGO de la protéine Bap (Figure III.25) de *S. epidermidis* montre une forte probabilité de s'agréger avec des feuilletts β . L'analyse de la séquence complète de cette protéine de 2736 acides aminés ne peut être effectuée car le logiciel ne peut analyser qu'une séquence ne dépassant pas 500 acides aminés. Les séquences répétées semblent jouer un rôle clé dans la formation de fibres amyloïdes, par conséquent, la séquence des acides aminés 361 à 820 n'a pas été étudiée. En revanche, l'analyse des séquences répétées a permis d'identifier différents peptides d'intérêt. La première séquence répétée de Bap correspondant aux acides aminés 49 à 361 a un score TANGO assez élevé de 337, mais les treize séquences répétées ont un score TANGO quatre fois plus élevé de 1209. Chaque motif de répétition analysé seul a un score TANGO de 62. Au sein de ces motifs de répétition, un peptide particulier, nommé par la suite R13T, a retenu notre attention. Il s'agit d'un peptide de 7 acides aminés ayant le score TANGO le plus élevé des motifs de répétitions (score de 78). Nous avons donc choisi ce peptide de 7 acides aminés pour réaliser la suite de notre étude et nous l'avons nommé R13T. Sa séquence est la suivante: STVTVTF.

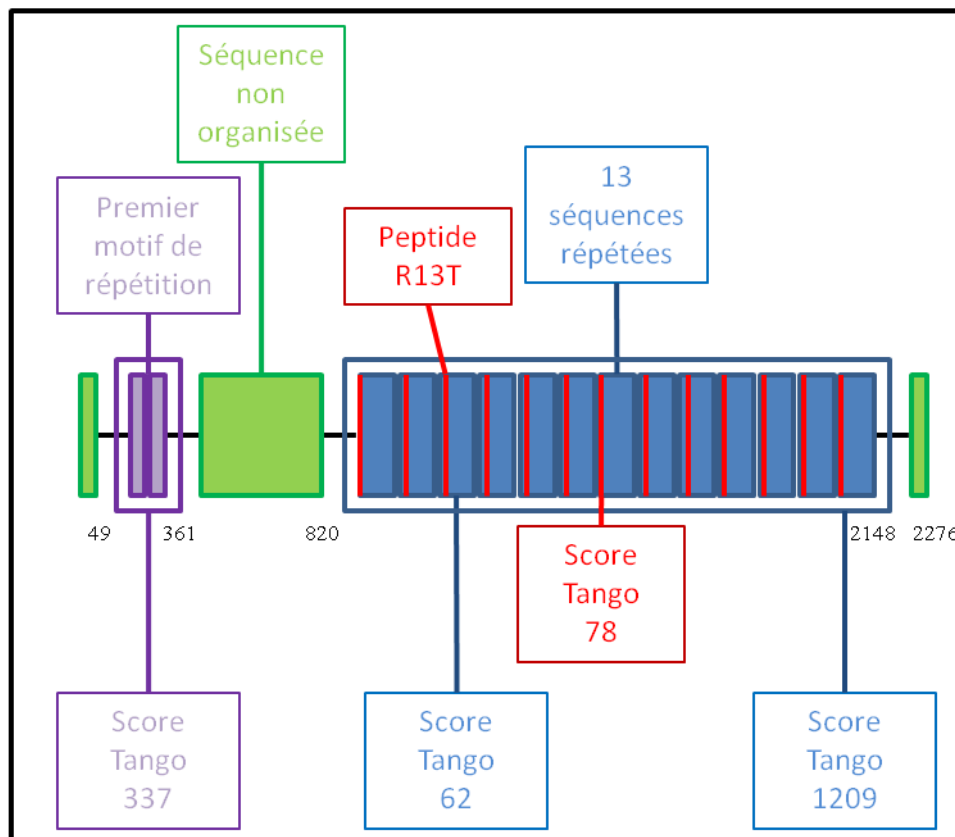


Figure III.25 : Score TANGO de la protéine Bap de *S. epidermidis*.

II.2) Formation de fibres

L'étude *in silico* est une première étape et est une prédiction de la potentialité des peptides choisis à s'agréger et à former des fibres amyloïdes. Nous avons poursuivi l'étude de leur caractère amyloïdogène par des expériences de formation de fibres amyloïdes par les peptides Q, R5, R5T, R2T et R13T. Pour caractériser la présence de ces assemblages peptidiques, nous avons utilisé deux approches différentes : une approche biochimique elle-même multiple, mais aussi une visualisation par imagerie de la présence et de la morphologie de ces fibres.

II.2.1) Caractérisation biochimique de la formation de fibres

Un premier suivi de la formation de fibres par les cinq peptides choisis (Q, R5, R5T, R2T et R13T) a été réalisé par mesure de fluorescence en présence de la thioflavine T (THT). La THT en présence de protéines amyloïdes voit son spectre d'émission de fluorescence décalé pour atteindre un maximum à 482 nm (LeVine H 3rd, 1999). En absence de protéines amyloïdes, l'intensité de fluorescence à 482 nm reste faible. Le premier peptide testé est le peptide Q (Figure III.26). La formation de fibres est testée dans différentes conditions de pH (pH variant de 4 à 9), afin de vérifier si ces conditions influencent la formation de ces assemblages. Ces différentes conditions de pH permettront aussi de vérifier la stabilité des fibres, car leur utilisation dans des matrices synthétiques nécessiteront des passages dans des solutions dans cette gamme de pH.

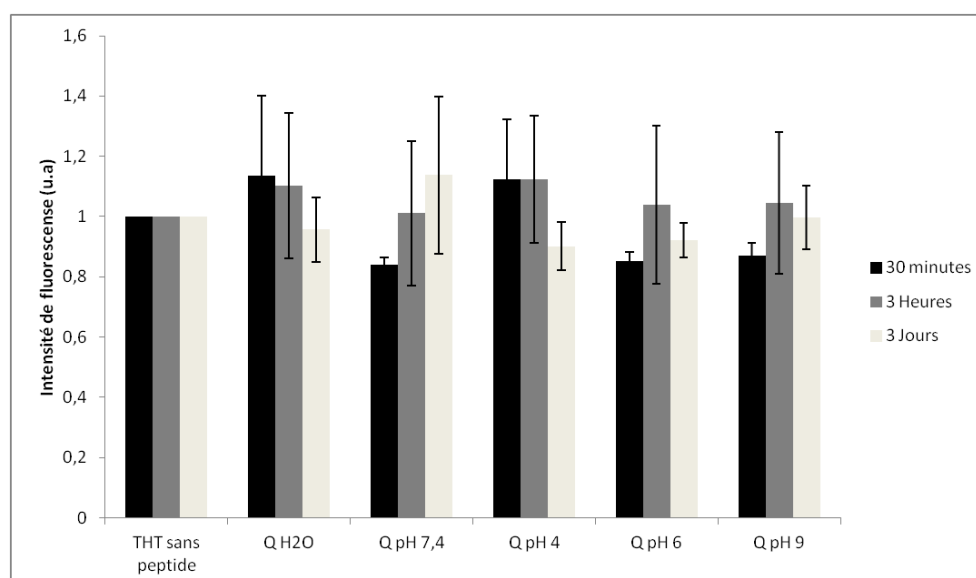


Figure III.6 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide Q à 30 minutes, 3 heures et 3 jours et en fonction du pH d'incubation.

En présence du peptide Q, la fluorescence de la thioflavine T à 482 nm n'augmente pas et ce quel que soit le tampon dans lequel est incubé le peptide et quel que soit le temps d'incubation (30 minutes, 3 heures ou 3 jours). D'après ce test, le peptide Q ne semble donc pas former de fibres dans ces conditions expérimentales.

Pour les tests à la thioflavine T des peptides R5 et R5T, nous avons dû diluer les solutions et travailler à des concentrations de 2 μM car la fluorescence émise en présence de ces peptides était trop importante à 20 μM . On peut alors observer (Figure III.27 et III.28) une très forte augmentation du signal de fluorescence aussi bien à 30 minutes qu'à 3 heures ou à 3 jours d'incubation et ce dans toutes les conditions de pH testées. Le signal de fluorescence augmente de 8 fois avec la sous unité R5 complète et de plus de 20 fois avec le peptide R5T. On peut donc suspecter pour ces deux peptides la formation de fibres amyloïdes dans le mélange réactionnel.

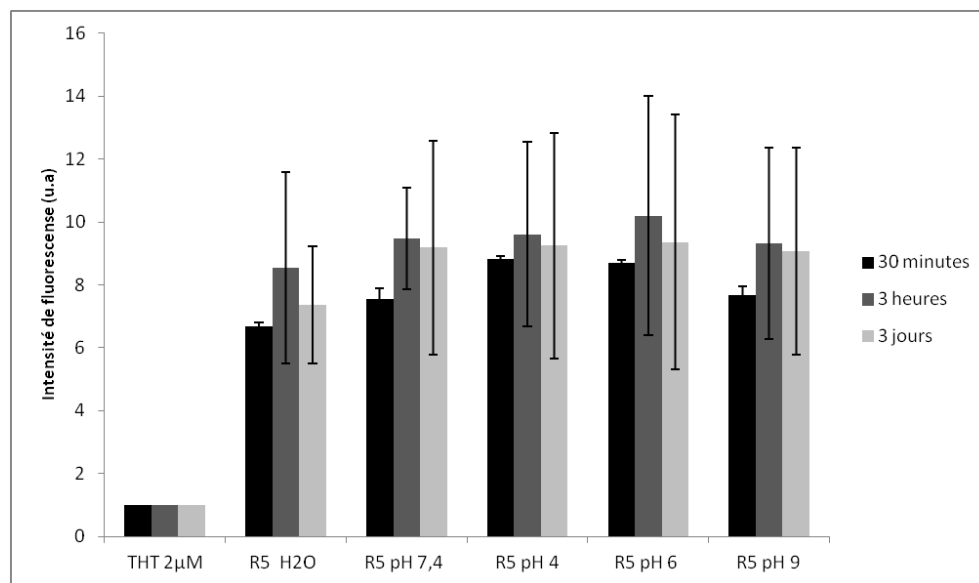


Figure III.27 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide R5 à 30 minutes, 3 heures et 3 jours, en fonction du pH d'incubation.

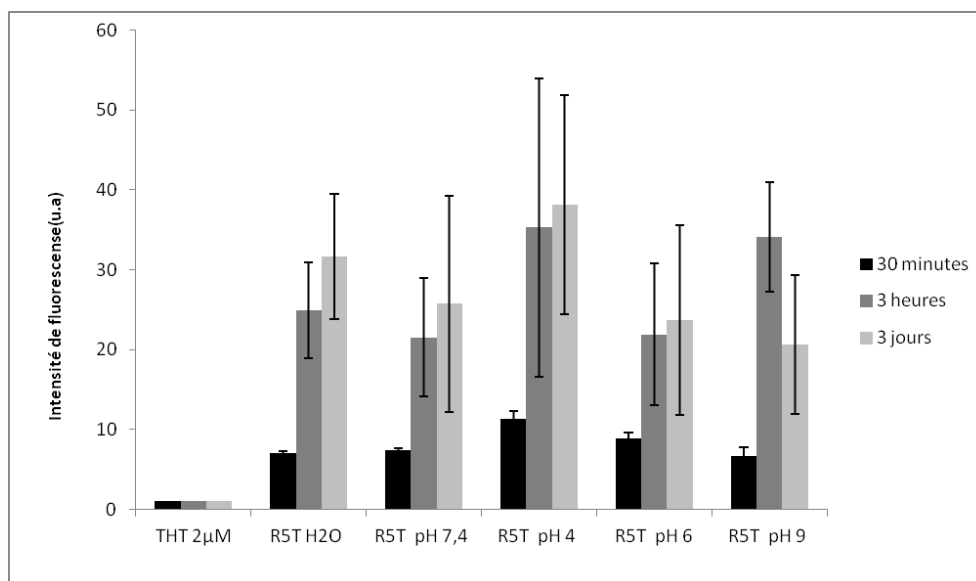


Figure III.28 : Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide R5T à 30 minutes, 3 heures et 3 jours, en fonction du pH d'incubation.

Pour le temps 30 minutes, deux comportements différents sont observés pour les peptides R5 et R5T. Pour la sous unité R5 complète, la fluorescence de la thioflavine T à 30 minutes est quasi identique à celle de 3 heures et de 3 jours. La fixation de la THT par ce peptide semble donc rapide et n'évolue pratiquement plus après 30 minutes d'incubation. En revanche, pour le peptide R5T, l'intensité de fluorescence de la thioflavine T à 482 nm est moins importante à 30 minutes qu'à 3 heures et 3 jours. La fixation de la thioflavine semble donc plus lente pour ce peptide que pour la sous unité R5. Le système continue d'évoluer dans le cas de R5T après 30 minutes pour atteindre une fluorescence à 3 heures d'environ deux fois plus importante. De plus, pour ces deux peptides, il n'y a pas de différence dans les signaux de fluorescence entre 3 heures et 3 jours d'incubation. On peut en déduire que la fixation de la THT est quasiment terminée à 3 heures. L'intensité de fluorescence de la thioflavine T ne présente pas de différence en fonction des conditions dans lesquelles le peptide a été incubé. Le pH n'influencerait pas la formation de fibres amyloïdes par les peptides R5 et R5T. On notera aussi en comparant les deux peptides que la valeur de l'intensité de fluorescence de la thioflavine en présence de R5T après 30 minutes d'incubation est quasi identique à celle de la thioflavine en présence de la sous unité R5 après le même temps d'agitation. Mais dans le cas de R5T, la fluorescence continue de croître pour atteindre des valeurs 3 à 4 fois plus importantes. Ainsi, d'après le test à la thioflavine, ces 2 peptides semblent former des fibres amyloïdes mais avec des mécanismes différents.

En présence du peptide R2T, on observe également une augmentation de la fluorescence de la thioflavine T à 482 nm (Figure III.29). Cette augmentation est moindre que celle observée avec les peptides R5 et R5T mais reste importante. En présence du peptide R2T, la fluorescence de la thioflavine T à 482 nm augmente de plus de 6 fois à 30 minutes et de plus de 3 fois à 3 jours. En revanche, pour ce peptide, la fluorescence de la THT n'est que très peu augmentée quand celui-ci a été incubé au préalable à pH 9. Le pH influencerait donc la formation de fibres amyloïdes ou sa stabilité : un pH basique diminuerait la capacité de ce peptide à former des fibres, les pH acides ou neutre ne changeraient pas, en revanche, cette capacité. On peut aussi observer une baisse de l'intensité de fluorescence de la THT après 30 minutes d'incubation. Cette baisse peut être due à une déstabilisation des fibres, à un arrangement moins favorable à la fixation de la thioflavine, ou encore à une solution non homogène.

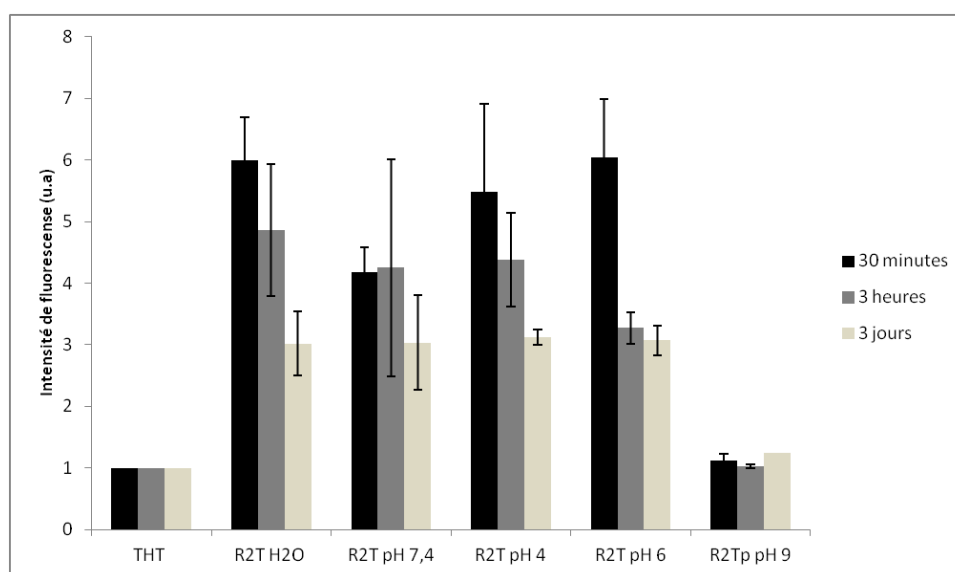


Figure III.29) Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence des peptides R2T à 30 minutes, 3 heures et 3 jours, en fonction du pH d'incubation.

En présence du peptide R13T, l'intensité de fluorescence de la THT n'est que très peu augmentée après 30 minutes d'incubation (Figure III.30). En revanche après 3 heures et trois jours, celle-ci est augmentée d'un facteur 3 à 4. La formation des structures seraient donc plus lente à se mettre en place. En revanche, l'intensité de fluorescence n'évolue pas entre 3 heures et 3 jours d'incubation. Les structures formées seraient donc stables dans le temps. De plus, comme pour le peptide R2T, à pH 9, il n'y a pas d'augmentation du signal de fluorescence. Le pH influencerait donc la formation de fibres amyloïdes ou leur stabilité. Un pH basique

diminuerait la capacité de ce peptide à former des fibres stables, les pH acides ou neutre ne changeraient pas, en revanche, cette capacité.

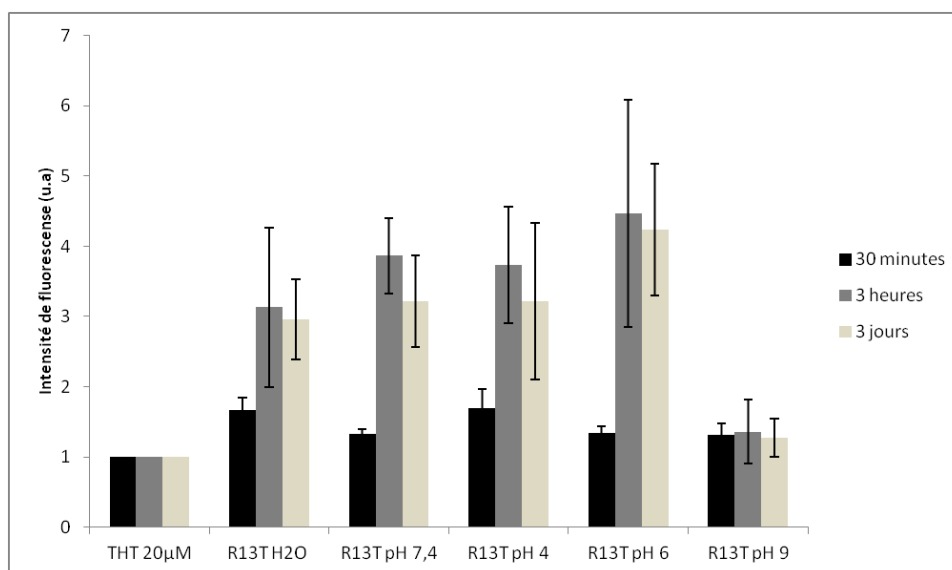


Figure III.30) Fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence du peptide R13T à 30 minutes, 3 heures et 3 jours, en fonction du pH d'incubation.

Pour l'analyse de tous les peptides, on remarque la présence d'écart-types élevés qui peuvent être dus à plusieurs facteurs. La présence de fibres dans le milieu réactionnel le rend non homogène, augmentant ou diminuant de façon locale la concentration en peptides et rendant le pipetage compliqué. De plus, les fibres peuvent être encombrantes et ne pas pouvoir entrer correctement dans le cône de pipetage. Ces deux problèmes peuvent expliquer en grande partie la présence d'écart-types aussi importants. Nous pouvons aussi observer une tendance à la diminution de l'intensité de fluorescence de la THT en fonction du temps d'incubation avec le peptide R2T. La fixation de la THT et donc les fibres formées seraient moins stables dans le temps pour R2T que pour les peptides R5, R5T et R13T.

De plus, l'intensité de fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence des peptides R5 et R5T est beaucoup plus importante qu'en présence des peptides R2T et R13T. Ces résultats suggèrent soit une organisation différente des fibres, soit un nombre plus important de fibres dans le milieu réactionnel. Les images de ces fibres en microscopie à lumière polarisée et à force atomique permettront de valider ou non ces hypothèses.

Afin de confirmer les résultats de fixation de la thioflavine T par les peptides, une deuxième analyse colorimétrique est effectuée en présence de Rouge Congo (RC). La confirmation de ces résultats par différentes techniques est importante car les tests aussi bien à la thioflavine T qu'au RC peuvent générer des faux positifs. Le RC se fixe aux fibres

protéiques de type amyloïde. La fixation du rouge Congo sur les fibres entraîne un décalage de son spectre d'absorbance avec un maximum d'absorbance qui passe de 488 nm à 540 nm (Klunk W E, et col, 1999).

En présence du peptide Q (Figure III.31), après 3 jours d'incubation, le spectre d'absorbance du RC reste inchangé. Le maximum d'absorption reste à 488 nm, et cela quelles que soient les conditions d'incubation (pH de 4 à 9). Ces résultats confirment ceux obtenus avec le test à la THT.

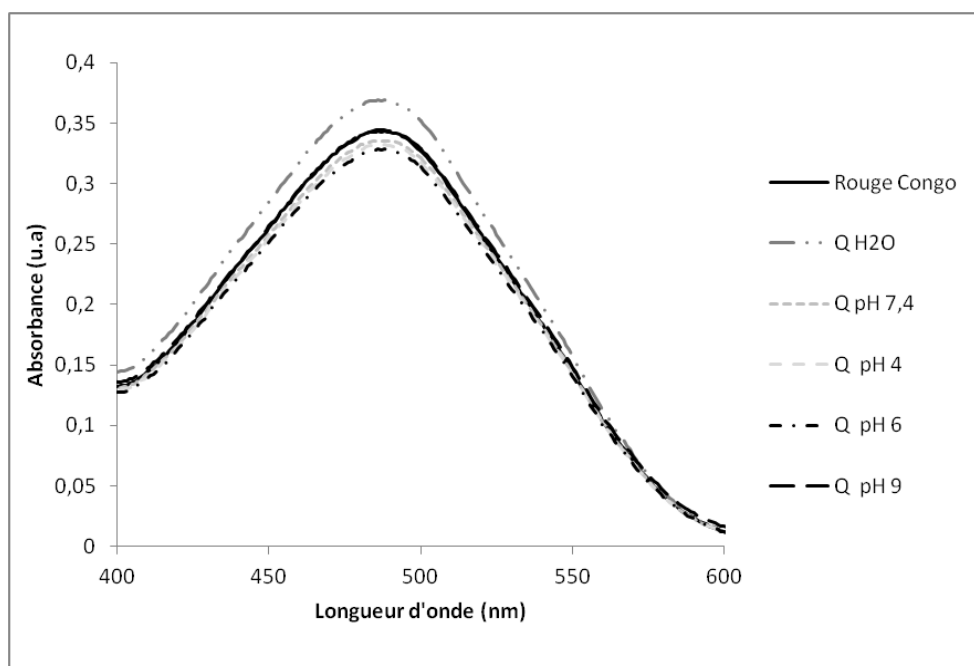


Figure III.31 : Spectre d'absorbance du rouge Congo en présence du peptide Q après 3 jours d'incubation à différents pH.

En présence des peptides R5 et R5T, on observe un décalage du spectre d'absorption du RC vers 540 nm (Figure III.32). Dans le cas de la sous unité R5, le spectre d'absorbance est décalé vers le rouge par un épaulement du pic d'absorption vers 550 nm, ce qui est caractéristique de la présence de rouge Congo fixé à des fibres de type amyloïde (Cherny I, et col, 2005). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus avec le test de la thioflavine T. Un décalage du spectre d'absorption du RC est également observé avec le peptide R5T.

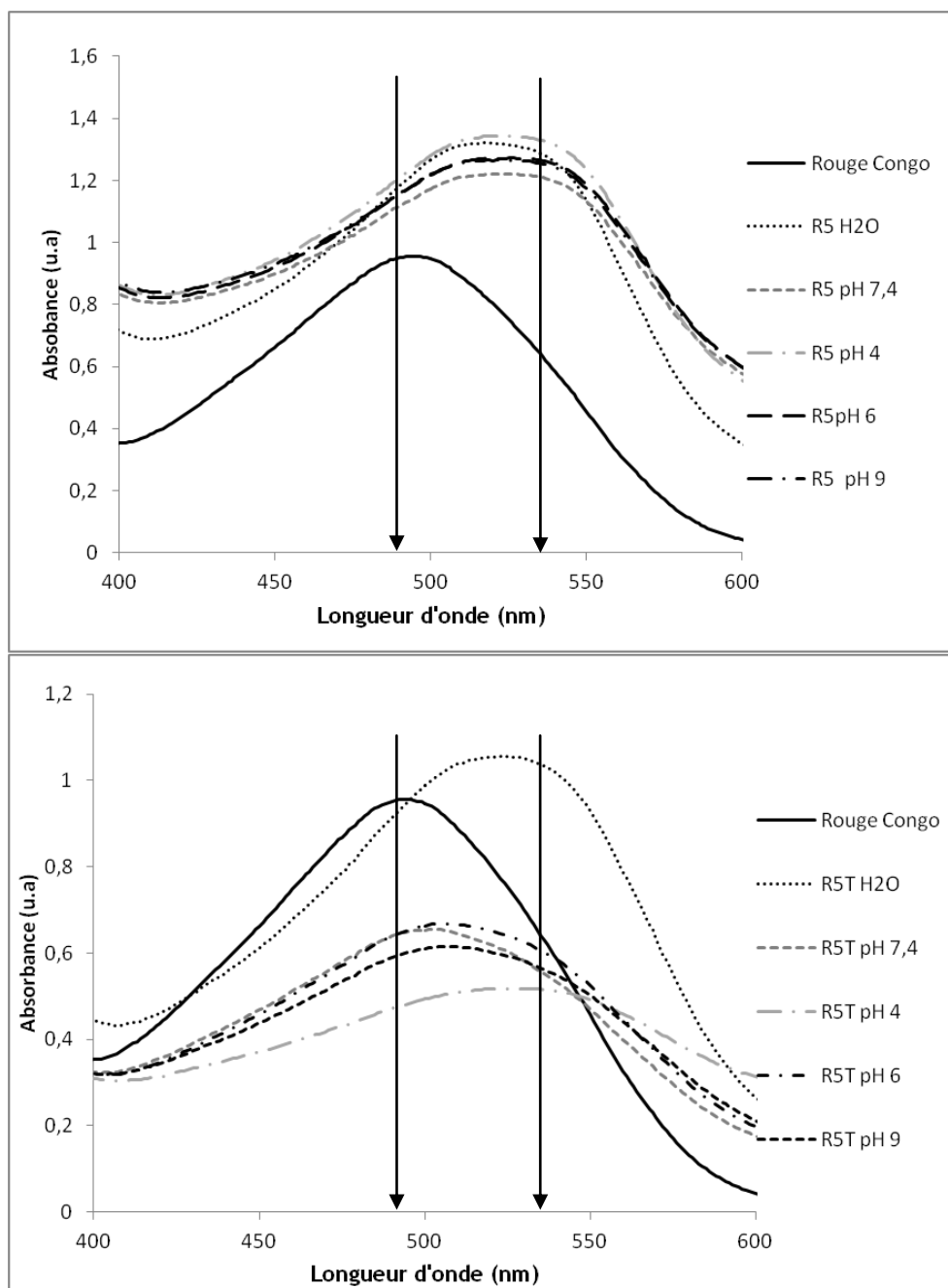


Figure III.32 Spectres d'absorbance du rouge Congo en présence des peptides R5 et R5T après 3 jours d'incubation à différents pH.

De plus, nous pouvons observer clairement un changement de couleur du milieu réactionnel en présence des deux peptides, consécutif à ce décalage du pic d'absorbance (Figure III.33).

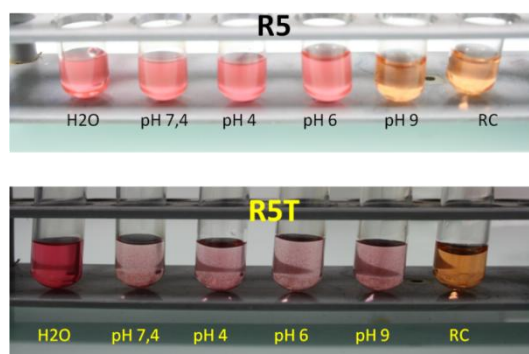


Figure III.33 : Photographie des milieux réactionnels contenant du rouge Congo, les peptides R5 ou R5T incubés dans différentes conditions de pH.

En revanche les spectres d'absorbance du rouge Congo en présence des peptides R2T et R13T ne sont que très peu modifiés, excepté un décalage du spectre d'absorption du RC en présence du peptide R13T à pH 4 (Figure III.34 et III.35). Ces résultats ne sont pas totalement en accord avec ceux des tests en présence de thioflavine T, qui montrent une présence probable de fibres amyloïdes dans toutes les conditions testées. Cela peut s'expliquer par le fait que l'augmentation des signaux de fluorescence de la thioflavine T en présence des peptides R2T et R13T est faible comparée à ceux observés pour les peptides R5 et R5T. De plus, les tests à la thioflavine T sont en général plus sensibles que les tests de liaison au rouge Congo (Khurana R, et col, 2005). D'après ces résultats, nous pouvons supposer que l'organisation des peptides R5 et R5T au sein des fibres pourrait être plus favorable à la liaison de la thioflavine T que du rouge Congo. Notons également, que d'après la littérature, un décalage du pic d'absorbance du rouge Congo est un phénomène classique lié à l'interaction du colorant avec les fibres. Cependant, l'augmentation (pour R5) ou la diminution d'absorbance (pour R5T à pH 4 à 9) consécutives à ce décalage sont des observations rarement commentées car encore non expliquées. Elles pourraient être dues à une différence d'arrangement des fibres selon les conditions.

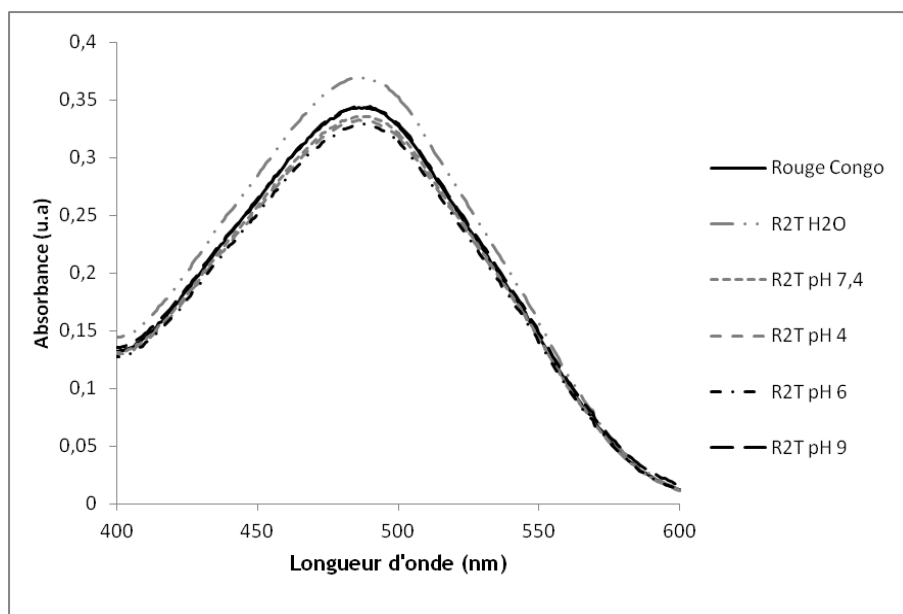


Figure III.34 Spectres d'absorbance du rouge Congo en présence des peptides R2T après 3 jours d'incubation à différents pH.

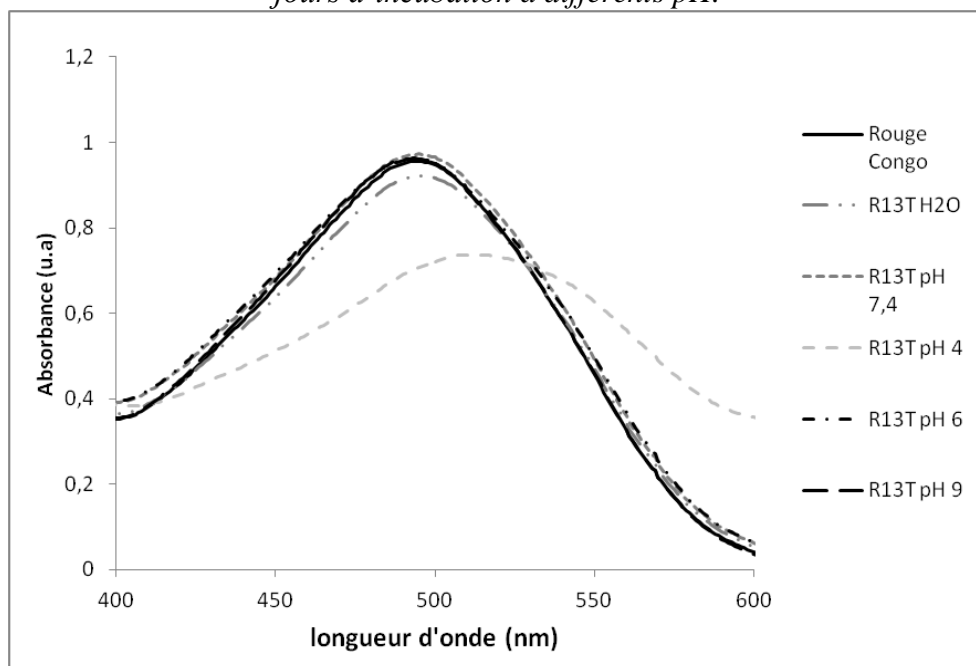


Figure III.35 Spectres d'absorbance du rouge Congo en présence des peptides R13T après 3 jours d'incubation à différents pH.

Pour compléter ces observations et éventuellement expliquer les divergences de résultats obtenus entre les tests à la THT et les tests au RC, une analyse des spectres d'absorption infrarouge des différents peptides a été effectuée. La spectroscopie infrarouge et surtout l'analyse de la bande amide-I permet de nous renseigner sur la structure des protéines (voir chapitre 2 et Byler D M, et col, 1986). Le calcul de la dérivée seconde du spectre d'absorption du rayonnement infrarouge permet de déterminer les pics d'absorption présents dans le spectre.

L'observation des spectres d'absorption infrarouge et de leur dérivée seconde montre la présence d'un pic d'absorption pour tous les peptides, à 1672 cm^{-1} (Figure III.36). Ce pic est caractéristique de la présence d'acide trifluoroacétique (TFA), un solvant utilisé pour la synthèse des différents peptides. On peut aussi observer pour tous les peptides hormis le peptide Q, la présence d'un fort pic d'absorption du rayonnement infrarouge aux alentours de 1620 cm^{-1} . Ce pic est caractéristique de la présence de liaisons hydrogène entre feuillets β (β), cette structure étant la signature des protéines ou peptides assemblés sous forme de fibres (cf chapitre 1). Pour le peptide Q, l'absence de ce pic d'absorption confirme que celui-ci est quasi totalement sous forme non organisée (NO). Ceci est confirmé par la présence d'un pic d'absorption à 1645 cm^{-1} caractéristique de la présence de structure non organisée (NO). Ce pic est aussi présent en moins grande proportion pour les peptides R5, R5T et R2T et absent pour le peptide R13T. En revanche le peptide R13T est le seul à présenter un pic d'absorption 1661 cm^{-1} . Ce pic est caractéristique de type turn (t).

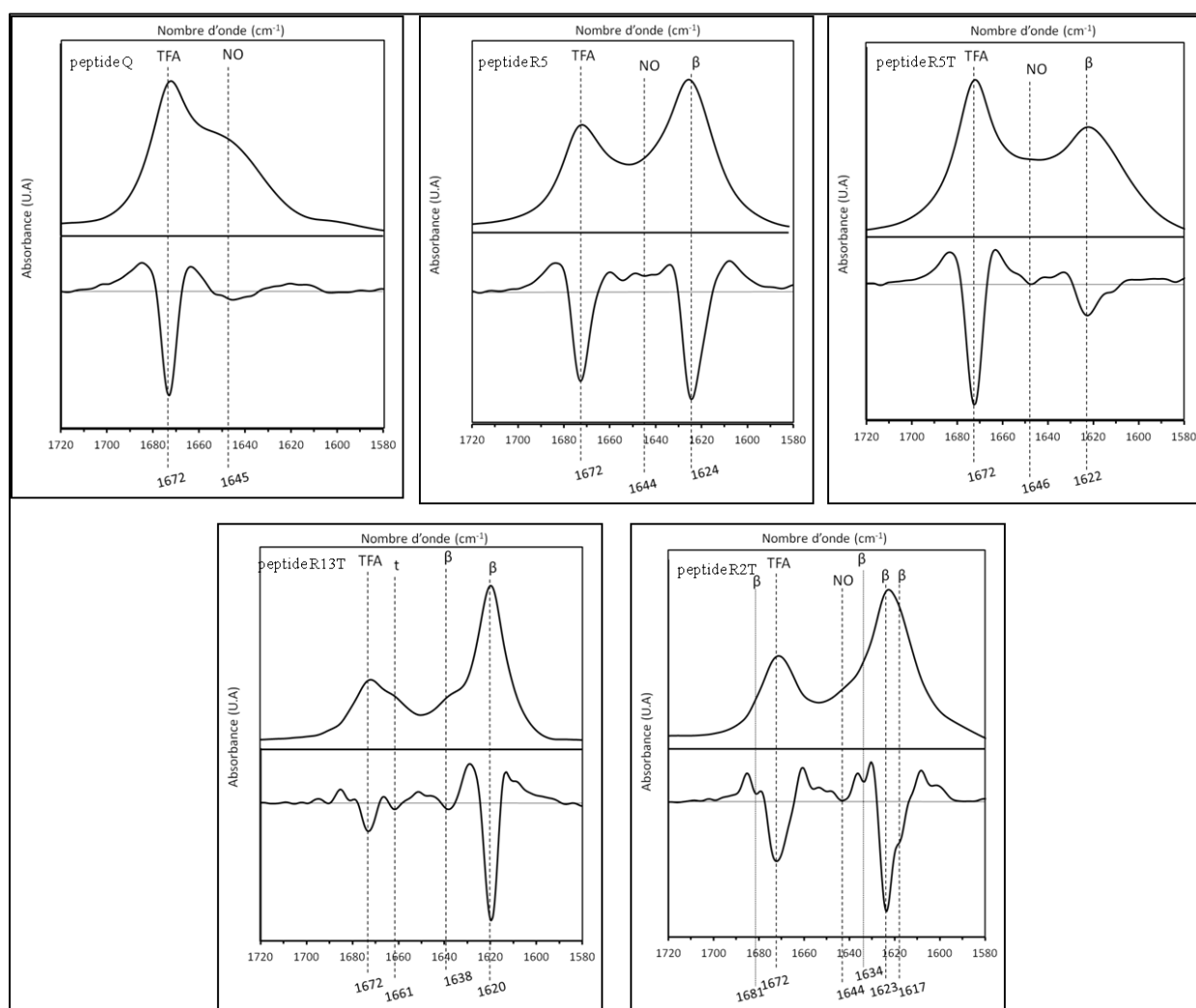


Figure III.36 : Spectres d'absorption infrarouge et leurs dérivés seconde des peptides Q, R5, R5T, R13T et R2T.

L'analyse plus précise du pic d'absorption à 1620 cm^{-1} montre aussi des différences entre les peptides. Les peptides R5, R2T, et R13T semblent avoir plus de liaisons hydrogène entre les feuillets β que le peptide R5T. Cette observation nous conforte dans l'hypothèse que l'arrangement des peptides au sein des fibres formées est différent.

L'analyse en spectroscopie infrarouge précise les résultats obtenus avec les tests à la thioflavine T et au Rouge Congo et permet de trancher sur la potentialité de formation de fibres par les différents peptides étudiés. Pour le peptide Q, il apparaît clair que celui-ci, dans ces conditions expérimentales, ne forme pas de fibres en solution. De plus, la présence d'autres structures doit influencer les signaux émis en fluorescence. Ces autres structures pourraient ne pas permettre la fixation de la totalité de la THT entraînant une baisse de l'intensité de fluorescence. Ces superstructures vont pouvoir être imagées et caractérisées en microscopie.

II.2.2) Caractérisation de la formation de fibres par imagerie

II.2.2.1) Etude de la biréfringence du rouge Congo lié au peptide R5 par microscopie confocale. Comparaison avec la technique de référence.

Afin de visualiser les fibres, celles-ci sont déposées sur une lame de verre en présence de rouge Congo. Ces dépôts sont ensuite imagés en lumière transmise et en lumière polarisée, sur un microscope à lumière polarisée « classique » et sur un microscope confocal. L'analyse de ces images va permettre de valider l'utilisation du microscope confocal pour imager des structures en lumière polarisée. Cette validation est réalisée avec le peptide R5.

L'analyse des images avec un microscope à lumière polarisée (Figure III.37), montre en lumière non polarisée que le peptide R5 fixe le rouge Congo et forme des amas à la surface de la lame de verre quel que soit le pH d'incubation. En lumière polarisée, on peut voir que ces amas colorés au rouge Congo deviennent biréfringents, c'est-à-dire qu'il dévie le faisceau de lumière polarisée et prennent une couleur verte brillante caractéristique

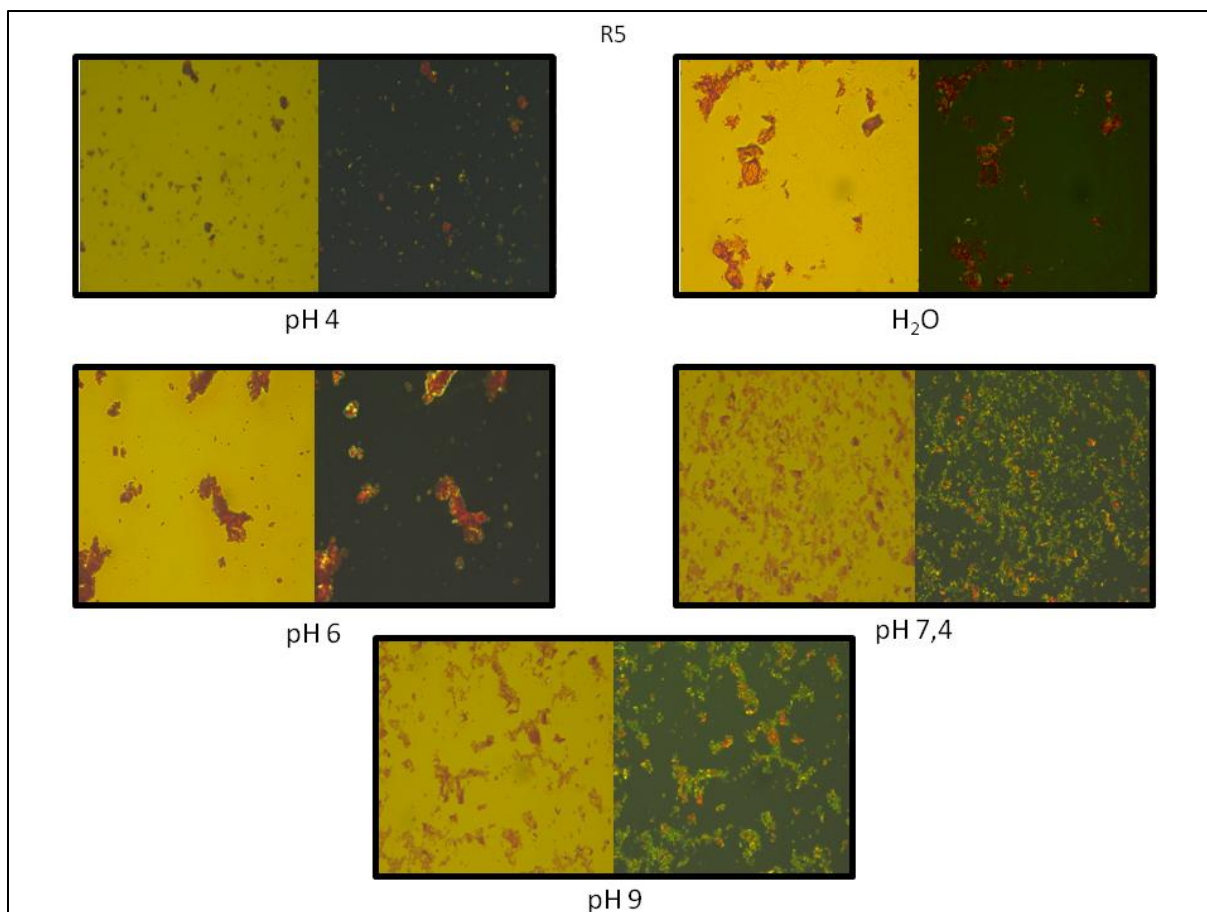


Figure III.37 Photographies en lumière transmise (gauche) et en lumière polarisée (droite) du dépôt des fibres du peptide R5 sur lame de verre en présence de rouge Congo après incubation à différents pH. Grossissement X20 avec un microscope à lumière polarisée.

L'observation des lames en présence du peptide R5 avec le microscope confocal, montre la présence d'amas de taille variable dans toutes les conditions de pH (Figure III.38). De plus, ces amas ont fixé le rouge Congo indiquant le caractère amyloïde. Nous pouvons donc observer que dans l'eau, à pH 4 et à pH 9, ces agrégats sont de plus petites tailles que ceux formés à pH 6 et 7,4. De plus, les échantillons formés dans l'eau et à pH 4 et 9, semblent contenir plus de fibres isolées que les fibres assemblées à pH 6 et 7,4. Lorsque les mêmes lames sont observées sous lumière polarisée, nous pouvons remarquer que le rouge Congo fixé aux amas devient biréfringent. Cette information nous conforte dans l'hypothèse que celui-ci est au moins en partie fixé aux fibres qui sont de nature amyloïde.

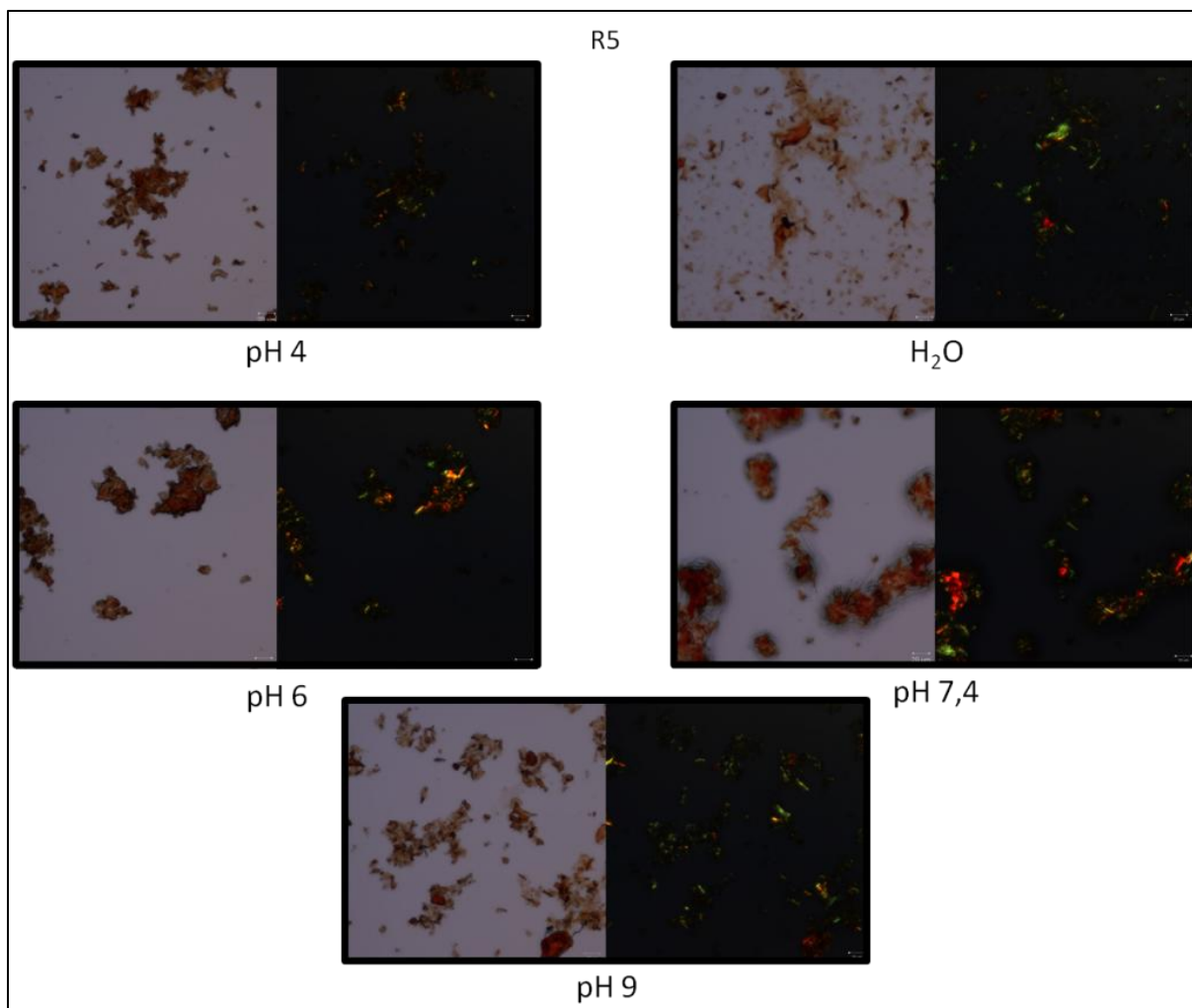


Figure III.38 : Photographies en lumière transmise (gauche) et en lumière polarisée (droite) du dépôt des fibres du peptide R5 sur lame de verre en présence de rouge Congo après incubation à différents pH. Grossissement X20. Observations faites avec un microscope confocal.

La comparaison des deux techniques montre qu'un microscope confocal en mode lumière polarisée, permet d'obtenir le même type d'image que celles réalisés avec un microscope polarisé classique. Les structures observées ainsi que la biréfringence du rouge Congo est similaire pour les deux techniques. On peut donc continuer d'imager le reste des peptides avec le microscope confocal, permettant d'obtenir des images de meilleure résolution.

II.2.2.2) Etude de la biréfringence du rouge Congo liée aux peptides R5T, R2T et R13T par microscopie confocale.

L'analyse des images en lumière polarisée nous informe sur la structure des fibres qui se forment en présence du peptide R5T (Figure III.39). On peut observer que quel que soit le pH d'incubation, il y a présence d'agrégats de taille plus ou moins importante. Tous les regroupements de peptides ont fixé le RC. En revanche, à la différence des images observées avec le peptide R5, ces structures sont de taille inférieure à celles observées précédemment. Les peptides semblent s'organiser en petites aiguillettes plutôt qu'en gros amas. Une partie du rouge Congo fixé aux peptides est biréfringent en lumière polarisée. Par contre, la biréfringence de celui-ci semble n'avoir lieu que sur les agrégats de petites tailles et en particulier sur les aiguillettes de peptides. Cette observation laisse à penser que ces aiguillettes seraient de nature amyloïde. La conformation des fibres de R5T et de la sous unités R5 complète semblent donc être différente. Tout comme dans le cas de R5, une biréfringence est observée pour une incubation dans l'eau et en tampon à pH de 4, 7,4 et 9 et de manière très faible à pH 6.

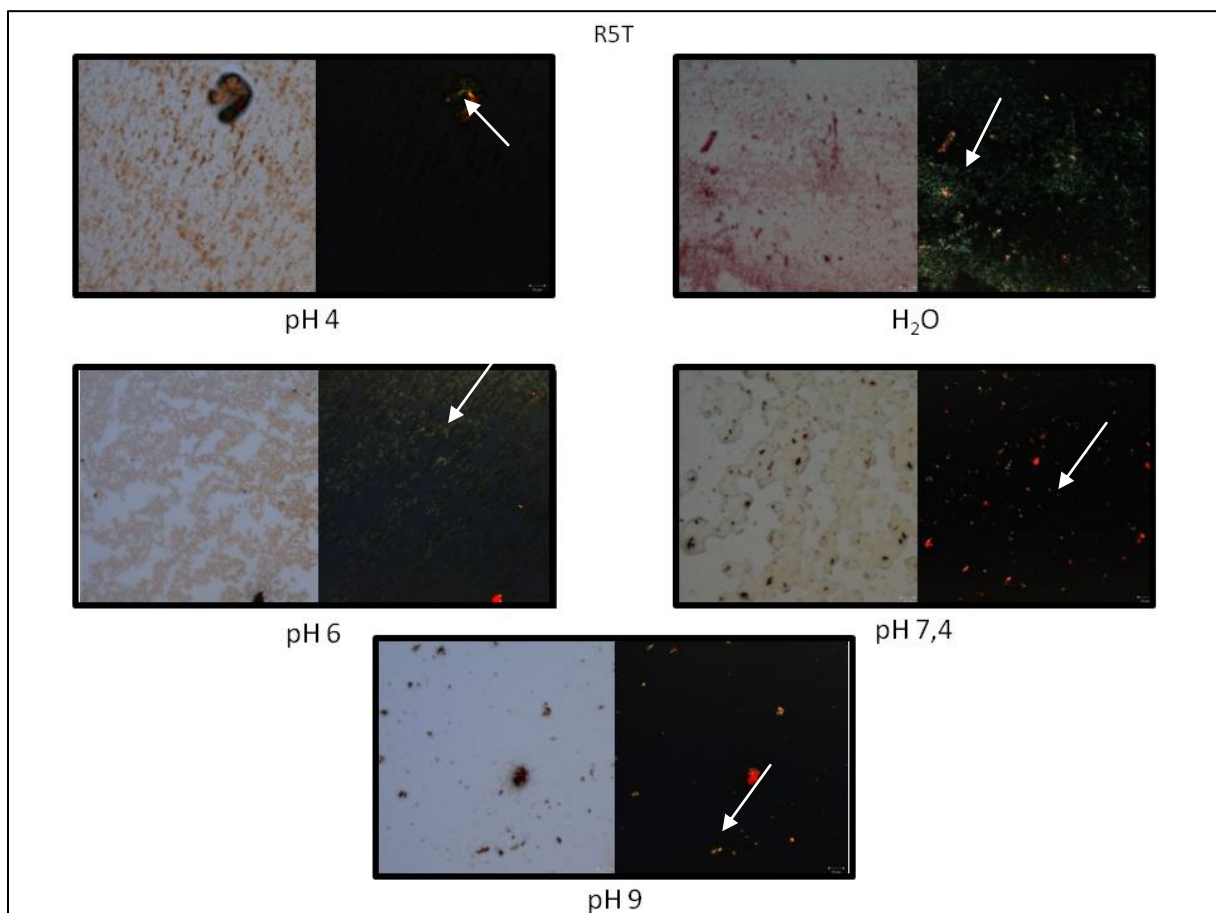


Figure III.39) Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt des fibres du peptide R5T sur lame de verre en présence de rouge Congo. Objectif X20.

L'observation des images en lumière visible du peptide R13T (figure III.40) montre la présence d'agrégats de grande taille dans l'eau et en tampon à pH 7,4. En revanche, à pH 4, 6 et 9, il n'y a pas ce type de structure. Pour ces pH, les structures sont plutôt de type aiguillette.

On peut observer en lumière polarisée, la présence de rouge Congo biréfringent dans toutes les conditions sauf en tampon à pH 6 où celle-ci est très faible. Pour les gros agrégats, on n'observe une biréfringence sur les extrémités comme pour les structures analogues formées par le peptide R5. Pour les tampons à pH 4 et 9, on observe des aiguillettes biréfringentes comme dans le cas du peptide R5T. On peut donc dire que la formation de structure par le peptide R13T est dépendante du pH à laquelle elle se forme. Dans l'eau et à pH 7,4, R13T a tendance à former de gros agrégats de nature amyloïde aux extrémités, en revanche à pH 4 et 9 celui-ci a plutôt tendance à former des aiguillettes de nature amyloïde.

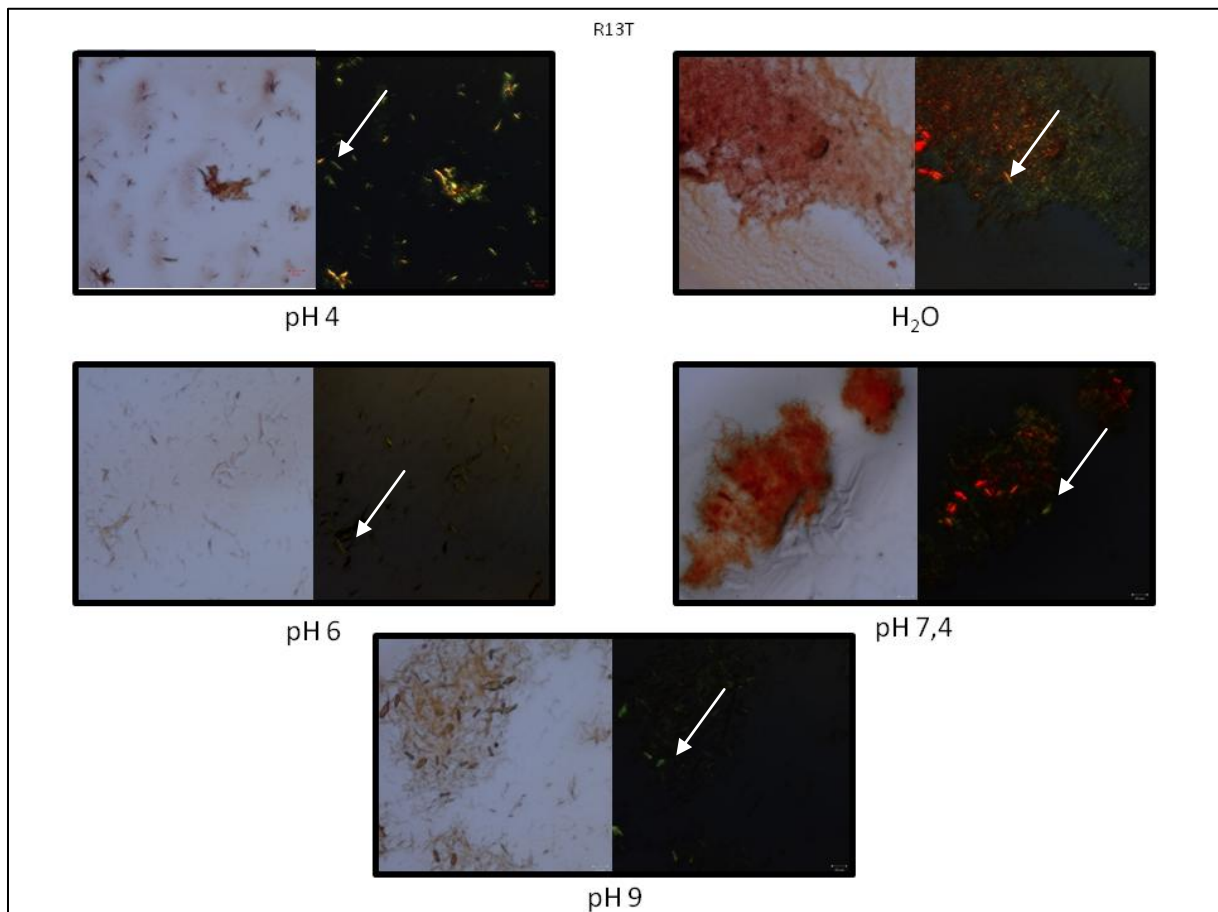


Figure III.40 : Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt des fibres du peptide R13T sur lame de verre en présence de rouge Congo. Objectif X20.

Les images en lumière transmise des dépôts du peptide R2T sur les lames de verre montrent la présence d'agrégats protéiques quelles que soient les conditions de pH d'incubation (Figure

III.41). Cependant, ces structures n'ont pas la même morphologie en fonction des conditions dans lesquelles elles ont été formées. A pH 6 et 9, ces structures semblent de tailles inférieures à celles formées à pH 4 et 7,4 et dans l'eau.

Les images en lumière polarisée nous montrent que ces agrégats sont biréfringents. La présence de biréfringence nous confirme la présence d'assemblages de nature amyloïde.

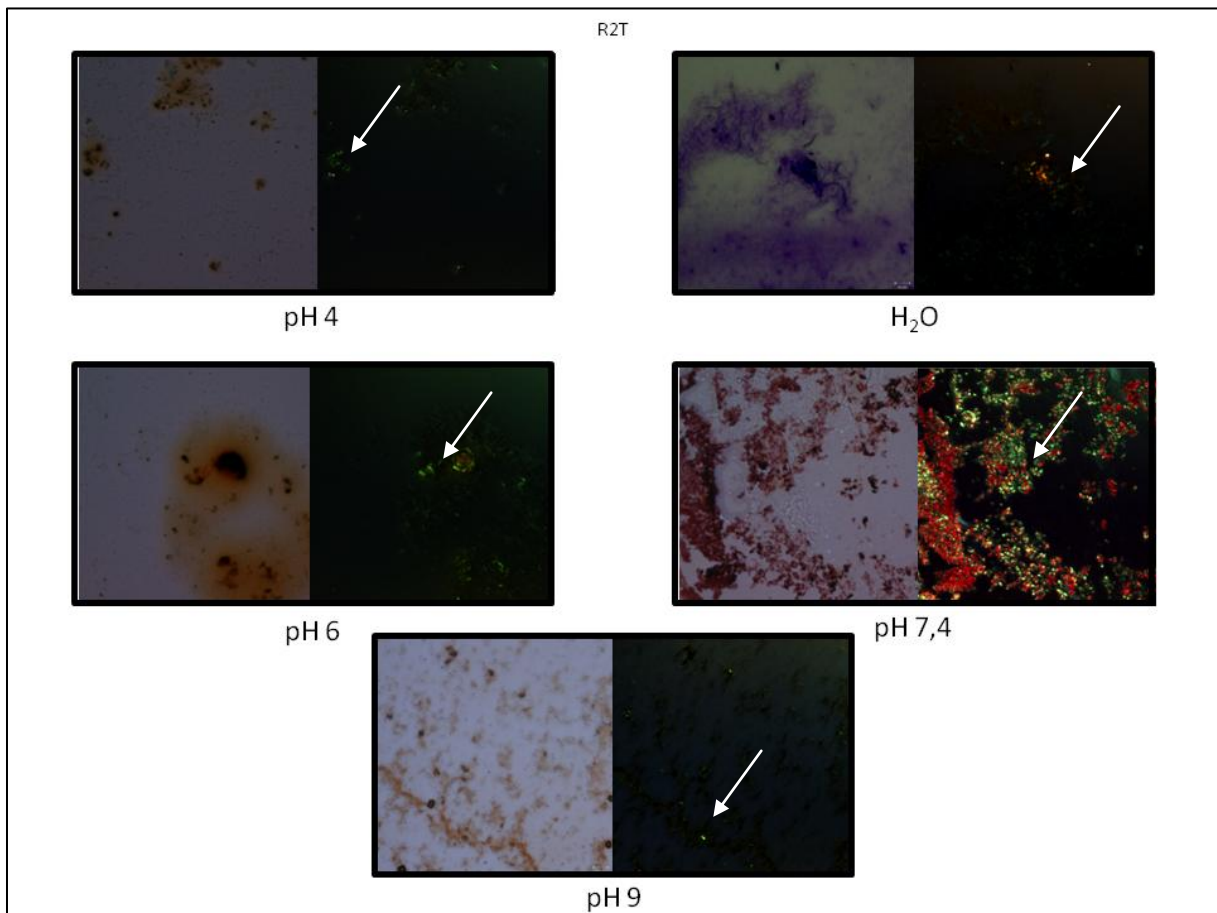


Figure III.41 : Photos en lumière transmise et en lumière polarisée du dépôt des fibres du peptide R2T sur lame de verre en présence de rouge Congo. Objectif X20.

Afin de visualiser les fibres de manières isolées et de préciser leur morphologie, des images en microscopie à force atomique on été réalisées.

II.2.2.3) Etude de la structure des assemblages de peptides par microscopie à force atomique.

En microscopie à force atomique (AFM), le fort grossissement permet de voir plus en détail les structures observées précédemment en microscopie à lumière polarisée (Figure III.42). Cela permettra de préciser la structure et l'organisation des assemblages de fibres et de déterminer la taille des fibres les plus petites.

Pour ces expériences, les fibres sont formées dans l'eau, déposées sur lame de verre et séchées avant observation.

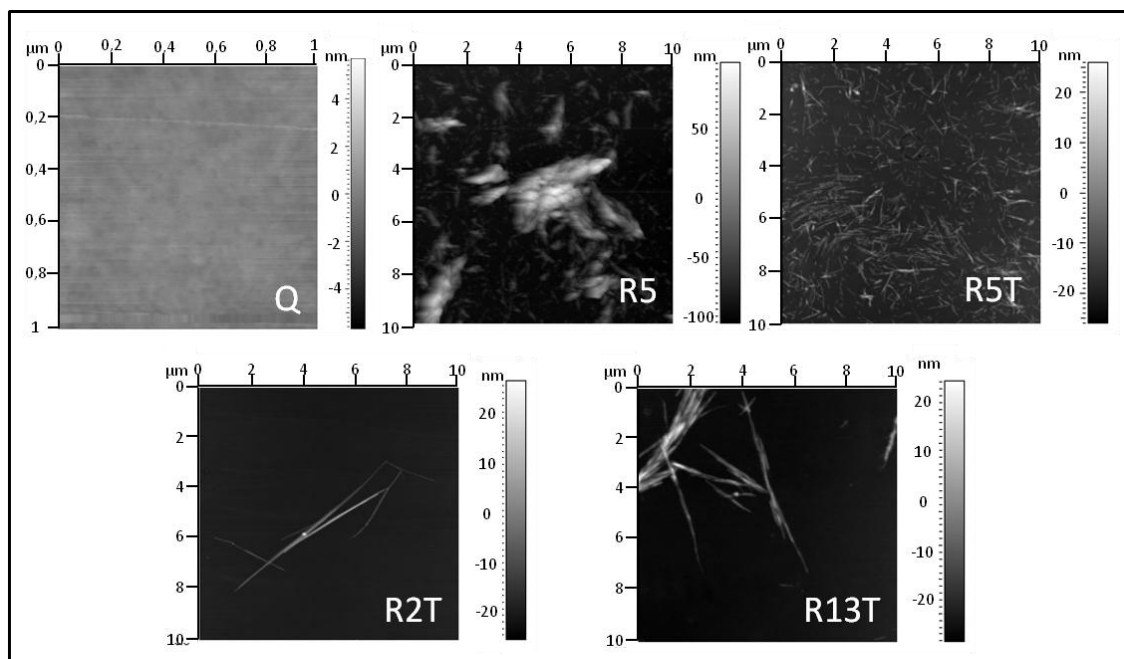


Figure III.42 : Image en microscopie à force atomique des peptides Q, R5, R5T, R2T et R13T sur lame de verre

On peut observer qu'il n'y a pas de structure visible en présence du peptide Q (Figure I.2.b.3.1). Celui-ci ne présente donc pas d'amas ou d'agrégation protéique. En revanche, pour les peptides R5, R5T, R2T et R13T, il y a une forte présence de fibres et/ou d'amas. Différents types d'assemblages sont observables. Pour le peptide R5T, les amas peptidiques semblent former de petites aiguilles distinctes les unes des autres. Leur taille moyenne est d'environ 746 nm, pour un diamètre de 142 nm (Tableau III.43). Le peptide R5 forme lui aussi des petites aiguilles, mais en plus il y a formation de gros amas de ces structures allant jusqu'à 2 μm de long pour 1 μm de large. De plus, les fibres isolées observées sont de taille 2 fois inférieure à celles du peptide R5T, de l'ordre de 0,373 μm de long pour un diamètre

d'environ 87 nm. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par l'équipe de Wang X et collaborateur qui ont montré que les fibres formées par R5 étaient plus rigides et plus riches en amas (Wang X, et col, 2007). Pour les peptides R2T et R13T, la taille des fibres est beaucoup plus importante. Les structures observées sont proches des 3 μm de long pour un diamètre entre 200 nm et 140 nm. En revanche, ces fibres semblent être constituées d'assemblage de fibrilles de taille plus petite. Mais la résolution de l'AFM ne permet pas de détailler chacune des fibrilles. Notons, qu'aucune structure plus petite n'a été observée durant les expérimentations, ce qui confirme que ce super-assemblage est la conformation normale de ces fibres dans ces conditions. Les différences observées en AFM peuvent expliquer en partie celles observées par les autres techniques. Les structures sur lames de verre observées étant différentes, la fixation de la thioflavine T, du rouge Congo peuvent en être modifiée.

	R5	R5T	R2T	R13T
Longueur moyenne (μm)	0,373 μm +/-0,05 μm	0,746 μm +/- 0,2 μm	3,1 μm +/- 0,8 μm	2,85 μm +/-0,5 μm
Diamètre moyen (nm)	87 nm +/-40 nm	142 nm +/- 60 nm	207 nm +/-134 nm	141 nm +/- 28 nm

Tableau III.43 Tailles moyennes des fibres observées en microscopie à force atomique.

En conclusion de cette partie portant sur la formation des fibres, nous pouvons dire à partir de l'ensemble des résultats de caractérisation obtenus avec différentes techniques complémentaires que nous avons conçus quatre peptides différents : R5, R5T, R2T et R13T capable de former des fibres de nature amyloïde. Le peptide Q quant à lui ne forme pas ce type de structure dans les conditions que nous avons testées. Nous pouvons maintenant nous intéresser aux fonctions que peuvent avoir ces structures lorsqu'elles sont exprimées par une cellule bactérienne et/ou au sein de biofilms.

II.3) Rôle potentiel des fibres amyloïdes dans l'adhérence bactérienne

Une des fonctions qu'ont les fibres amyloïdes dans le monde bactérien est de promouvoir l'adhérence des cellules sur les surfaces. Nous avons vérifié si cela était le cas pour les fibres que nous avons produit à partir des peptides R5, R5T, R2T et R13T. Pour cela, les fibres à

différentes concentrations ont été déposés sur des plaques de polystyrène, et l'adhérence au bout de 3 heures d'incubation pour trois souches bactériennes appartenant à chacune des trois espèces *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* et *S. enterica*, a été testé. Chaque expérience a été réalisée à trois reprises de manière indépendante.

L'adhérence de 100% correspond à l'adhérence à la surface du puits de plaque en absence de peptide. L'adhérence des trois souches bactériennes testées semble être affectée par la présence du peptide Q sur la surface de polystyrène (Figure III.44). En effet, à des concentrations en peptide supérieures à 0,2 mM, l'adhérence bactérienne est diminuée quelle que soit la souche utilisée. Pour les concentrations inférieures à 0,2 mM en peptide Q, deux comportements différents sont observés : pour la souche *P. aeruginosa* NK125502 et *S. epidermidis* CIP 53.124 l'adhérence à la surface semble quasi-identique en présence du peptide qu'en son absence, pour la souche *S. enterica* CIP 58.58, l'adhérence est diminuée pour toutes les concentrations en peptide Q.

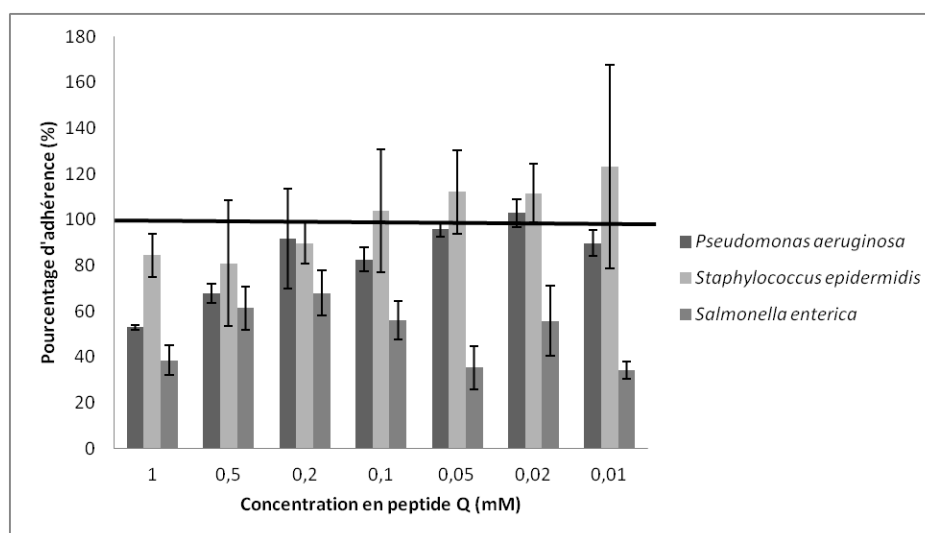


Figure III.44 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes : *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53124 et *S. enterica* CIP 58.58 sur une surface de polystyrène ou différentes concentrations de peptide Q sont déposées.

En présence du peptide R5 (Figure III.45), l'adhérence des trois souches bactériennes sur la surface semble modifiée. Là encore, les modifications dépendent de la concentration en peptide. Pour les plus fortes concentrations (1 mM et 0,5 mM) l'adhérence des trois souches est fortement diminuée. Pour une concentration de 0,2 mM, aucune tendance claire n'est observée, les écart-types étant très élevés. A 0,1 mM et 0,05 mM, l'adhérence semble augmentée pour les trois souches. Enfin en dessous de 0,05 mM l'adhérence semble inchangée pour les souches NK125502 et CIP 58.58. Les écart-types élevés obtenus avec la

souche *S. epidermidis* CIP 53.124 ne permettent pas de déterminer clairement un effet du peptide R5 sur l'adhérence en deçà d'une concentration de 0,05 mM.

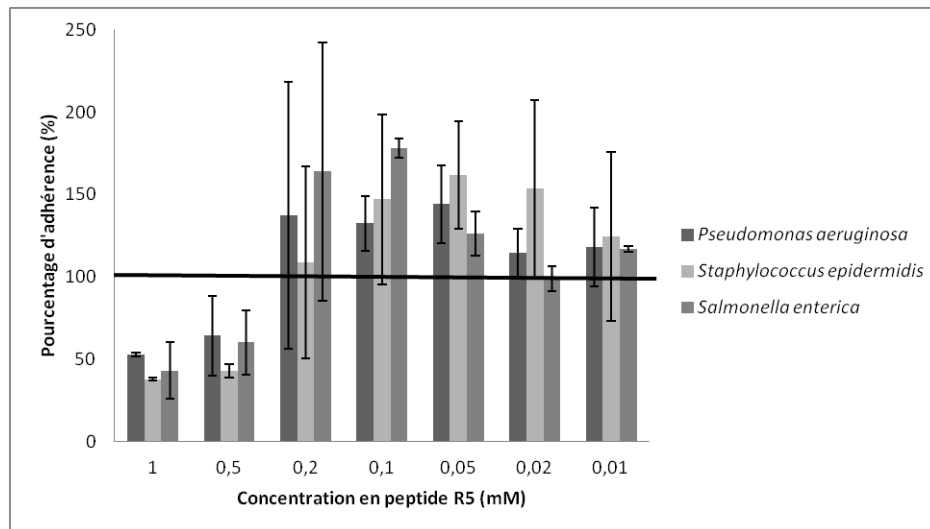


Figure III.45 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes : *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 sur une surface de polystyrène ou différentes concentrations de peptide R5 sont déposées.

En présence du peptide R5T (Figure III.46), un autre profil d'adhérence est encore observé. Au moins deux comportements différents sont observables. Pour la souche *S. epidermidis*, CIP 53.124 l'adhérence en présence du peptide R5T est peu modifiée, elle reste quasi identique par rapport au polystyrène seul quelle que soit la concentration en peptide. En revanche pour *P. aeruginosa* NK125502 et *S. enterica* CIP 58.58, l'adhérence en présence du peptide à une concentration supérieure ou égale à 0,1 mM et 0,05 mM respectivement, est fortement augmentée passant à plus de 150% d'adhérence. Cette augmentation est différente de celles observées avec le peptide R5. En effet, le maximum d'adhérence est obtenu pour la plus forte concentration de 1 mM, alors que pour R5, elle l'était pour 0,1 mM. En présence de peptide à une concentration de 0,02 mM, l'adhérence des trois souches n'est pas modifiée. Curieusement, en présence de peptide à une concentration de 0,01 mM, l'adhérence des trois souches est augmentée de manière sensible. Aucune réponse simple ne peut expliquer ce phénomène, un arrangement différent des peptides sur la surface pourrait expliquer ce type de résultats. Nous devrions donc imager les surfaces recouvertes par ce peptide afin de déterminer si son dépôt est identique à toutes les concentrations.

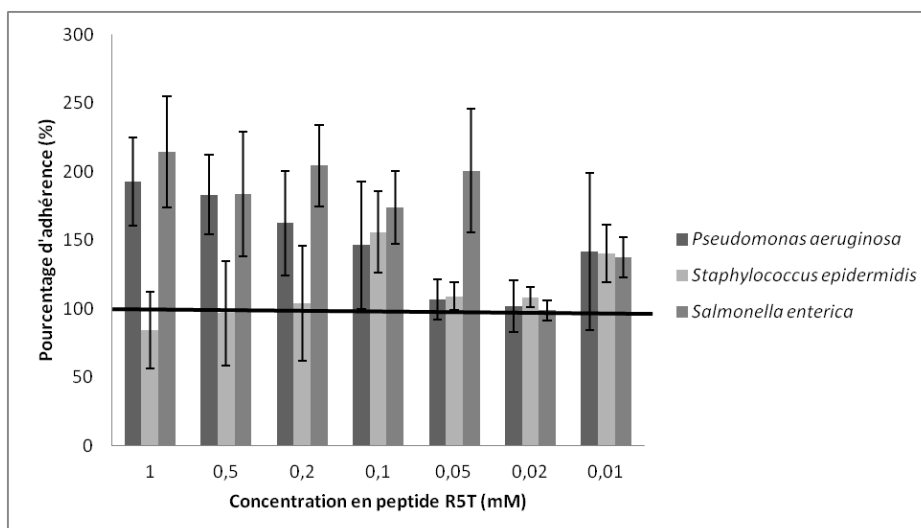


Figure III.46 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes : *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 sur une surface de polystyrène ou différentes concentrations de peptide R5T sont déposées.

La présence de peptide R2T modifie l'adhérence bactérienne de manière différente selon les souches (Figure III.27). Pour la souche *P. aeruginosa* NK125502, toutes les concentrations testées augmentent l'adhérence bactérienne. Pour la souche *S. epidermidis* CIP 53.124, l'adhérence est peu ou pas modifiée pour des concentrations de 0,02 et 0,01 mM alors qu'elle est augmentée pour des concentrations en peptide supérieures ou égales à 0,05 mM. L'adhérence de la souche *S. enterica* CIP 58.58 est augmentée à partir d'une concentration en peptide de 0,1 mM.

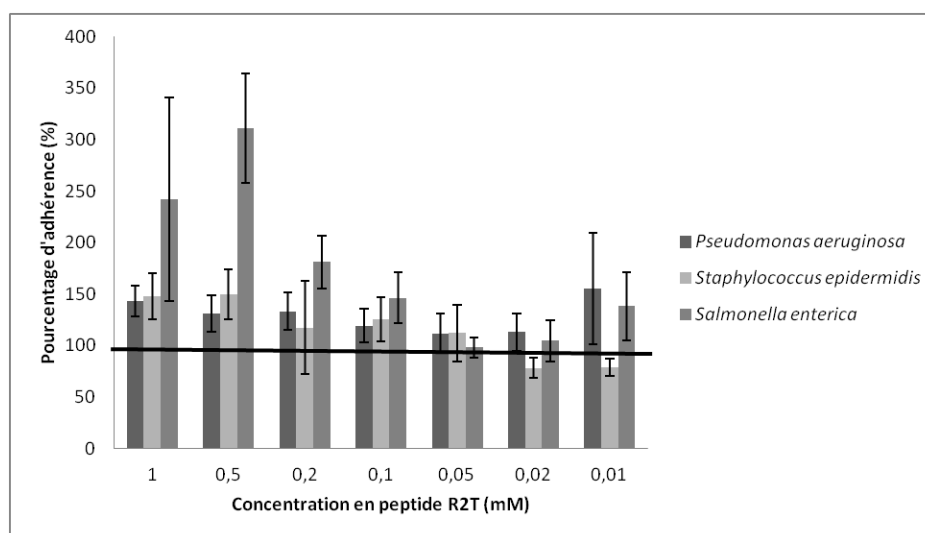


Figure III.47 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes : *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 sur une surface de polystyrène ou différentes concentrations de peptide R2T sont déposées.

Cette augmentation est très importante pour des concentrations en peptide de 1 et 0,5 mM, l'adhérence étant multipliée par trois en présence de 0,5 mM de peptide R2T. Curieusement,

l'adhérence de *S. enterica* CIP 58.58 est augmentée pour une concentration en peptide de 0,01 mM.

Le peptide R13T semble avoir un effet analogue sur l'adhérence des trois souches utilisées mais à des seuils de concentrations et dans des proportions différentes (Figure III.48). Pour la souche *S. enterica* CIP 58.58 et *S. epidermidis* CIP 53.124, la présence de peptide augmente l'adhérence pour une concentration supérieure ou égale à 0,02 mM. Cet effet semble être dose dépendant. Par contre, l'augmentation d'adhérence est très élevée pour *S. enterica* CIP 58.58 puisqu'elle atteint 250% à partir d'une concentration en peptide de 0,5 mM. Pour la souche *P. aeruginosa* NK125502, la présence de peptide augmente l'adhérence pour une concentration supérieure ou égale à 0,1 mM. Tout comme *S. epidermidis* CIP 53.124, l'augmentation d'adhérence de *P. aeruginosa* NK125502 reste limitée à 150% pour la concentration maximale en peptide de 1 mM.

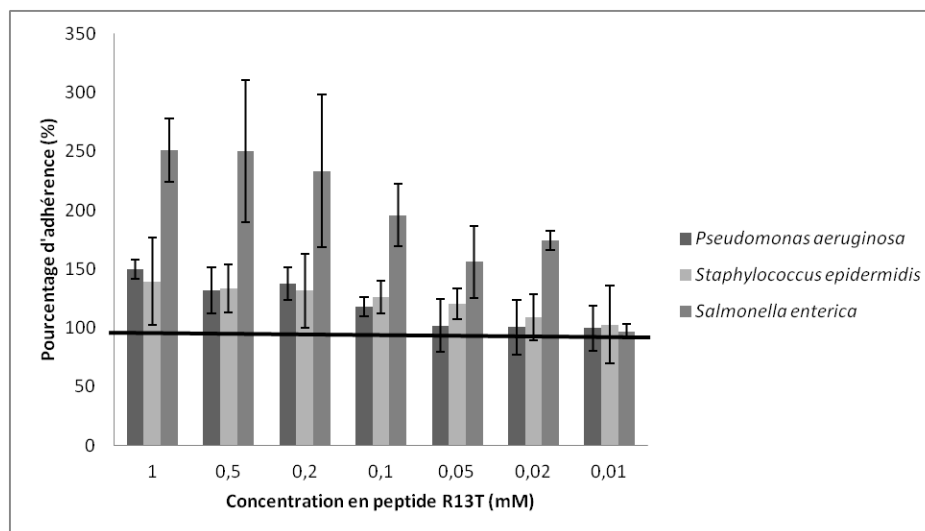


Figure III.48 : Pourcentage d'adhérence de 3 souches bactériennes : *P. aeruginosa* NK 125502, *S. epidermidis* CIP 53.124 et *S. enterica* CIP 58.58 sur une surface de polystyrène ou différentes concentrations de peptide R13T sont déposées.

En conclusion de cette partie, aucune tendance nette et universelle ne semble se dégager directement des résultats : les peptides n'ont pas le même effet entre eux, leurs effets sont souvent souche dépendant. Cependant, parmi les souches testées, *S. enterica* CIP 58.58 est la souche dont l'adhérence est la plus fortement et la plus souvent augmentée par la présence de peptide amyloïde. De plus, il est remarquable que les peptides n'aient pas d'effet particulier envers la souche bactérienne capable de produire la protéine correspondante. On aurait pu penser a priori que R5 et R5T favorisent particulièrement l'adhérence de *S. enterica*

CIP 58.58, que R2T favorise l'adhérence de *P. aeruginosa* NK 125502, et que R13T favorise l'adhérence de *S. epidermidis* CIP 53.124. Cela montre le caractère universel de reconnaissance de ce type de structure sur la surface. Afin d'analyser plus avant les résultats d'adhérence deux tests de recherche de corrélation ont été effectués : un test de Spearman et un test de Kendall, entre l'émission de fluorescence de la thioflavine T à 482 nm des peptides et l'adhérence des différentes souches à une concentration de peptide de 0,1 mM (Tableau III.49). Cette concentration a été choisie car cette concentration est celle utilisée pour les tests en thioflavine T. Ces tests montrent tout deux une bonne corrélation entre l'émission de fluorescence de la THT et l'adhérence bactérienne. Une augmentation de fluorescence (signe de présence d'une plus grande formation de fibres), entraîne une augmentation de l'adhérence bactérienne pour les souches *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*.

		<i>P. aeruginosa</i> NK 125502	<i>S. epidermidis</i> CIP 53.124	<i>S. enterica</i> CIP 58.58
Test de Spearman	r_s	1,000	0,950	0,090
	p-values	< 0,0001	0,017	0,683
Test de Kendall	τ	1,000	0,900	0,040
	p-values	< 0,0001	0,043	0,801

Tableau III.49 : Résultats des tests de corrélation de Spearman et de Kendall entre l'émission de fluorescence de la thioflavine T à 482 nm en présence de 1 mM des différents peptides et l'adhérence bactérienne sur les surfaces coatées par ces peptides à la même concentration.

La corrélation entre ces deux paramètres (intensité de fluorescence et adhérence bactérienne) laisse à penser que la présence de fibres de nature amyloïde sur la surface entraîne une augmentation de l'adhérence bactérienne pour les souches *P. aeruginosa* NK125502 et *S. epidermidis* CIP 53.124, quelque soit la protéine utilisée.

Le deuxième rôle que peuvent tenir les fibres de nature amyloïde dans les biofilms est celui de maintien, de renforcement, ou de cohésion de celui-ci, en prenant part dans l'agencement de la matrice, et à sa structuration. Les résultats correspondant à l'étude de cette fonction sont présentés dans la partie III Matrices artificielles.

III) Matrices artificielles

Dans cette partie, nous allons analyser les propriétés mécaniques de différentes matrices à base de polysaccharides. L'étude des propriétés des gels d'alginate et de méthylcellulose permettra d'expliquer en partie le comportement rhéologique observé pour les biofilms. De plus, l'étude de l'évolution des propriétés mécaniques des gels en ajoutant des composés comme les peptides amyloïdes ou des histones, permettra de mieux comprendre comment différents types de protéines peuvent influencer sur les propriétés mécaniques de gels de polysaccharide. Cela permettra de mieux comprendre leur rôle au sein de la matrice du biofilm. Pour chaque matrice de polysaccharide, nous avons décidé de mimer les concentrations en polymère de biofilms environnementaux, c'est-à-dire un poids humide entre 0,5% et 0,75%, en conservant le rapport de 3/2. Celui-ci étant le rapport polysaccharides /protéines des biofilms retrouvés sur les membranes de nanofiltration d'eau potable (Houari A et col, 2009). Nous avons donc utilisé pour toutes les matrices synthétiques 0,75% de polysaccharide et 0,5% de protéine pour mimer cela. De plus, nous avons décidé pour les matrices à base d'alginate, un polymère se retrouvant dans les biofilms de *P. aeruginosa*, d'utiliser le peptide R2T, car il est issu de FapC de *P. aeruginosa*, et le peptide Q comme témoin. De même, nous avons utilisé les peptides issus de CsgA (Q, R5 et R5T) avec les matrices de méthylcellulose présentes dans la matrice des biofilms d'*E. coli*. Enfin, ne disposant de polysaccharide pouvant être présent dans la matrice des biofilms de *S. epidermidis*, nous avons décidé d'inclure le peptide R13T à la fois dans les matrices d'alginate, et de méthylcellulose.

III.1) Matrices d'alginate

L'alginate est un polymère de sucres produit par différentes bactéries dont *P. aeruginosa* et par des algues présentes dans la matrice de biofilms (Cf chapitre I). Ce polymère est surtout connu pour sa capacité à former un gel en présence de cations divalents. Nous allons étudier dans cette partie l'influence que peut avoir l'apport de certaines protéines (histones, peptides amyloïdes), sur les propriétés mécaniques de gels de ce polysaccharide.

III.1.1) Gels d'alginate seuls

Les alginates forment un gel en présence de cations divalents. L'apport de cations Ca^{2+} à une solution d'alginate forme un gel de manière instantanée. Ce type de réaction de gélification ne permet pas d'obtenir un matériau homogène, ni d'inclure un autre type de polymère dans le gel. Aussi, un protocole de gélification contrôlée a été mis en place précédemment au laboratoire (Doumèche B, et col, 2007). Ce protocole permet une libération progressive de cations divalents dans la solution grâce à une acidification du milieu réactionnel par la δ -gluconolactone. Cette acidification dissocie le complexe entre l'EDTA et le calcium, permettant la gélification. On peut suivre la réaction par rhéologie (Figure III.50). Selon la définition rhéologique d'un gel, le module élastique (G') de la solution doit être supérieure au module visqueux (G''). Dans ces conditions, la gélification de l'alginate a lieu aux alentours de 19 minutes. Les propriétés mécaniques de la solution continuent ensuite d'évoluer rapidement jusqu'à environ 100 minutes, et plus lentement de 100 minutes à environ 260 minutes. Ensuite, le gel reste stable et ses propriétés demeurent inchangées. Le module élastique en fin d'expérience est alors de 544 Pa +/- 127 Pa, et le module visqueux est d'environ 13 Pa +/- 3 Pa.

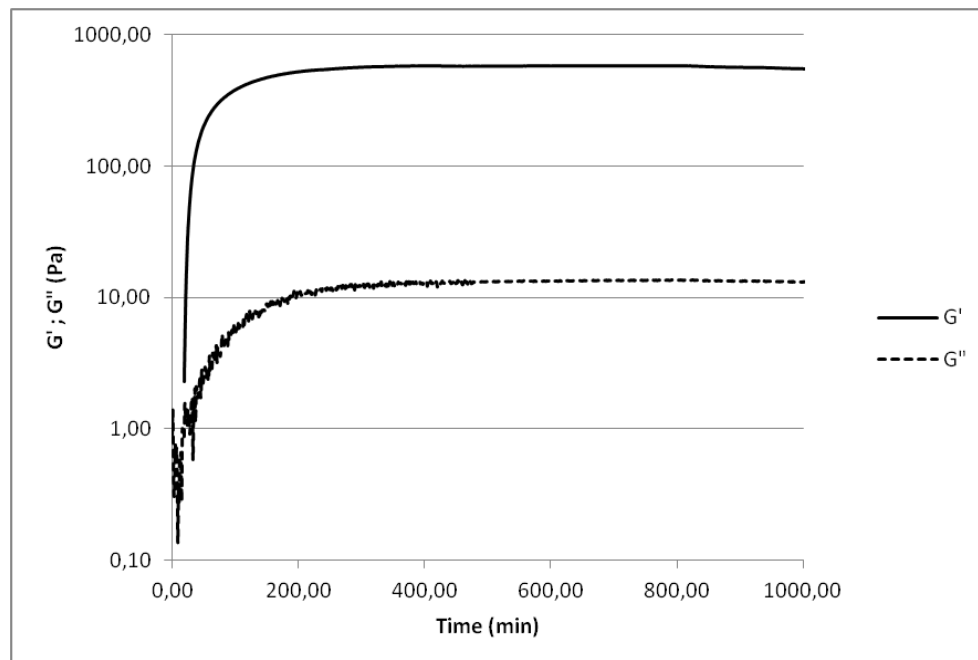


Figure III.50 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75%, à 26°C.

Le test de Creep effectué avec un gel d'alginate à une concentration de 0,75% sous une contrainte de 2,5 Pa montre un comportement viscoélastique avec une déformation se déroulant en deux phases distinctes (Figure III.51). La première de 0 à 90 secondes est une réponse rapide à la contrainte caractéristique d'un matériau élastique. Le module de cisaillement complexe (G^*) alors calculé est de 144,7 Pa +/- 9 Pa. La deuxième partie de la courbe de 90 s à 1000 s est le reflet de la déformation due à la partie visqueuse du gel. Lors de cette étape, nous pouvons calculer la viscosité apparente du gel η qui est de 2,05 +/- 0,2 x 10⁵Pa.s.

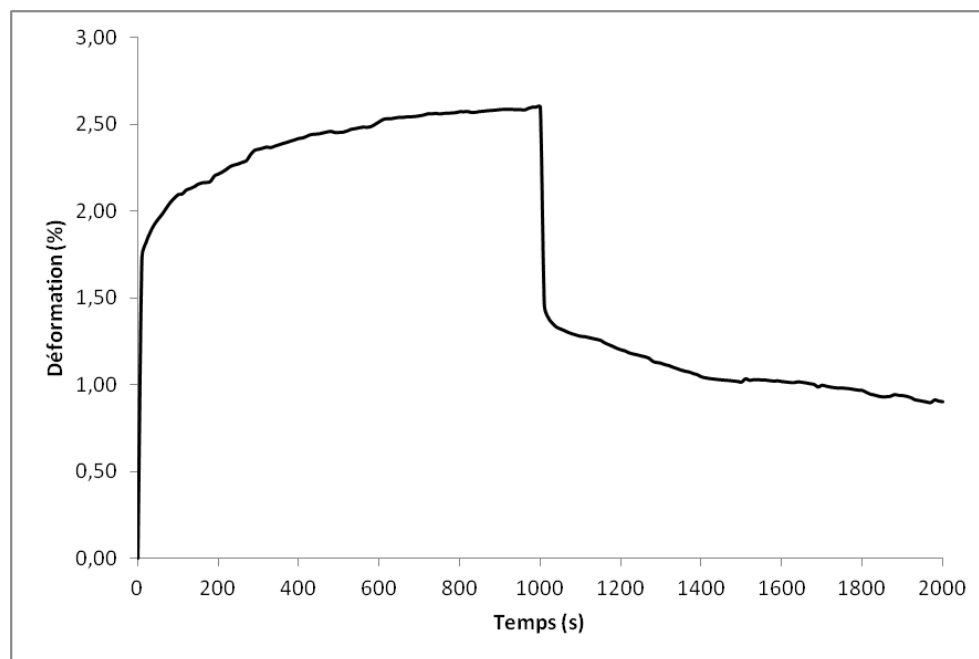


Figure III.51 : Courbe de Creep(Déformation) de l'alginate à 0,75%, à 26°C sous une contrainte τ de 2,5 Pa.

La relaxation du gel d'alginate après arrêt de la contrainte est observée à partir de 1000 s sur la courbe. Celle-ci s'effectue aussi en deux étapes. Tout d'abord, la relaxation élastique très rapide de 1000 à 1020 s, puis la relaxation visqueuse de 1020 s à 2000 s. Tout comme ce que nous avons pu observer avec les biofilms monomicrobiens, le gel d'alginate à 0,75% ne retrouve pas, même au bout de 2000 s, son état initial. Il y a donc une partie de la déformation du gel qui est irréversible à cause de l'écoulement visqueux.

En résumé, les paramètres mécaniques d'un gel d'alginate à 0,75% en présence de calcium sont : temps de gel (T_g) 19 minutes, G' 544 Pa +/- 127 Pa, G'' 13 Pa +/- 3,2 Pa, G^* 147 Pa +/- 9 Pa et η 2,05 +/- 0,2 x 10⁵Pa.s (voir aussi tableau III.7.2).

Nous avons ensuite choisi une protéine pouvant interagir avec l'alginate. Celui-ci étant un polymère de sucre de nature électro négative, notre choix s'est tourné vers une protéine de nature électro positive pouvant se trouver dans la matrice de certains biofilms contenant de l'ADN. Nous avons donc choisi d'utiliser une protéine globulaire, l'histone H2a.

III.1.2) Gels mixtes alginate et histone H2a.

L'incorporation d'histones dans un gel d'alginate a été réalisée avant l'ajout de la lactone. L'apport d'histone à une concentration de 0,5% n'entraîne pas de séparation de phase du milieu réactionnel. Le suivi de la gélification de ce mélange en oscillation nous montre que celle-ci a bien lieu, mais met plus de temps à se mettre en place par rapport à une solution d'alginate seul (Figure III.52). Le gel apparaît au bout de 43 minutes. Les paramètres mécaniques G' et G'' continuent d'évoluer fortement jusqu'à environ 200 minutes, puis se stabilisent pour atteindre des valeurs de 165 Pa +/- 3 Pa et de 3,15 Pa +/- 0,1 Pa., respectivement. Ces valeurs sont environ quatre fois inférieures à celles d'un gel d'alginate seul. L'histone modifierait le réseau d'alginate. Ce résultat n'est pas surprenant car l'histone, malgré sa charge brute positive est de trop grosse taille pour former un maillage aussi étroit qu'un gel d'alginate en présence de calcium seul. Les molécules d'histone doivent s'intercaler dans ce maillage étroit, et donc diminuer ses propriétés mécaniques.

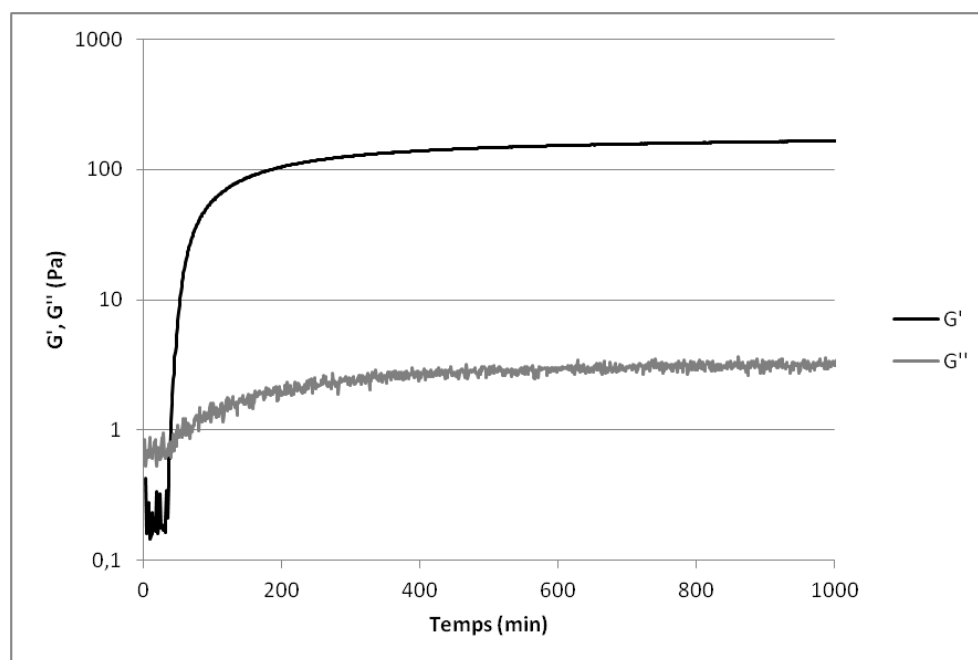


Figure III.52 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75%, en présence de 0,5% d'histone, à 26°C.

Afin d'observer comment évolue le gel d'alginate en présence d'histone sous une contrainte mécanique, nous avons réalisé un test de Creep sous contrainte de 2,5 Pa (Figure III.53). Lors de ce test, nous pouvons observer que le type de réponse à la contrainte est de même nature que celle du gel d'alginate seul. En effet, la courbe de réponse à la contrainte est aussi divisée en deux temps : une réponse élastique immédiate de 0 à 20 s, et une réponse visqueuse de 20 s à 1000 s. En revanche, la déformation globale de l'échantillon allant jusqu'à 11,5%, est beaucoup plus forte qu'en présence d'alginate seul. Le calcul du G^* reflète cette différence de déformation, dans le cas de ces gels d'alginate 0,75% et histone 0,5%, il est de 45,2 Pa +/- 12 Pa. Ce module est plus de 3 fois inférieur à celui observé dans le cas de l'alginate seul. La viscosité apparente η est aussi calculée et est de 2,0 +/- 1,8 x 10⁴Pa.s soit dix fois inférieure à la viscosité d'un gel d'alginate seul.

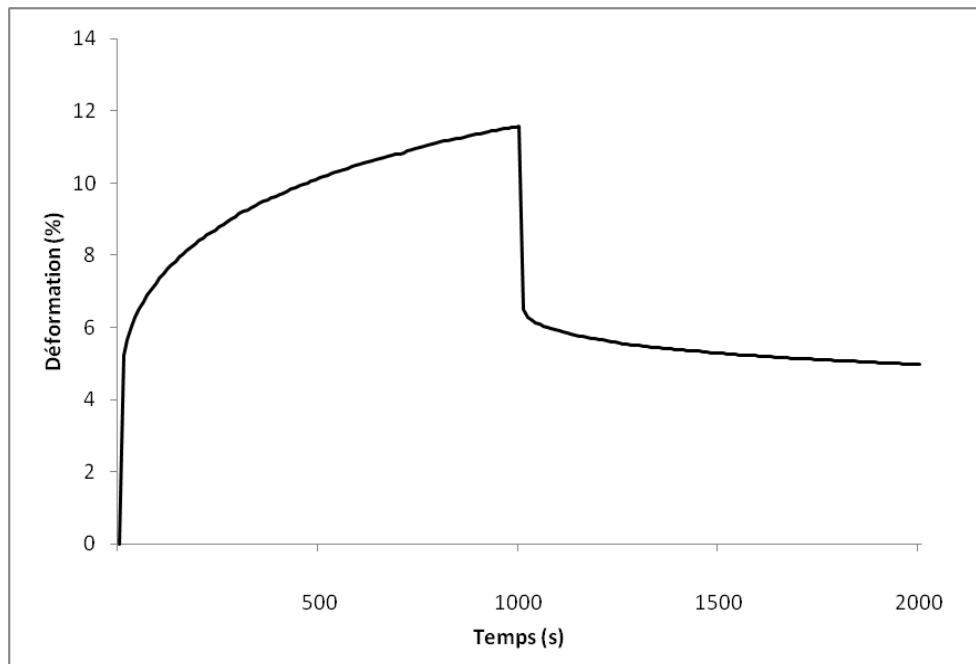


Figure III.53) Courbe de Creep (déformation) d'un gel d'alginate à 0,75% en présence de 0,5% d'histone, à 26°C sous une contrainte τ de 2,5 Pa.

La relaxation de ce test est aussi de même nature qu'en présence de l'alginate seul. De 1000 à 1020 s, la relaxation élastique à lieu et de 1020 s à 2000 s a lieu la relaxation visqueuse. Comme pour l'alginate seul, la relaxation du gel n'est pas totale. La déformation restant aux alentours de 6% même après 2000 s.

En résumé, les paramètres mécaniques d'un gel d'alginate 0,75%, en présence de calcium et contenant 0,5% d'histone sont : temps de gel (T_g) 43 minutes, G' 165 Pa +/- 3 Pa, G'' 3,15 Pa +/- 0,1 Pa, G^* 45,2 Pa +/- 12 Pa, η 2,0 +/- 1,08 x 10⁴Pa.s (tableau III.7.2).

Nous allons maintenant nous intéresser à des matrices toujours à base d'alginate à 0,75% en présence de calcium mais auxquelles ont été ajoutés les peptides Q, R2T ou R13T.

III.1.3) Gels mixtes alginate et peptides.

Lors de la première partie de cette étude, nous avons caractérisé des peptides formant ou non des fibres amyloïdes. Nous allons maintenant étudier l'influence de ces peptides sur les propriétés mécaniques d'une matrice à base de 0,75% d'alginate.

III.1.3.1) Gel mixte alginate et peptide Q.

L'incorporation du peptide Q à une concentration de 0,5% dans la matrice d'alginate à 0,75%, a pour premier effet d'augmenter le temps de gélification du mélange (Figure III.54). Ce temps passe de 19 minutes à 33 minutes. Le réseau d'alginate est plus difficile à former en présence du peptide. Les propriétés mécaniques du gel continuent ensuite d'évoluer fortement jusqu'à environ 80 minutes, puis tendent à se stabiliser. A la fin de l'expérience, le G' est de 453 Pa +/- 38 Pa et le G'' est de 7,3 Pa +/- 0,2 Pa. Ces paramètres du gel mixte alginate/peptide Q sont du même ordre de grandeur que ceux d'un gel d'alginate seul, mais légèrement inférieurs. La présence de ce peptide ne semble donc que très peu influencer les propriétés mécaniques du gel. Celui-ci ne semble donc pas en modifier la structure.

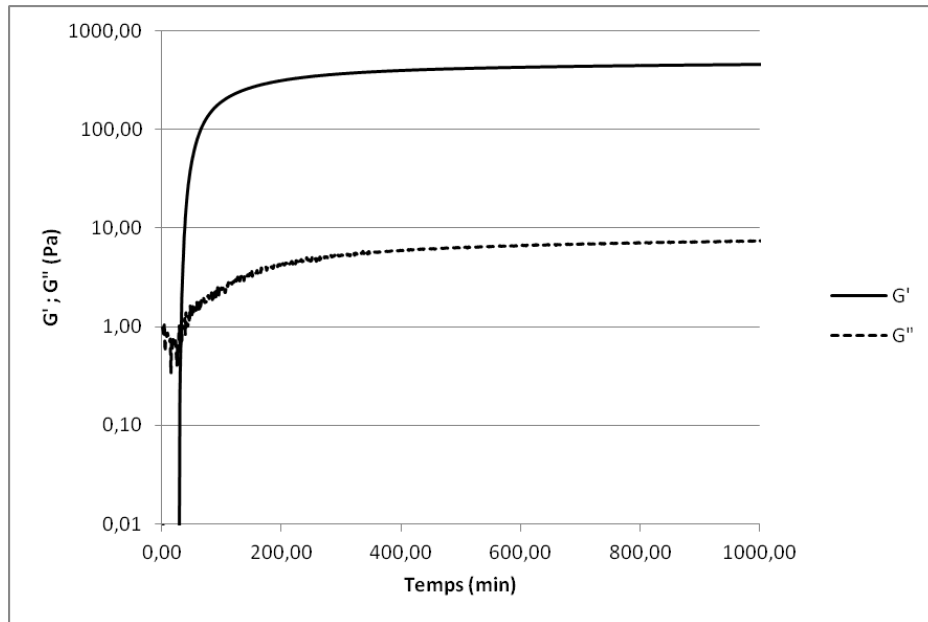


Figure III.54 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75%, en présence de 0,5% de peptide Q, à 26°C.

L'étude de la déformation du gel mixte alginate/peptide Q sous la contrainte mécanique de 2,5 Pa montre une réponse du gel mixte à la contrainte différente de celle observée en présence du gel d'alginate seul (Figure III.55). La déformation du gel à toujours lieu en deux temps mais la réponse visqueuse est très faible. La réponse élastique suite à la déformation est instantanée. Le G^* calculé est de 457 Pa +/-53 Pa. La viscosité η de 3,94 +/- 0,1 x 10⁶Pa.s est beaucoup plus élevée que pour le gel d'alginate seul. Le peptide Q resterait sous forme soluble dans la phase aqueuse du gel, augmentant sa viscosité.

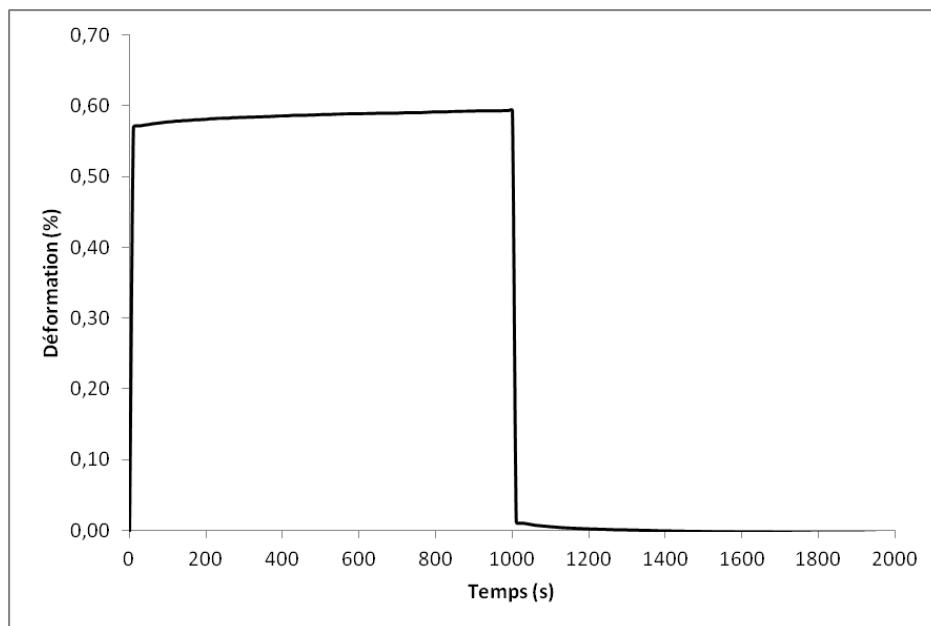


Figure III.55 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel d'alginate à 0,75% en présence de 0,5% de peptide Q, à 26°C sous une contrainte τ de 2,5 Pa.

La deuxième partie de la courbe de Creep est elle aussi différente de celle obtenue en présence d'alginate seul. La relaxation du gel mixte est totale. La déformation de celui-ci revient à zéro après relâchement de la contrainte avec une relaxation élastique rapide majoritaire entre 1000 et 1020 s et une relaxation visqueuse entre 1020 et 1100 s.

En résumé, les propriétés mécaniques d'un gel d'alginate 0,75%, en présence de calcium et contenant 0,5% de peptide Q sont : temps de gel (Tg) 33 minutes, G' 453 Pa +/- 38 Pa, G'' 7,5 Pa +/- 0,2 Pa, G^* 457 Pa +/- 53 Pa, et η 3,94 +/- 0,1 x 10⁶Pa.s (tableau III.7.2).

Nous allons maintenant étudier si la présence de fibres amyloïdes dans un gel d'alginate entraîne une modification des propriétés mécaniques du gel.

III.1.3.2) Gel de peptide amyloïde R2T.

A l'œil nu, une solution de peptide R2T à une concentration de 1 mM dans l'eau forme un bloc de type gel dans le tube où il est placé. Pour confirmer la présence de ce gel, un test de gélification en oscillation est réalisé (Figure III.56).

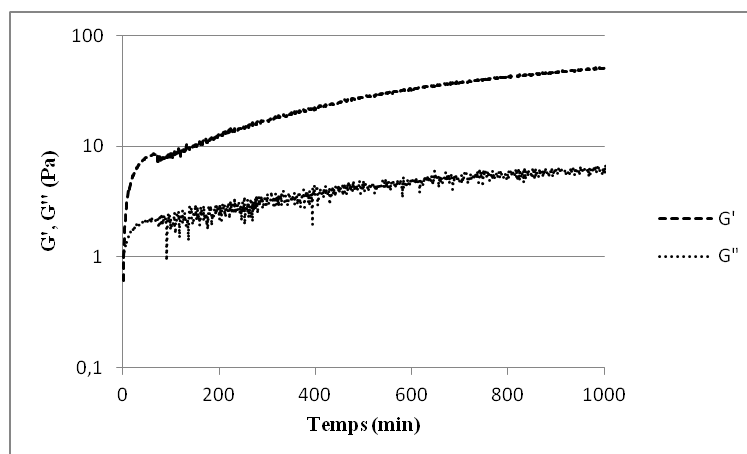


Figure III.56 : Modules élastique et visqueux en oscillation d'une solution de 1mM de peptide R2T.

Le peptide R2T en solution forme un gel de manière spontanée à température ambiante et à une concentration d'1mM. La gélification spontanée d'une solution de peptide R2T est confirmée par le test en oscillation montrant qu'après 3 minutes le module élastique devient supérieur au module visqueux. La valeur maximale du module élastique G' est de 53 Pa et la

valeur maximale du module visqueux G'' est de 6,5 Pa. Ces deux modules sont assez faibles face à ceux d'un gel d'alginate à 0,75% pure. Afin de déterminer d'autres paramètres rhéologiques, un test de Creep a été réalisé (Figure III.57).

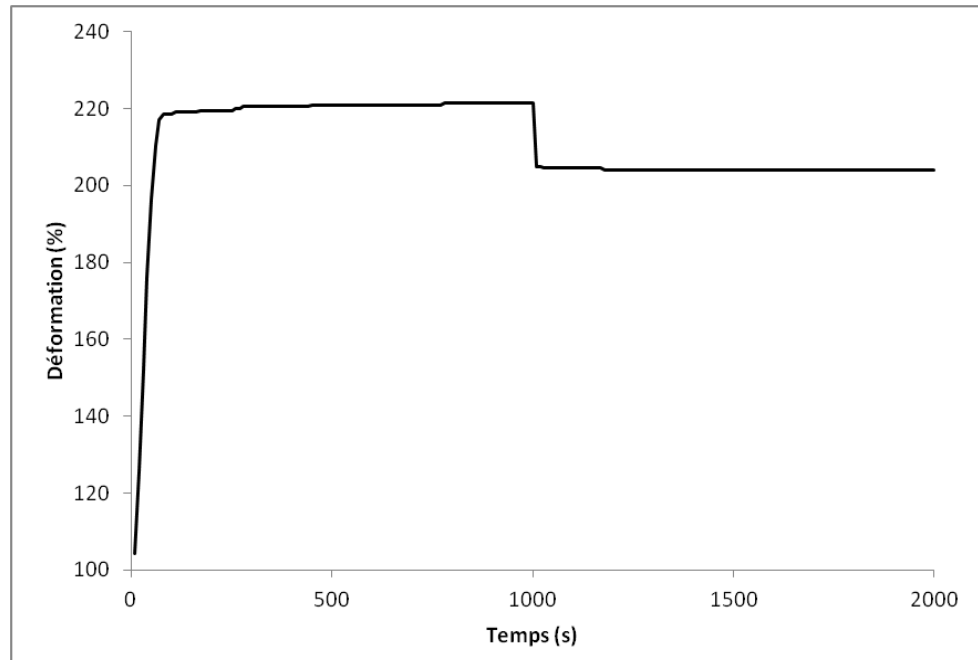


Figure III.57 : Courbe de Creep d'un gel de peptide R2T, sous une contrainte de 2,5 Pa et à une température de 26°C.

L'observation du test de Creep (Figure III.57) montre que le gel de peptide R2T se déforme très fortement sous l'effet de la contrainte. Cette réponse très forte et instantanée signe une réponse élastique. En revanche, la réponse visqueuse en comparaison est faible mais présente. La viscosité apparente de la solution est de $1,4 \cdot 10^5$ Pa.s. Et le G^* est de 1,6 Pa. On peut donc en déduire que la présence des fibres dans la matrice du biofilm peut à elle seule être responsable d'une partie des propriétés viscoélastiques. Cependant, aucun autre peptide utilisé n'a montré de capacité de gélification seul dans ces conditions.

III.1.3.3) Gel mixte alginate et peptide amyloïde R2T.

La courbe de gélification de l'alginate à 0,75%, en présence de calcium et du peptide R2T à 0,5% a la même allure que celle de l'alginate seule, hormis une légère baisse des paramètres mécaniques sur la fin de l'expérience (Figure III.58). Le temps de gélification est de 17 minutes, soit juste en deçà des 19 minutes pour le gel d'alginate seul, mais bien inférieur de celui du gel en présence du peptide Q. La présence du peptide R2T semble donc

légèrement améliorer la vitesse de gélification de l'alginate. Les paramètres viscoélastiques du gel sont : G' 232 Pa +/- 128 Pa et G'' de 6,31 Pa +/- 2,7 Pa. Ces modules sont bien inférieurs à ceux obtenus avec un gel d'alginate seul.

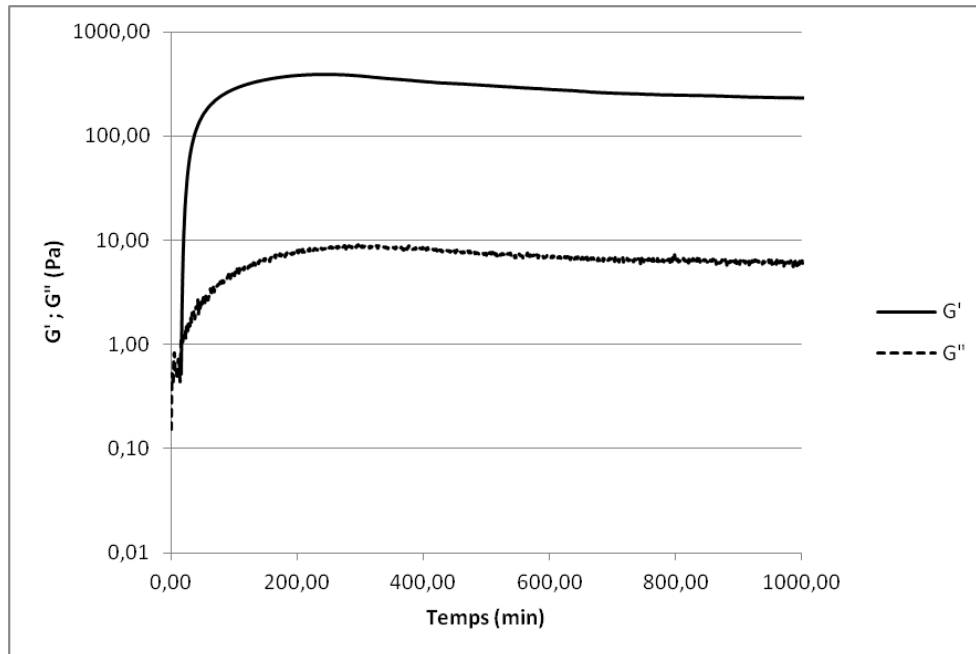


Figure III.58 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75%, en présence de 0,5% de peptide R2T, à 26°C.

L'étude de la déformation du gel d'alginate 0,75% en présence du peptide R2T montre une allure similaire à celle du gel mixte avec le peptide Q (Figure III.59). En revanche, la déformation globale de l'échantillon est d'environ 1,6%, soit deux fois plus importante que celle du gel mixte alginate/peptide Q et plus faible que celle du gel d'alginate seul d'environ 33%. En revanche, le profil de la déformation semble être intermédiaire entre les profils de déformation du gel d'alginate seul et celui du gel mixte alginate/peptide Q. Le G^* calculé est de 224 +/-126 Pa. La réponse visqueuse semble plus faible, par rapport à celle de l'alginate. La viscosité η est de 1,63 +/- 1 x 10⁶Pa.s. Cette valeur de viscosité est supérieure au gel d'alginate seul et inférieure a celle du gel mixte alginate/peptide Q.

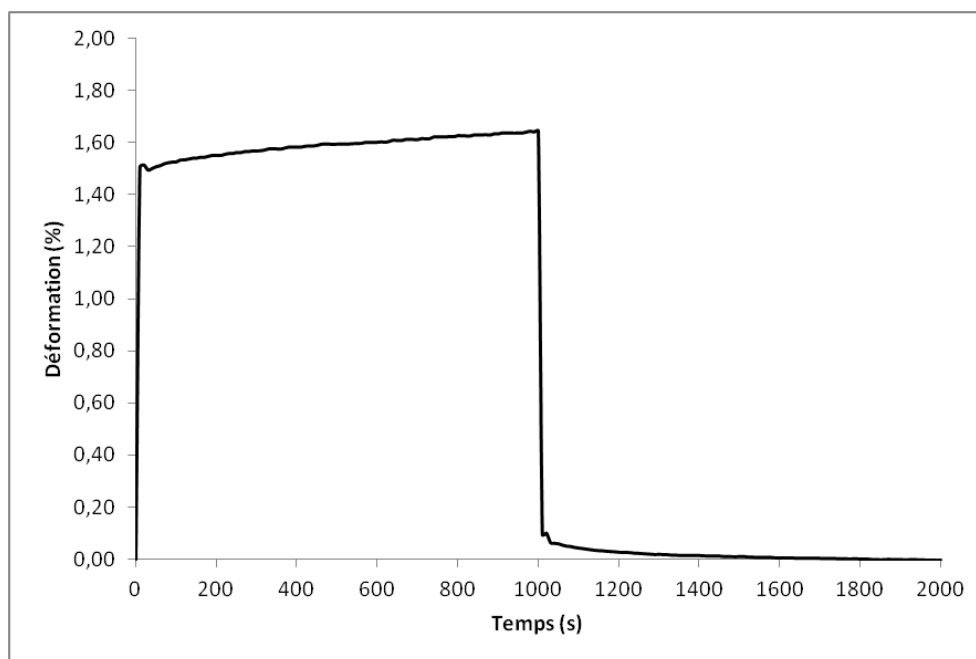


Figure III.59 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel d'alginate à 0,75% en présence de 0,5% de peptide R2T, à 26°C sous une contrainte τ de 2,5 Pa.

La courbe de relaxation en présence de peptide R2T est similaire à celle obtenue en présence du peptide Q, c'est-à-dire que la relaxation du gel est complète. La déformation de celui-ci revient à zéro après relâchement de la contrainte avec une relaxation élastique rapide majoritaire entre 1000 et 1300 s et une relaxation visqueuse entre 1020 et 1100 s plus lente que pour le gel mixte alginate/peptide Q.

En résumé, les propriétés mécaniques du gel d'alginate à 0,75%, en présence de calcium, et du peptide R2T sont : temps de gel (Tg) 17 minutes, G' 232 Pa +/- 128 Pa, G'' 6,31 Pa +/- 2,7, G^* 224 Pa +/- 126 Pa, et η 1,63 +/- 1 x 10⁶Pa.s (tableau III.7.2).

La dernière matrice à base d'alginate réalisée est une matrice contenant 0,75% d'alginate et 0,5% de peptide R13T.

III.1.3.4) Gel mixte alginate et peptide amyloïde R13T

L'étude de la gélification de l'alginate à 0,75% en présence de calcium et de 0,5% de peptide R13T, nous montre que la gélification a bien lieu à un temps de 29 minutes (Figure III.60). Ce décalage du temps de gel par rapport à un gel d'alginate seul montre que les chaînes d'alginate mettent plus de temps à se structurer en présence de ce peptide. En revanche, les propriétés mécaniques du gel en fin de gélification sont plus élevées que celle d'un gel d'alginate seul. Le G' obtenu est de 1037 Pa +/- 436 Pa et le G'' est de 6,31 Pa +/- 2,7 Pa. Ces propriétés élevées sont le signe d'une meilleure cohésion de la matière entre ce type de gel et une matrice d'alginate seul.

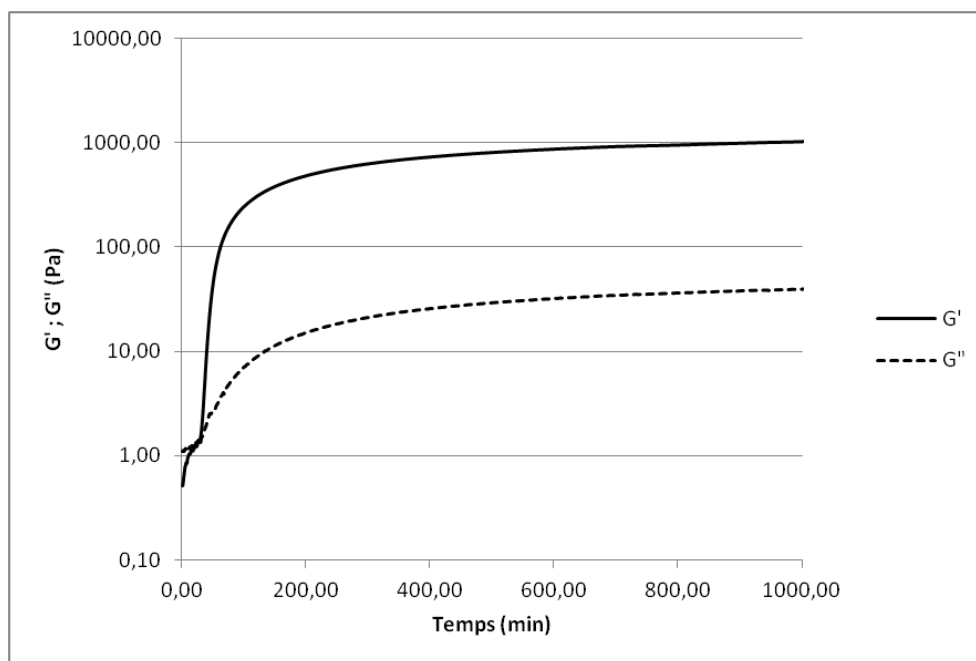


Figure III.60 : Courbe de gélification en oscillation de l'alginate à 0,75%, en présence de 0,5% de peptide R13T, à 26°C.

L'analyse de la déformation du gel de 0,75% d'alginate en présence de calcium et de 0,5% de peptide R2T, montre une très faible déformation sous une contrainte de 2,5 Pa (Figure III.61). La déformation ne dépasse pas les 0,35%. Ces résultats sont en accord avec ceux de la courbe de gélification qui montrent que les propriétés mécaniques de ce gel sont plus élevées. Le G^* calculé est de 959,8 Pa +/- 387 Pa, et la viscosité est de 4,39 +/- 0,9 x 10⁶ Pa.s. Ces propriétés expliquent la meilleure résistance à la déformation de la part de ce gel. Une contrainte de 2,5 Pa ne semble pas suffisante pour déformer ce gel.

L'analyse de la courbe de relaxation montre que le gel n'est pas déstructuré par la contrainte de 2,5 Pa. En effet, le gel reprend sa position initiale après l'arrêt de la contrainte, signe que très peu de liaisons au sein du gel ont été cassées.

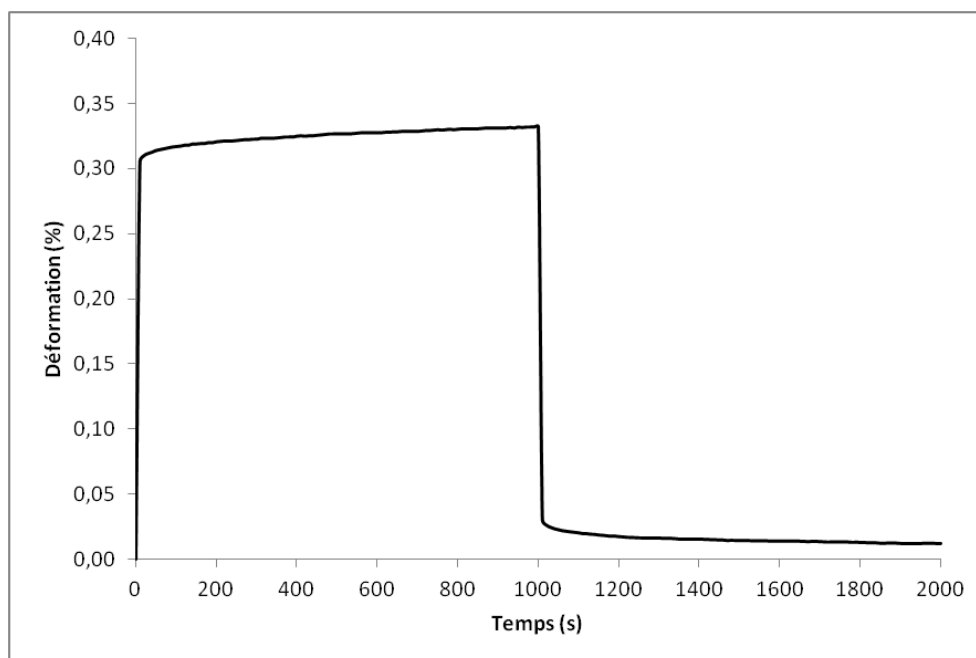


Figure III.61 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel d'alginate à 0,75% en présence de 0,5% de peptide R13T, à 26°C sous une contrainte τ de 2,5 Pa.

En résumé, les propriétés mécaniques d'un gel d'alginate à 0,75% en présence de calcium et de 0,5% de peptide R13T sont de : G' 1037 Pa +/- 436 Pa, G'' 6,31 Pa +/- 2,7 Pa, G^* 959,8 Pa +/- 387 Pa, et η 4,39 +/- 0,9 x 10⁶Pa.s (tableau III.72).

En bilan de cette analyse rhéologique de matrices à base d'alginate, nous pouvons dire que les protéines pouvant former des fibres amyloïdes semblent avoir un effet sur la structure du gel. En effet, pour les matrices contenant les peptides Q, R2T et R13T, la déformation du gel sous contrainte est moins importante que celle de la matrice d'alginate seul. La présence de protéine chargée positivement au sein de la matrice semble quant à elle diminuer ses propriétés mécaniques la rendant plus sensible à la déformation (Tableau III.72).

III.2) Matrices de méthyle cellulose.

Le deuxième type de matrices étudiées a été réalisé à base de méthyle cellulose. La cellulose est présente dans de nombreuses matrices de biofilms ou de pellicules bactériennes (chapitre 1). Ce polymère de sucre est connu pour présenter une gélification dépendante de la température. Lors de cette étude, 5 matrices différentes ont été caractérisées. Toutes contiennent une concentration massique de 0,75% en méthyle-cellulose et l'un des 4 peptides Q, R5, R5T, et R13T. Dans cette partie, nous allons étudier l'influence que peut avoir l'apport de ces peptides sur les propriétés mécaniques de gels constitués de ce polysaccharide.

III.2.1) Gel de Méthyle-cellulose seule

Le premier gel testé en rhéologie est un gel de méthyle-cellulose seule à une concentration massique de 0,75%. Les propriétés mécaniques de la cellulose dépendent de la température. C'est pourquoi, un test de gélification de la méthyle-cellulose (M-cellulose) a été réalisé en oscillation en fonction de la température (Figure III.62). Lors de ce test, nous pouvons observer que le module élastique G' d'une solution de M-cellulose est supérieur au module visqueux dès 20 °C. La température de gélification serait inférieure à 20 °C. De plus, le module élastique augmente fortement à partir d'une température de 50°C. Cette augmentation s'accompagne aussi de l'augmentation du module visqueux G'' . Les propriétés mécaniques de ce gel à une température de 65°C et à 5000 secondes sont : G' 56,63 Pa +/- 6,7 Pa, et G'' 2,06 Pa +/- 0,8 Pa. Ces paramètres mécaniques restent bien inférieurs à ceux d'un gel d'alginate à une même concentration massique de 0,75% en présence de calcium.

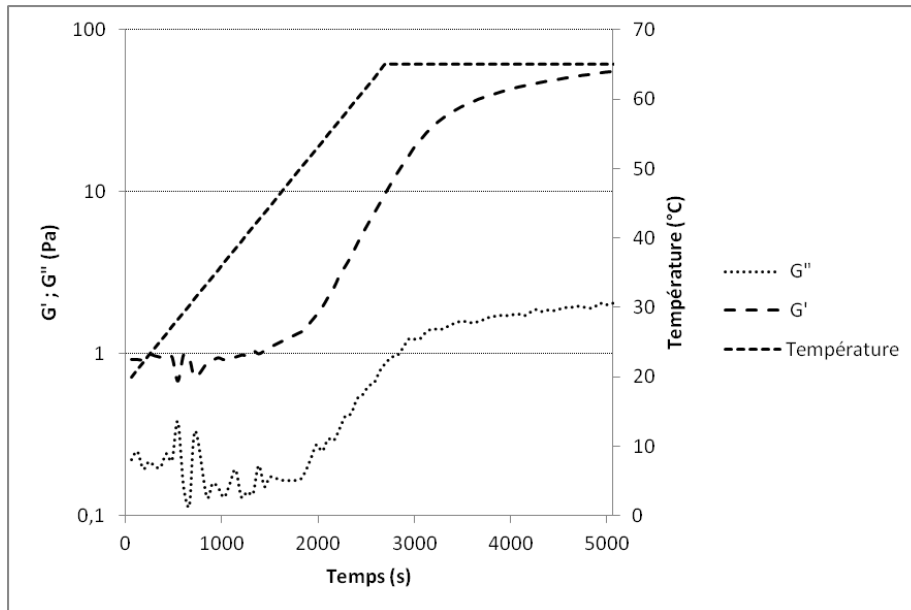


Figure III.62 : Courbe de gélification de la méthyle-cellulose à 0,75% en fonction de la température.

Comme pour l'alginate, le deuxième test effectué est un test de Creep, mais cette fois ci à 65°C et sous une contrainte de 5 Pa. En deçà de 5 Pa, très peu de déformation est observée. L'analyse de la déformation lors de ce test nous montre que comme dans le cas de l'alginate, la M-cellulose présente un comportement viscoélastique avec une déformation se déroulant en deux phases distinctes (Figure III.63). La première est une réponse élastique avec une forte déformation, et la seconde est une réponse visqueuse avec une déformation plus faible. La réponse globale de ce type de gel ressemble à celle de l'alginate en présence des différents peptides. Le G^* calculé est de 44,7 Pa +/- 3 Pa et la viscosité apparente η est de 1,1 +/- 0,6x10⁵Pa.s.

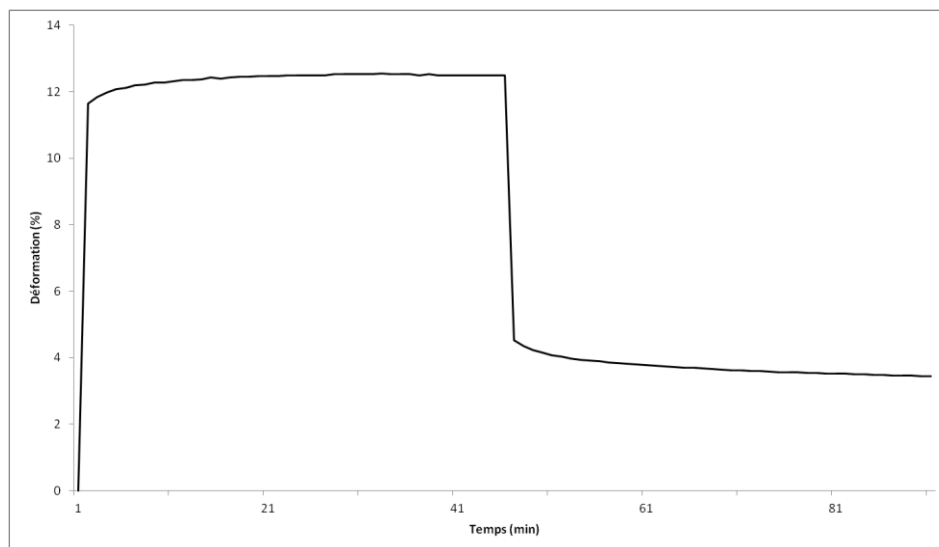


Figure III.63 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel de méthyle-cellulose à 0,75% à 65°C sous une contrainte τ de 5 Pa.

La relaxation du gel de M-cellulose après arrêt de la contrainte est observée à partir de 45 minutes sur la courbe. Celle-ci s'effectue aussi en deux étapes. Tout d'abord, a lieu la relaxation élastique très rapide de 0 à 2 min, puis la relaxation visqueuse. Tout comme dans le cas des biofilms monomicrobiens et du gel d'alginate seul, le gel de M-cellulose ne retrouve pas son état initial, même au bout de 81 min. Il y a donc une partie de la déformation du gel qui est irréversible ($\approx 4\%$) à cause de l'écoulement visqueux et de l'altération de liens dans le gel.

En résumé, les propriétés mécaniques d'un gel de M-cellulose à 0,75% sont : G' 56,6 Pa +/- 6,7 Pa, G'' 2,06 Pa +/- 0,8 Pa, G^* 44 Pa +/- 3Pa et η 1,1 +/- 0,6 x10⁵Pa.s (tableau III.7.2).

Nous allons maintenant nous intéresser au même type de gel de M-cellulose mais en présence de l'un des peptides Q, R5, R5Tou R13T.

III.2.2) Gels mixtes Méthyle-cellulose et peptides

Nous avons précédemment caractérisé des peptides formant ou non des fibres amyloïdes et montré l'influence que ces peptides avaient sur les propriétés d'une matrice d'alginate. Nous allons maintenant étudier si ces peptides changent les propriétés mécaniques d'une matrice à base de 0,75% de M-cellulose. Lors de cette étude tous les gels seront composés de 0,75% de M-cellulose, et de 0,5% de peptide. De plus, les tests de Creep seront tous effectués sous une contrainte de 5 Pa.

III.2.2.1) Gel mixte Méthyle-cellulose et peptide Q.

Le premier test réalisé est un test de gélification de la M-cellulose en présence d'un peptide ne formant pas de fibres amyloïdes : peptide Q. La gélification est suivie en oscillation suivant la même rampe de température que précédemment. Des différences peuvent alors être observées entre les gels contenant ou non le peptide Q à 0,5% (figures III.64 et III.65). La gélification est observée à partir d'une température de 23 °C. De plus, on peut observer deux phases d'augmentation des paramètres mécaniques, une première phase entre 20 et 30 °C et une deuxième entre 40 et 65°C. A la fin du test, les propriétés mécaniques

sont : G' 73,5 Pa +/- 2,3 Pa et G'' 2,53 Pa +/- 0,38. Pa. Le module G' est légèrement supérieur en présence de peptide Q par rapport à la M-cellulose seule. Cette différence peut être expliquée par un phénomène appelé effet masse. En effet, l'ajout d'une masse supplémentaire dans le milieu réactionnel peut entraîner une augmentation des paramètres mécaniques d'un gel sans pour autant en modifier la structure.

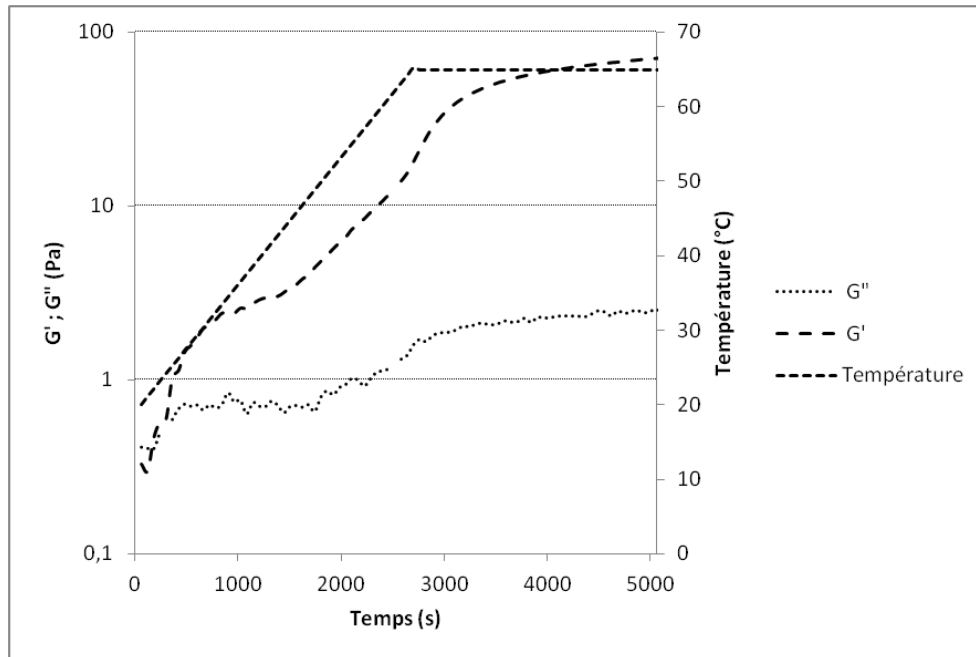


Figure III.64 : Courbe de gélification de la méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide Q à 0,5%, en fonction de la température.

L'analyse en test de Creep de ce gel mixte semble confirmer l'augmentation des paramètres mécaniques du gel (Figure III.65). En effet, la déformation globale de l'échantillon diminue légèrement en présence du peptide Q (environ 10% de déformation contre environ 12% en absence du peptide). Le type de réponse observé est de même nature qu'en absence du peptide. La réponse élastique a pour module G 57,5 Pa +/- 2,1Pa. La viscosité η est de : $2,31 \pm 1,5 \times 10^5$ Pa.s. Ces paramètres sont eux aussi légèrement supérieurs à ceux du gel de M-cellulose seule. Ces différences confirment donc celles observées en gélification.

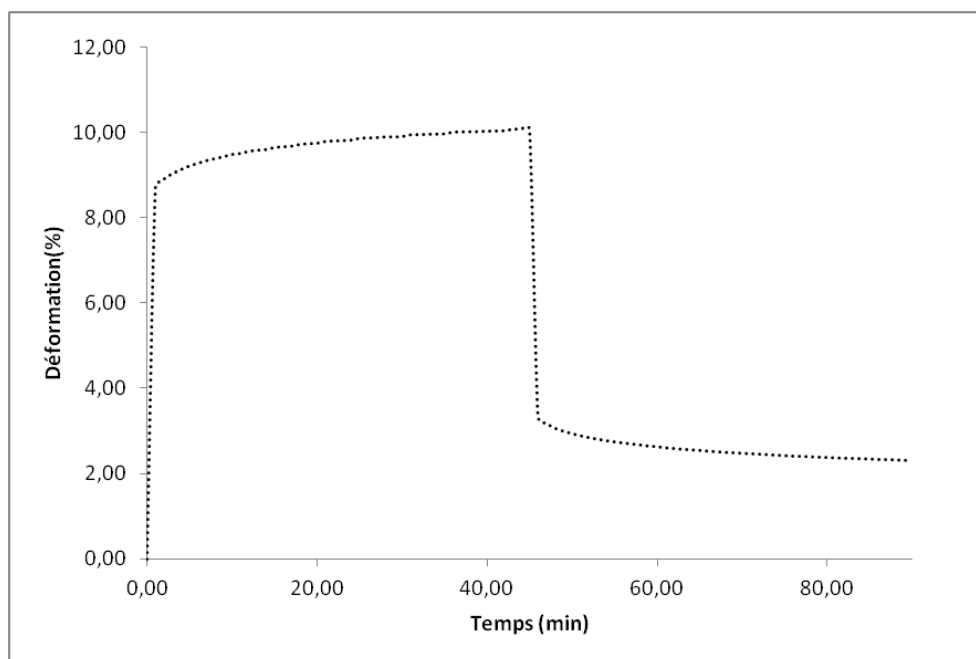


Figure III.65 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel de méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide Q à 0,5%, et à 65°C sous une contrainte τ de 5 Pa.

La courbe de relaxation du test est similaire à celle observée en présence de M-cellulose seule. La relaxation du gel après contrainte reste la aussi incomplète aux alentours de 3% à cause de l'écoulement visqueux et de l'altération de liens dans le gel.

En résumé, les paramètres mécaniques d'un gel de 0,75% de M-cellulose, en présence de 0,5% de peptide Q et à 65°C sont : température de gélification $\approx 23^\circ\text{C}$, G' 73,5 +/- 2,3 Pa, G'' 2,53 +/- 0,38 Pa, G^* 57,5 +/- 2,1 Pa, et η 2,31 +/- 1,5 x 10⁵ Pa.s (tableau III.7.2).

III.2.2.2) Gel mixte Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R5.

Le profil de gélification de la M-cellulose à 0,75% en présence du peptide R5 à 0,5% est assez différent de celui observé avec la M-cellulose seule (Figure III.66). En effet, une température plus élevée semble nécessaire à la gélification, celle-ci est d'environ 42°C. De plus, les paramètres mécaniques du gel à 65°C en fin d'expérience semblent eux aussi modifiés. Le G' à 65°C est de 32,5 Pa +/- 4,7 Pa, et le G'' est de 1,68 Pa +/- 0,85 Pa soit des valeurs environ deux fois inférieures à celle d'un gel de M-cellulose seule. La présence du peptide R5 semble donc perturber la formation des liaisons nécessaires à la gélification.

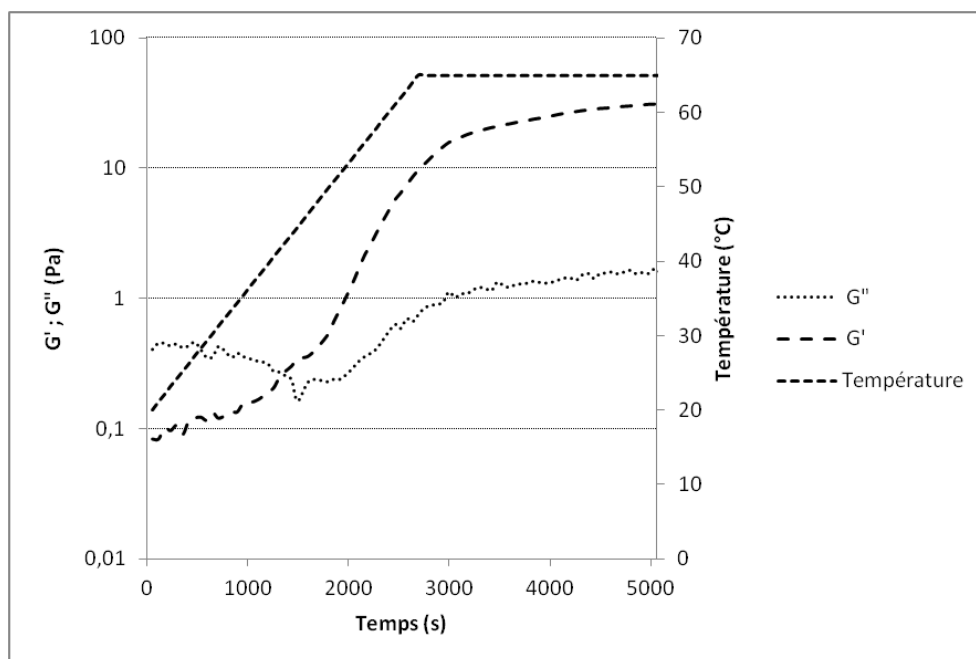


Figure III.66 : Courbe de gélification de la méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide R5 à 0,5%, en fonction de la température.

L'analyse du gel en test de Creep montre une déformation presque trois fois supérieure à celle observée en présence d'un gel de M-cellulose seule (Figure III.67), atteignant plus de 35%. Les deux réponses du gel à une contrainte sont présentes et la déformation élastique reste prédominante sur la réponse visqueuse. Les paramètres du gel ainsi obtenus sont : G^* 18,6 Pa +/- 3,7 Pa, et η 2,59 +/- 1,8 x10⁵Pa.s. Si le G^* est diminué d'environ 50% par rapport au gel de M-cellulose seule, la viscosité reste inchangée. Ces résultats montrent que l'incorporation du peptide R5 à une concentration de 0,5% dans une matrice de M-cellulose augmente la capacité du gel à se déformer. Ces résultats sont assez surprenants, car l'on aurait pu s'attendre à un effet inverse de celui-ci. La présence de fibres semble alors déstructurer le gel de M-cellulose.

La courbe de relaxation du test est similaire à celle observée en présence de M-cellulose seule. La relaxation du gel après contrainte reste là aussi incomplète aux alentours de 16% à cause de l'écoulement visqueux et de l'altération des liens dans le gel.

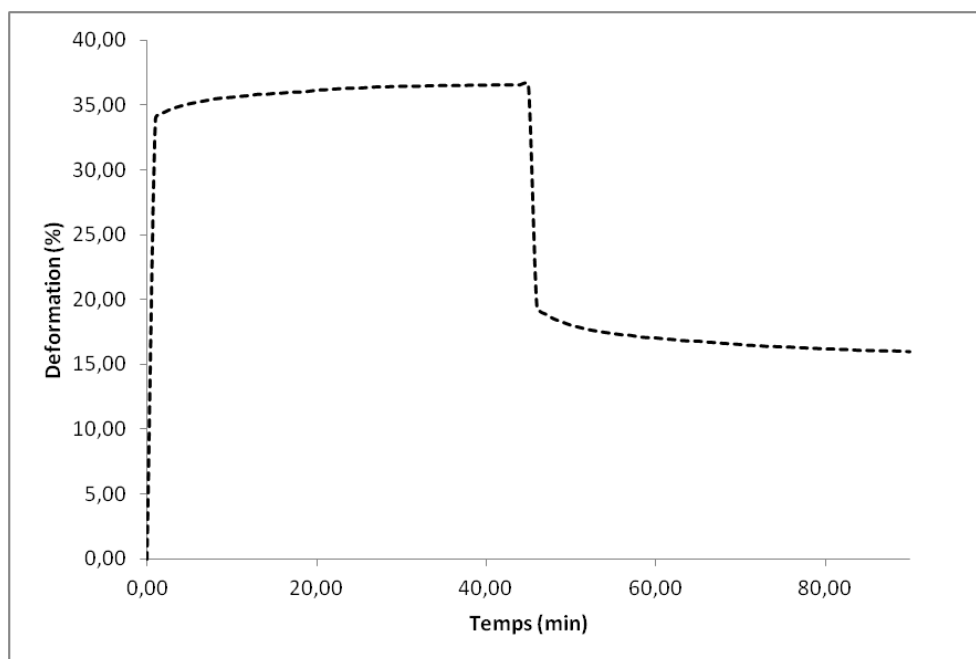


Figure III.67 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel de méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide R5 à 0,5%, et à 65°C sous une contrainte τ de 5 Pa.

En résumé, les paramètres mécaniques d'un gel de M-cellulose de 0,75% en présence de 0,5% de peptide R5 sont : température de gélification $\approx 42^\circ\text{C}$, G' 32,5 +/- 4,7 Pa, G'' 1,68 +/- 0,85 Pa, G^* 18,6 +/- 3,7 Pa, et η 2,31 x +/- 1,8.10⁵Pa.s (tableau III.7.2).

III.2.2.3) Gel mixte Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R5T.

L'analyse de la formation de gel de M-cellulose en présence du peptide R5T nous montre que la température de gélification de la M-cellulose est affectée par la présence du peptide (figure III.68). La température de gélification observée est encore plus élevée qu'en présence de peptide R5 et s'établi à 54°C. De plus, les paramètres mécaniques du gel en fin de test sont légèrement inférieurs à ceux observés pour le gel de M-cellulose seule, mais similaires à ceux du gel contenant le peptide R5. Le module G' est de 41,1 Pa +/- 1 Pa et le module visqueux est de 1,42 +/- 0,41 Pa. La différence de température de gélification du gel contenant le peptide R5 peut s'expliquer par la présence des aiguilles peptidiques réparties de façon plus homogènes, empêchant la méthyle-cellulose de se placer pour se structurer en gel.

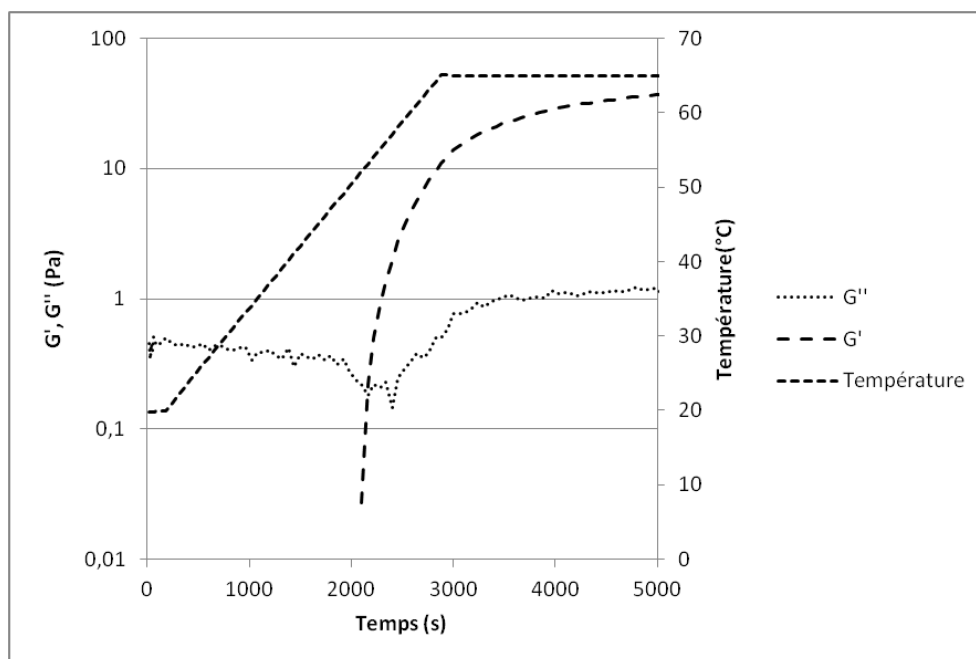


Figure III.68 : Courbe de gélification de la méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide R5T à 0,5%, en fonction de la température.

L'analyse en test de Creep de ce gel à 0,75% de méthyle-cellulose avec 0,5% de peptide R5T, montre pour la partie sous contrainte deux types de déformation : une déformation élastique instantanée d'environ 14% et une déformation visqueuse plus lente de 14% à 16% (Figure III.69). Globalement, la déformation du gel mixte M-cellulose/peptide R5T est à peine supérieure à la déformation du gel de M-cellulose seule et bien inférieure à la déformation du gel mixte M-cellulose/peptide R5. Le module G calculé est de 29 Pa +/- 3,9 Pa soit une valeur intermédiaire entre un gel de M-cellulose seule et un gel mixte M-cellulose/peptide R5. La viscosité est de $2,8 \pm 1,7 \times 10^5 \text{Pa}\cdot\text{s}$ soit une valeur très proche de la viscosité en présence de peptide R5.

La courbe de relaxation du test montre un comportement proche de celui d'un gel de M-cellulose seule et différent du comportement du gel mixte M-cellulose/peptide R5. En effet, la déformation du gel après arrêt de la contrainte est faible aux alentours de 3 %.

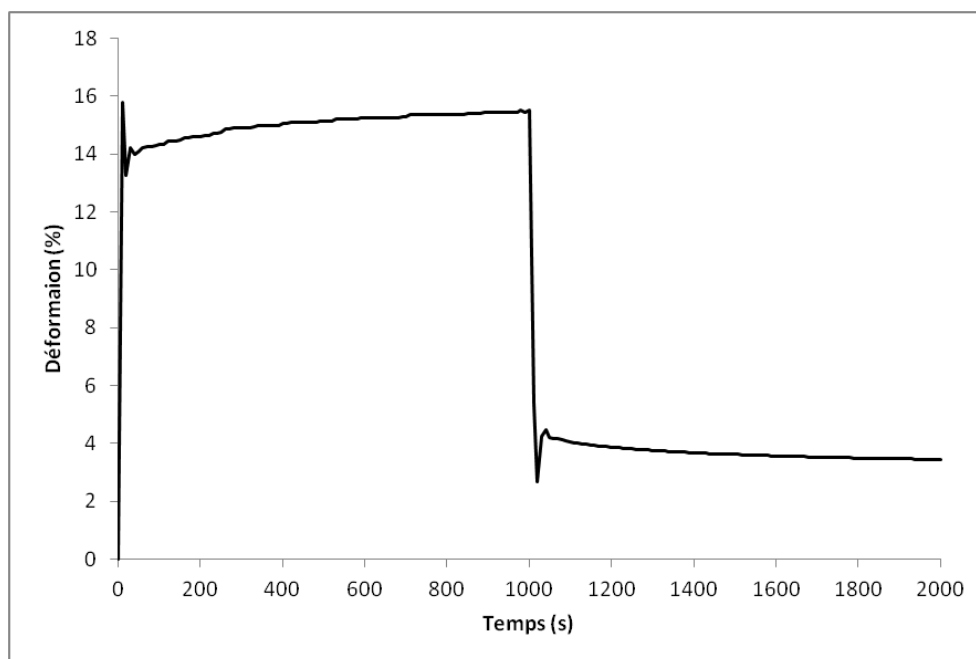


Figure III.69 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel de méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide R5T à 0,5%, et à 65°C sous une contrainte τ de 5 Pa.

En résumé les propriétés mécaniques d'un gel de M-cellulose à 0,75%, et 65°C en présence de peptide R5T sont : température de gélification $\approx 54^\circ\text{C}$, G' 41,1 +/- 1 Pa, G'' 1,42 +/- 0,41 Pa, G^* 29 +/- 3,9 Pa, et η 2,8 +/- 1,7 x 10⁵Pa.s. Ces paramètres mécaniques semblent être intermédiaires entre ceux d'un gel de M-cellulose seule et ceux d'un gel contenant le peptide R5 (tableau III.7.2).

III.2.2.4) Gel mixte Méthyle-cellulose et peptide amyloïde R13T.

L'analyse de la courbe de gélification de la M-cellulose à 0,75% en présence de 0,5 % de peptide R13T montre que celle-ci est modifiée par la présence du peptide. La température de gélification est de 41 °C (Figure III.70). Les propriétés mécaniques du gel à 65°C en fin de test sont de : G' 46,6 Pa +/- 8,7 Pa et G'' 2,85 Pa +/- 0,125 Pa. Ces propriétés sont similaires à celles observées pour le gel contenant 0,5% de peptide R5T.

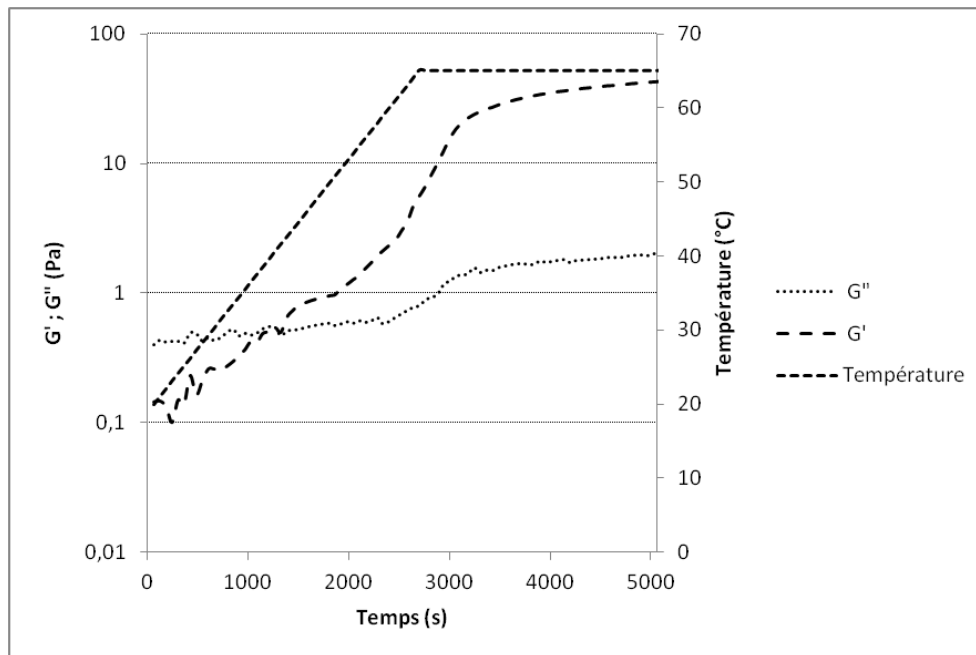


Figure III.70 Courbe de gélification de la méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide R13T à 0,5%, en fonction de la température.

Cependant, l'analyse en test de Creep de la déformation du gel de M-cellulose en présence de 0,5% de peptide R13T, montre une déformation similaire à la déformation mesurée pour un gel de M-cellulose seule (Figure III.71). Le G^* calculé est de 49,53 Pa +/- 8 Pa. La viscosité η est de $1,85 \pm 0,6 \times 10^5$ Pa.s. Ces modules sont du même ordre de grandeur que ceux observés pour le gel de M-cellulose seule.

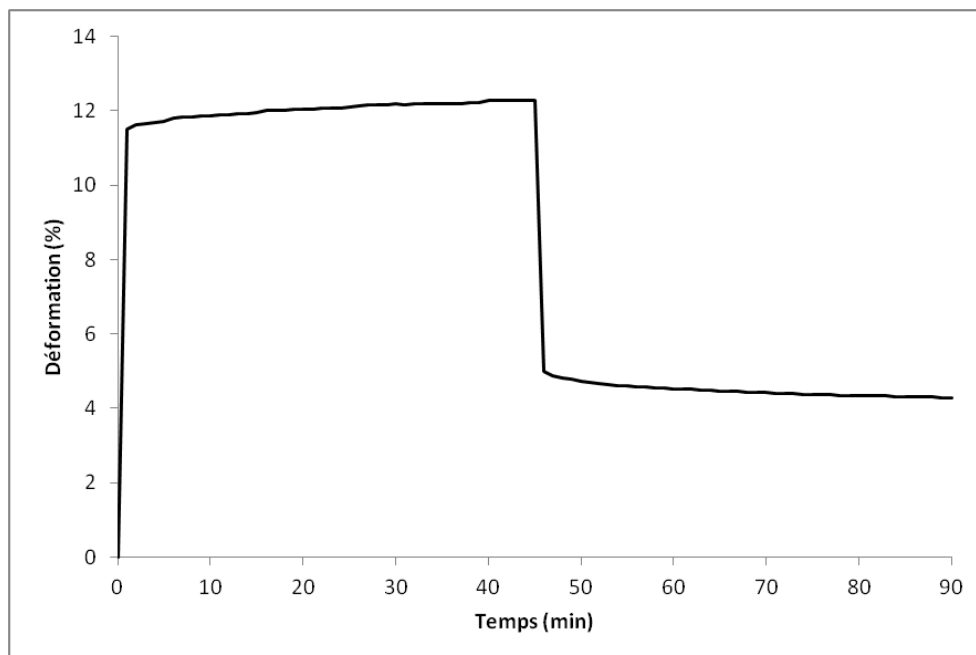


Figure III.71 : Courbe de Creep (déformation) d'un gel de méthyle-cellulose à 0,75%, en présence du peptide R13T à 0,5%, et à 65°C sous une contrainte τ de 5 Pa.

La courbe de relaxation du gel montre là encore un comportement similaire à celui d'un gel composé de M-cellulose seule avec environ 5 % de déformation irréversible en fin de test.

En résumé les propriétés mécaniques d'un gel de M-cellulose à 0,75%, et 65°C en présence de peptide R13T sont : température de gélification $\approx 41^\circ\text{C}$, G' 46,6 +/-8,7 Pa, G'' 2,85 +/- 0,12 Pa, G^* 49,53 +/- 8 Pa, et η 1,85 +/- 0,6 x 10⁵Pa.s (tableau III.7.2).

En conclusion de cette partie, les peptides ont augmentés la viscosité des gels qu'ils soient d'alginate ou de M-cellulose (Tableau III.72). Plusieurs comportements sont observés en présence des différents peptides. Pour les gels d'alginate, seul la présence du peptide R13T semble augmenter sensiblement les propriétés mécaniques du gel (G' et G''). En revanche, en présence de tous les peptides, le G^* est augmenté pour les gels d'alginate. Les gels semblent donc plus élastiques et moins visqueux en présence des peptides. En présence de M-cellulose, les peptides ne semblent pas avoir d'effets très significatifs. Les peptides ne semblent influencer que la température de gélification. Les paramètres mécaniques des matrices synthétiques sont supérieurs (G^* de 18 Pa à environ 1 000 Pa, et η supérieure à 10⁴Pa.s) à celles observées pour les biofilms (G^* entre 2 Pa et 10 Pa et η d'environ 10³Pa.s) à part la viscosité η du biofilm de *S. epidermidis* qui est proche de celles observées pour les différentes matrices.

Gel	G'	G''	G*	η	Température de gélification	Temps de gélification
	Pa	Pa	Pa	Pa.s	°C	min
Alginate 0,75%	544 +/- 127	13 +/-3	144,7 +/- 9	$2,05 \cdot 10^5$ +/- 0,2	26	19
Alginate 0,75% histone 0,5%	165 +/- 3	3,15 +/-0.1	45,2 +/- 12	$2,0 \cdot 10^4$ +/- 1,08	26	43
Alginate 0,75% Q 0,5%	453 +/-38	7,3 +/- 0,2	457 +/- 53	$3,94 \cdot 10^6$ +/- 0,1	26	33
Alginate 0,75% R2T 0,5%	232 +/-128	6,31 +/- 2,7	224 +/- 126	$1.63 \cdot 10^6$ +/-1	26	17
Alginate 0,75% R13T 0,5%	1037 +/- 436	6,31 +/- 2,7	959,8 +/- 387	$4,39 \cdot 10^6$ +/-0,9	26	29
Cellulose 0,75%	56,6 +/- 6.7	2,06 +/- 0.8	44 +/- 3	$1,1 \cdot 10^5$ +/- 0,6	<20	
Cellulose 0,75% Q 0,5%	73,5 +/- 2,3	2,53 +/- 0,38	57,5 +/- 2.1	$2,31 \cdot 10^5$ +/- 1,5	23	
Cellulose 0,75% R5 0,5%	32,5 +/- 4,7	1,68 +/- 0,85	18,6 +/- 3,7	$2,31 \cdot 10^5$ +/-1,8	42	
Cellulose 0,75% R5T 0,5%	41,1 +/- 1	1,42 +/- 0,41	29 +/- 3,9	$2,8 \cdot 10^5$ +/- 1,7	54	
Cellulose 0,75% R13T 0,5%	46,6 +/- 8,7	2,85 +/- 0,12	49,53 +/- 8	$1,85 \cdot 10^5$ +/- 0,6	41	
Biofilm <i>P. aeruginosa</i> NK125502			3,9	$4,2 \cdot 10^3$		
Biofilm <i>S. enterica</i> CIP 58.58			2,25	$6,9 \cdot 10^3$		
Biofilm <i>S. epidermidis</i> CIP 53.104			10,3	$3,6 \cdot 10^6$		

Tableau III.72 : Tableau récapitulatif des propriétés mécaniques des différentes matrices testées en rhéologie.

Chapitre IV Discussion

Les biofilms sont constitués de bactéries enchâssées dans une matrice d'exopolymères. Ces exopolymères sont de nature variée, mais les polysaccharides y jouent un rôle essentiel et central tant pour la structuration de la matière que pour la définition de ses propriétés mécaniques. Les protéines constituent également un type d'exopolymère très répandu au sein du biofilm. Parmi les protéines, les fibres amyloïdes, de par leur caractère universel, et leur structure doivent participer au réseau formant la matrice et intervenir dans la viscoélasticité de l'ensemble.

Nos objectifs étaient de caractériser, à partir d'espèces bactériennes et de polymères modèles, le rôle que peuvent avoir certains polymères dans la structuration du biofilm. Pour cela, nous avons choisi d'étudier les biofilms produits par trois espèces différentes : *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* et *S. enterica* connues pour former des biofilms aux interfaces qu'elles rencontrent. Lors de l'étude bibliographique, nous avons montré que les fibres amyloïdes semblent être très largement présentes dans les biofilms bactériens (Blanco L P, et col, 2012, Larsen P, et col 2007). Nous avons donc émis l'hypothèse que celles-ci intervenaient dans la structuration du biofilm et dans ses propriétés mécaniques. Pour valider cette hypothèse, nous avons étudié différents peptides issus d'exoprotéines de biofilms connues (CsgA, et Fap) ou non (Bap) pour leurs capacités à former des fibres de nature amyloïde. Nous avons aussi choisi deux exopolysaccharides pour mimer, dans le cadre de matrices synthétiques, le rôle que peuvent avoir ces constituants. Notre choix s'est porté sur deux polysaccharides présents dans les biofilms : l'alginate, un des composants de la matrice de biofilm de *P. aeruginosa* mucoïde, et la cellulose, un des composants de la matrice des biofilms des Entérobactéries étroitement lié à la synthèse de la protéine CsgA.

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus avec les peptides Q, R5, R5T, R2T, et R13T montre que des fibres de nature amyloïde ont été formées par les peptides R5, R5T, R2T et R13T (Tableau IV.1). L'analyse des résultats montre aussi que les scores TANGO semblent être corrélés à des morphologies de fibres particulières. Les plus forts scores TANGO seraient pour les peptides formant les fibres les plus longues comme les peptides R2T et R13T. Dans nos séquences plusieurs acides aminés sont très présents : G, N, S et V. Des séquences similaires riches en acides aminés G, N, Q, S, T et V ont déjà été montrées comme déterminantes pour la formation de fibres (Bodles A M, et col, 2000 ; Parmar A et col, 2012).

En revanche, les prédictions avec ce logiciel ne semblent pas infaillibles. Par exemple, il est surprenant de voir que les scores TANGO des sous-unités R2, R3, et R4 de CsgA soient nuls car il a été montré que celles-ci formaient des fibres de nature amyloïde (Cherny I, et col, 2005). De même, la protéine de prion sup35 très connue pour former des agrégats amyloïdes a un score TANGO nul (Linding R, et col, 2004). Ce logiciel reste donc un bon outil, mais on ne peut pas se fier exclusivement à sa prédiction pour déterminer si une protéine formera ou non des fibres amyloïdes. Il faut donc coupler ces résultats prédictifs à d'autres tests comme ceux à la thioflavine T, au rouge Congo et l'imagerie.

Protéine	Peptide	Score Tango	Séquence	Test THT	Test RC	Test Infrarouge	Test biréfringence RC	AFM (amas)
CsgA	Q	0	QFGGGN	-	-	-	-	- (-)
	R5	1,6	SSVNVTVQVFGNNATAHQY	++	++	++	+	+ (+)
	R5T	11,4	SVNVTVQVFG	++	+	+++	+	++ (+)
FapC	R2T	316	NNLAIVTA	+	-	+	+	+++ (-)
Bap	R13T	78	STVTVTF	+	-	+++	+	+++ (-)

Tableau IV.1 : Résumé des résultats obtenus pour la caractérisation des peptides. Test thioflavine T (THT) dans l'eau: ++ si l'intensité de fluorescence de la thioflavine T est au moins multipliée par 10, + si multipliée entre 2 et 10 fois. Test Rouge Congo (RC) ++ si décalage du spectre pour toutes les conditions de pH et + si au moins un décalage du spectre. Test infrarouge + si il y présence de liaisons hydrogènes entre les feuillettes β . Test d'observation de la biréfringence du rouge Congo + si présence de biréfringence en microscopie à lumière polarisée. AFM, + fibre entre 0 et 0,5 μm de long, ++ entre 0,5 μm et 1 μm de long, +++ au dessus de 1 μm (amas + si présence d'amas de fibres sur la lame).

Lors de cette étude, nous n'avons pas réussi à former des fibres avec le peptide Q, même après trois jours d'incubation et ce, dans toutes les conditions de pH que nous avons testées. Ces résultats sont confirmés par l'ensemble des techniques employées lors de l'étude. Or ce peptide est décrit par Cherny et col comme la séquence consensus de CsgA formant les fibres (Cherny I, et col, 2005). Les conditions expérimentales que nous avons utilisées ne permettent donc pas de former des fibres avec ce peptide. De plus, les concentrations utilisées par Cherny et col sont plus importantes et les temps de formation de fibres plus longs. Nous avons testé ces conditions mais aucun signal en thioflavine T et en rouge Congo permettant de

montrer que le peptide Q forme des fibres n'a été observé. Nos observations concernant le peptide Q sont à corréliser avec les travaux de Wang X et col en 2007, montrant que les sous-unités les plus amyloïdogéniques de CsgA sont les sous-unités R1, R3 et R5, et non R4 dont est issu le peptide Q (Wang X et col, 2007). La séquence protéique consensus ressortant de l'étude de Wang X (Wang X et col, 2008a) et importante pour la formation de fibres amyloïdes par CsgA est un peptide de type : S-X5-Q-X4-N-X5-Q. Nos travaux ont montré avec R5T que la séquence S-X4-Q était suffisante pour la formation de fibres.

Lors de cette étude, nous avons également démontré que les différents peptides R5, R5T, R2T et R13T issus de 3 protéines différentes (CsgA, FapC, et Bap) formaient des fibres de nature amyloïde. Ces fibres sont relativement stables sur une grande gamme de pH allant de 4 à 9. Les résultats croisés de ces expériences confirment la présence de fibres. Tous les tests effectués sont corrélés sauf le test au rouge Congo. Mais ce test est moins utilisé dans la littérature que le test à la thioflavine car moins fiable. En effet, il a été montré que le rouge Congo n'est pas capable de fixer certaines protéines amyloïdes (Klunk W E, et col 1993), les peptides courts et les protéines contenant peu de feuillet β semblant ne pas réagir avec ce colorant. Ceci est peut être le cas pour nos peptides car les résultats les plus positifs obtenus avec le rouge Congo concernent la séquence plus longue, le peptide R5. Cela confirme donc ces observations. En microscopie à lumière polarisée, une biréfringence du rouge Congo est observée. Ce test en microscopie est un des tests de référence pour la détection de plaques amyloïdes chez les patients atteints d'amyloïdose. Lors de cette étude, nous avons mis au point un protocole permettant l'observation du phénomène de biréfringence en microscopie confocale. L'utilisation du microscope confocal pour l'analyse de la biréfringence du rouge Congo n'a pas été montrée jusqu'à présent à notre connaissance. Ceci pourra permettre pour la suite, l'utilisation de cette technique afin de déterminer les épaisseurs des plaques amyloïdes en histologie par exemple, la biréfringence du rouge Congo étant le caractère discriminant de ce test.

Les résultats des tests à la thioflavine T confirment ceux observés avec le rouge Congo. Les travaux de LeVine H de 1993 montrent que ce test répond moins bien en présence de peptides courts, ou de certains peptides. Nos résultats appuient cette théorie car les intensités de fluorescence de la thioflavine T les plus élevées sont obtenues en présence des deux peptides les plus longs c'est-à-dire R5 et R5T, mais la conformation des fibres semble aussi influencer ce test. De plus, grâce à cette méthode, nous avons pu observer que la vitesse de formation des assemblages est différente, car pour certains peptides la fixation de la THT

est maximal à 30 minutes puis décroît. Cela peut aussi être dû à une stabilité différente des assemblages. Enfin, la visualisation par AFM du dépôt des fibres sur une surface permet de confirmer l'ensemble de ces résultats. La conformation des fibres entre le peptide R5 et R5T est différente, ce qui expliquerait la différence de signal en thioflavine. Cette disparité est aussi retrouvée en spectroscopie infrarouge où les mesures montrent des différences dans les types et les quantités de structures secondaires formées par les peptides sous forme de fibres. De plus, R5 et R5T forme des amas, une interaction latérale entre fibre pourrait expliquer cela. Cette interaction empêcherait alors la formation de structure plus longue, ce qui ne serait pas le cas pour R2T et R13T. Des expériences en utilisant des peptides de taille variable pourraient aider à comprendre la corrélation entre la longueur de la séquence peptidique et les dimensions des fibres.

Lors de cette étude, nous avons isolé pour FapC une séquence peptidique capable à elle seule de former ces fibres. A ce jour, chez *S. aureus*, seules les phénol-soluble modulins (PSMs) ont été identifiées comme protéines de nature amyloïde (Otto M, et col, 2008 ; Schwartz K, et col 2012). Ces protéines de 20 à 40 acides aminés forment des fibres au sein de la matrice du biofilm. Ces PSMs sont impliquées dans la structuration du biofilm car leur absence provoque une moins forte stabilité de la structure (Schwartz K, et col 2012). Ici, nous avons démontré que le peptide R13T était capable de former des fibres. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la protéine Bap entière pourrait donc être aussi impliquée dans ce type de structuration fibreuse. Cette protéine est ancrée sur la paroi bactérienne, elle pourrait donc permettre des interactions entre la cellule et d'autres protéines amyloïdes telles les PSMs renforçant la cohésion de la structure toute entière. De plus, la composition de la protéine contenant un grand nombre de répétitions et des acides aminés similaires hydrophobes rappelle celle de la protéine CsgA et celle de FapC. Il a été montré que la protéine CsgA permettait l'adhérence bactérienne à la fibronectine (Olsen A et col, 2002). L'interaction passerait par l'intermédiaire des sous unités R1 et R5. Il y aurait donc une corrélation entre la formation de fibres de nature amyloïde et l'interaction avec cette protéine de la matrice-extracellulaire eucaryote. Il serait intéressant de déterminer si la présence de structures similaires pour Bap et FapC, pourrait aider à la colonisation des cellules et des tissus eucaryotes.

Lors de cette étude, nous avons montré une implication des fibres amyloïdes dans l'adhérence des trois souches testées. La présence de fibres sur la surface de polystyrène augmente l'adhérence cellulaire. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ce

phénomène : le changement des propriétés de surface telles que l'hydrophobicité ou la rugosité, une interaction spécifique entre les fibres et un récepteur cellulaire ou encore une interaction entre des fibres amyloïdes présentes à la surface de la cellule comme le serait Bap et un peptide amyloïde ou un polysaccharide. De telles hypothèses ont déjà été validées. Par exemple l'équipe de Truong V K et col a démontré l'influence de la nanorugosité sur l'adhérence de *S. aureus* et *P. aeruginosa*, celle-ci étant augmentée avec la présence de nanorugosité (Truong V K, et col, 2010). De même, l'équipe de Bruinsma G M et col a démontré l'influence de l'hydrophobicité de surface sur l'adhérence de *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Bruinsma G M, et col 2001). Des interactions entre des protéines amyloïdes et un récepteur membranaire bactérien ont aussi déjà été observées. C'est le cas par exemple du récepteur OmpA d'*Escherichia coli*, qui fixe le sérum amyloïde A (SAA) (Shah C, et col, 2006). Afin de déterminer si l'une ou l'autre de ces hypothèses sont valides, plusieurs tests sont possibles, comme la mesure de l'angle de contact entre l'eau et la surface, ou encore une préincubation des différentes souches avec les peptides amyloïdes afin de bloquer d'éventuels récepteurs spécifiques.

Il a aussi été montré le rôle important de ces protéines dans la formation de biofilm, que ce soit pour CsgA (Barnhart M M, et col, 2006), que pour FapC (Dueholm M S, et col, 2010), ou pour Bap (Latasa C, et col 2006). De plus, nous avons montré lors de cette étude que les espèces à partir desquelles sont extraites ces protéines formaient des biofilms denses à 10 jours de culture. Nous avons aussi montré que ces biofilms montraient un marquage très riche en protéine. Le marquage des protéines sur les biofilms plus âgés met en évidence des structures filamenteuse au sein de la matrice et sur le pourtour. De plus, il semblerait que les protéines soient la première couche du biofilm en contact avec la surface. Il reste cependant à démontrer que ces fibres protéiques observées dans la matrice des biofilms obtenus en laboratoire sont de nature amyloïde.

Il semblerait donc que les protéines de la matrice soient primordiales dans la structuration en biofilm. Ces observations corroborent celles de Sutherland en 2001 qui explique que les protéines représentent environ 2 % de la matrice du biofilm en poids humide (Sutherland I W, 2001). Pour les biofilms sur membranes de nanofiltration, celles-ci représentent environ 2/3 du poids sec (Houari A et col, 2009).

En revanche, lors de cette étude, nous n'avons pas réussi à caractériser la matrice polysaccharidique des biofilms étudiés. Le poly-N-acétyl-glucosamine semble n'être que très

peu présente dans ces conditions de culture et sur ce temps de 10 jours d'incubation sauf pour *S. epidermidis* CIP 53.124. La présence de ce polymère dans les temps courts d'incubation et son absence sur les temps longs suggèrent un changement dans le type de polysaccharides servant à la structure du biofilm sur les temps d'incubation plus longs. Ce phénomène a aussi été observé par exemple pour *S. enteritidis* ou les conditions de flux dans lesquelles le biofilm était soumis entraînaient une modification de la composition en polymère osidique de la matrice (Mangalappalli-IllathuA K, et col 2007).

La caractérisation par rhéologie de ces biofilms montre différents comportements. Le biofilm de *P. aeruginosa* NK 125502 a une réponse en test de Creep similaire aux différents modèles de biofilms monomicrobiens déjà caractérisés. En effet, la réponse à la contrainte montre une déformation en deux temps avec une réponse élastique instantanée et une réponse visqueuse se mettant en place pour les temps plus longs de contrainte. Cette déformation est du même type que ce qui a été montré précédemment pour un biofilm de *S. mutans* (Vinogradov A M et col 2004). La principale différence avec ce biofilm est la présence de forces de flux dans le modèle de Vinogradov, forces que nous n'avons pas appliquées pour nos cultures. Cette différence peut expliquer la déformation plus importante du biofilm de *P. aeruginosa* NK 12502 sous une contrainte plus faible. En effet, il a été montré que les biofilms formés sous contrainte importante sont plus résistants que ceux non soumis à de fortes forces de flux (Stoodley P, et col, 2002). Pour *S. enterica* CIP 58.58, le même type de réponse en Creep est observé à la différence que la déformation du biofilm ne s'arrête pas avec l'arrêt de la contrainte. Ce phénomène peut être du à des cassures au sein du biofilm et sa rhéofluidication. Le biofilm continue ensuite à s'écouler après l'arrêt de la contrainte. Enfin, pour le biofilm de *S. epidermidis* CIP 53.124, un comportement rhéologique différent est observé en test de Creep. En effet, celui-ci répond plus comme un solide Kelvin-Voigt que comme le modèle de Burger décrivant en règle générale les biofilms (Towler B T, et col 2003). Des biofilms de *S. aureus* ont déjà été caractérisés en rhéologie par l'équipe de Rupp C J et col en 2005 (Rupp C J, et col, 2005). Lors de ces travaux, des biofilms de *S. aureus* soumis à des forces de flux lors de leur croissance ont montré une réaction à la contrainte en test de Creep différente de celle que nous avons observée. Les résultats de Rupp montrent un comportement similaire au biofilm de *P. aeruginosa* NK 125502. Les forces de flux lors de la croissance du biofilm semblent donc agir sur le comportement viscoélastique du biofilm. Sous forces de flux, les polymères composant la matrice du biofilm doivent donc être différents de ceux que nous avons pour notre étude.

De plus l'étude des propriétés mécaniques des différentes matrices synthétisées montre aussi ce type de comportement. Les gels à base d'alginate seul et en présence d'histone ont une réponse en test de Creep similaire au comportement des biofilms mixtes de membrane de nanofiltration (Houari A, et col, 2009) et de *P. aeruginosa* NK 125502 et *S. enterica* CIP 58.58. Ceux-ci répondent tous deux comme la modélisation de Burger. L'effet de l'histone sur les propriétés mécaniques du gel d'alginate est comparable à celui de la gélatine dans le même type de matrice (Panouillé M, et col, 2009). En effet, l'ajout de gélatine dans un gel d'alginate diminue les propriétés mécaniques du gel si la gélatine est sous forme non gélifiée, bien que l'histone interagisse probablement avec la matrice d'alginate.

En revanche, les matrices à base d'alginate et de peptide ainsi que celle à base de cellulose répondent comme le biofilm de *S. epidermidis*, et comme le model de Kelvin-Voigt. Ces résultats laissent à penser que la matrice formée par le biofilm de *S. epidermidis* CIP 53.124, est plus dense et cohésive que celle formée par les souches *P. aeruginosa* NK 125502 et *S. enterica* CIP 58.58. En revanche, les biofilms formés par *P. aeruginosa* ont la capacité de se déformer et de récupérer une partie de la déformation subie. Cette viscoélasticité de la matrice apporte un avantage certain aux bactéries. En effet, la déformation de la matrice procure aux cellules un temps de latence où elles peuvent apporter une réponse biologique aux changements environnementaux. De plus, l'augmentation des contraintes appliquées sur la structure permet un autre phénomène comme le rolling, une déformation servant à la mobilité. Ce phénomène a été étudié pour *S. aureus* par Rupp et col en 2005 (Rupp CJ, et col, 2005). Ce phénomène peut être relié aux matrices très élastiques contenant des protéines telles celles composées d'alginate ou de M-cellulose en présence des peptides amyloïdes. En effet, ces gels ont une viscosité très élevée ce qui permet très peu de déformation visqueuse. Si la contrainte appliquée augmente, au dessus du seuil de rupture du gel, l'ensemble de la structure se détachera de la surface permettant la colonisation dans un autre milieu ou les forces seront moins importantes. Mais l'ensemble de la matrice sera déplacée et la protection contre divers éléments sera conservée pour les bactéries incluses dans celle-ci.

Chapitre V : Conclusion et Perspectives

En conclusion de ces travaux, l'ensemble des résultats que nous avons obtenus permet de préciser le rôle joué par les exopolysaccharides et les fibres amyloïdes dans la matrice des biofilms. Une structure composée uniquement d'alginate ou de méthyl-cellulose possède des propriétés viscoélastiques qui constituent la base des propriétés mécaniques d'un biofilm. Nous avons montré que des petits peptides bactériens de séquence et d'origine variées peuvent former à eux seuls des fibres de natures amyloïdes. Ces peptides associés à de l'alginate ou à de la méthyl-cellulose pour former des matrices mixtes polysaccharides-peptides amyloïdes influencent les propriétés mécaniques de ces matrices en augmentant leur déformabilité sous contrainte.

Ces travaux pourront être poursuivis dans différentes directions afin de continuer l'approfondissement de la connaissance du rôle des exopolymères dans les propriétés des matrices de biofilms. Lors de cette étude, la matrice osidique des biofilms plus matures (à 10 jours) n'a été que très peu marquée par la lectine LE. Le glucose N-actylé semble donc très peu présent. Il serait possible de changer la lectine utilisée ou d'utiliser plusieurs lectines conjointement pour la visualisation par microscopie afin de mieux visualiser la matrice osidique.

Tout d'abord, il conviendra de compléter la caractérisation des matrices artificielles par des études en imagerie. L'analyse des gels avant et après les tests de Creep permettrait de mieux appréhender l'organisation de chaque classe de polymère et d'en étudier la déformation irréversible. Sur ce point, plusieurs tests de mise au point d'imagerie en microscopie confocale à balayage laser sont en cours avec une visualisation des fibres amyloïdes incluses dans un gel de polysaccharide après marquage respectif par le rouge Congo et une lectine fluorescente. Les résultats préliminaires de ces expériences montrent la présence de fibres protéiques au sein de la matrice d'alginate dont la répartition semble relativement homogène dans l'ensemble de la structure avant toute contrainte mécanique (Figure V.1). Ce type de marquage (rouge Congo associé à une lectine fluorescente) et ces observations en microscopie confocale pourront être mis en œuvre pour étudier l'organisation des exopolymères au sein de biofilms d'origines différentes : biofilms de laboratoire, mono et poly-microbiens, biofilms naturels, biofilms en milieu industriel, etc.

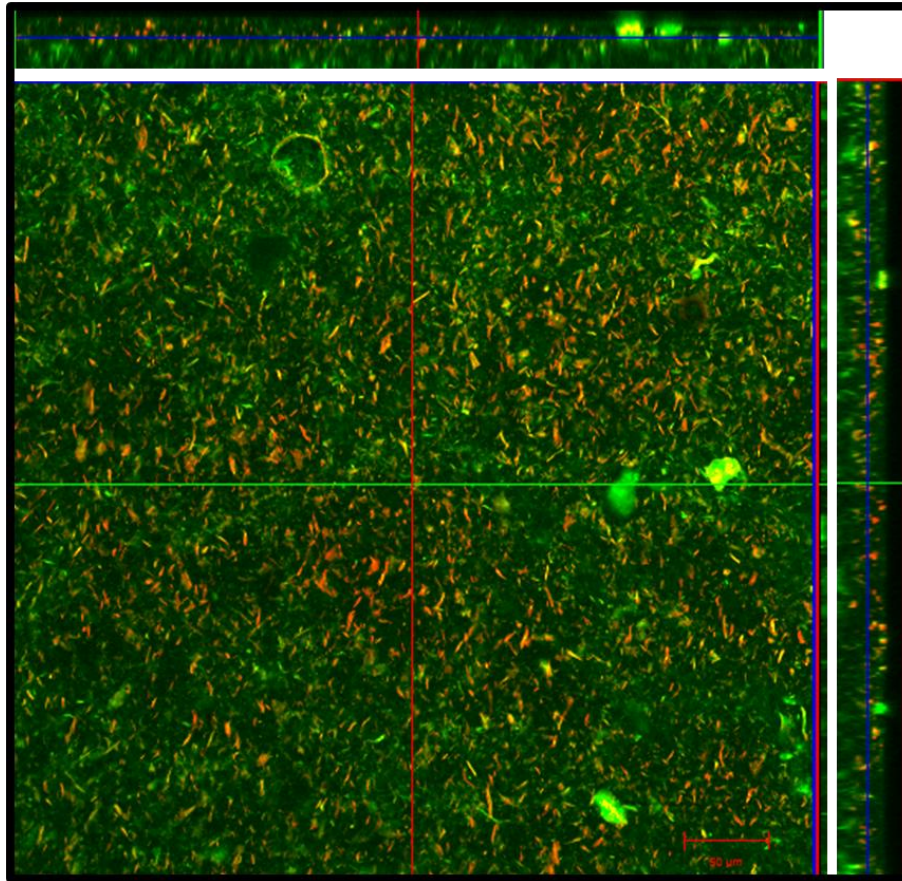


Figure V.1 : Image en microscopie confocale d'un gel de 0,75% d'alginate, et 0,5% de R2T. En vert marquage de l'alginate avec la lectine CA-FITC. En rouge marquage du peptide R2T au rouge Congo. Grossissement X40.

La démonstration de la formation de fibres amyloïdes par le peptide R13T issu de la protéine Bap de *S. epidermidis* est particulièrement originale. Il serait intéressant de compléter ces résultats par l'étude de la formation de fibres par la protéine Bap entière. Il convient de répondre aux questions suivantes : la protéine Bap entière forme-t-elle des fibres de nature amyloïde ? Si c'est une protéine amyloïde, quelle est la structure des fibres formées ? Comment se déroule la formation de ces fibres ? De plus, comme il existe une grande famille de protéines Bap présentant des homologies avec la protéine de *S. epidermidis*, il serait intéressant de déterminer si l'ensemble des membres de cette famille possède des propriétés amyloïdogènes. De plus, il serait judicieux de déterminer si le peptide Q au sein des matrices synthétiques forme des fibres de nature amyloïde. Si cela est le cas, il serait alors intéressant de comprendre les phénomènes permettant à ce peptide dans ces conditions de former ces assemblages.

Lors de cette étude, nous avons formé et étudié les propriétés de matrices artificielles dans le but de mimer d'un point de vue rhéologique le comportement de biofilms bactériens.

Afin de s'en rapprocher encore un peu plus, il est possible par la suite de diversifier les combinaisons de mélanges d'exopolymères et d'intégrer d'autres exopolymères dans ces matrices. Ainsi, pour mimer des biofilms mixtes entérobactéries/Pseudomonas, on pourrait former des matrices mixtes alginate/Méthyle-cellulose/peptides amyloïdes, mais aussi y inclure de l'ADN, des histones, ou des cellules bactériennes.

Egalement, l'utilisation de saccharidases, de protéases, et de nucléases, une à une ou en cocktail, permettrait d'approfondir le rôle de chacun des constituants de la matrice dans la structuration et la résistance mécanique des biofilms. La comparaison de l'effet de ces enzymes sur les propriétés mécaniques des matrices ainsi que des biofilms permettrait d'identifier de nouveaux acteurs de la structuration de la matrice du biofilm.

Chapitre VI : références bibliographiques

Abdel-Mawgoud A M, Lépine F, Déziel E (2010). Rhamnolipids : diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology Biotechnology*, 86: 1323-1336.

Al-Tahhan R A, Sandrin T R, Bodour A A, Maier R M, (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied Environmental Microbiology*, 66:3262-3268.

Allen R M, Bennetto H P, (1993). Microbial fuel cell. *Applied Biochemistry and Biology*, 39: 24-40.

Allesen-Holm M, Bundvig Barken K, Yang L, Klausen M, Webb J S, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59: 1114-1128.

Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P, (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 167: 179-184.

Amazian K, Rossello J, Castella A, Sekkat S, Terzaki S, Dhidah L, Abbelmoumene T, Fabry J, (2010). Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hopitaux de la region méditerranéenne. *Eastern Mediterranean health journal*, vol 16, 1070-1078.

Austin J W, Sanders G, Kay W, Collinson S, (1998). Thin aggregative Fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS microbiology letters*, 162:295-301.

Banner M A, Cunniffe J G, Macintosh R L, Foster T J, Rhode H, Mack D, Hoyes E, Derrick J, Upton M, Handley P S, (2006). Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the Accumulation-Associated protein. *Journal of Bacteriology*, 189: 2793-2804.

Barnhart M M, Chapman M R, (2006), Curli biogenesis and function. *Annual review Microbiology*, 60:131-147.

Baty A M 3rd, Eastburn C C, Techkarnjanaruk S, Goodman A E, Geesey GG, (2000). Spatial and temporal variations in chitinolytic gene expression and bacterial biomass production during chitin degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 8: 3574-3585.

- Beloin C, Roux A, Ghigo J M, (2010). *Escherichia coli* biofilm. *Current topics in Microbiology and immunology*, 322:249-289.
- Benard L, Litzler P Y, Cosette P, Lemeland J F, Jouenne T, Junter G A, (2008). Proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms grown in mechanical heart valve leaflets. *Journal of Biomedical materials research*, 88A: 1069-1078.
- Blanco L P, Evans M L, Smith D R, Badtke M P, Chapman M R, (2012), Diversity, biogenesis and function of microbial amyloid. *Trends in Microbiology*, 20:66-73.
- Bockelmann U, Janke A, Kuhn R, Neu T R, Wecke J, Lawrence J R, Szewzyk U, (2006). Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiology Letter*, 262:31-38.
- Bodles A M, Guthrie D J S, Harriott P, Campbell P, Irvine G B, (2000). Toxicity of non A β component of alzheimer's disease amyloid and N-terminal fragments thereof, correlates to formation of β -sheet structure and fibrils. *Eur J Biochemistry*, 267: 2186-2194.
- Boles B R, Horswill A R, (2008), Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathogens*, vol 4.
- Boles B R, Thoendel M, Singh P K, (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Molecular Microbiology*, 57: 1210-1223.
- Bowen W H, Koo H, (2009). Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries research* 45: 69-86.
- Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F, (2011), Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27: 1017-1032.
- Bruinsma G M, van der Mei H C, Busscher H J, (2001). Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*, 22: 3217-3224.
- Byler D M, Susi H (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25: 469-487.
- Cancela M A, Alvarez E, and Maceiras R (2005). Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. *Journal of Food Engineer* 71: 419-424.

- Cai J, Zhang L, (2006), Unique gelation behavior of cellulose in NaOH/Urea aqueous solution, *Biomacromolecules*, 7: 183-189.
- Cerca N, Maira-Litran T, Jefferson K K, Grout M, Goldmann D A, Pier G B, (2007), Protection against *Escherichia coli* infection by antibody to the *Staphylococcus aureus* poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *PNAS*, 104:7528-7533.
- Chapman M R, Robinson L S, Pinker J S, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren S J, (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, 295:851-855.
- Cherny I, Rockah L, Levy-Nissenbaum O, Gophna U, Ron E Z, Gazit E, (2005), The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *Journal of molecular biology*, 352:245-252.
- Chi E, Mehl T, Nunn D, Lory S, (1991). Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infection and immunity*, 59: 822-828.
- Christensen B E, Characklis W W, (1990). Physical and chemical properties of biofilm. In: Characklis W.G., Marshall, K.C., *editors. Biofilms*. New York: Wiley, 93-130.
- Claessen D, Rink R, De Jong W, Siebring J, De Vreugd P, Hidde Boersma F G, Dijkhuizen L, Wosten H A B, (2003), A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes & Development*, 17: 1714-1726.
- Cossard E, Gallet O, Di Martino P, (2005), Comparative adherence to human A549 cells, plant fibronectin-like protein and polystyrene surfaces of four *Pseudomonas fluorescens* strains from different ecological origin. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 811-815
- Costerton J W, Geesey G G, and Cheng G K, (1978), How bacteria stick. *Scientific american*. 238:86-95. Medline.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades J R, (2001), Bap, a *S. aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183:2888-2896.
- Cucarella C, Angeles Tormo M, Ubeda C, Pilar Trotonda M, Monzon M, Peris C, Amorena B, Lasa I, Penades J R, (2004). Role of Biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 72:2177-2185.

Danese P N, Pratt L A, Kolter R, (2000), Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of bacteriology*, 182: 3593-3596.

Danese P N, Pratt L A, Dove S L, Kolter R, (2000b). The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Molecular Microbiology*, 37:424-432.

Darfeuille-Michaud A., Neut C., Barnich N., Lederman E., Di Martino P., Desreumaux P., Gambiez L., Joly B., Cortot A., Colombel J.F, (1998). Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*: 115: 1405-1413

Davey M E, Caiazza N C, O'Tool G A, (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 185: 1027-1036.

de Beer D, Stoodley P, (1995). Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Water Sci Technol* 32(8): 11-18.

Delaney G M, Bennetto H P, Mason J R, Roller H D, Stirling J L, Thurston C F, (1984). Electron transfer coupling in microbial fuel cells: 2 performance of fuel cells containing selected microorganism mediator-substrate combinations. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 34: 13-27.

Di Martino P, Rebière-Huet J, Hulen C, (2000). Effects of antibiotics on adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to A549 pneumocyte cells. *Chemotherapy*, 46 : 129-134.

Di Martino P, (2001), Effects of Antibiotics on Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* to Human fibronectine. *Chemotherapy*, 47: 344-349.

Di Martino P, Gagnière H, Berry H, Bret L, (2002). Antibiotic resistance and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* strains from ventilated patients with pneumonia in intensive care units : comparison with imipenem resistant extra-respiratory tract isolates from uninfected patients. *Microbes and Infection*, 4:613-620.

Di Martino P, Fursy R, Bret L, Sundararaju B, Phillips R S, (2003). Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Canadian review of Microbiology*, 49:443-449.

Dobson C M, (2003), Protein folding and misfolding. *Nature*, 426:884-890.

Dorel C, Vidal O, Prigent-Combaret C, Vallet I, Lejeune P, (1999). Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiology letters* : 178: 169-175.

Doumèche B, Galas L, Vaudry H, Di Martino P, (2007a), Membrane foulants characterization in a drinking water production unit. *Food and Bioprocuts processing*, 85: 1-8.

Doumèche B, Picard J, Larreta-Garde V, (2007b), Enzyme-catalyzed phase transition of alginate gels and gelatin-alginate interpenetrated networks. *Biomacromolecules*, 8: 3613-3618.

Dow J M, Crossman L, Findlay K, He Y Q, Feng J X, Tang J L, (2003), Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:10995-11000.

Draget K I, Steinsvå K, Onsøyen E, Smidsrød O (1998). Na- and K-alginate; effect on Ca²⁺-gelation. *Carbohydrate Polymers* 35: 1-6.

Dueholm M S, Petersen S V, Sonderkaer M, Larsen P, Christiansen G, Hein K L, Enghild J J, Nielsen K L, Nielsen P H, Otzen D E, (2010), Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology*, 77:1009-1020.

Ejrnaes K, (2011). Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Danish medical bulletin*, 58 4.

Erable B, Roncato M A, Achouak W, Bergel A., (2009). Sampling natural biofilms: a new route to build efficient microbial anodes. *Environmental science and technology*, 43: 3194-3199.

Ertesvag H, Hoidal H K, Schjerven H, Svanem BI, Valla S, (1999), Mannuronan C-5-epimerases and their application for in vitro and *in vivo* design of new alginates useful in biotechnology. *Metabolic engineering*, 1: 262-269.

- Esteves C L C, Jones B D, Clegg S, (2005), Formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *E. coli* on epithelial cells following mixed inoculations. *Infection and immunity*, 73: 5198-5203.
- Fernandez-Escamilla A M, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L, (2004), Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology*, 22: 1302-1306.
- Fothergill J L, Winstanley C, James C E, (2012) Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert review of Anti-infective therapy*, 10:219-235.
- Fowler D M, Koulov A V, Balbh W E, Kelly J W, (2007), Functional amyloid-from bacteria to humans. *Trends*, 32:217-224.
- Friedman L, Kolter R, (2004a), Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51: 675-690.
- Friedman L, Kolter R, (2004b), Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186: 4457-4465.
- Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R, (2002). Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia* strains on the basis of *gyrB* gene sequence. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2779-2785.
- Gacesa P, (1998), Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiology*, 144: 1133-1143.
- Gagnière H, Di Martino P ,(2004), $\alpha 5\beta 1$ integrin and fibronectin are involved in adherence to A549 cells of the *Pseudomonas aeruginosa* ER97314 clinical strain. *Folia Microbiologica*. 49: 757-762.
- Garett E S, Perlegas D, Wozniak D J, (1999), Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *Journal of Bacteriology*, 181: 7401-7404.
- Geels F P, Schippers B, (1983). Reductions of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*:108: 207-214.

Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O, Götz F, (1998), Characterization of the N-acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *The journal of biological chemistry*, 273: 18586-18593.

Gerlach G F, Allen B L, Clegg S, (1988). Molecular characterization of the type 3 (MR/K) fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*, 170 : 3547-3553.

Ghigo J M, (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412:442-445.

Giltner C L, Habash M, Burrows L L, (2010). *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili. *Journal of molecular biology*, 398: 444-461.

Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T, (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular Microbiology*, 75: 815-826.

Gonzales Barrios AFG, Zuo R, Hashimoto Y, Yang L, Bentley WE, Wood TK (2006). Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *Journal of Bacteriology*, 188:305–316

Gotz F (2002) *Staphylococcus* and biofilm, *Molecular Microbiology*, 43: 1367-1378.

Gorin, J P A, Spencer T J F (1966) Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian journal of chemistry*, 44: 993-998.

Grantcharova N, Peters V, Monteiro C, Zakikhany K, Romling U, (2010), Bistable expression of CsgD in biofilm development of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 192: 456-466.

Habimana O, Meyrand M, Meylheuc T, Kulakauskas S, Briandet R, (2009), Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Environmental Microbiology*, 75: 7814-7821.

Halan B, Buehler K, Schmid A, (2012) Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in Biotechnology*, 30, 453-465.

Hanson M S, Hempel J, Brinton Jr C C, (1988). Purification of the *Escherichia coli* type I pilin and minor pilus proteins and partial characterization of the adhesion protein. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170:3350-3358.

Hegeman GD, Cohen G N, Morgan R (1970). Apsartate semi-aldehyde dehydrogenase from *E. coli* K12. *Methods enzymol* 17:708-713.

Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, Gotz F, (1996), Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infection and immunology*, 64: 277-282.

Heilmann C, Hussain M, Peters G, Gotz F, (1997), Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *S. epidermidis* to a polystyrene surface. *Molecular Microbiology*, 24: 1013-1024.

Henderson I R, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez R C, Aldeen D A, (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology review*, 68: 692-744.

Hinsa S M, Espinosa-Urgel M, Ramos J L, O'Tool G A, (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology*, 49:905-918.

Houari A, (2009), Caractérisation de biofilms formés à la surface de membranes de nanofiltration dans un processus de production d'eau potable et stratégies de lutte anti-biofilm. Thèse Université de Cergy-Pontoise.

Houari A, Picard J, Habarou H, Galas L, Vaudry H, Heim V, Di Martino P, (2008). Rheology of biofilms formed at the surface of NF membranes in a drinking water production unit. *Biofouling*, 24: 235-240.

Houari A, Di Matrino P, (2007). Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Letters in applied Microbiology*, 45:652-656.

Hugh R, Guarraia L, Hatt H, (1964). The proposed neotype strains of *Pseudomonas fluorescens* (trevisan) migula 1895. *International bulletin of Bacteriological nomenclature and taxonomy*, 14:145-155.

Hunt Ian, (2005). From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. *Protein expression and purification*, 40:1-22.

Izano E A, Amarante M A, Kher W B, Kaplan J B, (2008), Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 74: 470-476.

Jimenez-Gomez P, Pouelo de Felipe M J, Llinares Pinell F, Garcia de los Rios J E, (2007). Quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* active natural compounds as antagonists. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 41-51.

Jonas K, Tomenius H, Kader A, Normark S, Römling U, Belova L M, Melefors O, (2007), Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology*, 7:70.

Jourdan-Da Silva N, Le Hello S, (2010), Salmonelloses en France, 2002-2010: tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation*, 50 : 31-35.

Kaplan J B, Fine D H, (2002). Biofilm dispersal of *Neisseria subflava* and other phylogenetically diverse oral bacteria. *Applied in environmental microbiology*, 68: 4943-4950.

Kaplan J B, Rangunath C, Ramasubbu N, Fine D H, (2003), Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology*, 185: 4693-4698.

Kaplan J B, Rangunath C, Velliyagounder K, Fine D H, Ramasubbu N, (2004a), Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial agents and Chemiotherapy*, 48: 2633-2636.

Kaplan J B, Velliyagounder K, Rangunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch J K-M, Ramasubbu N, (2004b), Genes involved in the synthesis and degradation of Matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 186: 8213-8220.

- Kavanagh G N, Ross-Murphy S B (1998). Rheologicals characterisation of polymer gels. *Progress in Polymer Science*: 23: 533-562.
- Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter S A, Krishna V, Grover R, Roy R, Singh S, (2005). Mechanism of thioflavine T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151: 229-238.
- Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S, (2005). Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiology and immunology*, 49:875-884.
- Kipnis E, Sawa T, Weiner-Kronish J, (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses*, 36:78-91.
- Kjaergaard K, Schembri M A, Hasman H, Klemm P, (2000), Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 1982 :4789-4796.
- Klunk W E, Jacob R F, Mason R P, (1999). Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymology*, 309: 285-305.
- Korhonen T K, Lounatmaa K, Ranta H, Kuusi N, (1980). Characterization of Type 1 Pili of *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of bacteriology*, 144: 800-905.
- Kulasekara H D, Ventre I, Kulasekara B R, Ladzunski A, Filloux A, Lory S, (2005). A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Molecular Microbiology*, 55: 368-380.
- Lane M C, Mobley HLT, (2007). Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney international* 72: 19-25.
- Lasa I, Penadés J R, (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157: 99-107.
- Larsen P, Nieslen J L, Dueholm M S, Wetzel R, Otzen D, Nieslen P H, (2007), Amyloid adhesions are abundant in natural biofilm. *Environmental Microbiology*, 9:3077-3090.

Larsen P, Nielsen J L, Otzen D, Nielsen P H, (2008), Amyloid-like adhesions produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:1517-1526.

Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo J M, Gamazo C, Penades J R, Lasa I (2005), BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58, 1322-1339.

Latasa C, Solano C, Penades J R, Lasa I, (2006), Biofilm-associated proteins. *Comptes rendues Biologies*, 329:849-857.

Lau P C Y, Lindhout T, Beveridge T J, Dutcher J R, Lam J S, Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191: 6618-6631.

Lembré P, Peralta S, Cantin-Rivière S, Di Martino P, (2009), *Pseudomonas fluorescens* ER74508 adherence to polymer networks made of polydimethylsiloxane and/or cellulose acetate butyrate. *Congrès Biomicroworld 2009*, Lisbonne.

LeVine H, 3rd(1999). Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavine T. *Methods Enzymology*, 309, 274-284.

Lewis K, (2010). Persister Cells. *Annual review of Microbiology*, 64: 357-372.

Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, Diella F, Serrano L, (2004), A comparative study of the relationship between protein structure and β -aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *Journal of Molecular Biology*, 342: 345-353.

Linker A, Jones R S, (1964), A Polysaccharide resembling Alginic Acid from a *Pseudomonas* Micro-organism. *Nature*, 204: 187-188.

Loehfelm T W, Luke N R, Campagnari A A, (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm associated protein. *Journal of Bacteriology*, 190: 1036-1044.

Lund B, Edlund C, (2003). Bloodstream isolates of *Enterococcus faecium* enriched with the enterococcal surface protein gene, *esp*, show increased adhesion to eukaryotic cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5183-5185.

Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R, (1996), The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of Bacteriology*, 178: 175-183.

Man S M, Kaakoush N A, Mitchell H M, (2010). The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease. *Nature reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8: 152-168.

Mangalappalli-Illathu A K, Lawrence J R, Swerhone G D W, Korber D R, (2007), Architectural adaptation and protein expression patterns of *Salmonella enterica* serovar enteritidis biofilms under laminar flow conditions. *International journal of food Microbiology*, 123: 109-120.

Mann E E, Rice K C, Boles B R, Endres J, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang L H, Smeltzer M S, Horswill A R, Bayles K W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 4:e5822.

Marrafini L A, DeDent A C, Schneewind O, (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, 70: 192-221.

Matsukawa M, Greenberg E P, (2004), Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of bacteriology*, 186, 4449-4456.

McCrea K, W, Hartford O, Davis S, Ni Eidhin D, Lina G, Speziale P, Foster T J, HooK M, (2000). The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 146: 1535-1546.

Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A, (2011). Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 13: 1666-1681.

Molin S, Tolker-Nielsen, (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhance stabilization of the biofilm structure. *Current opinion in Biotechnology*, 14:255-261.

Monack D M, Mueller A, Falkow S, (2004). Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 747-765.

- Monteiro C, Fang X, Ahmad I, Gomelsky M, Romling U, (2011). Regulation of biofilm components in *Salmonella enterica serovar typhimurium* by lytic transglycosylases involved in cell wall turnover. *Journal of bacteriology*, 193: 6443-6451.
- Nemoto K, Hirota K, Murakami K, Taniguti K, Murata H, Viducic D, Miyake Y, (2003). Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy* 49: 121-125.
- Nilsson M, Frykberg L, Pei J I, Lindberg M, Guss B, (1998). A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 66: 2666-2673.
- O'Gara J P, (2007), Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *S. epidermidis* and *S. aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 270: 179–188.
- Olsen A, Herwald H, Wikstrom M, Persson K, Mattsson E, Bjorck L, (2002). Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. *The journal of biological chemistry* : 277 : 34568-34572.
- Olsen A, Arnqvist A, Hammar M, Sukupolvi S, Normark S (1993), The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 7:523-536.
- Orskov F, (1951). On the occurrence of *E. coli* belonging to O-group 26 in cases of infantile diarrhoea and white scours. *Acta Pathol microbiol Scand*, 29 : 373-378.
- O'Toole G A, Kolter R, (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30: 295-304.
- Ott M C, Day D F, Koenig D W, Pierson D L, (2001). The release of alginate lyase from growing *Pseudomonas syringae pathovar phaseolicola*. *Current Microbiology*, 42:78-81.
- Otto K, Hermansson M, (2004). Inactivation of *ompX* causes increased interactions of type I fimbriated *Echerichia coli* with abiotic Surfaces. *Journal of Bacteriology*, 186:226-234.
- Otto M, (2008). Staphylococcal biofilms. *Current topics in Microbiology Immunology*, 322: 207-228.
- Parmar A S, Nunes A M, Baum J, Brodsky B, (2012). A peptide study of the relationship between the collagen triple-helix and amyloid. *Biopolymers*, 10:795-806.

Parra-Ruiz J, Vidailiac C, Rybak M J, (2012) Macrolides and staphylococcal biofilms. *Revista Espanola Quimioterapia*, 25:10-16.

Patti J M, Allen B L, McGavin M J, HooK M, (1994). Mscramm-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual review of Microbiology*, 48:585-617.

Picot L, Mezghani-Abdelmoula S, Merieau A, Lerous P, Cazin L, Orange N, Feuilloley M GJ, (2001). *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes and infection*, 3: 1-11.

Pimenta A L, Di Martino P, Blight M A, (2006), Positive correlation between in vivo and in vitro assays for the evaluation of *Pseudomonas* virulence. *Research in Microbiology*, 157:885-890.

Ponnusamy P, Natarajan V, Sevanan M, (2011), In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 210-213.

Pratt L A, Kolter R, (1998), Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis, and type I pili. *Molecular microbiology*, 30: 285-293.

Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P, (1999), Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181: 5993-6002.

Prigent-Combaret C, Brombacher E, Vidal O, Ambert A, Lejeune P, Landini P, Dorel C,(2001), Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183 : 7213-7223.

Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D, (2007). Rôle of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 153: 2083-2092.

Rabaey K, Boon N, Siciliano S D, Verhaege M, Verstraete W, (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied Environmental Microbiology*, 70 :5373-5382.

Ras M, Girbal-Neuhauser E, Paul E, Spérandio M, Lefebvre D. (2008) Protein extraction from acitvated sludge : An analytical approach. *Water research*, 42: 1867-1878.

Rebière-Huet J., Di Martino P., Gallet O., Hulen C., (1999), Intéractions de protéine de membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* avec la fibronectine plasmatique. Recherche d'adhésines bactériennes. *C. R. Acad. Sci. Paris* 322 :1071-1081.

Reisner A, Haagensen J A J, Schembrei M A, Zechner E L , Molin S, (2003), Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular Microbiology*, 48: 933-946.

Remminghorst U, Rehm B H A, (2006), Bacterial alginates: from biosynthesis to applications, *Biotechnology letters*, 28:1701-1712.

Rice K C, Mann E E, Endres J L, Weiss E C, Cassat J E, Smeltzer M S, Bayles K W. (2007). The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *PNAS*, 104:8113-8118.

Romling U, Sierralta W D, Eriksson K, Normark S, (1998), Multicellular and aggregative behavior of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the AgfD promoter. *Molecular Microbiology*, 28: 249-264.

Romling U, Rhode M, Olsen A, Normark S, Reinköster J, (2000), AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Molecular Microbiology*, 36: 10-23.

Romling U, (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behavior in Enterobacteriaceae. *Cellular and molecular life science*, 62: 1234-1246.

Ross P, Mayer R, Benziman M, (1991), Cellulose biosynthesis and function in bacteria, *Microbiological review*, 35-58.

Roubaty J-L, (2001), Biofilm et développement de la Legionella, En ligne, www.salmonellose.com.

Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L, (2006), Protein aggregation and amyloidosis: Confusion of the kinds? *Current opinion in structural biology*, 16: 118-126.

Roux A, Beloin C, Ghigo JM, (2005). Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of New *Escherichia coli* adhesins. *Journal of Bacteriology*, 187: 1001-1013.

Ryder C, Byrd M, Woznik D J, (2007), Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current opinion in Microbiology*, 10: 644-648.

Sabra W, Zeng A P, Deckwer W D, (2001), Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 315-325.

Sadovskaya I, Vinogradov E, Li J, Jabbouri S, (2004), Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydrate research*, 339: 1467-1473.

Saha C, Hari-dass R, Raynes J G, (2006), Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood*, 108:1751-1757.

Salman L, Prince A, (1993). *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *The Journal of Clinical investigation*, 92; 1875-7880.

Sauer, K, Cullen M C, Rickard A H, Zeef L A H, Davies D G, Gilbert P, (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 186:7312-7326.

Schneider C A, Rasband W S, Eliceiri K W, (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:671-675.

Schmidt M A,(2010). LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular Microbiology*, 12: 1544-1552.

Schürks N, Wingender J, Flemming H-C, Mayer C (2002). Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of biological macromolecules*, 30:105-111.

Schwartz K, Syed A K, Stephenson R E, Rickard A H, Boles B R, (2012). Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLOS pathogens*, 8: e1002744.

Shaw T, Winston M, Rupp C J, Klapper I, Stoodley P (2004). Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Physique review letter* 93: 1-4.

Sherlock O, Munk Vejborg R, Klemm P, (2005), The TibA adhesion/invasion from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infection and Immunity*, 73: 1654-1663.

Sherlock O, Schembri M A, Reisner A, Klemm P, (2004). Novel roles for the AIDA adhesion from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186: 8058-8065.

Sherwood L, Wiley J, Woolverton C (2010) *Microbiologie* 3eme edition, De Boeck Edition.

Shewmaker F, McGlinchey R P, Thurber R P, McPhie K R, Dyda F, Tycko R, Wickner R B, (2009). The functional curli amyloid is not based on in-register parallel β -sheet structure. *The journal of Biological Chemistry*, 284: 25065-25075.

Shirliff M E, Mader J T , Camper A K , (2002), Molecular interactions in biofilms, review, *Chemistry & biology*,. 9: 859–871.

Simoes M, Pereira M O, Vieira M J, (2005). Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Research*, 39:5142-5152.

Skerman V B D, McGowan V, Sneath P H A, (1980). Approved Lists of Bacterial name. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 30 : 225-420.

Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo J M, Gamazo C, Lasa I, (2002), Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation : critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43: 793-808.

Sponza D T, (2004). Properties of four biological flocs as related to settling. *Journal of environmental engineering*, 11: 1289-1300.

Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C, Lindahl G, (1999). The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 33: 208-219.

Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M, (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*: 43:159-271.

Stewart P S, Costerton J W, (2001), Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358: 135-138.

Stokke B T, Draget K I, Smidsrod O, Yuguchi Y, Urakawa H, Kajiwara K, (2000), Small-Angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. *Macromolecules*, 33: 1853-1863.

Stoodley P, Dodds I, Boyle J D, Lappin-Scott H M (1999). Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology*, 85: S19–S28.

Stoodley P, Cargo R, Rupp C J, Wilson S, Klapper L (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*:29, 361-367.

Sutherland I W, (2001), The biofilm matrix- an immobilized but dynamic microbial environment, *TRENDS in Microbiology*, 9, No.5.

Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E, (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature review microbiology*, 8: 207-217.

Thomas V C, Thurlow L R, Boyle D, Hancock LE. (2008). Regulation of autolysis-dependent eDNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 190: 5690-5698.

Timmerman C P, Fler A, Besnier J M, De Graaf L, Cremers F, Verhoef J, (1991). Characterization of a proteinaceous adhesion of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infection and immunity*, 59:4187-4192.

Tormo M A, Knecht E, Gotz F, Lasa I, Penades J R, (2005) Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfert. *Microbiology*, 151: 2465-2475.

Toutain C M, Caizza N C, Zegans M E, O'Toole G A, (2007), Rôles for flagellar stators in biofilm formation by *P. aeruginosa*. *R. in Microbiology*, 158: 471-477

Towler B W, Rupp C J , Cunningham Al B, Stoodley P (2003). Viscoelastic properties of a mixed culture biofilm from rheometer creep analysis. *Biofouling*, 19: 279-285.

Truong V K, Lapovok R, Estrin Y S, Rundell S, Wang J Y, Fluke C J, Crawford R J, Ivanova E P, (2010). The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. *Biomaterials*, 31: 3674-3683.

Uhlich G A, Cooke P H, Solomon E B, (2006). Analyses of the Red-Dry-Rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2564-2572.

Uhlen B E, Norgren M, Baga M, Normark S, (1985), Adhesion to human cells by *Escherichia coli* lacking the major subunit of digalactoside-specific pilus-adhesin. *PNAS*, 82:1800-1804.

Urli T, Perone G, Acquarolo A, Zappa S, Antonini B, Ciani A, (2002), Surveillance of infections acquired in intensive care : usefulness in clinical practice. *Journal of hospital infection*, 52: 130-135.

Vallet I, Olson J W, Lory S, Lazdunski A, Filloux A, (2001), The chaperon/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involment in biofilm formation. *PNAS*, 98: 6911-6916.

Van Schaik E J, Giltner C L, Audette G F, Keizer D W, Bautista D L, Slupsky C M, Sykes B D, Irvin R T, (2005). DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Journal of Bacteriology*, 187:1455-1464.

Veenstra G J C, Cremers F F M, Van Dijk H, Fleer A, (1996), Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *S. epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 178: 537-541.

Vega N M, Rallison K, Skhalil A , Collins J J (2012) Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, 8:431-433.

Venyaminov S Y, Prendergast F G, (1997). Water (H₂O and D₂O) molar absorptivity in the 1000-4000 cm⁻¹ range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. *Analytical biochemistry*, 248: 234-245.

Verstraeten N, Breaken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, Michiels J (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiology*, 16: 496-506.

Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P, (1998). Isolation of *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology*, 180:2442-2449.

Viera M J, Melo J F, Pinheiro M M, (1993). Biofilm formation : hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 7 : 67-80.

Vinogradov A M, Winston M, Rupp C J, Stoodley P (2004). Rheology of biofilms formed from dental plaque pathogen *Streptococcus mutans*. *Biofilms* 1: 49-56.

Von Eiff C, Peters G, Heilmann C, (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*, 2:677-685.

Vuong C, Gerke C, Somerville G A, Fisher E R, Otto M, (2003), Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of infection disease*, 188: 706-718.

Wang X, Smith D R, Jones J W, Chapman M R, (2007), *In vitro* polymerization of a functional *Escherichia coli* amyloid protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 3713-3719.

Wang X, Chapman M R, (2008a), Sequence determinants of bacterial amyloid formation. *Journal of molecular Biology*, 380: 570-580.

Wang X, Chapman M R, (2008b), Curli provide the template for understanding controlled amyloid propagation. *Prion*, 2: 57-60.

Weiss-Muszkat M, Shakh D, Zhou Y, Pinto R, Belausov E, Chapman M R, Sela S,(2010) Biofilm formation by multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain. *Applied and environmental Microbiology*, 76: 1545-1554.

Weng L, Zhang L, Ruan D, Shi L, Xu J, (2004), Thermal gelation of cellulose in a NaOH/thiourea aqueous solution. *Langmuir*, 20: 2086-2093.

Whiteley M, Bangera M G, Bumgarner R E, Parsek M R, Teitzel G M, Lory S, Greenberg E P, (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413, 860-864.

Witchurch C B, Tolker-Nielsen T, Ragas P C, Mattick J S, (2002), Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295: 1487.

- Withe A P, Collinson S K, Banser P A, Gibson D L, Paetzel M, Strynadka N C J, Kay W W, (2001), Structure and characterization of AgfB from *Salmonella enteritidis* thin aggregative fimbriae. *Journal of Molecular Biology*, 311:735-749.
- White A P, Gibson D L, Kim W, Kay W W, Surette M G, (2006), Thin aggregative Fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of Salmonella. *Journal of Bacteriology*, 188:3219-3227.
- Wood T K, Bentley W E, (2007). Signaling in *Escherichia coli* Biofilms. *Edition Horizon bioscience*, p 123-141.
- Xun L Y, Mah R A, Boon D R, (1990), Isolation and characterization of disaggregatase from *Methanosarcina mazei* LYC. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 3693-3698.
- Yang L, Liu Y, Wu H, Hoiby N, Molin S, Song Z J, (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of Oral science*, 3: 74-81.
- Zalewska-Piatek B M, (2011). Urinary tract infections of *Escherichia coli* strains of the chaperone-usher system. *Polish journal of Microbiology*, 60:279-285.
- Zogaj X, Nimtz M, Rhode M, Bokranz W, Romling U, (2001), The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 39: 1452-1463.

Chapitre VI annexes

Annexe 1

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Souches	Phénotype agglomération rouge congo
PAO1 CIP 104116	-
NK 125502	-
PAK	-
PAK N1G	+/-
PA 61964	+
PA 63204	+
PA 63259	++
PA 64194	+/-
PA 64949	+/-
PA 65026	+++
PA 65564	+/-
PA 65566	-
PA 65609	++
PA 65673	-
PA 67081	-
PA 68916	+
PA 69005	+
PA 69084	+
PA 69560	-
PA 72565	-
PA 72735	-
PA 74171	+
PA 75520	-
PA 76825	-
PA 77126	+

PA 78976	+/-
PA 78997	-
PA 81887	-
PA 82483	-
PA 83950	+
PA 84081	+
PA 84483	+
PA 86371	-
PA 86676	+
PA 86940	+
PA 87756	-
PA 88377	+
PA91886	+
PA 91887	-
PA 92581	+/-
PA 93506	-
PA 93610	++
PA 96426	+++
PA 96635	+
PA 96805	-
PA 96904	+/-
PA 96906	+++
PA 97030	++
PA 97314	+/-
PA98513	+
PA 99980	-
PA 99146	+
PA 99210	-
PA 99832	+

PA 99833	+
----------	---

<i>Pseudomonas fluorescense</i>	
Souches	Phénotype agglomération rouge Congo
PF 74508	-
PF 6913	-
WCS 53 65 ZK 8334	++
SMD 31 PF UK	-
FFD 16 PF UK	+
MFO	

<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	
Souches	Phénotype agglomération rouge Congo
KP 11989	-
KP 15851	-
KP 18005	-
KP 20953	-
KP 21713	-
KP 25196	-
KP 26930	-
KP 34012	-
KP 36655	-
KP 37033	-
KP 37694	-
KP 41761	+/-
KP 42027	-
KP 9141	++

IA65	-
------	---

<i>Klebsiella ocytocae</i>	
Souches	Phénotype agglomération rouge Congo
KO 10383	-
KO 18673	-
KO 19645	-
KO 25067	-
KO 29685	-
KO 35291	-
KO 37904	-
KO 79561	+/-

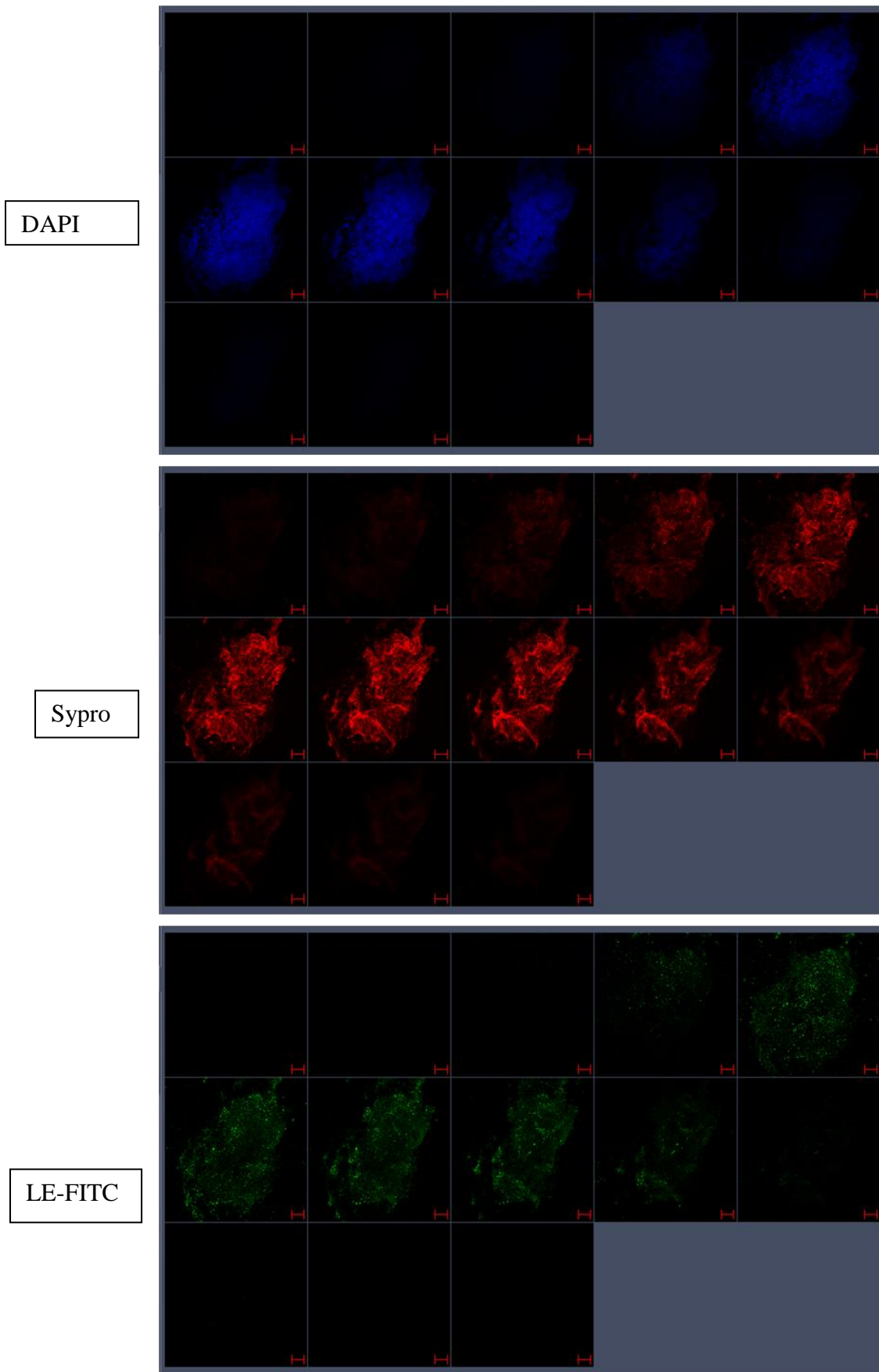
Souches	Phénotype agglomération rouge congo
<i>S. epidermidis</i> CIP 6.509	+
<i>S. epidermidis</i> CIP 53.124	+
<i>S. enterica</i> CIP 58.58	++

<i>Escherichia coli</i>	
Souches	Phénotype agglomération rouge congo
Coli K12 ref	-
XL1 Blue	+/-
Coli B	-
Coli tp viro	+
PHL 804	-
PHL 644 Kan^f	++
PHL 645 Kan ^f	+
MG 1655 Δ tnA Kan ^f	-
3714	-
3714 PMD6	+
3720	-
3720 PDM6	-
JM109 Puc	+/-
CIP 52167	-
CIP 52172	++
K1 S10	-
K1 S52	-
K1 S55	+++
K1 S56	-
K1 S70	-
K1 S75	-
K1 S83	-
EC 40	++
EC 65	++

EC 70	++
EC 78	+/-
EC 97	++
EC 140	+/-
EC 163	++
EC173	++
EC 207	++
EC 219	-
EC 305	-
EC 346	++
EC 384	-
EC 398	-
EC 418	+
EC 434	++
EC 459	++
EC 525	-
EC 548	-
EC 568	-
EC 586	-
EC 752	+/-
EC 812	+
EC 844	+++
EC 846	+
EC 874	+++
EC 892	-
EC 1022	++
EC 1077	++
EC 1287	+++
EC 1303	-

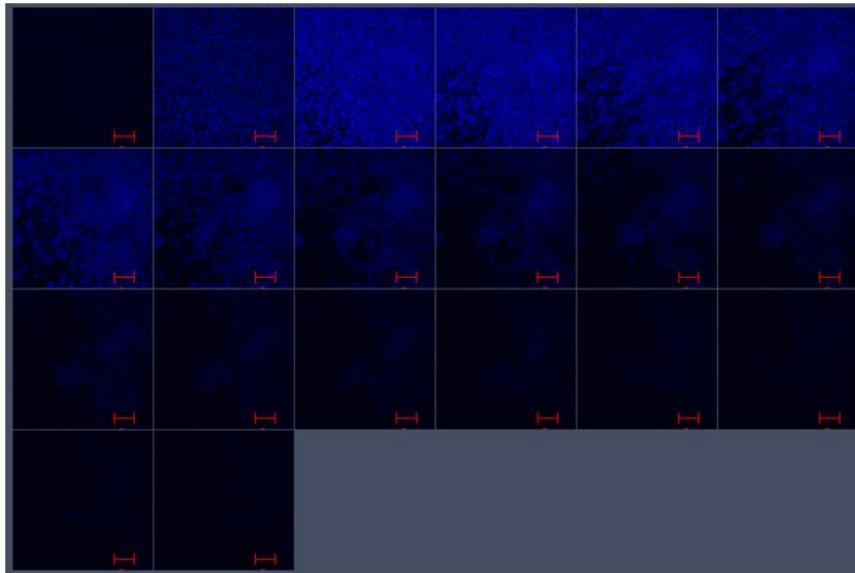
EC 1321	-
EC 1344	++
EC 1345	-
EC 1347	+
EC 1350	-
EC 1360	-
EC 1380	+
EC 01384	+
EC 1387	++
EC 1473	++
EC 1487	++
EC 1526	-
EC 1633	+
EC 1641	+/-
EC 1666	++
EC 1722	++
EC 1726	-
EC 1750	+
EC 1769	-
EC 1794	+/-
EC 1817	+
EC 1926	-
EC 1945	-
EC 2019	+
EC 2167	-
EC 2215	++
EC 2330	+
EC 2332	+++
EC 2710	+/-

EC 2951	-
EC 3022	-
EC 3117	-
EC 3178	++
EC 3190	-
EC 3229	+/-
EC 3240	-
EC 3312	-
EC 3564	-
EC 3769	-
EC 3791	-
EC 3966	++
EC 4008	-
EC 4117	+/-
EC 4174	++
EC 4421	-
EC 4488	+/-
EC 4602	-
EC 4691	+
EC 4921	-
EC 5132	-
EC 13812	-
EC 15242	-
EC 16334	++
EC 20477	-
EC 52170	-

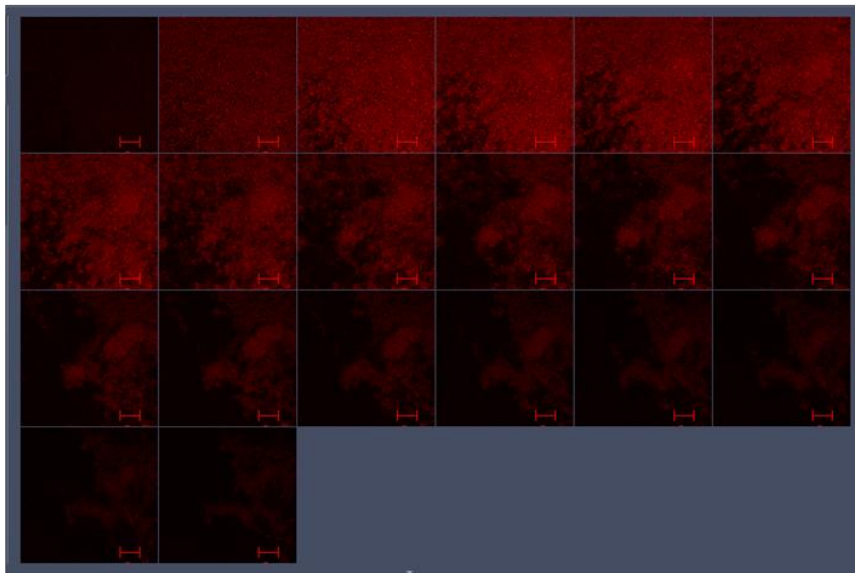


Coups en microscopie confocale d'un biofilm de *P. aeruginosa* de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC, les coupes réalisées sont espacées de deux microns (barre d'échelle 20 µm, l'image en haut à gauche est la surface de verre t celle en bas à droite est le haut de la structure).

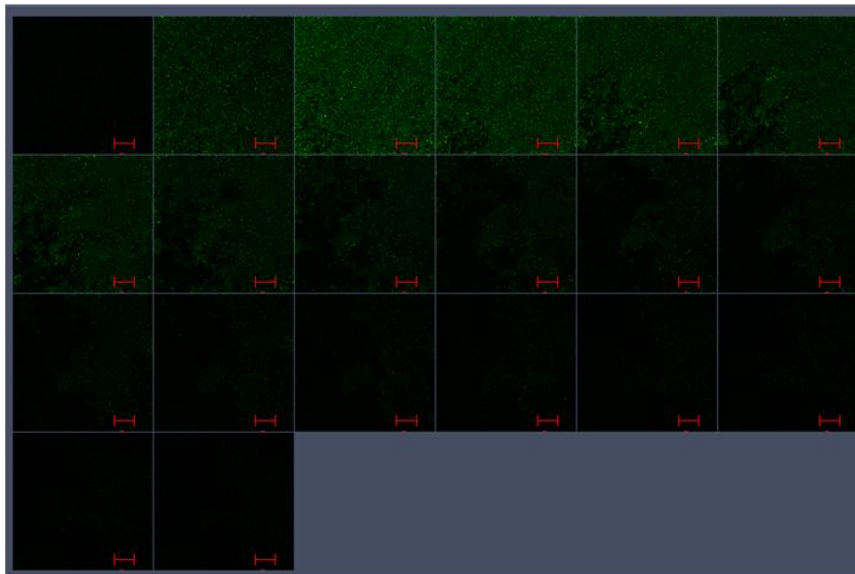
DAPI



Sypro

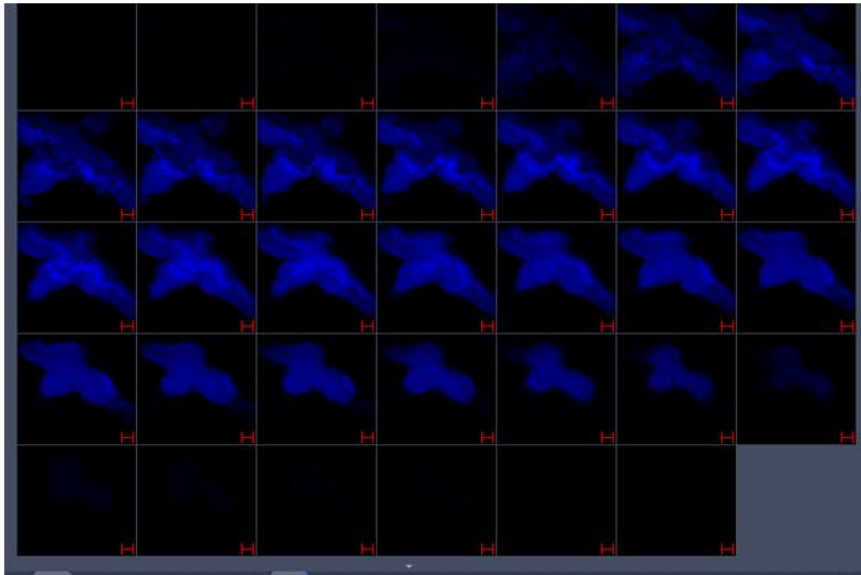


LE-FITC

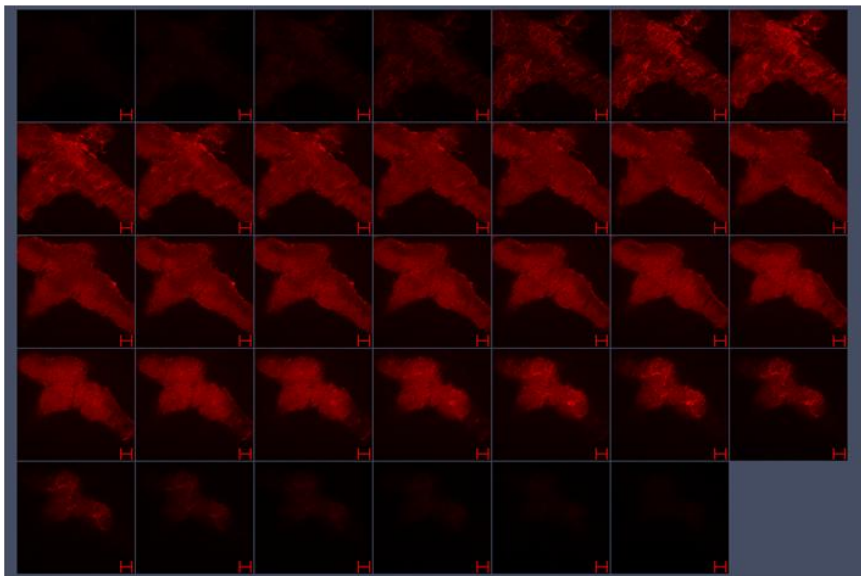


Coups en microscopie confocale d'un biofilm de *S. epidermidis* de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC, les coupes réalisées sont espacées de deux microns (barre d'échelle 20 μ m, l'image en haut à gauche est la surface de verre t celle en bas à droite est le haut de la structure).

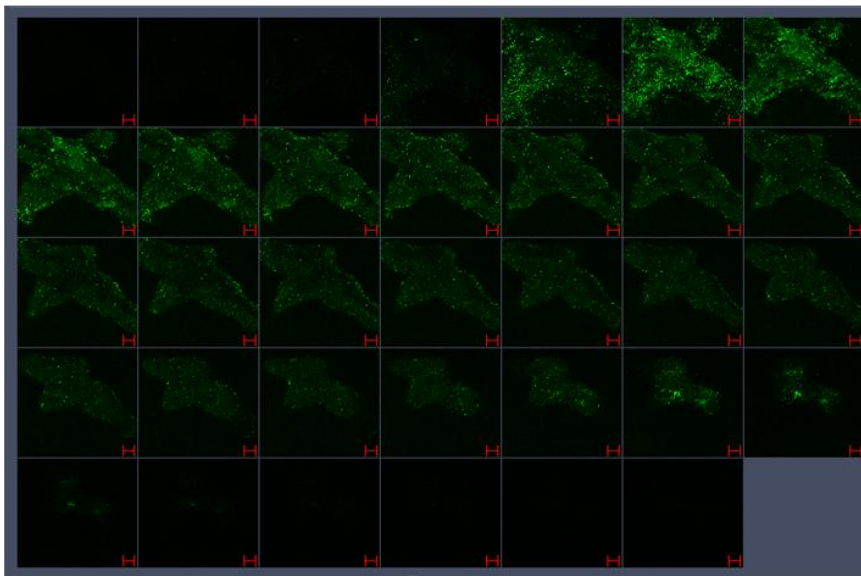
DAPI



Sypro



LE-FITC



Coupes en microscopie confocale d'un biofilm de *S. enterica* de 10 jours sur lame de verre marqué par le DAPI, le Sypro Ruby, et la lectine LE-FITC, les coupes réalisées sont espacées de deux microns (barre d'échelle 20 μm , l'image en haut à gauche est la surface de verre t celle en bas à droite est le haut de la structure).

Résumé

Les biofilms sont des édifices macromoléculaires qui résultent de l'adhérence de microorganismes à une surface. Ils sont constitués de cellules enchâssées dans un réseau d'exopolymères d'origine biologique qui forment une matrice extracellulaire. Les biofilms posent des problèmes technologiques et sanitaires dans de nombreux domaines, aussi bien agroalimentaire, médical, ou industriel. Comprendre les mécanismes de formation de ces structures est donc un enjeu majeur. Malgré une grande diversité de la structure des biofilms, de grands principes semblent en régir la composition. Ainsi, la présence de polysaccharides comme l'alginate et la cellulose joue un rôle majeur dans leur formation et dans la définition de leurs propriétés mécaniques. Si la présence de polymères protéiques comme les fibres amyloïdes semble avoir un caractère universel au sein des biofilms, leur rôle dans la formation de la matrice et dans ses propriétés mécaniques restait à définir. Lors de cette étude, nous avons caractérisé la structure et la composition de trois biofilms monobactériens issus de trois espèces différentes *P. aeruginosa* NK 125502, *S. enterica* CIP 58.58 et *S. epidermidis* CIP 53.124. Les biofilms monobactériens formés par *P. aeruginosa* et *S. enterica* après 10 jours comportent une matrice riche en protéine qui englobe très largement les cellules. Ils ont des propriétés viscoélastiques avec une réponse en test de fluage analogue à ce qui a été décrit dans la littérature pour de nombreux biofilms. Les biofilms formés par *S. epidermidis* sont plus denses en cellules et moins riches en matrice. De plus, ces biofilms ont un comportement plus élastique et moins visqueux en test de fluage. Il semblerait donc y avoir une relation entre abondance de la matrice du biofilm et viscoélasticité. Afin de comprendre le rôle des protéines dans la matrice de biofilms, nous avons étudié les propriétés d'auto-assemblage de peptides synthétiques issus des protéines CsgA d'*E. coli*, FapC de *P. aeruginosa*, et BAP de *S. epidermidis*. Nous avons décrit la formation de fibres amyloïdes par chacun de ces peptides par des approches complémentaires de biochimie (fixation du rouge Congo et de la thioflavine), physico-chimie (spectroscopie Infrarouge) et imagerie (microscopie à lumière polarisée, microscopie à force atomique). Nous décrivons pour la première fois la formation de fibres amyloïdes par un peptide issu d'une protéine de la famille BAP. Enfin, nous avons formé différentes matrices synthétiques à base d'alginate et de méthylcellulose, en présence et en absence de protéines et de peptides amyloïdes et en avons analysé les propriétés mécaniques afin de mieux comprendre l'apport qu'a ce type de fibres sur les propriétés de ces structures. Ainsi, les fibres amyloïdes modifient les propriétés mécaniques des matrices synthétiques, permettant d'augmenter leur déformation sous contrainte. Nous avons débuté le développement de l'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser pour étudier l'organisation spatiale de ces matrices synthétiques.

En conclusion, ce travail apporte de nouveaux éléments pour la compréhension du rôle des fibres amyloïdes dans le renforcement de la matrice du biofilm. La capacité à former des fibres amyloïdes par un peptide issu de la protéine Bap de *S. epidermidis* suggère que cette propriété est plus largement présente au sein de cette famille de protéines. L'utilisation de matrices synthétiques à base d'alginate et de méthylcellulose et de peptides amyloïdes permet de mimer le comportement rhéologique de biofilms matures. La mise au point de ce modèle de matrice devra être poursuivie. Les travaux menés au cours de cette thèse, et l'ensemble des techniques utilisées, avec notamment la mise au point de l'observation de la biréfringence du rouge Congo par microscopie confocale permettront de développer les études sur cette famille de protéines amyloïdes ainsi que sur les matrices complexes de biofilms.

Mots clés : Biofilm, matrice, fibre amyloïde, alginate, cellulose, viscoélasticité

Abstract

Biofilms are macromolecular structures which result from the adhesion of microorganisms to a surface. They consist of cells embedded in a network of exopolymers of biological origin which form an extracellular matrix. Biofilms posed technological and health problems in many industrial and medical domains. Understanding the mechanisms of formation of these structures is a major challenge. Despite a great diversity in the structure of biofilms, universal principles seem to govern their composition. Thus, the presence of polysaccharides such as alginate and cellulose plays a major role in their formation and in determining their mechanical properties. If the presence of protein polymers such as amyloid fibers seems to be universal within biofilms, their role in the formation and in the mechanical properties of the matrix remains to be defined. In this study, we characterized the structure and composition of monobacterial biofilms from three different species: *P. aeruginosa* NK 125502, *S. enterica* CIP 58.58 and *S. epidermidis* CIP 53.124. These monobacterial biofilms formed on 10 days proved to have a matrix rich in protein, especially those formed by *P. aeruginosa* and *S. enterica*. In contrast, those formed by *S. epidermidis* seem more cohesive and less rich matrix. In addition, these biofilms were characterized by rheology. Biofilms formed by *P. aeruginosa* and *S. enterica* have a typical viscoelastic behavior in rheology, whereas those of *S. epidermidis* have a behavior more elastic and less viscous. It would therefore seem to be a relationship between abundance of the biofilm matrix and viscoelasticity.

In order to understand the role of proteins in biofilms, we studied the self-assembly of synthetic peptides extracted from proteins CsgA of *E. coli*, FapC of *P. aeruginosa*, and BAP of *S. epidermidis*. We characterized the formation of amyloid fibers by complementary methods of biochemistry (binding of thioflavine T and Congo Red), physical-chemistry (infra-red spectroscopy), and microscopies. We describe for the first time the formation of amyloid fibers by a peptide extracted from a protein of the BAP family. Finally, we formed various synthetic matrices composed of alginate and methyl-cellulose in the presence and absence of protein and amyloid peptides and we analyzed their mechanical properties in order to better understand the contribution of this type of fiber on the properties of these matrices. Hence, amyloid fibers modify the mechanical properties of synthetic matrices, by increasing the deformation under stress.

In conclusion, this study provides new evidence for understanding the role of amyloid fibers in the biofilm matrix strengthening. The formation of amyloid fibers by the Bap protein of *S. epidermidis* suggests the possibility of a general amyloid behavior in the Bap protein family. The use of synthetic matrices made of alginate and methyl-cellulose and amyloid peptides allows to mimic rheological properties of mature biofilms. The establishment of these model matrices should be continued. The studies made during this PhD and the methods used, in particular, a new application of confocal laser scanning microscopy to image the birefringence of Congo red will be helpful for the study of those type of amyloids and complex matrices of biofilms.

Keywords: Biofilm Matrix, amyloid fibers, alginate, cellulose, viscoelasticity