



HAL
open science

Caractérisation et contrôle du biofilm de *Vibrio tapetis*, pathogène de la palourde japonaise *Ruditapes* *philippinarum*

Sophie Rodrigues

► **To cite this version:**

Sophie Rodrigues. Caractérisation et contrôle du biofilm de *Vibrio tapetis*, pathogène de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Bactériologie. Université de Bretagne Sud, 2014. Français. NNT : 2014LORIS347 . tel-01245143

HAL Id: tel-01245143

<https://theses.hal.science/tel-01245143>

Submitted on 16 Dec 2015

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.



THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD

Mention : Sciences Biologiques / Microbiologie

Ecole Doctorale des Sciences de la Mer (EDSM)

présentée par

Sophie RODRIGUES

Préparée à l'EA 3884

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines

Caractérisation et contrôle du
biofilm de *Vibrio tapetis*,
pathogène de la palourde
japonaise *Ruditapes*
philippinarum

Thèse soutenue le 1^{er} décembre 2014

devant le jury composé de :

Alain RINCÉ

Professeur à l'Université de Caen Basse-Normandie / Rapporteur

Romain BRIANDET

Directeur de Recherche INRA AgroParisTech / Rapporteur

Delphine DESTOUMIEUX-GARZÓN

Chargée de Recherche CNRS, Universités de Montpellier 1 et 2 / Examinatrice

Alain DUFOUR

Professeur à l'Université de Bretagne Sud / Directeur de thèse

Alexis BAZIRE

Maitre de Conférences à l'Université de Bretagne Sud / Co-directeur de thèse

Christine PAILLARD

Directrice de Recherche CNRS IUEM, Université de Bretagne Occidentale /

Co-directrice de thèse

« L'Homme est capable de faire ce qu'il est incapable d'imaginer [...] »

René Char

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier la région Bretagne pour avoir financé ces travaux ainsi que le GIS Europôle Mer pour sa contribution à l'ouverture internationale de mon travail. Mes remerciements vont également aux personnes qui ont accepté de juger ces travaux : *Delphine Destoumieux-Garzón*, *Alain Rincé* et *Romain Briandet*. Merci pour le temps consacré à l'examen de ce manuscrit.

J'adresse toute ma reconnaissance à *Alain Dufour*, directeur du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Merci d'avoir également dirigé ces travaux et de m'avoir fait confiance pour la conduite de cette thèse. Mais surtout, merci pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses nombreux et précieux conseils qui m'auront permis, je l'espère, d'acquérir l'exigence et le sens critique dont il a toujours fait preuve à l'égard de mon travail.

J'exprime aussi toute ma gratitude à *Alexis Bazire* qui a co-dirigé ces travaux. Merci de m'avoir donné, il y a cinq ans, la chance de découvrir le monde de la Recherche. Merci pour tout ce que j'ai appris à ses côtés et d'avoir fait naître en moi cette vocation. Merci pour sa disponibilité au quotidien, son enthousiasme et pour tous les moments de partage.

Je remercie également *Christine Paillard* d'avoir co-encadré cette thèse et de m'avoir fait découvrir le monde des *Vibrio*. Merci pour sa gentillesse et de toujours avoir fait preuve d'enthousiasme à l'égard de mon travail.

Merci à vous pour la qualité de l'encadrement que j'ai pu recevoir tout au long de ces trois ans.

Je tiens à remercier tous les membres du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR) pour leur accueil lors de mes passages à Brest. Merci à *Adeline Bidault* et *Nelly Le Goïc* pour leur aide et leur disponibilité.

Pour sa contribution à ces travaux, je tiens à remercier chaleureusement *Annick Jacq* de l'institut de Génétique et Microbiologie (IGM) de l'Université de Paris Sud. Merci de m'avoir accueillie dans son équipe pendant ces quelques semaines, pour ses nombreux conseils et son aide apportée à la réalisation de la partie mutagénèse de cette thèse. Et par elle, je tiens à remercier tous les membres de l'IGM et plus particulièrement l'équipe de *Philippe Bouloc*, pour les échanges scientifiques plus qu'enrichissants.

Bien évidemment, je remercie tous les membres du LBCM pour leur gentillesse : *Alain*, *Karine*, *Isabelle*, *Florence*, *Fabienne*, *Chrystèle*, *Pierre*, *Gaël*, *Pierre-Emmanuel*, *Alexis*, *Charlotte*, *Dalyal*,

Claudia, Charline, Laure, Marion, Marjolaine et sans oublier les vannetais ! merci pour la bonne ambiance apportée pendant ces trois années.

Pour son aide plus que précieuse, j'adresse un remerciement spécial à *Gaël Le Pennec* sans qui, les observations en MET n'auraient pas été possibles. Merci, d'avoir consacré du temps (et des kilomètres) pour l'analyse de mes échantillons.

Je remercie aussi *Florence*, notre ange gardien de TP, pour son aide très précieuse lors de la préparation des séances de TP, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci aussi aux doctorants, *Kévin, Ludo* (et les autres) du LBCM Vannes pour les quelques moments passés ensemble.

Enfin, ceux sans qui cette thèse n'aurait pas été la même :

Les anciens doctorants devenus Docteurs : *Johan* qui m'a vue franchir les portes du labo d'abord comme stagiaire puis comme doctorante, merci pour ton soutien. *Caro*, merci pour ta gentillesse et tes conseils quand je suis arrivée en thèse. *Fabrice*, notre chimiste préféré ! Merci pour la sagesse que tu as apporté dans ce bureau de filles et enfin merci de vouloir faire tous ces kilomètres pour m'apporter ton soutien lors de cette soutenance.

Je remercie également *Laure* pour nos discussions du soir, nos fous rires et en qui j'ai aussi toujours su trouver une oreille attentive. *Dalyal*, notre stagiaire devenu ingénieur ! Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur (et tes crêpes !).

Je n'oublie pas *Florie*, ton passage au sein du LBCM fut (trop) court, mais merci pour cette belle rencontre professionnelle et personnelle. Je retiens ta gentillesse, ta bienveillance et ton goût de l'échange. Enfin quelqu'un avec qui parler *Vibrio* ! Merci !

Enfin, les doctorantes avec qui tout a commencé en même temps : *Marjo*, qui eut cru qu'un jour nous nous retrouverions ensemble, pour se lancer dans cette folle aventure ? C'est ensemble que nous avons commencé et c'est ensemble que nous avons su surmonter nos moments de doutes et d'angoisses pour en arriver là. Merci pour ces trois années passées à travailler à tes côtés ! *Marion*, sans toi cette période de rédaction n'aurait pas été supportable, ces trois ans non plus d'ailleurs... Merci pour tous les moments passés ensemble et nos échanges parfois un peu lunaires (toi seule sais !). Merci !

Dans un cadre plus privé je tiens à remercier tous mes proches. Ma mère, mon éternel soutien... merci pour tout ce que tu fais pour moi. Je remercie aussi toute ma famille, même (très) loin, elle a toujours su m'encourager et me soutenir dans cette aventure. Obrigada ! Mes ami(e)s *Fanny, Tiffanie, Pauline, Florent* et les autres, merci pour votre soutien et votre

compréhension durant ces derniers mois passés sans beaucoup se voir. J'adresse un merci tout particulier à *Tiffanie* pour les corrections et les relectures apportées à ce manuscrit.

Enfin, je voudrais remercier *Sylvain*. Merci de m'avoir accompagné tout au long de ces trois ans, d'avoir accepté les dimanches en compagnie de ma thèse et surtout de m'avoir supporté pendant la rédaction de ce manuscrit. À nous maintenant d'écrire un nouveau chapitre...

Merci !!!

SOMMAIRE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. AVANT-PROPOS.....	p1
2. ÉCOLOGIE DES <i>VIBRIO</i>.....	p3
2.1. Biologie du genre <i>Vibrio</i>.....	p3
2.1.1. Caractéristiques phénotypiques.....	p3
2.1.2. Caractéristiques génétiques.....	p3
2.1.3. Phylogénie du genre <i>Vibrio</i>	p4
2.2. Diversité et pathogénicité des <i>Vibrio</i>.....	p5
2.2.1. <i>Vibrio</i> pathogènes de l'Homme.....	p5
2.2.2. <i>Vibrio</i> pathogènes de poissons.....	p6
2.2.3. <i>Vibrio</i> pathogènes de crustacés.....	p6
2.2.4. <i>Vibrio</i> pathogènes de mollusques.....	p8
2.3. <i>Vibrio tapetis</i> et la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise <i>Ruditapes philippinarum</i>.....	p8
2.3.1. La palourde japonaise <i>R. philippinarum</i>	p8
2.3.2. Le syndrome « Anneau Brun ».....	p10
2.3.3. Prévalence de la MAB.....	p11
2.3.4. <i>V. tapetis</i> : agent étiologique de la MAB.....	p12
2.3.5. Pathogénicité de <i>V. tapetis</i>	p14
2.3.5.1. Capacité de colonisation.....	p16
2.3.5.2. Capacité d'invasion.....	p16
3. LES BIOFILMS BACTERIENS.....	p21
3.1. Définitions.....	p21
3.2. La formation de biofilm.....	p22
3.2.1. Conditionnement de surface et déplacement des bactéries.....	p23
3.2.2. Adhésion des bactéries au support.....	p24
3.2.3. Maturation du biofilm.....	p25
3.2.3.1. Les exopolysaccharides (EPS).....	p26
3.2.3.2. L'ADN extracellulaire.....	p27
3.2.3.3. Les autres constituants de la matrice extracellulaire.....	p28
3.2.4. Dispersion du biofilm.....	p29
3.3. Le biofilm chez les <i>Vibrio</i> : quelques précisions.....	p29
4. LE QUORUM SENSING.....	p32
4.1. Définitions.....	p32
4.2. Le système modèle LuxR/LuxI.....	p32
4.3. Les systèmes Las et Rhl chez <i>P. aeruginosa</i>.....	p34
4.4. Le Quorum Sensing chez les <i>Vibrio</i>.....	p35
4.5. Le rôle du Quorum-Sensing dans la formation de biofilm.....	p37
5. MOLÉCULES À ACTIVITE ANTI-BIOFILM.....	p39
5.1. Molécules anti-biofilm d'origine marine.....	p39
5.2. Activité anti-biofilm de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6.....	p41

OBJECTIFS DE TRAVAIL

6. OBJECTIFS DE TRAVAIL	p42
--------------------------------------	-----

MATÉRIELS ET MÉTHODES

7. CULTURE BACTERIENNE	p43
7.1. Conditions de culture	p43
7.2. Préparation du surnageant de culture de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6	p45
7.2.1. Recherche d'activité antibactérienne de SN _{3J6} contre <i>V. tapetis</i>	p45
7.3. Formation de biofilm	p45
7.3.1. Mise en place du système.....	p45
7.3.2. Adhésion des bactéries et formation de biofilm.....	p46
7.3.3. Effet de molécules anti-biofilm.....	p47
7.3.3.1. Conditionnement du support par SN _{3J6}	p47
7.3.3.2. Traitement d'un biofilm préformé.....	p47
8. MICROSCOPIE	p48
8.1. Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)	p48
8.2. Microscopie Électronique	p49
8.2.1. Microscopie Électronique à Balayage (MEB).....	p49
8.2.2. Microscopie Électronique à Transmission (MET).....	p49
9. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	p50
9.1. Extraction d'ADN	p50
9.2. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)	p51
9.3. Clonage	p53
9.4. Séquençage	p54
9.5. Transformation	p54
9.5.1. Chimique.....	p54
9.5.2. Électrique.....	p54
9.5.3. Conjugaison.....	p55
9.6. Technique de mutagenèse dirigée chez <i>V. tapetis</i>	p55
9.6.1. Mutagenèse dirigée par double recombinaison homologue.....	p55

CHAPITRE I – Caractérisation du biofilm de *V. tapetis*

10. INTRODUCTION	p58
10.1. Contexte de l'étude	p58
10.2. Expériences préliminaires	p58
11. FORMATION DE BIOFILMS CHEZ <i>V. TAPETIS</i>, AGENT RESPONSABLE DE LA MALADIE DE L'ANNEAU BRUN	p59
11.1. Résumé de l'article	p59
11.2. Article en révision pour « Applied and Environmental Microbiology »	p61
11.3. Résultats complémentaires	p86
11.3.1. Caractérisation des composants sphériques.....	p86
11.3.2. Effet des variations des conditions de culture.....	p83

11.3.2.1. Effet de la salinité.....	p88
11.3.2.2. Effet de l'augmentation de la température.....	p89
11.3.2.3. Effet de la présence de fer.....	p90
12. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	p92
CHAPITRE II – Etude de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez <i>V. tapetis</i>	
13. INTRODUCTION.....	p95
14. RECHERCHE DE GENES POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LA FORMATION DE BIOFILM.....	p96
14.1. Les gènes impliqués dans les fonctions d'adhésion.....	p97
14.2. Les gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides.....	p98
14.3. Les gènes impliqués dans la communication bactérienne (QS).....	p99
15. MUTAGÈNESE PAR DÉLÉTION DE GÈNES CIBLES.....	p100
15.1. Construction plasmidique.....	p100
15.2. Mutation du gène <i>cqsA</i>	p104
15.2.1. La mutagénèse.....	p104
15.3. Construction du plasmide pSW-S36 pour muter <i>luxS</i>	p107
16. ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ DES MUTANTS DE <i>V. TAPETIS</i>.....	p109
16.1. Développement de biofilm par <i>V. tapetis</i> VTS1 ($\Delta cqsA$).....	p109
16.1.1. Adhésion bactérienne du mutant VTS1.....	p109
16.1.2. Formation de biofilm par le mutant VTS1.....	p110
16.1.3. Recherche de phénotype pour le mutant VTS1 ($\Delta cqsA$).....	p112
16.2. Développement de biofilm par <i>V. tapetis</i> VT16 ($\Delta djIA$).....	p113
16.2.1. Adhésion bactérienne du mutant VT16.....	p113
16.2.2. Formation de biofilm par le mutant VT16.....	p114
17. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	p116
CHAPITRE III – Activité anti-biofilm et contrôle du biofilm de <i>V. tapetis</i>	
18. INTRODUCTION.....	p119
18.1. Contexte de l'étude.....	p119
18.2. Travaux antérieurs.....	p119
19. ACTIVITÉ ANTIBIOFILM DE LA BACTÉRIE MARINE <i>PSEUDOALTEROMONAS</i> SP. 3J6 VIS-À-VIS DE <i>V. TAPETIS</i>.....	p120
19.1. Résumé de l'article.....	p120
19.2. Article accepté dans « Probiotics and Antimicrobial Proteins ».....	p120
19.3. Résultats complémentaires.....	p137

19.3.1. Effet du conditionnement de surface par $SN_{3/6}$ sur la formation de biofilm de <i>V. tapetis</i> au-delà de 24h de culture.....	p137
19.3.2. Effet de la co-inoculation sur l'étape d'adhésion de <i>V. tapetis</i>	p137
20. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	p139
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	p141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	p145
ANNEXES	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 :	Phylogénie du genre <i>Vibrio</i>	p4
Figure 2 :	Photo d'une palourde japonaise <i>R. philippinarum</i> et représentation schématique d'une coupe transversale de palourde.....	p9
Figure 3 :	Répartition géographique mondiale de <i>Ruditapes philippinarum</i> et dates d'introduction en Europe et Amérique du Nord.....	p9
Figure 4 :	Palourde japonaise atteinte de la MAB.....	p10
Figure 5 :	Observations en microscopie électronique à balayage de <i>V. tapetis</i> au sein du dépôt brun.....	p11
Figure 6 :	Réparation coquillère chez <i>R. philippinarum</i> après l'apparition de la MAB.....	p11
Figure 7 :	Arbre phylogénétique de 30 espèces de <i>V. tapetis</i> et 12 autres espèces de <i>Vibrio</i> proches de <i>V. tapetis</i>	p13
Figure 8 :	Stratégies de colonisation de la palourde <i>R. philippinarum</i> par <i>V. tapetis</i>	p15
Figure 9 :	Photographie en microscopie électronique à balayage de <i>V. tapetis</i> adhérent à la lame périostracale.....	p16
Figure 10 :	Observation en microscopie photonique d'hémocytes de <i>R. philippinarum</i> incubés 3h à 18°C.....	p17
Figure 11 :	Schéma synthétique du processus de défense et de phagocytose de cellules hémocytaires de <i>R. philippinarum</i> au contact de <i>V. tapetis</i>	p18
Figure 12 :	Cycle infectieux de <i>V. tapetis</i> et mécanismes d'interaction hôte-pathogène.....	p20
Figure 13 :	Représentation schématique de la formation d'un biofilm bactérien.....	p22
Figure 14 :	Systèmes de quorum-sensing chez <i>V. fischeri</i>	p33
Figure 15 :	Exemples d'autoinducteurs bactériens de type acyl-homosérine lactone.....	p34
Figure 16 :	Systèmes de Quorum-Sensing chez <i>P. aeruginosa</i>	p34
Figure 17 :	Systèmes de Quorum Sensing CqsS/CqsA et LuxP/LuxPQ chez <i>V. cholerae</i>	p36
Figure 18 :	Structure de la molécule CAI-1 détectée chez <i>V. cholerae</i>	p36

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 19 :	Système de formation de biofilm en chambre à flux.....	p46
Figure 20 :	Principe du clonage par « Gibson Assembly ».....	p53

Figure 21 :	Schéma de la construction du vecteur suicide utilisé pour la mutagenèse dirigée.....	p56
Figure 22 :	Principe de la mutagenèse dirigée de gène <i>cqsA</i> chez <i>V. tapetis</i> par double recombinaison homologue.....	p57
CHAPITRE I – Caractérisation du biofilm de <i>V. tapetis</i>		
Figure 23 :	<u>FIG 1 article</u> , Three-dimensional (3D) views of <i>V. tapetis</i> CECT4600 and LP2 biofilms grown for 24 and 48 h.....	p69
Figure 24 :	<u>FIG 2 article</u> , Biovolume and thickness values of biofilms of the indicated <i>V. tapetis</i> strains.....	p70
Figure 25 :	<u>FIG 3 article</u> , Extracellular matrix compounds of 24 h <i>V. tapetis</i> CECT4600-GFP and LP2 biofilms stained by Calcofluor White (β 1-3 and β 1-4 polysaccharides) and DDAO (eDNA).....	p72
Figure 26 :	<u>FIG 4 article</u> , SEM images of 48 h biofilms formed by <i>V. tapetis</i> CECT4600 and LP2.....	p73
Figure 27 :	<u>FIG 5 article</u> , Spherical components observed at the biofilm surface by CLSM.....	p74
Figure 28 :	<u>FIG 6 article</u> , Spherical components observed by SEM (A,B) and TEM (C-F).....	p75
Figure 29 :	<u>FIG 7 article</u> , Biofilms of <i>V. tapetis</i> GDE, GTR I and IS1 strains grown for 24 and 48 h.....	p76
Figure 30 :	<u>FIG 8 article</u> , Effect of increasing salinity on <i>V. tapetis</i> CECT4600 biofilm development.....	p78
Figure 31 :	Observations au MCBL en fluorescence (1) et en contraste de phase (2) de cultures liquides de <i>V. tapetis</i> CECT4600-GFP cultivée en milieu Zobell à 18°C.....	p86
Figure 32 :	Observation en MEB d'un biofilm de 48h formé par <i>V. tapetis</i> LP2 en milieu Zobell à 18°C.....	p87
Figure 33 :	Cinétiques de croissance en milieu liquide de <i>V. tapetis</i> CECT4600 en fonction des variations de conditions de culture.....	p88
Figure 34 :	Observations en contraste de phase au MCBL de cultures liquides de <i>V. tapetis</i> CECT4600 à 24h et 48h de croissance en milieu Zobell 5% et à 18°C.....	p89
Figure 35 :	Représentations tridimensionnelles du biofilm de <i>V. tapetis</i> CECT4600 cultivé à 18°C ou 23°C en milieu Zobell pendant 24h.....	p90
Figure 36 :	Effet de la température de culture sur la biomasse du biofilm de <i>V. tapetis</i> CECT4600 à 24h et 48h de croissance.....	p90
Figure 37 :	Effet sur la biomasse du biofilm de <i>V. tapetis</i> CECT4600 à 24h et 48h de culture de la suppression de la source de fer dans le milieu Zobell.....	p91
Figure 38 :	Images de microscopie électronique de biofilms de <i>V. tapetis</i> CECT4600.....	p94

CHAPITRE II – Etude de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *V. tapetis*

Figure 39 :	Représentation schématique de l'organisation des clusters de gènes de biosynthèse du pilus de type IV chez <i>V. tapetis</i> CECT4600 (V.t) et <i>V. vulnificus</i> CMCP6 (V.v).....	p97
Figure 40 :	Représentation schématique de l'organisation du locus <i>syp</i> chez <i>V. tapetis</i> CECT4600 (V.t) et <i>V. fischeri</i> ES114(V.f).....	p99
Figure 41:	Cartographie du vecteur pSW7848 utilisé pour la mutagenèse dirigée chez <i>V. tapetis</i>	p100
Figure 42 :	Schéma récapitulatif de la stratégie I de construction du plasmide utilisé pour la mutagenèse dirigée.....	p101
Figure 43 :	Cartographie du plasmide pSW7848- <i>sypA</i> -Gm.....	p102
Figure 44 :	Vérification par linéarisation à l'aide de l'enzyme <i>SpeI</i> de l'insertion de la construction « gène <i>sypA</i> tronqué + cassette Gm » dans le vecteur pSW7848.....	p103
Figure 45 :	Cartographie du plasmide pSW-S34.....	p105
Figure 46 :	Vérification de l'insertion dans pSW7848 des fragments « UP » et « DOWN » du gène <i>cqsA</i>	p105
Figure 47 :	Vérification par PCR du mutant <i>V. tapetis</i> VTS1 ($\Delta cqsA$).....	p107
Figure 48 :	Cartographie du plasmide pSW-S36.....	p107
Figure 49 :	Vérification de l'insertion dans pSW7848 des fragments « UP » et « DOWN » du gène <i>luxS</i>	p108
Figure 50 :	Adhésions bactériennes relatives de <i>V. tapetis</i> CECT4600 et VTS1.....	p109
Figure 51 :	Représentation tridimensionnelle du biofilm formé par le mutant <i>V. tapetis</i> VTS1 ($\Delta cqsA$) et la souche sauvage CECT4600.....	p110
Figure 52 :	Biovolumes (A) et épaisseurs maximales (B) des biofilms des souches CECT4600 et VTS1 à 24 et 48h de croissance.....	p111
Figure 53 :	Recherche de lécithinase chez <i>V. tapetis</i> CECT4600 et VTS1 ($\Delta cqsA$) sur gélose à l'œuf....	p112
Figure 54 :	Observations de l'adhésion de <i>V. tapetis</i> CECT4600 et VT16.....	p113
Figure 55 :	Adhésions bactériennes relatives de <i>V. tapetis</i> CECT4600 et VT16.....	p114
Figure 56 :	Formation de biofilm chez le mutant VT16 ($\Delta djIA$).....	p115
Figure 57 :	Biovolumes des biofilms de la souche mutante de <i>V. tapetis</i> VT16 et de la souche sauvage CECT4600.....	p115

CHAPITRE III – Activité anti-biofilm et contrôle du biofilm de *V. tapetis*

Figure 58 :	<u>Fig. 1 article</u> , <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6 outcompetes <i>V. tapetis</i> CECT4600-GFP in two-species biofilms and liquid co-cultures.....	p129
Figure 59 :	<u>Fig. 2 article</u> , Coating the glass substratum with SN _{3J6} impairs <i>V. tapetis</i> CECT4600-GFP attachment and biofilm formation.....	p131
Figure 60 :	<u>Fig. 3 article</u> , Effect of coating the glass substratum with SN _{3J6} on biofilm formation (24 h biofilms) [A] and of treating preformed 48 h biofilms with SN _{3J6} [B].....	p132
Figure 61 :	Biofilms formés par <i>V. tapetis</i> CECT4600-GFP après conditionnement du support par SN _{3J6}	p137
Figure 62 :	Observations au MCBL de l'adhésion de <i>V. tapetis</i> CECT4600-GFP en co-inoculation avec <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6 ou seul.....	p138

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 :	Espèces pathogènes d'organismes marins appartenant au genre <i>Vibrio</i>	p7
Tableau 2 :	Souches de <i>V. tapetis</i> isolées entre 1988 et 2003.....	p14

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau 3 :	Souches bactériennes utilisées lors de cette étude.....	p44
Tableau 4 :	Plasmides utilisés lors de cette étude.....	p51
Tableau 5 :	Amorces oligonucléotidiques utilisées lors de cette étude.....	p52

CHAPITRE I – Caractérisation du biofilm de *V. tapetis*

Tableau 6 :	<u>TABLE 1 article</u> , <i>V. tapetis</i> strains used in this study.....	p65
--------------------	--	-----

CHAPITRE II – Etude de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *V. tapetis*

Tableau 7 :	Gènes identifiés chez <i>V. tapetis</i> CECT4600 pouvant être impliqués dans des fonctions liées à la formation de biofilm.....	p96
--------------------	---	-----

CHAPITRE III – Activité anti-biofilm et contrôle du biofilm de *V. tapetis*

Tableau 8 :	Proportions des deux bactéries <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6 et <i>V. tapetis</i> CECT4600-GFP dans l'inoculum destiné à la culture de biofilms mixtes.....	p138
--------------------	--	------

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADN_e :	ADN extracellulaire
AHL :	Acyl-Homosérine Lactone
BET :	Bromure d'Ethidium
Cm :	Chloramphénicol
Cqs :	Cholerae Quorum Sensing
DAP :	Diaminopimélate
DDAO :	7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)
DO :	Densité Optique
EDMA :	Eau De Mer Artificielle
EDTA :	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EPS :	Exopolysaccharides
Ery :	Erythromycine
FC :	Flow Cell (Chambre à flux)
GFP :	Green Fluorescent Protein
HSL :	Homosérine Lactone
IGM :	Institut de Génétique et Microbiologie
IP :	Iodure de Propidium
Km :	Kanamycine
LB :	Luria Bertani
LBS :	Luria Bertani Salin
LEMAR :	Laboratoire des sciences de l'Environnement Marin
LPS :	Lipopolysaccharide
MAB :	Maladie de l'Anneau Brun
MCBL :	Microscop(i)e Confocal à Balayage Laser
MEB :	Microcop(i)e Electronique à Balayage
MET :	Microscop(i)e Electronique à Transmission
PCR :	Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerization Chain Reaction)
PF :	Phosphate Ferrique

QS :	Quorum Sensing
SN_{3J6} :	Surnageant de culture de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6
Syp :	Symbiosis Polysaccharide
TAE :	Tris Acétate EDTA
TE :	Tampon d'Elution
Tet :	Tétracycline
Thy :	Thymidine
VNC :	Viable Non Cultivable
VNSS :	Vaatanen Nine-Salt Solution
Vps :	Vibrio polysaccharide synthesis

English abbreviations

ASW:	Artificial Sea Water
BRD:	Brown Ring Disease
CLSM:	Confocal Laser Scanning Microscope (Microscopy)
PI:	Propidium Iodide
SEM:	Scanning Electron Microscope (Microscopy)
TEM:	Transmission Electron Microscopy
VBNC:	Viable But Non Culturable

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. AVANT-PROPOS

L'émergence des maladies bactériennes affectant des espèces écologiquement ou économiquement importantes est devenue aujourd'hui un réel problème, notamment dans le domaine aquacole. Ces maladies, qui touchent notamment la culture de mollusques, sont souvent associées à des forts épisodes de mortalité, causant d'importantes pertes économiques. Parmi les pathogènes infectant les populations naturelles et cultivées de mollusques marins, les bactéries appartenant au genre *Vibrio* sont les plus souvent associées à ces maladies (Friedman *et al.*, 1991 ; Paillard et Maes, 1990; Paillard *et al.*, 1994; Borrego *et al.*, 1996a). Jusque dans les années 90, la plupart des maladies décrites chez les bivalves étaient attribuées à des protozoaires tels que *Bonamia*, *Marteilia* et *Perkinsus* ou à des virus (Azevedo, 1989; Sinderman, 1990). La notion de maladies bactériennes affectant durablement les bivalves adultes est plus récente et actuellement uniquement trois pathologies de ce genre ont été décrites : la nocardiose chez l'huître du pacifique *Crassostrea gigas* (Friedman *et al.*, 1991), la maladie des juvéniles d'huîtres *Crassostrea virginica*, « Juvenile Oyster Disease (JOD) » (Ford et Borrero, 2001 ; Boettcher *et al.*, 2005) et la Maladie de l'Anneau Brun chez les palourdes *Ruditapes philippinarum* et *R. decussatus* (Paillard *et al.*, 1989 ; Paillard et Maes, 1990 ; Paillard, 2004a). D'autres maladies et mortalités de bivalves sont suspectées d'être provoquées par des infections bactériennes, comme le phénomène de mortalités estivales chez l'huître *C. gigas*, qui a été associé à des bactéries du genre *Vibrio* appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus* (Lacoste *et al.*, 2001 ; Le Roux *et al.*, 2002 ; Labreuche *et al.*, 2010).

Chez de nombreuses espèces bactériennes, la pathogénicité est étroitement liée à un comportement microbien particulier : la formation de biofilm (Parsek et Singh, 2003), notion décrite notamment dans plusieurs infections chroniques chez l'Homme (Costerton *et al.*, 1999). Parmi les pathogènes appartenant au genre *Vibrio*, la bactérie *V. cholerae* fait figure de modèle pour la description de la formation de biofilm et du lien avec sa pathogénicité (Watnick et Kolter, 1999 ; Matz *et al.*, 2005 ; Faruque *et al.*, 2006 ; Tamayo *et al.*, 2010). Bien que la formation de biofilm ait également été explorée chez d'autres *Vibrio* tels que *V. parahaemolyticus* (Enos-Berlage *et al.*, 2005) ou encore *V. vulnificus* (Joseph et Wright, 2004), peu de recherches ont été entreprises concernant la formation de biofilm chez des *Vibrio* pathogènes de bivalves. L'émergence des bactéries appartenant au genre *Vibrio* considérées

comme agents étiologiques de maladies chez les bivalves a conduit les scientifiques à se tourner vers l'étude et la compréhension de la nature des interactions entre les *Vibrio* et les hôtes qu'ils colonisent. C'est dans ce contexte que s'inscrivent ces travaux, visant à établir les premières données sur la formation de biofilm par *V. tapetis*, l'agent pathogène de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) chez la palourde japonaise.

Cette introduction bibliographique s'articule en quatre parties, la première sera consacrée à l'étude bibliographique des *Vibrio* et plus particulièrement de *V. tapetis*. Puis une deuxième partie sera dédiée à la bibliographie des biofilms bactériens et des mécanismes mis en jeu lors de leur formation. Dans la troisième section, les systèmes de communication de type quorum sensing (QS) et leurs rôles dans le développement des biofilms seront détaillés. Enfin, un dernier volet sera consacré à l'étude des molécules anti-biofilm d'origine marine et leurs applications dans la lutte contre les biofilms indésirables.

2. ÉCOLOGIE DES *VIBRIO*

Décrit pour la première fois en 1854 par l'anatomiste italien Fillippo Pacini, l'agent pathogène responsable du choléra *V. cholerae* est la première bactérie du genre *Vibrio* à avoir été isolée. Le genre *Vibrio* compte 118 espèces décrites (<http://www.bacterio.net/vibrio.html>, janvier 2015) et *V. cholerae* reste son représentant le plus étudié.

La prédominance du genre *Vibrio* dans les cultures bactériennes issues d'échantillons d'eau de mer ou dans les isolats des microflores associées à des poissons ou des coquillages ainsi que l'augmentation des cas de vibrioses entraînant de lourdes pertes économiques pour l'aquaculture font de ce genre bactérien l'objet de toutes les attentions des microbiologistes du milieu marin, ainsi que du monde aquacole.

2.1. Biologie du genre *Vibrio*

2.1.1. Caractéristiques phénotypiques

Les bactéries du genre *Vibrio* sont ubiquitaires dans les écosystèmes aquatiques marins. Elles appartiennent à la classe des γ -*proteobacteria* et à la famille des *Vibrionaceae*. Il s'agit de bâtonnets à Gram négatif fréquemment incurvés, non-sporulés, de 0,5 à 1 μm de diamètre sur 1 à 3,5 μm de longueur. Les bactéries appartenant au genre *Vibrio* sont généralement mobiles en milieu liquide grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Elles sont anaérobies facultatives. Les bactéries du genre *Vibrio* sont cultivables sur gélose non sélective de la flore hétérotrophe marine et sur milieu sélectif Thiosulfate Citrate Bile Saccharose (TCBS) (Holt et Krieg, 1994). La majorité d'entre elles exige la présence de NaCl dans le milieu et présente une température optimale de croissance comprise entre 10 et 40°C.

2.1.2. Caractéristiques génétiques

D'un point de vue génétique, tous les *Vibrio* actuellement décrits, tels que *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. splendidus* ou encore *V. fischeri*, ont la particularité de posséder deux chromosomes circulaires (Trucksis *et al.*, 1998 ; Yamaichi *et al.*, 1999 ; Thompson *et al.*, 2004 ; Okada *et al.*, 2005). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer cette particularité. Il pourrait s'agir d'une acquisition ancestrale d'un mégaplasmide par transfert horizontal (Heidelberg *et al.*, 2000) ou d'une excision ancestrale du génome (Waldor et RayChaudhuri, 2000). La majorité des gènes essentiels à la croissance et à la

virulence sont localisés sur le grand chromosome (ou chromosome I), tandis que le plus petit chromosome (ou chromosome II) porterait des gènes impliqués dans l'adaptation bactérienne aux changements environnementaux et semblerait contenir une proportion importante de gènes spécifiques à chaque espèce de *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2004).

2.1.3. Phylogénie du genre *Vibrio*

La classification des *Vibrio* s'est d'abord faite en se fondant sur les techniques classiques d'identification phénotypiques (tests enzymatiques : arginine dihydrolase, lysine et ornithine décarboxylase, gélatinase, chitinase, oxydase ; utilisation de différentes sources de carbone, susceptibilité à l'agent vibriostatique 0/139, présence de flagelle(s), production d'indole, température optimale de croissance, tolérance à la salinité, pourcentage en GC du génome) (Alsina et Blanch, 1994 ; Thompson *et al.*, 2004). Mais face à la grande variabilité phénotypique des espèces de la famille des *Vibrionaceae*, des méthodes de classifications et d'identifications génomiques se sont avérées nécessaires (Figure 1).

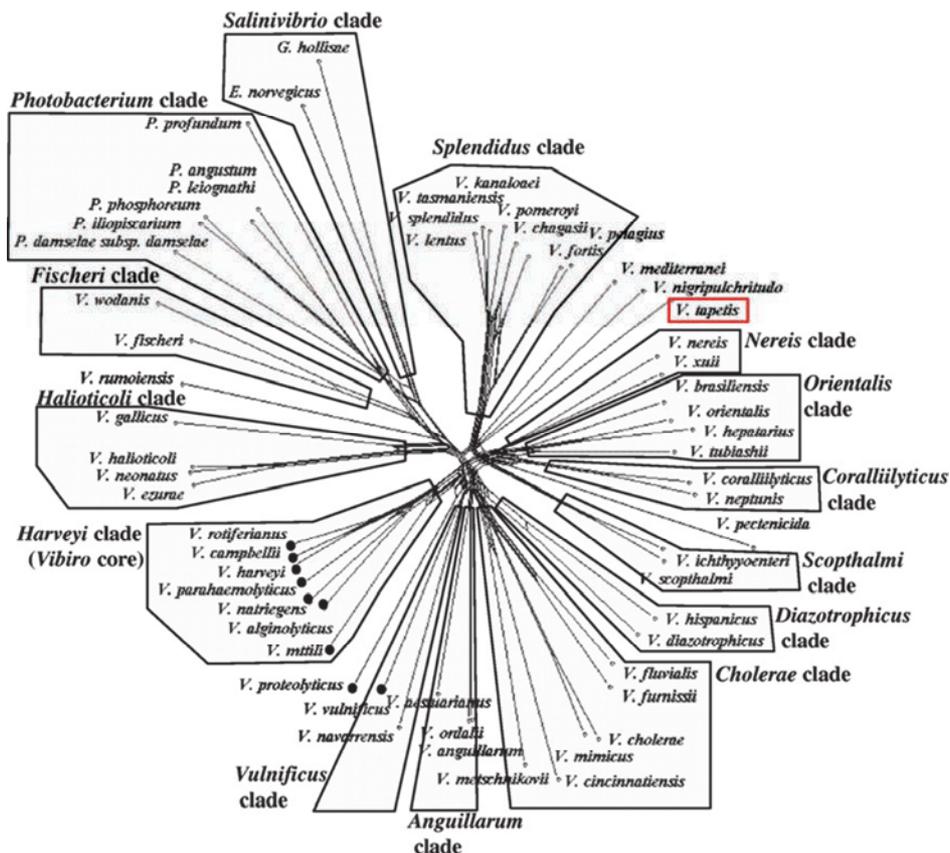


Figure 1: Phylogénie du genre *Vibrio*. Analyse fondée sur une analyse MLST (MultiLocus Sequence Typing) de 8 gènes (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *topA* et ARNr 16S) de 58 souches de bactéries du genre *Vibrio* (d'après Sawabe *et al.*, 2007).

Une comparaison entre d'une part, une identification moléculaire incluant AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), hybridation ADN/ADN, et séquençage de l'ARNr 16S, et d'autre part une identification phénotypique, a permis une reclassification de certains *Vibrio*. Cela a été notamment le cas pour des souches mal identifiées comme *V. harveyi* par exemple. Il s'avère en effet que *V. harveyi*, *V. campbelli* et *V. rotiferianus* ont des phénotypes non distinguables les uns des autres par les méthodes classiques d'identification (Thompson *et al.*, 2004). Ainsi une approche plus complexe comme la MLST (Multilocus Sequence Typing) basée sur le séquençage de 7 gènes (*topA*, *pyrH*, *ftsZ*, *mreB*, *gyrB*, *recA*, *gapA*) a permis une classification plus précise de *V. harveyi* (Thompson *et al.*, 2007).

2.2. Diversité et pathogénicité des *Vibrio*

Les *Vibrio* sont très abondants dans les environnements aquatiques tels que les estuaires, les eaux marines côtières, les sédiments ou encore les infrastructures aquacoles. Ils sont également présents en forte densité associés à des organismes marins tels que le corail, les poissons, les mollusques, les éponges, les crevettes ou encore le zooplancton (Thompson *et al.*, 2004). Ils peuvent former avec leurs hôtes des relations symbiotiques, pathogènes ou non. *V. fischeri* forme par exemple une symbiose avec le calmar *Euprymna scolopes*. Cette bactérie colonise l'organe luminescent du calmar et joue un rôle dans l'attraction des proies et l'évitement des prédateurs via l'émission de lumière (Ruby, 1996 ; Nyholm *et al.*, 2000), l'étude de ce phénomène est notamment à l'origine de la découverte du système de communication bactérienne de type Quorum Sensing (Fuqua *et al.*, 1994). Cependant, les *Vibrio* représentent aussi une part importante des bactéries responsables de pathologies affectant les animaux d'élevage aquacole, touchant tous les types de filières de production de poissons, crustacés ou mollusques ; ils sont également à l'origine de nombreuses infections chez l'Homme. Parmi les espèces pathogènes du genre *Vibrio*, la plus documentée est *V. cholerae*, l'agent étiologique du choléra.

2.2.1. *Vibrio* pathogènes de l'Homme

V. cholerae est responsable du choléra, maladie infectieuse épidémique caractérisée par des diarrhées brutales et abondantes. Cette maladie touche essentiellement des pays en voie de développement et est causée principalement par des problèmes sanitaires et d'approvisionnement en eau. Les souches de *V. cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 et O139 sont les souches les plus virulentes. Le séro groupe O1 est subdivisé en deux groupes : le

biotype classique et le biotype El Tor, qui est le plus répandu sur toute la planète, il est à la base des dernières pandémies de choléra. En 2012, 245 393 cas, dont 3034 cas mortels, ont été déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé (données 2012 de l'OMS <http://www.who.int/wer/2013/wer8831/fr/>). D'autres bactéries appartenant au genre *Vibrio*, tels que *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* ou encore *V. alginolyticus* ont également été associées à de graves infections chez l'Homme. *V. vulnificus* est notamment responsable d'infections sévères de plaies, alors que *V. parahaemolyticus* provoque des gastroentérites liées à la consommation de coquillages (notamment d'huîtres), de crustacés ou de poissons crus (Austin, 2010).

2.2.2. *Vibrio* pathogènes de poissons

Plusieurs espèces de *Vibrio* sont aujourd'hui potentiellement impliquées dans des épisodes de mortalité chez les poissons (Tableau 1). *V. anguillarum* et *V. salmonicida* sont les plus importants pathogènes de poissons. D'abord décrit comme responsable de la peste rouge des anguilles en 1909 en mer Baltique, *V. anguillarum* a depuis été associé à de nombreuses autres espèces de poissons, en particulier à des salmonidés (Trust *et al.*, 1986). *V. salmonicida* est l'agent étiologique de la maladie d'Hitra ou vibriose des eaux froides (Egidius *et al.*, 1986), responsable de fortes mortalités dans les élevages intensifs de saumons. Ces deux espèces de *Vibrio* provoquent chez leurs hôtes des septicémies hémorragiques. *V. carchariae* a été isolé lors d'épisodes de mortalité de requins en captivité (Grimes *et al.*, 1984), cette espèce a été plus tard identifiée comme identique à l'espèce *V. harveyi* (Thompson *et al.*, 2002). *V. splendidus* a été plus souvent associé à des pathologies de l'huître, mais aussi à des mortalités en élevage larvaire de turbots (Gatesoupe *et al.*, 1999). Enfin, plus récemment, *V. tapetis* a été isolé chez trois espèces de poissons, le crénilabre mélops *Shymphodus melops*, le flétan *Hippoglossus hippoglossus* et la sole (Lopez *et al.*, 2011) au cours de forts épisodes de mortalité (Jensen *et al.*, 2003 ; Reid *et al.*, 2003a).

2.2.3. *Vibrio* pathogènes de crustacés

La plupart des bactéries pathogènes identifiées comme responsables de maladies infectieuses chez la crevette appartiennent au genre *Vibrio* (Tableau 1). Même si quelques pathologies ont été décrites chez le homard, *Homarus americanus* par exemple (Tall *et al.*, 2003), la pénéculture reste la filière la plus touchée. *V. harveyi* et *V. penaeicida* représentent les agents étiologiques responsables des plus lourdes pertes économiques. *V. harveyi* est

impliqué dans des mortalités de larves et de juvéniles de crevettes (Prayitno et Latchford, 1995). En dépit de son rôle important dans des vibrioses, les mécanismes de pathogénicité de *V. harveyi* n'ont pas encore été élucidés (Austin et Zhang, 2006). *V. penaeicida* infecte la crevette *Peneaus japonicus* et est responsable de la maladie saisonnière « Syndrome 93 » décrite pour la première fois à l'hiver 1993 en Nouvelle Calédonie (Costa *et al.*, 1998). Puis en 1998, une nouvelle pathologie appelée « Syndrome d'été » touchant également les élevages de crevettes calédonniennes a été attribuée à des souches hautement virulentes de *V. nigripulchritudo* (Goarant *et al.*, 2006 ; Le Roux *et al.*, 2011).

Tableau 1 : Espèces pathogènes d'organismes marins appartenant au genre *Vibrio*

Espèce	Hôte	Pathologies / Symptômes	Référence
<i>V. anguillarum</i>	Bivalves	Mortalités de larves et adultes d'huître (<i>C. virginica</i> ; <i>C. gigas</i>)	Grischowski et Liston, 1974 ; Tubiash, 1975
	Poissons	Zones hémorragiques, lésions de la peau	Tubiash, 1973 ; Trust <i>et al.</i> , 1986
<i>V. carchariae</i> (= <i>V. harveyi</i>)	Poissons	Mortalités de requin en captivité	Grimes <i>et al.</i> , 1984
	Gastéropodes	Mortalités importantes de l'ormeau <i>Haliotis tuberculata</i>	Nicolas <i>et al.</i> , 2002
<i>V. harveyi</i>	Crustacés	Mortalités larves et juvéniles de crevettes	Prayitno et Latchford, 1995
<i>V. nigripulchritudo</i>	Crustacés	Mortalités de la crevette <i>Litopenaeus stylirostris</i>	Goarant <i>et al.</i> , 2006
<i>V. salmonicida</i>	Poissons	Vibrioses d'eau froides du saumon <i>Salmo salmar</i>	Egidius <i>et al.</i> , 1986
<i>V. splendidus</i>	Bivalves	Mortalités estivales de l'huître <i>C. gigas</i>	Lacoste <i>et al.</i> , 2001
	Poissons	Mortalité larvaire du turbot	Gatesoupe <i>et al.</i> , 1999
<i>V. penaeicida</i>	Crustacés	Pathologie de la crevette <i>Peaneus stylirostris</i>	Costa <i>et al.</i> , 1998
<i>V. pectinicida</i>	Bivalves	Mortalité de larves de Coquille St-Jacques <i>P. maximus</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1999
<i>V. tapetis</i>	Bivalves	Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise <i>R. philippinarum</i>	Nicolas <i>et al.</i> , 1992 Paillard et Maes, 1989 ; Paillard et Maes, 1990
	Poissons	Mortalité de poissons d'élevage <i>S. melops</i> et <i>H. hippoglossus</i>	Jensen <i>et al.</i> , 2003 ; Reid <i>et al.</i> , 2003a
<i>V. tubiashii</i>	Bivalves	Mortalités de larves d'huîtres <i>C. virginica</i>	Tubiash <i>et al.</i> , 1965

2.2.4. *Vibrio* pathogènes de mollusques

Les *Vibrio* jouent un rôle important dans les pathologies affectant les animaux d'aquaculture et les mollusques bivalves sont particulièrement atteints par ces vibrioses (Tableau 1). Elles touchent principalement les larves et juvéniles de bivalves. Parmi les mieux décrits, *V. tubiashii* et *V. anguillarum*, qui infectent les larves d'huître de *C. virginica*, *V. splendidus* chez l'huître *C. gigas* ou encore *V. pectinocida*, qui affecte les larves de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Lambert *et al.*, 1999). De nombreux autres pathogènes appartenant au genre *Vibrio* affectant des larves et juvéniles de bivalves ont été décrits sans être identifiés au-delà du genre (Paillard *et al.*, 2004a)

Le nombre de vibrioses décrites touchant des bivalves adultes est plus limité. Parmi elles, la mortalité estivale de l'huître du pacifique *C. gigas* qui est provoquée par *V. splendidus* et *V. aesturianus* et est influencée par l'augmentation des températures (Friedman *et al.*, 1991 ; Lacoste *et al.*, 2001 ; Garnier *et al.*, 2007). La Maladie de l'Anneau Brun (MAB) observée chez la palourde japonaise *R. philippinarum* est causée par *V. tapetis*, elle est quant à elle considérée comme une maladie d'eau froide (Paillard *et al.*, 1989 ; Paillard et Maes, 1990).

2.3. *Vibrio tapetis* et la Maladie de l'Anneau Brun chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*

Préalablement à toute description de la MAB et du symptôme associé chez la palourde japonaise, il est important de définir quelques caractéristiques de l'hôte en question : *R. philippinarum*.

2.3.1. La palourde japonaise *R. philippinarum*

La palourde japonaise *R. philippinarum* est un mollusque bivalve de la famille des *Veneridae* (World Register of Marine Species, WoRMS) vivant enfouit à quelques centimètres dans les sédiments vaseux ou sablo-vaseux (Figure 2). C'est un animal filtreur, constitué d'un corps mou et d'une coquille composée de deux valves articulées et liées dorsalement par un ligament élastique au niveau de la charnière. Le corps mou se constitue d'un pied musculueux, d'une masse viscérale, d'une paire de branchies et du manteau. Les lobes du manteau, accolés aux faces internes de la coquille délimitent la cavité palléale de l'animal. L'espace délimité par le manteau et la coquille correspond au compartiment extrapalléal. La lame périostracale, ou périostracum, est sécrétée par le manteau et s'attache au bord de la coquille. Elle permet la

biominéralisation de la coquille et correspond à la zone de croissance en longueur de celle-ci (Figure 2).

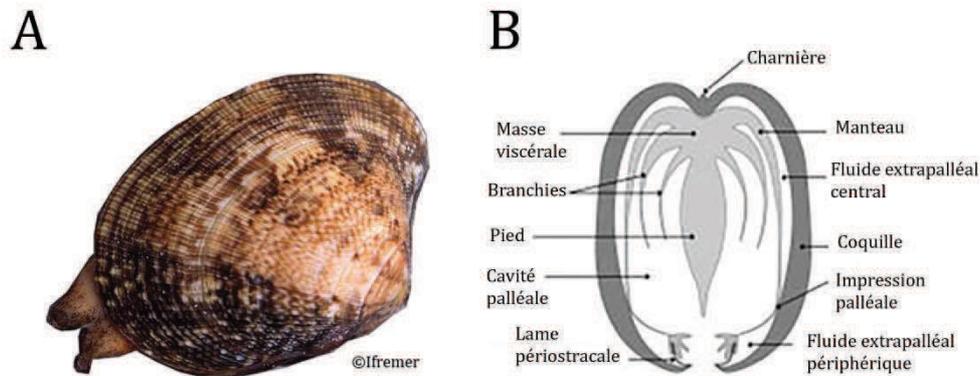


Figure 2: Photo d'une palourde japonaise *R. philippinarum*(A) ; Représentation schématique d'une coupe transversale de palourde (B) (Paillard, 2004b).

La palourde japonaise a été accidentellement importée avec un naissain d'huîtres creuses, *C. gigas*, et introduite sur la côte occidentale des Etats-Unis en 1936. Puis, dans le but de diversifier l'aquaculture Européenne, *R. philippinarum* a été introduite pour la première fois en France en 1972, en Grande Bretagne en 1980, en Espagne et en Italie en 1985, en Norvège en 1987 et en Irlande en 1997 (Figure 3). En 2012, l'aquaculture de *R. philippinarum* représentait 5,7% de la production mondiale et plus de 80% de la production Européenne (données sur l'année 2012 de la FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations).

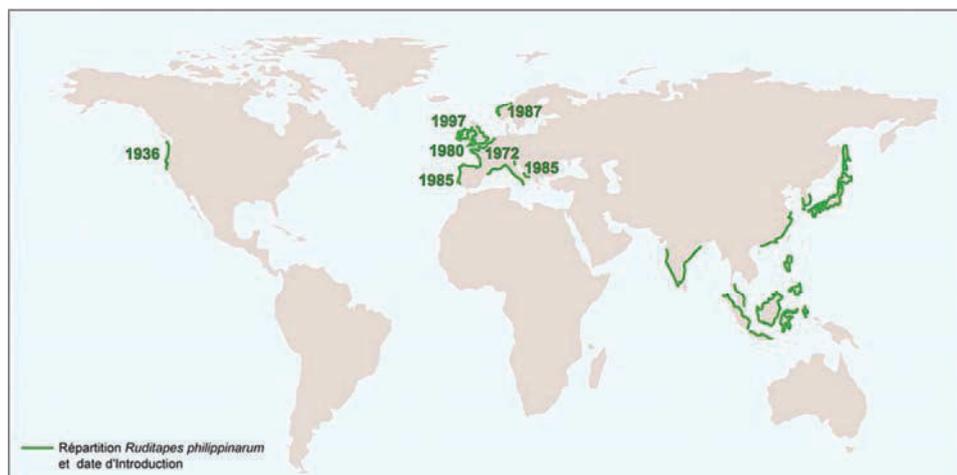


Figure 3 : Répartition géographique mondiale de *Ruditapes philippinarum* et dates d'introduction en Europe et Amérique du Nord (d'après Paillard, 2004b).

2.3.2. Le syndrome « Anneau Brun »

La MAB est apparue en 1987, dans des élevages de palourdes japonaises *R. philippinarum* à Landéda (Finistère, France). Elle est un des exemples de maladie bactérienne dont l'étiologie a été vérifiée en suivant les postulats de Koch (Paillard, 1992). La majorité des palourdes moribondes présentait un dépôt brun sur le bord interne de leur coquille (Figure 4B). Cette vibriose affectant l'élaboration de la coquille chez la palourde se traduit par la présence d'un dépôt brun sur les bords internes de la coquille (Figure 4B), associée à une altération de la calcification de la coquille (Paillard *et al.*, 1989). *V. tapetis* entre dans la cavité palléale de la palourde, adhère à la lame périostracale par l'intermédiaire de ses pili, puis induit des altérations au sein cette couche organique. Le périostracum dégradé se pigmente alors d'une couleur brune due à l'accumulation de conchyoline sur la face interne des valves au niveau de la zone infectée par la bactérie. Cette matrice organique ainsi que du périostracum dégradé constituent le dépôt brun, qui est souvent localisé entre la ligne palléale et le bord de la coquille. Il forme ainsi un anneau brun d'où le nom donné à la maladie (Paillard *et al.*, 1989). Dans les stades les plus précoces de la MAB, le dépôt brun se traduit par l'apparition de petites taches brunes sur la face interne des valves et peut nécessiter l'utilisation d'une loupe binoculaire pour être détecté (Figure 4A).



Figure 4: Palourde japonaise atteinte de la MAB. A : stade précoce de la maladie. B : stade avancé de la maladie. C : Déformation de la coquille, le dépôt brun est visible sur la face externe des valves (Photos : C. Paillard).

Lorsque le dépôt brun devient plus épais, le bourrelet externe du manteau peut présenter des boursouffures, signe externe de lésions. Le dépôt brun apparaît alors sous forme d'une structure feuilletée constituée de nombreuses lamelles organiques empilées et des proliférations bactériennes y ont également été observées (Figure 5) (Paillard et Maes, 1995a, b).

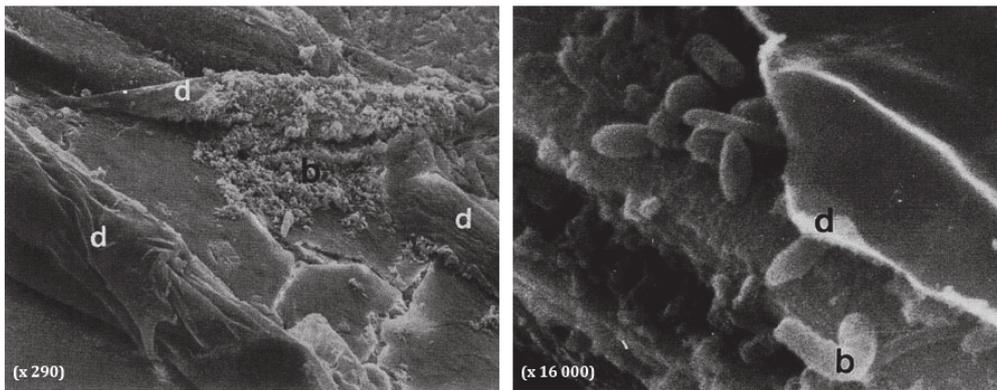


Figure 5 : Observations en microscopie électronique à balayage de *V. tapetis* au sein du dépôt brun. d : dépôt brun ; b : bactéries (Paillard et Maes, 1995b).

Lors d'infections plus sévères, des ralentissements de la croissance peuvent être engendrés et lorsque ces ralentissements n'affectent que la zone du dépôt, ce dernier entraîne des déformations de la coquille, visibles sur la figure 4C, se traduisant par des ondulations du bord externe des valves (Paillard, 1992). Cependant, certaines palourdes sont capables de se défendre face à la MAB, notamment par la mise en place de processus de défense telle que la guérison coquillière. Le mécanisme de réparation coquillière permet de recouvrir le dépôt brun et les bactéries par une couche coquillière afin d'isoler les bactéries du manteau, des fluides extrapalléaux et des autres organes (Figure 6B). La palourde est considérée comme guérie quand une couche cristalline recouvre entièrement le dépôt brun (Figure 6C) (Trinkler, 2009).



Figure 6 : Réparation coquillière chez *R. philippinarum* après l'apparition de la MAB. (A) : anneau brun sans réparation ; (B) : réparation coquillière partielle ; (C) : réparation totale (D'après Trinkler, 2009).

2.3.3. Prévalence de la MAB

Les populations de palourde japonaise *R. philippinarum* présentent en milieu naturel des prévalences de la MAB plus élevées en hiver (environ 20%), qui peuvent atteindre jusqu'à

75% en période de forte mortalité (Paillard, 2004b). Cependant, la prévalence de la maladie peut être modulée par des facteurs environnementaux, tels que la température ou encore la salinité. Reid *et al.* (2003) ont montré notamment que de fortes prévalences de la MAB (45%) avaient été retrouvées en conditions de faible salinité (milieu contenant seulement 2% de NaCl). Une autre étude a également mis en évidence le rôle de la température sur l'expression de la MAB. En effet, de fortes prévalences de la maladie ont été obtenues en conditions de faible température (<14°C) et *a contrario* la prévalence de la MAB était réduite avec une hausse de la température (>21°C) (Paillard *et al.*, 2004b).

2.3.4. *V. tapetis* : agent étiologique de la MAB

V. tapetis est un bacille incurvé à Gram négatif de 1 à 1,5 µm de long et de 0,5 µm de large, anaérobie facultatif et mobile grâce à un flagelle polaire (Borrego *et al.*, 1996a). *V. tapetis* a été isolée en 1990 de palourdes atteintes de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) (Paillard et Maes, 1990). D'abord appelé VP1 en 1990 par Paillard et Maes, l'agent pathogène a ensuite été renommé *Vibrio tapetis*, après avoir été entièrement décrit par Borrego *et al.* (1996a).

V. tapetis possède les particularités de ne pas utiliser le mannitol et de ne pas se développer à des températures supérieures à 25°C. Des tests rapides d'identification ont ainsi été mis au point en se fondant sur la non utilisation du mannitol et du sucrose et sur l'absence de croissance au-delà de 30°C, suivis d'un test d'agglutination avec un anticorps anti-*V. tapetis* (Paillard *et al.*, 1994).

La composition du génome de *V. tapetis* en bases nucléotidiques GC, comprise entre 42,9 et 45,5%, associée au profil phénotypique confirme son appartenance au genre *Vibrio* (Figure 7). A partir de l'analyse phylogénétique de plusieurs souches de *V. tapetis*, il apparaît que cette espèce est proche de *V. pectenocida* et *V. splendidus*, deux espèces également pathogènes de bivalves. Les souches de *V. tapetis* possèdent toutes deux chromosomes ainsi que plusieurs plasmides ; la souche de référence CECT4600 contient deux plasmides de 80 et 100 kb (Le Chevalier *et al.*, 2003).

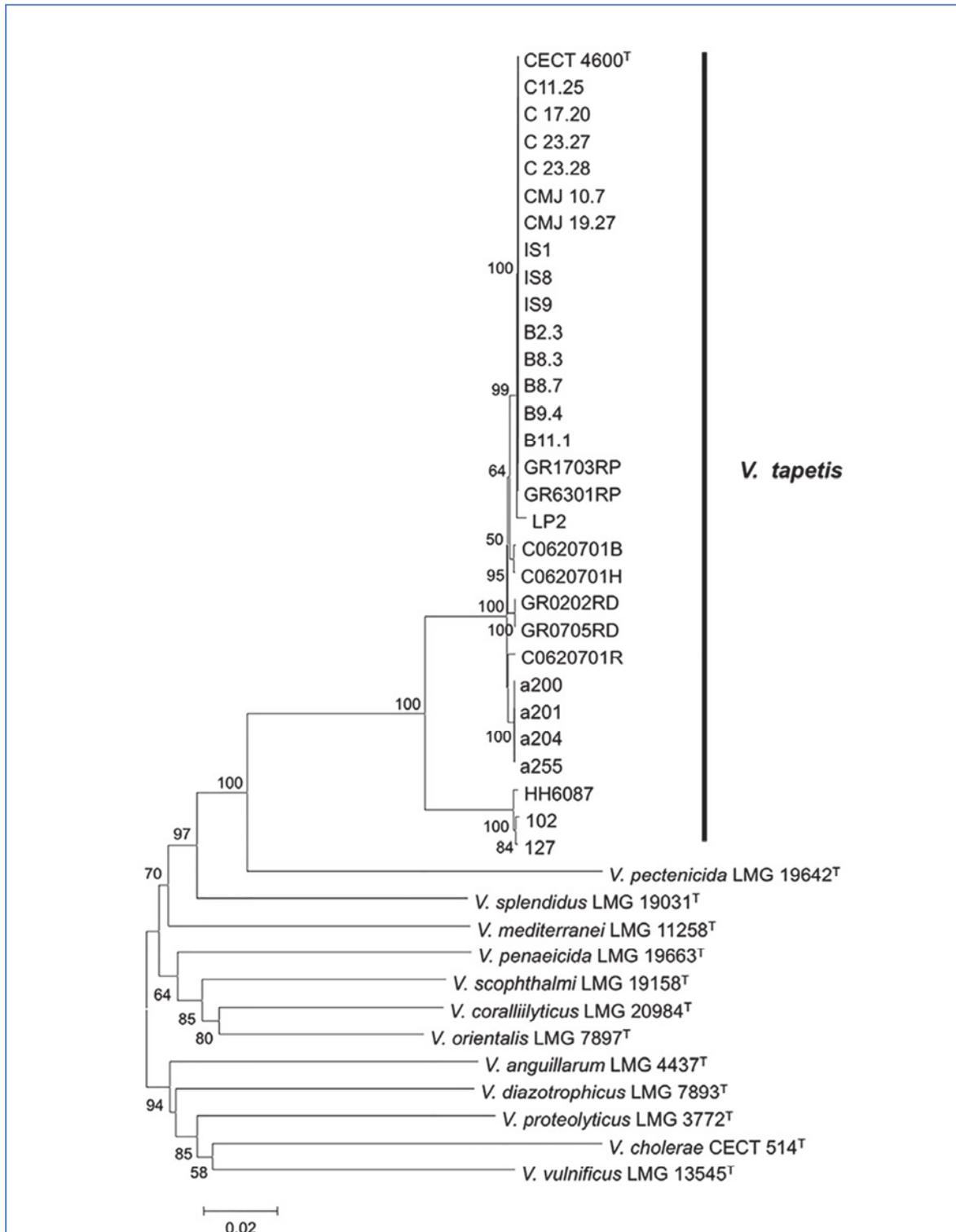


Figure 7: Arbre phylogénétique de 30 souches de *V. tapetis* et 12 souches appartenant à d'autres espèces de *Vibrio* proches de *V. tapetis*. Construction fondée sur l'analyse des séquences des 8 gènes *atpA*, *fstZ*, *gapA*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *rpoD* et *topA* (d'après Balboa et Romalde, 2013).

Depuis l'apparition de la MAB en 1987 à Landéda et l'isolement de l'agent responsable en 1988, 34 souches de *V. tapetis* ont été isolées de bivalves et de poissons en différents points géographiques par Paillard et collaborateurs (Tableau 2). Parmi les souches identifiées de *V. tapetis*, la souche LP2 isolée d'un poisson, est la première souche de *V. tapetis* décrite comme pathogène d'un vertébré (Jensen *et al.*, 2003).

Tableau 2: Souches de *V. tapetis* isolées entre 1988 et 2003 (d'après Paillard, 2004b).

Souche	Date	Hôte	Espèce	Origine
CECT4600	Oct. 90	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Landéda, France
IS1 (VP1)	Sept. 88	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Landéda, France
IS5	Oct. 91	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Landéda, France
IS7	Avr. 90	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Quiberon, France
IS8	Avr. 90	Bivalve (Palourde)	<i>Venerupis aurea</i>	Quiberon, France
IS9	Avr. 90	Bivalve (Coque)	<i>Cerastoderma edule</i>	Quiberon, France
2.3	90-91	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Landéda, France
8.17	90-91	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Landéda, France
9.7	90-91	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Landéda, France
11.2	90-91	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Landéda, France
RD 0202	Dec. 92	Bivalve (Palourde)	<i>R. decussatus</i>	Galice, Espagne
RD 0705	Dec. 92	Bivalve (Palourde)	<i>R. decussatus</i>	Galice, Espagne
RP 1703	Dec. 92	Bivalve (Palourde)	<i>R. decussatus</i>	Galice, Espagne
RP 6301	Dec. 92	Bivalve (Palourde)	<i>R. decussatus</i>	Galice, Espagne
P21	Oct. 93	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Rade de Brest, France
UK6	Juin 96	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Poole Harbour, Grande Bretagne
LP (LP2)	1999	Poisson (vieille)	<i>Symphodus melops</i>	Bergen, Norvège
HH6087	2002	Poisson (flétan)	<i>Hypoglossus hypoglossus</i>	Glasgow, Grande Bretagne
GDO	Mar. 2003	Bivalve (Palourde)	<i>Dosynia exoleta</i>	Glénan, France
NRP45	Juin 2003	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Espevik, Norvège
HRPR1	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
HRPR2	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
HRPR3	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
HRPR4	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
HRPR5	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
ERPR1	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
ERPR2	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
ERPR3	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
ERPR4	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
ERPR5	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France
ERPR6	Dec. 2002	Bivalve (Palourde)	<i>R. philippinarum</i>	Golfe du Morbihan, France

2.3.5. Pathogénicité de *V. tapetis*

Le processus infectieux d'un pathogène implique la colonisation, la multiplication, l'invasion et la persistance de celui-ci dans son hôte. *V. tapetis* est capable d'adopter deux stratégies de colonisation de la palourde *R. philippinarum*. D'une part, *V. tapetis* peut d'abord

agir en microparasite externe en colonisant la lame périostracale et les fluides extrapalléaux, induisant le symptôme « anneau brun ». D'autre part, si le pathogène pénètre dans les tissus, il se propage alors dans l'hémolymphe, provoquant la mort de la palourde. L'orientation vers l'une ou l'autre des stratégies dépend essentiellement de l'état physiologique de la palourde et des conditions environnementales (Figure 8).

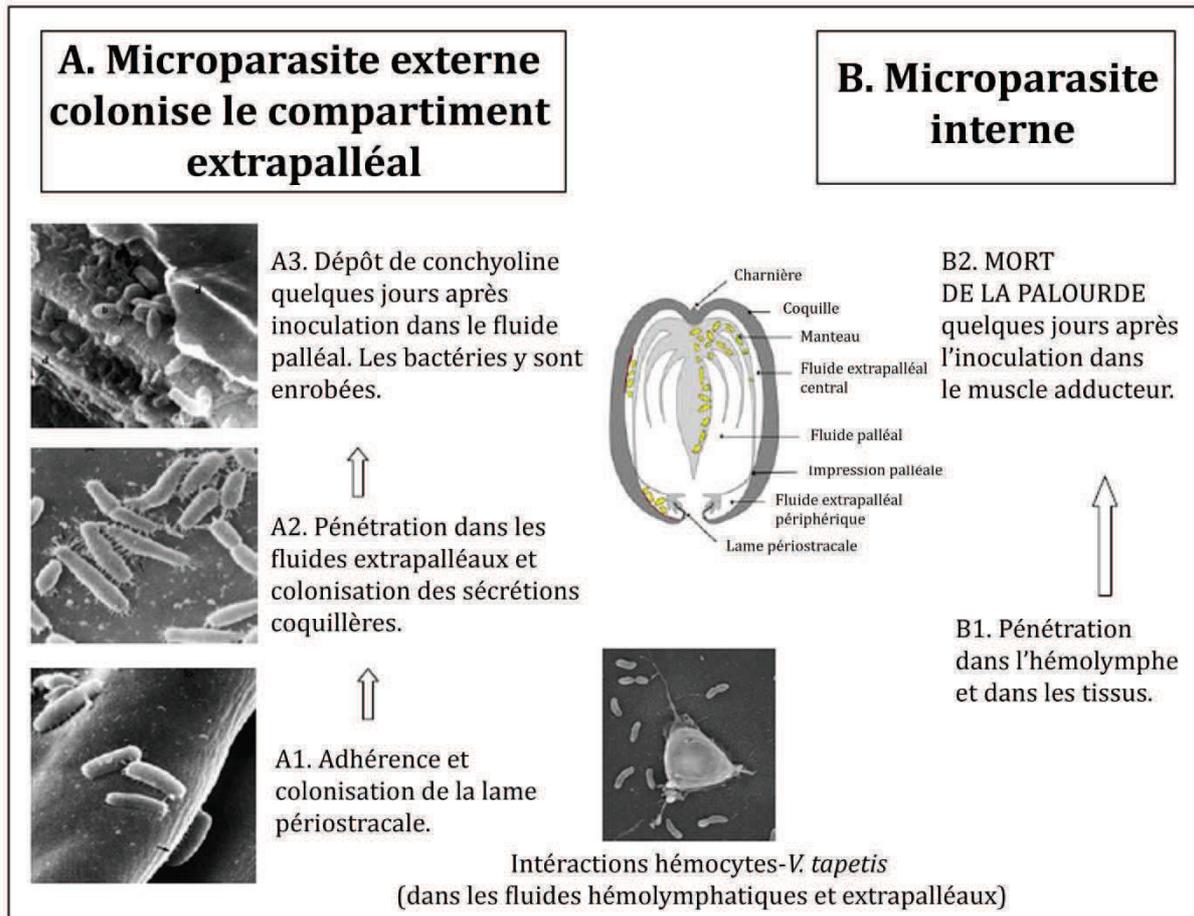


Figure 8 : Stratégies de colonisation de la palourde *R. philippinarum* par *V. tapetis* (d'après Paillard, 2004b).

Stratégie A : Microparasite externe ou « pseudo-interne » induisant le symptôme anneau brun. A1 : adhésion et colonisation de *V. tapetis* au niveau du site d'infection, la lame périostracale, au sein des fluides palléaux. A2 : Pénétration et colonisation des compartiments extrapalléaux (périphériques et/ou centraux). A3 : Dépôt de conchyoline sur la face interne des valves, avec enrobage des bactéries au sein des matrices organiques.

Stratégie B : Microparasite interne provoquant la mort de la palourde. B1 : Pénétration de *V. tapetis* dans les tissus et l'hémolymphe suite à des lésions. B2 : Mort de la palourde démontrée expérimentalement par inoculation de *V. tapetis* dans le muscle adducteur. L'étape B1 peut aussi nécessiter avant les étapes A1 ou A2 ou A3 (stratégie couplée A + B) ou bien directement avoir lieu sans les étapes précédemment décrites, celle-ci dépendant de l'état physiologique de l'hôte et de son intégrité tissulaire et cellulaire.

Le processus de pathogénicité d'une bactérie implique un fort pouvoir de colonisation spécifique de son hôte, la capacité d'invasion et de multiplication au sein de celui-ci notamment en déjouant les défenses de l'hôte. Ces processus de pathogénicité chez *V. tapetis*

ne sont pas encore clairement élucidés ; cependant certains facteurs semblent être impliqués dans la virulence de *V. tapetis*.

2.3.5.1. Capacité de colonisation

La colonisation et le développement d'une pathologie bactérienne dépendent fortement de la capacité du pathogène à adhérer spécifiquement aux cellules de son hôte, particulièrement au niveau de son site d'infection (Pizzaro-Cerda et Cossart, 2006). L'aptitude de *V. tapetis* à adhérer à la lame périostracale de la palourde, notamment par la présence de pili à la surface de la bactérie (Figure 9) semble être nécessaire à la mise en place de la MAB (Borrego *et al.*, 1996b ; Paillard et Maes, 1995a,b). Quelques heures après une infection, *V. tapetis* est préférentiellement retrouvée adhérente au periostracum de la palourde (Paillard et Maes, 1995b). D'autre part, une étude a également démontré la spécificité de l'adhésion de *V. tapetis* vis-à-vis des cellules de palourdes, puisque le pathogène s'est avéré incapable d'adhérer à des cellules issues de lignées cellulaires de poissons (Lopez-Cortes *et al.*, 1999).

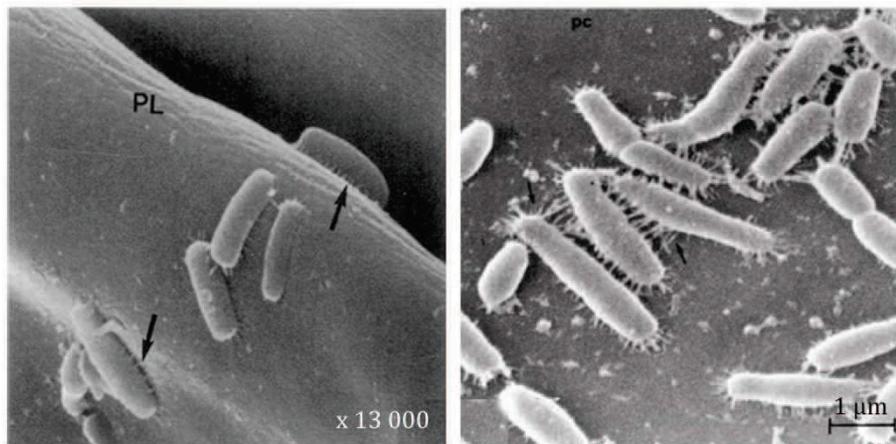


Figure 9 : Images en microscopie électronique à balayage de *V. tapetis* adhérent à la lame périostracale. Les pili sont visibles à la surface de la bactérie (flèches). PL/pc : lame périostracale. (Paillard, 2004b).

2.3.5.2. Capacité d'invasion

Lorsque *V. tapetis* pénètre le milieu interne de la palourde ou lorsqu'il est injecté directement dans l'hémolymphe, le pathogène induit la mort de la palourde en 3 jours (Allam *et al.*, 2002). Des tests spécifiques *in vitro* ont permis de mettre en évidence l'effet cytotoxique de *V. tapetis* vis-à-vis des hémocytes de palourde. Ces cellules du système immunitaire constituent la principale ligne de défense de la palourde contre les agressions extérieures. Au contact du pathogène, les cellules hémocytaires présentent une augmentation de leur volume, un arrondissement cellulaire, une inhibition de la formation de pseudopodes et de leur faculté

d'agrégation, ainsi qu'une réduction de leur capacité d'adhésion (Figure 10) (Choquet *et al.*, 2003). Ce phénomène d'arrondissement des hémocytes a également été décrit chez la moule *Mytilus edulis* infectée par d'autres *Vibrio* tels que *V. alginolyticus* et *V. anguillarum* (Lane et Birkbeck, 1999).

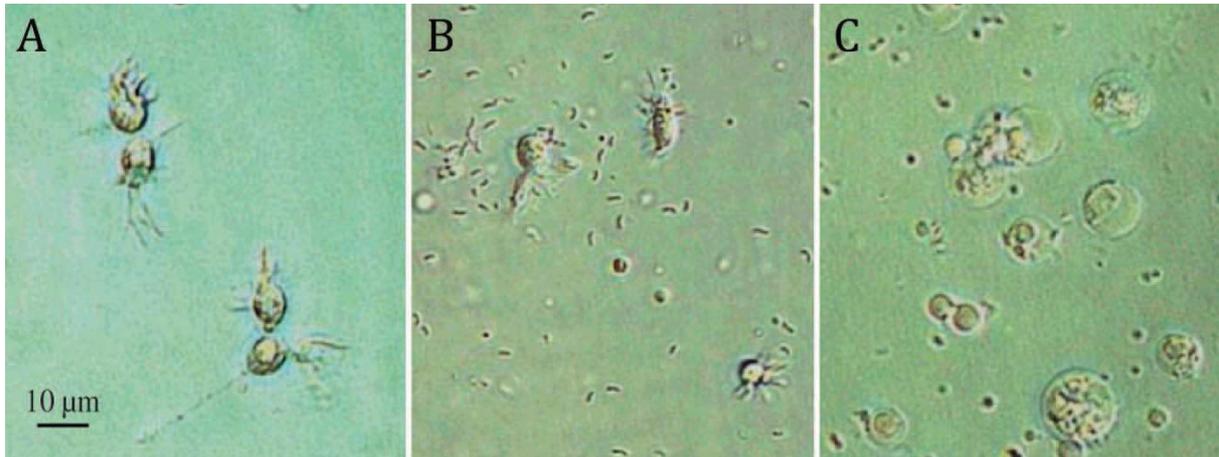


Figure 10 : Observation en microscopie photonique d'hémocytes de *R. philippinarum* incubés 3h à 18°C. A : témoin, incubation avec de l'eau de mer stérile filtrée (EMSF) ; B : hémolymphe + *V. splendidus* (témoin négatif) ; C : hémolymphe + *V. tapetis* (Choquet *et al.*, 2003).

Bien que l'injection dans le muscle adducteur des produits extracellulaires de *V. tapetis* n'entraîne que 6% de mortalité (contre 100% de mortalité avec une culture de *V. tapetis*) (Allam *et al.*, 2002) ; une étude ultérieure a montré que ces produits extracellulaires induisaient des changements morphologiques, ainsi qu'une diminution de l'activité de phagocytose des hémocytes de *R. philippinarum* (Allam et Ford, 2006).

V. tapetis est également capable de se multiplier au sein des cellules immunitaires de la palourde et d'inhiber le métabolisme oxydatif des hémocytes (mécanisme de lyse intracellulaire faisant appel à la production de radicaux libres oxygénés (reactive oxygen species [ROS]) et permettant l'élimination des bactéries lors de la phagocytose [Lambert *et al.*, 2003 ; Roch, 1999 ; Paillard *et al.*, 2004b]). *V. tapetis*, en détournant ainsi le processus de phagocytose (Figure 11), est capable de survivre au sein des hémocytes. Puis, en induisant leur lyse, le pathogène va se disséminer dans l'hémolymphe et les fluides extrapalléaux, provoquant une septicémie et la mort de la palourde (Paillard, 2004b).

Une étude plus récente a montré que la production d'oxyde nitrique (NO) dans l'hémolymphe et les fluides extrapalléaux de la palourde est dépendante de la concentration

de bactéries inoculée et augmente avec le temps d'incubation avec *V. tapetis* (Jeffroy et Paillard, 2011). Il semblerait que l'augmentation de la production de NO soit directement corrélée à l'arrondissement des cellules et à la perte de la capacité de formation de pseudopodes des hémocytes au cours du processus infectieux.

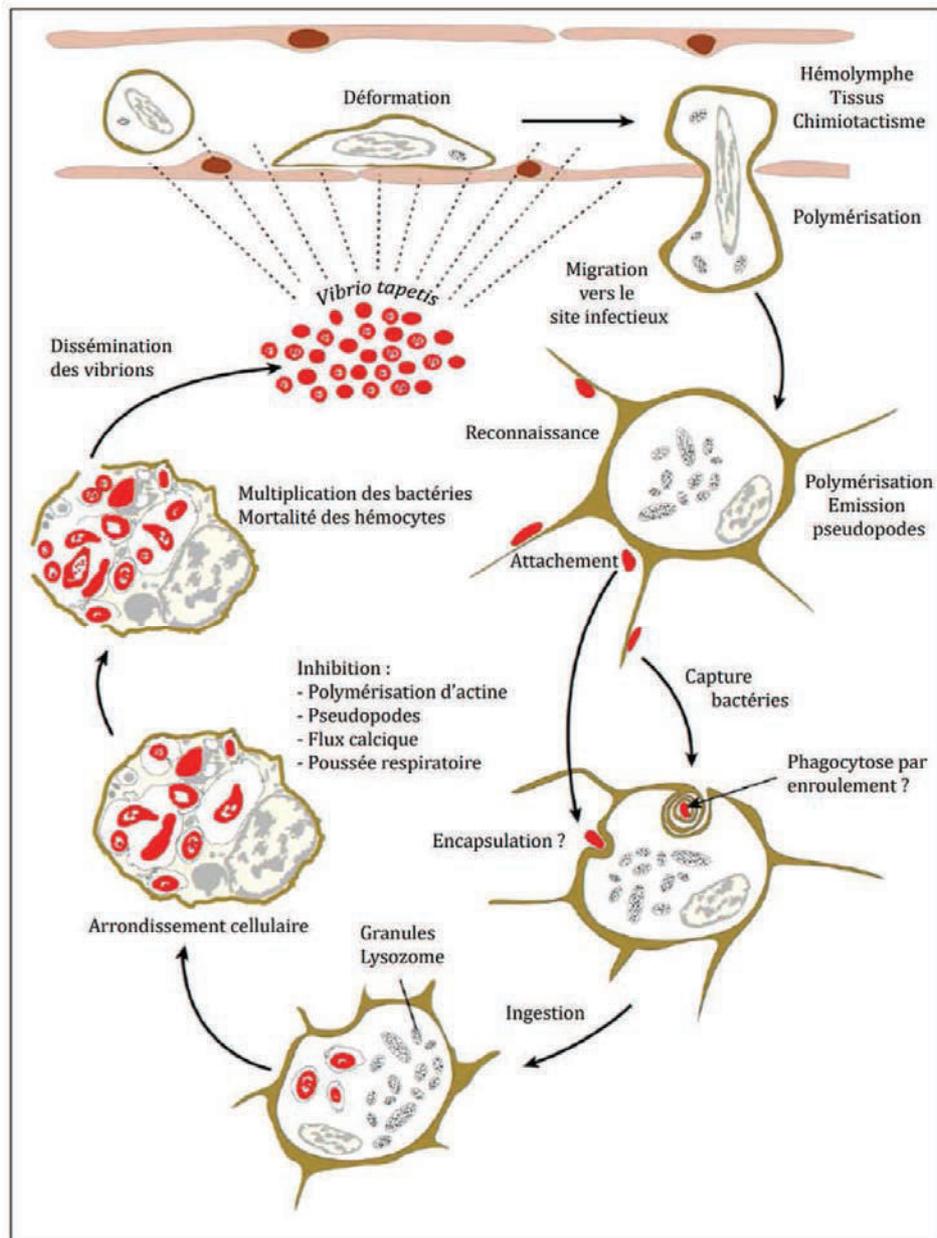


Figure 11 : Schéma synthétique du processus de défense et de phagocytose de cellules hémocytaires de *R. philippinarum* au contact de *V. tapetis* (en rouge) (Paillard, 2004b).

Parmi les gènes de virulence décrits chez les *Vibrio*, ceux codant pour des toxines de type hémolysine sont assez bien connus (Zhang et Austin, 2005), notamment chez des *Vibrio* pathogènes humains comme *V. cholerae* (Menzl *et al.*, 1996 ; Olivier *et al.*, 2007) ou *V. anguillarum* (Rodkhuma *et al.*, 2005). Peu de données sont disponibles dans ce domaine chez *V. tapetis*, néanmoins un gène d'hémolysine de type lécithinase a été identifié dans son génome (Choquet, 2004) et pourrait jouer un rôle dans la virulence de *V. tapetis*. L'implication de cette toxine dans la pathogénicité de *V. tapetis* n'a cependant pas encore été examinée.

La première étude d'un mécanisme de virulence au niveau moléculaire a été développée par Lackhal *et al.* (2008) qui ont révélé que la protéine chaperonne DjlA (ancrée à la membrane interne), de la famille des cochaperonnes DnaJ/Hsp40, était impliquée dans la cytotoxicité de *V. tapetis*. En réalisant le premier mutant de *V. tapetis* par simple recombinaison homologue, les auteurs ont montré que la mutation du gène *djlA* entraîne une réduction significative de l'activité cytotoxique de la bactérie *in vitro* vis-à-vis des hémocytes de *R. philippinarum*. Ils ont constaté que les mutants dépourvus de la protéine DjlA sont incapables d'induire l'arrondissement des hémocytes et de causer la MAB. Les auteurs proposent ainsi l'hypothèse que la protéine DjlA serait impliquée, à travers son activité de chaperonne, dans l'assemblage du ou des système(s) de sécrétion des facteurs cytotoxiques.

L'implication de la protéine DjlA dans la virulence d'un pathogène a déjà été démontré chez *Legionella dumoffii* (Ohnishi *et al.*, 2004).

Depuis l'apparition de la MAB et l'isolement de l'agent pathogène responsable, de nombreuses études ont été menées afin de comprendre le processus infectieux de *V. tapetis*. La figure 12 résume les connaissances acquises sur le cycle de *V. tapetis* et les mécanismes d'interactions *Vibrio tapetis*-palourde.

Comme nous l'avons déjà évoqué, *V. tapetis* est capable d'adopter deux stratégies pour infecter son hôte. Lorsqu'il se comporte en microparasite externe, le pathogène adhère et colonise le periostracum, induisant le développement du syndrome anneau brun, il se multiplie ensuite dans les fluides extrapalléaux de la palourde. Si, à la suite de lésions, *V. tapetis* pénètre les tissus de la palourde, il est capable d'induire très rapidement la mort de son hôte notamment en échappant à son système immunitaire. Néanmoins, parmi les mécanismes impliqués dans le cycle infectieux de *V. tapetis* évoqués par Paillard (2004b) (Figure 12), l'un d'entre eux reste encore non élucidé : la formation de biofilm et sa place dans

le processus de la MAB. Cet aspect encore inconnu de la virulence de *V. tapetis* fait l'objet de mes travaux et nous amène à la deuxième partie de cette étude bibliographique consacrée aux biofilms bactériens.

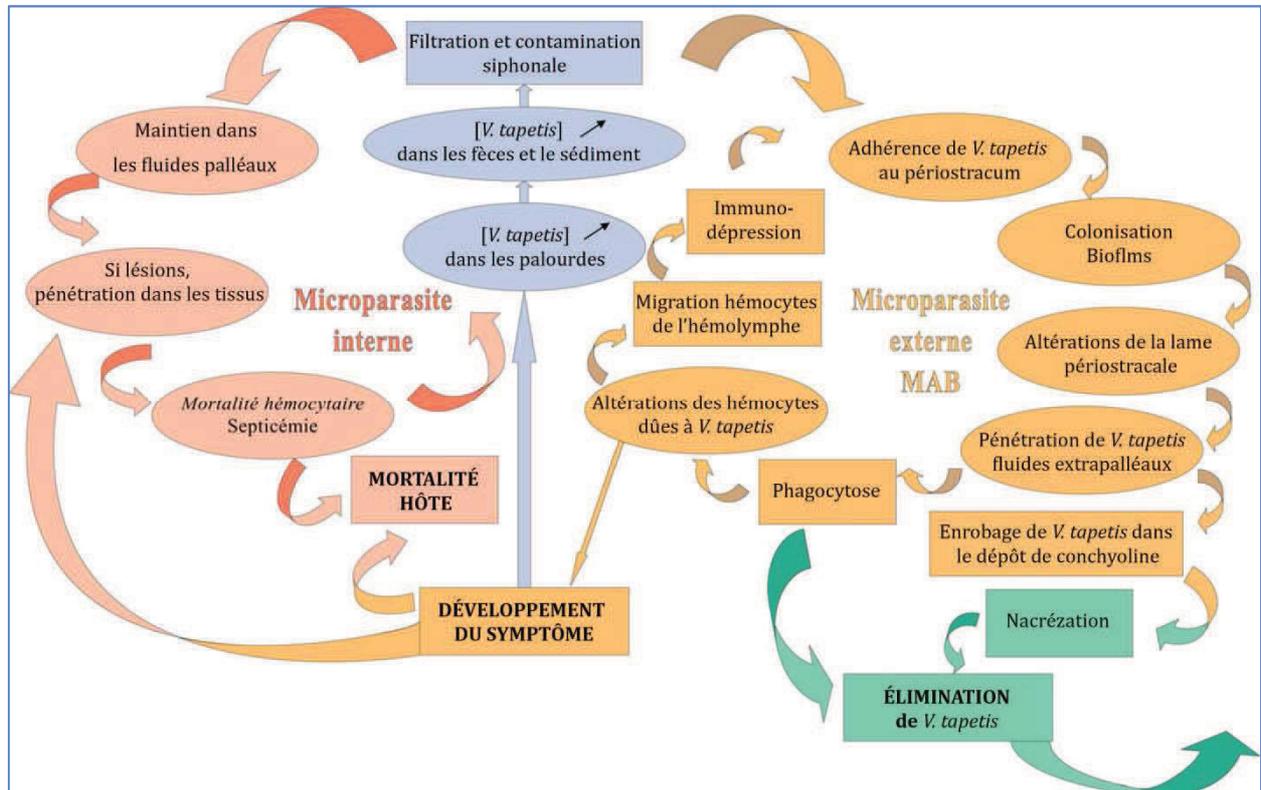


Figure 12 : Cycle infectieux de *V. tapetis* et mécanismes d'interaction hôte-pathogène. Ce cycle est composé de deux sous cycle en fonctions des stratégies du microparasite (Paillard, 2004b).

3. LES BIOFILMS BACTERIENS

3.1. Définitions

Les bactéries peuvent vivre sous forme libre, dite planctonique, ou bien en faisant partie de communautés organisées : les biofilms. Ce mode de vie est considéré comme le plus fréquent dans le monde bactérien. Depuis les années 70, où les biofilms ont été observés pour la première fois, la définition d'un biofilm n'a cessé d'évoluer. Le terme de biofilm fut utilisé pour la première fois en 1978 par Costerton *et al.*, qui ont observé les premières communautés bactériennes attachées à un substrat et entourées d'une matrice de « glycocalyx ». Une décennie plus tard, Costerton *et al.* (1987) définissaient le biofilm bactérien comme constitué d'une phase visqueuse et hydratée, composée de cellules et de leur matrice d'exopolysaccharides.

Ces bactéries formant des biofilms présentent une différence de phénotype liée à l'état physiologique et à des variations d'activités génétiques. Chez *Escherichia coli*, la synthèse de la flagelline est plus faible chez les bactéries en biofilm, tandis que la synthèse d'exopolysaccharides y est fortement augmentée (Prigent-Combaret *et al.*, 1999), suggérant l'idée que la formation de biofilm est régulée par l'expression de gènes spécifiques. La vie en biofilm procure aux bactéries une résistance aux agents antimicrobiens, aux systèmes immunitaires des hôtes infectés, les protège de conditions environnementales défavorables et permet d'augmenter la diversité génétique (Donlan, 2000 ; Donlan et Costerton, 2002).

La définition aujourd'hui communément admise d'un biofilm bactérien est celle proposée par Donlan (2002), qui parle d'une communauté organisée de cellules attachées à un substrat, ou à une interface, associées entre elles et enveloppées dans une matrice extracellulaire polymérique produite par les bactéries elles-mêmes, et présentant des différences phénotypiques et d'activités génétiques.

De manière générale, il n'existe pas une organisation architecturale standard des biofilms, différents types de structures tridimensionnelles peuvent être observées, comme des empilements ou encore des champignons. Ces derniers sont très souvent représentés dans les modèles de formation de biofilms (Figure 13), du fait de la généralisation du modèle *P. aeruginosa*, alors qu'ils ne sont pas fréquemment observés chez d'autres bactéries.

3.2. La formation de biofilm

La plupart des bactéries en suspension dans un milieu aqueux est capable de coloniser rapidement une surface immergée et de former un biofilm. La formation d'un biofilm dépend de nombreux facteurs et est largement affectée par les conditions environnementales. Il n'existe pas de modèle universel de formation de biofilm, cependant des étapes clés semblent nécessaires à la mise en place d'un biofilm chez de nombreuses espèces bactériennes. Ces étapes et leurs mécanismes ont été le plus souvent largement décrits chez *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif pathogène opportuniste pour l'homme (Watnick et Kolter, 2000 ; O'Toole *et al.*, 2000). De nombreuses données bibliographiques sont disponibles sur la formation des biofilms de *Vibrio*, mais essentiellement des pathogènes Humains et très peu sur ceux d'organismes marins. Dans cette partie sera présenté ce qui est considéré comme le modèle de formation de biofilm fondé sur les connaissances acquises notamment chez *P. aeruginosa* et, à chaque fois que cela sera possible, un encadré décrira un parallèle chez des *Vibrio*.

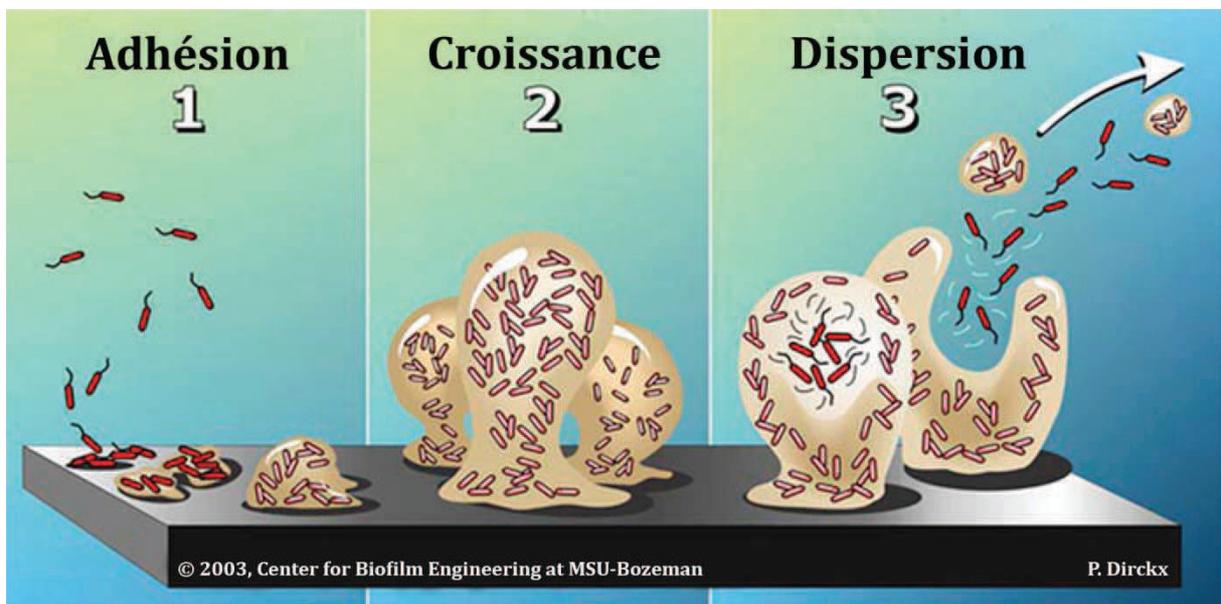


Figure 13 : Représentation schématique de la formation d'un biofilm bactérien. (1) adhésion réversible puis irréversible des bactéries ; (2) croissance et maturation du biofilm : multiplication cellulaire et production de la matrice extracellulaire ; (3) dispersion de cellules bactériennes. (D'après P. Dirckx, Center for Biofilm Engineering Montana State University).

Il est généralement considéré que les principales étapes de formation d'un biofilm sont : le déplacement des bactéries vers un support, qui aura été au préalable conditionné par

l'adsorption de molécules, et la fixation des bactéries à ce support, d'abord de façon réversible puis irréversible ; la multiplication bactérienne et la production d'exopolymères, conduisant à la formation de microcolonies puis au développement tridimensionnel du biofilm mature. Enfin, des cellules peuvent se détacher du biofilm mature afin d'aller coloniser d'autres surfaces (Figure 13). Ces étapes sont décrites dans les paragraphes suivants.

3.2.1. Conditionnement de surface et déplacement des bactéries

Un support solide, lorsqu'il est immergé dans un milieu aqueux, est inévitablement recouvert par des molécules organiques et inorganiques issues du milieu, qui viennent s'y adsorber ; entraînant ainsi des modifications des propriétés physico-chimiques de surface. Ce phénomène appelé conditionnement de surface a été décrit pour la première fois par Loeb et Neihof (1975). Le film conditionnant commence à se former dès les premières minutes d'immersion du support et continue de se mettre en place pendant plusieurs heures. Il en résulte une accumulation de molécules organiques et inorganiques et une concentration plus élevée en nutriments sur le support (Kumar et Anand, 1998). Les bactéries planctoniques peuvent alors être attirées vers cette surface en fonction de divers signaux environnementaux et nutritionnels.

Le déplacement des bactéries vers la surface à coloniser se fait généralement grâce à des appendices générateurs de mouvements tels que les flagelles ou les pili. La formation de biofilm débute lorsque la bactérie atteint la surface à coloniser et s'y attache. Chez de nombreuses espèces bactériennes, la présence du flagelle est importante pour les étapes initiales de formation de biofilm. Ainsi, chez *P. aeruginosa*, les gènes codant pour la formation de pili ainsi que la mobilité du flagelle sont nécessaires à la formation de son biofilm (O'Toole et Kolter, 1998). L'approche des bactéries vers la surface à coloniser peut également se faire de façon passive, c'est-à-dire par gravitation, diffusion ou grâce à la force d'un flux qui projette les cellules contre la surface (Donlan, 2002).

Chez de nombreux *Vibrio*, la nage médiée par les flagelles est essentielle dans les premières étapes de formation de biofilm (Yildiz et Visick, 2008). Chez *V. cholerae* par exemple, il a été démontré que la perte du flagelle entraînait une diminution de l'attachement des cellules, ainsi qu'une altération du développement du biofilm (Watnick *et al.*, 2001).

3.2.2. Adhésion des bactéries au support

Lorsqu'une bactérie se déplace vers une surface solide, des forces physico-chimiques attractives et répulsives vont s'exercer entre elle et le support et vont conditionner l'initiation de l'étape d'adhésion. Ces forces d'interactions, incluant les forces de Van der Waals, les forces électrostatiques et les forces acide-base de Lewis diffèrent par leur intensité et la distance à laquelle elles influencent l'interaction. Lorsque la bactérie est proche de la surface (<1nm), des interactions spécifiques se mettent en place (liaisons hydrogènes, ponts cationiques ou liaisons de type récepteur-ligand pour les interactions entre les bactéries et cellules hôtes), mais les bactéries subissent encore à ce stade un mouvement Brownien et peuvent se détacher facilement du support sous l'action de contraintes hydrodynamiques (Fletcher, 1996).

L'adhésion devient irréversible lorsqu'elle correspond à une fixation physique de la bactérie sur le support. Plusieurs constituants de la surface cellulaire permettent à la bactérie d'adhérer à un support. Ces constituants varient selon les types de microorganismes. Les bactéries se trouvant dans un environnement aquatique sont capables de coloniser toute sorte de supports, tels que des particules en suspension, du phytoplancton ou encore des invertébrés.

La colonisation peut se faire de manière spécifique, comme cela a été démontré par Montgomery et Kirchman (1993) qui ont mis en évidence qu'il existait une adhésion spécifique de *V. harveyi* sur des particules chitineuses, possible notamment par la présence de protéines membranaires capables de lier spécifiquement la chitine.

La présence sur la bactérie d'appendices extracellulaires de type fimbriae contribue à l'hydrophobicité de la surface cellulaire et permettrait à la bactérie de surmonter la barrière de répulsion électrostatique initiale qui existe entre la cellule et le substrat, favorisant ainsi l'attachement sur la surface (Rosenberg *et al.*, 1982). Pratt et Kolter (1998) ont montré qu'une mutation du gène *fimH* (impliqué dans la biosynthèse des pili de type I ou fimbriae) empêchait l'attachement initial chez *E. coli*.

Les pili présents à la surface des bactéries sont impliqués dans l'adhésion au support. Chez *P. aeruginosa*, l'expression de gènes codant pour les sous-unités structurales du pilus est diminuée lorsque les cellules sont établies en biofilm, montrant ainsi le rôle plus spécifique

des pili dans l'étape d'adhésion (Whiteley *et al.*, 2001). Les pili de type IV ont aussi été décrits pour leur rôle dans l'attachement des cellules aux surfaces abiotiques (Watnick et Kolter, 1999). Chez les bactéries à Gram négatif, le rôle des lipopolysaccharides (LPS) dans l'adhésion bactérienne a également été démontré. Williams et Fletcher (1996) ont montré que des mutants de *P. fluorescens* déficients en antigène O (composant du LPS) présentaient une plus forte capacité d'adhésion aux surfaces hydrophobes.

Chez *V. cholerae*, trois types de pili sont impliqués dans la formation de biofilm : le pilus de type IV « mannose-sensitive haemagglutinin » (MSHA), le « toxin co-regulated pilus » (TCP) et le pilus « chitin-regulated » (ChiRP appelé aussi PilA) (Chiavelli *et al.*, 2001 ; Reguera et Kolter, 2005 ; Watnick *et al.*, 1999). Moorthy et Watnick (2004) ont démontré le rôle du gène de structure du pilus *mshA* dans l'établissement de la première couche de cellules, mais celui-ci n'était indispensable puisqu'un mutant *mshA* pouvait contourner cette étape en formant des agrégats de cellules et générer ensuite un biofilm. Enfin, Paranjpye et Strom (2005) ont montré chez *V. vulnificus* que l'inactivation du gène codant pour la piline de type IV (PilA), présentant une forte homologie avec les pilines présentes chez plusieurs pathogènes comme *V. cholerae* (PilA) ou encore *P. aeruginosa* (PilA), réduisait la capacité de *V. vulnificus* à former des biofilms et diminuait significativement l'adhérence et la virulence de la bactérie vis-à-vis des cellules épithéliales.

Plusieurs études ont démontré que de nombreux gènes étaient régulés de manière spécifique à la formation de biofilm, une fois les cellules adhérentes. Chez *E. coli*, c'est environ 22% des gènes qui sont induits, tandis que 16% sont réprimés lorsque la bactérie se trouve en biofilm (Pringent-Combaret *et al.*, 1999). Davies et Geesey (1995) ont ainsi montré chez *P. aeruginosa* une induction du gène *algC* quelques minutes suivant l'attachement des cellules à la surface.

3.2.3. Maturation du biofilm

La maturation du biofilm se traduit par une structuration et une croissance tridimensionnelle de celui-ci. La maturation du biofilm est notamment facilitée par la mise en place d'une communication bactérienne de type Quorum-Sensing (QS). Les bactéries vont se multiplier sur la surface et produire une matrice extracellulaire contribuant à la robustesse et à l'architecture finale du biofilm (Brenda *et al.*, 2005). La matrice alors produite est en

majorité composée d'exopolymères, de protéines, mais aussi d'ADN extracellulaire. La composition et la quantité de ces différents éléments varient en fonction de l'âge du biofilm, de facteurs environnementaux et du genre bactérien.

3.2.3.1. Les exopolysaccharides (EPS)

Les exopolymères sont essentiellement de nature polysaccharidique et peuvent représenter 50 à 90% des carbones organiques du biofilm. Les différentes architectures que peuvent adopter les biofilms sont en partie liées à leur composition en exopolysaccharides (EPS) ; ces derniers participent notamment à l'établissement et au maintien de structures tridimensionnelles telles que les champignons (Brenda *et al.*, 2005).

Ce phénomène a été décrit chez *V. cholerae* El Tor, chez qui des mutants ne produisant plus d'EPS ne formaient plus de biofilms matures, mais juste une monocouche de cellules (Watnick et Kolter, 1999).

Chez les bactéries à Gram négatif, ces polysaccharides sont neutres ou polyanioniques. Dans le cas de certaines bactéries à Gram positif, telles que celles appartenant au genre *Staphylococcus*, la composition chimique des EPS diffère et ceux-ci sont alors essentiellement de nature cationique (Donlan, 2002).

Les EPS jouent également un rôle dans l'hydratation de la matrice, car ils peuvent intégrer dans leur structure de nombreuses molécules d'eau par l'établissement de liaisons hydrogènes. La solubilité des polysaccharides dépend de leur composition et leur structure, de ce fait certains EPS possèdent des liaisons β -1,3 et β -1,4 les rendant plus rigides et donc moins solubles (Donlan, 2002). Les répartitions spatiale et temporelle des EPS au sein du biofilm peuvent également varier (Leriche *et al.*, 2000). Ces auteurs ont montré par exemple que différentes bactéries produisent des quantités variables d'EPS et que celles-ci augmentaient avec l'âge du biofilm. De manière générale, les EPS sont fortement hydratés et empêchent ainsi la dessiccation des biofilms.

Ces exopolymères sont aussi impliqués dans les propriétés de résistances aux agents antimicrobiens, en empêchant le passage à travers le biofilm des molécules antibiotiques, probablement en se liant aux agents antibactériens (Donlan, 2000).

Chez plusieurs bactéries appartenant au genre *Vibrio*, les EPS ou VPS (pour « *Vibrio* polysaccharide synthesis ») ont également été décrits comme impliqués dans la formation et

le maintien du biofilm (Yildiz et Schoolnik, 1999). Le locus *vps* est en partie conservé chez plusieurs espèces de *Vibrio* (Yildiz et Visick, 2008). Chez *V. fischeri*, la formation de biofilm et la mise en place de la symbiose chez son hôte le calmar *E. scolopes* dépendent de l'expression des gènes de biosynthèse de polysaccharide *syp* (symbiosis polysaccharides) (Morris et Visick, 2010 ; Shibata *et al.*, 2012). Les gènes *syp* sont conservés chez *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, mais ils n'ont pas été retrouvés chez *V. cholerae* (Yip *et al.*, 2005).

3.2.3.2. L'ADN extracellulaire

En plus des exopolysaccharides, l'ADN extracellulaire (ADN_e) est un des composants majeurs de la matrice d'un biofilm (Whitchurch *et al.*, 2002). L'ADN_e présent dans la matrice extracellulaire des biofilms peut avoir des origines différentes. La mortalité bactérienne fait partie intégrante du développement du biofilm, l'ADN_e peut alors provenir de la lyse naturelle des cellules, qui relarguent ainsi leurs acides nucléiques dans la matrice. Cependant, l'ADN_e peut aussi être issu d'un processus contrôlé par les bactéries elles-mêmes. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, plusieurs voies biochimiques conduisant à la production d'ADN_e ont été rapportées, tels que l'excrétion d'ADN double brin, la libération de vésicules contenant de l'ADN ou la lyse contrôlée d'une sous-population de cellules au sein même du biofilm (Webb *et al.*, 2003 ; Dominiak *et al.*, 2011).

La production d'ADN_e dans les biofilms de *P. aeruginosa* et d'autres bactéries a également été corrélée à la production des signaux de communication du QS (Allesen-Holm *et al.*, 2006 ; Spoering et Gilmore, 2006). Il semblerait cet l'ADN_e possède une structure double brin très proche de celle de l'ADN chromosomique (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Le rôle de l'ADN_e dans le développement du biofilm n'a pas encore été clairement élucidé ; il semble néanmoins intervenir dès les étapes initiales de formation du biofilm comme par exemple chez *Listeria monocytogenes* (Harmsen *et al.*, 2010). L'ADN_e pourrait servir également de source d'énergie ou encore favoriser une résistance induite aux antibiotiques par le transfert horizontal de gènes.

Le rôle de cet ADN exogène dans le maintien de la structure du biofilm semble incontestable. Diverses études ont montré que des enzymes de type DNase peuvent inhiber la formation de biofilms, mais aussi disperser des biofilms préformés d'un grand nombre de bactéries et de champignons (Jakubovics *et al.*, 2013). Néanmoins, certains biofilms contenant

des quantités importantes d'ADN_e sont résistants aux traitements par des DNase. Il semblerait alors que le traitement à la DNase affaiblisse la structure du biofilm et augmente la sensibilité aux agents antimicrobiens ou encore facilite la dispersion mécanique du biofilm (Jakubovics *et al.*, 2013).

La caractérisation de composés inhibant la formation de biofilm a également mis en évidence que certaines de ces molécules anti-biofilm avaient une activité DNase. C'est le cas notamment pour la bactérie *Bacillus licheniformis*, qui produit une molécule anti-biofilm de type DNase capable de disperser le biofilm préformé d'*E. coli* ou encore de *B. subtilis* (Nijland *et al.*, 2010).

Peu d'études ont été menées dans le but d'examiner le rôle de l'ADN_e dans les biofilms de *Vibrio*. Cependant, cet ADN exogène a été identifié comme un composant important de la matrice du biofilm de *V. cholerae* (Seper *et al.*, 2011). Les auteurs ont notamment montré que l'ADN_e ainsi que des nucléases extracellulaires sont impliqués dans le développement, l'architecture et la dispersion du biofilm de l'agent responsable du choléra.

3.2.3.3. Les autres constituants de la matrice extracellulaire

Les matrices extracellulaires des biofilms sont généralement très riches en eau (environ 97%) et contiennent d'autres macromolécules telles que des protéines dont de nombreuses enzymes. La matrice extracellulaire contient également en plus faibles quantités des ions, des métabolites, des lipides et débris de cellules lysées (Sutherland, 2001). Les protéines peuvent être secrétées par les bactéries, mais aussi provenir du contenu cellulaire après la lyse de bactéries.

Les protéines de la matrice jouent un rôle dans l'adhérence aux surfaces mais elles participent aussi au maintien de la structure du biofilm, notamment en créant des interactions avec d'autres molécules. Une étude récente a montré chez *P. aeruginosa* que la protéine CdrA est une adhésine extracellulaire ou de surface interagissant avec certains exopolysaccharides (Psl), suggérant que les liaisons formées entre les protéines CdrA et ces EPS pourraient contribuer à lier les cellules avec la matrice (Borlee *et al.*, 2010).

Chez *V. cholerae*, c'est la protéine RbmA qui a été décrite pour son rôle dans le développement de la structure du biofilm et de la morphologie rugueuse des colonies (Fong *et*

al., 2006). Plus récemment, une autre étude a suggéré que cette protéine RbmA contribuerait à la robustesse du biofilm par le maintien de liaisons flexibles entre les cellules et la matrice extracellulaire (Giglio *et al.*, 2013).

3.2.4. Dispersion du biofilm

Le détachement de cellules du biofilm mature fait partie du cycle de vie d'un biofilm. Ce phénomène de dispersion permettrait aux bactéries de coloniser de nouvelles surfaces afin de réinitialiser la formation d'un nouveau biofilm et ainsi faciliter leur transmission dans le cas de bactéries pathogènes (Parsek et Greenberg, 2005). Nous pouvons distinguer deux types de dispersion : la dispersion dite passive due à des forces physiques appliquées sur le biofilm mature et la dispersion active initiée par les bactéries elles-mêmes. De nombreux facteurs tels que des signaux environnementaux ou encore les systèmes de QS sont impliqués dans le processus complexe de dispersion du biofilm (Karatan et Watnick, 2009). Trois principaux modes de dispersion ont été identifiés : l'érosion, le relargage et la dispersion ou « dispersal seeding ». L'érosion correspond à libération continue de cellules individuelles ou de petits amas de cellules provenant d'un biofilm mature. Le relargage provient du détachement soudain de grandes parties du biofilm. Enfin, le « dispersal seeding » correspond au détachement rapide de morceaux du biofilm mature souvent renfermant des cellules planctoniques, qui seront relarguées dans le milieu environnant (Kaplan, 2010). Un des mécanismes classiques engendrant la dispersion du biofilm est la production d'enzymes extracellulaires par les bactéries, qui vont dégrader les composants de la matrice du biofilm, facilitant ainsi sa dissociation. Comme nous l'avons déjà évoqué avec le rôle de l'ADN_e dans la structuration du biofilm, la production d'enzymes à activité DNase, est un des processus impliqués dans la dispersion du biofilm (Seper *et al.*, 2011). Boyd et Chakrabarty (1994) ont montré que la surexpression chez *P. aeruginosa* du gène codant pour l'enzyme alginate lyase (*algL*), qui permet la dégradation de l'alginate (EPS pouvant être très abondant dans la matrice du biofilm de certaines souches dites mucoïdes de *P. aeruginosa*), facilitait le détachement des cellules du biofilm.

3.3. Le biofilm chez les *Vibrio* : quelques précisions

Les *Vibrio* sont ubiquitaires dans les écosystèmes aquatiques où ils alternent entre leur croissance et multiplication au sein de leur hôte et leur persistance dans l'environnement

aquatique. L'adaptation des *Vibrio* aux changements des paramètres environnementaux implique la formation de biofilm, facteur clef pour leur survie et dissémination.

Depuis les années 70 où les biofilms ont été décrits pour la première fois, de nombreuses études ont été menées afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la formation d'un biofilm. La plupart des données disponibles sur les processus de formation de biofilm sont issues de l'étude du biofilm de *P. aeruginosa*. Néanmoins, parmi les bactéries appartenant au genre *Vibrio*, *V. cholerae* fait figure de modèle pour la formation de biofilm. La capacité à former des biofilms de l'agent étiologique du choléra est bien documentée (Watnick et Kolter, 1999 ; Watnick *et al.*, 1999 ; Watnick *et al.*, 2001 ; Yildiz et Visick, 2008 ; Berk *et al.*, 2012). Ainsi chez *V. cholerae*, nous savons par exemple que la mobilité flagellaire, la présence de pili de type IV (MSHA) ou encore la synthèse d'exopolysaccharides sont largement impliqués dans la formation de biofilm. Plus récemment, les pathogènes humains *V. parahaemolyticus* (Enos-Berlage *et al.*, 2005) et *V. vulnificus* (Joseph et Wright, 2004) ont également été décrits pour leur capacité à former des biofilms. Chez *V. cholerae*, un nouveau cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse d'exopolysaccharides, *vps* (*V*ibrio*p*olysaccharides *s*ynthesis), a été identifié. Le locus *vps* a été retrouvé en partie conservé chez d'autres espèces de *Vibrio*, telles que *V. parahaemolyticus* (Guvener et McCarter, 2003) ou *V. vulnificus* (Grau *et al.*, 2008). Un autre cluster de gènes (*syp*, symbiosis polysaccharides) responsable de la synthèse de polysaccharides et spécifiquement retrouvé chez les espèces appartenant au genre *Vibrio* a été identifié chez la bactérie *V. fischeri* symbiotique du calmar (Yip *et al.*, 2005). De plus, les gènes *syp* ont été décrits comme impliqués dans l'établissement de la symbiose entre *V. fischeri* et le calmar *E. scolopes* (Morris et Visick, 2010 ; Shibata *et al.*, 2012). La place du quorum sensing dans la formation de biofilm chez les *Vibrio* a également été mise en évidence chez *V. cholerae* (Hammer et Bassler, 2003) ou encore chez *V. fischeri* (Ray et Visick, 2012).

Toutes ces données, sur les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm concernent essentiellement des *Vibrio* pathogènes de l'Homme (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*). L'étude de la formation de biofilm chez des *Vibrio* pathogènes d'organismes marins reste encore très peu documentée. Récemment, deux études se sont focalisées sur le rôle d'un régulateur du quorum sensing (QS) dans la formation de biofilm d'une souche pathogène de poisson *V. salmonicida* responsable de vibrioses d'eau froide chez le saumon *Salmon salmar* (Bjelland *et al.*, 2012 ; Hansen *et al.*, 2014). Vezzulli *et al.* (2014) ont

montré la capacité de *V. splendidus* et *V. aesturianus* à former des biofilms sur des substrats en chitine, suggérant en même temps que ces deux pathogènes d'huître adopteraient ce mode de vie comme stratégie pour persister dans l'environnement. À notre connaissance, il s'agit ici des seules données disponibles sur la formation de biofilm chez des souches pathogènes d'organismes marins.

4. LE QUORUM SENSING

4.1. Définitions

Pour beaucoup d'espèces bactériennes, la formation de biofilm est directement liée à une régulation par des systèmes de communication intra-espèce de type quorum sensing (QS). Tout comme la mise en place d'un biofilm, le QS repose sur une notion de forte densité cellulaire. Plus exactement, le QS décrit le phénomène par lequel l'accumulation extracellulaire de molécules signal (aussi appelées autoinducteurs) de faible poids moléculaire, permet à une cellule individuelle de détecter le moment où la densité bactérienne seuil est atteinte pour une action concertée. Le terme de quorum sensing fut utilisé pour la première fois par Fuqua *et al.* (1994). Ce phénomène fut mis en évidence chez la bactérie *V. fischeri*, qui utilise le QS notamment pour exprimer les gènes responsables de la production de bioluminescence lorsqu'elle vit en symbiose dans l'organe lumineux du calmar *E. scolopes* (Visick *et al.*, 2000).

Chez les bactéries à Gram négatif, les autoinducteurs sont capables de diffuser à travers les membranes tandis que la communication bactérienne de type QS chez les bactéries à Gram positif utilise comme molécules signal des peptides qui sont sécrétées par des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette). Lorsque la population bactérienne atteint son seuil, ces peptides sont détectés par un système à deux composants. Le premier composant est un récepteur histidine kinase, qui une fois lié au peptide s'autophosphoryle, puis active par phosphorylation le second composant, une protéine régulatrice qui va alors pouvoir activer la transcription des gènes cibles (Ng et Bassler, 2009). Alternativement, ces peptides peuvent être réimportés et agir en modulant l'activité de régulateurs de transcriptions ou de phosphatases (Monnet *et al.* 2014).

Dans la suite de cette partie, seuls les systèmes de QS présents chez les bactéries à Gram négatif seront développés.

4.2. Le système modèle LuxR/LuxI

Le système LuxR/LuxI, mis en évidence chez *V. fischeri*, fut le premier système de communication bactérienne décrit. Il met en jeu le régulateur transcriptionnel LuxR et la protéine LuxI. LuxI est responsable de la synthèse d'une molécule de communication de type acyl-homosérine lactone (AHL). Lorsqu'une forte densité cellulaire est atteinte, l'AHL se fixe

sur le régulateur LuxR. Le complexe ainsi formé va réguler la transcription de l'opéron *lux* (Figure 14) responsable de la production de bioluminescence par *V. fischeri*.

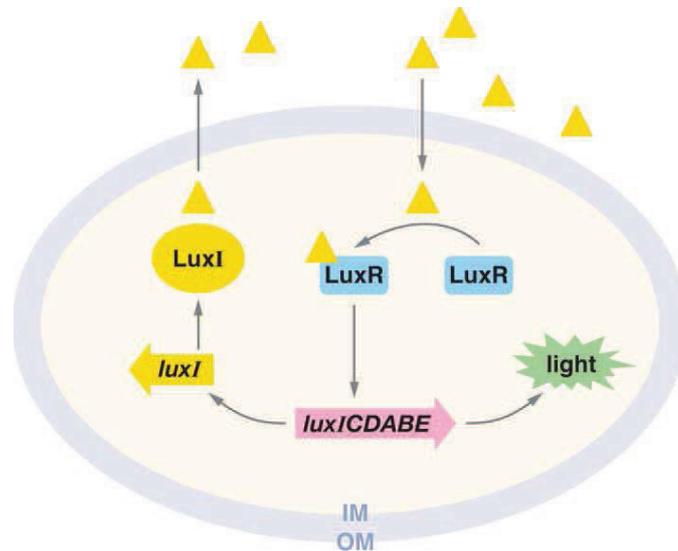


Figure 14 : Système de quorum-sensing LuxRI chez *V. fischeri*. L'autoinducteur synthétisé par LuxI est représenté par des triangles jaunes. IM : membrane interne ; OM : membrane externe. (D'après Waters et Bassler, 2005).

Le complexe LuxR/AHL va également induire l'expression du gène *luxI*, qui fait partie de l'opéron *lux*, créant ainsi un rétrocontrôle positif du signal QS. Ce type de système n'a d'abord été observé que chez les *Vibrio*. Puis, des systèmes fonctionnant sur le même principe que le modèle LuxR/LuxI ont été décrit chez d'autres bactéries à Gram négatif (Fuqua *et al.*, 1996), impliquant des protéines régulatrices et des molécules signal proches.

Toutes les AHL sont composées d'un cycle homosérine lactone (HSL) portant une chaîne acyle dont le nombre de carbones est variable (Fuqua *et al.*, 2001). Les AHL diffèrent par la longueur et le degré d'insaturations de leur chaîne acyle (« R-group » Figure 15), ainsi que par la substitution au niveau d'un des carbones de la chaîne (souvent un groupe hydroxy ou cétone) (Figure 15). Ces variations de la structure des AHL assurent une certaine spécificité de signalisation en fonction des espèces bactériennes (Ng et Bassler, 2009).

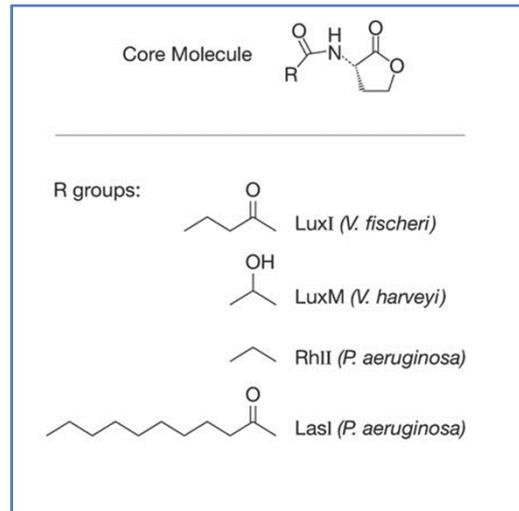


Figure 15 : Exemples d'autoinducteurs bactériens de type acyl-homosérine lactone. (D'après Waters et Bassler, 2005).

4.3. Les systèmes Las et Rhl chez *P. aeruginosa*

Chez la bactérie *P. aeruginosa*, il existe deux systèmes de QS impliquant également des AHL, qui sont les systèmes LasR/LasI et RhlR/RhlI (Figure 16). Ces deux systèmes fonctionnent de manière similaire au système LuxR/LuxI décrit précédemment.

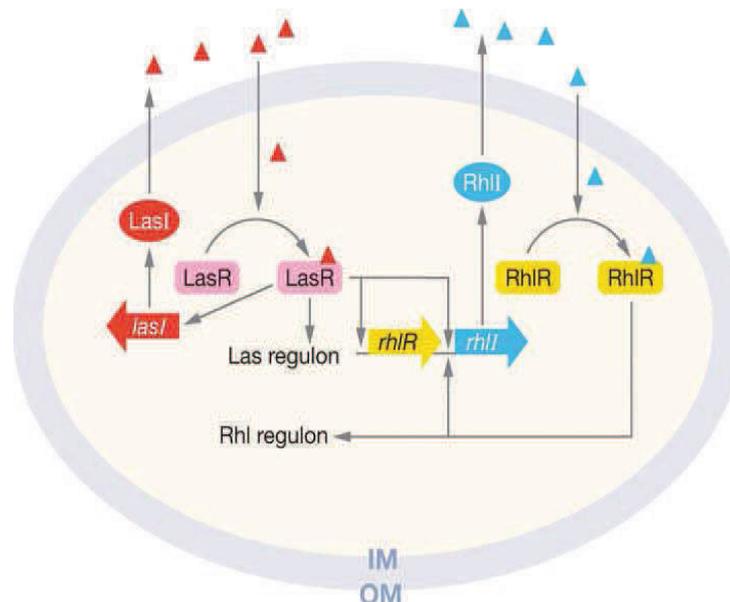


Figure 16 : Systèmes de Quorum-Sensing chez *P. aeruginosa*. Les autoinducteurs LasI et RhlI sont représentés respectivement par des triangles rouges et bleus. IM : membrane interne ; OM : membrane externe. (D'après Waters et Bassler, 2005).

Lorsque la densité de population est suffisante, les molécules signal LasI et RhlI (Figure 15) atteignent des concentrations requises pour l'activation de gènes dépendants des régulateurs LasR et RhlR (Figure 16). Comme dans le modèle LuxR/LuxI, les complexes formés par les régulateurs et leurs AHL vont exercer un rétrocontrôle positif des systèmes ; à la différence que ces deux systèmes fonctionnent en série, c'est-à-dire que le couple LasR/AHL va également induire la transcription des gènes *rhlR* et *rhlI*.

4.4. Le Quorum Sensing chez les *Vibrio*

Bien que des systèmes de QS de type LuxRI semblables à celui présent chez *V. fischeri* aient été retrouvés dans différents genres bactériens, d'autres systèmes de QS ont été identifiés et particulièrement chez des bactéries appartenant au genre *Vibrio*. La plupart des *Vibrio* possèdent plusieurs systèmes parallèles de QS et sont capables de produire, détecter et répondre à de multiples signaux (Henke et Bassler, 2004). Cette capacité à communiquer via plusieurs voies de QS a été découverte pour la première fois chez *V. harveyi*. Cette bactérie marine possède trois voies de signalisation : les systèmes LuxM/LuxN, LuxS/LuxPQ et CqsS/CqsA. Ces systèmes de QS sont les plus répandus chez les bactéries du genre *Vibrio*, ils font intervenir des protéines membranaires histidines kinases comme récepteurs des signaux de QS.

Le système LuxM/LuxN permet la synthèse d'une molécule signal de type AHL (appelée HAI-1) par l'enzyme LuxM, qui ne présente aucune homologie avec les enzymes de type LuxI (Bassler *et al.*, 1993). HAI-1 se lie ensuite au récepteur membranaire histidine kinase LuxN, semblable à ceux présents dans les systèmes de QS des bactéries à Gram positif.

Le deuxième système LuxS/LuxPQ est un des plus répandu chez les bactéries du genre *Vibrio* (Bassler *et al.*, 1994). Il est retrouvé notamment chez *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. anguillarum* et les pathogènes humains *V. cholerae*, et *V. vulnificus* (Milton, 2006), ainsi que chez d'autres bactéries à Gram négatif. La molécule signal associée à ce système est un diester furanosyle borate connu sous le nom de AI-2 (autoinducteur 2), et dont la synthèse nécessite l'enzyme LuxS. AI-2 est lié dans le périplasme par la protéine LuxP ; le complexe LuxP/AI-2 va ensuite interagir avec un autre capteur membranaire histidine kinase LuxQ.

Le système CqsS/CqsA (Figure 17) a d'abord été mis en évidence chez *V. cholerae* (Miller *et al.*, 2002), mais il est également retrouvé chez d'autres bactéries du genre *Vibrio* (Milton, 2006).

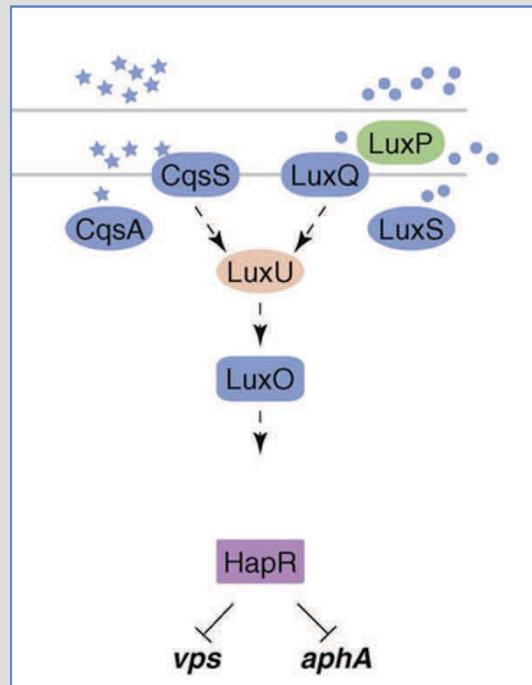


Figure 17 : Systèmes de Quorum Sensing CqsS/CqsA et LuxP/LuxPQ chez *V. cholerae*. Les autoinducteurs CAI-1 et AI-2 sont représentés respectivement par des étoiles et des ronds. (D'après Yildiz et Visick, 2008).

Ce système met en jeu l'enzyme CqsA (pour *cholerae* quorum-sensing autoinducteur) responsable de la synthèse de la molécule signal CAI-1 (*cholerae* autoinducteur 1) (Figure 18) (Higgins *et al.*, 2007) et le récepteur CqsS (*cholerae* quorum-sensing sensor) (Figure 17).

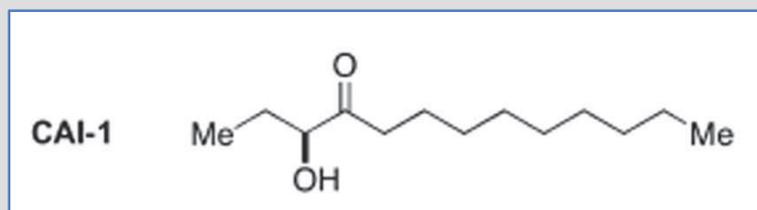


Figure 18 : Structure de la molécule CAI-1 détectée chez *V. cholerae* (D'après Ng *et al.*, 2011).

Les mécanismes de QS chez les *Vibrio* varient par leur complexité ainsi que leur multiplicité au sein d'une même souche (Ng et Bassler, 2009). Tous les systèmes de QS analysés jusque là convergent vers un seul et même régulateur : LuxO. Cependant le nombre

de signaux convergeant vers LuxO diffère selon les espèces de *Vibrio*. La bactérie *V. vulnificus* possède le système le plus simple avec une seule voie de transmission de signal vers LuxO. Enfin, l'agent pathogène *V. cholerae* possède quand à lui deux voies convergeant vers LuxO (Milton, 2006).

4.5. Le rôle du Quorum-Sensing dans la formation de biofilm

La communication bactérienne par des systèmes de QS semble avoir une part non négligeable dans la formation d'un biofilm du fait notamment de son implication dans la régulation de sa croissance, de sa biomasse et de sa robustesse, ainsi que dans le phénomène de dispersion du biofilm.

Les systèmes LasR/LasI et RhIR/RhII, chez *P. aeruginosa* sont notamment impliqués dans la régulation de l'expression de gènes de virulence ou encore dans la formation de biofilm chez ce pathogène opportuniste (Davies *et al.*, 1998). Les auteurs ont ainsi montré que les mutants déficients en molécules signal des deux systèmes de QS sont capables de former un biofilm, mais plus fin et présentant une architecture différente de celle de la souche sauvage. De plus, les biofilms de ces mutants sont plus faciles à décrocher de leur surface par traitement antibactérien.

Plus récemment, des études sur les effets d'inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm montrent l'importance de ces systèmes de communication dans la régulation des gènes impliqués dans la formation de biofilm. O'Loughlin *et al.* (2013) ont mis en évidence que l'utilisation de molécules de synthèses inhibitrices des récepteurs LasR et RhIR chez *P. aeruginosa* entraînait une inhibition de la formation de biofilm. Ces molécules anti-QS font d'ailleurs partie des stratégies prometteuses dans la lutte contre les biofilms.

Le système LuxS/luxPQ régule également de nombreux gènes de virulence et la formation de biofilm. Une étude récente a montré que la mutation des gènes *luxS* et *luxR* réduisait la capacité de la bactérie *V. scophthalmi* à former un biofilm (Garcia-Aljaro *et al.*, 2012). Chez *V. cholerae*, les mutants Δ *cqsA* présentent une augmentation de la formation de biofilm, confirmant ainsi que CAI-1 et par conséquent le système CqsA/CqsS contrôle la formation de biofilm de *V. cholerae* (Zhu et Mekalanos, 2003). Enfin, le rôle du régulateur LitR (homologue de LuxR), dans la formation du biofilm de *V. salmonicida* a été examiné (Hansen *et al.*, 2014).

Chez ce pathogène de poisson, LitR est un répresseur de l'opéron *syp*. Les auteurs concluent que la mutation de *litR*, mimant les conditions de faible densité de population, entraîne la formation d'un biofilm plus épais et très riche en exopolysaccharides, favorisant ainsi la persistance du pathogène.

5. MOLÉCULES À ACTIVITE ANTI-BIOFILM

Parce que les bactéries vivant en biofilms sont plus résistantes aux agents antibactériens, au système immunitaire de l'hôte qu'elles infectent, aux antibiotiques, ou encore aux désinfectants, les biofilms représentent un problème majeur dans le domaine médical, industriel, mais aussi dans l'environnement. En médecine, les biofilms sont impliqués dans 60 à 80% des infections chroniques souvent par leur développement sur les dispositifs médicaux tels que les cathéters, prothèses ou pacemakers (Hall-Stoodley *et al.*, 2004 ; Bjarnsholt, 2013). L'un des cas les plus étudiés dans le domaine médical est la formation de biofilm par *P. aeruginosa* chez des patients atteints de la mucoviscidose, chez qui le traitement des infections par ce pathogène opportuniste est rendu plus compliqué par la présence de celui-ci sous forme de biofilm dans les poumons des malades (Costerton, 2001 ; Høiby *et al.*, 2010). Dans l'industrie agro-alimentaire, le développement de biofilms sur les surfaces au contact des aliments est une source de nombreuses infections d'origine alimentaire (Van Houdt et Michiels, 2010). Enfin, les biofilms sont aussi à l'origine de la formation de salissures marines ou biofouling (accrochage successif de micro puis macro-organismes) sur la coque des bateaux, causant des problèmes économiques et écologiques (Qian *et al.*, 2007 ; Schultz *et al.*, 2011).

Les divers problèmes engendrés par les biofilms ont orienté de nombreuses recherches vers le développement de stratégies anti-biofilms. Dans un souci d'écodéveloppement des moyens de lutte contre les biofilms, l'environnement marin se révèle être une source précieuse et prometteuse de molécules à action anti-biofilm, issues aussi bien de bactéries marines que d'algues ou encore d'éponges.

5.1. Molécules anti-biofilm d'origine marine

La plupart des molécules anti-biofilm décrites dans la littérature présentent également une activité anti-bactérienne (activité bactéricide ou bactériostatique). Actuellement, très peu de composés présentant une activité anti-biofilm sans activité anti-bactérienne sont décrits.

Une des approches actuellement explorée et visant à inhiber la formation de biofilms consiste à utiliser des molécules capables d'interférer avec la communication interbactérienne de type QS (Natrash *et al.*, 2011). Manefield *et al.* (1999) ont identifié chez l'algue rouge *Delisea pulchra* des composés de type furanones halogénés, structurellement similaires aux AHL (N-Acyl homoserine lactone), et capable de perturber les signaux du QS.

Une étude plus récente a montré que l'utilisation de furanones inhibait la formation de biofilm chez *Staphylococcus epidermidis* (Lönn-Stensrud *et al.*, 2009).

Les spongiaires se sont avérées être aussi de potentielles sources de molécules actives contre les biofilms (Stowe *et al.*, 2011). Ces invertébrés marins produisent parmi leurs métabolites secondaires, des composés à activité anti-biofilm. En 2008, (Skindersoe *et al.*) ont montré que des extraits de l'espèce *Luffariella variabilis* agissaient comme inhibiteurs du QS chez des espèces bactériennes à Gram positif ou négatif. À ce jour, deux types de molécules anti-biofilm issues d'éponges ont été répertoriées : les terpénoïdes et les pyrrole-imidazoles. Chez des spongiaires appartenant au genre *Agelas*, un métabolite diterpénoïde a été décrit pour sa capacité à inhiber le biofilm de *Staphylococcus epidermidis* sans affecter la croissance bactérienne (Hertiani *et al.*, 2010).

Les bactéries marines constituent aussi une source de molécules actives contre les biofilms. En effet, de nombreuses souches bactériennes produisent des composés capables d'inhiber la formation de biofilm d'autres bactéries. Thenmozhi *et al.* (2009) ont notamment isolé chez des coraux des bactéries capables d'inhiber la formation de biofilm de souches cliniques de *Streptococcus pyogenes*. Une autre étude a montré qu'une bactérie appartenant au genre *Vibrio* produisait un type d'exopolysaccharide qui était capable d'inhiber la formation de biofilm. Les auteurs ont également décrit que cet exopolysaccharide agissait sur des biofilms préformés d'un large panel de bactéries à Gram négatif et positif, sans toutefois montrer une activité antibactérienne (Jiang *et al.*, 2011). Des surnageants de culture de 12 souches bactériennes marines ont également montré une activité anti-biofilm sur plusieurs espèces de *Vibrio* pathogènes sans altérer la croissance bactérienne (Nithya et Pandian, 2010).

De nombreuses bactéries marines appartenant au genre *Pseudoalteromonas* sont connues pour produire des composés d'intérêt biotechnologique (Holmström et Kjelleberg, 1999 ; Bowman, 2007) comme des composés antibactériens (Hayashida-Soiza *et al.*, 2008) ou encore des molécules anti-biofilm (Klein *et al.*, 2011). Une étude récente a mis en évidence que le surnageant de culture de la souche *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 inhibait la formation de biofilm de plusieurs staphylocoques (Papa *et al.*, 2013). Une étude antérieure avait déjà mis en évidence l'activité anti-biofilm du surnageant de culture de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (Dheilly *et al.*, 2010).

5.2. Activité anti-biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

Pseudoalteromonas sp. 3J6 est une bactérie à Gram négatif isolée en 2003 dans le Golfe du Morbihan sur lame de verre après 6h d'immersion dans l'eau (Grasland *et al.*, 2003). Dheilly *et al.* (2010) ont mis en évidence l'activité anti-biofilm du surnageant de culture de cette bactérie marine. Les auteurs ont notamment montré que le surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}) inhibait le développement de biofilm chez 13 des 18 souches de bactéries marines testées, y compris trois souches du genre *Vibrio* (Klein *et al.*, 2011). Les souches non sensibles comprenaient essentiellement des souches appartenant au genre *Pseudoalteromonas*. Par ailleurs, SN_{3J6} n'a révélé aucune activité anti-bactérienne (ni bactéricide ni bactériostatique) vis-à-vis de bactéries planctoniques (Dheilly *et al.*, 2010), démontrant que son action est spécifiquement anti-biofilm. Son mode d'action non élucidé peut avoir des cibles variées, il a été montré que SN_{3J6} affectait modérément l'adhésion (réduction d'un facteur 2) de deux souches bactériennes appartenant au genre *Parococcus* et *Vibrio*. Une étude ultérieure, sur 10 souches sensibles au SN_{3J6}, a montré qu'il n'y avait pas d'effet significatif du surnageant sur l'adhésion de ces bactéries (Klein, 2011).

L'étude menée par Dheilly *et al.* (2010) a également mis en évidence la prédominance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 dans un biofilm bi-espèces avec d'autres bactéries marines telle que *Vibrio* sp. D01, montrant ainsi son effet négatif sur la croissance bactérienne uniquement en biofilm.

L'activité anti-biofilm du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a récemment été attribuée à un peptide nommé alterocine (Simon, 2014) ; néanmoins le mode d'action précis de cette molécule reste encore non élucidé.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

6. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Concernant *V. tapetis*, de nombreuses études ont visé à comprendre les mécanismes de pathogénicité mis en place lors de l'infection de la palourde japonaise *R. philippinarum* et du développement de la MAB (Paillard, 2004b). Néanmoins, un aspect inexploré de sa pathogénicité subsiste encore : la formation de biofilm chez ce pathogène n'avait encore jamais été étudiée. D'ailleurs, plus généralement, peu de recherches ont été entreprises concernant la formation de biofilm chez des *Vibrio* pathogènes de bivalves (Bjelland *et al.*, 2012 ; Hansen *et al.*, 2014 ; Vezzulli *et al.*, 2014). Il s'agit pourtant d'un genre bactérien très représenté parmi les pathogènes d'organismes marins et de l'Homme. Ceux qui sont impliqués dans des infections chez l'Homme, tel que *V. cholerae*, sont très étudiés pour leur capacité à former des biofilms, mais aussi pour le rôle de ce comportement microbien particulier dans leur virulence.

À travers ces travaux, nous avons voulu établir les premières données concernant la formation de biofilm chez *V. tapetis*, pathogène de la palourde japonaise. Des techniques de microscopie nous ont permis dans un premier temps de caractériser *in vitro* le biofilm de *V. tapetis* et sa composition. Afin de comprendre la place du biofilm dans la pathogénicité de *V. tapetis*, le rôle de paramètres affectant la prévalence de la MAB sur le développement du biofilm a été investigué. La mutagénèse de gènes potentiellement impliqués dans la formation de biofilm a également été entreprise. Cette approche, que nous avons voulue innovante chez *V. tapetis* en réalisant de la mutagénèse par délétion totale d'un gène, a nécessité l'adaptation de protocoles et outils moléculaires déjà existants pour la réalisation de nouveaux mutants de *V. tapetis*.

Enfin, le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) avait isolé la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et mis en évidence dans son surnageant une activité anti-biofilm contre plusieurs espèces bactériennes. Nous nous sommes proposé d'orienter également nos travaux vers le contrôle du biofilm de *V. tapetis*, par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et par son surnageant de culture.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

7. CULTURE BACTERIENNE

7.1. Conditions de culture

Les différentes souches utilisées lors de cette étude (Tableau 3) sont cultivées en milieu liquide ou en milieu solide contenant 1,5% d'agar et conservées à -80°C en glycérol 25%.

Les souches de *V. tapetis* sont cultivées en milieu liquide Zobell (Zobell, 1941) (en g.l⁻¹: tryptone, 4 ; extraits de levure, 1 ; phosphate ferrique, 0,1 ; sea salts, 30) ou en milieu Luria Bertani Salin (LBS, en g.l⁻¹: tryptone, 10 ; extraits de levure, 5 ; NaCl, 20) à 18°C et sous agitation. Au besoin, les milieux peuvent être supplémentés en kanamycine (Km) ou chloramphénicol (Cm) à des concentrations finales respectives de 100 et 4 µg.ml⁻¹. Certaines expériences ont nécessité l'ajout de D-glucose ou L-arabinose à une concentration finale de 0,2%. Pour cela, des solutions mères à 20% sont préparées et stérilisées sur filtre de 0,2 µm de porosité et ajoutées au milieu après autoclavage.

La bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 est cultivée en milieu VNSS (Vätäänen Nine Salt Solution, en g.l⁻¹: peptone de soja, 1 ; extraits de levure, 0,5 ; glucose, 0,5 ; amidon soluble, 0,5 ; FeSO₄.7H₂O, 0,01 ; Na₂HPO₄, 0,01 ; NaCl, 17,6 ; Na₂SO₄, 1,47 ; NaHCO₃, 0,08 ; KCl, 0,25 ; KBr, 0,04 ; MgCl₂.6H₂O, 1,87 ; CaCl₂.2H₂O, 0,41 ; SrCl₂.6H₂O, 0,01 ; H₃BO₃, 0,01) (Mårdén *et al.*, 1985) à 20°C et sous agitation.

Pour les co-cultures liquides de *V. tapetis* CECT4600-GFP et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, les deux souches sont d'abord cultivées séparément en milieu VNSS (supplémenté en Km pour la souche CECT4600-GFP) pendant une nuit, puis lavées deux fois dans de l'eau de mer artificielle stérile (EDMA ; sea salts, 30 g.l⁻¹ [Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO]). Les deux souches sont ensuite co-inoculées dans du milieu VNSS frais et sans antibiotique à une DO₆₀₀ finale de 0,1 pour chaque souche (~2,4 UFC.ml⁻¹ pour chaque souche). Les co-cultures sont effectuées à 18°C et sous agitation.

Pour la croissance de certaines souches d'*E. coli* (Tableau 3), le milieu est supplémenté après autoclavage en DAP (Diaminopimelate) ou thymidine (Thy) à une concentration finale de 0,3 mM à partir de solutions mères à 30 mM stérilisées par filtration (pores de 0,2 µm de diamètre). Les concentrations en antibiotiques (µg.ml⁻¹) utilisées pour *E. coli* sont : Km, 50 ; Cm, 20 ; Tétracycline (Tet), 15. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C à une pression de 1,2 Bar et pendant 20 min.

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées lors de cette étude.

Souche	Caractéristiques / utilisation	Origine	Référence ou provenance
<i>V. tapetis</i>			
CECT4600	Souche sauvage, pathogène de la palourde <i>R. philippinarum</i> .	Landeda, France	Paillard & Maes, 1990 Borrego <i>et al.</i> , 1996
CECT4600-GFP	CECT4600 + pVSV102 (Km ^R , <i>gfp</i>), pathogène de <i>R. philippinarum</i> .		LEMAR collection, Institut Universitaire Européen de la Mer
VTS1	CECT4600Δ <i>cqsA</i>		Cette étude
VT16	CECT4600 <i>djlA</i> ::pSW23T-aphA (Km ^R)		Lakhal <i>et al.</i> , 2008
LP2	Souche sauvage, non pathogène de <i>R. philippinarum</i> . Pathogène du poisson <i>Symphodus melops</i> .	Bergen, Norvège	Jensen <i>et al.</i> , 2003
IS1	Souche sauvage, pathogène de <i>R. philippinarum</i> .	Landeda, France	Paillard & Maes, 1990
GDE	Souche sauvage, non pathogène de <i>R. philippinarum</i> . Pathogène de la palourde <i>Dosinia exoleta</i> .	Iles Glénan, France	LEMAR collection
GTR-I	Souche sauvage, non pathogène de <i>R. philippinarum</i> . Pathogène de la palourde <i>Tapes rhomboides</i> .	Iles Glénan, France	LEMAR collection
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>			
3J6	Isolée sur lame de verre après 6h d'immersion.	Golf du Morbihan, France	Grasland <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i>			
GEB802	<i>lacIQ, thi1, supE44, endA1, recA1, hsdR17, gyrA462, zei298 ::tn10</i> [Tc], <i>ΔthyA ::(erm-pir116)</i> , Ery ^R , Tet ^R , Thy ⁻		F. Le Roux, Station Biologique de Roscoff
GEB848	(F-) <i>RP4-2-Tc::Mu</i> [Km] <i>ΔdapA ::(erm-pir)</i> , <i>gyrA462, zei298 ::Tn10</i> /pGEB12, Ery ^R , Tet ^R , Km ^R , Cm ^R , DAP ⁻		A. Jacq, IGM, Université Paris Sud
GEB872	(F-) <i>RP4-2-Tc::Mu</i> [Km] <i>ΔdapA ::(erm-pir)</i> , <i>gyrA462, zei298 ::Tn10</i> /pSW7848, Ery ^R , Tet ^R , Km ^R , Cm ^R , DAP ⁻		A. Jacq, IGM, Université Paris Sud
GEB883	WT <i>E.coli</i> K12 <i>ΔdapA::erm pir RP4-2, ΔrecA, gyrA462, zei298::Tn10</i> , Ery ^R , Tet ^R , DAP ⁻ . Souche conjugative		A. Jacq, IGM, Université Paris Sud
GEB-S12	GEB883, pGEB12, Ery ^R , Tet ^R , Km ^R , Cm ^R , DAP ⁻		Cette étude
GEB-S34	GEB883, pSW7848Δ <i>cqsA</i> , Cm ^R , DAP ⁻		Cette étude
GEB-S36	GEB883, pSW7848Δ <i>luxS</i> , Cm ^R , DAP ⁻		Cette étude

Km^R, Ery^R, Tet^R, Cm^R : résistance à la Kanamycine, Erythromycine, Tétracycline, Chloramphénicol. DAP : Diaminopimelate ; Thy : Thymidine. Les bactéries sont conservées à -80°C en glycérol 25%. LEMAR : Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin.

7.2. Préparation du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

À partir d'une préculture d'une nuit, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 estensemencée à une DO_{600} de 0,25 et cultivée en milieu VNSS jusqu'à une DO_{600} comprise entre 0,9 et 1,2 (Klein, 2011). La culture est ensuite centrifugée 2 fois à 8000g pendant 10 minutes. Le surnageant de culture, nommé SN_{3J6} dans la suite de ce manuscrit, est filtré (pores de 0,2 μm de diamètre) puis conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

7.2.1. Recherche d'activité antibactérienne de SN_{3J6} contre *V. tapetis*

L'activité antibactérienne de SN_{3J6} a été testée vis-à-vis de cellules planctoniques de *V. tapetis* CECT4600. La méthode consiste à incuber des bactéries en phase stationnaire de croissance en présence de SN_{3J6} ou de VNSS pour le témoin. Pour cela, à partir de 10 ml d'une culture de *V. tapetis* CECT4600 en phase stationnaire, deux fois 5 ml de culture sont centrifugés à 4000g pendant 10 min. Le surnageant est remplacé par 5 ml de SN_{3J6} et par 5 ml de VNSS pour le témoin. Les cellules sont remises en suspension et incubées pendant 4h à 4°C pour éviter toute croissance bactérienne. Les dilutions 10^{-4} à 10^{-6} sont ensuite étalées sur milieu VNSS gélosé. Un dénombrement est réalisé après 48h d'incubation des géloses à 18°C.

7.3. Formation de biofilm

7.3.1. Mise en place du système

Les biofilms des différentes souches de *V. tapetis* sont formés en conditions dynamiques dans un système de chambre à flux (FC, Flow Cell) (Pamp *et al.*, 2009 ; Tolker-Nielsen et Sternberg, 2011) et à 18°C (Figure 19). La FC est une chambre à flux à trois canaux (1 x 40 x 44 mm ; Biocentrum, DTU, Danemark) sur laquelle une lamelle en verre (24 x 50 mm ; Knittel Glass, Braunschweig, Allemagne) (Figure 19) est collée à l'aide d'une colle silicone neutre (Clear Super Silicone Sealant, 3M, St-Paul, MN, États-Unis). La FC permet la formation dynamique de biofilm par l'écoulement continu d'un flux laminaire. Pour cela, le système est alimenté de façon continue en milieu de culture à l'aide d'une pompe péristaltique (Watson Marlow 205 U, Falmouth, Royaume Uni). Des pièges à bulles (Biocentrum, DTU) sont placés en amont de la FC afin de capter les éventuelles bulles d'air qui viendraient détériorer le biofilm en formation. Le système est stérilisé à l'eau de Javel 0,5% pendant au moins 30 minutes puis une solution d'EDMA est passée dans le montage durant toute une nuit afin d'éliminer toute trace de Javel.

7.3.2. Adhésion des bactéries et formation de biofilm

Le milieu de culture est relié au montage de manière stérile juste avant l'inoculation de la FC. Une fois le système rempli, le flux est stoppé et les tuyaux en amont de la FC sont clampés. L'inoculum est préparé à partir d'une culture de nuit centrifugée (4000g pendant 10 min) et ramenée à une DO_{600} de 0,1 dans de l'EDMA stérile. Pour la formation de biofilms bi-espèces de *V. tapetis* CECT4600-GFP et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, les deux souches sont co-inoculées à une DO_{600} de 0,1 chacune ($\sim 2,4 \cdot 10^7$ UFC.ml⁻¹ pour chaque souche). 300 µl de suspension bactérienne sont injectés dans chaque canal à l'aide d'une seringue. Les tubes en aval de la FC sont clampés et de la colle silicone (Clear Super Silicone Sealant, 3M) est immédiatement appliquée sur les tubes pour boucher les trous laissés par les piqûres.

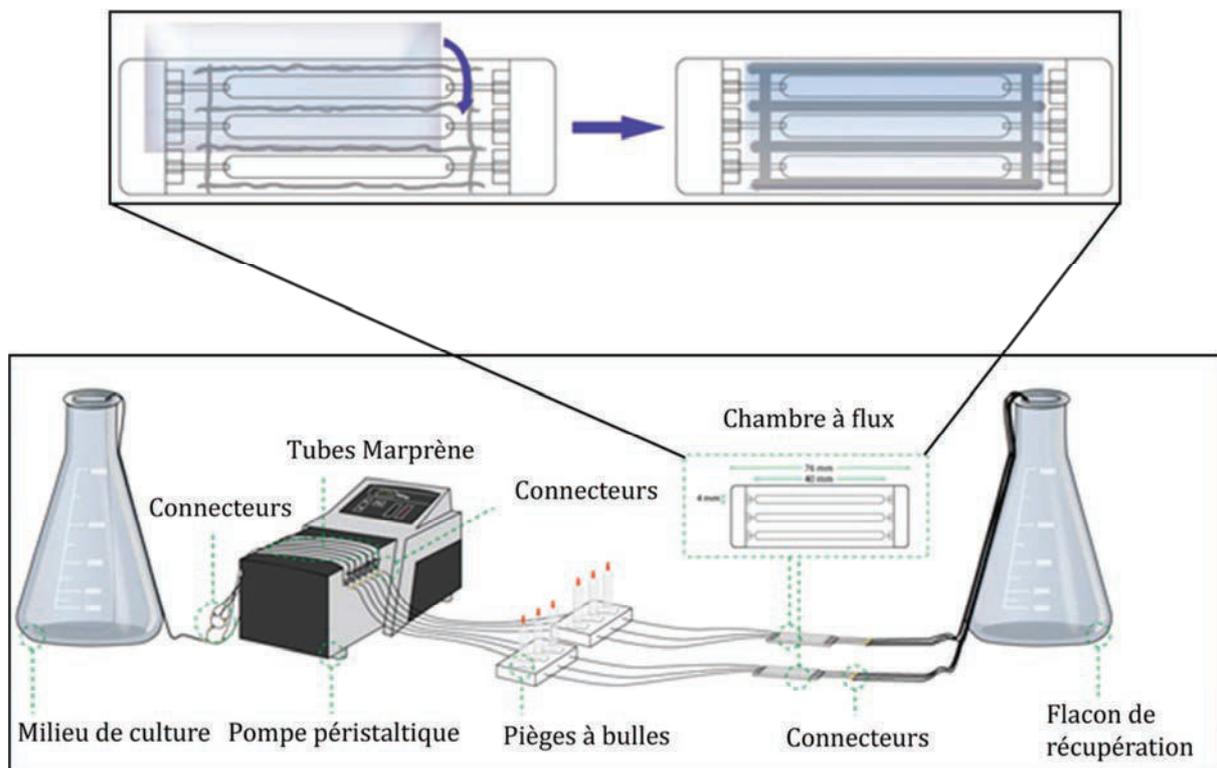


Figure 19 : Système de formation de biofilm en chambre à flux (Weiss Nielsen *et al.*, 2011).

Les FC sont retournées afin de favoriser l'adhésion des bactéries sur la lame de verre. L'étape d'adhésion est ainsi réalisée en condition statique pendant 2h à 18°C. Après les 2h d'adhésion, les clamps en amont et en aval de la FC sont ouverts et un flux de milieu de culture (2,5 ml.h⁻¹) est appliqué pendant 15 minutes afin d'éliminer les bactéries planctoniques ou faiblement adhérentes. L'adhésion bactérienne est observée en contraste de phase au

microscope confocal à balayage laser (MCBL, Leica Microsystems, Heidelberg, Allemagne) avec un objectif à immersion à huile de grossissement x63. L'adhésion bactérienne est quantifiée en estimant le pourcentage de recouvrement de la surface à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health, MD). La formation de biofilm se fait sous un flux de milieu de culture ($2,5 \text{ ml.h}^{-1}$) pendant 24 à 48h.

7.3.3. Effet de molécules anti-biofilm

Dheilly *et al.* (2010) ont mis en évidence l'activité anti-biofilm du surnageant de culture d'une bactérie marine : *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Cette activité inhibitrice de biofilm est attribuée à un peptide récemment nommé Alterocine (Simon, 2014). Cet effet anti-biofilm a ici été vérifié contre *V. tapetis* CECT4600. Trois stratégies différentes ont été choisies pour étudier l'activité anti-biofilm : (i) la formation de biofilm bi-espèces (décrit § 7.3.2), (ii) le conditionnement de surface par le surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, et (iii) le traitement par SN_{3J6} d'un biofilm préformé.

7.3.3.1. Conditionnement du support par SN_{3J6}

Préalablement à la formation de biofilm en FC (décrit § 7.3.2), un conditionnement du support (lamelle de verre) est réalisé (Dheilly *et al.*, 2010). Pour cela, une fois le système rempli de milieu et avant l'étape d'adhésion des bactéries, le flux est stoppé, 250 μl de SN_{3J6} sont injectés dans le canal de la FC, puis les « stop-flux » sont fermés. Le conditionnement se fait pendant 2h à température ambiante. Le flux est ensuite appliqué pendant 15 min pour éliminer les molécules non adsorbées et toute trace de SN_{3J6}. L'inoculation de la FC, l'adhésion et la formation de biofilm se font ensuite suivant la procédure décrite § 7.3.2.

7.3.3.2. Traitement d'un biofilm préformé

Après avoir cultivé un biofilm de 48h (§ 7.3.2), le flux est coupé et les tuyaux en amont de la FC sont clampés. 250 μl de SN_{3J6} sont injectés très délicatement dans les canaux de la FC, de façon à ne pas détériorer mécaniquement le biofilm. Les « stops-flux » en aval de la FC sont immédiatement fermés et le trou laissé par la piqûre est rebouché par de la colle silicone (Clear Super Silicone Sealant, 3M). Le traitement se fait pendant 2h à 18°C. Le flux est de nouveau appliqué pendant 15 minutes afin d'éliminer les cellules qui se seraient détachées du biofilm sous l'action du traitement.

8. MICROSCOPIE

8.1. Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL)

La formation de biofilm réalisée en FC est visualisée au microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP2 (Leica Microsystems). Pour le marquage des biofilms, le flux est stoppé et les clamps en amont sont fermés, 300 µl de fluorochromes sont injectés très délicatement dans chaque canal puis les clamps en aval sont fermés. Le marquage se fait pendant 15 min à l'obscurité, puis le flux est remis pendant 15 minutes afin de rincer l'excédent de fluorochrome. La structure du biofilm est examinée par détection de fluorescence sous l'objectif à immersion x63. À l'aide du logiciel Leica LAS AF (Leica Microsystems), des prises de vue sont réalisées dans les différentes couches du biofilm permettant ainsi une reconstitution tridimensionnelle ; au minimum 3 prises de vue sont réalisées en des points différents d'un même canal de la FC. Les fichiers de chaque prise de vue sont ensuite analysés par le logiciel COMSTAT (<http://www.imageanalysis.dk/>) (Heydorn *et al.*, 2000), trois prises de vue d'au moins deux expériences indépendantes sont analysées, permettant de déterminer les épaisseurs moyennes et maximales des biofilms ainsi que le biovolume bactérien.

La souche de *V. tapetis* CECT4600-GFP possède le plasmide pVSV102 portant le gène *gfp* codant pour une protéine fluorescente, la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette dernière est excitée à une longueur d'onde de 488 nm et l'émission est recueillie entre 500 et 550 nm. Pour l'observation des autres souches, un marqueur intercalant fluorescent, le SYTO 9 green (λ excitation = 485-486 nm ; λ émission = 498-501 nm) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Etats-Unis) est utilisé à 5 µM et permet le marquage des acides nucléiques de toutes les cellules, visualisées alors en vert.

La présence d'exopolysaccharides β 1-3 et β 1-4 dans la matrice extracellulaire du biofilm est observée par un marquage à l'aide de 100 µM de Calcofluor White (Chen *et al.*, 2007) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis). Le Calcofluor White est excité à 400 nm et sa fluorescence est détectée entre 410 et 450 nm. L'utilisation de DDAO (7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2one) (Invitrogen) à 5 µM permet de marquer l'ADN extracellulaire présent dans la matrice (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Pour tester l'intégrité membranaire des cellules, un mélange de 5 µM de SYTO 9 green et 0,3 µM d'iodure de propidium (IP) est utilisé (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen), l'IP ne

pouvant traverser les membranes que lorsqu'elles sont endommagées. L'IP et le DDAO sont excités respectivement à 543 et 633 nm et leurs fluorescences sont récoltées à 565 et 660 nm.

8.2. Microscopie Électronique

À partir de biofilms formés en FC, des observations en microscopie électronique peuvent également être réalisées. Dans ce cas, la FC utilisée est refermée avec une lame de verre (26 x 76 mm ; Knittel Glass) prédécoupée au diamant en 3 sections par canal d'environ 5 x 5 mm, ce qui permet de casser facilement la lame après la formation du biofilm. La formation de biofilm se fait ensuite comme décrit § 7.3.

8.2.1. Microscopie Électronique à Balayage (MEB)

Après formation du biofilm, la lame de verre de la FC est cassée et les fragments de lame sont stérilement décollés de la FC et rincés dans de l'EDMA stérile. Les échantillons sont ensuite fixés pendant une nuit dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% préparée dans du PBS marin (en g.l⁻¹: NaCl, 28,6 ; KH₂PO₄, 0,2 ; Na₂HPO₄, 1,15 ; KCl, 0,86) pH 7,3. Après la fixation, les échantillons subissent 3 lavages de 10 min dans du PBS marin pH 7,3 et sont ensuite progressivement déshydratés dans des solutions d'éthanol de plus en plus anhydres (50%, 70%, 95% et 100%) par 3 bains de 10 min à chaque fois. Les échantillons sont ensuite déshydratés par la méthode du point critique, méthode qui consiste à remplacer l'éthanol absolu par du CO₂ gazeux à l'aide d'un 3AL-TEC CDp030 Critical Point Dryer (Bal-Tec, Bondoufle, France). Les fragments sont ensuite montés sur des plots en aluminium, métallisés à l'or pendant 120s à 20 mA ((Edwards Pirani, West Sussex, United Kingdom) et observés au microscope électronique à balayage JEOL 6460LV (JEOL Ltd. Tokyo, Japan) à des grossissements de x1000 à x20000.

8.2.2. Microscopie Électronique à Transmission (MET)

Les fragments de lame de verre sont stérilement décollés de la FC et rincés dans de l'EDMA stérile. Les cellules détachées du biofilm se trouvant dans le canal de la FC sont également récupérées stérilement et centrifugées 10 minutes à 4000g. Les échantillons sur lame de verre et les culots bactériens sont ensuite fixés pendant une nuit dans une solution de glutaraldéhyde 2,5% préparée dans du PBS marin pH 7,4. Après la fixation, les échantillons sont rincés par 2 bains de 30 min à 4°C en cacodylate de sodium 0,1 M préparé en EDMA stérile ; ils subissent ensuite une post-fixation dans une solution de tétroxyde d'osmium 1%

en solution de cacodylate de sodium 0,1 M pendant 1h à 4°C. Les fragments de lame de verre sont ensuite rincés dans 2 bains d'éthanol 70% à 4°C pendant 30 min, puis progressivement déshydratés dans des solutions d'éthanol de plus en plus anhydres (70%, 95% et 100%) par 2 bains de 30 min à 4°C. L'inclusion des échantillons en résine se réalise progressivement dans une série croissante (25%, 50%, 75% et 100%) de milieu d'inclusion à faible viscosité Spurr (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) en éthanol suivie par une polymérisation à 70°C pendant 8h (Spurr, 1969). Les blocs polymérisés sont coupés en sections de 50 nm à l'aide d'un ultra microtome Leica Reichert Ultracut S (Leica Microsystems). Les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle 5% préparé dans du méthanol et au citrate de plomb 0,25% avant d'être observées au microscope électronique à transmission JEOL 100CX (JEOL Ltd.).

9. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

9.1. Extraction d'ADN

À partir d'une culture de nuit en milieu liquide, l'ADN génomique est extrait à l'aide du kit « PureLink Genomic DNA » (Invitrogen). Pour les réactions de PCR, l'ADN chromosomique peut être également préparé à partir d'une colonie bactérienne récupérée sur gélose. Pour cela, la colonie est resuspendue dans 200 µl d'eau ultra pure stérile et centrifugée 1 minute à 10000g. Le culot bactérien est séché, chauffé à 95°C pendant 5 minutes et repris dans 100 µl d'eau ultra pure stérile, cette préparation servant de matrice pour les réactions de PCR.

Les extractions d'ADN plasmidique se font selon la méthode de la lyse alcaline adaptée de Birnboim et Doly (1979). Les échantillons sont repris dans 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) (Biosolve, Dieuze, France). Pour les plasmides à faible nombre de copies, les extractions se font à l'aide du kit « QIAGEN Plasmid midi kit » suivant les consignes du fournisseur (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Les différents plasmides utilisés ou construits lors de cette étude sont indiqués dans le tableau 4.

Certaines expériences ont nécessité de concentrer les échantillons d'ADN. Pour cela, les acides nucléiques sont précipités par addition d'acétate de sodium (0,3 M finale ; pH 5,2) et 2 volumes d'éthanol absolu froid (Sambrook *et al.*, 1989).

Tableau 4 : Plasmides utilisés lors de cette étude.

Plasmide	Caractéristiques	Référence ou provenance
pSW7848	Plasmide suicide chez <i>V. tapetis</i> pour échange allélique - <i>oriV_{R6Kγ}</i> , <i>oriT_{RP4}</i> , <i>araC-P_{BAD}-ccdB</i> Cm ^R . Réplicatif chez <i>E.coli</i> GEB	Val <i>et al.</i> , 2012
pGEB12	Plasmide conjugatif et réplicatif chez <i>V. tapetis</i> et <i>E.coli</i> GEB, dérivé de pSU18, <i>oriT_{RP4}</i> , Cm ^R	A. Jacq, IGM, Université Paris Sud
pSW-S34	Plasmide suicide chez <i>V. tapetis</i> , pSW7848Δ <i>cqsA_{Vt}</i> . Réplicatif chez <i>E. coli</i> GEB	Cette étude
pSW-S36	Plasmide suicide chez <i>V. tapetis</i> , pSW7848Δ <i>luxS_{Vt}</i> . Réplicatif chez <i>E. coli</i> GEB	Cette étude

Cm^R : Résistance au chloramphénicol. Vt : *Vibrio tapetis*. Tous les plasmides sont conservés à -20°C.

9.2. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

Les amorces utilisées pour l'amplification des plasmides et des fragments à cloner sont choisies à l'aide de l'outil « NEBuilder for Gibson Assembly » (nebuilder.neb.com; New England BioLabs) et les T_m sont calculés spécifiquement pour chaque ADN polymérase à l'aide de l'outil « NEB T_m Calculator » www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator ou à l'aide de « Thermo Scientific T_m Calculator » www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/. Tous les oligonucléotides utilisés lors de cette étude sont listés dans le tableau 5.

Les PCR de routine sont réalisées dans un volume réactionnel final de 50 µl comprenant : du tampon 10X DreamTaq (Thermo Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de chaque dNTP (New England BioLabs, Ipswich, MA, Etats-Unis), 0,5 µM de chaque amorce (Eurogentec, Liège, Belgique), environ 10 ng d'ADN matrice ou 1 µl d'ADN préparé à partir d'une colonie (cf. § 9.1) et 1,25 unité de DreamTaq DNA polymérase (Thermo Scientific). Pour certaines réactions difficiles ou nécessitant un faible taux d'erreur, les PCR se font avec 1 unité de Q5 High-Fidelity DNA polymerase suivant les consignes du fournisseur (New England BioLabs).

Tableau 5 : Amorces oligonucléotidiques utilisées lors de cette étude.

Amorce	Séquence (5' - 3')	Cible
VT16S-F VT16S-R	CGA-GCG-GAA-ACG-AGA-AGT-AG GGA-TGC-ACG-CTA-TTA-ACG-TAC-A	ARN 16S _{Vt}
pSW7848-F pSW7848-R	CAC-TGT-CCC-TTA-TTC-GCA-CCT GGT-TGT-GAA-GAA-AAA-GTG-AAT-GAT	pSW7848
* pSW_cqsAup_F * cqsAup_R	ATA-AGC-TTG-ATA-TCG-AAT-TCG-GTT-TCG-TCC-GTT-CTG-TG AGT-TGT-AAC-TTT-TTT-AGT-ACT-CAT-TTT-AAG-AAT-AAT-GTA-ATG	Région amont de <i>cqsA</i> _{Vt}
* cqsAdown_F * pSW_cqsAdown_R	GTA-CTA-AAA-AAG-TTA-CAA-CTT-ATT-AAT-ATA-AAG-AAA-AGG-TAC CAT-AAT-TGG-TAA-CGA-ATC-AGG-CAA-AAT-TCC-AGC-TCA-ATA-TTC	Région aval de <i>cqsA</i> _{Vt}
cqsA-F cqsA-R	GCC-GAG-CGG-TTC-CAT-TAT-CT CGC-AGC-AAG-ATT-CAC-CTT-GA	<i>cqsA</i> _{Vt}
* pSW_luxSup_F * luxSup_R	ATA-AGC-TTG-ATA-TCG-AAT-TCC-TGG-CAT-GAC-AAT-TGG-GA TTA-AGC-TCT-TGG-TAT-TCC-TTC-TCC-TAA-CTC-TAT-TTT-AAT-TC	Région amont de <i>luxS</i> _{Vt}
* luxSdown_F * pSW_luxSdown_R	AAG-GAA-TAC-CAA-GAG-CTT-AAG-GTT-TAA-GTG-C CAT-AAT-TGG-TAA-CGA-ATC-AGA-AAT-TGT-TGA-TAT-TGC-TCG	Région aval de <i>luxS</i> _{Vt}
luxS-F luxS-R	TAT-GTG-GCA-GAA-GGG-AAA-CC TTA-TGC-TCA-GGC-TCA-AGA-CC	<i>luxS</i> _{Vt}
* pSW_pilCup_F * pilCup_R	AAG-CTT-GAT-ATC-GAA-TTC-GAA-GAG-AGT-TAT-CGT-ATT-CGC-ATG CTC-TGT-ATC-CGG-GTG-CCC-TTA-TAG-GAA-TAG	Région amont de <i>pilC</i> _{Vt}
* pilCdown_F * pSW_pilCdown_R	GGC-ACC-CGG-ATA-CAG-AGA-CAA-CGC-CG TAA-TTG-GTA-ACG-AAT-CAG-TTG-CTA-TGA-TAT-CAG-CAT-CAA-C	Région aval de <i>pilC</i> _{Vt}
pilA-F pilA-R	AAA-ACT-CTG-GCA-ACG-TGA-CG CAC-AAA-GCA-GTT-GAC-CGT-TTT	<i>pilC</i> _{Vt}
* pSW_sypCup_F * sypCup_R	AAG-CTT-GAT-ATC-GAA-TTC-TAA-CAA-CGT-GAA-ATT-TCT-TG TTA-GTA-CTA-TTG-AAG-GTT-TAG-TAA-CGA-TCA-TG	Région amont de <i>sypC</i> _{Vt}
* sypCdown-F * pSW_sypCdown_R	AAA-CCT-TCA-ATA-GTA-CTA-ATA-GGA-GCT-CTG-TAA-TGA-TG TAA-TTG-GTA-ACG-AAT-CAG-TGG-TCA-ATG-TTG-GAT-GTT-TG	Région aval de <i>sypC</i> _{Vt}
sypC-F sypC-R	TCG-CGT-CTC-GAC-ATC-ATC-AA GGT-GAC-GGC-AAG-TTG-CAT-AT	<i>sypC</i> _{Vt}

Les amorces précédées d'un astérisque (*) ont été choisies à l'aide de l'outil « NEBuilder for Gibson Assembly » et spécifiquement dessinées pour une utilisation en vue d'un clonage par la méthode « Gibson Assembly ». Vt : *Vibrio tapetis*. Toutes les amorces sont conservées à -20°C.

La réaction de PCR est ensuite réalisée dans un T100 Thermal Cycler (Biorad, Hercules, CA, Etats-Unis), avec une première étape de dénaturation de l'ADN de 10 minutes à 95°C, 35 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 1 minute à 95 °C, une étape d'appariement des amorces de 1 minute à la température d'appariement spécifique des amorces et une étape d'élongation à 72°C dont la durée varie selon la longueur du fragment à amplifier et la vitesse de polymérisation de l'enzyme utilisée (30 secondes minimum à 1 minute par kb), enfin un cycle d'élongation finale de 10 minutes termine la réaction pour limiter les élongations incomplètes.

Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés par électrophorèse en gel d'agarose 0,8% (Invitrogen) dans un tampon TAE 1X (Tris HCl 40 mM, acétate de sodium 20 mM, EDTA 10 mM pH 7,9) (Biosolve). La migration se fait dans un système d'électrophorèse RunOne (Embi Tec, San Diego, CA, Etats-Unis) pendant 35 minutes à 50 V. La révélation des bandes est réalisée par fixation de bromure d'éthidium (BET, Invitrogen) sur l'ADN et observation sous UV (Vilber Lourmat, Collégien, France). Le marqueur de taille moléculaire (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen) permet de déterminer la taille de fragments de 0,1 à 12 kb.

Les fragments séparés par électrophorèse peuvent être purifiés sur gel à l'aide du kit « PureLink Quick Gel Extraction » (Invitrogen). La concentration et la pureté des échantillons d'ADN sont évaluées par calcul du rapport DO_{260}/DO_{280} par NanoQuant (Tecan, Männedorf, Suisse).

9.3. Clonage

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont purifiés, en vue d'un clonage, avec le kit « PureLink PCR purification » (Invitrogen) ; le clonage par la méthode du « Gibson Assembly » nécessite que les plasmides soient également amplifiés par PCR et purifiés sur gel. Les clonages sont effectués par la méthode d'assemblage isothermale de fragments d'ADN multiples, développée par Gibson *et al.* (2009) (Figure 20).

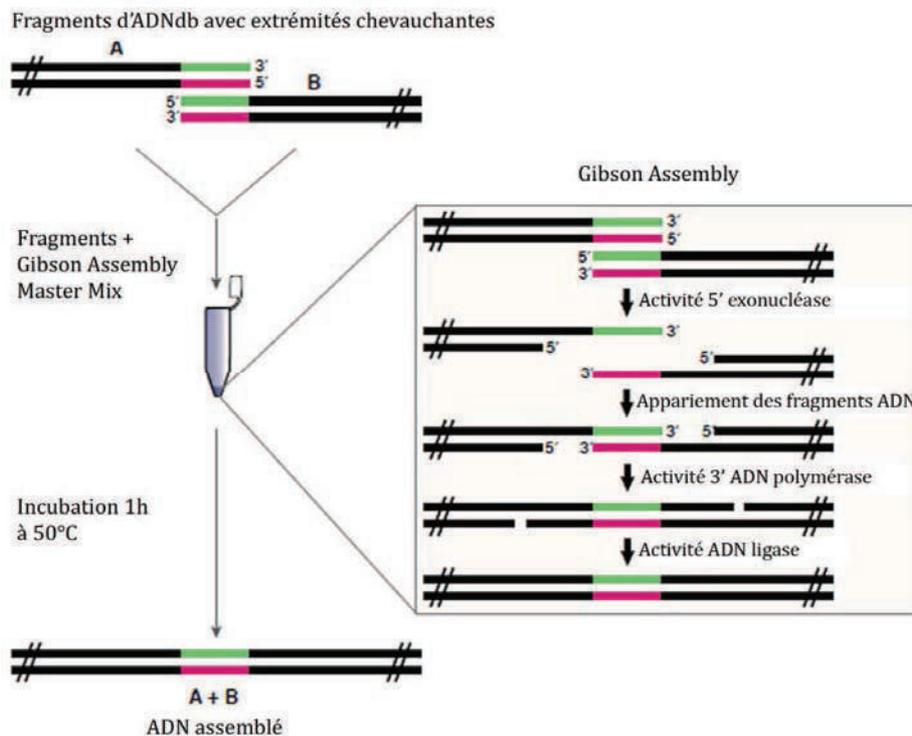


Figure 20 : Principe du clonage par « Gibson Assembly » (D'après Gibson *et al.*, 2009).

9.4. Séquençage

Le séquençage des produits clonés et des produits PCR est réalisé par la société Beckman Coulter Genomics (www.cogenicsonline.com). L'analyse des séquences est effectuée en les comparant aux séquences de la base de données MaGe (www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/) à l'aide du logiciel SerialCloner (©Franck Perez [SerialBasics]).

9.5. Transformation

9.5.1. Chimique

La transformation chimique est réalisée à partir de bactéries compétentes préparées par la méthode au chlorure de calcium (Oishi & Cosloy, 1972), par centrifugations successives (10 minutes à 4000g) à froid (4°C) dans une solution de CaCl₂ 50 mM stérile et froide. 100 µl de cellules compétentes de la souche *E. coli* GEB883 sont transformées avec 5 µl de produit de clonage obtenu par le Gibson assemblage (soit environ 50 ng de vecteur). Après 30 minutes d'incubation dans de la glace, les cellules subissent un choc thermique à 42°C pendant 1 minute et sont replacées immédiatement dans la glace pendant 1 minute. 1 ml de milieu LB (supplémenté en DAP 0,3 mM) est ajouté et les cellules sont incubées 2h à 37°C sous agitation. 100 µl de produit de transformation sont étalés sur gélose sélective, le reste est centrifugé (10 minutes à 4000g) et repris dans 100 µl de milieu et également étalé sur gélose sélective.

9.5.2. Électrique

Les cellules électrocompétentes d'*E. coli* GEB802 sont préparées par la méthode de Dower *et al.* (1988) consistant à laver et concentrer plusieurs fois les cellules dans du glycérol 10% par centrifugations successives (10 minutes à 4000g) à froid (4°C). Les produits de clonage ou plasmides sont introduits dans des souches d'*E. coli* par électroporation (Genepulser, Biorad). 1 µl de produit de clonage ou 10 ng de plasmides sont ajoutés à froid à 50 µl de cellules compétentes dans une cuve d'électroporation (1 mm de distance inter-électrodes, Eurogentec) préalablement refroidie. Le choc thermique est réalisé à 1,8 kV, la constante de temps en résultant étant de 4 à 5 ms. 1 ml de milieu LB (supplémenté en Thy 0,3 mM) est ajouté et l'ensemble est incubé pendant 2h à 37°C sous agitation. 100 µl de produit de transformation sont étalés sur gélose sélective, le reste est centrifugé (10 minutes à 4000g) et repris dans 100 µl de milieu et également étalé sur gélose sélective.

9.5.3. Conjugaison

La souche donneuse (*E. coli* GEB883) et la souche receveuse (*V. tapetis* CECT4600) sont cultivées séparément à respectivement 37°C en milieu LB et 18°C en milieu LBS, jusqu'en phase exponentielle (DO_{600} respectives de 0,4 et 0,5). À ce stade, 7 ml de la culture de *V. tapetis* sont centrifugés 10 minutes à 4000g et le culot est repris avec 250 µl de LBS. De la même manière, 1 ml de la souche donneuse est centrifugé et le culot est resuspendu dans 100 µl de LBS.

Cette méthode de conjugaison biparentale, inspirée de Lakhal *et al.* (2008), se fait sur milieu gélosé LBS supplémenté en DAP à 0,3 mM ; pour cela 50 µl de la préparation de souche receveuse et 10 µl de la préparation de souche donneuse sont déposés sur filtre de nitrocellulose de diamètre 2,5 cm (Whatman, GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) placé sur le milieu gélosé et le tout est incubé à 18°C pendant 24h. Le lendemain, les bactéries sont reprises dans 1 ml de LBS et les dilutions 10^{-1} à 10^{-3} sont étalées sur une gélose LBS sélective puis incubées à 18°C.

9.6. Technique de mutagenèse chez *V. tapetis*

9.6.1. Mutagenèse par double recombinaison homologue

Cette technique repose sur le phénomène de double échange allélique (crossing-over), et permet la délétion d'un gène chromosomique à l'aide d'un plasmide suicide construit à partir du vecteur, pSW7848 (Tableau 4). Les plasmides suicides utilisés pour la mutagenèse dirigée sont construits par la méthode du clonage isothermale « Gibson Assembly » décrit § 9.3. Les parties en amont (appelée partie « up ») et en aval (partie « down ») du gène à déléter sont amplifiées par PCR, en utilisant les amorces spécifiquement dessinées pour le clonage par la technique du « Gibson Assembly » (Tableau 5) et clonées dans le vecteur pSW7848 (Figure 21).

Le vecteur suicide pSW7848 possède un gène codant pour la toxine CcdB placé sous le contrôle du promoteur P_{BAD} , inductible par l'arabinose et répressible par le glucose. Les plasmides construits par clonage dans pSW7848 (Tableau 4) sont d'abord introduits dans la souche conjugative *E. coli* GEB883, capable de répliquer pSW7848, puis dans *V. tapetis* CECT4600 par conjugaison (cf. § 9.5.).

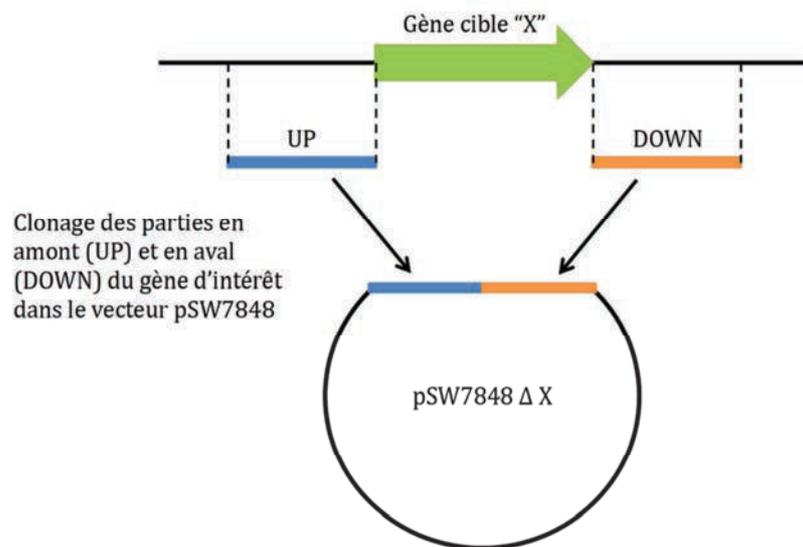


Figure 21 : Schéma de la construction du plasmide suicide utilisé pour la mutagenèse dirigée.

Le vecteur pSW7848 (Cm^R) n'étant pas répliquatif chez *V. tapetis*, seul un évènement de recombinaison homologue dans l'une des régions flanquantes (« up » ou « down ») du gène cible permet l'apparition de clones de *V. tapetis* résistants au chloramphénicol. La première recombinaison permet l'intégration du plasmide suicide dans le génome (Figure 22-I) et est effectuée en présence de glucose (0,2%) afin de réprimer le promoteur P_{BAD} et d'éviter la production de la toxine CcdB.

Les transconjugants de *V. tapetis* sont donc discriminés sur milieu gélosé sélectif (Cm 4 µg.ml⁻¹) supplémenté en glucose et sans DAP, la souche donneuse GEB883 étant incapable de se développer en absence de DAP. Les clones simples recombinants possèdent encore une version intègre du gène cible, reconstituée par l'intégration du plasmide dans le génome. Une deuxième recombinaison homologue est alors nécessaire. Celle-ci est forcée par l'ajout dans le milieu d'arabinose (0,2%). L'arabinose induit le promoteur P_{BAD} et la transcription du gène *ccdB*, toxique pour la bactérie, favorisant ainsi la deuxième recombinaison qui excisera le plasmide du chromosome. Celle-ci entraîne l'apparition de deux types de clones : des clones au génotype « mutant » ou des clones au génotype « sauvage » (Figure 22-II).

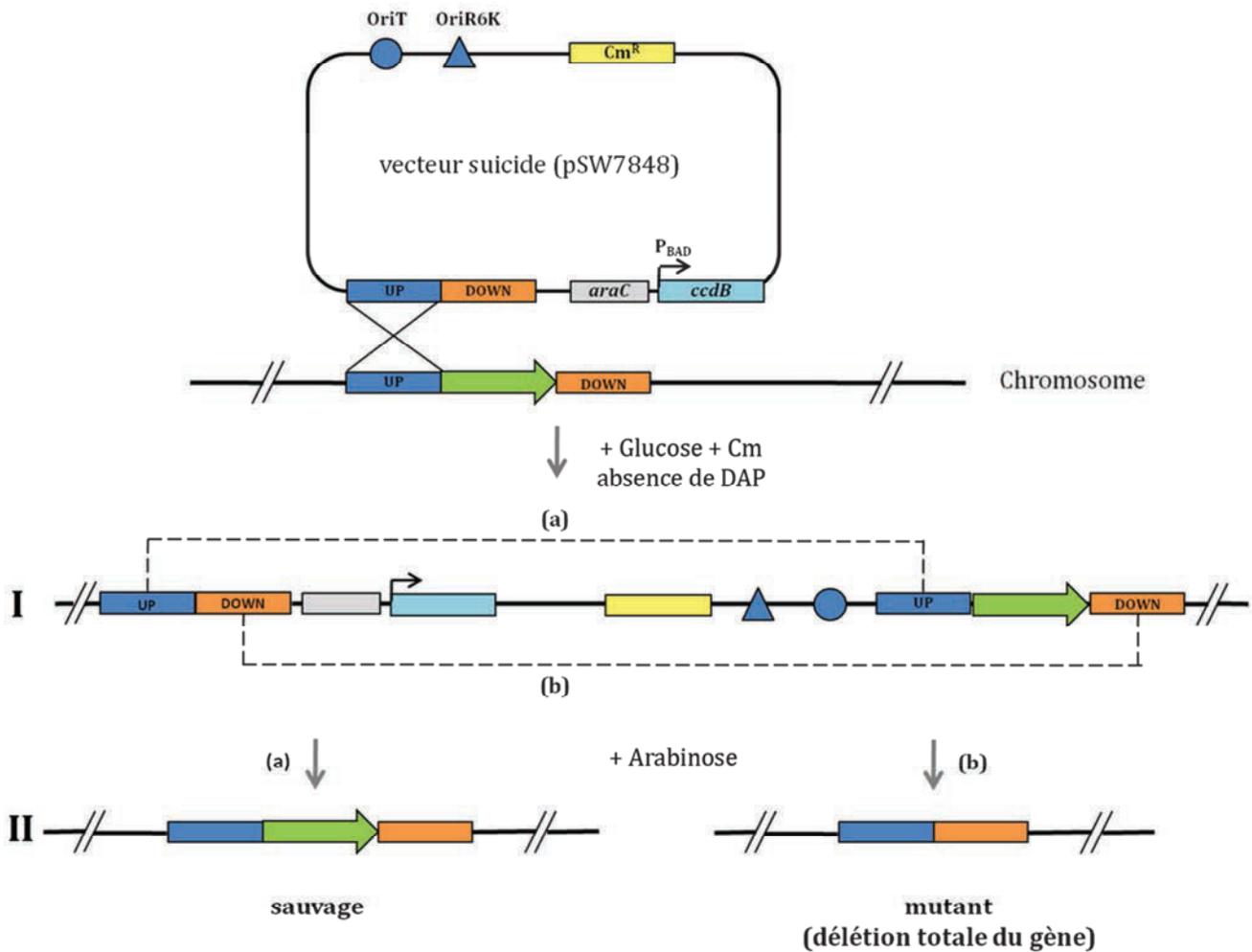


Figure 22 : Principe de la mutagenèse dirigée du gène *cqsA* chez *V. tapetis* par double recombinaison homologue. I: première recombinaison homologue; II: deuxième recombinaison homologue; Cm: chloramphénicol; *araC*: gène codant pour le régulateur AraC; *ccdB*: gène codant pour la toxine CcdB; *OriT*: origine de transfert; *OriR6K*: origine de réplication R6K.

Si la deuxième recombinaison s'effectue dans la deuxième région flanquante, elle entraîne l'excision du plasmide, éliminant ainsi la copie intacte du gène cible. Si elle s'effectue dans la même région que la première recombinaison, alors le génotype « sauvage » est obtenu (Figure 22-II). Un criblage par PCR de la région mutée permet de différencier les deux types de clones. Les clones mutants sont contrôlés comme étant bien *V. tapetis* par absence de croissance à 37°C et séquençage de l'ARN16S. Enfin, la mutation est vérifiée par séquençage.

CHAPITRE I

Caractérisation du biofilm de *Vibrio tapetis*

10. INTRODUCTION

10.1. Contexte de l'étude

Au cours de l'étude bibliographique, nous avons pu constater que les bactéries appartenant au genre *Vibrio* occupaient une place importante parmi les pathogènes d'invertébrés marins. Il apparaît également inéluctable que la pathogénicité de nombreuses espèces bactériennes soit étroitement liée à la formation de biofilm. Cependant, peu de données sont disponibles concernant la formation de biofilm chez des espèces du genre *Vibrio* pathogènes de bivalves. Comme c'est le cas pour *V. tapetis*, la plupart des études se sont concentrées sur la compréhension des processus impliqués dans le cycle infectieux du pathogène. Néanmoins, jusqu'à aujourd'hui, aucune donnée dans la littérature n'était disponible sur la formation de biofilm par l'agent étiologique de la MAB. C'est vers cette approche que nous nous sommes dirigés pour tenter d'apporter de nouvelles données, en commençant tout d'abord par la caractérisation du biofilm de *V. tapetis* cultivé *in vitro*. Ce premier axe de notre étude a donné lieu à la préparation d'un article décrivant pour la première fois la formation de biofilm chez *V. tapetis*. Des résultats complémentaires seront présentés à la suite de l'article dans la partie **10.3** afin d'éclaircir les aspects non développés dans l'article.

10.2. Expériences préliminaires

La première étape de notre travail fut de déterminer les conditions et paramètres à utiliser lors des expérimentations pour l'étude des biofilms de *V. tapetis*. Dans la littérature, la formation de biofilm en chambre à flux couplée à l'observation en MCBL est la technique de choix pour étudier la structure des biofilms bactériens (Pamp *et al.*, 2009 ; Tolker-Nielsen et Sternberg, 2014). La formation de biofilm a été étudiée jusqu'à 48h de croissance car aucune évolution en terme d'épaisseur de celui-ci n'a été observée au-delà de ce temps (78h). Le milieu Zobell a été choisi, car il favorise la virulence *in vitro* de *V. tapetis* et les cultures de biofilms se font à 18°C, température optimale de croissance de la bactérie (Paillard, communications personnelles). Le marquage de la souche pathogène CECT4600 par la GFP, réalisé au LEMAR, a permis dans certains cas une observation en continu et non destructive, sans utilisation de fluorochromes, en MCBL.

11. FORMATION DE BIOFILMS CHEZ *V. TAPETIS*, AGENT RESPONSABLE DE LA MALADIE DE L'ANNEAU BRUN

11.1. Résumé de l'article

À travers cet article, nous avons voulu poser les bases de l'étude du biofilm de *V. tapetis* afin de pouvoir comprendre le lien potentiel entre la virulence de ce pathogène et sa capacité à former un biofilm. Les objectifs de cette étude ont tout d'abord été de caractériser pour la première fois la formation de biofilm *in vitro* de *V. tapetis*. Des observations en MCBL nous ont permis de mettre en évidence la capacité de *V. tapetis* à former des biofilms *in vitro* en 24h et de décrire la structure du biofilm, ainsi que la composition de sa matrice extracellulaire. Les répartitions de polysaccharides et d'ADN_e au sein de cette matrice se sont révélées différentes en fonction des souches de *V. tapetis* testées. Nous avons également mis en évidence la présence de composants sphériques, un phénomène particulier et jamais observé auparavant à notre connaissance au sein d'un biofilm bactérien. Ces composants ont été observés plutôt en surface du biofilm et retrouvés dans les biofilms de toutes les souches de *V. tapetis* testées. Ces composants semblent contenir des protéines, puisqu'ils émettent une fluorescence verte sans ajout de colorant dans les biofilms de la souche de *V. tapetis* CECT4600 exprimant la GFP ; ils semblent également contenir de l'ADN puisqu'ils ont été détectés à l'aide de marqueurs d'ADN fluorescents (SYTO 9 et IP). Les observations réalisées en MEB nous ont permis de constater une différence entre l'aspect de surface de ces composants sphériques et celui des bactéries, ainsi que de suggérer un lien physique entre celles-ci et les composants sphériques. Une analyse par MET d'un biofilm de 48h a mis en évidence une différence d'organisation ultrastructurale de ces composants sphériques par rapport aux cellules bactériennes. De plus, cette approche nous a également permis de conforter notre hypothèse d'un lien physique entre les bactéries et ces composants sphériques.

Enfin, l'effet sur le développement du biofilm de *V. tapetis* de paramètres environnementaux influant sur la prévalence de la MAB a également été évalué. Bien que la hausse de température ($\geq 21^{\circ}\text{C}$) ait un effet avéré sur le développement de la maladie (Paillard *et al.*, 2004b), nous n'avons pas constaté de différence significative entre les biofilms de *V. tapetis* formés à 23°C et à 18°C (condition témoin) durant les 24 premières heures de culture. De la même manière, Reid *et al.* (2003b) ont montré que la prévalence de la MAB était réduite à une salinité de 4% (soit 40 g.l^{-1} de sels marins) ; cependant nous avons démontré que l'augmentation de la salinité du milieu de culture (à 50 g.l^{-1} de sels marins au lieu de 30

g.l⁻¹) n'empêche pas la formation de biofilm par *V. tapetis*, mais conduit à la surproduction de composants sphériques ainsi qu'à la présence de cellules filamenteuses.

11.2. Article en révision pour « *Applied and Environmental Microbiology* »

**Biofilms formed by *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown
Ring Disease**

Sophie Rodrigues,^{a,b} Christine Paillard,^b Gaël Le Pennec,^a Alain Dufour,^{a*}

Alexis Bazire^{a*}

^aUniv. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France

^bUniversité de Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 Laboratoire des Sciences de
l'Environnement Marin(LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Technopôle
Brest Iroise, Plouzané, France

*Corresponding authors: Alain Dufour, alain.dufour@univ-ubs.fr, and Alexis Bazire,

alexis.bazire@univ-ubs.fr

Journal: *Applied and Environmental Microbiology* – Section: Environmental Microbiology

Running title: Biofilms of the pathogen *Vibrio tapetis*

Key words: *Vibrio tapetis*, biofilm, Brown Ring Disease, *Ruditapes philippinarum*

ABSTRACT

Vibrio tapetis is a marine bacterium causing Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. The BRD development process has been well described, but one phenomenon likely linked to *V. tapetis* pathogenicity remains unexplored: its biofilm formation. The objectives of this study were (i) to characterize the biofilm formation *in vitro* of *V. tapetis* and (ii) to evaluate the effects of culture conditions on biofilm development. The biofilm structure and its matrix composition were examined by confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy. *V. tapetis* was able to form biofilms on a glass substratum within 24h. Polysaccharides and eDNA were observed in the biofilm matrixes, but were differently distributed depending on the *V. tapetis* strain. Spherical components were found at the surface of *V. tapetis* biofilms. These components contain DNA, proteins, and seemed to be physically linked to bacteria, but are not membrane vesicles. Transmission electron microscopy showed that the content of the spherical components looked more homogeneous without nucleoid or any kind of internal compartment. They were abundant in biofilms of all tested *V. tapetis* strains pathogenic towards venerid clams, including *R. philippinarum*, but were scarce in biofilms of a fish pathogen strain. Finally, we examined the effect of conditions known to affect the BRD prevalence. Although elevated temperatures (> 21°C) inhibit the BRD development, *V. tapetis* was able to form biofilms *in vitro* at 23°C without any noticeable difference compared to 18°C. Disease prevalence and the rate of disease progression were favoured in clams that had been held at low salinity (2‰). However, increasing the medium salinity (5‰ of sea salts instead of 3‰) did not prevent biofilm formation, but led to cell filamentation and production of many spherical components.

INTRODUCTION

Bacteria belonging to *Vibrio* species are ubiquitous in aquatic ecosystems and can have symbiotic or pathogenic relationships with eukaryotic hosts. They can cause vibrioses in various marine organisms, including molluscs (1), and many diseases affecting shellfishes have been reported (2-4). *Vibrio tapetis*, described by Borrego *et al.* (5), is the causative agent of an epizootic infection described in clams and called Brown Ring Disease (BRD). In 1987, mass mortalities of cultured clams were associated with a high prevalence of a characteristic symptom, a brown deposit on the inner surface of the valves (6, 7). This was the first epizootic infection described in Europe which affected cultivated and wild populations of adult clams, mainly the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (6). BRD is characterized by a brown deposit of conchiolin onto the inner edge of clam shell. This deposit formation is induced by colonization of the clam periostracal lamina by some *V. tapetis* strains (8). The attachment of *V. tapetis* to the periostracal lamina is the initial event in the BRD process. Colonisation by *V. tapetis* provokes some alterations and ruptures of the periostracal lamina, allowing the penetration of the bacteria into the extrapallial fluids where the bacteria colonize shell secretions and progressively are embedded into the conchioline deposit layers. If some tissue lesions occur, *V. tapetis* can penetrate and proliferate into tissues, which can lead to the clam death (9-14).

In general, one key factor for environmental survival and dissemination of bacteria and for the host infection is the ability to form biofilms (15). Biofilms are composed of cells bound to a surface and to each other and embedded within a matrix of extracellular polymeric substances that they have produced (16). Biofilms enhance bacterial growth and survival by providing access to nutrients and provide protection from predators and antimicrobial compounds. Furthermore, pathogenicity is often closely related to bacterial biofilm formation

(17, 18). Several studies investigated the biofilm formation by *Vibrio* species (19, 20). However, most of the information about *Vibrio* biofilms is coming from studies of human pathogenic species, in particular the etiological agent of cholera, *Vibrio cholerae*.

Studies on *V. tapetis* pathogenicity have shown that the clam periostracum colonization by *V. tapetis* is a required step in its infectious cycle (8, 21-23). This bacterial attachment onto the periostracal lamina suggests that biofilm is subsequently developed. This notion is supported by a Brown Ring syndrome microscopic study, which revealed bacterial proliferations within the conchiolin deposit (21). Whereas the BRD development was the object of a number of previous studies (9-14), no study described so far the *V. tapetis* biofilms. More generally, data on biofilm formation by *Vibrio* pathogens of marine organisms are extremely scarce. In the present work, we evaluated the biofilm formation capacity of *V. tapetis* and characterized it, from the description of first steps of biofilm formation to the composition of the extracellular matrix. Unexpectedly, we observed spherical components which we describe here. Moreover, the effects of culture conditions on biofilm development were examined.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. The CECT4600 and IS1 strains were isolated from the venerid clam *R. philippinarum* suffering from BRD (7). Strains isolated from other species of venerid clams harbouring BRD symptoms, such as *V. tapetis* GDE and GTR I (isolated from *Dosinia exoleta* and *Tapes rhomboides*, respectively), have been identified as *V. tapetis* using Multi Locus Sequence Analyses (*gyrB*, *recA*, *rpoA*, and *pyrH* genes) and/or DNA-DNA hybridization methods (P. Le Chevalier, C. Paillard *et al.*, unpublished data). The *V. tapetis* strains CECT4600 (wild type and its derivative producing the Green Fluorescent Protein [GFP]) and IS1 induce

BRD by pallial infection to *R. philippinarum* (7 and C. Paillard, unpublished data). In contrast, the strains LP2 (isolated from the wrasse fish *Symphodus melops*) and GDE are not able to reproduce BRD after pallial inoculation in the clam *R. philippinarum* (14, 24).

Tableau 6 : TABLE 1 *V. tapetis* strains used in this study

Strain	Characteristics	Host	Geographic Origin	Reference
CECT4600	Wild type strain, $\mu=0.32 \text{ h}^{-1}$ CECT4600	Venerid clam, <i>R. philippinarum</i>	Landeda, France	5, 7
CECT4600-GFP	containing the pVSV102 plasmid (Km ^R , <i>gfp</i>) $\mu=0.32 \text{ h}^{-1}$	Venerid clam, <i>R. philippinarum</i>		32, LEMAR ^b collection
LP2	Wild type strain $\mu=0.38 \text{ h}^{-1}$	Wrasse fish <i>Symphodus melops</i>	Bergen, Norway	30
IS1 (VP1)	Wild type strain $\mu=0.34 \text{ h}^{-1}$	Venerid clam, <i>R. philippinarum</i>	Landeda, France	7
GDE	Wild type strain $\mu=0.34 \text{ h}^{-1}$	Venerid clam <i>Dosinia exoleta</i>	Glenan island, France	LEMAR ^b collection
GTR I	Wild type strain $\mu=0.35 \text{ h}^{-1}$	Venerid clam <i>Tapes rhomboides</i>	Glenan island, France	LEMAR ^b collection

^bUniversité de Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France. All strains are stored at -80°C in 25% glycerol.

All *V. tapetis* strains were routinely grown aerobically in Zobell medium (g.l⁻¹: tryptone, 4; yeast extract, 1; sea salts, 30; ferric phosphate, 0.1) at 18°C, the optimal temperature for *V. tapetis* growth. Kanamycin (Km) was used at 100 µg.ml⁻¹ during precultures of *V. tapetis* CECT4600-GFP but not during biofilm culture. The growth rates were determined from growth kinetics recorded for each strain at 18°C in Zobell medium at 18°C in a 96-well

microplate. OD₆₀₀ measurements were made every 15 min for 48 h using a plate reader (Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, Finland).

Biofilm culture. *V. tapetis* biofilms were grown at 18°C under hydrodynamic conditions in a three channel flow cell (1x40x44 mm; Biocentrum, DTU, Denmark) (25). The flow system was assembled, prepared and sterilized as described by Tolker-Nielsen and Sternberg (26). The substratum consisted of a microscope glass coverslip (24x50 st1 [KnittelGlasser, Braunschweig, Germany]). Each channel was inoculated with 250 µl of an overnight culture of *V. tapetis* diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in Artificial Sea Water (ASW: 30 g.l⁻¹ sea salts [Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO]). A two-hour attachment step was performed without any flow of ASW or medium. A flow (2.5 ml.h⁻¹) of Zobell medium was then applied for 24 to 48h using a Watson Marlow 205U peristaltic pump (Watson Marlow, Falmouth, UK). For experiments addressing the effects of higher osmotic conditions or temperatures, a Zobell medium with 50 g.l⁻¹ of sea salts (Zobell 5%) was used or the temperature was set to 23°C during biofilm culture, respectively. The biofilms were then either observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) or by electron microscopy (SEM), as described below.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Biofilms formed by *V. tapetis* CECT4600-GFP (Table 1) were observed by monitoring the GFP fluorescence. Depending on the biofilm components to observe, various fluorescent dyes were used after biofilm growth. The non GFP-producer bacteria were routinely stained with 5 µM SYTO 9 (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Alternatively, a mixture of 5 µM SYTO 9 and 0.3 µM Propidium Iodide (PI) (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, Carlsbad, Ca) was used to examine whether the spherical components contain DNA. Additional dyes were used to detect matrix components: polysaccharides and extracellular DNA (eDNA) were stained with 100 µM Calcofluor White (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Mo) (27) and 1 µM 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-

dimethylacridin-2-one) (DDAO) (Invitrogen, Carlsbad, Ca) (28), respectively. PI and DDAO could not be used on a single biofilm, since they both fluoresce in red. All stainings were performed after biofilm growth by injecting 250 μl of the appropriate fluorescent dye(s) prepared in ASW into a flow cell channel, incubating at room temperature for 15 min in the dark, and washing for 15 min with a flow (2.5 ml.h^{-1}) of Zobell medium. CLSM observations were then immediately performed with a TCS-SP2 microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), using a 63x oil immersion objective. GFP and SYTO 9 were excited at 488 nm and fluorescence emission was detected between 500 and 550 nm. PI and DDAO were excited with the 488 nm argon laser line and fluorescence emission was detected between 570 and 620 nm. Calcofluor White was excited at 400 nm and fluorescence emission was detected between 410 and 450 nm. Fluorescence signal of double-labelled or triple-labelled specimens were acquired simultaneously. Images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. For visualization and processing of three-dimensional (3D) image data (volume rendering with shadow projection), the Leica LAS AF software (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) was used. Quantitative analyses of image stacks were performed using the COMSTAT software (<http://www.imageanalysis.dk/>) (29). At least three image stacks from each of three independent experiments (nine stacks in total) were used for each analysis.

Scanning Electron Microscopy (SEM). Fragments of flow cell glass substratum, on which a 48h biofilm was formed, were aseptically retrieved and the samples were fixed overnight in a 2.5% glutaraldehyde solution at 4°C. Glass fragments with biofilm were then washed three times in 0.1M marine phosphate buffer (pH 7.35) for 10 min, and gradually dehydrated in an ethanol series (50%, 70%, 95% and 100%, 3 times for 15 min each). The samples were dried in ethanol in a CPD 030 critical point dryer (Bal-Tec, Bondoufle, France), using CO_2 as a

transitional fluid until the critical point was reached. The samples were mounted on aluminium stubs and coated for 120 s at 20 mA with gold-palladium alloy, using a model 501 sputter coater (Edwards Pirani, West Sussex, United Kingdom), and were observed with a JEOL 6460LV microscope (JEOL Ltd. Tokyo, Japan) at magnifications of $\times 1,000$ to $\times 20,000$. The voltage was kept at 10kV or 15kV and at an average distance from the electron gun of about 10 mm.

Transmission Electron Microscopy (TEM). To observe thin sections of bacterial cells from biofilms, cells detached from the biofilm but still present in the flow cell channel were fixed overnight in a 2.5% glutaraldehyde solution at 4°C. Samples were washed two times with a solution of sodium cacodylate 0.1M (prepared in ASW) for 30 min. Samples were placed for at least 1h in a post-fixation solution of 1% osmium tetroxyde (prepared in sodium cacodylate 0.1M) and next gradually dehydrated in an ethanol series (70%, 95% and 100% twice for 30 min each). They were then progressively infiltrated with an ascending series of Spurr's low-viscosity embedding medium in ethanol (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) (25%, 50%, 75% and 100%) and cured at 70°C for 8h. The polymerized blocks were cut in 50 nm thin sections with a Leica Reichert Ultracut S (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). Sectioned samples were stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined using a JEOL JEM 1400 transmission electron microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan).

RESULTS

Biofilm structure and formation. We first compared biofilm formation by two *V. tapetis* strains: CECT4600, which is the type strain (5) and is responsible for BRD in *R. philippinarum* (7); and LP2 (30), which is not able to reproduce BRD in *R. philippinarum* after pallial

inoculation (14, 31), but is a pathogen of the wrasse fish *Symphodus melops* (Table 1). Both strains displayed similar growth rates in liquid cultures (Table 1) and were able to form biofilms on glass in our culture conditions. *V. tapetis* CECT4600 formed non-structured and rather homogeneous biofilms (Fig. 1) reaching an average thickness of 26 μm and a biovolume of 16 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ after 48 h of growth (Fig. 2). These two parameters increased about 2-fold between 24 and 48 h of growth (Fig. 2). *V. tapetis* LP2 biofilms were visually very different since they displayed a structured architecture with mushroom-like components (Fig. 1).

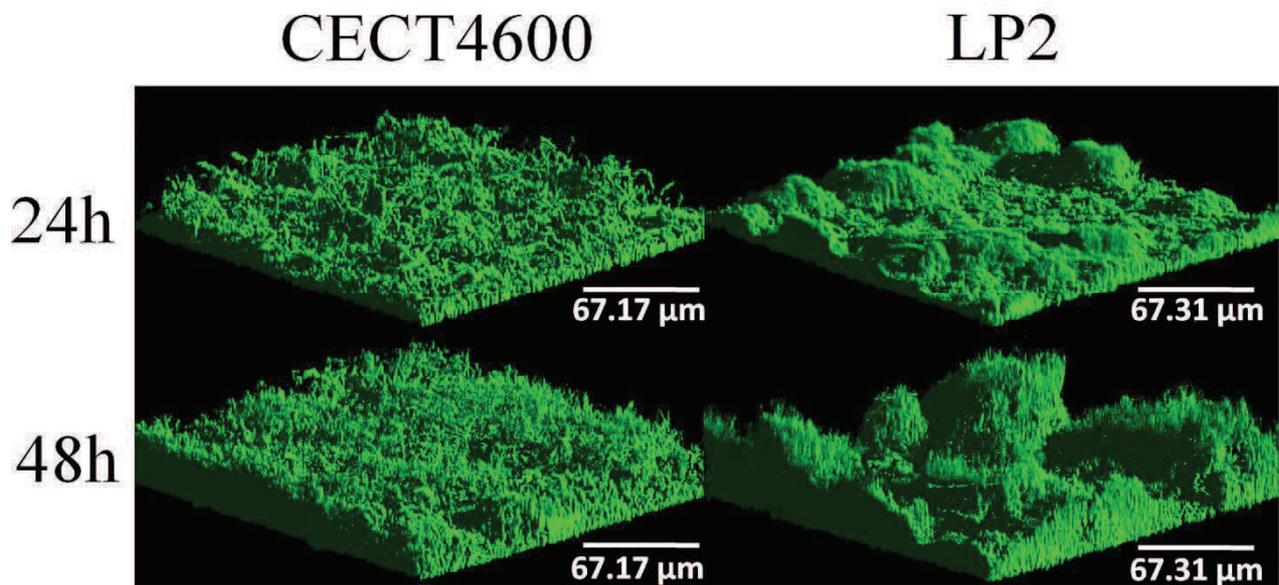


Figure 23 : FIG 1 Three-dimensional (3D) views of *V. tapetis* CECT4600 and LP2 biofilms grown for 24 and 48 h. Bacteria were stained with SYTO 9 and observed by CLSM.

The average thickness and biovolume were higher at 48 h (19 μm and 14 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$, respectively) than at 24 h, but they increased only by factors 1.2 to 1.4 between these two time points (Fig. 2).

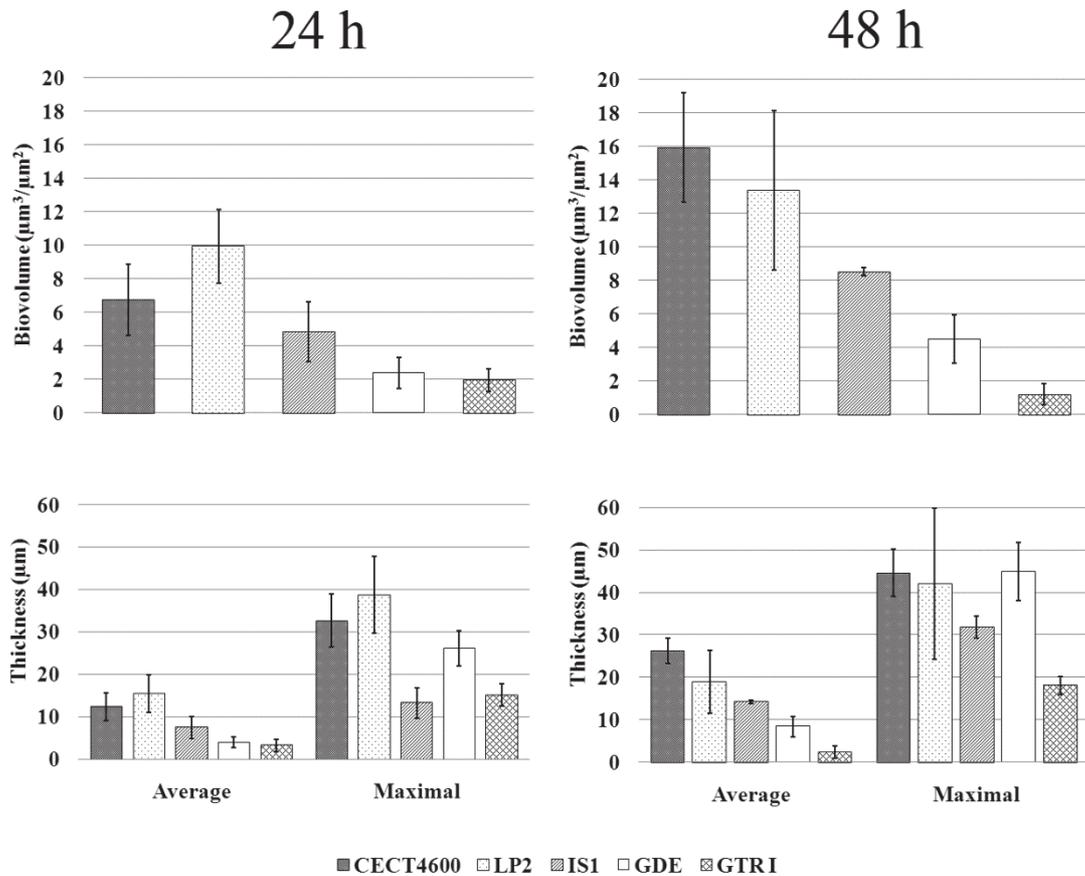


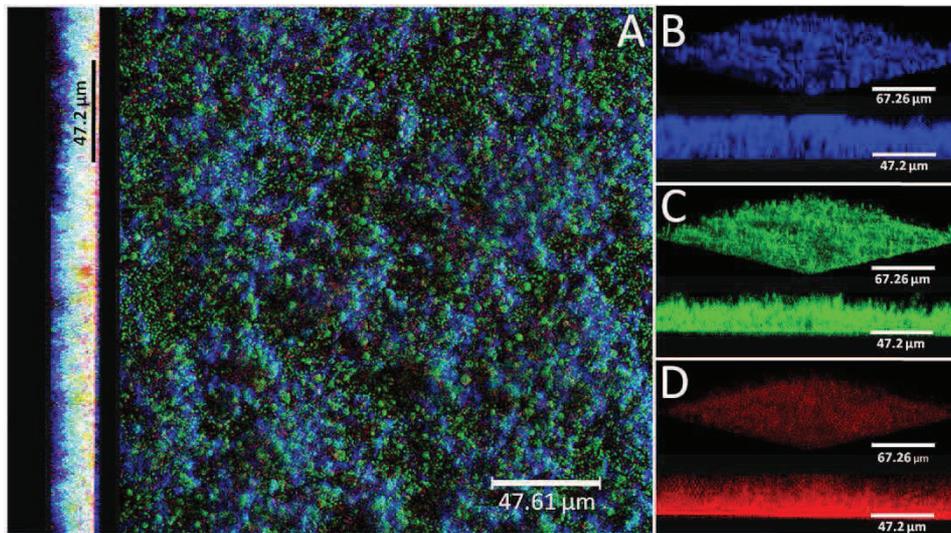
Figure 24 : FIG 2 Biovolume and thickness values of biofilms of the indicated *V. tapetis* strains. The values were determined by image analyses using the COMSTAT software.

A time-lapse study using light microscopy in which an image was recorded every 10 min during the first 18 h of biofilm growth revealed that the CECT4600 cells attached to the glass surface and colonized the whole surface by dividing, but did not display a surface motility behaviour such as swarming or twitching (see movie 1 in supplemental material). Cell multiplication started 2 h after the attachment step. Between 2 and 8 h post-attachment, bacteria were multiplying, yielding cell aggregates. From 8h, the first microcolonies were observed, and the surface was completely covered by cells after 12 h. Similar observations were made for the LP2 strain, except that the building of mushroom-like structures was apparent after 10 h, and detachment of large biofilm parts was clearly observed from 13 h,

which could contribute to the shaping of 3D structures (see movie 2 in supplemental material).

Distribution of matrix components. Specific fluorescent dyes allowed the CLSM observation of matrix components and of their distribution within biofilms. To facilitate multi-labelled observations, we used the CECT4600-GFP strain (Table 1) after verifying that the presence of the GFP-encoding plasmid pVSV102 (32) did not affect the biofilm formation (biovolume, architecture and thicknesses) (Fig. 3C). The composition of the extracellular matrix was examined by staining the biofilms with Calcofluor White (binds to β -1,4 and β -1,3 polysaccharides) and DDAO (binds to eDNA). Both dyes were able to stain the matrixes of CECT4600-GFP and LP2 biofilms. Extracellular DNA was not visible on the top view of CECT4600-GFP biofilms (Fig. 3A, top view), but was located at the biofilm base, roughly at its lowest 1/3 part (Fig. 3A, side view, and Fig. 3D). By contrast, eDNA was observed throughout the LP2 biofilms (Fig. 3E and H). CECT4600-GFP biofilms displayed a homogeneous distribution of polysaccharides (Fig. 2B), which were clearly visible at the top of the biofilms (Fig. 3A). In LP2 biofilms, the polysaccharides were mostly found in the lowest 3/4 part of the biofilm (Fig. 3E, side view, and Fig. 3F) and were not predominant at the biofilm surface (Fig. 3E, top view). When using SEM to observe the biofilm surfaces, the matrix was clearly visible at the top of CECT4600-GFP biofilms, but much less abundant on LP2 biofilms (Fig. 4). The CLSM data (Fig. 3) indicate that the matrix observed by SEM is mainly constituted of polysaccharides.

CECT4600-GFP



LP2

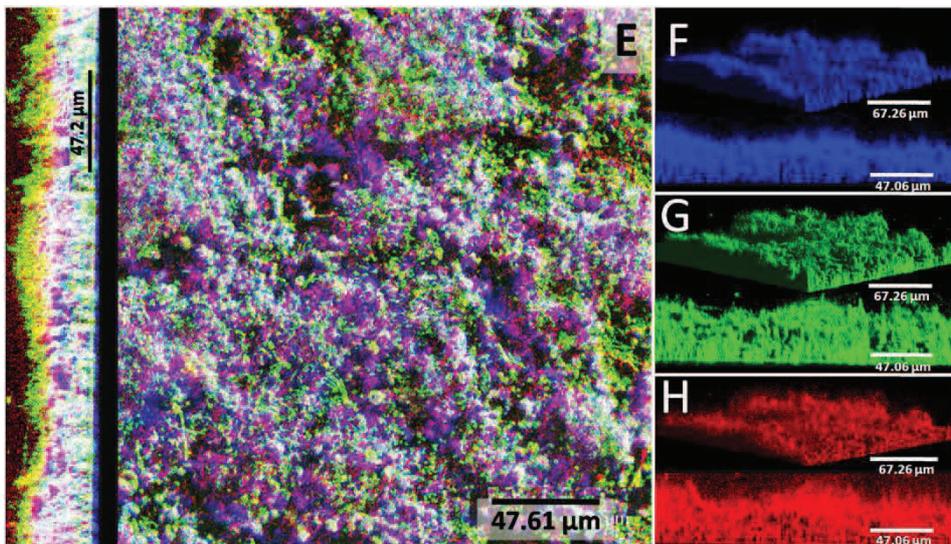


Figure 25 : FIG 3 Extracellular matrix compounds of 24 h *V. tapetis* CECT4600-GFP and LP2 biofilms stained by Calcofluor White (β 1-3 and β 1-4 polysaccharides) and DDAO (eDNA). A, E: top views and side views of overlay; B-D and F-H: 3D views and side views of β -polysaccharides (blue), bacteria (green) detected by GFP fluorescence (CECT4600-GFP) or SYTO 9 staining (LP2), or eDNA staining (red).

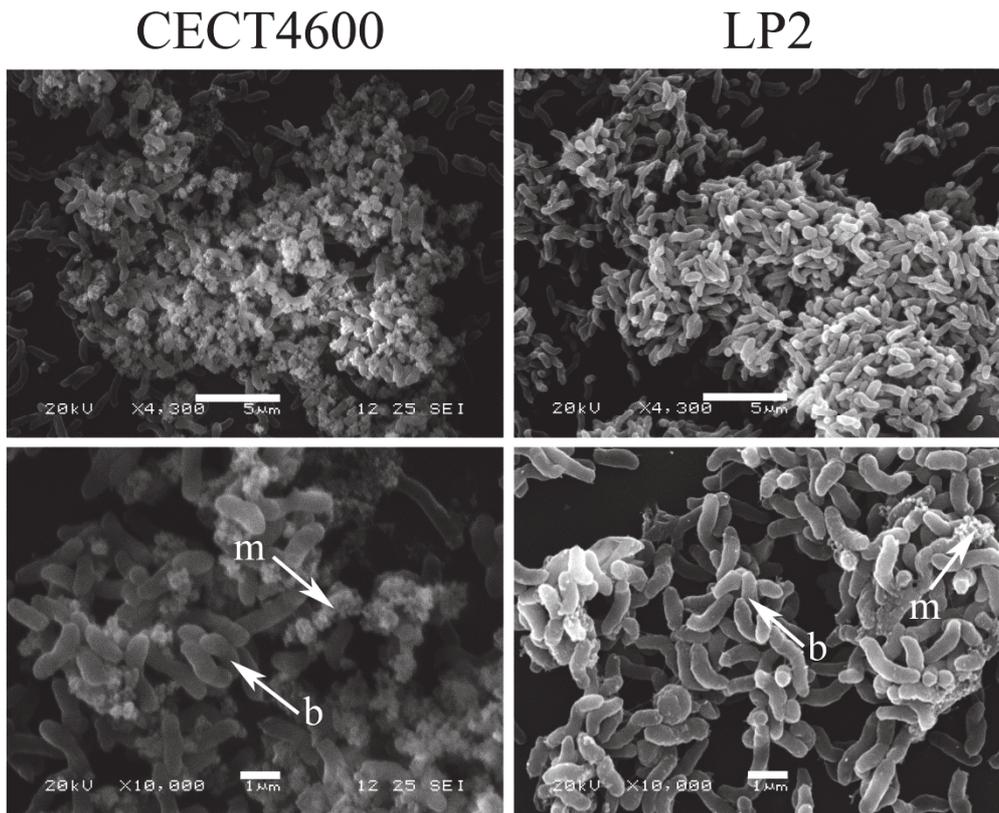


Figure 26 : FIG 4 SEM images of 48 h biofilms formed by *V. tapetis* CECT4600 and LP2. Arrows indicates bacterial cells (b) and extracellular matrix (m). Scale bars: 5 µm (top); 1 µm (bottom).

***V. tapetis* biofilms display unusual components.** CLSM observations revealed the presence of spherical components at the surface of CECT4600-GFP biofilms (Fig. 5A-C) and of SYTO 9-stained CECT4600 biofilms (Fig. 5D). The fact that these components displayed a green fluorescence when the bacteria carried the GFP-encoding plasmid pVSV102 (Fig. 5A) revealed that they contain GFP, which suggests that they are likely to contain other proteins synthesized by the bacteria. Furthermore, the spherical components could be stained with the DNA-binding dyes propidium iodide (PI) (Fig. 5B) and SYTO 9 (Fig. 5D), indicating that they contain DNA. The overlay of GFP and PI fluorescences revealed that only few spherical components were labelled by PI (Fig. 5C), suggesting that only damaged spherical components were permeable to PI. We failed to detect these components in liquid cultures of

V. tapetis CECT4600 and CECT4600-GFP (data not shown), they therefore seem to be biofilm-specific in our culture conditions.

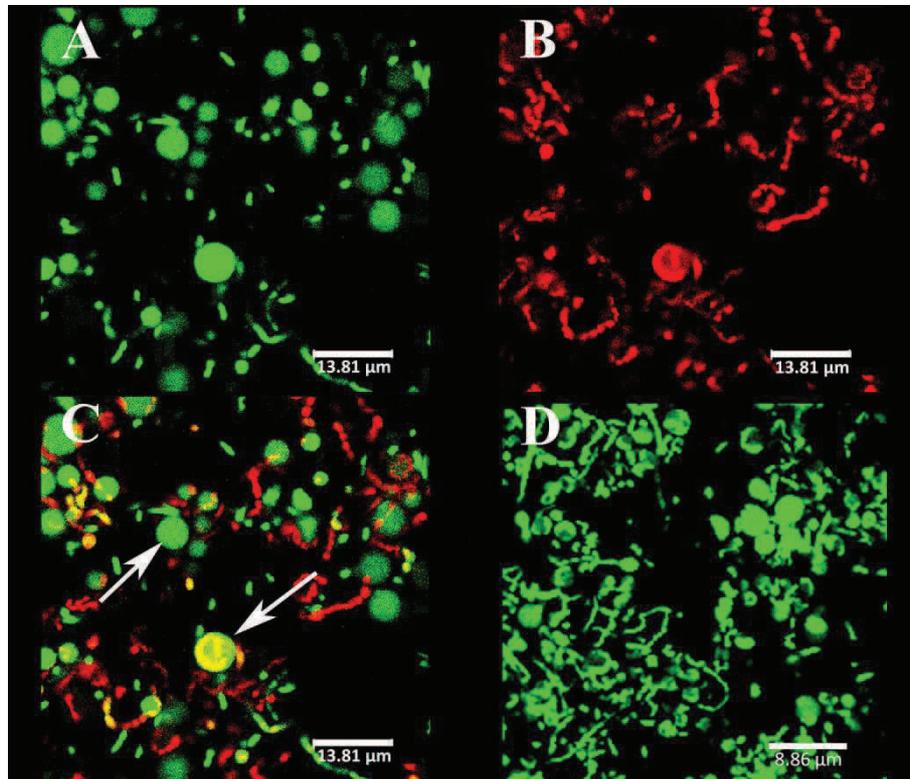


Figure 27 : FIG 5 Spherical components observed at the biofilm surface by CLSM. The strains were *V. tapetis* CECT4600-GFP (A-C) and CECT4600 (D). GFP fluorescence was detected (A) or the following DNA-binding dyes were used: propidium iodide (B) or SYTO 9 (D). (C): overlay of GFP and propidium iodide fluorescences from panel A and B. The arrows indicate spherical components.

The observation of the biofilm surface by SEM allowed us to estimate that these components had an average diameter of about 1-2 μm (Fig. 6). They were therefore too large to be membrane vesicles (diameters of 50 to 250 nm), which are produced by various Gram negative bacteria (33, 34). SEM images furthermore showed that the spherical components had a different surface aspect (rough aspect) than typical bacteria, and seemed physically linked to the cells, as if a cell pole was differentiating (Fig. 6A and B). In order to elucidate the spherical component ultrastructure, we used TEM to examine cells detaching from 48h biofilms. Whereas the nucleoids of bacteria were clearly distinguishable from their cytoplasm,

the content of the spherical components looked more homogeneous without nucleoid or any kind of internal compartment (Fig. 6C and E). Each spherical component was found in the proximity of a bacterial cell and they seemed linked to each other by their envelopes (Fig. 6D and F).

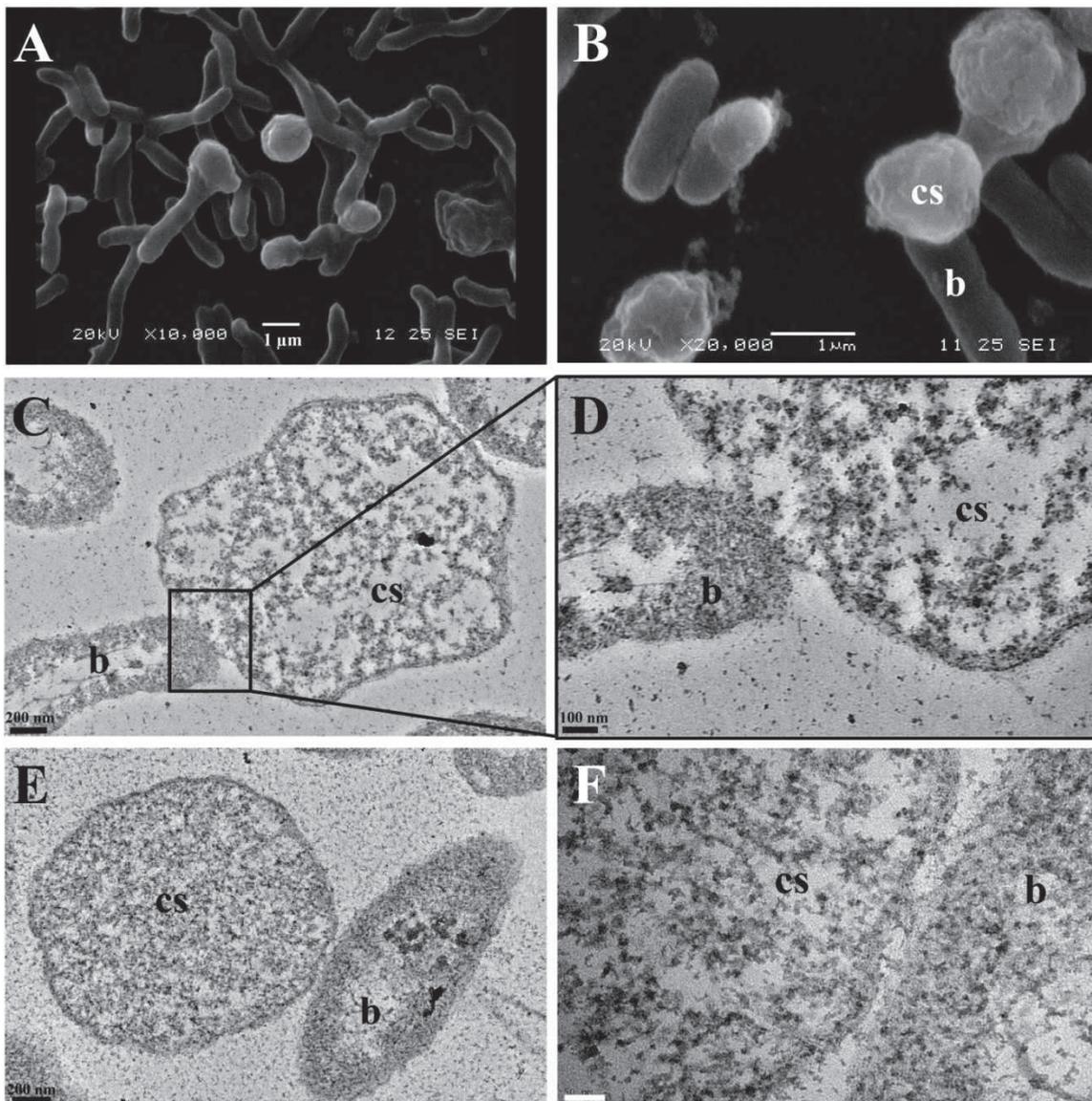


Figure 28 : FIG 6 Spherical components observed by SEM (A,B) and TEM (C-F). b, bacteria; sc, spherical components. Scale bars: 200 nm (C,E); 100 nm (D); 50 nm (F).

In *V. tapetis* LP2 biofilms, we did not observe such spherical components using CLSM, but a few of them were visible by SEM at the biofilm surface (data not shown). This prompted us to

examine if the production of high amounts of spherical components is specific of the CECT4600 strain or if this property is shared by other *V. tapetis* strains. We therefore grew biofilms of the *V. tapetis* strains IS1, GDE and GTR I, which are all pathogenic against clams of the *Veneridae* family: *R. philippinarum*, *D. exoleta*, and *T. rhomboids* (Table 1). Spherical components were abundant at the surfaces of biofilms of these three strains (Fig. 7).

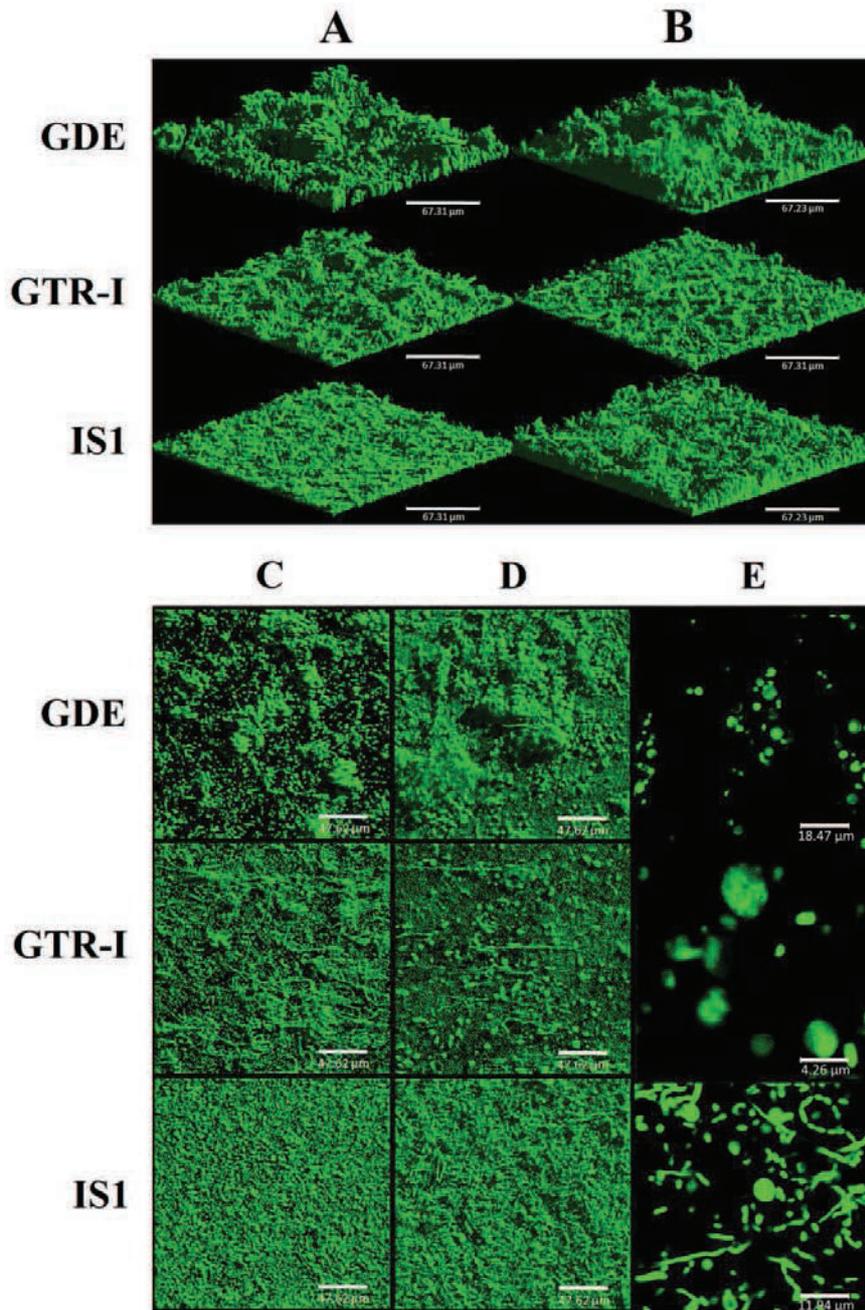


Figure 29 : FIG 7 Biofilms of *V. tapetis* GDE, GTR I and IS1 strains grown for 24 and 48 h. (A,B): 3D views; (C,D): top views; (E): spherical components. Bacteria were stained with SYTO 9. Top view scale bar: 47.62 μm.

GDE was the most productive strain, its biofilm displaying aggregates of these spherical components, as seen on Figure 7C-E. GDE biofilms displayed a heterogeneous surface (Fig. 7A and B) compared to the reference strain CECT4600 (Fig. 1) and achieved an average biovolume of $4.5 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}$ after 48 h of growth (Fig. 2). The GTR I strain formed rather flat biofilms (Fig. 7A-B) harbouring filamentous cells (Fig. 7C and D) and numerous spherical components were visible at their surface (Fig. 7D and E). The biovolume of GTR I biofilms did not exceed $2 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}$ (Fig. 2). The *R. philippinarum* pathogen IS1 strain formed homogeneous biofilms (Fig. 7A and B) with an architecture very similar to the CECT4600 biofilm one (Fig. 1) and an average biovolume of $8 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}$ (Fig. 2). IS1 biofilms also contained spherical components (Fig. 6C-E), in a similar amount as CECT4600 biofilms. These spherical components are thus abundantly present in the biofilms all the strains isolated from bivalves of the *Veneridae* family.

Effect of culture conditions. Temperature and salinity are subject to great variations in coastal environments where clams can be found. They are known to affect clam immune parameters and BRD expression, since a temperature of 21°C or a salinity of 4% led to lower BRD prevalence than a temperature of 14°C (35) or a salinity of 2% (36). However, it is unknown if these parameters may also affect *V. tapetis* biofilm formation. To address this question, we chose the highest temperature (23°C) and the highest sea salt concentration (50g.l^{-1} of sea salts in Zobell medium [Zobell 5%]) which did not affect the *V. tapetis* CECT4600 growth in liquid medium compared to our standard conditions (18°C and Zobell 3%) (data not shown). At 23°C , we failed to observe any difference in biofilm formation by *V. tapetis* CECT4600 compared to 18°C during the first 24 hours but limits its growth between 24 and 48 h (data not shown). By contrast, when salinity was increased by using Zobell 5%, more spherical components were present in *V. tapetis* CECT4600 biofilms (Fig. 8A).

Furthermore, filamentous CECT4600 cells were abundant in biofilms grown in Zobell 5% (Fig. 8A), which was not the case in Zobell 3% (Fig. 1). This morphological change was not observed in liquid culture in Zobell 5% (data not shown). Salinity also affected the evolution of biofilm biovolume: it was higher at 24 h of growth in Zobell 5% than in 3% (11 vs $7 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}$), but it decreased between 24 and 48 h down to $7 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}$ in Zobell 5% whereas it increased up to $16 \mu\text{m}^3.\mu\text{m}^{-2}$ during the same time frame in Zobell 3% (Fig. 8B).

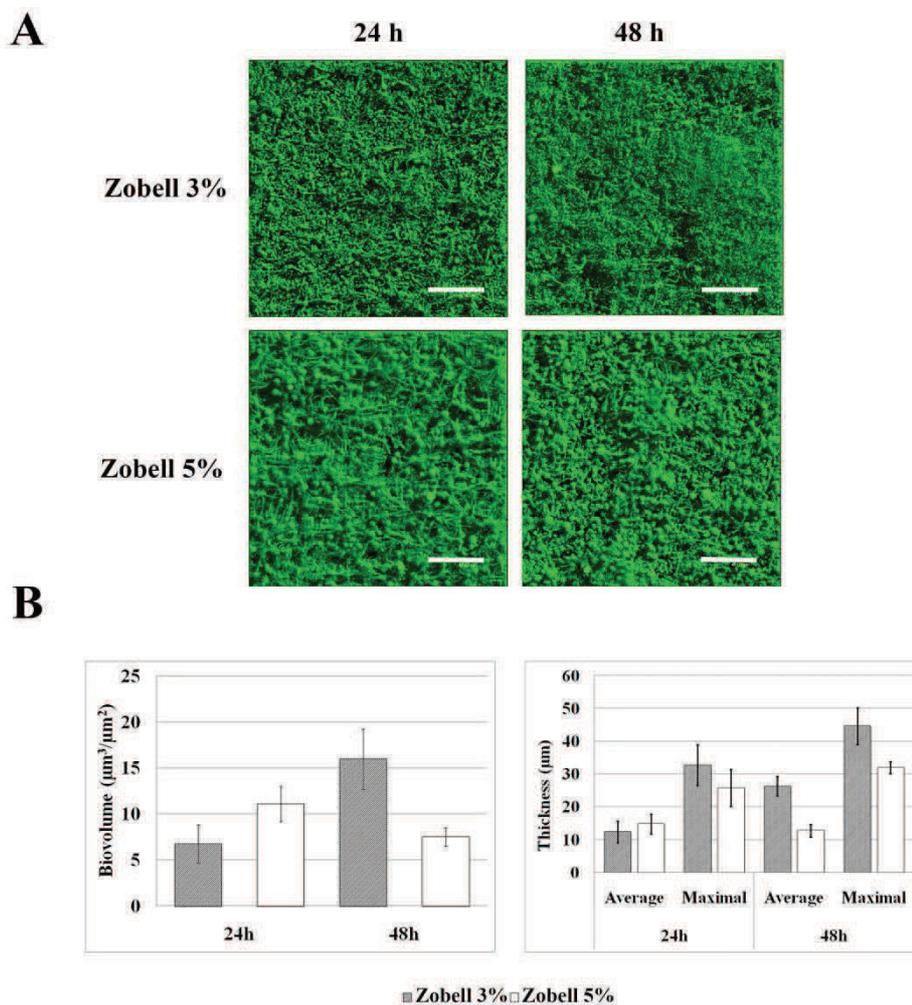


Figure 30 : FIG 8 Effect of increasing salinity on *V. tapetis* CECT4600 biofilm development. A: CLSM images (top views) of 24 h and 48 h biofilms formed by *V. tapetis* CECT4600 in Zobell 5%. Bacteria were stained with SYTO 9. Top view scale bar: $47.62 \mu\text{m}$. B: comparison of biovolume and thickness values of *V. tapetis* CECT4600 biofilms grown in Zobell 3% and in Zobell 5%. The values were determined by image analysis using COMSTAT software.

DISCUSSION

In this study, we characterized for the first time the biofilm formed by the clam pathogen *V. tapetis* CECT4600. We showed that *V. tapetis* CECT4600 is able to form biofilms *in vitro* on glass under dynamic conditions. After initial attachment, *V. tapetis* colonized the substratum by dividing without cell motility on surface, in contrast to other bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* (37). CECT4600 and LP2 strains formed biofilms with marked differences in the distribution of matrix components and in the biofilm architecture. Interestingly, these two strains are very similar from a genetic point of view (30), but they do not target the same type of organisms since LP2 is a fish pathogen. Altogether, all the *V. tapetis* strains tested are able to form biofilms covering the entire glass surface in 24 h. At the surface of all *V. tapetis* biofilms, we observed unusual spherical components. They had an average diameter of about 1-2 μm , showed a different surface aspect than bacteria, and contained DNA, GFP and likely other proteins. These observations and our SEM and TEM images support the hypothesis that the spherical components are excrescences from the bacterial cells to which they seem to remain attached. TEM images furthermore that the content of the spherical component was homogeneous without evidence of nucleoid or any kind of internal compartment. Moreover, these components are too large to be membrane vesicles. Berk *et al.* (38) reported that in *V. cholerae* biofilms, cells produced 50-200 nm diameter spheroids protruding away from the cell surface and containing matrix components of polysaccharidic nature [*Vibrio* polysaccharides (VPS)]. However, we failed to stain the *V. tapetis* spherical components with Calcofluor White (data not shown), which binds β 1-3 and β 1-4 polysaccharides. These spherical components seemed to be biofilm-specific because they were not observed in liquid cultures. They were abundant at the surface of the biofilms of the four *V. tapetis* strains (CECT4600, IS1, GDE, GTR I) which are pathogenic towards clams of the *Veneridae* family (*R.*

philippinarum, *D. exoleta*, and *T. rhomboids*), but very scarce at the surface of *V. tapetis* LP2 which is pathogenic towards the wrasse fish *Symphodus melops*. We speculate that the spherical components might be related to the *V. tapetis* virulence, but this must be considered only as a new hypothesis which will require future studies to be addressed. To our knowledge, this type of spherical components within a biofilm has not been previously reported in other bacterial species.

In marine invertebrates, disease prevalence is often controlled by environment factors (39). Paillard *et al.* (40) showed the influence of temperature on BRD prevalence. *V. tapetis* growth is inhibited under 4°C and above 25°C; laboratory experiments have also demonstrated that a temperature of 21°C inhibits the development of BRD compared to 14°C and enhances shell repair process (35, 40). In this study, we demonstrated that the *in vitro* biofilm formation by *V. tapetis* CECT4600 is not altered by a growth at 23°C compared to 18°C. This indicates that elevated temperatures lead to a reduction of the BRD prevalence not by impairing *V. tapetis* biofilm development, but more likely by conferring to the clam better immune defenses to fight the disease agent, as described by Paillard *et al.* (35).

Environmental salinity has previously been correlated with disease incidence in Manila clam (36) and in several bivalve species (41, 42). Reid *et al.* (36) reported that the disease prevalence was significantly lower at a salinity of 4‰ than at 2‰, which was consistent with an impairment of clam immune parameters at 2‰. We showed here that *V. tapetis* CECT4600 is able to form biofilms at a high salinity (5‰), but biovolumes and cells within the biofilm were affected. More spherical components were present at the biofilm surface in this condition, and numerous filamentous cells were observed. These changes were not observed in liquid culture. Filamentous bacterial morphology has already been described as potentially involved in bacterial survival in response to the sensing of environmental changes (43).

Our observations on effects of culture parameters thus showed that *V. tapetis* is able to form biofilms in conditions in which the BRD prevalence is affected. It suggests that *V. tapetis* biofilm formation could play a role in the persistence of the pathogen in clam without inducing BRD symptoms. Biofilm development by *V. cholerae* facilitates its persistence in the environment and the host and plays a fundamental role in the epidemic cycles of this pathogen (44).

This first study describing the *V. tapetis* biofilm formation and characteristics yields the bases to decipher the role of biofilms in the pathogenic cycle of this bacterium towards clams. Future works will be undertaken to observe *V. tapetis* biofilm formation *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Aurora mobility French-Norway project, GDR I and GDE strains were isolated in Glénan islands by P. Le Chevalier and the Aurora Crew (S. Mortensen, K. Kjornes, A. Bidault, L. Harkestad, Ø. Bergh and C. Paillard). Authors also thank the « Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie » (Université de Bretagne Occidentale, Brest, France) for technical assistance.

SR is the recipient of a doctoral fellowship from Région Bretagne and was supported by the Axis 1 of GIS Europôle Mer. This work was performed in the framework of LabexMER "A Changing Ocean" ANR-10-LABX-19-01, which is a cluster of Excellence funded by the French "Investissements d'Avenir" program, supported by French Ministry of Research and Education.

REFERENCES

1. **Paillard C, Le Roux F, Borrego JJ.** 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* **17**:477-498.
2. **Pass D, Dybdahl R, Mannion MM.** 1987. Investigation into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in western Australia. *Aquaculture* **65**:149-169.
3. **Friedman CS, Beattie JH, Elston RA, Hedrick RP.** 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortalities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunbergh. *Aquaculture* **94**:1-15.
4. **Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waetchter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe F.** 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* **15**:251-258.
5. **Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A.** 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:480-484.
6. **Paillard C, Percelay L, Le Pennec M, Le Picard D.** 1989. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve) = Pathogenic origin of the brown ring in *Tapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *C. R. Acad. Sci. III-Vie* **309**:235-241.
7. **Paillard C, Maes P.** 1990. Étiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C. R. Acad. Sci. III-Vie* **310**:15-20.
8. **Paillard C, Maes P.** 1995. The Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J. Invertebr. Pathol.* **65**:91-100.
9. **Paillard C.** 1992. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum*. Ph.D. thesis. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
10. **Allam B, Paillard C, Maes P.** 1996. Localization of the pathogen *Vibrio* P1 in clams affected by Brown Ring Disease. *Dis. Aquat. Organ.* **27**:149-155.
11. **Allam B, Paillard C, Auffret M.** 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum* challenged with its pathogen, *Vibrio tapetis*. *J. Invertebr. Pathol.* **76**:63-69.
12. **Allam B, Paillard C, Ford SE.** 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the ethiological agent of Brown Ring Disease (BRD) in clams. *Dis. Aquat. Organ.* **45**:221-231.
13. **Paillard C.** 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* **17**:467-475.

14. **Paillard C.** 2004. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes ; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves. Habilitation à diriger des recherches (HDR). Université de Bretagne Occidentale, Brest.
15. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
16. **Donlan RM.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:881-890.
17. **Parsek MR, Singh PK.** 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:677-701.
18. **Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M, Colwell RR.** 2008. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Curr.Opin.Biotech.* **19**:244-247.
19. **Yildiz F, H. Visick KL.** 2009. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* **17**:109-118.
20. **Vezzulli L, Pezzati E, Stauder M, Stagnaro L, Venier P, Pruzzo C.** 2014. Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aesturarius*. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.12484.
21. **Paillard C, Maes P.** 1995. The Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. II. Microscopic study of the Brown Ring Syndrome. *J. Invertebr. Pathol.* **65**:101-110.
22. **Borrego JJ, Luque A, Castro D, Santamaria JA, Martinez-Manzanares E.** 1996. Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour.* **9**:125-136.
23. **Lopez-Cortes L, Luque A, Martinez-Manzanares E, Castro D, Borrego JJ.** 1999. Adhesion of *Vibrio tapetis* to clam cells. *J. Shellfish Res.* **18**:91-97.
24. **Trinkler N.** 2009. La guérison coquillière: Un mécanisme de défense de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face au *Vibrio tapetis* dans le cadre de la maladie de l'anneau brun. Ph.D. thesis. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
25. **Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T.** 2009. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *CytometryA* **75**:90-103.
26. **Tolker-Nielsen T, Sternberg C.** 2011. Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr. Protoc. Microbiol.* **1B**:2.1-2.17.
27. **Chen MY, Lee DJ, Tay JH, Show KY.** 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:467-474.
28. **Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**:1114-1128.

29. **Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer programme COMSTAT. *Microbiology* **146**:2395-2407.
30. **Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, Paillard C, Bergh Ø.** 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Organ.* **56**:25-31.
31. **Choquet G.** 2004. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez les palourdes. Ph.D. thesis. Université de Bretagne Occidentale, Brest.
32. **Travers MA, Barbou A, Le Goïc N, Huchette S, Paillard C, Koken M.** 2008. Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **289**:34-40.
33. **Zhou L, Srisatjaluk D, Justus DE, Doyle RJ.** 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:223-228.
34. **Mashburn-Warren L, McLean JC, Whiteley M.** 2008. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology* **6**:214-219.
35. **Paillard C, Allam B, Oubella R.** 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* **59**:249-262.
36. **Reid HI, Soudant P, Lambert C, Paillard C, Birkbeck TH.** 2003. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* **56**:249-258.
37. **Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Givskov M, Whitchurch CB, Engel JN, Tolker-Nielsen T.** 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**:2331-2343.
38. **Berk V, Fong CNF, Dempsey GT, Develioglu ON, Zhuang X, Liphardt J, Yildiz F, Chu S.** 2012. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science* **13**:236-239.
39. **Harvell CD, Kim K, Burkholder JM, Colwell R, Epstein PR, Grimes DJ, Hofmann EE, Lipp EK, Osterhaus ADME, Overstreet RM, Porter JW, Smith GW, Vasta GR.** 1999. Emerging marine disease – climate links and anthropogenic factors. *Science* **285**:1505-1510.
40. **Paillard C, Maes P, Mazuries J, Claude S, Marhic A, Le Pennec M.** 1997. Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence. *Proc. VIIIe Symp. Int. Soc. Veterinary Epidemiology and Economics* **31/32**:14.03.1-14.03.3.

41. **Chu FLE, LaPeyre JF, Burreson CS.** 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in Eastern oysters, *Crassostrea virginica* – salinity effects. *J. Invertebr. Pathol.* **62**:226-232.
42. **Hauton C, Hawkins LE, Hutchinson S.** 2000. The effects of salinity on the interaction between a pathogen (*Listonella anguillarum*) and components of a host (*Ostrea edulis*) immune system. *Comp. Biochem. Physiol. B* **127**:203-212.
43. **Justice SS, Hunstad DA, Cegelski L, Hultagren SJ.** 2008. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:162-168.
44. **Watnick PI, Kolter R.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* **34**:586-595.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental movie 1 *V. tapetis* CECT4600 biofilm formation (first 18 h). Time-lapse movie, an image was recorded every 10 min with a CLSM.

Supplemental movie 2 *V. tapetis* LP2 biofilm formation (first 16 h). Time-lapse movie, an image was recorded every 10 min with a CLSM.

11.3 Résultats complémentaires

Dans cette partie, des résultats complémentaires sont exposés afin de clarifier certains points non développés ou non évoqués dans l'article présenté § 11.2. En annexe de ce chapitre sera présenté également un panel d'images de microscopie électronique des biofilms de *V. tapetis*.

11.3.1. Caractérisation des composants sphériques

Lors des observations réalisées en MCBL ainsi qu'en MEB, des composants sphériques de nature inconnue ont été observés, le plus souvent au niveau de la partie haute du biofilm. Ceux-ci sont très abondants à 48h de croissance du biofilm et retrouvés dans toutes les conditions testées. Ces composants particuliers du biofilm de *V. tapetis* n'ont pas été observés lors de cultures de la souche CECT4600-GFP en milieu liquide (Figure 31), il semblerait donc que ces composants soient spécifiques de *V. tapetis* CECT4600 lorsqu'elle se trouve en biofilm.

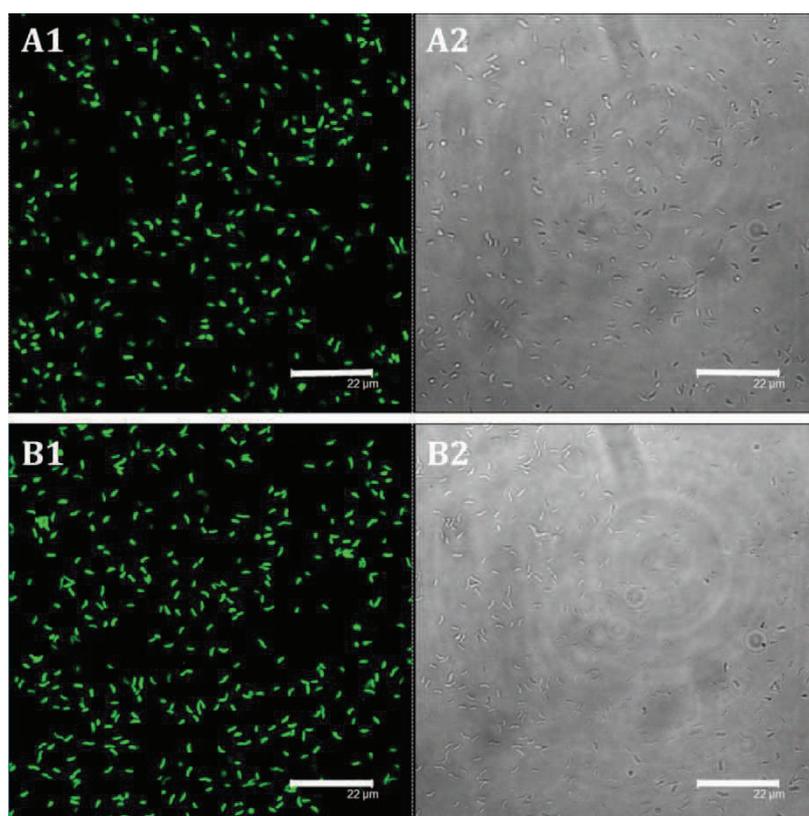


Figure 31 : Observations au MCBL en fluorescence (1) et en contraste de phase (2) de cultures liquides de *V. tapetis* CECT4600-GFP cultivée en milieu Zobell à 18°C. (A1 et A2) : culture de 24h ; (B1 et B2) : culture de 48h. (A1 et B1) : les bactéries sont observées par détection de la fluorescence de la GFP. Echelle : 22 µm.

Parmi les hypothèses considérées pour expliquer la présence de ces composants sphériques, la nature vésiculaire de ces structures a été envisagée. La littérature nous indique que de nombreux microorganismes sont capables de former des vésicules membranaires, phénomène fréquent chez les bactéries à Gram négatif (Zhou *et al.*, 1998). Ces vésicules sont définies dans une gamme de taille allant de 50 à 250 nm (Mashburn-Warren *et al.*, 2008). Chez *V. tapetis*, nous avons observé ce phénomène dans le biofilm de la souche LP2 (Figure 32). Lors de ces observations en MEB, nous avons pu comparer la structure et la taille des vésicules membranaires à celles des composants sphériques également présents dans le biofilm de *V. tapetis*. Il apparaît clairement que ces composants sont d'une taille très supérieure (1 à 2 μm de diamètre) à celle des vésicules ($\sim 0,1 \mu\text{m}$). De plus, il semblerait également que ces composants sphériques sont eux-mêmes capables de produire des vésicules à leur surface (Figure 32).

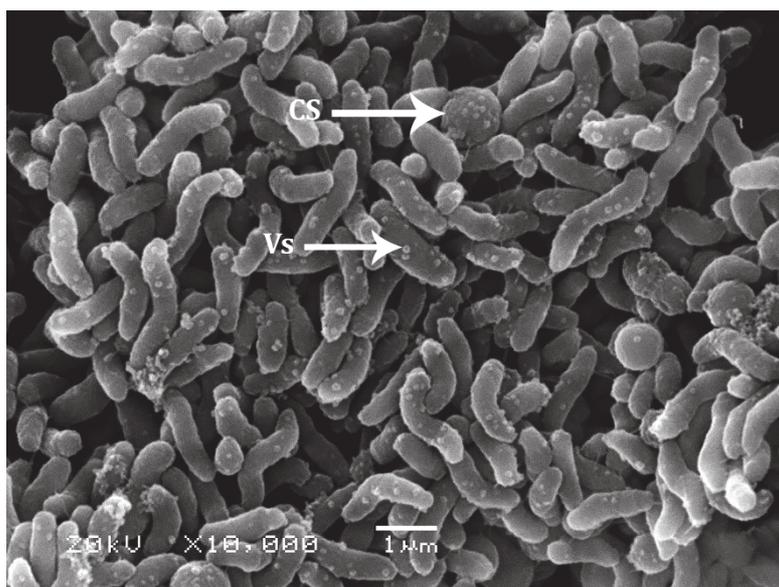


Figure 32 : Observation en MEB d'un biofilm de 48h formé par *V. tapetis* LP2 en milieu Zobell à 18°C. CS : composant sphérique ; Vs : vésicules. Echelle : 1 μm .

11.3.2. Effet des variations des conditions de culture

L'étude de bactéries marines, comme *V. tapetis*, implique la prise en compte des variations de l'environnement naturel de la bactérie. Pour cela, nous avons voulu observer l'effet des variations des conditions de culture des biofilms.

Pour chaque condition testée, des cinétiques de croissance en milieu liquide ont été réalisées afin de vérifier que celles-ci ne modifiaient pas la croissance de la bactérie (Figure 33).

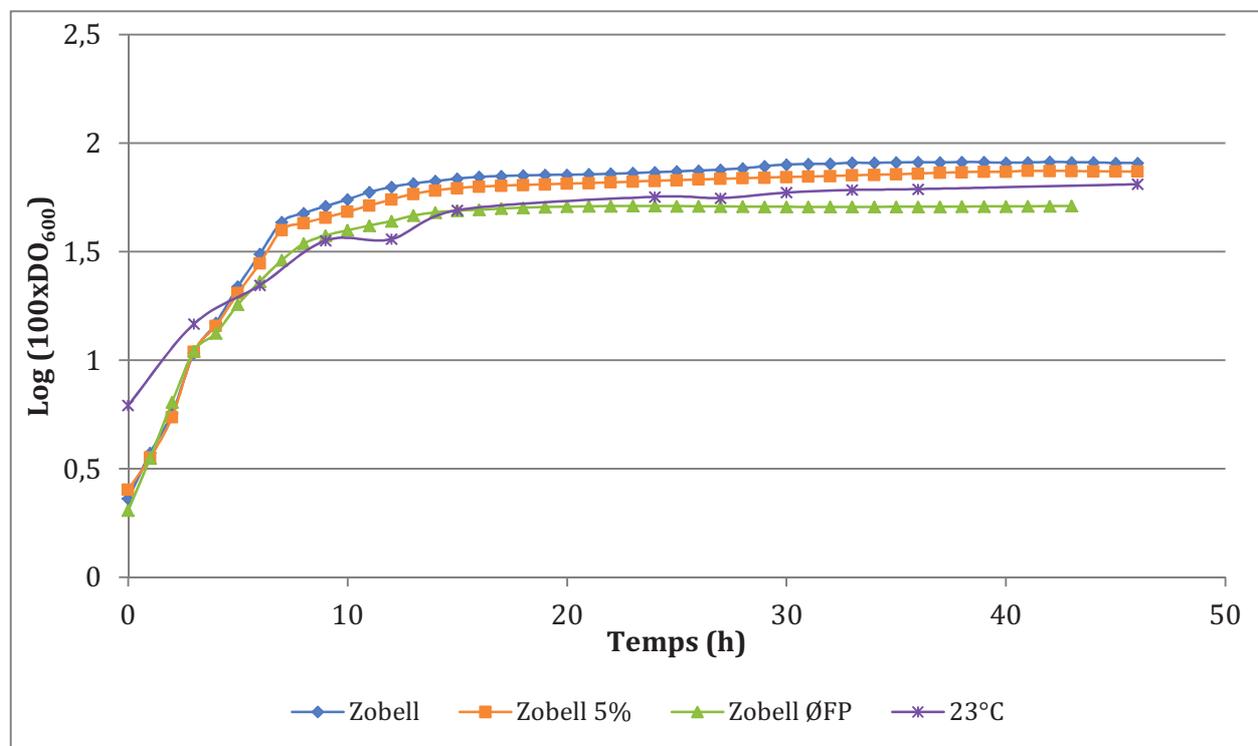


Figure 33 : Cinétiques de croissance en milieu liquide de *V. tapetis* CECT4600 en fonction des variations de conditions de culture. La bactérie a été cultivée en milieu Zobell (losanges bleus) ou Zobell 5% (50 g.l⁻¹ de sels marins au lieu de 30 g.l⁻¹) (carrés oranges) ou Zobell sans phosphate ferrique (ØFP) (triangles verts) à 18°C ou bien en milieu Zobell à 23°C (étoiles mauves).

11.3.2.1. Effet de la salinité

Dans l'article présenté § 11.2, nous avons montré que l'augmentation de la salinité du milieu Zobell jusqu'à 5% de sels marins au lieu de 3%, entraînait une augmentation de la biomasse du biofilm de *V. tapetis*, la présence de cellules de forme allongée ainsi que de nombreux composants sphériques. L'effet de la modification de la salinité du milieu de culture a d'abord été vérifié sur la croissance bactérienne en milieu liquide. Le choix s'est porté sur le milieu Zobell à 5% de sels marins (50 g.l⁻¹ de sea salts) car il s'agit de la valeur de plus forte salinité n'affectant pas la croissance bactérienne par rapport au milieu Zobell de référence (30 g.l⁻¹ de sea salts), comme en témoigne la Figure 33.

Comme nous l'avons évoqué dans l'article § 11.2, la présence de cellules de forme allongée et de nombreux composants sphériques dans les biofilms de *V. tapetis* CECT4600 cultivés en

milieu Zobell 5% n'a pas été observée dans des cultures liquides de *V. tapetis* CECT4600. Des croissances en milieu liquide Zobell 5% de *V. tapetis* CECT4600 ont permis de constater par microscopie que les bactéries n'adoptent pas cette morphologie filamenteuse lorsqu'elles sont sous forme planctonique comme en atteste la Figure 34. Il semblerait donc que l'augmentation de la salinité affecte la morphologie des bactéries uniquement quand celles-ci se trouvent en biofilm.

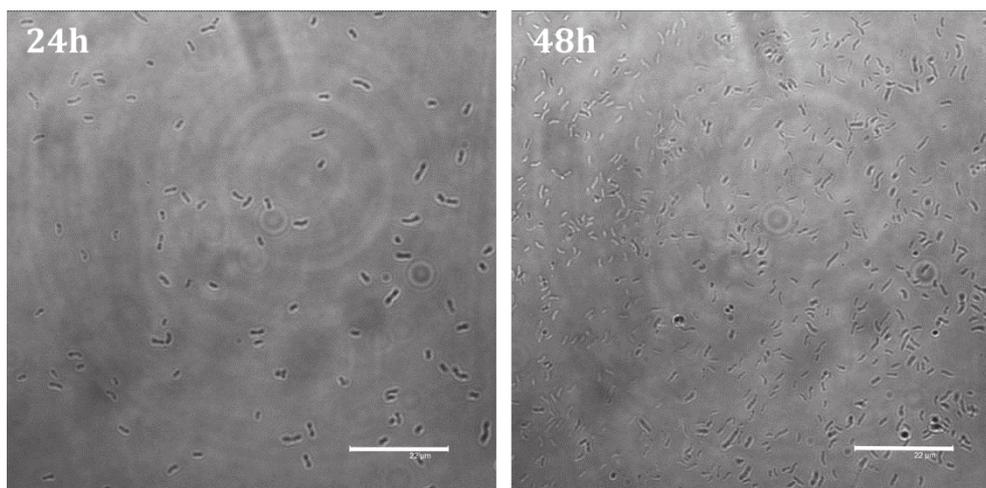


Figure 34 : Observations en contraste de phase au MCBL de cultures liquides de *V. tapetis* CECT4600 à 24h et 48h de croissance en milieu Zobell 5% à 18°C. Echelle : 22 µm.

11.3.2.2. Effet de l'augmentation de la température

Un des facteurs clef pour le développement de la MAB est la température. Une étude ultérieure a montré que l'augmentation de la température ($\geq 21^{\circ}\text{C}$) réduisait la prévalence de la maladie (Paillard *et al.*, 2004b). Des expériences préliminaires ont montré que 23°C est la température la plus élevée n'affectant pas la croissance bactérienne en culture liquide par rapport à la température optimale de 18°C (Figure 33). C'est donc la température de 23°C qui a été choisie pour examiner l'effet de l'augmentation de ce paramètre sur la formation de biofilm.

La température de 23°C n'affecte pas significativement le développement du biofilm de *V. tapetis* pendant les 24 premières heures. En effet, à cette température, *V. tapetis* CECT4600 est capable de former en 24h un biofilm dont la structure et le biovolume sont très proches de ceux d'un biofilm formé en condition standard (18°C) (Figures 35 et 36). Cependant, entre 24 et 48h, la biomasse n'évolue pas de la même manière dans la condition standard (18°C) et à

23°C (Figure 36). L'augmentation de la température jusqu'à une valeur affectant la prévalence de la MAB n'empêche pas le développement d'un biofilm par *V. tapetis* CECT4600, mais limite sa croissance entre 24 et 48h.

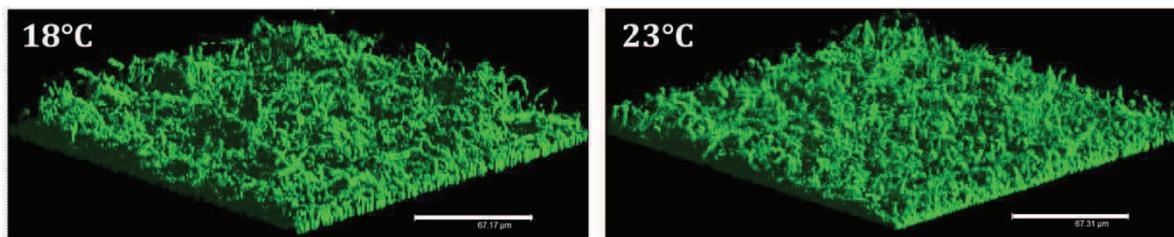


Figure 35 : Représentations tridimensionnelles du biofilm de *V. tapetis* CECT4600 cultivée à 18°C ou 23°C en milieu Zobell pendant 24h. Observations en MCBL après un marquage des cellules au SYTO 9 (5 µM).

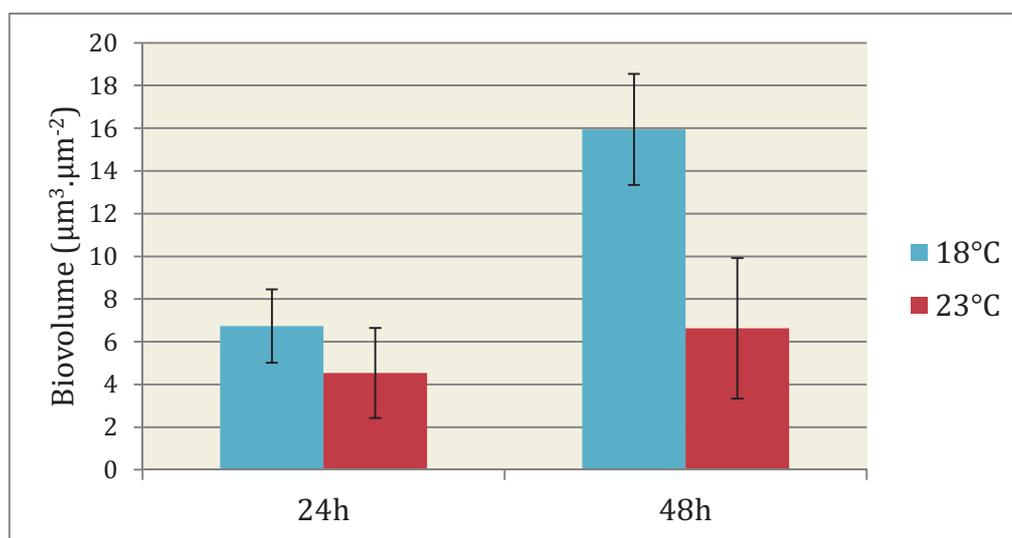


Figure 36 : Effet de la température de culture sur la biomasse du biofilm de *V. tapetis* CECT4600 à 24h et 48h de croissance. Les biofilms sont formés en chambre à flux et en milieu Zobell à 18°C (condition standard) ou 23°C. Données obtenues par analyse d'images à l'aide du logiciel COMSTAT, à partir de prises de vues d'au moins trois sites distincts et d'au moins deux expériences indépendantes.

11.3.2.3. Effet de la présence de fer

Le fer est un élément essentiel à la croissance des microorganismes. Il est retrouvé en général en très faible quantité dans l'environnement, incitant les bactéries à mettre en place des systèmes complexes et performants pour le récupérer (Crosa *et al.*, 2004). La capacité des bactéries à rivaliser pour acquérir le fer à la fois dans leur environnement et leur hôte est un facteur très important pour leur croissance et leur dissémination. De plus, de nombreuses

bactéries, dont celles qui appartiennent au genre *Vibrio*, possèdent des systèmes de transport du fer clairement décrit comme étant impliqués dans leur virulence (Wang *et al.*, 2008 ; Alice *et al.*, 2008). De plus, la présence de phosphate ferrique (PF) favoriserait la virulence de *V. tapetis* CECT4600 (Paillard, communication personnelle).

L'effet de la carence en PF a également été vérifié sur la croissance bactérienne en milieu liquide. Dans le milieu Zobell sans PF la croissance bactérienne n'est pas affectée pendant la phase exponentielle mais atteint une DO finale plus faible (Figure 33).

La suppression, dans le milieu Zobell, de la source de fer que constitue le PF n'engendre pas de différence significative sur le développement du biofilm de *V. tapetis* CECT4600. La biomasse de celui-ci est sensiblement la même que dans la condition standard (milieu Zobell contenant 0,1 g.l⁻¹ de PF), que ce soit à 24 ou 48h de culture (Figure 37).

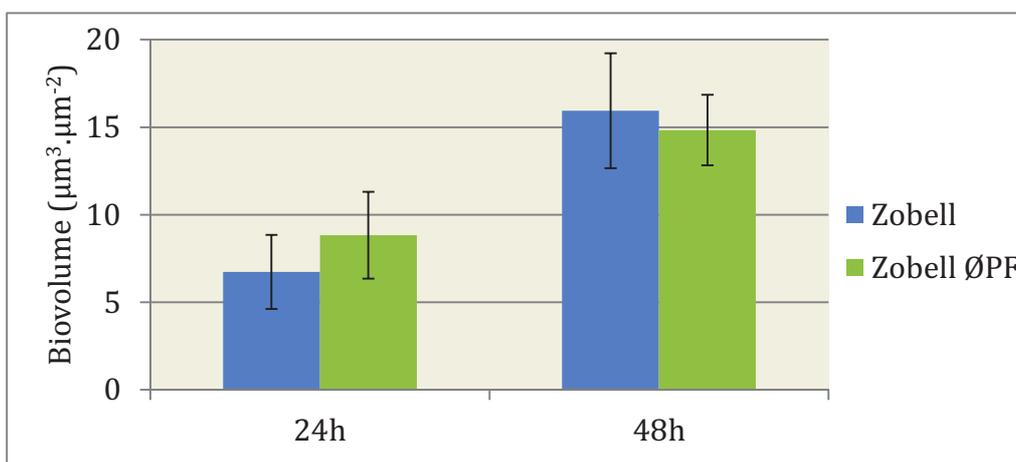


Figure 37 : Effet sur la biomasse du biofilm de *V. tapetis* CECT4600 à 24h et 48h de culture de la suppression de la source de fer dans le milieu Zobell. Les biofilms sont formés en chambre à flux à 18°C en milieu Zobell (0,1 g.l⁻¹ de PF) ou Zobell sans PF (ØPF). Données obtenues par analyse d'images à l'aide du logiciel COMSTAT, à partir de prises de vues d'au moins trois sites distincts et d'au moins deux expériences indépendantes.

12. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Lors de cette étude, nous avons caractérisé pour la première fois le biofilm du pathogène de la palourde japonaise, *V. tapetis*. Plus particulièrement, la capacité à former du biofilm *in vitro* de deux souches de *V. tapetis*, CECT4600 et LP2 a été examinée. Ces deux souches pourtant très proches d'un point de vue génétique, mais pathogènes d'organismes marins différents (la palourde *R. philippinarum* et le poisson *S. melops*), présentent des différences dans leurs biofilms, aussi bien au niveau de leurs architectures que dans la distribution des composants de leurs matrices extracellulaires. CECT4600 et LP2 sont capables de coloniser entièrement le substrat en verre en moins de 12h sans utiliser de motilité de surface et de former un biofilm mature en 24h.

Les nombreuses observations du biofilm de la souche référence CECT4600 par différentes techniques de microscopie ont permis de mettre en évidence de manière récurrente la présence de composants sphériques dans la matrice des biofilms de *V. tapetis*. De manière générale, toutes les souches de *V. tapetis* testées, qu'elles soient pathogènes ou non de la palourde japonaise, ont arboré des architectures de biofilm différentes mais ont toutes présenté la particularité de produire ces composants sphériques dans leur biofilm. Ces composants ont été clairement observés en microscopie électronique (MEB et MET), affichant un aspect de surface différent de celui de la bactérie et une taille estimée de 1 à 5 μm . La microscopie électronique à transmission a permis de montrer que l'organisation ultrastructurale de ces composants sphériques était différente de celle des cellules bactériennes. Ces observations confortent notre hypothèse que les composants seraient des excroissances des bactéries auxquelles ils seraient physiquement attachés. En effet, l'observation de ces composants dans les biofilms de la souche CECT4600-GFP ainsi que leur marquage par des marqueurs d'ADN fluorescents, nous permettent de suggérer une communication du cytoplasme entre la bactérie et le composant sphérique. Bien qu'il semble que l'observation de tels composants de la matrice d'un biofilm soit inédite, plusieurs hypothèses quant à la nature de ces structures, ont été écartées. Nous pensons qu'il ne peut s'agir de vésicules membranaires à la vue de leur taille supérieure à 1 μm . De même que la présence de cellules de *V. tapetis* Viables Non Cultivables (VNC) paraît peu probable. Cet état bactérien particulier est décrit dans la littérature comme une stratégie de survie adoptée par les bactéries en réponse à des conditions environnementales difficiles (Oliver, 2010). Des observations en MCBL de cellules VNC de *V. cholerae*, obtenues après 84 jours d'incubation à

4°C et dans le noir, ont été récemment rapportées (Senoh *et al.*, 2010). Si les formes VNC de *V. cholerae* possèdent elles aussi une morphologie sphérique, la formation de cellules VNC dans nos conditions de culture du biofilm de *V. tapetis* ne semble pas être en accord avec la définition donnée. En effet, la température (18°C) et le milieu (Zobell) utilisés en condition standard ont été choisis pour être des paramètres optimaux de croissance pour *V. tapetis*.

D'autre part, ces composants sphériques ont été spécifiquement retrouvés en biofilm et non en culture liquide. Les perspectives d'étude devront viser à déterminer la nature exacte de ces composants sphériques. Des conditions de culture de biofilm dans lesquelles les composants sphériques ne sont pas retrouvés pourront être recherchées.

ANNEXE

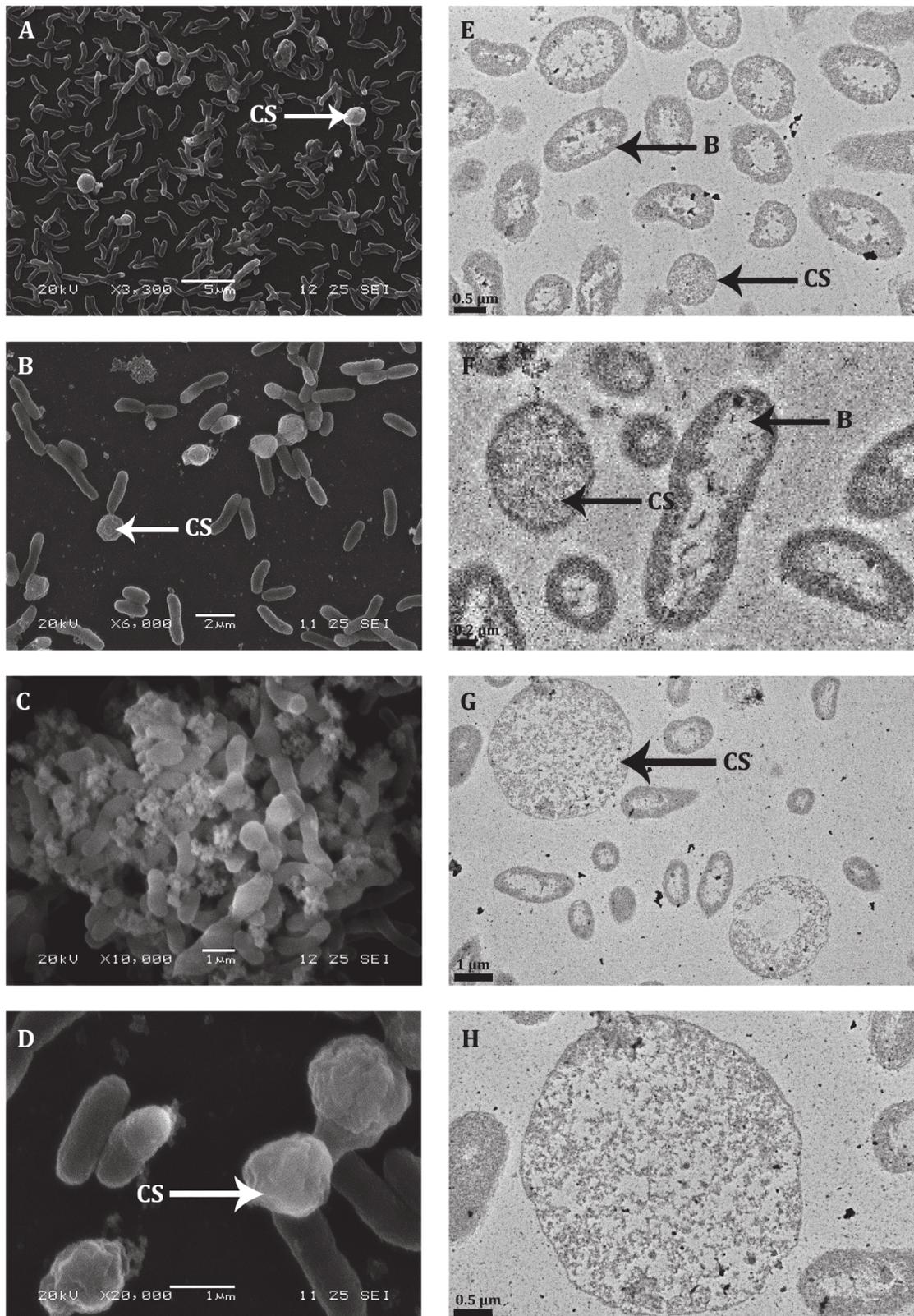


Figure 38 : Images de microscopie électronique de biofilms de 48h de *V. tapetis* CECT4600. [A-D] : prises de vues en MEB ; [E-H] : prises de vues en MET. B : bactéries ; CS : composants sphériques.

CHAPITRE II

Étude de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *Vibrio tapetis*

13. INTRODUCTION

La capacité des bactéries à établir un biofilm va en partie dépendre de l'expression de certains gènes. La régulation de l'expression de ces gènes va en particulier conditionner les différentes étapes de la formation d'un biofilm. Plusieurs études ont déjà mis en évidence les variations d'activité génétique des bactéries lorsqu'elles se trouvent en biofilm (Whiteley *et al.*, 2001 ; Schembri *et al.*, 2003), illustrant ainsi le rôle clé de certains gènes dans le développement des biofilms. Comme nous l'avons déjà évoqué, il n'existe pas de modèle unique de formation de biofilm, cependant certains gènes ont été largement décrits chez plusieurs espèces bactériennes pour leur rôle avéré dans la formation de biofilms. Ces gènes sont notamment impliqués dans les étapes d'adhésion, de synthèse des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire ou encore dans la communication bactérienne (QS). L'étude de ces gènes « clés » apparaît donc comme indispensable pour la compréhension de la mise en place d'un biofilm.

Chez *V. tapetis*, très peu de gènes impliqués dans sa pathogénicité (Lakhal *et al.*, 2008) ont été décrits et aucun concernant la formation de biofilm n'a jusqu'à présent été identifié. C'est vers cet aspect que nous nous sommes dirigés pour tenter d'apporter de nouvelles données concernant la description de gènes impliqués dans des fonctions liées à la formation de biofilm chez *V. tapetis*. Nous avons dans un premier temps recherché dans le génome de *V. tapetis* la présence de gènes potentiellement impliqués dans la formation de biofilm. En s'appuyant sur ce qui est décrit dans la littérature chez d'autres *Vibrio*, nous avons identifié plusieurs de ces gènes et, afin de mettre en évidence et d'examiner expérimentalement leur rôle dans la formation de biofilm chez *V. tapetis*, CECT4600 nous avons cherché à inactiver certains d'entre eux.

Très peu d'outils moléculaires permettant la mutagénèse chez *V. tapetis* sont actuellement disponibles et l'inactivation de gènes par double recombinaison homologue n'avait encore jamais été réussie chez ce *Vibrio*. Seul le mutant $\Delta djIA$, obtenu par simple recombinaison homologue, a été décrit (Lakhal *et al.*, 2008) et pour nos travaux nous avons pu nous baser sur les outils développés au cours de cette étude. La deuxième partie de cette étude fut donc consacrée à la construction de mutants de *V. tapetis*. Cette partie a été réalisée en collaboration avec A. Jacq (IGM, Université de Paris Sud), notamment à travers un séjour dans son équipe de recherche, afin d'être initié aux méthodes de clonages et de conjugaison utilisés chez d'autres *Vibrio*.

14. RECHERCHE DE GENES POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LA FORMATION DE BIOFILM

La première étape de ce travail a été d'identifier dans le génome de *V. tapetis* CECT4600 des gènes pouvant être impliqués dans des fonctions liées à la formation de biofilm (Tableau 7). Pour cela, les séquences de gènes décrits dans la littérature comme ayant un rôle dans la formation de biofilm chez d'autres espèces du genre *Vibrio* ont été recherchées par homologie dans le génome de *V. tapetis*. Celui-ci a entièrement été séquencé et en partie annoté par la plateforme « MicroScope, Microbial Genome Annotation & Analysis » (MaGe, www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php).

Tableau 7 : Gènes identifiés chez *V. tapetis* CECT4600 pouvant être impliqués dans des fonctions liées à la formation de biofilm. (Données obtenues à partir de l'outil MaGe).

Identification de l'ORF chez <i>V. tapetis</i> CECT4600	Produit du gène	Nom du gène	Taille (pb)	Fonction liée à la formation de biofilm
VIBTA _{v3} _B1771	CAI-1 autoinducteur synthase (<i>V. cholerae</i> quorum-sensing autoinducer)	<i>cqsA</i>	1176	Quorum Sensing
VIBTA _{v3} _A10116	S-ribosylhomocysteine lyase (enzyme de synthèse d'AI-2)	<i>luxS</i>	516	Quorum Sensing
VIBTA _{v3} _B1514	putatif anti-anti-facteur sigma SypA	<i>sypA</i>	330	Biosynthèse de polysaccharides
VIBTA _{v3} _B1513	Protéine de la membrane externe	<i>sypB</i>	852	Biosynthèse de polysaccharides
VIBTA _{v3} _B1512	Putative protéine périplasmique SypC, impliquée dans le transport d'exopolysaccharides	<i>sypC</i>	2151	Biosynthèse de polysaccharides
VIBTA _{v3} _B1511	Protéine de biosynthèse d'exopolysaccharide SypD	<i>sypD</i>	690	Biosynthèse de polysaccharides
VIBTA _{v3} _A22453	Piline MshA3, sous-unité protéique du pilus MSHA (mannose sensitive hemagglutinin)	<i>mshA-3</i>	480	Adhésion
VIBTA _{v3} _A22454	Piline MshA2, sous-unité protéique du pilus MSHA (mannose sensitive hemagglutinin A)	<i>mshA-2</i>	435	Adhésion
VIBTA _{v3} _A22455	Piline MshA1, sous-unité protéique du pilus MSHA (mannose sensitive hemagglutinin A)	<i>mshA-1</i>	474	Adhésion
VIBTA _{v3} _A10251	Putative sous-unité de pili de type IV – 39,32% d'homologie avec la protéine Pila chez <i>V. tapetis</i> LP2	(<i>pilA</i>)	459	Biosynthèse de pili de type IV – Adhésion
VIBTA _{v3} _A10249	PilC, protéine d'assemblage de pili de type IV	<i>pilC</i>	1233	Biosynthèse de pili de type IV – Adhésion
VIBTA _{v3} _A10248	Protéine homologue à PilD, prepiline peptidase (biosynthèse du pilus de type IV)	<i>vvpD</i>	537	Biosynthèse de pili de type IV – Adhésion

ORF : Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture).

Une analyse *in silico* du génome de *V. tapetis* CECT4600 a été réalisée à l'aide de l'outil MaGe (www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home) et a permis d'identifier de manière non-exhaustive 12 gènes potentiellement engagés dans des activités liées à la formation de biofilm, certains impliqués dans le QS, d'autres dans la formation de pili ou encore dans la synthèse de polysaccharides (Tableau 7).

Toutes les valeurs de pourcentage d'identité des séquences de gènes ou de similarité des séquences protéiques, données ci-après, ont été obtenues à partir de la plateforme MaGe.

14.1. Les gènes impliqués dans les fonctions d'adhésion

Dans le génome de *V. tapetis* CECT4600, nous avons pu identifier plusieurs gènes pouvant être impliqués dans la biosynthèse de pili de type IV (Tableau 7). Parmi eux, le gène *pilC* dont le produit est une protéine d'assemblage de pili de type IV. Ce gène est retrouvé sur le chromosome A sur un locus proche de deux autres gènes, *vvpD* et *tapB* avec l'organisation présentée figure 39.

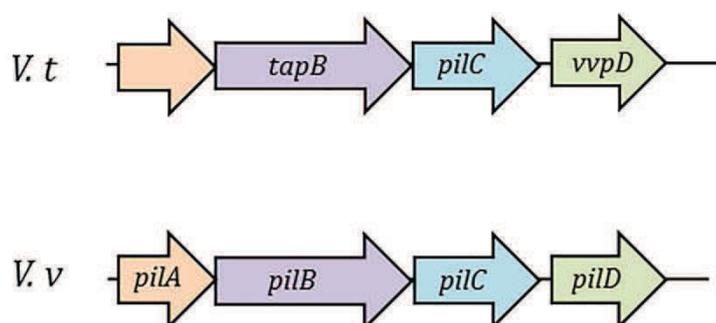


Figure 39 : Représentation schématique de l'organisation des clusters de gènes de biosynthèse du pilus de type IV chez *V. tapetis* CECT4600 (V.t) et *V. vulnificus* CMCP6 (V.v). (Données obtenues à partir de l'outil MaGe).

Le produit de *vvpD* est une pré-piline peptidase présentant plus de 65% d'homologie avec la protéine PilD (anciennement appelé VvpD) de *V. vulnificus*. Le produit de *tapB* est une protéine d'assemblage d'un pilus de type IV présentant aussi une forte homologie (>61%) avec la protéine PilB de *V. vulnificus*. De manière intéressante, ces trois gènes se trouvent proches d'un ORF dont le produit pourrait être une sous-unité de pili, présentant plus de 32% d'homologie avec la protéine PilA de *V. vulnificus* et plus de 39% avec PilA de *V. tapetis* LP2.

Les fortes homologies qui existent entre ces différentes protéines de *V. tapetis* et *V. vulnificus* suggèrent que ces protéines possèdent des fonctions proches. Ainsi chez *V. vulnificus*, plusieurs études ont montré que les gènes *pilABCD* et notamment *pilA* contribuaient à l'adhérence et la virulence de la bactérie, ainsi qu'à la formation de biofilm (Paranjpye *et al.*, 1998 ; Paranjpye & Strom, 2005). Chez la bactérie modèle *P. aeruginosa*, la protéine PilA joue également un rôle dans la formation de biofilm puisque des mutants $\Delta pilA$ développent des biofilms dont l'architecture est désorganisée par rapport au biofilm de la souche sauvage (Klausen *et al.*, 2003).

D'autres pili de type IV sont également impliqués dans la formation de biofilm, comme le pilus MSHA. Ce genre de pilus est notamment présent chez *V. cholerae* et peut jouer un rôle dans la formation de biofilm de la souche El Tor (Watnick *et al.*, 1999). Dans cette étude, les auteurs ont montré que la mutation du gène *mshA* réduisait significativement la formation de biofilm sur certains supports comme le verre et la cellulose. Chez *V. tapetis* CECT4600, nous avons identifié trois gènes, *mshA-1*, *mshA-2* et *mshA-3*, dont les produits sont des sous-unités de la protéine MshA (Tableau 7).

14.2. Les gènes impliqués dans la synthèse d'exopolysaccharides

La croissance tridimensionnelle d'un biofilm requiert la production de composants de la matrice extracellulaire tels que des exopolysaccharides, permettant notamment de maintenir une cohésion entre les cellules ainsi que l'adhérence à la surface. Chez les *Vibrio*, la synthèse de ces EPS a souvent été corrélée avec la présence de deux clusters de gènes, *vps* (Yildiz et Schoolnik, 1999) et *syp* (Yip *et al.*, 2005). Chez *V. tapetis* CECT4600, le locus *vps* ne semble pas être présent, en revanche une partie des gènes *syp* a été identifiée (Tableau 7). L'intégralité des gènes présents sur ce locus chez *V. tapetis* n'a pas encore la dénomination *syp* dans la base de données MaGe. Cependant le pourcentage d'identité (de 38 à 70%) des séquences de ces gènes présents chez *V. tapetis* et *V. fischeri*, ainsi que leur organisation (Figure 40), laissent supposer que ce cluster de gènes est bien conservé chez *V. tapetis* CECT4600.

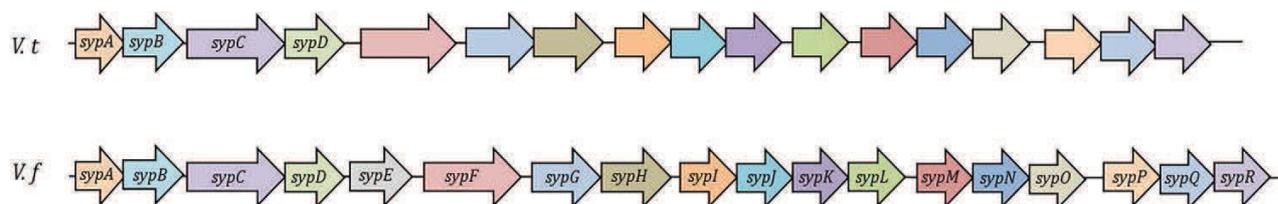


Figure 40 : Représentation schématique de l'organisation du locus *syp* chez *V. tapetis* CECT4600 (V.t) et *V. fischeri* ES114(V.f). (Données obtenues à partir de l'outil MaGe).

Chez *V. fischeri*, l'expression des gènes *syp* favorise la formation de biofilm, ainsi que la mise en place de la symbiose entre ce *Vibrio* et son hôte (Yip *et al.*, 2005).

14.3. Les gènes impliqués dans la communication bactérienne (QS)

Comme nous avons pu le voir au cours de l'étude bibliographique, la communication bactérienne joue un rôle important dans la formation de biofilm et en particulier chez les espèces appartenant au genre *Vibrio*. Même si pour l'instant aucun système de communication de type QS n'a été décrit chez *V. tapetis*, nous avons recherché dans son génome si certains d'entre eux étaient présents. L'analyse *in silico* a montré l'existence de deux gènes codant pour des enzymes de synthèse de molécules de communication, les gènes *luxS* et *cqsA*.

Le produit du gène *luxS* est une S-ribosylhomocysteine lyase responsable de la synthèse d'AI-2. LuxS de *V. tapetis* CECT4600 présente plus de 86% d'homologie avec la protéine LuxS présente chez *V. cholerae* et plus de 85% avec celle présente chez *V. fischeri*. Le système LuxS/LuxPQ est connu pour contrôler la formation de biofilm chez de nombreux vibrions tels que *V. cholerae* (Hammer et Bassler, 2003) ou encore chez *V. scopthalmi* (Garcia-Aljaro *et al.*, 2012).

Enfin, le gène *cqsA*, qui est responsable de la biosynthèse de l'autoinducteur CAI-1, a également été retrouvé dans le génome de *V. tapetis* CECT4600. Le produit de ce gène possède plus de 55% d'homologie avec la protéine CqsA de *V. cholerae* chez qui ce système de QS a été décrit pour la première fois (Miller *et al.*, 2002).

L'étude effectuée *in silico* du génome de *V. tapetis* CECT4600 a permis d'identifier plusieurs gènes dont les produits pourraient être impliqués dans des fonctions liées à la formation de biofilm. Les forts pourcentages d'homologies entre les produits de ces gènes et les protéines décrites chez d'autres *Vibrio* font de ces gènes de bons candidats à la mutagenèse afin

d'examiner leur rôle dans le développement du biofilm du pathogène de la palourde japonaise.

15. MUTAGÉNÈSE PAR DÉLÉTION DE GÈNES CIBLES

Les outils moléculaires disponibles pour la mutagénèse de bactéries telles que *V. tapetis* restent encore très limités, et les techniques de mutagénèse chez ce *Vibrio* sont encore en cours de perfectionnement. À ce jour, la mutagénèse dirigée par recombinaison homologue chez *V. tapetis* CECT4600 n'a été tenté avec succès qu'une seule fois (Lakhal *et al.*, 2008). Au cours de ces travaux de thèse, nous avons eu pour ambition de mettre au point un protocole de mutagénèse dirigée par double recombinaison homologue. C'est pourquoi dans la partie qui suit, une stratégie de construction du plasmide de mutagénèse qui avait été envisagée au début de l'étude sera présentée. Nous avons choisi de ne pas intégrer ce protocole au chapitre Matériels et Méthodes mais de le présenter ici.

Les souches d'*E. coli* (Tableau 3 du chapitre Matériels et Méthodes) utilisées pour la mutagénèse lors de cette étude nous ont été gracieusement fournies par F. Le Roux (Station Biologique de Roscoff) et A. Jacq (IGM, Université de Paris Sud). Ces souches ont été spécifiquement construites pour répliquer le vecteur de mutagénèse pSW7848, et réaliser de la conjugaison biparentale avec différents *Vibrio*.

15.1. Construction plasmidique

Le vecteur utilisé pour la mutagénèse dirigée chez *V. tapetis* est le plasmide pSW7848 (Figure 41).

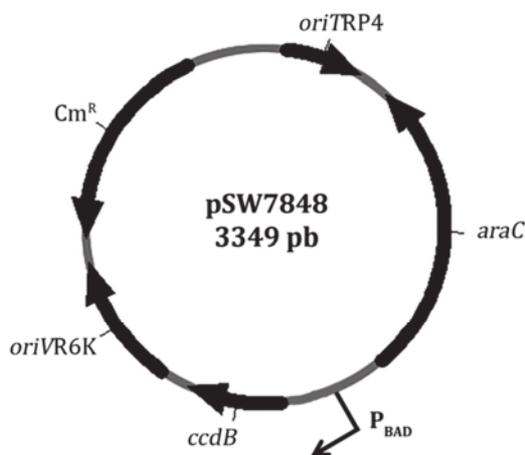


Figure 41 : Cartographie du vecteur pSW7848 utilisé pour la mutagénèse dirigée chez *V. tapetis*. *ccdB* : gène codant pour la toxine CcdB ; *araC* : gène codant pour le régulateur de l'opéron arabinose AraC. P_{BAD} : promoteur inducible par le complexe AraC/arabinose.

Ce vecteur est répliatif en faible nombre de copies chez les souches *d'E. coli* GEB et non répliatif chez *V. tapetis* qui ne possède pas le gène *pir* nécessaire à la réplication du vecteur à partir de l'origine RP4.

La première stratégie de mutagenèse imaginée avait pour but de déléter la partie centrale du gène à inactiver en utilisant pSW7848. La construction du plasmide utilisé pour la mutagenèse avait d'abord été menée selon la méthode présentée Figure 42.

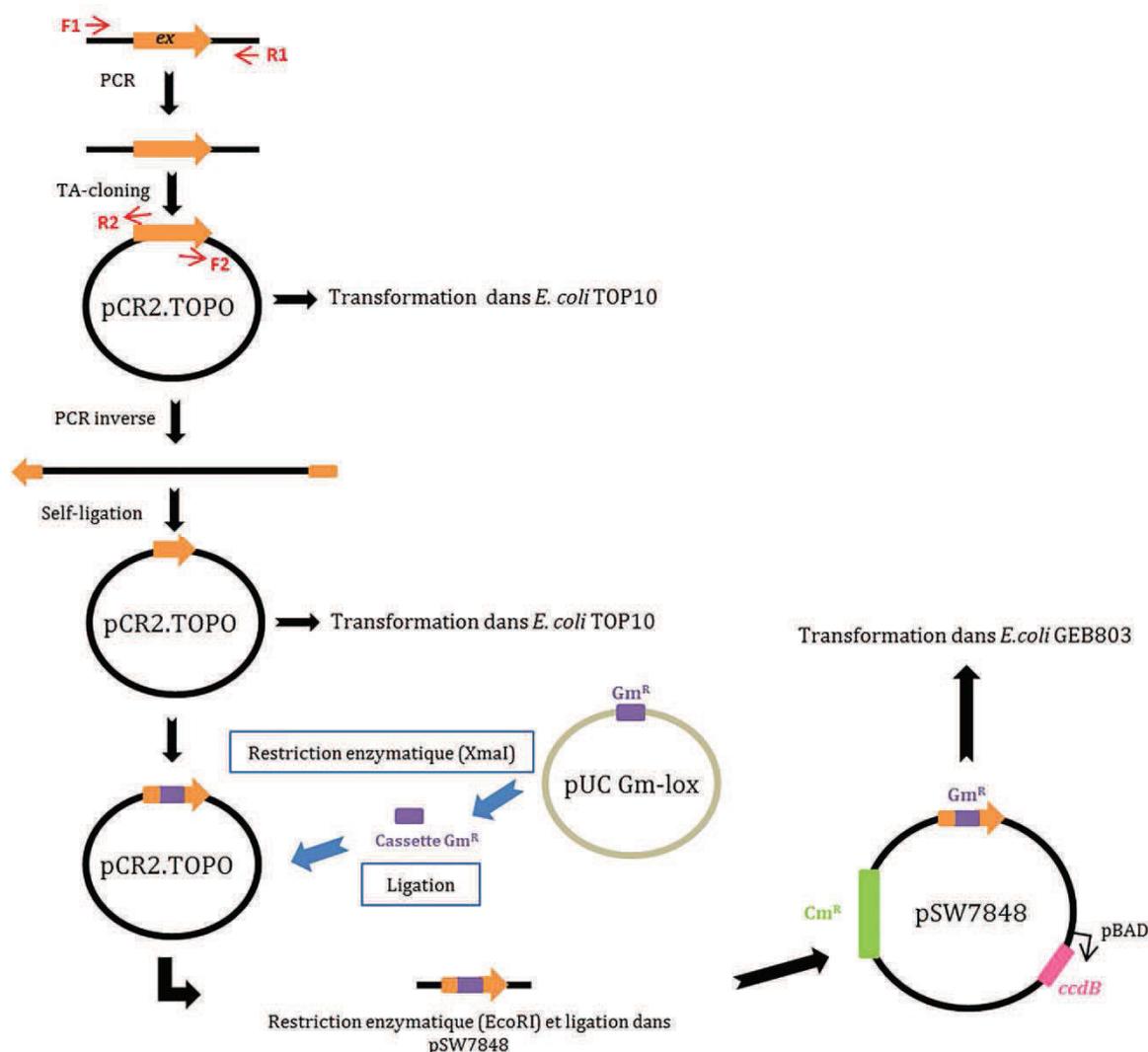


Figure 42 : Schéma récapitulatif de la première stratégie de construction du plasmide utilisé pour la mutagenèse dirigée. *ex* : gène exemple ; F1/R1 et F2/R2 : amorces utilisées ; self-ligation : étape de recircularisation du plasmide ; Gm^R : cassette de résistance à la gentamycine ; Cm^R : résistance au chloramphénicol ; *ccdB* : gène codant pour la toxine CcdB ; P_{BAD} : promoteur inducible par le complexe AraC/arabinose.

Tout d'abord, une PCR utilisant les amorces F1/R1 permettait d'amplifier le gène d'intérêt (appelé ici pour l'exemple *ex*) ainsi qu'une partie des régions flanquant ce gène (environ 300 pb en amont et en aval du gène). Le produit de cette PCR était cloné dans le vecteur commercial pCR2.1TOPO (Invitrogen). La technique du « TA-cloning » utilisée avec ce vecteur permet un clonage rapide du produit PCR sans réaliser de restrictions enzymatiques au préalable. Une seconde PCR dite « inverse » permettait d'amplifier l'intégralité du plasmide ainsi que le début et la fin du fragment cloné, supprimant de ce fait la partie centrale du gène *ex*.

Le plasmide linéaire amplifié par PCR était ensuite recircularisé sous l'action d'une ligase. La paire d'amorces (F2/R2) utilisée pour la PCR « inverse » permettait d'inclure un site de restriction *Xma*I. La présence de ce site sur le plasmide recircularisé permettait d'insérer dans le gène *ex* une cassette de résistance à la gentamycine (Gm^R), provenant du plasmide pUCGm-lox préalablement digéré par l'enzyme *Xma*I. La construction constituée du gène *ex* tronqué et de la cassette Gm^R a été clonée dans le vecteur pSW7848 au niveau du site *Eco*RI. L'utilisation de la gentamycine permettait à cette étape de cribler plus rapidement les clones transformés par le plasmide pSW7848 ayant intégré le fragment d'intérêt contenant la cassette de résistance à l'antibiotique.

À l'aide de cette stratégie (Figure 42), nous avons réussi à obtenir trois constructions préliminaires dans le vecteur pCR2.1TOPO, pour les gènes *sypA*, *luxS* et *pilA*, ainsi que la construction dans le plasmide pSW7848 pour le gène *sypA* (Figure 43).

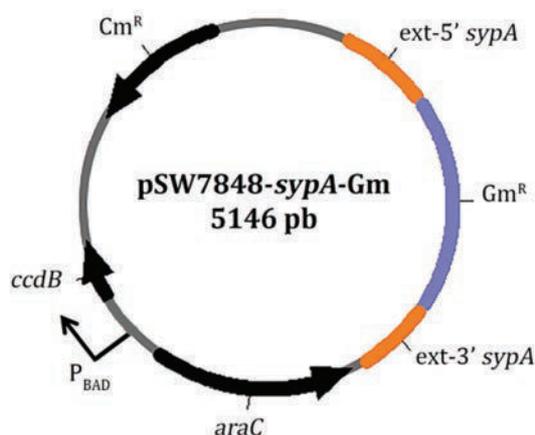


Figure 43 : Cartographie du plasmide pSW7848-*sypA*-Gm. *ccdB* : gène codant pour la toxine CcdB ; *araC* : gène codant pour le régulateur AraC. P_{BAD} : promoteur inducible par le complexe AraC/arabinose. Ext : extrémité (5' ou 3' du gène *sypA*).

Dans le cas du gène *sypA*, la construction comprenant la cassette Gm (1,1 kb) et le gène tronqué (20 pb du gène *sypA* et 340 pb de chaque région flanquant le gène) correspond à une taille d'environ 1,8 kb. Une linéarisation du plasmide pSW7848-*sypA*-Gm par l'enzyme *SpeI* nous a permis de visualiser la taille de ce plasmide (5,1 kb) (Figure 44). L'augmentation de la taille du plasmide par rapport à celle du vecteur pSW7848 vide (3,3 kb) résultait de l'insertion du fragment : gène *sypA* tronqué et cassette Gm (1,8 kb). L'insertion du fragment a également été vérifiée par séquençage.

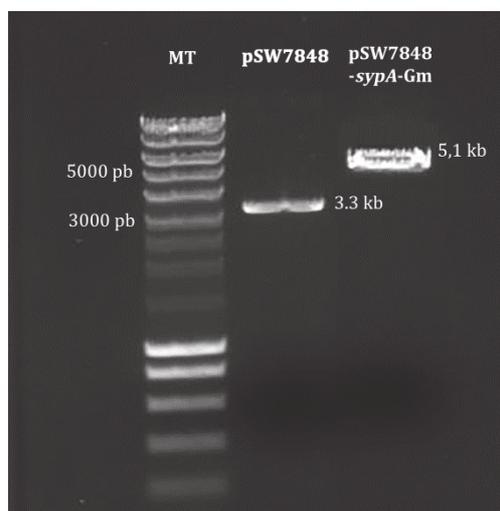


Figure 44 : Vérification par linéarisation à l'aide de l'enzyme *SpeI* de l'insertion de la construction « gène *sypA* tronqué + cassette Gm » dans le vecteur pSW7848. MT : marqueur de taille.

Malheureusement, après plusieurs tentatives de conjugaison entre la souche d'*E. coli* GEB803 contenant pSW7848-*sypA*-Gm et *V. tapetis* CECT4600, aucun transconjugant n'a été obtenu. Dès l'étape du premier évènement de recombinaison aucun clone n'est apparu. Nous avons alors émis l'hypothèse que la taille de la séquence d'ADN permettant la recombinaison homologue (environ 350 pb) pourrait être insuffisante. À ce moment-là, nous n'avions pas en notre possession de plasmide répliquatif chez *V. tapetis* qui nous aurait permis de vérifier l'efficacité de la conjugaison biparentale utilisée dans nos conditions.

De plus, nous avons rencontré de nombreuses difficultés à cloner des fragments d'ADN dans le vecteur pSW7848. Les restrictions enzymatiques sur ce vecteur étaient assez peu efficaces et nécessitaient des temps de digestion très longs (jusqu'à 24h) pour obtenir suffisamment de

vecteur linéarisé. Enfin, bien que le clonage préliminaire dans le vecteur pCR2.1TOPO fut efficace, les différentes étapes qui menaient à la construction dans pSW7848 étaient longues et fastidieuses.

Ces difficultés nous ont donc poussés à revoir la stratégie de construction du plasmide pSW7848 utilisée pour la mutagenèse dirigée. Nous avons alors choisi de nous tourner vers une technique récente de clonage par assemblage isothermal, développée par Gibson *et al.* (2009) et décrit §9.3 du chapitre Matériels et Méthodes. Cette technique permet notamment d'assembler de multiples fragments d'ADN de tailles variables. Cette alternative nous a permis d'augmenter la taille des fragments d'ADN insérés dans le vecteur. Nous avons ainsi cloné environ 1 kb de chaque région flanquant le gène à muter afin de favoriser la recombinaison homologue et d'envisager une mutation par la délétion totale du gène cible.

15.2. Mutation du gène *cqsA*

Le produit du gène *cqsA* est une enzyme responsable de la biosynthèse de l'autoinducteur CAI-1. L'analyse *in silico* a permis d'identifier ce gène dans le génome de *V. tapetis* CECT4600. Pour tenter de mieux comprendre comment pourrait intervenir ce système de communication dans la formation de biofilm chez *V. tapetis* CECT4600, une mutation par délétion totale du gène a été effectuée.

15.2.1. La mutagenèse

Une amplification par PCR à l'aide des amorces pSW_cqsAup_F/cqsAup_R et cqsAdown_F/pSW_cqsAdown_R a permis d'obtenir deux fragments d'ADN d'environ 1 kb chacun contenant les régions en amont (UP) et en aval (DOWN) du gène *cqsA*. Le vecteur pSW7848 a également été amplifié par PCR à l'aide des amorces pSW7848-F/pSW7848-R. Les PCR des séquences « UP » et « DOWN » du gène *cqsA* ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiquement dessinées pour ce type de clonage. Les fragments ainsi obtenus possèdent des extrémités chevauchantes entre elles et avec le vecteur dans lequel le clonage est réalisé. Le plasmide pSW-S34 (Figure 45) a été obtenu en assemblant, en une réaction isothermale unique, les fragments « UP » et « DOWN » avec le vecteur pSW7848 (décrit §9.3).

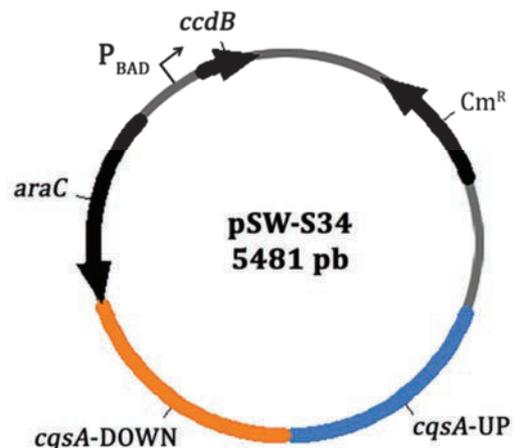


Figure 45 : Cartographie du plasmide pSW-S34. *ccdB* : gène codant pour la toxine CcdB ; *araC* : gène codant pour le régulateur AraC. P_{BAD} : promoteur inducible par le complexe AraC/arabinose.

Le produit de clonage a ensuite été introduit dans la souche conjugative *E. coli* GEB883 par transformation chimique pour donner la souche GEB-S34.

Une amplification par PCR à l'aide des amorces pSW_cqsAup_F/ pSW_cqsAdown_R a permis de vérifier la taille du fragment inséré dans le vecteur pSW7848. La taille des deux fragments combinés correspond à 2214 pb, ce qui fut la taille observée après amplification (Figure 46).

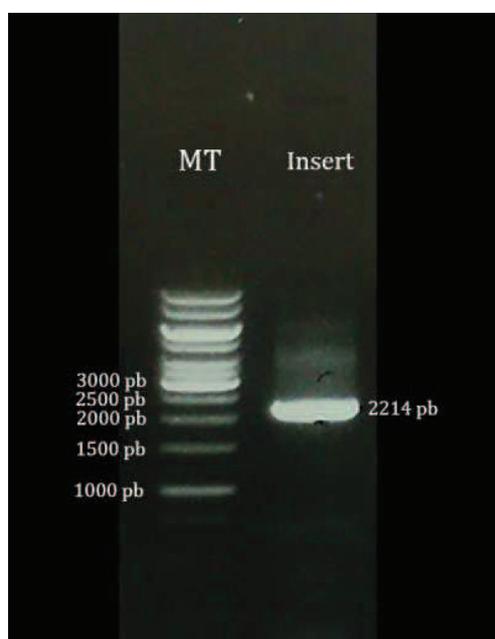


Figure 46 : Vérification de l'insertion dans pSW7848 des fragments « UP » et « DOWN » du gène *cqsA*. Analyse par électrophorèse en gel d'agarose du fragment amplifié par PCR à partir du plasmide recombinant pSW-S34 avec les amorces pSW_cqsAup_F/ pSW_cqsAdown_R. MT : marqueur de taille. Insert : amplification de l'insert « UP » + « DOWN ».

De plus, le séquençage du produit de PCR a confirmé l'insertion des séquences « UP » et « DOWN » dans le vecteur pSW7848.

Le plasmide pSW-S34 ainsi formé a été introduit chez *V. tapetis* CECT4600 par conjugaison biparentale avec *E. coli* GEB-S34. Parmi les souches d'*E. coli* fournies par A. Jacq (IGM – Université de Paris Sud), la souche GEB848 nous a permis d'en extraire le plasmide pGEB12 qui est répliatif chez *V. tapetis*. Nous avons alors transformé la souche conjugative *E. coli* GEB883 avec ce plasmide. La souche conjugative portant pGEB12 et nommée GEB-S12 nous a alors servi de témoin de conjugaison. Chaque expérimentation de conjugaison entre la souche *E. coli* GEB-S34 et *V. tapetis* CECT4600 était également réalisée entre la souche *E. coli* GEB-S12 et *V. tapetis* CECT4600 afin de vérifier l'efficacité de conjugaison en s'affranchissant de l'efficacité de recombinaison homologue.

Le plasmide pSW-S34 n'étant pas répliatif chez *V. tapetis*, seul un événement de recombinaison homologue entre le chromosome de *V. tapetis* et l'une des régions flanquant le gène (« UP » ou « DOWN ») a permis d'obtenir un clone dont le phénotype Cm^R a été vérifié par trois repiquages successifs sur milieu LBS supplémenté en Cm (4 µg.ml⁻¹). Le maintien de ce transconjugant a été possible par ajout dans le milieu de glucose (0,2%) afin de réprimer le promoteur P_{BAD} et d'éviter la production de la toxine CcdB. L'identification du transconjugant, comme étant bien *V. tapetis*, a été confirmée par vérification de l'absence de croissance à 37°C et par amplification par PCR du gène codant pour l'ARN 16S à l'aide des amorces VT16S-F/VT16S-R puis séquençage.

La seconde recombinaison a été induite par ajout d'arabinose (0,2%) dans le milieu de culture. L'arabinose, en se liant au régulateur AraC, induit le promoteur P_{BAD} et ainsi la transcription du gène *ccdB* présent sur le vecteur pSW7848. La protéine CcdB étant toxique pour la bactérie, elle provoque la deuxième recombinaison homologue, qui excise le plasmide du chromosome (cf. §9.6). Celle-ci a entraîné l'apparition de deux types de clones au génotype « mutant » ou « sauvage » (Figure 22, chapitre Matériels et Méthodes). La discrimination des deux génotypes s'est faite par amplification du gène *cqsA* à l'aide des amorces *cqsA-F/cqsA-R* (Figure 47). Dans le cas d'un clone au génotype « sauvage », la PCR a amplifié un fragment de 1809 pb, correspondant à la taille du gène *cqsA* (1176 pb) plus une partie des régions flanquant le gène (environ 300 pb de chaque côté). Dans le cas d'un clone « mutant », la délétion du gène *cqsA* entraîne l'amplification d'un fragment de 634 pb. 24 clones ont été testés et 11 présentaient le génotype « mutant ». Le mutant ($\Delta cqsA$) ainsi obtenu a été nommé

VTS1. Le séquençage du fragment amplifié par PCR a confirmé la délétion du gène *cqsA* chez *V. tapetis* VTS1.

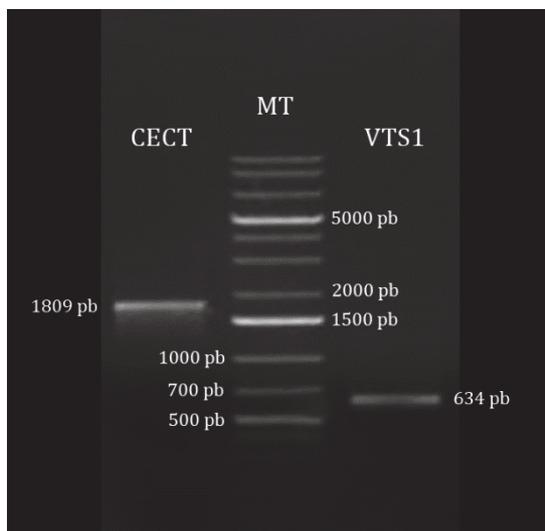


Figure 47 : Vérification par PCR du mutant *V. tapetis* VTS1 ($\Delta cqsA$). Analyse par électrophorèse en gel d'agarose des fragments amplifiés par PCR avec les amorces *cqsA*-F/*cqsA*-R. MT : marqueur de taille ; CECT : souche sauvage (*V. tapetis* CECT4600) ; VTS1 : mutant $\Delta cqsA$ (*V. tapetis* CECT4600 $\Delta cqsA$).

15.3. Construction du plasmide pSW-S36 pour muter *luxS*

De la même manière que pour la construction de pSW-S34 qui nous servi à muter *cqsA*, nous avons obtenu le plasmide pSW-S36. Une amplification par PCR à l'aide des amorces pSW_luxSup_F/luxSup_R et luxSdown_F/pSW_luxSdown_R a permis d'obtenir les fragments UP et DOWN correspondant aux régions flanquant le gène *luxS*. Ces fragments ont ensuite été clonés dans le vecteur pSW7848 par assemblage isothermale pour former pSW-S36 (Figure 48).

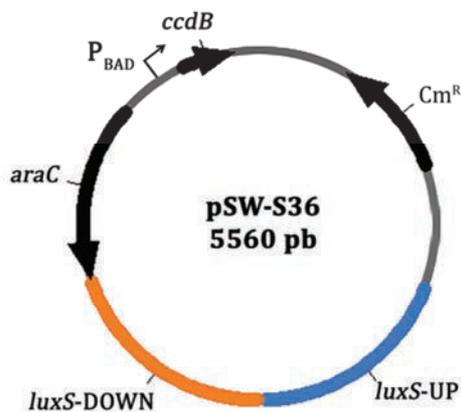


Figure 48 : Cartographie du plasmide pSW-S36. *ccdB* : gène codant pour la toxine CcdB ; *araC* : gène codant pour le régulateur AraC. P_{BAD} : promoteur inducible par le complexe AraC/arabinose.

Le produit de clonage a dans un premier temps été inséré dans la souche *E. coli* GEB802 par transformation électrique. En effet, la souche conjugative GEB883 utilisée précédemment possède le phénotype DAP⁻, c'est-à-dire qu'elle est incapable de se développer en l'absence de diaminopimélate (DAP). L'étape de conjugaison a donc été réalisée en présence de DAP dans le milieu. Ce composant intervient dans la synthèse du peptidoglycane des bactéries. Le phénotype DAP⁻ crée donc une fragilité de la paroi et par conséquent l'efficacité de transformation en est affectée. Une transformation préliminaire a donc été effectuée dans la souche GEB802. Cette étape supplémentaire permettait d'extraire une plus grande quantité de pSW-S36 que celle obtenue après l'assemblage isothermal. Ce plasmide était alors utilisé pour transformer chimiquement la souche GEB883, générant la souche GEB-S36.

La vérification de l'insertion des fragments UP et DOWN a été faite par PCR à l'aide des amorces pSW_luxSup_F/ pSW_luxSdown_R et contrôle de la taille du fragment inséré. La taille des deux fragments combinés correspond à 2293 pb, ce qui fut la taille observée après amplification (Figure 49). Les séquences des fragments « UP » et « DOWN » insérés ont également été contrôlées par séquençage du fragment d'ADN amplifié.

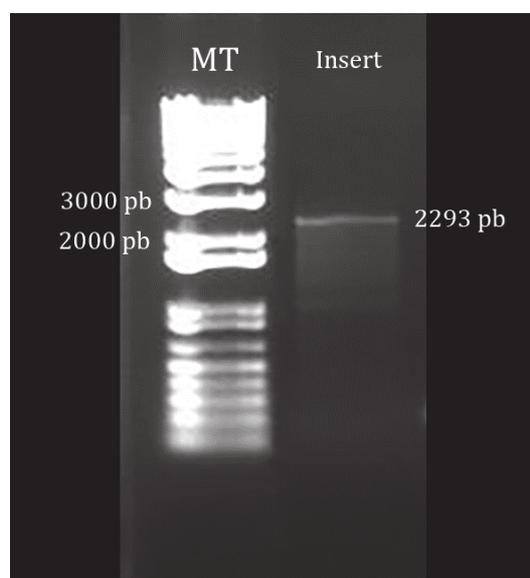


Figure 49 : Vérification de l'insertion dans pSW7848 des fragments « UP » et « DOWN » du gène *luxS*. Analyse par électrophorèse en gel d'agarose du fragment amplifié à partir de pSW-S36 par PCR avec les amorces pSW_luxSAup_F/ pSW_luxSdown_R. MT : marqueur de taille. Insert : amplification de l'insert « UP » + « DOWN ».

Les essais de conjugaison entre la souche d'*E. coli* GEB-S36 et *V. tapetis* CECT4600 n'ont malheureusement pas abouti. Nous n'avons donc pas obtenu de mutant $\Delta luxS$.

16. ETUDE DE LA FORMATION DE BIOFILM CHEZ DES MUTANTS DE *V. TAPETIS*

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la formation de biofilm chez des souches de *V. tapetis* dont des gènes potentiellement impliqués (i) dans des fonctions liées à la formation de biofilm ou (ii) dans la virulence de ce pathogène ont été inactivés. Dans le premier cas il s'agit du mutant VTS1 ($\Delta cqsA$) que nous avons construit lors de cette étude. Dans le second cas, nous avons examiné la capacité du mutant VT16 ($\Delta djIA$) (Lakhal *et al.*, 2008) à développer un biofilm.

16.1. Développement de biofilm par *V. tapetis* VTS1 ($\Delta cqsA$)

Une expérience préliminaire a permis de vérifier que le mutant n'était pas atteint au niveau de la croissance. Les résultats ont montré que la souche VTS1 présentait un taux de croissance de $0,36h^{-1}$ alors qu'il était de $0,32h^{-1}$ chez la souche sauvage CECT4600.

16.1.1. Adhésion bactérienne du mutant VTS1

Le mutant *V. tapetis* VTS1 a été obtenu en déléant l'intégralité du gène *cqsA* chez la souche pathogène CECT4600. Nous avons ensuite observé l'effet de cette délétion sur la formation de biofilm chez *V. tapetis*. Dans un premier temps, l'effet de la mutation a été estimé sur l'étape d'adhésion bactérienne.

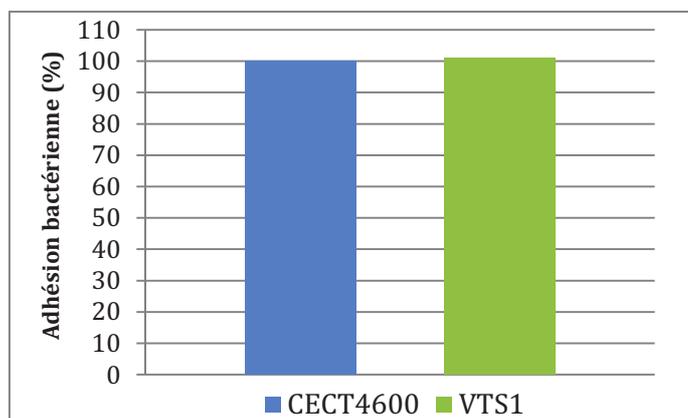


Figure 50 : Adhésions bactériennes relatives de *V. tapetis* CECT4600 et VTS1. Les bactéries sont inoculées à la même DO_{600} (0,1) et l'adhésion se fait pendant 2h sur lame de verre. Les valeurs de pourcentage de recouvrement pour la souche VTS1 ($\Delta cqsA$) sont normalisées par rapport à celles obtenues pour la souche sauvage CECT4600.

À partir des observations réalisées en MCBL, une analyse d'image a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (cf §7.3.2). Les résultats (pourcentage de recouvrement de la surface) pour la

souche VTS1 ont été normalisés par rapports à ceux obtenus pour la souche sauvage CECT4600, ces derniers sont définis comme étant une adhésion de 100%. Les résultats pour le mutant VTS1 indiquent que l'adhésion n'est pas affectée par la délétion du gène *cqsA*, puisque celle-ci atteint en moyenne une adhésion de 101 % par rapport à l'adhésion standard de la souche CECT4600 (Figure 50).

16.1.2. Formation de biofilm par le mutant VTS1

Comme le montre la Figure 51, le mutant VTS1 est capable de former un biofilm recouvrant la totalité de la surface en 24h. Cependant, l'architecture du biofilm formé par ce mutant diffère de celle retrouvée chez la souche sauvage CECT4600. En effet, dans le chapitre I nous avons décrit l'architecture du biofilm de *V. tapetis* CECT4600 comme étant relativement homogène à 24 comme à 48h de culture. Le mutant VTS1 présente quant à lui une architecture plus irrégulière avec des structures montantes à 48h de croissance (Figure 51).

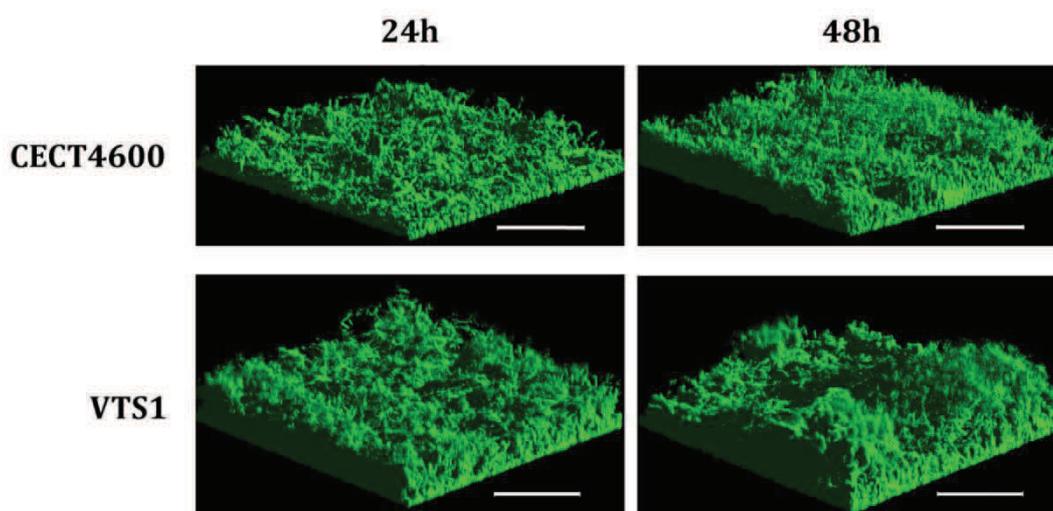


Figure 51 : Représentation tridimensionnelle du biofilm formé par le mutant *V. tapetis* VTS1 ($\Delta cqsA$) et la souche sauvage CECT4600. Observations en MCBL après un marquage des cellules au SYTO 9. Les biofilms ont été cultivés en milieu Zobell à 18°C pendant 24h et 48h. Barre d'échelle : 67,27 μm .

Le biovolume retrouvé à 24h de culture ($16,0 \pm 2,2 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$) dans le biofilm de ce mutant est 2,5 fois plus élevé que celui du biofilm de la souche CECT4600 ($6,7 \pm 2,1 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$) (Figure 52A). À 48h de croissance, la différence est moins prononcée, puisque le biovolume du mutant VTS1 représente $21 \pm 6,1 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ alors que le biovolume du biofilm de la souche sauvage est de $15,9 \pm 3,3 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$. Les mêmes tendances ont été retrouvées pour les épaisseurs

maximales de ces biofilms. Le biofilm du mutant VTS1 est plus épais à 24h de croissance, alors qu'à 48h les épaisseurs maximales pour les deux souches sont équivalentes (Figure 52B).

Une étude menée par Zhu et Mekalanos (2003) a également montré chez *V. cholerae* que la délétion du gène *cqsA* exacerbait la formation de biofilm, suggérant que l'autoinducteur CAI-1 était impliqué dans la régulation de la formation de biofilm. Plus précisément, lorsque CAI-1 atteint une concentration seuil suffisante, il active l'expression d'un régulateur appelé HapR (Zhu *et al.*, 2002). Celui-ci va à son tour réguler négativement la production d'exopolysaccharides et la formation de biofilm chez *V. cholerae* (Hammer et Bassler, 2003 ; Zhu et Mekalanos, 2003). La levée de l'inhibition exercée par HapR et engendrée par l'absence de CAI-1 est à l'origine de la densité cellulaire plus élevée au sein du biofilm de *V. cholerae*.

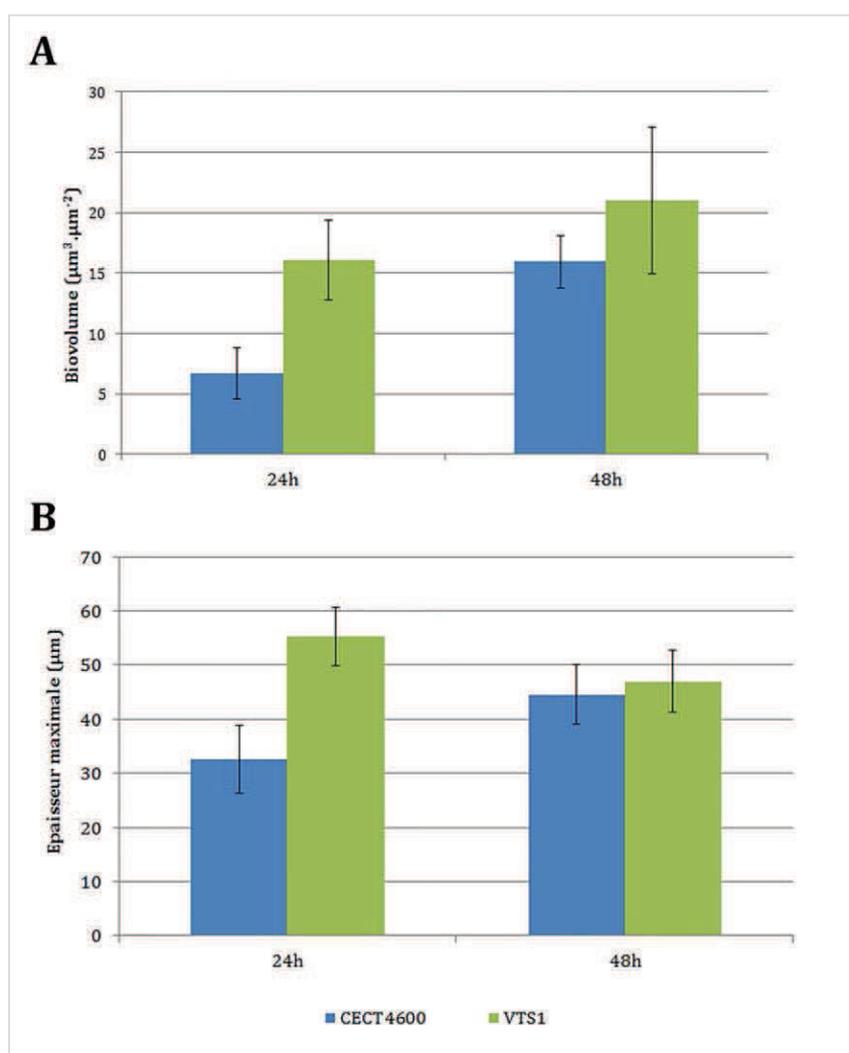


Figure 52 : Biovolumes (A) et épaisseurs maximales (B) des biofilms des souches CECT4600 et VTS1 à 24 et 48h de croissance. Les biofilms ont été formés en milieu Zobell et à 18°C. Les données sont obtenues par analyse d'images à l'aide du logiciel COMSTAT, à partir de prises de vue d'au moins trois sites distincts et d'au moins deux expériences indépendantes.

Chez *V. tapetis*, aucun système de communication n'a encore été décrit et par conséquent encore aucune voie de régulation dépendant du QS n'est connue. L'hypothèse donnée par comparaison avec les travaux menés chez *V. cholerae* reste donc à vérifier, notamment par l'étude du régulateur LuxR chez *V. tapetis* qui possède plus de 59% d'homologie avec la protéine HapR chez *V. cholerae* (données MaGe).

16.1.3. Recherche de phénotype pour le mutant VTS1 ($\Delta cqsA$)

La délétion du gène *cqsA* ne nous a pas permis d'obtenir un phénotype de type tout ou rien en ce qui concerne la formation de biofilm. Au cours de l'étude bibliographique, nous avons pu constater que les gènes codant pour des toxines de type hémolysine faisaient souvent parti des gènes de virulence décrits chez les *Vibrio* (Zhang et Austin, 2005). Certains gènes de virulence et notamment les gènes codant pour des hémolysines sont contrôlés par des voies de régulation dépendantes du QS (Wang *et al.*, 2013). Nous avons évoqué dans le paragraphe 2.3.5 l'identification chez *V. tapetis* d'un gène d'hémolysine de type lécithinase (Choquet, 2004). Bien que l'implication de cette toxine dans la virulence de *V. tapetis* n'ait pas encore été examinée, nous avons voulu vérifier l'effet de la mutation du gène *cqsA* sur la production de cette lécithinase.

Pour cela, la production de cette hémolysine a été recherchée sur gélose à l'œuf (Figure 53).

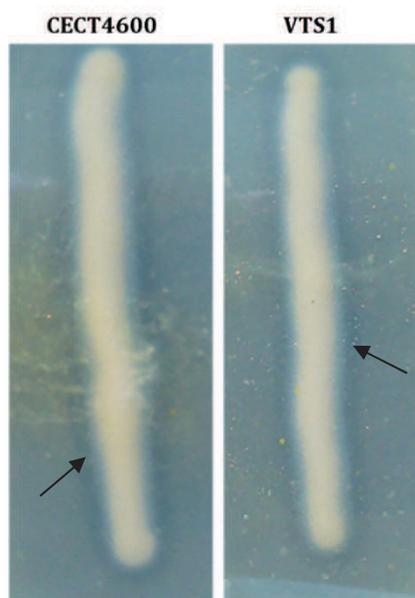


Figure 53 : Recherche de lécithinase chez *V. tapetis* CECT4600 et VTS1 ($\Delta cqsA$) sur gélose à l'œuf. Les flèches indiquent le halo de transparence formé autour de la strie d'inoculation. Géloses Zobell supplémentées en jaune d'œuf (10%).

L'action de la lécithinase sur la lécithine (phosphatidylcholine) libère de la choline soluble et un diglycéride peu soluble, qui précipite dans le milieu, provoquant un trouble autour de la strie d'ensemencement. Généralement, les limites du trouble formé n'excèdent pas celles de la zone de transparence résultant de l'action de protéase détectable également à l'aide de ce type de gélose. Chez *V. tapetis* CECT4600 et VTS1, les zones troubles formées par l'action de la lécithinase sont difficilement détectables (Figure 53). Cependant, nous pouvons clairement observer qu'aucune différence dans les phénotypes obtenus chez les deux souches VTS1 et CECT4600 n'a été mise en évidence. Le gène *cqsA* ne semble donc pas être impliqué dans la régulation de la production de ces enzymes.

16.2. Développement de biofilm par *V. tapetis* VT16 ($\Delta djIA$)

Dans cette partie de notre travail, nous avons également examiné la formation de biofilm par un autre mutant de *V. tapetis*, VT16. Cette souche a été mutée au niveau du gène *djIA* (Lakhal *et al.*, 2008). La mutation de ce gène entraînait une réduction importante de l'activité cytotoxique *in vitro* de la bactérie. Le mutant était notamment incapable d'induire l'arrondissement des hémocytes et de causer la MAB chez la palourde japonaise. Dans le but de comprendre le lien entre la formation de biofilm chez *V. tapetis* et sa capacité à induire la MAB, nous avons analysé la capacité de ce mutant à former des biofilms.

16.2.1. Adhésion bactérienne du mutant VT16

La première étape de la formation d'un biofilm, l'adhésion au support, a été examinée chez le mutant VT16. Les observations réalisées en MCBL ont montré une adhésion moins efficace chez le mutant VT16 que chez la souche sauvage CECT4600 (Figure 54).

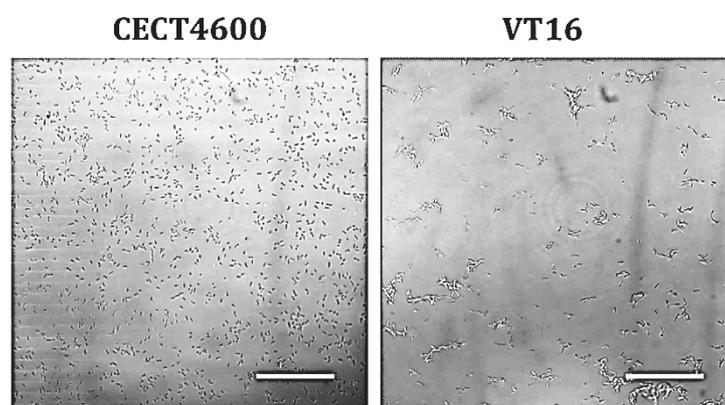


Figure 54 : Observations de l'adhésion de *V. tapetis* CECT4600 et VT16. Les observations ont été réalisées en contraste de phase à l'aide d'un MCBL. Les bactéries sont inoculées à la même DO_{600} (0,1) et l'adhésion se fait pendant 2h sur lame de verre. Barre d'échelle : 47,62 μm .

Le mutant semble former des amas de cellules plutôt que d'être reparti uniformément sur la surface comme pour l'adhésion de la souche sauvage CECT4600 (Figure 54). L'inactivation du gène *djlA* affecte significativement l'adhésion sur lame de verre de *V. tapetis*. En effet, l'analyse d'images effectuée à partir de ces observations révèle une adhésion de 40 % chez VT16 en comparaison de l'adhésion standard de CECT4600 (Figure 55).

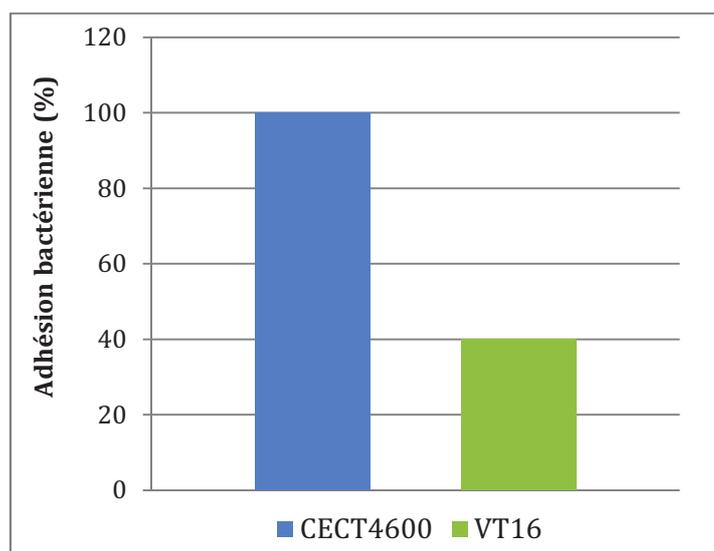


Figure 55 : Adhésions bactériennes relatives de *V. tapetis* CECT4600 et VT16. Les bactéries sont inoculées à la même DO_{600} (0,1) et l'adhésion se fait pendant 2h sur lame de verre. Les valeurs de pourcentage de recouvrement pour la souche VT16 ($\Delta djlA$) sont normalisées par rapport à celles obtenues pour la souche sauvage CECT4600.

La protéine co-chaperonne DjlA est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'assemblage de protéines néosynthétisées et de systèmes de sécrétion (Qiu *et al.*, 2006). Cette protéine membranaire chez *V. tapetis* interviendrait donc, de manière directe ou indirecte, également au niveau de l'adhésion bactérienne.

16.2.2. Formation de biofilm par le mutant VT16

Le mutant VT16 n'a pas montré de capacité à former un biofilm recouvrant la totalité de la surface en 48h (Figure 56). Des agrégats de cellules ont été observés et les cellules présentaient une morphologie filamenteuse. Le biovolume de ce biofilm représentait $0,13 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ à 24h et $0,17 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$ à 48h de culture (Figure 57). En 48h, le biofilm du mutant VT16 atteint un biovolume 93 fois inférieur à celui de la souche sauvage. Cette différence pourrait être en partie expliquée par le taux de croissance 5 fois plus faible de VT16 ($0,06 \text{ h}^{-1}$) par rapport à CECT4600 ($0,32 \text{ h}^{-1}$) observé en culture liquide.

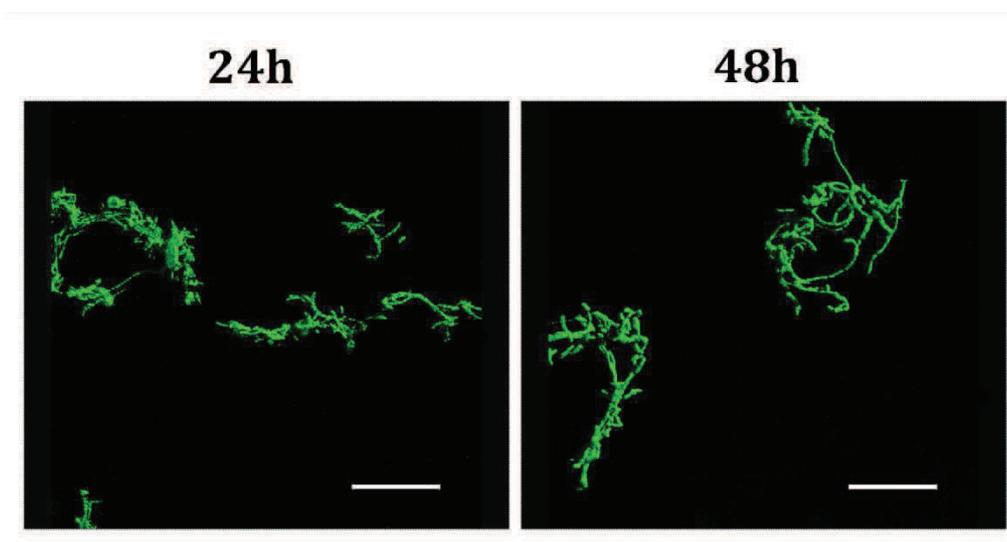


Figure 56 : Formation de biofilm chez le mutant VT16 ($\Delta djIA$). Vues du dessus en MCBL après un marquage des cellules au SYTO 9. Les biofilms ont été cultivés en milieu Zobell à 18°C pendant 24h et 48h. Barre d'échelle : 47,61 μm .

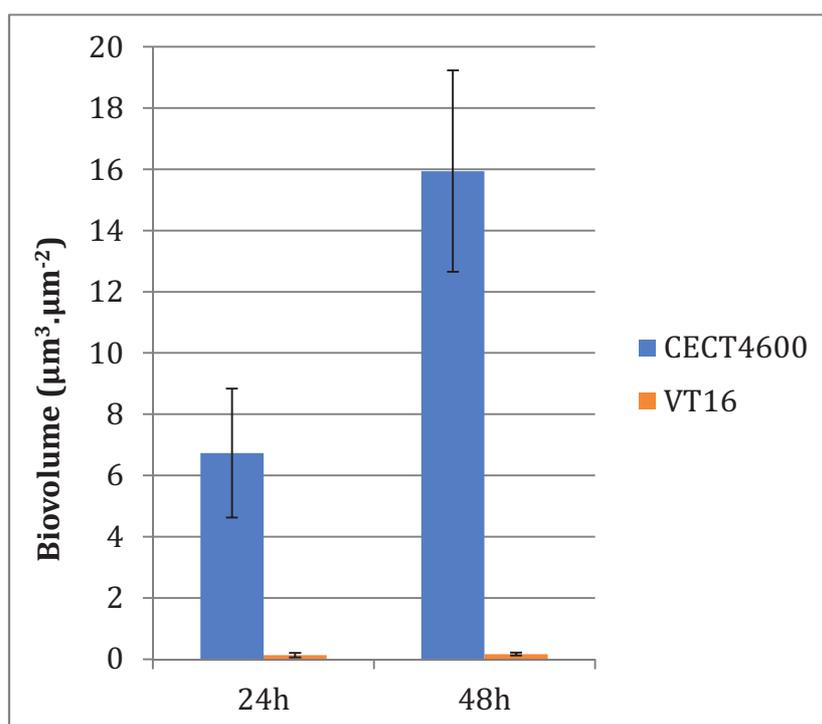


Figure 58 : Biovolumes des biofilms de la souche mutante de *V. tapetis* VT16 et de la souche sauvage CECT4600. Les biofilms ont été formés en milieu Zobell et à 18°C. Les données sont obtenues par analyse d'images à l'aide du logiciel COMSTAT, à partir de prises de vue d'au moins trois sites distincts et d'au moins deux expériences indépendantes.

17. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude de gènes impliqués dans la formation de biofilm chez *V. tapetis* a nécessité dans un premier temps d'identifier des gènes cibles dont les produits pourraient être impliqués dans des fonctions liées à la formation de biofilm. Nous avons ainsi identifié et sélectionné 12 gènes candidats à la mutagenèse afin d'examiner expérimentalement leur rôle dans le développement du biofilm de *V. tapetis*. Ces gènes sont notamment impliqués dans la synthèse de pili (*mshA*, *pilA*, *pilC*, *vvpD*), la production d'exopolysaccharides (*sypA*, *sypB*, *sypC*, *sypD*) ou encore dans la communication bactérienne de type QS (*luxS*, *cqsA*).

La deuxième partie de notre travail a consisté à inactiver les gènes précédemment sélectionnés. La mutagenèse dirigée par double recombinaison homologue n'avait jusqu'à présent jamais été réalisée chez *V. tapetis*. Une première stratégie de construction du plasmide utilisé pour la mutagenèse avait été imaginée. Elle nous avait permis d'obtenir le plasmide pSW7848-*sypA*-Gm. Cependant nous n'avions alors pas réussi à obtenir l'intégration de ce plasmide dans le génome de *V. tapetis*. De plus, le clonage dans pSW7848, par les techniques classiques, était peu efficace. Nous avons alors revu notre modèle de construction du plasmide pSW7848 pour choisir la technique de clonage développée par Gibson *et al.* (2009). Nous avons alors pu construire les plasmides pSW-S34 et pSW-S36 permettant la délétion de *cqsA* et *luxS*. Les outils moléculaires disponibles pour réaliser de la mutagenèse chez *V. tapetis* sont peu nombreux et leurs efficacités chez la souche étudiée (CECT4600) restent assez faibles. Nous envisageons de continuer la mutagenèse chez *V. tapetis* telle que nous l'avons développée lors de ces travaux, mais en utilisant également d'autres souches de *V. tapetis* pathogènes de palourdes (IS1, GTR-I, GDE) afin de comparer l'efficacité de transformation et de recombinaison de ces souches.

Le plasmide pSW-S34 nous a permis d'obtenir le premier mutant de *V. tapetis* par double recombinaison homologue, VTS1 ($\Delta cqsA$). Ce mutant ne produisant plus l'enzyme de synthèse de la molécule de communication CAI-1 ne présentait pas de défaut de formation de biofilm. À 24h, le biovolume du biofilm était plus important chez le mutant VTS1 d'un facteur 2,5. À 48h, le biofilm de ce mutant présentait surtout une différence dans son architecture, qui était plus irrégulière que celle de la souche sauvage CECT4600. Si dans la littérature les systèmes de communication (QS) sont reconnus pour réguler la formation de biofilms bactériens (Hammer *et al.*, 2003), l'abolition d'un des systèmes pourrait être compensé par la présence d'un ou

plusieurs autres systèmes de communication. Chez *V. tapetis*, nous avons identifié un deuxième système de QS par la présence du gène *luxS* dans son génome. Nous avons donc envisagé de muter ce gène, mais sans succès pour le moment. La construction du simple mutant sera également poursuivie afin d'estimer le rôle du système LuxS/LuxPQ dans la régulation de la formation de biofilm chez *V. tapetis*. Par la suite, nous envisageons également la construction d'un double mutant *cqsA/luxS* afin de comprendre si l'inactivation de ces deux systèmes de communication affecte la formation de biofilm chez le pathogène de la palourde japonaise, s'ils se compensent l'un l'autre ou si d'autres systèmes pourraient exister. La détection de la molécule CAI-I pourra également être entreprise par des techniques de chimie analytique et son absence chez le mutant VTS1 permettrait de vérifier que ce système de QS est inactivé. Nous n'avons pour l'instant pas mis en évidence de phénotype marquant chez le mutant VTS1. Afin d'examiner le potentiel rôle de CqsA dans la virulence de *V. tapetis*, des expérimentations menées au LEMAR dans le cadre d'un stage de Master 2, ont eu pour but d'examiner la virulence *in vitro* du mutant VTS1. L'inhibition de la capacité d'adhésion et de la phagocytose des hémocytes de palourdes mises en contact avec le mutant VTS1 a été testée. L'effet sur le métabolisme oxydatif a également été recherché. Ces différents tests ont permis de montrer que la souche mutante VTS1 avait gardé ses capacités de virulence au même titre que la souche sauvage CECT4600. Dans cette même perspective, des expérimentations *in vivo* sur la virulence de VTS1 pourront être menées afin de déterminer la capacité de ce mutant à induire la MAB chez la palourde japonaise.

L'étude de la formation de biofilm chez VT16 (Lakhal *et al.*, 2008) a permis de mettre en évidence l'incapacité de ce mutant à former un biofilm en 48h. Sa capacité d'adhésion au support a également été réduite. Cependant, ces observations pourraient être en partie expliquées par sa croissance qui est affectée par la mutation créée ($\Delta djIA$) et qui présente un taux de croissance nettement réduit par rapport à la souche sauvage CECT4600. Ces résultats sont toutefois encourageants quant au lien potentiel entre la virulence de *V. tapetis* et la formation de biofilm puisqu'une réduction de sa virulence et une incapacité à former un biofilm ont été à la fois observées chez ce mutant.

Malgré les nombreuses informations obtenues lors de cette étude, les perspectives de travail restent encore nombreuses afin de comprendre la formation du biofilm de *V. tapetis* et de la mettre en relation avec la virulence. L'inactivation de certains gènes potentiellement impliqués dans la formation de biofilm reste une piste très prometteuse pour la

compréhension des mécanismes mis spécifiquement en jeu chez *V. tapetis*. L'étude de futurs mutants dont la capacité à développer un biofilm sera affectée, sera une voie à explorer pour des tests de virulence *in vivo*.

CHAPITRE III

Activité anti-biofilm et contrôle du biofilm de *Vibrio tapetis*

18. INTRODUCTION

18.1. Contexte de l'étude

La lutte contre le développement de biofilms indésirables est devenue un enjeu majeur dans de nombreux secteurs d'activités tels que la santé, les industries agroalimentaires et maritimes, mais aussi l'aquaculture. Ces biofilms peuvent constituer des réservoirs de bactéries pathogènes, permettant leur prolifération puis leur dissémination (Qian *et al.*, 2007). En effet, comme nous avons pu le voir au cours de l'étude bibliographique, les animaux d'élevage aquacole sont particulièrement touchés par les infections bactériennes causées le plus souvent par des *Vibrio*. Plusieurs études se sont d'ailleurs concentrées sur les moyens pour limiter le développement de ces pathogènes dans les infrastructures aquacoles (Nithya *et al.*, 2010 ; Natrah *et al.*, 2011) ; et les organismes d'origine marine se sont avérés être une source intéressante de molécules actives (Bowman, 2007). Dans cette perspective, nous avons voulu examiner le potentiel « anti-*Vibrio* » de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 vis-à-vis du biofilm de *V. tapetis*. Cette partie de notre travail consacrée à l'étude de l'activité antibiofilm de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et ses exoproduits (Dheilly *et al.*, 2010 ; Klein *et al.*, 2011) sur le biofilm de l'agent étiologique de la MAB a fait l'objet d'un article présenté §19.2. Des résultats complémentaires §19.3 viendront étayer certains points exposés dans l'article.

18.2. Travaux antérieurs

Comme décrit dans l'introduction bibliographique (§5.2), les exoproduits de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 possèdent une activité anti-biofilm contre une majorité (72%) des bactéries marines à Gram négatif testées, sans toutefois exercer d'activité antibactérienne (Dheilly, 2007 ; Dheilly *et al.*, 2010 ; Klein *et al.*, 2011). Enfin, des travaux réalisés récemment au LBCM ont permis d'identifier un peptide, nommé alterocine, impliqué dans l'activité anti-biofilm du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}) (Simon, 2014). Ni *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 ni SN_{3J6} n'ont été auparavant testés contre *V. tapetis*.

19. ACTIVITÉ ANTIBIOFILM DE LA BACTÉRIE MARINE *PSEUDOALTEROMONAS* SP. 3J6 VIS-À-VIS DE *V. TAPETIS*

19.1. Résumé de l'article

Lors de cette étude, nous avons examiné la sensibilité de *V. tapetis* CECT4600 vis-à-vis de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et ses exoproduits. Nous avons tout d'abord montré que lorsque les deux bactéries sont co-cultivées, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 se trouve être la souche prédominante, quel que soit le mode de croissance (planctonique ou biofilm). Cette tendance résulte probablement au moins en partie d'une croissance plus rapide de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. D'autre part, nous avons également vérifié l'activité antibiofilm de SN_{3J6} sur le biofilm de *V. tapetis* CECT4600. Dans un premier temps, l'effet du conditionnement du support par SN_{3J6} sur la formation de biofilm par *V. tapetis* CECT4600 a été examiné. L'adsorption des exoproduits de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sur la surface avant l'inoculation de *V. tapetis* CECT4600, réduisait d'un facteur cinq l'adhésion bactérienne par rapport à l'adhésion témoin (sans conditionnement du support). Après 24h de culture, le biofilm de *V. tapetis* CECT4600 ne couvrait pas toute la surface, mais n'était constitué que de macrocolonies dispersées, tandis que le biofilm contrôle obtenu sans SN_{3J6} était confluent. L'obtention d'un biofilm couvrant entièrement la surface n'était observée qu'après 48h de culture sur une lame de verre conditionnée par SN_{3J6}. Enfin, l'effet de SN_{3J6} sur un biofilm préformé a été analysé. À la suite d'un traitement de 2h par SN_{3J6}, la biomasse du biofilm de *V. tapetis* CECT4600 était diminuée d'un facteur neuf.

19.2. Article accepté dans « Probiotics and Antimicrobial Proteins »

Antibiofilm activity of the marine bacterium

***Pseudoalteromonas* sp. 3J6 against *Vibrio tapetis*,**

the causative agent of Brown Ring Disease

Sophie Rodrigues,^{a,b*} Christine Paillard,^b Alain Dufour,^a Alexis Bazire^a

Accepted manuscript PAAP-D-14-00034

^aUniv. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France

^bUniversité de Brest, CNRS, IRD, Ifremer, UMR 6539 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin(LEMAR), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Technopôle Brest Iroise, Plouzané, France

*Corresponding author: email: sophie.rodriques@univ-ubs.fr; Phone: (+33) 2 97 87 46 33; Fax (+33) 2 97 87 46 10

Keywords: Biofilm, *Vibrio tapetis*, Brown Ring Disease, antibiofilm activity, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

ABSTRACT

Vibrio tapetis CECT4600 is a pathogenic Gram negative bacterium causing the Brown Ring Disease in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. This vibriosis is induced by bacterial attachment on the periostracal lamina, yielding a decalcification of the bivalve shell. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to biofilm formation. The proteinaceous exoproducts of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 inhibit the formation of biofilm by most of the tested marine bacteria without affecting their planktonic growth. In the present work, we examined the sensitivity of *V. tapetis* to *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and its exoproducts. In *V. tapetis* CECT4600-GFP - *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 co-cultures, the latter outcompeted *V. tapetis* whatever the growth mode (planktonic or biofilm), which could result from a slower growth of *V. tapetis*. Biofilms containing only *V. tapetis* were grown *in vitro* on a glass substratum under dynamic conditions. When the glass was coated with a culture supernatant of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}) prior to inoculating *V. tapetis* CECT4600-GFP, the bacterial attachment was about 5-fold lower than in control experiment without SN_{3J6} and the biofilm formation was delayed by about 24 h: a full biofilm was obtained at 48 h vs 24 h for the control. Moreover, a preformed *V. tapetis* biofilm (grown on SN_{3J6}-free glass substratum) could be disrupted by incubating it with SN_{3J6}. This data suggest that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 is a good candidate to set up an anti-*V. tapetis* strategy usable in aquaculture to grow *V. tapetis*-free Manila clam spats.

INTRODUCTION

Gram negative bacteria belonging to the *Vibrio tapetis* species are the causative agents of an epizootic infection in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* which was named Brown Ring Disease (BRD) [1, 2]. BRD is characterized by a brown deposit of conchiolin onto the inner edge of clam shell. The attachment of *V. tapetis* to the clam shell secretion is the initial event in the BRD process [3] and it is a required step in the *V. tapetis* infectious cycle [4, 5]. This bacterial attachment onto the shell secretion suggests that a biofilm is subsequently developed, which is supported by the notion that pathogenicity and bacterial biofilm formation are generally linked [6, 7]. The first study of *V. tapetis* biofilms showed the ability of this clam pathogen to form biofilms *in vitro* (S. Rodrigues, C. Paillard, A. Dufour, and A. Bazire, submitted). Biofilms can be described as communities of cells bound to a surface and to each other and embedded within a matrix of extracellular polymeric substances that they have produced [8]. Biofilms enhance bacterial growth and survival by providing access to nutrients and supply protection from predators and antimicrobial compounds. It is also considered that biofilm is the predominant bacterial lifestyle and is therefore a key factor for environmental survival and dissemination of bacteria for the host infection [6, 9]. The development of antibiofilm strategies is therefore of major interest and constitutes an important field of investigation in which environment-friendly molecules or organisms are highly valuable [10, 11]. Marine bacteria belonging to the genus *Pseudoalteromonas* are known to be producers of compounds of biotechnological interest [12-15]. The *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6 was isolated in the Morbihan Gulf (Brittany, France) [16], and its exoproducts display an antibiofilm activity [17] attributed at least in part to a peptide named alterocin (M. Simon, A. Dufour, and A. Bazire, unpublished data). The *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 culture supernatants (SN_{3J6}) were shown to inhibit biofilm development of 13 out of 18 (72%) tested marine bacteria, including three *Vibrio* sp. strains [15]. The five non-sensitive strains included three other *Pseudoalteromonas* sp. strains, so the large majority of the non-

Pseudoalteromonas marine bacteria was sensitive to the antibiofilm activity, revealing its wide spectrum of action. Interestingly, SN_{3J6} is neither bactericidal nor bacteriostatic towards planktonic bacteria [17]. Its antibiofilm activity is therefore not due to a classical antibacterial action. SN_{3J6} moderately affected the attachment of two strains on a glass substratum, but this about 2-fold reduction of attachment was too mild to fully explain the subsequent 7 to 20-fold lower biofilm biovolume [17]. Subsequent analyses on six other strains sensitive to the antibiofilm activity showed no significant effect of SN_{3J6} on bacterial attachment [18]. SN_{3J6} was thus proposed to act on the biofilm formation mainly at a post-attachment stage since the active compound was shown to adsorb onto the glass substratum [17]. However, its precise mode of action remains unknown.

In this study, the antibiofilm activity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was tested for the first time against the causative agent of BRD, *V. tapetis* CECT4600. We first examined the biofilms resulting from a *V. tapetis* CECT4600 and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 co-inoculation. Two different strategies were then used to examine the effects of SN_{3J6} on bacterial attachment and biofilm formation: (i) the glass substratum was coated with SN_{3J6} before inoculating bacteria and growing biofilms or (ii) a preformed biofilm was treated with the SN_{3J6}.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

V. tapetis CECT4600 was isolated from the venerid clam *R. philippinarum* suffering from BRD [1] and is the *V. tapetis* type strain [2]. The CECT4600 strain was tagged with the Green Fluorescent Protein (GFP)-encoding pVSV102 plasmid (Km^R, *gfp*) [19]. *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was isolated in the Morbihan Gulf, France [16]. *V. tapetis* and *Pseudoalteromonas* strains were routinely grown aerobically in Vaatanen nine-salt solution (VNSS) (g.l⁻¹: soy peptone, 1; yeast extract, 0.5;

glucose, 0.5; soluble starch, 0.5; FeSO₄·7H₂O, 0.01; Na₂HPO₄, 0.01; NaCl, 17.6; Na₂SO₄, 1.47; NaHCO₃, 0.08; KCl, 0.25; KBr, 0.04; MgCl₂·6H₂O, 1.87; CaCl₂·2H₂O, 0.41; SrCl₂·6H₂O, 0.01; H₃BO₃, 0.01) [20] at their optimal growth temperature, 18°C and 20°C, respectively. Co-cultures and mixed biofilms were performed in VNSS since this medium is appropriate for the production of antibiofilm molecules by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 [17] at the temperature ensuring an optimal *V. tapetis* growth, 18°C. Single-species biofilms containing only *V. tapetis* were grown in Zobell medium (g.l⁻¹: tryptone, 4; yeast extract, 1; sea salts, 30; ferric phosphate, 0.1) [21] at 18°C. Kanamycin (Km) was used at 100 µg.ml⁻¹ during liquid precultures of *V. tapetis* strain carrying the GFP-encoding plasmid pVSV102, but not during biofilm culture. We previously verified that *V. tapetis* CECT4600-GFP biofilms displayed the same biovolumes when grown in the presence of absence of Km, indicating that no significant plasmid loss occurred during biofilm growth without Km (unpublished data).

For liquid co-cultures of *V. tapetis* CECT4600-GFP and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, the two strains were grown separately in VNSS (with Km for *V. tapetis* CECT4600-GFP, to maintain the GFP-encoding plasmid), washed twice in Artificial Sea Water (ASW: 30 g.l⁻¹ sea salts [Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO]), and co-inoculated in fresh VNSS without antibiotic at a final OD₆₀₀ of 0.1 for each strain (about 2.4.10⁷ CFU.ml⁻¹ for each strain). After 24 h of growth at 18°C, the bacteria were diluted and plated on VNSS agar plates without antibiotic to determine the total Colony Forming Units (CFU) number and on Km-containing plates to determine the *V. tapetis* CECT4600-GFP CFU number, the Km resistance being encoded by the GFP-encoding plasmid pVSV102. Three independent experiments were performed. A control experiment showed that pVSV102 was maintained in 100% of *V. tapetis* CECT4600 bacteria grown in liquid VNSS during 24 h at 18°C, showing that this plasmid was stable enough to perform the liquid co-culture assay.

Doubling times were determined from growth kinetics performed for each strain grown at 18°C in VNSS in a 96-well microplate. OD₆₀₀ measurements were made every 15 min for 48 h using a plate reader (Bioscreen C, Oy Growth Curves Ab Ltd, Finland).

Preparation of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 culture supernatant (SN_{3J6})

SN_{3J6} was prepared as described by Dheilly et al. [17]. Briefly, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was grown overnight in VNSS with shaking at 20°C. The culture supernatant was collected after centrifugation (10 min at 8000g), sterilized by filtration (pore of 0.22 µm), and stored at -20°C until use.

Biofilm culture

Biofilms were grown at 18°C under dynamic conditions in a three channel flow cell (1x40x44 mm; Biocentrum, DTU, Denmark) [22]. The flow system was assembled, prepared and sterilized as described by Tolker-Nielsen and Sternberg [23]. The substratum consisted of a microscope glass coverslip (24x50 st1 [KnittelGlasser, Braunschweig, Germany]). Each channel was inoculated with 250 µl of bacterial overnight cultures diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in ASW. In the case of two-species biofilms, *V. tapetis* CECT-GFP and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 were grown separately in VNSS, washed twice in ASW, resuspended in ASW, and mixed so that the OD₆₀₀ of each strain was 0.1 (about $2.4 \cdot 10^7$ CFU.ml⁻¹ for each strain). The flow cell channels were inoculated with this mixture. In both cases (single or two-species biofilms), bacteria were allowed to attach to the glass surface during 2 h at 18°C without any flow of ASW or medium. A constant flow (2.5 ml.h⁻¹) of VNSS was then applied either for 15 min in order to remove planktonic cells and observe the attached bacteria or for 24 h at 18°C to grow biofilms.

To examine the effects of SN_{3J6} on attachment onto the glass coverslip and the subsequent biofilm formation, two different strategies were tested: (i) 250 µl of SN_{3J6} were injected without any bacterium into flow cell channels, were left for 2 h at 18°C to coat the glass surface, and the channels were rinsed with a medium flow for 15 min before inoculating *V. tapetis* CECT4600-GFP; (ii) a 48 h biofilm was treated for 2 h with 250 µl of SN_{3J6} without any flow, the biofilm was then rinsed with a flow of medium for 15 min.

The attached bacteria or biofilms were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) as described below.

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Attached bacteria and biofilm observations were performed with a TCS-SP2 microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany), using a 63x oil immersion objective. Bacteria were detected by monitoring the GFP fluorescence of *V. tapetis* CECT4600-GFP, or stained with 5 µM of SYTO 61 red (Invitrogen, Carlsbad, Ca) for *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. The staining was performed after biofilm growth by injecting 250 µl of fluorescent dye prepared in ASW into a flow cell channel, incubating at room temperature for 15 min in the dark and washing for 15 min with a flow (2.5 ml.h⁻¹) of medium, and CLSM observations were then immediately performed. GFP was excited at 488 nm and fluorescence emission was detected between 500 and 550 nm. SYTO 61 red was excited with the 633 nm argon laser line and fluorescence emission was detected at 645 nm. Fluorescence signal of double-labelled specimens were acquired simultaneously. The glass surfaces covered by attached bacteria were evaluated by using the ImageJ software (National Institutes of Health, MD). For three-dimensional (3D) visualization, images were taken every micrometer throughout the whole biofilm depth. Processing of 3D image data (volume rendering with shadow projection), the Leica LAS AF software (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) was used. Quantitative analyses of image stacks were performed using the COMSTAT software

(<http://www.imageanalysis.dk/>) [24]. At least three image stacks from each of two independent experiments (at least six stacks in total) were used for each analysis.

Test of bactericidal activity

An overnight culture of *V. tapetis* CECT4600-GFP grown in VNSS was centrifuged at 4000g for 10 min and the pelleted bacteria were resuspended in SN_{3J6} (using the same volume as the culture volume) or fresh VNSS (same volume as the culture volume) for the control. Cells were incubated for 4 h at 4°C to avoid bacterial growth, centrifuged (10 min at 4000g) and resuspended into ASW. Dilutions were then plated onto VNSS agar with Km and the CFU number was determined after 48 h of growth. Two independent experiments were performed and bacteria were plated in triplicate.

RESULTS

***Pseudoalteromonas* sp. 3J6 outcompetes *V. tapetis* CECT4600-GFP in two-species biofilms and liquid co-cultures**

We first attempted to grow mixed biofilms after co-inoculating *V. tapetis* CECT4600-GFP and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 in a 1:1 (CFU.ml⁻¹:CFU.ml⁻¹) ratio. The use of the GFP-labeled *V. tapetis* CECT4600 strain allowed us to distinguish between the two strains in the resulting biofilms: *V. tapetis* CECT4600-GFP was specifically detected by the green fluorescence of GFP, whereas total bacteria from both *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and *V. tapetis* CECT4600-GFP strains were visualized after staining biofilms with SYTO 61 red (red fluorescence). After 24 h of biofilm growth, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 seemed largely predominant on the CLSM images (Fig. 1A). This is particularly obvious on the overlay of red and green fluorescences, on which *V. tapetis* CECT4600-GFP bacteria are green or yellow (overlay of green and red) and *Pseudoalteromonas* sp.

3J6 bacteria are red (Fig. 1A, bottom). This visual observation was confirmed by determining the biovolume of each strain within the two-species biofilms by images analyses with the COMSTAT software [24]: *V. tapetis* CECT4600-GFP biovolume was $0.3 \pm 0.2 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$, which represented only 4.9% of the total biovolume ($6.1 \pm 2.3 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$) of two-species biofilms (Fig. 1C).

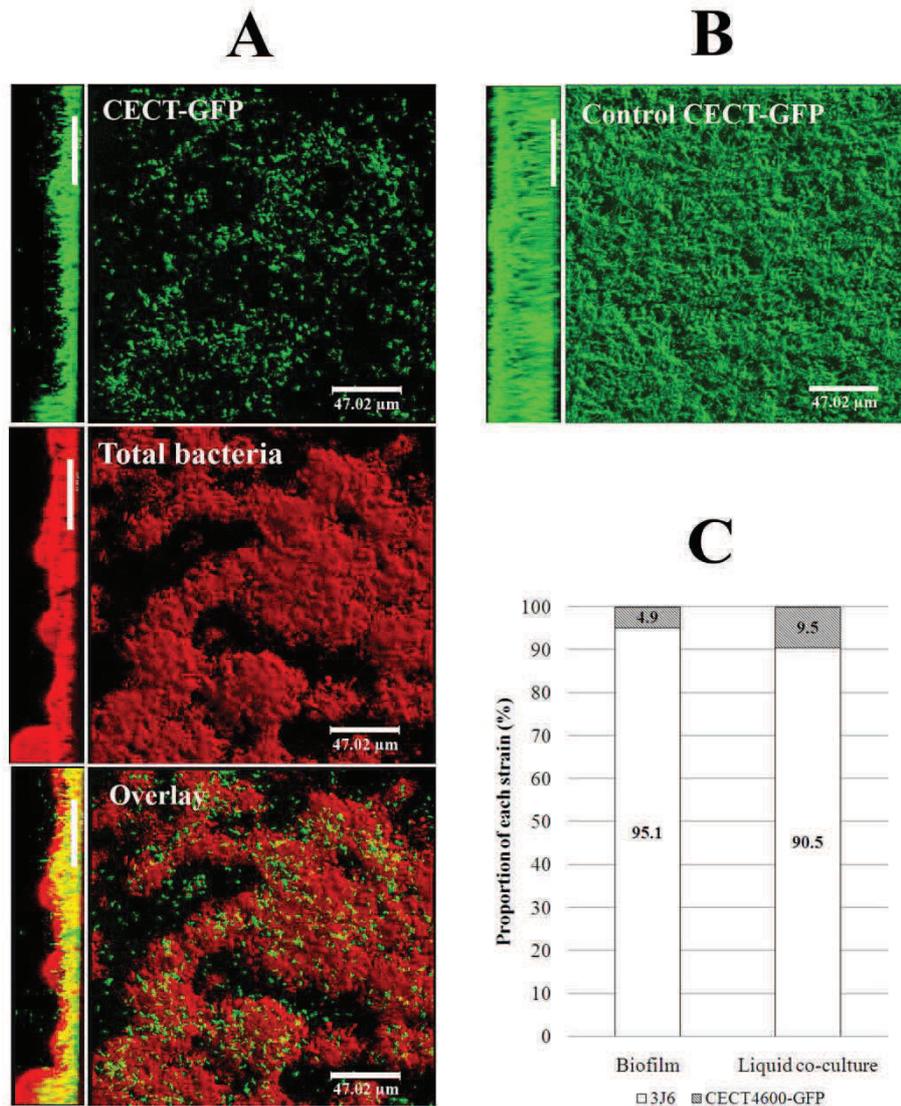


Figure 58 : Fig. 1 *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 outcompetes *V. tapetis* CECT4600-GFP in two-species biofilms and liquid co-cultures. [A] Side (left) and top (right) views of the same two-species biofilm observed by CLSM. CECT-GFP (top): only the green fluorescence is shown (*V. tapetis* CECT4600-GFP); Total bacteria (middle): only the red fluorescence is shown (both strains stained by SYTO 61 red); Overlay (bottom): overlay of the green and red fluorescences. Side view scale bars: 47.44 μm. [B] Side and top views of a single-species *V. tapetis* CECT4600-GFP biofilm observed by CLSM; Side view scale bar: 47.44 μm. [C] Proportion of each strain in two-species biofilms and liquid co-cultures. The values are representative averages of two and three independent experiments for biofilms and liquid cultures, respectively, and were determined by image analyses using the COMSTAT software for biofilms and CFU counting for liquid co-cultures.

By contrast, when *V. tapetis* CECT4600-GFP was inoculated alone in the flow cell, it was able to form a biofilm covering the entire glass surface (biovolume: $21.6 \pm 0.2 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$) within 24 h in the same culture conditions (Fig. 1B). To examine if the predominance of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 over *V. tapetis* CECT4600-GFP occurred specifically in biofilms, we performed liquid co-cultures starting from the same 1:1 (CFU.ml⁻¹:CFU.ml⁻¹) inoculation ratio as for biofilm cultures. After 24 h of growth, the total CFU number and the *V. tapetis* CECT4600-GFP CFU number were determined as described in the “materials and methods” section. *V. tapetis* CECT4600-GFP represented 9.5% of the total bacterial count (Fig. 1C), showing that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 also outcompeted *V. tapetis* CECT4600-GFP during growth in liquid co-culture. This contrasts with previous results which showed that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exerted its inhibitory effect against another marine bacterium strain, *Vibrio* sp. D01, only during biofilm development but not in liquid co-cultures [17]. This new result could be explained simply by a longer doubling time of *V. tapetis* CECT4600-GFP compared to *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 in liquid VNSS at 18°C: 156 vs 67 min.

Glass-coating by SN_{3J6} reduces bacterial attachment and delays subsequent biofilm formation

In order to examine if *V. tapetis* CECT4600-GFP is sensitive to the antibiofilm activity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts, we then examined if the culture supernatant (SN_{3J6}) of the latter strain is able to impair the *V. tapetis* biofilm development. The antibiofilm activity was tested by coating the glass substratum with SN_{3J6} for 2 h in the flow cell chambers. This strategy was previously used with success against other marine bacteria [17]. *V. tapetis* CECT4600-GFP was then incubated in the flow cell for 2h without flow (attachment step) and the glass surfaces covered by bacteria were determined. The coating by SN_{3J6} impaired the bacterial attachment of *V. tapetis* CECT4600-GFP (Fig. 2, left panels), reducing the surface covered by bacteria by more than 5-fold compared to the SN_{3J6}-free control (16.8 ± 2.6 % of attachment on coated glass if considering that the control corresponds to 100 % of attachment).

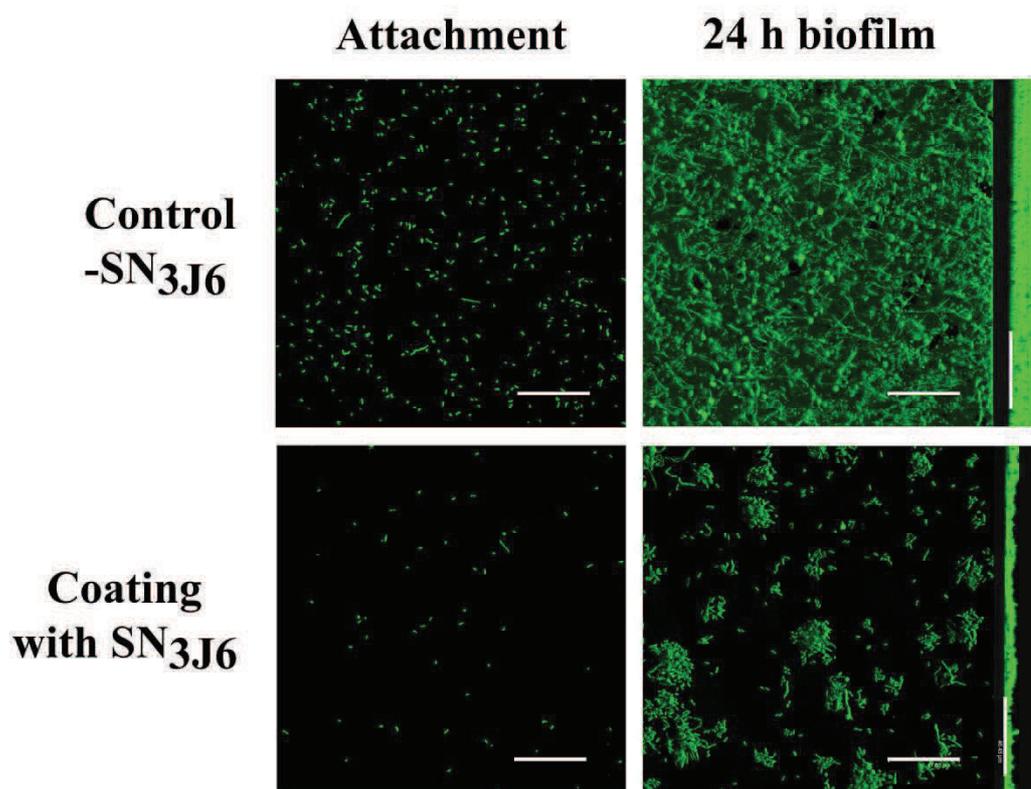


Figure 59 : Fig. 2 Coating the glass substratum with SN_{3J6} impairs *V. tapetis* CECT4600-GFP attachment and biofilm formation. CLSM observations were performed after the 2 h attachment step (top views) and 24 h of biofilm growth (top and side views). Scale bars: 47.02 μm .

After 24 h of biofilm growth on a coated surface, *V. tapetis* CECT4600-GFP yielded macrocolonies but failed to form a full biofilm, on the opposite to the control without SN_{3J6} (Fig. 2, right panels). This led to biofilm biovolume and average thickness about 15 and 30-fold lower, respectively, than those of control biofilms (without coating by SN_{3J6}) (Fig. 3A). Upon a longer growth time (48 h) on a coated surface, *V. tapetis* CECT4600-GFP was able to form a biofilm similar to the biofilm obtained at 24 h on a SN_{3J6}-free surface (data not shown). These data therefore reveal that SN_{3J6} delays by about 24 h *in vitro* biofilm formation by *V. tapetis* CECT4600-GFP, and that this can be explained at least in part by an inhibition of the bacterial attachment onto the glass substratum. As expected from our previous works [15, 17], incubating planktonic *V. tapetis* CECT4600-GFP cells in SN_{3J6} for 4 h at 4°C did not reduce the number of cultivable bacteria ($7.25 \cdot 10^5 \text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$ in the

presence of SN_{3J6} vs 7.13 10⁵ UFC.ml⁻¹ in the control), showing that SN_{3J6} is devoid of bactericidal activity towards planktonic *V. tapetis*.

Preformed biofilm is affected by SN_{3J6} treatment

The effect of SN_{3J6} on preformed biofilms has previously not been investigated against other marine bacteria. After cultivating 48 h biofilms of *V. tapetis* CECT4600-GFP, SN_{3J6} was introduced into the flow cell channels and incubated with the biofilms during 2 h. This treatment, followed by a flow of medium applied for 15 min in order to remove detached bacteria, reduced the biovolume by 9-fold and the average thickness by 8-fold, compared to the control (sterile ASW injected instead of SN_{3J6}) (Fig. 3B). SN_{3J6} is therefore able to alter the stability of a preformed *V. tapetis* CECT4600-GFP biofilm.

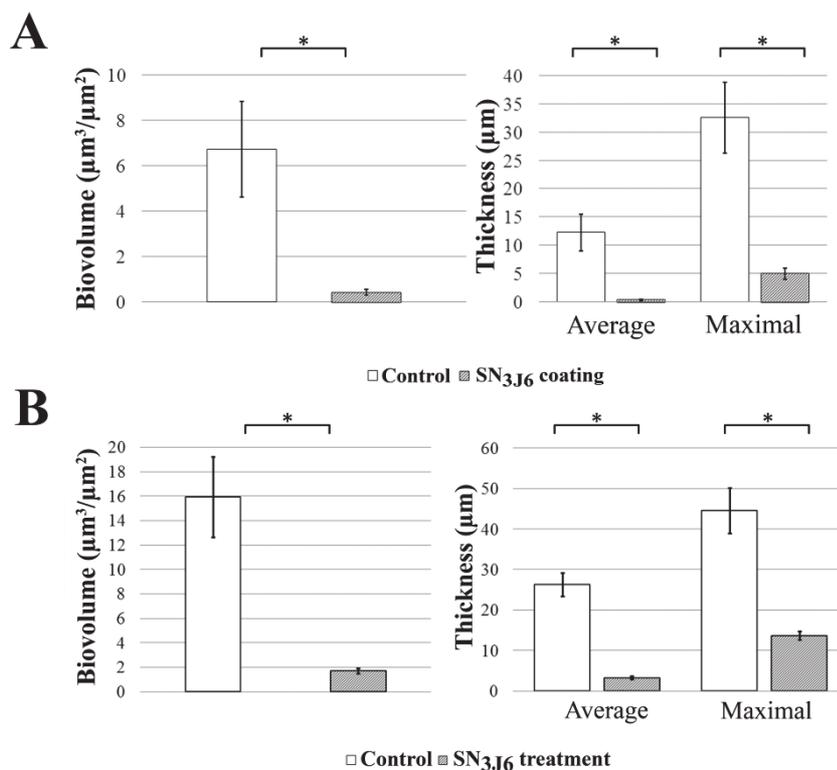


Figure 60 : Fig. 3 Effect of coating the glass substratum with SN_{3J6} on biofilm formation (24 h biofilms) [A] and of treating preformed 48 h biofilms with SN_{3J6} [B]. Biovolumes and thicknesses were determined by analyzing at least three image stacks from each of two independent biofilms (at least six stacks in total) per experiment using the COMSTAT software. *, P < 0.05 by Student's *t* test.

DISCUSSION

Previous works reported the antibiofilm activity exerted by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 on a wide range of Gram-negative bacteria [15, 17]. This study was aimed at examining if this antibiofilm activity also impairs the biofilm formation by the clam pathogen *V. tapetis* CECT4600. As expected, the *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts (SN_{3J6}) impaired biofilm formation by *V. tapetis* while being devoid of bactericidal activity towards planktonic cells. Surprisingly, SN_{3J6} reduced by about 5-fold the *V. tapetis* attachment onto the glass substratum, which could explain at least in part the impairment of biofilm development during the first 24h of growth. After 48h, a full biofilm was observed on SN_{3J6}-coated surfaces, suggesting that either the antibiofilm molecules had been removed from the surfaces by the flow of medium and/or that their effects were only transient. Our previous results on eight marine bacteria, which were all sensitive to the SN_{3J6} antibiofilm activity, showed either no significant effect of SN_{3J6} on bacterial attachment [18] or only a mild effect (2-fold reduction) [17]. The present data indicate that SN_{3J6} could exert its antibiofilm activity at different stages of biofilm formation depending on the target bacterium. The antibiofilm activity was attributed to a peptide named alterocin (M. Simon, A. Dufour, and A. Bazire, unpublished data), but it remains possible that SN_{3J6} contains several different antibiofilm molecules with complementary activities. Future experiments will aim at examining if purified alterocin is by itself responsible for impairing attachment of *V. tapetis* CECT4600, as well as biofilm formation by a strain which is not affected at the attachment level.

Pseudoalteromonas sp. 3J6 outcompeted *V. tapetis* CECT4600 in co-cultures, both in liquid medium and during biofilm formation. This can be explained by the faster growth of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (2.3-fold shorter doubling time) than of *V. tapetis* CECT4600-GFP. In the case of biofilm co-cultures, the *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exoproducts were not abundant during the attachment step since bacteria were washed before being inoculated in the flow cell chamber and since bacterial growth is not expected to occur due to the lack of nutrients in ASW.

Consistently, we did not observe any effect of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 presence against *V. tapetis* attachment in biofilm co-cultures (data not shown). However, during the biofilm growth step under a flow of culture medium, the production of antibiofilm exoproducts by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 might contribute to low abundance of *V. tapetis* CECT4600-GFP in the final biofilms. Finally, the treatment of a preformed biofilm with SN_{3J6} was examined here for the first time and was shown to reduce considerably the bacterial biomass within the biofilm.

This study indicates that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 could be useful to develop anti-*V. tapetis* strategies usable in aquaculture. Manila clam population maintenance indeed requires the seeding of natural environment by spats obtained by aquaculture. It is essential that these spats are not infected by *V. tapetis*, both to generate an efficient restocking and to avoid disseminating *V. tapetis* in the environment. Future works will aim at verifying the non-toxicity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 against the Manila clam *R. philippinarum* and at examining if *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and/or its exoproducts can prevent clam from colonization by *V. tapetis* and impair BRD development.

ACKNOWLEDGMENTS

SR is the recipient of a doctoral fellowship from Région Bretagne and was supported by the Axis 1 of GIS Europôle Mer. This work was performed in the framework of LabexMER "A Changing Ocean" ANR-10-LABX-19-01, which is a cluster of Excellence funded by the French "Investissements d'Avenir" program, supported by French Ministry of Research and Education.

REFERENCES

1. Paillard C, Maes P (1990) Étiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). C R Acad Sci III-Vie 310:15-20
2. Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A (1996a) *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. Int J Syst Bacteriol 46:480-484
3. Paillard C, Maes P (1995) The Brown Ring Disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. J Invertebr Pathol 65:91-100
4. Borrego JJ, Luque A, Castro D, Santamaria JA, Martinez-Manzanares E (1996b) Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Aquat Living Resour 9:125-136
5. Lopez-Cortes L, Luque A, Martinez-Manzanares E, Castro D, Borrego JJ (1999) Adhesion of *Vibrio tapetis* to clam cells. J Shellfish Res 18:91-97
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284:1318-1322
7. Parsek MR, Singh PK (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol 57:677-701
8. Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 8:881-890
9. Huq A, Whitehouse CA, Grim CJ, Alam M, Colwell RR (2008) Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. Curr Opin Biotech 19:244-247
10. Donlan RM (2009) Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. Trends Microbiol 17:66-72
11. Estrela AB, Heck MG, Abraham WR (2009) Novel approaches to control biofilm infections. Curr Med Chem 16:1512-1530
12. Holmström C, Kjelleberg S (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. FEMS Microbiol Ecol 30:285-293
13. Bowman JP (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. Mar Drugs 5:220-241
14. Hayashida-Soiza G, Uchida A, Mori N, Kuwahara Y, Ishida Y (2008) Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. J Appl Microbiol 105:1672-1677
15. Klein GL, Soum-Soutéra E, Guede Z, Bazire A, Compère C, Dufour A (2011) The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. Biofouling 27:931-940
16. Grasland B, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Vallée-Réhel K, Haras D (2003) Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. Biofouling 19:307-313

17. Dheilly A, Soum-Soutéra E, Klein GL, Bazire A, Compère C, Haras D, Dufour A (2010) Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *App Environ Microbiol* 76:3452-3461
18. Klein G (2011) Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Ph.D. thesis, Université de Bretagne Occidentale, France
19. Travers MA, Barbou A, Le Goïc N, Huchette S, Paillard C, Koken M (2008) Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiol Lett* 289:34-40
20. Mårdén P, Tunlid A, Malmcrona-Friberg K, Odham G, Kjelleberg S (1985) Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch Microbiol* 142:326–332
21. Zobell CE (1941) Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J Mar Res* 4:41-75
22. Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T (2009) Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *CytometryA* 75:90-103
23. Tolker-Nielsen T, Sternberg C (2011) Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr Protoc Microbiol* 1B:2.1-2.17
24. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer programme COMSTAT. *Microbiology* 146:2395-2407

19.3. Résultats complémentaires

19.3.1. Effet du conditionnement de surface par SN_{3J6} sur la formation de biofilm de *V. tapetis* au-delà de 24h de culture

Nous avons précédemment décrit dans l'article présenté §19.2 l'effet du conditionnement de surface par SN_{3J6} sur la formation de biofilm de *V. tapetis* CECT4600. Après 24h de croissance, le biofilm formé par *V. tapetis* ne couvrait pas toute la surface, mais n'était constitué que de macrocolonies dispersées et le biovolume était environ 15 fois plus faible que celui du biofilm contrôle (§19.2). En revanche, au-delà de 24h de culture, le conditionnement de surface ne semble plus agir, ou bien retarde la croissance du biofilm au vue du nombre plus faible de bactéries adhérees sur la surface conditionnée. À 48h de croissance, un biofilm dense était observé dont la biomasse ($5,1 \pm 0,7 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$) était proche de celle d'un biofilm de 24h réalisé en condition standard ($6,7 \pm 2,1 \mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$) (Figure 61).

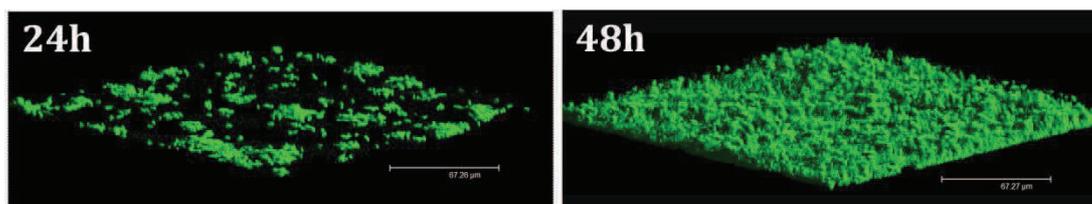


Figure 61 : Biofilms formés par *V. tapetis* CECT4600-GFP après conditionnement du support par SN_{3J6}. Les biofilms ont été cultivés en milieu Zobell, à 18°C et observés en MCBL. Les images sont représentatives de trois expériences indépendantes. Barre d'échelle : 67,27 µm.

Le traitement du support par SN_{3J6} avant la formation de biofilm de *V. tapetis* paraît être efficace pendant au moins 24h. Passé ce délai, les cellules semblent retrouver une capacité à former normalement un biofilm.

19.3.2. Effet de la co-inoculation sur l'étape d'adhésion de *V. tapetis*

Lors de la formation de biofilms bi-espèces de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *V. tapetis* CECT4600-GFP, la proportion observée pour chaque souche, dans un biofilm de 24h, est de 95,1% et 4,9% respectivement (voir article §17.2). Nous avons précisé dans l'étude que la co-inoculation dans la FC se faisait dans un rapport 1 : 1 (CFU.ml⁻¹ : CFU.ml⁻¹). Les dénombrements bactériens effectués sont précisés dans le Tableau 8.

Dénombrement bactérien de l'inoculum mixte		
	3J6	CECT4600-GFP
DO ₆₀₀ = 0,1	2,53.10 ⁷ UFC.ml ⁻¹	2,37. 10 ⁷ UFC.ml ⁻¹

Tableau 8 : Proportions des deux bactéries *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *V. tapetis* CECT4600-GFP dans l'inoculum destiné à la culture de biofilms mixtes. Les valeurs indiquées sont des moyennes de trois expériences indépendantes.

Lors de la formation de biofilms bi-espèces de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *V. tapetis* CECT4600-GFP, chaque souche a été inoculée avec un nombre d'UFC équivalent (environ 2,4.10⁷). Nous avons déterminé la proportion de chaque espèce bactérienne après les 2h d'adhésion en FC, en estimant le pourcentage de recouvrement de la surface à l'aide du logiciel ImageJ (cf. §7.3.2 du chapitre Matériels et Méthodes). Cette estimation a permis de montrer que l'adhésion des deux bactéries se faisait aussi en gardant le même rapport. Après 2h d'adhésion d'un inoculum mixte, *V. tapetis* CECT4600-GFP recouvrait 2,3% de la surface, soit environ 48% des bactéries totales fixées à la surface (Figure 62).

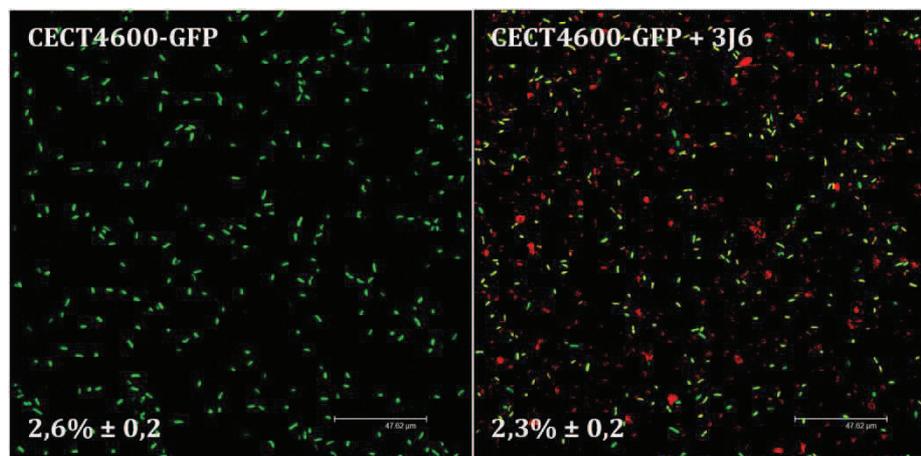


Figure 62 : Observations au MCBL de l'adhésion de *V. tapetis* CECT4600-GFP en co-inoculation avec *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (image de droite) ou seule (image de gauche). L'adhésion est réalisée sur lame de verre pendant 2h à 18°C. Les valeurs indiquées représentent le pourcentage moyen de surface recouverte par *V. tapetis* CECT4600-GFP évalué à partir de trois expériences indépendantes. Pourcentage moyen de recouvrement pour 3J6 : 2,5% ± 0,4. Barre d'échelle : 47,02 µm.

Les surfaces recouvertes par *V. tapetis* CECT4600-GFP après adhésion de cette espèce bactérienne seule et après co-inoculation avec *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sont équivalentes (Figure 62). Ceci montre que l'adhésion de *V. tapetis* CECT4600-GFP n'est pas affectée lorsque celle-ci se fait en présence de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

20. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus montrent que *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et ses exoproduits (SN_{3J6}) inhibent la formation de biofilm de l'agent pathogène de la palourde japonaise sans toutefois présenter d'activité antibactérienne contre les cellules planctoniques. Pour la première fois, SN_{3J6} semble agir de manière significative dès l'étape de l'adhésion bactérienne, en réduisant celle-ci de 5 fois chez *V. tapetis* CECT4600, lorsque le support a été conditionné par SN_{3J6}. Les résultats antérieurs montraient que SN_{3J6} n'avait pas d'effet significatif sur l'adhésion de dix bactéries marines sensibles à l'action anti-biofilm et un effet modéré (diminution d'un facteur 2) sur l'adhésion de deux autres souches sensibles à l'action anti-biofilm (Klein, 2011). L'inhibition observée ici dès l'étape d'adhésion pourrait expliquer en partie le défaut de formation de biofilm chez *V. tapetis* à 24h de croissance. Cette inhibition est toutefois temporaire et ne s'applique plus au-delà de 24h puisque à 48h de culture, *V. tapetis* retrouve la capacité à former un biofilm recouvrant la totalité de la surface. Lors de cette étude, nous avons également montré que le traitement avec SN_{3J6} d'un biofilm préformé élimine plus de 87% de la biomasse du biofilm de *V. tapetis*. Ces résultats encourageants obtenus lors d'un traitement de 2h uniquement, font du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 un bon candidat pour le développement de molécule(s) anti-biofilm puissante(s). Dans cette optique, il serait intéressant de tester des temps plus courts de traitement, ainsi que l'effet sur les biofilms d'autres souches de *V. tapetis*.

Ainsi, toutes les données obtenues jusqu'à aujourd'hui indiquent que SN_{3J6} pourrait exercer son activité antibiofilm de différentes manières en fonction de la bactérie cible. Même si une étude récente a identifié un peptide appelé altérocine, impliqué dans l'activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (Simon, 2014), nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que plusieurs molécules soient engagées dans cette action. Les expérimentations menées lors de cette étude se sont fondées sur le pouvoir antibiofilm du surnageant de culture brut. Il s'agit ici de travaux préliminaires qui amènent à de nombreuses questions et perspectives de travail. De futures expériences auront notamment pour but d'estimer l'activité antibiofilm de l'altérocine purifiée à la fois sur l'étape d'adhésion et sur la formation de biofilm de *V. tapetis*. Nous pourrions ainsi valider les résultats obtenus avec SN_{3J6} et examiner si oui ou non l'activité observée peut être attribuée à une seule et même molécule, l'altérocine.

L'utilisation directe de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pour son pouvoir antibiofilm a été aussi une des pistes explorées lors de cette étude. En effet, si l'activité antibiofilm de cette bactérie marine a été mise en évidence lors de l'étude de biofilm bi-espèces (Dheilly, 2007), nous avons voulu tester si les tendances dégagées lors des travaux de Dheilly (2007) sont retrouvées dans les biofilms mixtes de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *V. tapetis* CECT4600.

Une prédominance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 dans les co-cultures avec *V. tapetis* (planctonique et biofilm) a été observée. L'agent étiologique de la MAB, représente moins de 10% de la biomasse d'une culture liquide mixte et moins de 5% de celle d'un biofilm bi-espèces. Cette prédominance pourrait se justifier par la croissance plus rapide de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, dont le temps de génération est 2,3 fois plus court que celui de *V. tapetis*. Mais il est de plus possible que la production de molécule anti-biofilm par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pendant la croissance du biofilm contribue à limiter le développement de *V. tapetis* dans le biofilm mixte. Même si ces résultats sur l'utilisation directe de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, comme agent anti-biofilm, sont encourageants, il semble toutefois difficile de conclure quand à l'effet réel de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sur le biofilm de *V. tapetis* CECT4600.

Cette étude apporte des pistes prometteuses quant à l'élaboration de stratégies anti-*V. tapetis* potentiellement utilisables en aquaculture. Nous pouvons ainsi envisager d'utiliser l'alterocine purifiée ou bien directement la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 comme probiotique afin de lutte contre la formation du biofilm de *V. tapetis*. En effet, il est indispensable de maintenir un faible taux d'infection à *V. tapetis* dans les populations de naissains de palourdes japonaises cultivées en aquaculture pour réensemencer le milieu marin, afin de limiter la diffusion de l'agent étiologique de la MAB dans l'environnement.

Avant de développer une telle stratégie, il sera indispensable de vérifier la non-toxicité de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et de son surnageant et/ou de l'alterocine vis-à-vis de la palourde japonaise *R. philippinarum*. Enfin, nous examinerons également si *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et/ou ses exoproduits peuvent empêcher la colonisation des palourdes par *V. tapetis* et réduire le développement de la MAB.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Le genre *Vibrio* regroupe de nombreuses espèces bactériennes considérées comme responsables de fortes mortalités affectant les animaux d'élevages aquacoles. La culture de mollusques est particulièrement touchée par ces infections à *Vibrio* et celles-ci sont à l'origine de lourdes pertes écologiques et économiques. La lutte contre le développement de ces vibrioses nécessite donc l'étude et la compréhension de la nature des interactions entre les *Vibrio* et les hôtes qu'ils colonisent. Un des axes majeurs dans l'étude de ces interactions hôte/pathogène est l'exploration des mécanismes de virulence du pathogène. Chez *V. tapetis*, essentiellement deux aspects de sa pathogénicité ont été décrits : sa capacité d'adhésion spécifique à la lame périostracale de la palourde (Borrego *et al.*, 1996b ; Paillard et Maes, 1995a,b ; Lopez-Cortes *et al.*, 1999) et son pouvoir cytotoxique vis-à-vis de hémocytes (Allam *et al.*, 2002 ; Choquet *et al.*, 2003 ; Paillard, 2004b ; Allam et Ford, 2006). Cependant, un aspect de la pathogénicité de *V. tapetis* n'a encore jamais été exploré : la formation de biofilm. Pourtant, chez de nombreuses bactéries, la pathogénicité est liée au développement de ce mode de vie microbien (Costerton *et al.*, 1999 ; Parsek et Singh, 2003).

Au cours de cette étude, nous avons cherché à caractériser pour la première fois le biofilm de *V. tapetis* CECT4600 et à comprendre sa place dans la pathogénicité de l'agent étiologique de la MAB. Nous avons, lors de ce travail, observé que la souche CECT4600 était capable de recouvrir entièrement le substrat en moins de 12h sans motilité de surface et de former un biofilm présentant une architecture homogène. Le biofilm de *V. tapetis* LP2 a également été examiné. Cette souche pathogène de poisson, mais n'induisant pas la MAB chez la palourde japonaise, formait un biofilm dont l'architecture était irrégulière avec la présence de structures montantes. Ces deux souches présentaient aussi des différences dans la distribution des composants (exopolysaccharides et ADNe) de leurs matrices extracellulaires.

Nous avons également montré la présence de composants sphériques dans la partie supérieure des biofilms de *V. tapetis*. Ces composants de nature inconnue affichaient un aspect de surface différent de celui de la bactérie, une taille estimée de 1 à 5 μm et semblaient physiquement liés aux bactéries. Les observations en MCBL ont permis de mettre en évidence la présence d'ADN et de protéines à l'intérieur de ces composants sphériques. Une analyse par MET a montré que l'organisation ultra-structurale de ces composants était différente de celle des cellules bactériennes, et ont conforté notre hypothèse que ces composants seraient physiquement attachés aux bactéries. Les composants sphériques ont été retrouvés dans les biofilms de toutes les souches de *V. tapetis* testées, mais avec des abondances variables. Ils

sont notamment beaucoup moins abondants dans les biofilms de la souche LP2 non pathogène de la palourde que dans les quatre souches pathogènes de mollusques bivalves de la famille des *Veneridae*. Nos résultats nous permettent donc de poser l'hypothèse de l'existence d'un lien entre la présence de ces composants sphériques dans le biofilm de *V. tapetis* et sa pathogénicité, mais cette hypothèse reste à examiner. La détermination de la nature et du rôle de ces composants sphériques particuliers sera une perspective prioritaire de recherches, afin de caractériser leur fonction au sein du biofilm de *V. tapetis*. Même si la nature VNC de ces composants semble peu probable, cette hypothèse devra être vérifiée.

L'étude de gènes impliqués dans la formation de biofilm par *V. tapetis* CECT4600 a permis dans un premier temps d'identifier dans son génome 12 gènes dont les produits pourraient jouer un rôle dans des fonctions liées à la formation de biofilm, comme la synthèse de pili, la production d'exopolysaccharides ou encore la communication bactérienne (QS).

La construction d'un mutant de *V. tapetis* CECT4600 par la délétion d'un gène a nécessité de nombreux essais avant de parvenir à la construction de deux plasmides utilisés pour la mutagenèse. Une première stratégie avait permis de construire le plasmide pSW7848-sypA-Gm sans toutefois réussir à l'insérer par recombinaison homologue dans le génome de *V. tapetis*. Puis, en utilisant la technique de clonage développée par Gibson *et al.* (2010), nous avons alors pu construire les plasmides pSW-S34 et pSW-S36 permettant la délétion des gènes *cqsA* et *luxS*.

Le plasmide pSW-S34 nous a permis d'obtenir pour la première fois un mutant de *V. tapetis* par double recombinaison homologue, VTS1 ($\Delta cqsA$). Ce mutant ne présentait pas de défaut de formation de biofilm, mais au contraire son biofilm affichait à 24h un biovolume plus important que celui du biofilm de la souche sauvage. À 48h, c'est une différence dans son architecture qui était observée. Il est admis que les systèmes de QS, comme CqsS/CqsA, sont impliqués dans la régulation de la formation de biofilms bactériens (Hammer *et al.*, 2003). Cependant, l'inactivation d'un des systèmes pourrait être compensée par la présence d'un ou plusieurs autres systèmes de communication. Nous avons envisagé la mutation du gène *luxS*, identifié dans le génome de *V. tapetis*, mais sans succès pour le moment. Nous prévoyons la construction du double mutant *cqsA/luxS* et du simple mutant *luxS* dans le but de comprendre le rôle de chacun des deux systèmes, si leur inactivation affecte le développement du biofilm de *V. tapetis* ou s'ils peuvent se compenser l'un l'autre. La construction d'autres mutants de gènes potentiellement impliqués dans la formation de biofilm sera également poursuivie. La

mutagénèse sera également envisagée avec d'autres souches de *V. tapetis* pathogènes de la palourde japonaise. Dans cette perspective, les futurs mutants, ainsi que le mutant VTS1 seront testés *in vivo* sur leur capacité à induire la MAB chez la palourde japonaise. Le lien entre la formation de biofilm et la pathogénicité de *V. tapetis* pourra ainsi être examiné.

Nous avons également observé les effets sur le développement du biofilm de *V. tapetis* de paramètres environnementaux influant sur la prévalence de la MAB. La plupart des conditions testées ayant un effet avéré sur le développement de la MAB, notamment la température (Paillard *et al.*, 2004b) et la salinité (Reid *et al.*, 2003), affectaient la biomasse du biofilm au-delà de 24h lorsque celui-ci était cultivé à 23°C ou encore conduire à la surproduction de composants sphériques et à la présence de cellules filamenteuses lorsque la salinité était augmentée (50g.l⁻¹ de sels marins au lieu de 30g.l⁻¹). Cependant, les conditions testées n'empêchaient pas la formation de biofilm. Nos résultats peuvent suggérer le rôle de la formation de biofilm dans la persistance de *V. tapetis* au sein de son hôte. La vie en biofilm pourrait être une solution d'attente des conditions favorables pour le pathogène afin d'initier l'infection. Ce genre de comportement a déjà été mis en évidence chez *V. cholerae*, qui se sert du mode de vie en biofilm pour favoriser sa transmission en lui procurant un environnement protecteur et en assurant une niche riche en bactéries virulentes (Hall-Stoodley et Stoodley, 2005).

Les expérimentations basées sur l'activité anti-biofilm du surnageant de culture de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 se sont révélées très encourageantes. Le conditionnement du support par du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}) inhibait l'adhésion bactérienne de *V. tapetis* et le biofilm formé suite à ce conditionnement était également inhibé. Le traitement d'un biofilm préformé par SN_{3J6} réduisait également la biomasse du biofilm d'un facteur neuf. La formation de biofilms bi-espèces entre *V. tapetis* CECT4600 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a permis de mettre en évidence une prédominance de la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Bien que la croissance plus rapide de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pourrait expliquer cette prépondérance, la production de la molécule anti-biofilm par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pendant la croissance du biofilm pourrait contribuer à limiter le développement de *V. tapetis* dans les biofilms mixtes.

Dans le cadre d'un autre projet (Simon, 2014), la cytotoxicité de SN_{3J6} a déjà été testée sur des lignées de cellules humaines ainsi que sur un modèle murin, sans révéler d'effet négatif.

La cytotoxicité de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 ainsi que de SN_{3J6} et/ou l'altérocine sera également évaluée vis-à-vis d'hémocytes et de palourdes. Des expérimentations *in vivo* sont envisagées afin d'examiner si *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et/ou ses exoproduits peuvent empêcher la colonisation des palourdes par *V. tapetis* et réduire le développement de la MAB.

Cette première étude concernant la caractérisation du biofilm formé par *V. tapetis*, le pathogène de la palourde japonaise *R. philippinarum*, a permis de collecter de nombreuses informations. Elle pose ainsi les bases de futurs travaux visant à comprendre la place de la formation de biofilm chez ce *Vibrio* dans sa pathogénicité et son cycle infectieux. La mise au point d'une étude de la formation du biofilm de *V. tapetis* directement sur la coquille de la palourde couplée à des analyses par différentes techniques de microscopie (MET, ViVaTome...) est également envisagée. L'utilisation de la RT-PCR quantitative sur des gènes de virulences de *V. tapetis* pourrait être entreprise en condition planctonique et en biofilm afin de constater de l'activité de transcription de ces gènes dans les deux « états » de la bactérie.

Enfin, cette étude s'inscrit parmi les prémices d'études complémentaires visant à mettre en place des stratégies « anti-*Vibrio* » afin de lutter contre les biofilms indésirables et applicables en aquaculture pour de nombreux *Vibrio* pathogènes de bivalves.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Alice AF, Naka H, Crosa JH.** 2008. Global gene expression as a function of the iron status of the bacterial cell: influence of differentially expressed genes in the virulence of the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **76**: 4019-4037.
2. **Allam B, Paillard C, Ford SE.** 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Dis. Aquat. Org.* **48**:221-231.
3. **Allam B, Ford SE.** 2006. Effets of the pathogenic *Vibrio tapetis* on defense factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. *Fish Shellfish Immun.* **20**:374-383.
4. **Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**:1114-1128.
5. **Alsina M, Blanch AR.** 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. App. Microbiol.* **76**:79-85.
6. **Austin B.** 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet. Microbiol.* **140**:310-317.
7. **Austin B, Zhang XH.** 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Let. Appl. Microbiol.* **43**:119-124.
8. **Azevedo C.** 1989. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J. Parasitol.* **75**:627-635.
9. **Balboa S, Romalde JL.** 2013. Multilocus sequence analysis of *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease: Description of *Vibrio tapetis* subsp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**:183-187.
10. **Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR.** 1993. Intercellular signaling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* **9**:773-786.
11. **Bassler BL, Wright M, Silverman MR.** 1994. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**:273-286.
12. **Bjarnsholt T.** 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS suppl.* **136**:1-51.
13. **Bjellans AM, Sørum H, Tegegne DA, Winther-Larsen HC, Willasen NP, Hansen H.** 2012. LitR of *Vibrio salmonicida* is a salinity-sensitive quorum-sensing regulator of phenotypes involved in host interactions and virulence. *Infect. Immun.* **80**:1681-1689.
14. **Berk V, Fong JC, Dempsey GT, Develioglu ON, Zhuang X, Yildiz FH, Chu S.** 2012. Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science* **337**:236-239.
15. **Birnboim HC, Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* **7**:1513-1523.

16. **Boettcher KJ, Geaghan KK, Maloy AP, Barber BJ.** 2005. *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:1531-1537.
17. **Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT, Ventosa A.** 1996a. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:480-484.
18. **Borrego JJ, Luque A, Castro D, Santamaria JA, Martinez-Manzanares E.** 1996b. Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat. Living Resour.* **9**:125-136.
19. **Borlee B, Goldman A, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesion to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **75**:827-842.
20. **Bowman JP.** 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar. Drugs* **5**:220-241.
21. **Boyd A, Chakrabarty AM.** 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2355-2369.
22. **Brenda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**:20-26.
23. **Chen MY, Lee DJ, Tay JH, Show KY.** 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *App. Microbiol. Biot.* **75**:467-474.
24. **Chiavelli DA, March JW, Taylor RK.** 2001. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3320-3225.
25. **Choquet G, Soudant P, Lambert C, Nicolas JL, Paillard C.** 2003. Reduction of adhesion properties on *Ruditapes philippinarum* hemocytes exposed to *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* **57**:109-116.
26. **Choquet G.** 2004. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest. Caractérisation et pathogénie des isolats de *Vibrio tapetis*, bactérie responsable de la maladie de l'anneau brun chez la palourde japonaise.
27. **Costa R, Mermoud I, Koblavi S, Morlet B, Haffner P, Berthe F, Legroumellec M, Grimont P.** 1998. Isolation and characterization of bacteria associated with *Peaneus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* **164**:297-309.
28. **Costerton JW.** 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* **9**:50-52.
29. **Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.** 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**:86-95.

30. **Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.
31. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
32. **Crosa JH, Mey AR, Payne SM.** 2004. Iron transport in bacteria. ASM Press, Washington, DC.
33. **Davies DG, Geesey GG.** 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:860-867.
34. **Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-298.
35. **Dheilly A, Soum-Soutéra E, Klein GL, Bazire A, Compère C, Haras D, Dufour A.** 2010. Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:3452-3461.
36. **Dominiak DM, Nielsen JL, Nielsen PH.** 2011. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ. Microbiol.* **13**:710-721.
37. **Donlan RM.** 2000. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.* **46**:47-52.
38. **Donlan RM.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:881-890.
39. **Donlan RM, Costerton JW.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:167-193.
40. **Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW.** 1988. High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**:6127-6145.
41. **Egidius E, Wilk R, Andersen K, Hoff KA, Hjetnes B.** 1986. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**:518-520.
42. **Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL.** 2005. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Mol. Microbiol.* **55**:1160-1182.
43. **Faruque SM. et al.** 2006. Transmissibility of cholera: In vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *PNAS* **103**:6350-6355.
44. **Fletcher M.** 1996. Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity. Publié par John Wiley and Sons. p1-14.
45. **Fong JCN, Karplus K, Schoolnik GK, Yildiz FH.** 2006. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **188**:1049-1059.
46. **Ford SE, Borrero FJ.** 2001. Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.* **78**:141-154.

47. **Friedman CS, Beattie JH, Elston RA, Hedrick RP.** 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortalities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunbergh. *Aquaculture* **94**:1-15.
48. **Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP.** 1994. Quorum sensing in bacteria : the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275.
49. **Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:727-751.
50. **Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP.** 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum-sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**:439-468.
51. **Garnier M, Labreuche Y, Garcia C, Robert M, Nicolas JL.** 2007. Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Microbial Ecol.* **53**:187-196.
52. **Gatesoupe FJ, Lambert C, Nicolas JL.** 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *J. App. Microbiol.* **87**:757-763.
53. **Garcia-Aljaro C, Melado-Rovira S, Milton DL, Blanch AR.** 2012. Quorum-sensing regulates biofilm formation in *Vibrio scophthalmi*. *BMC Microbiol.* **12**:287-295.
54. **Goarant C, Ansquer D, Herlin J, Domalain D, Imbert F, De Decker S.** 2006. « Summer syndrome » in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* **253**:105-113.
55. **Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HQ.** 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **6**:343-345.
56. **Giglio KM, Fong JC, Yildiz FH, Sondermann H.** 2013. Structural basis for biofilm formation via the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA. *J. Bacteriol.* **195**:3277-3286.
57. **Grasland B, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Vallée-Réhel K, Haras D.** 2003. Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling* **19**:307-313.
58. **Grau BL, Henk MC, Garrison KL, Oliver BJ, Schulz RM, O'Reilly RM, Pettis GS.** 2008. Further characterization of *Vibrio vulnificus* rugose variants and identification of a capsular and rugose exopolysaccharide gene cluster. *Infect. Immun.* **76**:1485-1497.
59. **Grimes DJ, Stemmler J, Hada H, May EB, Maneval D, Hetrick FM, Jones RT, Stoskopf M, et al.** 1984. *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbial. Ecol.* **10**:271-282.
60. **Grischowsky RS, Liston L.** 1974. Bacterial pathogenicity in laboratory-induced mortality of the pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* **64**:82-91.

61. **Guvener ZT, McCarter LL.** 2003. Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **185**:5431-5441.
62. **Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Micro.* **2**:95-108.
63. **Hall-Stoodley L, Stoodley P.** 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**:7-10.
64. **Hammer BK, Bassler BL.** 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **50**:101-114.
65. **Hansen H, Bjelland AM, Ronessen M, Robersten E, Willassen NP.** 2014. LitR is a repressor of *syp* genes and has a temperature-sensitive regulatory effect on biofilm formation and colony morphology in *Vibrio (Aliivibrio) salmonicida*. *Appl. Environ. Microb.* doi:10.1128/AEM.01239-1
66. **Harmsen M, Lappann M, Knöchel S, Molin S.** 2010. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:2271-2279.
67. **Hayashida-Soiza G, Uchida A, Mori N, Kuwahara Y, Ishida Y.** 2008. Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. *J. Appl. Microbiol.* **105**:1672-1677.
68. **Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O.** 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**:477-483.
69. **Henke JM, Bassler BL.** 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **186**:6902-6914.
70. **Hertiani T, Edrada-Ebel R, Ortlepp S, Van Soest RWN, De Voogd NJ, Wray V, Hentschel U, Kozytska S, Muller WEG, Proksch P.** 2010. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorg. Med. Chem.* **18**:1297-1311.
71. **Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S.** 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer programme COMSTAT. *Microbiology* **146**:2395-2407.
72. **Higgins DA, Pomianek ME, Kraml CM, Taylor RK, Semmelhack MF, Bassler BL.** 2007. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature.* **450**:883-886.
73. **Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* **5**:1663-1674.

74. **Holmström C, Kjelleberg S.** 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiol. Ecol.* **30**:285-293.
75. **Holt JG, Krieg NR.** 1994. *Bergey's manual of determinative microbiology*, 9th ed. p. 190-274. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
76. **Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG.** 2013. Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letts. Appl. Microbiol.* **57**:467-475.
77. **Jeffroy F, Paillard C.** 2011. Involvement of nitric oxide in the *in vitro* interaction between Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, hemocytes and the bacterium *Vibrio tapetis*. *Fish Shellfish Immunol.* **6**:1137:1141.
78. **Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, Paillard C, & BerghØ.** 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *V. tapetis* isolated from corkwing wrasse *Symphodus melops* suffering vibriosis. *Dis. Aquat. Organ.* **56**:25-31.
79. **Jiang P, Li J, Han F, Duan G, Lu X, Gu Y, Yu W.** 2011. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PloS One* **6**:e18514
80. **Joseph LA, Wright AC.** 2004. Expression of *Vibrio vulnificus* Capsular Polysaccharide Inhibits Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* **186**:889-893.
81. **Kaplan JB.** 2010. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Crit. Rev. Oral. Biol. M.* **89**:205-218.
82. **Karatan E, Watnick P.** 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **73**:310-347.
83. **Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambersten L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **48**:1511-1524.
84. **Klein G.** 2011. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest. Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines.
85. **Klein GL, Soum-Soutéra E, Guede Z, Bazire A, Compère C, Dufour A.** 2011. The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling* **27**:931-940.
86. **Kumar CG, Anand SK.** 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food. Microbiol.* **42**:9-27.
87. **Labreuche Y, Le Roux F, Henry JI, Zatylny CI, Huvet A, Lambert C, Soudant P, Mazel D, Nicolas JL.** 2010. *Vibrio aestuarianus* zinc metalloprotease causes lethality in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and impairs the host cellular immune defenses. *Fish Shellfish Immun.* **29**: 753-758.

88. **Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gelebart F, Cordevant C, Lange M, Poulet SA.** 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Organ.* **46**:139-145.
89. **Lakhal F, Bury-Moné S, Nomane Y, Le Goïc N, Paillard C, Jacq A.** 2008. DjlA, a Membrane-Anchored DnaJ-Like Protein, Is Required for Cytotoxicity of Clam Pathogen *Vibrio tapetis* to Hemocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5750-5758.
90. **Lambert C, Nicolas JL, Cilia V.** 1999. *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **19**:102-106.
91. **Lane E, Birkbeck HT.** 1999. Toxicity to bacteria towards haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquat Living. Resourc.* **12**:343-350.
92. **Le Chevalier P, Le Boulay C, Paillard C.** 2003. Characterization by restriction fragment length polymorphism and plasmid profiling of *Vibrio tapetis* strains. *J. Basic. Microbiol.* **43**:414-422.
93. **Lerliche V, Sibille P, Carpentier B.** 2000. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl. Environn. Microbiol.* **66**:1851-1856.
94. **Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waetchter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas JL, Berthe F.** 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat. Living Resour.* **15**:251-258.
95. **Le Roux F, Labreuche Y, Davis BM, Iqbal N, Mangenot S, Goarant C, Mazel, D, Waldor MK,** 2011. Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependent on two plasmids. *Environ. Microbiol.* **13**:296-306.
96. **Loeb GL, Neihof RA.** 1975. Marine conditioning films. *Adv. Chem.* **145**:319-335.
97. **Lönn-Stensrud J, Landin MA, Benneche T, Petersen FC, Scheie AA.** 1999. Furanones, potential agents for preventing *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections? *J. Antimicrob. Chemoth.* **63**:309-316.
98. **López JR, Balboa S, Núñez S, De La Roca E, De La Herran R, Navas JI, Toranzo AE, Romalde JL.** 2011. Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). *Res. Vet. Sci.*, **90**: 189-195.
99. **Lopez-Cortes L, Luque A, Martinez-Manzanares E, Castro D, Borrego JJ.** 1999. Adhesion of *Vibrio tapetis* to clam cells. *J. Shellfish. Res.* **18**:91-97.
100. **Manefield M, De Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P, Kjelleberg S.** 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* **145**:283-291.

101. **Mårdén P, Tunlid A, Malmcrona-Friberg K, Odham G, Kjelleberg S.** 1985. Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch. Microbiol.* **142**:326–332.
102. **Mashburn-Warren L, McLean RJC, Whiteley M.** 2008. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology* **6**:214-219.
103. **Matz C, McDougald D, Moreno AM, Yung PY, Yildiz FH, Kjelleberg S.** 2005. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:16819-16824.
104. **Menzl K, Maier E, Chakraborty T, Benz R.** 1996. HylA hemolysin of *Vibrio cholerae* 01 biotype El Tor – identification of the hemolytic complex and evidence for the formation of anion-selective ion-permeable channels. *Eur. J. Biochem.* **240**:646-654.
105. **Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK, Bassler BL.** 2002. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**:303-314.
106. **Milton D.** 2006. Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**:61-71.
107. **Monnet V, Juillard V, Gardan R.** 2014. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* sous presse.
108. **Montgomery MT, Kirchman DL.** 1993. Role of chitin-binding proteins in the specific attachment of the marine bacterium *Vibrio harveyi* to chitin. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:373-379.
109. **Moorthy S et Watnick PI.** 2004. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol. Microbiol.* **52**: 573-587.
110. **Morris AR, Visick KL.** 2010. Control of biofilm formation and colonization in *Vibrio fischeri*: a role for partner switching ? *Environ. Microbiol.* **12**:2051-2059.
111. **Natrah FMI, Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P.** 2011. Disruption of bacterial cell-to-cell communication by marine organisms and its relevance to aquaculture. *Mar. Biotechnol.* **13**:109-126.
112. **Ng WL, Bassler BL.** 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Ann. Rev. Genet.* **43**:197-222.
113. **Ng WL, Perez LJ, Wei Y, Kraml C, Semmelhack MF, Bassler BL.** 2011. Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsQ quorum-sensing systems. *Mol. Microbiol.* **79**:1407-1417.
114. **Nicolas JL, Ansquer D, Cochard JC.** 1992. Isolation and characterization of a pathogenic bacterium specific to manila clam *Tapes philippinarum* larva. *Dis. Aquat. Org.* **14**:153-159.
115. **Nicolas JL, Basuyaux O, Mazuries J, Thébault A.** 2002. *Vibrio carchariae*, a pathogen of the abalone *Haliotis tuberculata*. *Dis. Aquat. Org.* **50**:35-43.

116. **Nijland R, Hall, MJ, Burgess JG.** 2010. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PLoS One* **5**:e15668.
117. **Nithya C, Pandian SK.** 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected marine bacterial culture supernatants against *Vibrio* spp. *Arch. Microbiol.* **192**:843-854.
118. **Nyholm SV, Stabb EV, Ruby EG, McFall-Ngai MJ.** 2000. Establishment of an animal-bacterial association: recruiting symbiotic vibrios from the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 10231-10235.
119. **Ohnishi HY, Mizunoe Y, Takade A, Tanaka Y, Miyamoto H, Harada M, Yoshida S.** 2004. *Legionella dumoffii* DjlA, a member of the DnaJ family, is required for intracellular growth. *Infect. Immun.* **72**:3592-3603.
120. **Oishi M, Cosloy SD.** 1972. The genetic and biochemical basis of the transformability of *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49**:1569-1572.
121. **Okada K, Iida T, Kita-Tsukamoto K, Honda T.** 2005. Vibrios commonly possess two chromosomes. *J. Bacteriol.* **187**:252-257.
122. **Oliver JD.** 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:415-425.
123. **Olivier V, Kenneth Haines III G, Tan Y, Fullner Satchell KJ.** 2007. Hemolysin and the multifunctional autoprocessing RTX toxin are virulence factors during intestinal infection of mice with *Vibrio cholerae* El Tor O1 strains. *Infect. Immun.* **75**:5035-5042.
124. **O'Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, Dreschera K, Semmelhack MF, Bassler BL.** 2013. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *PNAS.* **110**:17981-17986
125. **O'Toole GA, Kolter R.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**:295-304.
126. **O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:49-79.
127. **Paillard C, Percelay L, Le Pennec M, Le Picard D.** 1989. Origine pathogène de l'«anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve) = Pathogenic origin of the brown ring in *Tapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia). *C. R. Acad. Sci. III-Vie* **309**:235-241.
128. **Paillard C, Maes P.** 1990. Étiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C. R. Acad. Sci. III-Vie* **310**:15-20.
129. **Paillard C.** 1992. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest. Etiologie et caractérisation de la maladie de l'anneau brun chez la palourde d'élevage, *Ruditapes philippinarum*.
130. **Paillard C, Maes P, Oubella R.** 1994. Brown ring disease in clams. *Ann. Rev. Fish Dis.* **4**:219-240.

131. **Paillard C, Maes P.** 1995a. The Brown Ring Disease in the manila clam *Ruditapes philippinarum* I. Ultrastructural alterations of the periostracal lamina. *J. Invertebr. Pathol.* **65**:91-100.
132. **Paillard C, Maes P.** 1995b. The Brown Ring Disease in the manila clam *Ruditapes philippinarum* II. Microscopic study of the brown ring syndrome. *J. Invertebr. Pathol.* **65**: 101-110.
133. **Paillard C, Maes P, Mazuries J, Claude S, Marhic A, Le Pennec M.** 1997. Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variations of prevalence. *Proc. VIIIe Symp. Int. Soc. Veterinary Epidemiology and Economics* **31/32**:14.03.1-14.03.3.
134. **Paillard C.** 2004a. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Living Resour.* **17**:467-475.
135. **Paillard C.** 2004b. Habilitation à diriger des recherches (HDR), Université de Bretagne Occidentale, Brest. Rôle de l'environnement dans les interactions hôtes-pathogènes ; développement d'un modèle de vibriose chez les bivalves.
136. **Paillard C, Le Roux F, Borrego, JJ.** 2004a. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat. Living Resour.* **17**:477-498.
137. **Paillard C, Allam B, Oubella R.** 2004b. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* **59**:249-262.
138. **Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T.** 2009. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* **75**:90-103.
139. **Papa R, Parrilli E, Sannino F, Barbato G, Tutino ML, Artini M, Selan L.** 2013. Anti-biofilm activity of the antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Res. Microbiol.* **164**:450-456.
140. **Paranjpye RN, Strom MS.** 2005. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells and virulence. *Infect. Immun.* **73**:1411-1422.
141. **Paranjpye RN, Lara JC, Pepe JC, Pepe CM, Strom MS.** 1998. The type IV leader peptidase/N-methyltransferase of *Vibrio vulnificus* controls factors required for adherence to HEp-2 cells and virulence in iron-overloaded mice. *Infect. Immun.* **66**:5659-5668.
142. **Parsek MR, Singh PK.** 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:677-701.
143. **Parsek MR, Greenberg EP.** 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *TRENDS Microbiol.* **13**:27-33.
144. **Pizzaro-Cerda J, Cossart P.** 2006. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell* **124**:715-727.
145. **Prayitno SB, Latchford JW.** 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. *Aquaculture.* **132**:105-112.

146. **Pratt LA, Kolter R.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* **30**:285-293.
147. **Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P.** 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**:5993-6002.
148. **Qian PY, Lau SCK, Dahms HU, Dobretsov S, Harder T.** 2007. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Mar. Biotechnol.* **9**:399-410.
149. **Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L.** 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell. Mol. Life. Sci.* **63**:2560-2570.
150. **Ray VA, Visick KL.** 2012. LuxU connects quorum sensing to biofilm formation in *Vibrio fischeri*. *Mol. Microbiol.* **86**: 954-970.
151. **Reguera G et Kolter R.** 2005. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J. Bacteriol.* **187**: 3551-3555.
152. **Reid HI, Duncan HL, Laidler LA, Hunter D, Birkbeck TH.** 2003a. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*
153. **Reid HI, Soudant P, Lambert C, Paillard C, Birkbeck TH.** 2003b. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Org.* **56**:249-258.
154. **Roch P.** 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed in marine invertebrates. *Aquaculture.* **172**:125-145.
155. **Rodkhuma C, Hironoa I, Crosab JH, Aokia T.** 2005. Four novel hemolysin genes of *Vibrio anguillarum* and their virulence to rainbow trout. *Microb. Pathogenesis* **39**:109-119.
156. **Rosenberg M, Bayer EA, Delarea J, Rosenberg E.** 1982. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:929-937.
157. **Ruby EG.** 1996. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:591-624.
158. **Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL.** 2007. Inferring the evolutionary history of Vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J. Bacteriol.* **189**:7932-7936.
159. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
160. **Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Ramamurthy T, Hamabata T, Kurakawa T, Takeda M, Colwell RR, Nair GB, Takeda Y.** 2010. Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by co-culture with eukaryotic cells.

161. **Seper A, Fengler VH, Roier S, Wolinski H, Kholwein SD, Bishop AL, Camilli A, Reid J, Schild S.** 2011. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **82**:1015-1037. *Microbiol. Immunol.* **54**: 502–507.
162. **Schembri MA, Kjærgaard K, Klemm P.** 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* **48**:253-267.
163. **Shibata S, Yip ES, Quirke KP, Ondrey JM, Visick KL.** 2012. Roles of the structural symbiosis polysaccharide (*syp*) genes in host colonization, biofilm formation, and polysaccharide biosynthesis in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **194**:6736-6747.
164. **Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WN.** 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* **27**:87-98.
165. **Simon M.** 2014. Action anti-biofilm contre des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne Sud, Lorient.
166. **Sindermann CJ.** 1990. Diseases of marine shellfish. Principal diseases of marine fish and shellfish . Academic Press, San Diego.
167. **Skindersoe M, Ettinger-Epstein P, Rasmussen T, Bjarnsholt T, De Nys R, Givskov M.** 2008. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar. Biotechnol.* **10**:56-63.
168. **Sutherland, IW.** 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9**:222–227.
169. **Spoering AL, Gilmore MS.** 2006. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:133-137.
170. **Spurr AR.** 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultra. Struct. R.* **26**:31-43.
171. **Stowe SD, Richards JJ, Tucker AT, Thompson R, Melander C, Cavanagh J.** 2011. Anti-biofilm compounds derived from marine sponges. *Mar. Drugs* **9**:2010-2035.
172. **Tall BD, Fall S, Pereira MR, Ramos-Valle M, Curtis SK, Kothary MH, Chu DMT, Monday SR, Kornegay L, Donkar T, Prince D, Thunberg RL, Shangraw KA, Hanes DE, Khambaty FM, Lampel KA, Bier JW, Bayer RC.** 2003. Characterization of *Vibrio fluvialis*-like strains implicated in limp lobster disease. *App. Environ. Microbiol.* **69**:7435-7446.
173. **Tamayo R, Patimalla B, Camilli A.** 2010. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **78**:3560–3569.
174. **Thenmozhi R, Nithyanand P, Ratha J, Pandian SK.** 2009. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol Med. Microbiol.* **57**:284-294.

175. **Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Engelbeen K, Denys R, Swings J.** 2002. *Vibrio trachuri* Iwamoto *et al.* 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Jonhson and Shunk, 1936) Baumann *et al.* 1981. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **52**:973-976.
176. **Thompson FL, Iida T, Swings J.** 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:403-431.
177. **Thompson FL, Gomez-Gil B, Ribeiro Vasconcelos AT, Sawabe T.** 2007. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4279-4285.
178. **Tolker-Nielsen T, Sternberg C.** 2011. Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr. Protoc. Microbiol.* **1B**:2.1-2.17.
179. **Tolker-Nielsen T, Sternberg C.** 2014. Methods for studying biofilm formation: Flow cells and confocal laser scanning microscopy. *Methods Mol. Biol.* **1149**:615-629.
180. **Tubiash HS, Chanley PE, Leifson E.** 1965. Bacillary necrosis disease of larval and juvenile bivalve molluscs. I. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* **90**:1036-1044.
181. **Tubiash HS, Otto SV, Hugh R.** 1973. Cardiac edema associated with *Vibrio anguillarum* in the American oyster. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* **63**:39-42.
182. **Tubiash HS.** 1975. Bacterial pathogen associated with cultured bivalve mollusk larvea. *Culture of Marine Invertebrate Animals.* Plenum. New-York. p.61-71.
183. **Trinkler N.** 2009. Thèse de Doctorat. Université de Bretagne Occidentale, Brest. La guérison coquillère : Un mécanisme de défense de la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* face au *Vibrio tapetis* dans le cadre de la maladie de l'anneau brun.
184. **Trucksis M, Michalski J, Deng YK, Kaper JB.** 1998. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 14464-14469.
185. **Trust TJ.** 1986. Pathogenesis of infectious disease of fish. *Ann. Rev. Microbiol.* **40**:479-502.
186. **Val ME, Skovgaard O, Ducos-Galand M, Bland MJ, Mazel D.** 2012. Genome Engineering in *Vibrio cholerae*: A feasible approach to adress biological issues. *PLoS Genet.* **8**:e1002472.
187. **Van Houdt R, Michiels CW.** 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* **109**:1117-1131.
188. **Visick KL, Foster J, Doino J, McFall-Ngai M, Ruby EG.** 2000. *Vibrio fischeri lux* genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *J. Bacteriol.* **182**:4578-86.
189. **Vezzulli L, Pezzati E, Stauder M, Stagnaro L, Venier P, Pruzzo C.** 2014. Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aesturianus*. *Environ. Microbiol.* DOI: 10.1111/1462-2920.12484.
190. **Waldor MK, RayChaudhuri.** 2000. Treasure trove for cholera research. *Nature* **406**: 469-470.

191. **Wang Q, Liu Q, Cao X, Yang M, Zhang Y.** 2008. Characterization of two TonB systems in marine fish pathogen *Vibrio alginolyticus*: their roles in iron utilization and virulence. *Arch. Microbiol.* **190**: 595-603.
192. **Waters CM, Bassler BL.** 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **21**:319-346.
193. **Watnick PI, Kolter R.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* **34**:586-595.
194. **Watnick PI, Fulner KJ, Kolter R.** 1999. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**:3606-3609.
195. **Watnick PI, Kolter R.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **182**:2675-2679.
196. **Watnick P, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R.** 2001. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* **39**:223-235.
197. **Webb JS, Thompson LS, Jame S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M, Kjelleberg S.** 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* **185**:4585-4592.
198. **Weiss Nielsen M, Sternberg C, Molin S, Regenbreg B.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *J. Vis. Exp.* **47**:2383.
199. **Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS.** 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
200. **Whiteley M, Bangera MG, Bumgamer RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S Greenberg EP.** 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**:860-864.
201. **Williams V, Fletcher M.** 1996. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:100-104.
202. **Yamaichi Y, Iida T, Park KS, Yamamoto K, Honda T.** 1999. Physical and genetic map of the genome of *Vibrio parahaemolyticus*: presence of two chromosomes in *Vibrio* species. *Mol. Microbiol.* **31**:1513-1521.
203. **Yildiz FH, Schoolnick GK.** 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**:4028-4033.
204. **Yildiz FH, Visick KL.** 2008. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* **17**:109-118.
205. **Yip ES, Grublesky BT, Hussa EA, Visick KL.** 2005. A novel, conserved cluster of genes promotes symbiotic colonization and sigma-dependent biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *Mol. Microbiol.* **57**:1485-1498.

206. **Zhang XH, Austin B.** 2005. Haemolysins in *Vibrio* species. *J. Appl. Microbiol.* **98**:1011-1019.
207. **Zobell CE.** 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J. Mar. Res.* **4**:41-75.
208. **Zhou L, Srisatjaluk R, Justus DE, Doyle RJ.** 1998. On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:223-228.
209. **Zhu J, Mekalanos JJ.** 2003. Quorum-sensing dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev. Cell* **5**:647-656.

ANNEXES

CONGRÈS INTERNATIONAL VIBRIO2011 (Espagne)

Biofilms of the *Vibrio tapetis* pathogen strain CECT4600

Sophie Rodrigues,^{1,2} Alexis Bazire,¹ Christine Paillard,² and Alain Dufour¹

1 Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UEB), Lorient, France

2 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, CNRS, Plouzané, France

Vibrio tapetis CECT4600 is a pathogenic bacterium that causes the Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* [1]. This vibriosis is induced by bacterial adhesion on the periostracal lamina, yielding a decalcification of the bivalve shell. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to a particular microbial behavior: biofilm formation. In this study, *V. tapetis* biofilms were characterized for the first time. Biofilms were grown at 18°C on glass slides in flow cell chambers as follows: *V. tapetis* CECT4600 containing the pVSV102 plasmid [2], which encodes the Green Fluorescent Protein (GFP), was allowed to attach for 2 h to the glass surface, and a flow of culture medium was applied for up to 48 h to obtain biofilm growth. Attached bacteria and biofilms were observed using confocal laser scanning microscopy to monitor the GFP fluorescence. This strain formed homogeneous biofilms with maximal thicknesses of 25-30 µm. We examined the impact on biofilm development of conditions which are relevant for coastal environments and/or are known to alter the *V. tapetis* pathogenicity (elevated temperature, higher salinity, iron limitation). Increasing salinity had the most pronounced effect on biofilm development. The anti-biofilm activity from supernatant cultures of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6 [3] was tested against *V. tapetis*, revealing an inhibition of adhesion and biofilm formation. This study yields the bases for future works aiming at deciphering the involvement of biofilm formation in the infection process of the Manila clam leading to BRD and at developing anti-*Vibrio* strategies.

References

- [1] C. Paillard. *Aquat. Living Resour.* 17 (2004) 467-475.
- [2] M.A. Travers, A. Barbou, N. Le Goïc, S. Huchette, C. Paillard, M. Koken. *FEMS Microbiol. Lett.* 289 (2008) 34-40.
- [3] A. Dheilly, E. Soum-Soutera, G.L. Klein, A. Bazire, C. Compère, D. Haras, A. Dufour. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) 3452-3461.

Sophie RODRIGUES^{1,2}, Alexis BAZIRE¹, Christine PAILLARD² and Alain DUFOUR^{1*}

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), EA 3884, Université de Bretagne Sud, UEB, Lorient, France

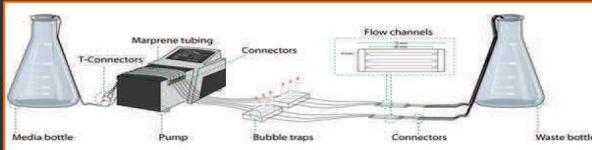
² Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), CNRS, Plouzané, France
* alain.dufour@univ-ubs.fr

INTRODUCTION

Vibrio tapetis CECT4600 is a pathogenic bacterium that causes the **Brown Ring Disease** (BRD) in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Paillard *et al.* 2004. *Aquat. Living Resour.* **17**, 467-475). This vibriosis is induced by bacterial adhesion on the periostracal lamina, yielding a decalcification of the bivalve shell. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to a particular microbial behavior: **biofilm formation**.

► In this study, *V. tapetis* biofilms were characterized for the first time. We examined the impact on biofilm development of conditions which are relevant for coastal environments and/or are known to alter the *V. tapetis* pathogenicity. We also tested the anti-biofilm activity from supernatant cultures of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

MATERIALS & METHODS

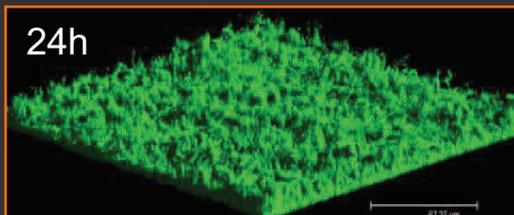


Biofilms were grown at 18°C on glass slides in flow cell chambers as follows: *V. tapetis* CECT4600 containing the pVSV102 plasmid (Travers *et al.* 2008. *FEMS Microbiol. Lett.* **26**, 3452-3461), which encodes the Green Fluorescent Protein (GFP), was allowed to attach for 2 h to the glass surface, and a flow of culture medium (Zobell) was applied for up to 48 h to obtain biofilm growth. Attached bacteria and biofilms were observed using **confocal laser scanning microscopy** to monitor the GFP fluorescence.

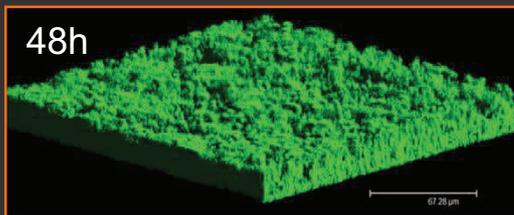
RESULTS

► *V. tapetis* forms a mature biofilm in 48 h on glass

CECT4600-GFP
3% Sea Salts
Biomass : 4 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$
Thickness : 20-25 μm



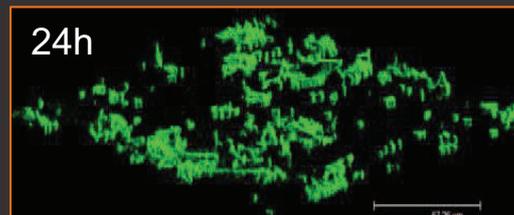
CECT4600-GFP
3% Sea Salts
Biomass : 4.5 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$
Thickness : 25-30 μm



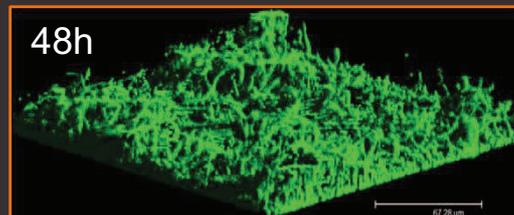
Standard conditions

► Increasing salinity negatively affects biofilm development

CECT4600-GFP
5% Sea Salts
Biomass : 0.54 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$
Thickness : 0.5-1 μm



CECT4600-GFP
5% Sea Salts
Biomass : 8 $\mu\text{m}^3 \cdot \mu\text{m}^{-2}$
Thickness : 9-11 μm



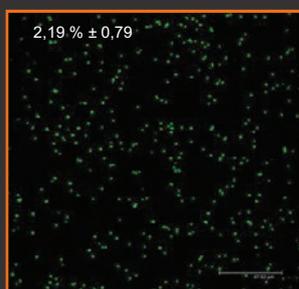
Increased salinity



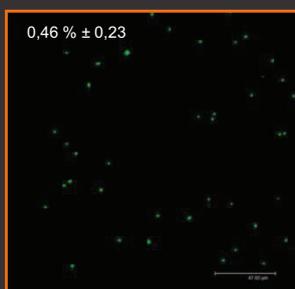
Our observations highlighted the negative effect of increased salinity on biofilm formation.

► Anti-biofilm activity of culture supernatant of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6})

• Inhibition of bacterial adhesion

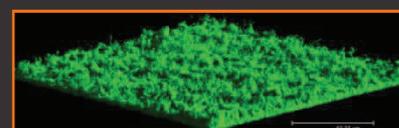


Glass without SN_{3J6}

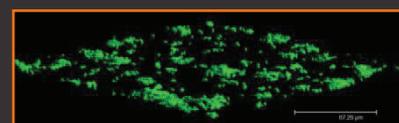


Glass with SN_{3J6}

• Inhibition of biofilm formation (24h)



Standard conditions



Anti-biofilm activity (SN_{3J6})



The surface covered by bacteria is about 5 fold lower after surface-conditioning by SN_{3J6}. After 24h of growth, there is an inhibition of biofilm formation and the biomass is about 8 fold lower compared to the control (standard conditions).

CONCLUSION

This study yields the bases for future works aiming at deciphering the involvement of biofilm formation in the infection process of the Manila clam leading to BRD and at developing anti-*Vibrio* strategies.

Acknowledgements. SR is the recipient of a doctoral fellowship from the Région Bretagne, France. This work is supported by the Axis 1 "Genomics and blue chemistry" of the GIS Europôle Mer and European FEDER.

Anti-biofilm activity of a culture supernatant from a marine bacterium strain

Marjolaine Simon^{1*}, Sophie Rodrigues^{1,2*}, Erwan Pernet¹, Christine Paillard², Alexis Bazire¹
and Alain Dufour¹

*M.S. And S.R. contributed equally to this work

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UEB), Lorient, France

² Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, CNRS, Plouzané, France

When they form biofilm, bacteria can become more tolerant against antibiotics or host defenses, explaining that chronic infections can be difficult to treat and the necessity to find new alternative treatments. The present study aims at inhibiting the biofilm development of two pathogen bacteria: *Vibrio tapetis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *V. tapetis* CECT4600 is a pathogenic bacterium causing the Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*, whereas *P. aeruginosa* is a human pathogen inducing chronic lung infections in Cystic Fibrosis (CF) patients. We used two clinical isolates of *P. aeruginosa*, MUC-N1 and MUC-N2, which were isolated from CF patients and are nonmucoïd and mucoïd, respectively. Adhesion and biofilm formation on glass of *V. tapetis* and *P. aeruginosa* strains were observed under dynamic conditions using Confocal Laser Scanning Microscopy, they formed different biofilm structures.

The marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 secretes proteinaceous molecule(s) able to inhibit biofilm formation of marine bacteria without affecting planktonic bacteria. The activity of the 3J6 culture supernatant (SN_{3J6}) was here tested against *V. tapetis* CECT4600 and *P. aeruginosa* MUC-N1 and MUC-N2. Two strategies were tested. The first consisted in the surface conditioning by SN_{3J6} for 2 h before inoculating the bacteria. The second was the inoculation of bacteria directly with the SN_{3J6} during the adhesion step. The biofilm formation by all three strains was impaired to various levels, showing that SN_{3J6} spectrum of action includes *V. tapetis* and clinical *P. aeruginosa* strains. The final aim of this work is to develop antibiofilm strategies.

Keywords: biofilm, antibiofilm activity, *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6

Marjolaine Simon^{1*}, Sophie Rodrigues^{1,2*}, Erwan Pernet¹, Christine Paillard², Alexis Bazire¹ and Alain Dufour¹ (alain.dufour@univ-ubs.fr)

- ¹ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UEB), Institut Universitaire Européen de la Mer, Lorient, France
² Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, CNRS, Plouzané, France

Introduction

When bacteria form biofilms, they become more resistant to antibiotics and host defenses, explaining the difficulty to treat chronic infections and the necessity of finding new alternatives treatments. The present study aims at inhibiting the biofilm development of two pathogenic bacteria: *Vibrio tapetis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *V. tapetis* CECT4600 is a pathogenic bacterium causing the Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Dheilly *et al.* 2010. Appl. Environ. Microbiol. **76**, 3452-3461), whereas *P. aeruginosa* is a human pathogen inducing chronic lung infections in Cystic Fibrosis (CF) and immunocompromized patients. The marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 secretes proteinaceous molecule(s) which is able to inhibit biofilm formation of marine bacteria without affecting planktonic bacteria (Paillard *et al.* 2004. Aquat. Living Resour. **17**, 467-475). The same report was concluded for *P. aeruginosa* PAO1.

Methods

The activity of the *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 culture supernatant (SN_{3J6}) was tested against *V. tapetis* CECT4600 and two clinical *P. aeruginosa* strains, MUC-N1 and MUC-N2, isolated from CF patients. Biofilm formation on glass of *V. tapetis* and both *P. aeruginosa* strains were observed under dynamic conditions using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Biofilms were observed after 24 h of growth. Biofilms of *P. aeruginosa* were stained with syto 9 green (green fluorescence). The strain *V. tapetis* CECT4600 already contains the gene encoding the Green Fluorescent Protein (GFP). Two different strategies were tested. The first consisted in the surface conditioning by SN_{3J6} 2 h before inoculating the bacteria. The second was the inoculation of bacteria directly with the SN_{3J6} during the 2 h adhesion step. The 3-dimensional views and the inhibition effect of SN_{3J6} (on biomasses and average thicknesses) were estimated using COMSTAT software. Biofilms were grown in Zobell for *V. tapetis* and in LB for *P. aeruginosa*.

Results

SN_{3J6} effect on *V. tapetis* biofilm development after 24 h under dynamic conditions

SN_{3J6} effect on *P. aeruginosa* MUC-N1 and MUC-N2 biofilms development after 24 h under dynamic conditions

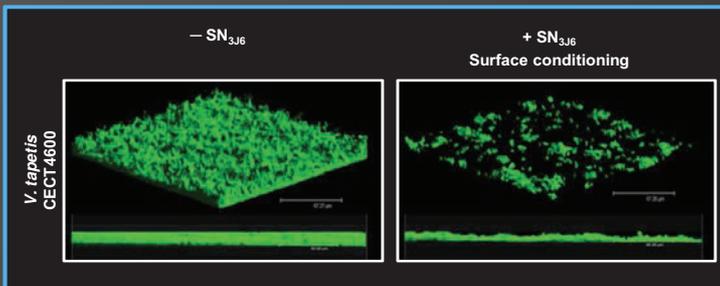


Fig.1: 3-dimensional views of 24 h biofilms of *V. tapetis* CECT4600 observed by CLSM using GFP fluorescence.

After 24h of growth, when the surface is conditioned by SN_{3J6} the biomass is reduced by 10-fold and the thickness is about 25-fold lower compared to the control (- SN_{3J6})
 The second strategy (inoculation of bacteria with SN_{3J6}) is under preparation.

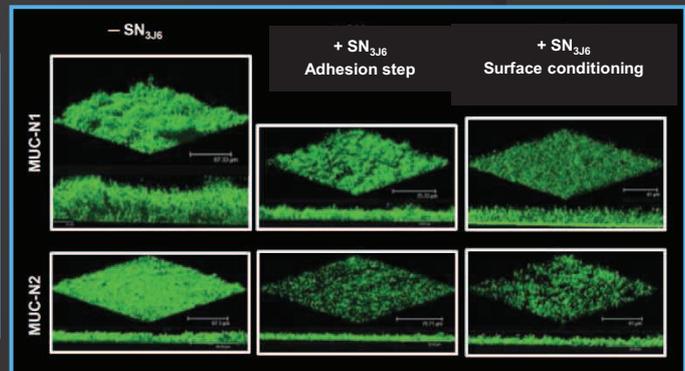


Fig.2: 3-dimensional views and side-views of 24 h biofilms of both *P. aeruginosa* strains observed by CLSM using Syto 9 green dye.

The 3-dimensional views indicate that both *P. aeruginosa* clinical strains are sensitive to SN_{3J6} because the biomass and average thickness of MUC-N1 are distinctly reduced (respectively decreasing by a factor of 8 and 3). The SN_{3J6} effect is more significant on the biomass of MUC-N2 with a diminution by a factor of 20. The average thickness is diminished by a factor of 2.

Discussion and Conclusion

The biofilm formation by all three strains was impaired to various levels, showing that SN_{3J6} spectrum of action includes *V. tapetis* and clinical *P. aeruginosa* strains. To continue this study further experiments will be performed on the effects of SN_{3J6} on the bacterial viability, preformed biofilm and extracellular matrix. We will examine if SN_{3J6} can ease the antibiotic activity, which would be a major interest in the area of therapeutics. Cytotoxicity tests will be executed to ensure the potential therapeutic uses of the proteinaceous molecule(s). The purification and identification of the molecule(s) are in progress. The final aim of this work is the development of antibiofilm strategies.

Biofilms of the *Vibrio tapetis* pathogen strain CECT4600, the causative agent of Brown Ring Disease

Sophie Rodrigues,^{1,2} Alexis Bazire,¹ Christine Paillard,² and Alain Dufour¹

1 Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UEB), Lorient, France

2 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, CNRS, Plouzané, France

Vibrio tapetis CECT4600 is a pathogenic bacterium that causes the Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. This Vibriosis is induced by bacterial adhesion on the periostracal lamina, yielding an inhibition of biomineralisation of the bivalve shell. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to biofilm formation. In this study, *V. tapetis* biofilms were characterized for the first time. Biofilms were grown at 18°C in flow cell chambers. *V. tapetis* CECT4600-GFP was allowed to attach for 2h to the glass slide, and a flow of Zobell medium was applied for 48h. Biofilms were observed using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) to monitor the GFP fluorescence and viability assessments were performed. This strain formed homogeneous biofilms with maximal thicknesses of 25-30 µm. We examined the impact on biofilm development of conditions which are relevant for coastal environments and/or are known to modulate *V. tapetis* pathogenicity (elevated temperature, higher salinity, and iron limitation). In response to increased salinity, *V. tapetis* formed a biofilm constituted of filamentous cells, which was neither observed in biofilms grown in liquid cultures even at high salinity.

Spherical structures of unknown nature were observed both by CLSM and Scanning Electronic Microscope (SEM) at the top of *V. tapetis* biofilms grown in various conditions. These structures had an average diameter of about 1-2 µm, were physically linked to the bacteria, and showed a different surface aspect than the bacterial surface. Moreover, these structures displayed a GFP fluorescence and could be stained with DNA-binding dyes, indicating that they contain DNA and proteins.

This study yields the bases for future works aiming at deciphering the involvement of biofilm formation in the infection process of the Manila clam which leads to BRD.

Keywords: Biofilm, *Vibrio tapetis*, Brown Ring Disease.

Biofilm of *Vibrio tapetis* pathogen strain displays unusual structures

Sophie RODRIGUES^{1,2*}, Alexis BAZIRE¹, Christine PAILLARD² and Alain DUFOUR¹

¹Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), EA 3884, Université de Bretagne Sud, UEB, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Lorient, France
²Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), CNRS, Plouzané, France
 *sophie.rodrigues@univ-ubs.fr

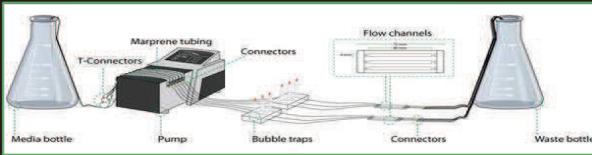
INTRODUCTION

Vibrio tapetis is the causative agent of the Brown Ring Disease (BRD) in manila clam *Ruditapes philippinarum* (Paillard *et al.* 2004, Aquat. Living Resour. **17**, 467-475). This vibriosis is induced by the bacterial adhesion on the shell secretion and exhibits a brown deposit on the inner shell of the valves, leading to decalcification, lesions and death. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to biofilm formation.



While characterizing for the first time the biofilm of *V. tapetis* pathogen strain CECT4600, we observed spherical structures of unknown composition, which we describe here.

MATERIALS & METHODS



Biofilms were grown at 18°C on glass slides in flow cell chambers as follows: *V. tapetis* CECT4600 containing or not the GFP-encoding plasmid pVSV102 (Travers *et al.* 2008, FEMS Microbiol. Lett. **76**, 3452-3461) was allowed to attach for 2 h to the glass surface, and a flow of culture medium (Zobell) was applied for up to 48 h to obtain biofilm growth. Attached bacteria and biofilms were observed using **Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)** to monitor the fluorescence of GFP or DNA-binding dyes (Syto 9 green or propidium iodide) and by **Scanning Electronic Microscopy (SEM)** to observe the surface aspect of the spherical structures.

RESULTS

► Upper layers of *V. tapetis* biofilm display GFP-containing spherical structures...

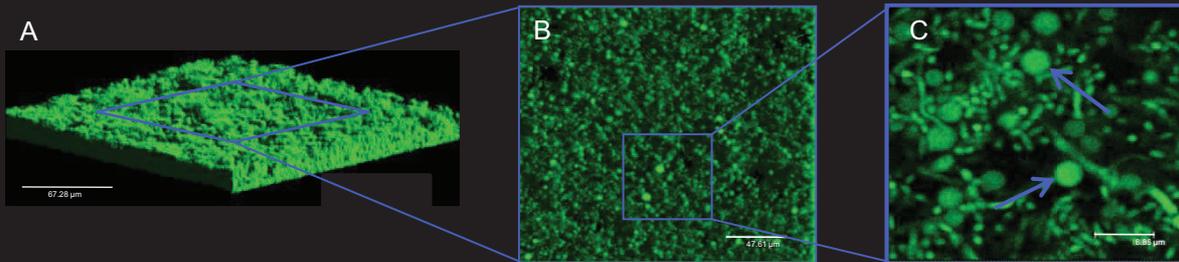


Fig. 1: *V. tapetis* CECT4600(pVSV102) biofilm observed by CLSM using GFP fluorescence. [A]: 3-dimensional view; [B]: top view; [C]: zoom of a section view. Arrows indicate the structures.

► ... including DNA, permeable to dyes...

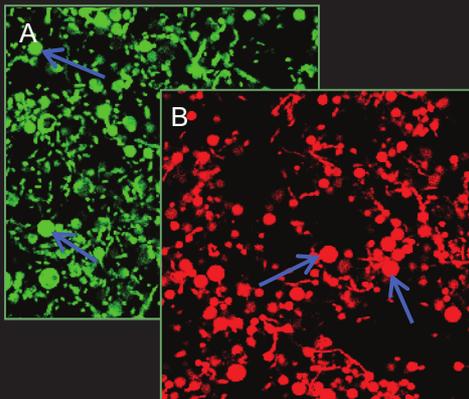


Fig. 2: *V. tapetis* CECT4600 biofilm stained by DNA-binding dyes Syto 9 green (diffuses through membranes) [A] or propidium iodide (does not diffuse through intact membranes) [B]. Arrows indicate the structures

► ... and with a surface of irregular aspect.

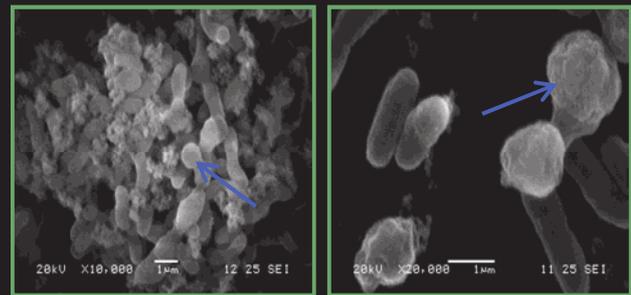


Fig. 3: *V. tapetis* CECT4600 biofilm observed by SEM. Arrows indicate the structures.

Biofilms of the *V. tapetis* pathogen strain CECT4600 shows spherical structures at their surface. These structures, with an average diameter of ~1-2 µm, showed a different surface aspect than bacteria, and seem to be physically linked to the cells. Moreover, the structures displayed a GFP fluorescence (Fig.1) and could be stained with DNA-binding dyes (Fig.2), indicating that they contain proteins and DNA.

These observations support the hypothesis that the structures are excrescences from the bacteria cells to which they seem to remain attached. Staining by a DNA-binding dye unable to diffuse through intact membranes (propidium iodide) indicates that the structures are more permeable than viable cells. Interestingly, such structures were neither observed on planktonic *V. tapetis* CECT4600 bacteria nor in biofilms of the non-pathogenic strain *V. tapetis* LP2 (not shown), suggesting that they are biofilm specific and that they might be related to bacterial virulence.

CONCLUSION

To our knowledge, these structures have never been previously observed in a *Vibrio* biofilm or in biofilms from other bacterial genera. Observations by Transmission Electronic Microscope (TEM) will be performed to study the inner organization of these structures.

Characterization of biofilm formed by *Vibrio tapetis*, the causative agent of Brown Ring Disease.

Sophie Rodrigues^{1,2}, *Alain Dufour*¹, *Christine Paillard*² and *Alexis Bazire*¹

1 Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UEB), Lorient, France

2 Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, CNRS, Plouzané, France

Vibrio tapetis CECT4600 is a pathogenic bacterium causing the Brown Ring Disease in Manila clam *Ruditapes philippinarum*. This vibriosis is induced by bacterial adhesion on the periostracal lamina, yielding a decalcification of bivalve shell. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to biofilm formation. In this study, *V. tapetis* biofilm was characterized for the first time. *V. tapetis* CECT4600 was allowed to attach for 2h to the glass slide of a flow chamber (FC). After 48h of Zobell medium flow, biofilms and their matrix were observed using Confocal Laser Scanning Microscopy. This strain formed homogeneous biofilms with maximal thicknesses of 25-30 μm . The extracellular matrix is mainly composed of exopolysaccharides stained by specific dyes. Furthermore, we set up new methods to observe *V. tapetis* biofilms grown in FC by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy (TEM). These complementary approaches allowed us to describe spherical structures observed at the top of *V. tapetis* CECT4600 biofilm. These biofilm-specific structures had an average diameter of 1-2 μm and showed a different surface aspect than the bacterial one and were also observed in biofilms of other *V. tapetis* strains, including pathogen and non-pathogen strains. Moreover, using a GFP-labelled strain, structures displayed GFP fluorescence and were stained with DNA dyes, revealing they contain DNA and proteins. To our knowledge, this type of structure was not previously reported and the outlook is to understand their function. More generally this study yields the bases for deciphering the biofilm formation and its relationship with pathogenesis.

Keywords: *Vibrio tapetis*, biofilm, confocal laser scanning microscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy.

Characterization of biofilm formed by *Vibrio tapetis* CECT4600, the causative agent of Brown Ring Disease

Sophie RODRIGUES^{1,2*}, Alain DUFOUR¹, Christine PAILLARD² and Alexis BAZIRE¹

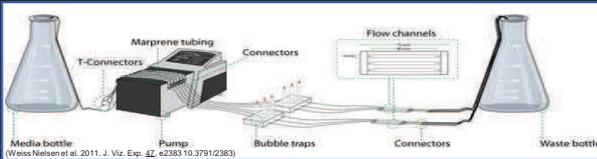
¹Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), EA 3884, Université de Bretagne Sud, UEB, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Lorient, France
²Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), CNRS, Plouzané, France
 *sophie.rodrigues@univ-ubs.fr

INTRODUCTION

Vibrio tapetis is the causative agent of the Brown Ring Disease (BRD) in manila clam *Ruditapes philippinarum* (Paillard *et al.* 2004. Aquat. Living Resour. 17, 467-475). This vibriosis is induced by the bacterial adhesion on the shell secretion, leading to decalcification and a brown deposit on the inner shell, lesions and death after infection of the mollusc tissues. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to biofilm formation. Therefore, the present study was aimed at characterizing for the first time the biofilm formed by *V. tapetis*. The objectives of this work were (i) to characterize the biofilm formation and structure under dynamic conditions and (ii) to estimate the composition of the extracellular matrix. Furthermore, we observed spherical structures of unknown composition which we also describe here.



MATERIALS & METHODS



Biofilms were grown at 18°C on glass slides in flow cell chambers as follows: *V. tapetis* CECT4600 was allowed to attach for 2 h to the glass surface, and a flow of culture medium (Zobell) was applied for up to 48 h to obtain biofilm growth. Attached bacteria and biofilms were observed using **Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)** to monitor the fluorescence of GFP protein and/or DNA-binding dyes (Syto 9 green 5µM, propidium iodide 1.5 µM). Compounds of extracellular matrix were stained with specific dyes (CalcoFluor White 100 µM, DDAO 5 µM). *V. tapetis* biofilm was also observed by **Scanning Electronic Microscopy (SEM)**.

RESULTS

► *V. tapetis* biofilm architecture

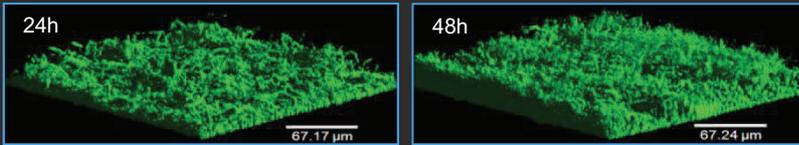


Fig. 1: 3-dimensional views of *V. tapetis* CECT4600 biofilm observed by CLSM (Syto 9 green staining).

	Biomass (µm ³ .µm ⁻²)	Average thickness (µm)	Max. thickness (µm)
24h	7.0 ± 2.2	12.5 ± 3.4	33.1 ± 6.0
48h	15.9 ± 3.3	26.3 ± 2.9	44.6 ± 5.6

Table 1: Image analysis of *V. tapetis* CECT4600 biofilm by COMSTAT

► Composition of *V. tapetis* biofilm matrix

- β-polysaccharides and extracellular DNA (eDNA)

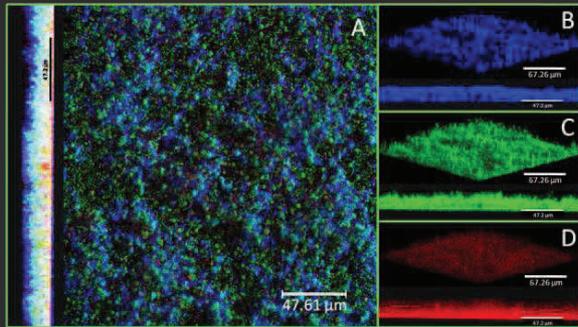


Fig. 2: Extracellular matrix compounds of *V. tapetis* CECT4600 biofilm stained by CalcoFluor white (β-polysaccharides) and DDAO (eDNA). [A] top view and side view of overlay; [B]: 3D view and side view of β-polysaccharides staining by CalcoFluor white (blue); [C]: 3D view and side view of cells detected by GFP fluorescence (green); [D]: 3D view and side view of eDNA staining by DDAO (red).

V. tapetis strain CECT4600 formed homogeneous biofilms (Fig.1) without cell motility after attachment to the surface (see the movie, flashcode). The biofilms displayed a maximal thickness of 40-50 µm and a biomass of about 15 µm³.µm⁻² at 48h (Table 1). Examination of extracellular matrix revealed the presence of eDNA at the biofilm base, and of homogeneously distributed polysaccharides.

Spherical structures were observed at the surface of *V. tapetis* biofilms. These structures, with an average diameter of ~1-2 µm, showed a different surface aspect than bacteria, and seemed to be physically linked to the cells (Fig.3A and B). Moreover, the structures displayed a GFP fluorescence (Fig.3E) and could be stained with DNA-binding dyes (Fig.3C and D), indicating that they contain proteins and DNA. These observations support the hypothesis that the structures are excrecences from the bacterial cells to which they seem to remain attached. We also observed these structures in biofilms of other *V. tapetis* strains, including pathogenic and non-pathogenic strains (data not shown).

- spherical structures of unknown composition

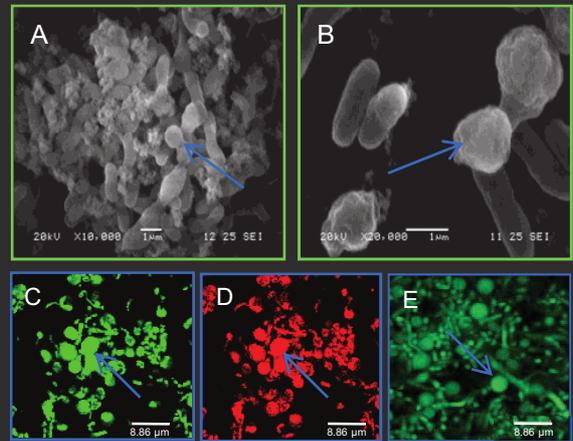


Fig. 3: *V. tapetis* CECT4600 biofilm and its structures observed by SEM ([A],[B]) and by CLSM ([C],[D],[E]). For CLSM the biofilm was stained with DNA-binding dyes: Syto 9 green (diffuses through membranes) [C] and propidium iodide (does not diffuse through intact membranes) [D]. [E]: GFP fluorescence. Arrows indicate the structures.

First steps of *V. tapetis* biofilm formation



CONCLUSION

V. tapetis pathogen strain CECT4600 is able to form a mature biofilm in 24h. CLSM imaging allows the observation of biofilm compounds such as eDNA and polysaccharides. *V. tapetis* biofilm displays unusual structures of unknown composition. To our knowledge, these structures have never been previously observed in a *Vibrio* biofilm or in biofilms from other bacterial genera. Observations by Transmission Electronic Microscope (TEM) are in progress and will enable to study the inner organization of these structures. Characterization for the first time of *V. tapetis* biofilm yields the bases for future works aiming at deciphering the involvement of biofilm formation in the infection process of the Manila clam leading to BRD.

Anti-*Vibrio* strategy: antibiofilm activity of a marine bacterium against *Vibrio tapetis* CECT4600 biofilm, the causative agent of Brown Ring Disease

Sophie Rodrigues^{1,2*}, *Alain Dufour*¹, *Christine Paillard*², and *Alexis Bazire*¹

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA3884, Université de Bretagne-Sud (UEB), Lorient, France

² Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer, Université de Bretagne Occidentale, CNRS, Plouzané, France

Vibrio tapetis CECT4600 is a pathogenic bacterium causing the Brown Ring Disease (BRD) in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. This vibriosis is induced by bacterial attachment on the periostracal lamina, yielding a decalcification of the bivalve shell. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to biofilm formation. The present study aims at inhibiting the adhesion and biofilm formation of *V. tapetis* by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. The latter secretes alterocin, a peptide able to inhibit biofilm formation without affecting planktonic bacterial growth. Adhesion and biofilm formation were performed in vitro on glass substratum under dynamic conditions and were observed using Confocal Laser Scanning Microscopy.

The antibiofilm activity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was tested against *V. tapetis* CECT4600-GFP. When this strain was co-inoculated with *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, we observed an inhibition of *V. tapetis* biofilm formation. Moreover, when the glass surface was coated during 2h with culture supernatant of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}), *V. tapetis* was not able to attach on the surface. These positive results prompt us to examine the potential probiotic effect of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 *in vivo*. *V. tapetis* attachment on clam and BRD development will be investigated by infecting manila clams with both *V. tapetis* and/or *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. This yields the bases for future works aiming at developing anti-*Vibrio* strategies potentially usable in aquaculture.

Keywords: Biofilm, *Vibrio tapetis*, Brown Ring Disease, antibiofilm activity, *Pseudoalteromonas*

Sophie RODRIGUES^{1,2*}, Alain DUFOUR¹, Christine PAILLARD² and Alexis BAZIRE¹

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM), EA 3884, Université de Bretagne Sud, UEB, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), Lorient, France

² Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), CNRS, Plouzané, France

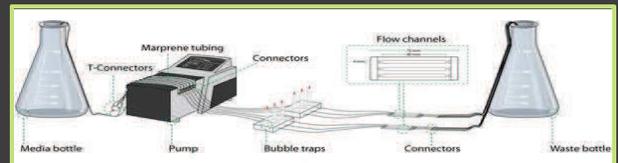
INTRODUCTION

Vibrio tapetis is the causative agent of the Brown Ring Disease (BRD) in manila clam *Ruditapes philippinarum* [1]. This vibriosis is induced by the bacterial adhesion on the shell secretion, leading to decalcification and a brown deposit on the inner shell. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to biofilm formation. Therefore, the present study aimed at inhibiting biofilm formation of *V. tapetis* CECT4600-GFP by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, which secretes alterocin, a peptide able to inhibit biofilm formation without affecting planktonic bacterial growth [2].



MATERIALS & METHODS

Adhesion and biofilms were performed *in vitro* on glass substratum in flow cell chambers at 18°C and were observed using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Biofilms were observed after 24h of growth under dynamic conditions. Two different strategies were tested. The first consisted in the surface conditioning with culture supernatant of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}) during 2h before inoculated *V. tapetis* CECT4600-GFP. The second was the co-inoculation of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and *V. tapetis* CECT4600-GFP leading to a mixed biofilm. Biofilms were observed by monitoring GFP (Green Fluorescent Protein) fluorescence and/or staining cells with 5 μM of SYTO61 red. Biomasses and average thicknesses were estimated using COMSTAT software.



RESULTS

► Inhibition of *V. tapetis* biofilm development by surface coating with SN_{3J6}

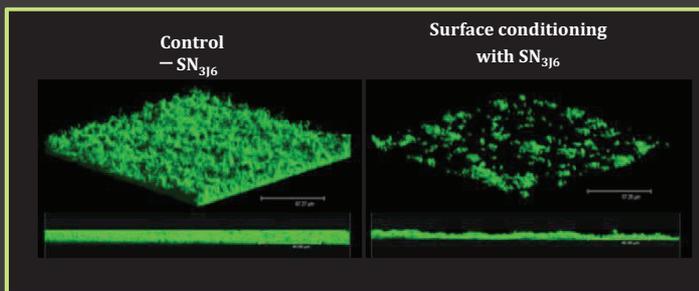


Fig.1: Three-dimensional views of 24h biofilms of *V. tapetis* CECT4600-GFP observed by CLSM using GFP fluorescence.

After 24h of growth, when the surface was conditioned by SN_{3J6}, *V. tapetis* CECT4600-GFP failed to form a full biofilm (Fig.1). This led to biofilm biomass and thickness about 15- and 30-fold lower, respectively, than those of control biofilms (-SN_{3J6}) (Fig.2). This showed that *V. tapetis* was sensitive to surface conditioning with SN_{3J6}.

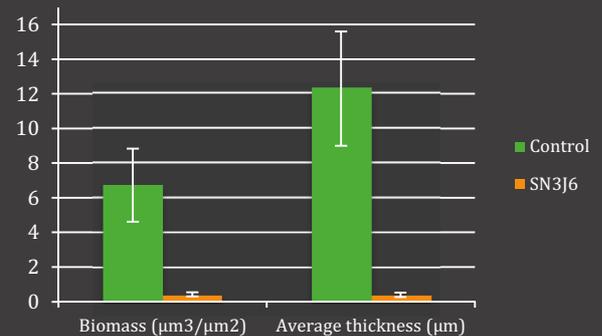


Fig.2: Effect of surface conditioning with SN_{3J6} on biomass and average thickness of *V. tapetis* CECT4600-GFP biofilms (image analysis by COMSTAT software).

► Inhibition of *V. tapetis* development in mixed biofilm

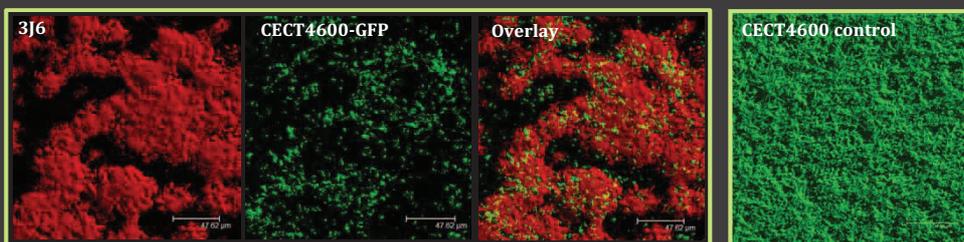


Fig.3: Top views of 24h mixed biofilms of *V. tapetis* CECT4600-GFP and *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (left frame) and biofilm of only *V. tapetis* CECT-GFP (right frame) observed by CLSM.

CLSM observations of mixed biofilms revealed that *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 inhibited the biofilm formation of *V. tapetis* CECT4600-GFP (Fig.3). Indeed, when both strains were co-inoculated, *V. tapetis* CECT4600-GFP biomass was reduced by more than 98% compared to the biofilm control of only *V. tapetis* CECT4600-GFP (Fig.3). In the mixed biofilm, *V. tapetis* represented only 5% of the total biomass (Fig.4), reflecting the high anti-biofilm activity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 against *V. tapetis* CECT4600.

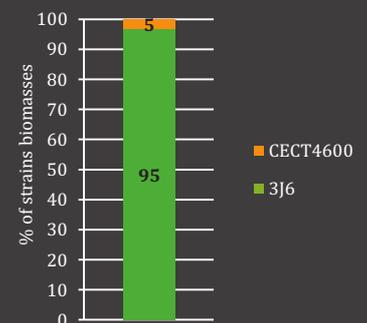


Fig.4: Biomass proportion of each strain in mixed biofilm. (Image analysis by COMSTAT software)

CONCLUSION

The antibiofilm activity of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 was tested against *V. tapetis* CECT4600-GFP. When *V. tapetis* CECT4600-GFP was co-inoculated with *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, we observed an inhibition of *V. tapetis* biofilm formation. Moreover, when the glass was coated during 2h with SN_{3J6}, *V. tapetis* was not able to attach on the surface. These positive results prompt us to examine soon the potential probiotic effect of *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 *in vivo*. *V. tapetis* attachment on clam and BRD development will be investigated by infecting manila clams with both *V. tapetis* and/or *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. This yields the bases for future works aiming at developing anti-*Vibrio* strategies potentially usable in aquaculture.

References: [1] Paillard *et al.* 2004. *Aquat. Living Resour.* 17, 467-475 ; [2] Dheilly *et al.* 2010. *Appl. Environ. Microbiol.* 76,3452-3461.

Acknowledgements. SR is the recipient of a doctoral fellowship from the Région Bretagne, France. This work is supported by the Axis 1 "Genomics and blue chemistry" of the GIS Européen Mer, European FEDER, and the LabexMER.

RÉSUMÉ

Vibrio tapetis est une bactérie pathogène responsable de la Maladie de l'Anneau Brun (MAB) chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum*. Cette vibriose est induite par l'adhésion du pathogène à la lame périostracale provoquant ainsi une décalcification de la coquille du bivalve. Nous nous sommes intéressés à un aspect de la pathogénicité de *V. tapetis* encore jamais exploré jusqu'à présent : la formation de biofilm. Chez de nombreuses espèces bactériennes, la pathogénicité est étroitement liée à ce comportement microbien particulier qu'est le biofilm. Au cours de cette étude, nous avons ainsi caractérisé pour la première fois le biofilm de la souche *V. tapetis* CECT4600. La composition de la matrice du biofilm a également été examinée. Différents types de microscopies ont été utilisés pour observer le biofilm de *V. tapetis*, nous permettant de mettre en évidence à la surface du biofilm la présence de composants sphériques de nature inconnue. Ces composants ont été retrouvés dans les biofilms de différentes souches de *V. tapetis* et une analyse ultra-structurale indique qu'il pourrait y avoir un lien physique entre ces composants et les bactéries. Ces composants particuliers du biofilm de *V. tapetis* présentent une taille et un aspect de surface différents de ceux de la bactérie et semblent également contenir de l'ADN et des protéines. L'étude de l'effet de paramètres ayant un effet sur la prévalence de MAB a été réalisée et a permis notamment de mettre en évidence la capacité de *V. tapetis* à persister et à développer des biofilms dans ces conditions jugées défavorables à l'établissement de la maladie. L'étude expérimentale de gènes potentiellement impliqués dans des fonctions liées à la formation de biofilm a été menée par la construction d'un mutant de *V. tapetis*. La délétion d'un gène du quorum sensing (*cqsA*) a été réalisée et la formation de biofilm par ce mutant a également été examinée, révélant un effet exacerbé sur le biovolume du biofilm à 24h de culture. Enfin, l'activité anti-biofilm du surnageant de culture d'une bactérie marine, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, sur le biofilm de *V. tapetis* a été testée, révélant une inhibition de l'adhésion bactérienne et de la formation du biofilm. Le traitement d'un biofilm préformé par ce surnageant s'est révélé également très efficace, manifestant ainsi le potentiel de cette bactérie et son surnageant pour la lutte « anti-*Vibrio* » en aquaculture.

Mots-clés : Biofilm, *Vibrio tapetis*, *Ruditapes philippinarum*, Maladie de l'Anneau Brun (MAB).

ABSTRACT

Vibrio tapetis is a pathogenic bacterium causing the Brown Ring Disease (BRD) in Manila clam *Ruditapes philippinarum*. This vibriosis is induced by bacterial adhesion on the periostracal lamina, yielding a decalcification of bivalve shell. We focused on one aspect of *V. tapetis* pathogenicity never explored so far: biofilm formation. As in many bacterial species, pathogenesis is likely related to this microbial behavior that is the biofilm. In this study, *V. tapetis* biofilm was characterized for the first time. The composition of the biofilm matrix was also examined. Different microscopy techniques were used to observe *V. tapetis* biofilm, allowing us to highlight at the top of the biofilm the presence of spherical components. These peculiar components were found in biofilms of different *V. tapetis* strains and an ultra-structure analysis indicates that there may be a physical link between these components and bacterial cells. The spherical components of *V. tapetis* biofilm display a size and a different surface aspect than bacteria ones. Moreover, they seem to contain DNA and proteins. We also examined the effect of parameters that affect BRD prevalence and we highlighted the ability of *V. tapetis* to persist and form biofilms in these unfavorable conditions for the disease development. Experimental study of genes potentially involved in functions related to biofilm formation was carried out by construction of a *V. tapetis* mutant. The deletion of a quorum sensing gene (*cqsA*) was performed and subsequent biofilm formation was examined, revealing an exacerbated effect on the biovolume of a 24h biofilm. Finally, the antibiofilm activity of the culture supernatant of a marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, against *V. tapetis* biofilm was tested, revealing the inhibition of bacterial attachment and biofilm formation. Treatment of a preformed biofilm by this supernatant also very efficient, highlighting the potential of this bacterium and its supernatant in the “anti-Vibrio” fight in aquaculture.

Keywords: Biofilm, *Vibrio tapetis*, *Ruditapes philippinarum*, Brown Ring Disease (BRD)