



**HAL**  
open science

# Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin : mise en évidence de biomolécules antibiofilm

Ibtissem Doghri

► **To cite this version:**

Ibtissem Doghri. Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin : mise en évidence de biomolécules antibiofilm. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2015. Français. NNT : 2015LAROS016 . tel-01708229

**HAL Id: tel-01708229**

**<https://theses.hal.science/tel-01708229>**

Submitted on 13 Feb 2018

**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.



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE

*Science pour l'Environnement Gay-Lussac*

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266-ULR

**THÈSE**

Présentée par :

**Ibtissem DOGHRI**

Soutenue le 15 octobre 2015

**Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle**

**Discipline: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin. Mise en évidence de biomolécules antibiofilm**

---

JURY :

Maëlle MOLMERET

Romain BRIANDET

Jean-Marc BERJEAUD

Vianney PICHEREAU

Alexis BAZIRE

Isabelle LANNELUC

Sophie SABLE

Professeur, Université de Toulon, Rapporteur

Directeur de recherche, INRA-Micalis, Massy, Rapporteur

Professeur, Université de Poitiers, Examineur

Professeur, Université de Bretagne-Occidentale, Brest, Examineur

Maître de conférences, Université de Bretagne-Sud, Lorient, Examineur

Maître de conférences, Université de La Rochelle, Co-directrice de thèse

Maître de conférences, Université de La Rochelle, Directrice de thèse



---

# *Contributions scientifiques*

---

## *Publications*

### Publication soumise

1. **Ibtissem Doghri**, Sophie Rodrigues, Alexis Bazire, Alain Dufour, David Akbar, Valérie Sopena, Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé (2015) **Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm abilities and different biofilm 3D architectures**. Soumis dans BMC Microbiology.

### Publications en attente de soumission

2. **Ibtissem Doghri**, Zhao Jean Michel, Alexis Bazire, Alain Dufour, Florie Desriac, Ingrid Fruitier, Stéphanie Bordenave, Nicolas Bridiau, Marianne Graber, Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé. **Antibiofilm activity of a marine *Pseudoalteromonas* bacterium against a *Roseovarius* strain**.

3. **Ibtissem Doghri**, Marianne Graber, Alexis Bazire, Alain Dufour, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Jean-Marie Herry, Ana Caroline Ferro, Valérie Sopena, Sophie Sablé, Isabelle Lanneluc. **The antibiofilm activity secreted by a marine *Pseudomonas* sp. bacterium**.

4. **Ibtissem Doghri**, Johann Lavaud, Alain Dufour, Alexis Bazire, Isabelle Lanneluc, Sophie Sablé. **Cell-bound exopolysaccharides from an axenic culture of the intertidal mudflat *Navicula phyllepta* diatom affects biofilm formation by benthic bacteria**.

## **Communications orales**

**Doghri I**, Bazire A, Dufour A, Lanneluc I, Sablé S. “*Understanding the bacterial interactions within marine biofilms*”. Young Researchers Workshop, Lyngby, Denmark, Août 10-16, 2014.

**Doghri I**, Bazire A, Dufour A, Lanneluc I, Sablé S. “*Colonisation de trois interfaces par des bactéries marines issues d’un biofilm benthique transitoire et d’un biofilm composite permanent*”. Colloque National Biofilm (RNB), Pau, France, Novembre, 19-20, 2013.

## **Communications affichées**

**Doghri I**, Bazire A, Dufour A, Lanneluc I, Sablé S. “*Understanding the bacterial interactions within marine biofilms*”. 5<sup>ème</sup> congrès FEMS (Federation of European Microbiological Societies), Leipzig, Allemagne, Juillet 21-25, 2013.

**Doghri I**, Lanneluc I, Sablé S. “*Bacterial interactions in an intertidal temperate mudflat biofilm of the French Atlantic coast*”. Congrès international Biofilms 6, Vienne, Autriche, Mai 11-13, 2014.

**Doghri I**, Sablé S, Bazire A, Dufour A, Lanneluc I. “*Bacterial interactions in a marine mudflat biofilm: a Pseudomonas bacterium produces a proteinaceous molecule inhibiting the biofilm formation of a Flavobacterium strain*”. 4<sup>ème</sup> congrès international AMP (Antimicrobial Peptides), Lorient, France, Juin 4-6, 2014.

**Doghri I**, Lanneluc I, Bazire A, Dufour A, Sablé S. “*Interactions between bacteria of a marine benthic biofilm: antibiofilm activity of a Pseudomonas bacterium against a Flavobacterium strain*”. Congrès international ICAR (International Conference on Antimicrobial Research), Madrid, Espagne, Octobre 1-3, 2014.

## **Activités d'enseignement**

**2012-2015:** Activités complémentaires d'enseignement (DCACE) au sein du Département de Biotechnologies à l'université de la Rochelle, France. Volume horaire: 64h équivalent TD/an. Niveau: Master 1 (TP de microbiologie fondamentale et appliquée) et Licence 3 (TP de génétique bactérienne, métabolisme et croissance).

---

## *Remerciements*

---

*Trois ans après...*

*Ce manuscrit est le transcrit d'un travail acharné qui m'a permis de me construire au fil des années, mais qui n'aurait jamais vu le jour sans des personnes chères à mon cœur.*

*Je souhaite tout d'abord remercier vivement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail.*

*Merci au Dr Pierre Richard et au Pr Olivier de Viron de m'avoir accueilli au sein du laboratoire LIENSs UMR 7266 CNRS-ULR.*

*Je remercie tout particulièrement mes directrices de thèse, les Dr Sophie Sablé et Isabelle Lanneluc qui se sont investies pour le bon déroulement de ma thèse. Au fil du temps, nous avons appris à nous connaître et j'ai découvert en vous des personnes extraordinaires. Sophie, j'ai adoré tout particulièrement ta franchise et ta bonne humeur. Isabelle, j'ai beaucoup apprécié ta gentillesse, toujours le petit mot réconfortant au bon moment.*

*Je remercie également le Pr Alain Dufour et le Dr Alexis Bazire pour leur grande implication dans ce travail. Merci pour votre écoute, vos encouragements et votre soutien. Tous vos précieux conseils m'ont permis d'aboutir à un travail rigoureux.*

*Je remercie vivement le Dr Johan Lavaud pour m'avoir transmis ses connaissances sur les diatomées. J'ai apprécié nos échanges scientifiques et notre collaboration fructueuse.*

*Merci à Marie-Noëlle Bellon-Fontaine et Jean-Marie HÉRRY et toute l'équipe de MICALIS (UMR 1319) pour m'avoir fait découvrir le monde de la physico-chimie, donnant ainsi une nouvelle dimension à ce travail.*

*Au LaSIE, je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai collaboré sur des aspects qui dépassent mes compétences. Je cite : René Sabot, Bruno Peraudeau et tous les doctorants que j'ai côtoyés.*

*Je tiens aussi à remercier les collaborateurs au sein du laboratoire LIENSs, les Dr Ingrid Fruitier, Stéphanie Bordenave, Nicolas Bridiau et Zhao Jean Michel pour leurs précieux conseils dans le domaine de la protéomique, sans oublier le Pr Marianne Graber pour sa précieuse collaboration et son expertise en physico-chimie.*

*Je remercie également Mr Gérard Blanchard pour m'avoir accueillie au sein de l'Université de La Rochelle dans laquelle j'ai réalisé, dans de bonnes conditions, mes charges d'enseignements et de recherche.*

*Je tiens aussi à remercier le Pr Christine Dupuy, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir donné les moyens de me former. Je remercie aussi le Pr Paco Bustamante, directeur de l'école doctorale, pour son dévouement et son investissement envers les doctorants.*

*Un grand merci particulièrement aux 'gens' de l'IUT, notamment les Dr Sandrine Didelot, Romain Chevrot et Fatoumata TambaDou pour leur écoute et leurs conseils.*

*Une bonne partie de ce travail a été réalisée au laboratoire LBCM de Lorient. Je remercie donc toute l'équipe qui m'a gentiment accueillie. Merci à Dalyal, Sophie, Marjo, Marion, Laure, Charlotte, Charline et*



*Florie pour toute l'aide que vous m'avez apportée, afin que je puisse travailler dans les meilleures conditions.*

*Un grand merci à ces personnes, qui ont chacune dans son domaine, apporté sa contribution : Martine Bréret, Patricia Caillat-Miousse, Jennifer De La Corte Gomez et Isabelle Hirsch.*

*Merci à tous les stagiaires qui ont participé à ce travail : Amandine, Vincent, Anna-Caroline, Caroline...*

*A Viviane et Valérie, deux personnes extraordinaires débordantes de gentillesse. Valérie, ou mamacrobio, tu m'as toujours écoutée, épaulée, conseillée et même consolée. Je tiens à te remercier pour ta franchise et ta bonne humeur. Viviane, toujours prête à m'écouter débattre mes problèmes ou même raconter ma vie, ne change jamais !!!*

*Je remercie chaleureusement mes collègues 'Rochelais' qui pour la plupart sont devenus des amis. Merci à Amandine, Camille, Meriem, Hervé, Benjamin, Nicolas (le petit), Nicolas (le grand), Maylis, Antoine, Julien et Boris. Au fil du temps et grâce au CODEC, on a partagé de bons délires. Merci aussi à David, un véritable ami qui m'a beaucoup soutenue et cru en moi.*

*A Rachida et Oussama, bien plus que des amis. Vous avez toujours été là pour moi et ceci bien avant la thèse. Maman Rachida, merci pour ton soutien, ton écoute et tes bons conseils. Ouss, science ou pas science, tu as toujours été là pour moi.*

*Enfin, on peut toujours compter sur sa famille et ses meilleurs amis. D'abord, à ma maman (Atifa) et mes deux frères, Moetez (Tizou) & Ahmed (le Coréen), malgré les centaines de milliers de kilomètres qui nous séparent, nous sommes toujours restés soudés et vous m'avez apporté votre soutien qui m'a permis de surmonter tous les obstacles.*

*Merci à toutes les mamies et les papis, les tatas et les tontons, les cousins et les cousines.*

*Merci à Sendā, plus qu'une amie, une sœur et une confidente. Merci pour ta présence et tes conseils.*

*Un énorme merci à mon chéri Yahya (anticorps). Par ta joie de vivre et ta simplicité tu as conquis mon cœur. Par ta confiance en moi, tu m'as poussée vers le haut.*

*Finalement, je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.*

*La reconnaissance est la mémoire du coeur  
Hans Christian Andersen*

*Chaque bonne réalisation, grande ou petite, connaît ses périodes de corvées et de triomphes ; un début, un combat et une victoire.*

*- Mohandas Karamchand Gandhi -*

---

## *Table des matières*

---

<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>14</b>
<b>Index des figures .....</b>	<b>15</b>
<b>Index des tableaux .....</b>	<b>17</b>
<b>Contexte général .....</b>	<b>18</b>
<b>Introduction bibliographique.....</b>	<b>23</b>
<b>I. Les biofilms, des forteresses microbiennes .....</b>	<b>24</b>
I.1 Généralités.....	24
I.2 Formation du biofilm .....	26
I.2.1 Conditionnement de la surface.....	26
I.2.2 Transport et déplacement.....	27
I.2.3 L'adhésion microbienne .....	28
I.2.4 La colonisation, maturation et structuration du biofilm .....	30
I.2.5 Dispersion .....	31
I.3 La matrice extracellulaire, un bouclier toutes options .....	31
I.3.1 Les principaux constituants.....	32
I.3.2 Fonction des produits extracellulaires .....	38
I.4 L'omniprésence des biofilms .....	40
<b>II. Focus sur le biofilm marin.....</b>	<b>44</b>
II.1 Les conséquences du développement des biofilms en milieu marin.....	45
II.1.1 Impact positif des biofilms .....	46
II.1.2 Impact négatif des biofilms .....	47
II.2 Les facteurs influençant la formation des biofilms .....	48
II.3 Le biofilm des vasières intertidales .....	50
II.4 Le biofilm des structures métalliques portuaires.....	53
<b>III. Les interactions entre microorganismes au sein des biofilms marins.....</b>	<b>56</b>
III.1 La communication entre microorganismes.....	56

III.1.1	Le Quorum Sensing chez les bactéries .....	56
III.1.2	La signalisation chez les diatomées .....	59
III.2	Autres interactions entre bactéries et diatomées .....	61
III.2.1	Synergie entre bactéries et diatomées .....	62
III.2.2	Inhibition des diatomées et des bactéries .....	64
IV.	Stratégies de lutte contre les biofilms .....	65
IV.1	Inhibition de la croissance microbienne par les microorganismes .....	65
IV.1.1	Exoproduits bactériens .....	65
IV.1.2	Exoproduits de diatomées .....	70
IV.2	Interférence avec la communication bactérienne .....	71
IV.2.1	Inactivation des signaux du quorum sensing .....	71
IV.2.2	Interférence avec le système du quorum sensing .....	72
IV.3	Perturbation de l'adhésion .....	74
IV.3.1	Modification des propriétés de surface .....	74
IV.3.2	Régulation des facteurs d'adhésion .....	75
IV.4	Destruction des biofilm formés .....	75
IV.4.1	Enzymes dégradants les polymères de la matrice des biofilms .....	75
IV.4.2	Les polysaccharides .....	77
IV.4.3	Les bactéries nageuses ou « swimmers » .....	77
V.	Objectifs de l'étude .....	77
	<b>Partie I : Sélection des modèles microbiens .....</b>	<b>81</b>
A/	Article I: Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm abilities and different biofilm 3D architectures .....	84
B/	Caractérisation des modèles bactériens sélectionnés .....	107
1.	Observations macroscopiques .....	107
2.	Observations microscopiques et type respiratoire .....	107
3.	Test de motilité/mobilité .....	108

3.1 Etat Frais .....	108
3.2 Test sur Gélose .....	108
<b>Partie II : Interactions bactéries / bactéries .....</b>	<b>111</b>
I. Bactéries du biofilm des structures métalliques corrodées.....	113
A/ Effet du sécrétome de bactéries cultivées en pools sur la capacité à former des biofilms et la croissance de <i>Roseovarius</i> sp. VA014.....	113
1. Effet des surnageants des pools sur la formation de biofilm .....	113
2. Effet sur la croissance .....	114
3. Fractionnement du pool sélectionné.....	114
B/ Article II: Antibiofilm activity of a marine <i>Pseudoalteromonas</i> bacterium against a <i>Roseovarius</i> strain .....	116
II. Bactéries du biofilm de la vasière.....	141
A/ Effet du sécrétome de bactéries cultivées en pools sur la capacité à former des biofilms et la croissance de <i>Flavobacterium</i> sp. II2003 .....	141
1. Effet des surnageants de pools sur la formation de biofilm .....	141
2. Effet des surnageants de pools sur la croissance .....	142
3. Fractionnement du pool sélectionné.....	142
B/ Article III: The antibiofilm activity secreted by a marine <i>Pseudomonas</i> sp. bacterium....	144
C/ Purification des molécules actives et caractérisation des effets .....	173
1. Purification des molécules protéiques impliquées dans l'inhibition de la formation de biofilm de <i>Flavobacterium</i> sp. II2003 pendant la phase d'adhésion.....	173
2. Caractérisation de l'effet d'absorption du surnageant de <i>Pseudomonas</i> sp. IV2006 .....	174
<b>Partie III : Interactions bactéries / microalgues.....</b>	<b>177</b>
Article IV: Cell-bound exopolysaccharides from an axenic culture of the intertidal mudflat <i>Navicula phyllepta</i> diatom affects biofilm formation by benthic bacteria. ....	179
<b>Discussion générale &amp; perspectives .....</b>	<b>210</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>224</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>260</b>

***Liste des abréviations***

---

<b>NO</b>	Oxyde nitrique
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNe</b>	Acide désoxyribonucléique extracellulaire
<b>AHL</b>	<i>N</i> -Acyl homosérine lactone
<b>AI</b>	Autoinducteur
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BFO</b>	Bactérie ferro-oxydantes
<b>BFR</b>	Bactéries ferri-réductrices
<b>BSO</b>	Bactéries sulfo-oxydantes
<b>BSR</b>	Bactéries sulfato-réductrices
<b>BTR</b>	Bactéries thiosulfato-réductrices
<b>DAPI</b>	4',6'-Diamidino-2-phényl indole
<b>DD</b>	(2E,4E/Z)-Décadiénal
<b>DNase</b>	Désoxyribonucléase
<b>HSL</b>	Homosérine lactone
<b>QS</b>	Quorum Sensing
<b>SPE</b>	Substances polymériques extracellulaires

---

## Index des figures

---

<b>Figure 1 :</b> Sites d'échantillonnage pour la collecte des souches marines .....	20
<b>Figure 2 :</b> Biofilm produit par une souche de <i>Staphylococcus epidermidis</i> dans un système en microplaque. Image obtenue par microscopie confocale suite à une coloration au FilmTracer™ FM® 1-43 (Tremblay et al., 2014).....	24
<b>Figure 3 :</b> Étapes de formation d'un biofilm bactérien en milieu marin .....	26
<b>Figure 4 :</b> Schéma descriptif des interactions impliquées dans l'étape d'adhésion initiale (Pierre, 2010) .....	28
<b>Figure 5 :</b> Structure et composition des biofilms bactériens (McDougald et al., 2012).....	32
<b>Figure 6 :</b> Biofilm de bactéries acidophiles vu au microscope électronique à balayage. Cet échantillon a été prélevé à partir d'un forage de 75 m de profondeur situé dans le complexe de la mine de Kempton dans le Maryland (Taylor et al., 2008) .....	33
<b>Figure 7 :</b> Images 3D des biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Grobe et al., 1995).....	34
<b>Figure 8 :</b> Mécanismes cellulaires de résistance et d'adaptation au sein des biofilms (d'après de la Fuente-Núñez et al., 2013) .....	40
<b>Figure 9 :</b> (A) Plaque dentaire humaine mature. (B) Image en microscopie électronique à balayage montrant une formation dite en épis de maïs ( <a href="http://www.ohdq.com">www.ohdq.com</a> ). .....	42
<b>Figure 10 :</b> Biofilm formé dans les systèmes de circulation d'eau potable ( <a href="http://www.hydeos.fr">www.hydeos.fr</a> ).....	42
<b>Figure 11 :</b> Photographies de salissures sur une coque de bateau ( <a href="http://www.agriculture.gov.au">www.agriculture.gov.au</a> ) et sur des structures portuaires.....	43
<b>Figure 12 :</b> Représentation schématique des phases d'établissement des salissures marines sur une surface (d'après Wahl et al., 1989).....	45
<b>Figure 13 :</b> Facteurs influençant la formation et la structuration des biofilms marins.....	49
<b>Figure 14 :</b> Synchronisation environnementale de l'évolution de la biomasse dans la couche supérieure de la vasière intertidale de Marennes-Oléron (Blanchard et al., 2001).....	51
<b>Figure 15 :</b> Structure de molécules signales produites par les bactéries Gram négatives (Dobretsov et al., 2009) .....	58
<b>Figure 16 :</b> Schéma représentatif de la détection des signaux du quorum sensing (AHL) chez les bactéries Gram négatives.....	58
<b>Figure 17 :</b> Le quorum sensing chez <i>Vibrio harveyi</i> (Waters & Bassler, 2006).....	59
<b>Figure 18 :</b> Les phéromones produites par les diatomées (Amin et al., 2012) .....	60



**Figure 19** : Modèle hypothétique des interactions entre bactéries et diatomées au cours de la formation du biofilm (Bruckner et al., 2011).....62

**Figure 20** : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale utilisée lors de ce projet.....78

**Figure 21** : Cellules des quatre bactéries marines après coloration de Gram ..... 107

**Figure 22** : Test sur gélose de la mobilité par Swimming ..... 108

**Figure 23** : Test sur gélose de la mobilité par Swarming ..... 109

**Figure 24** : Test sur gélose de la mobilité par Twitching ..... 109

**Figure 25** : Effet des surnageants sur la formation de biofilm de *Roseovarius* sp. VA014 ..113

**Figure 26** : Effet des surnageants des pools sur la croissance de *Roseovarius* sp. VA014 ...114

**Figure 27** : Fractionnement du pool 3 ..... 115

**Figure 28** : Effet des surnageants sur la formation de biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 ..... 141

**Figure 29** : Effet des surnageants des pools sur la croissance de *Flavobacterium* sp. II2003 ..... 142

---

## ***Index des tableaux***

---

<b>Tableau 1</b> : Les enzymes retrouvées dans les biofilms aquatiques naturels et artificiel.....	35
<b>Tableau 2</b> : Exemples de protéines de structure .....	36
<b>Tableau 3</b> : Les principaux rôles et fonctions des substances polymériques extracellulaires dans les biofilms microbiens.....	38
<b>Tableau 4</b> : Rôles des signaux du quorum sensing .....	57
<b>Tableau 5</b> : Les molécules impliquées dans la synergie entre diatomées et bactéries .....	63
<b>Tableau 6</b> : Activité antimicrobienne des bactéries marines hétérotrophes .....	66
<b>Tableau 7</b> : Activité anti-larvaire et anti-algale des bactéries marines hétérotrophes.....	69
<b>Tableau 8</b> : Composés anti-croissance sécrétés par les diatomées marines .....	71
<b>Tableau 9</b> : Les enzymes qui dégradent les AHL .....	72
<b>Tableau 10</b> : Composés naturels marins interférant avec le système du quorum sensing .....	73
<b>Tableau 11</b> : Les enzymes qui dégradent les polymères extracellulaires au sein des biofilms .....	76
<b>Tableau 12</b> : Observation macroscopique des colonies des quatre bactéries marines sélectionnées .....	107
<b>Tableau 13</b> : Morphologies des cellules par observation microscopique.....	108
<b>Tableau 14</b> : Mesures des angles de contact avec l'eau, le formamide et diiodométhane sur les surfaces traitées .....	175
<b>Tableau 15</b> : Calcul des composants de l'énergie de surface à partir des mesures d'angles de contact: interaction Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), caractère acide ( $\gamma_S^+$ ), caractère basique ( $\gamma_S^-$ ), interaction acide-base au sens de Lewis ( $\gamma^{AB}$ ) et l'énergie libre de surface ( $\gamma_S$ ).....	175

***Contexte général***

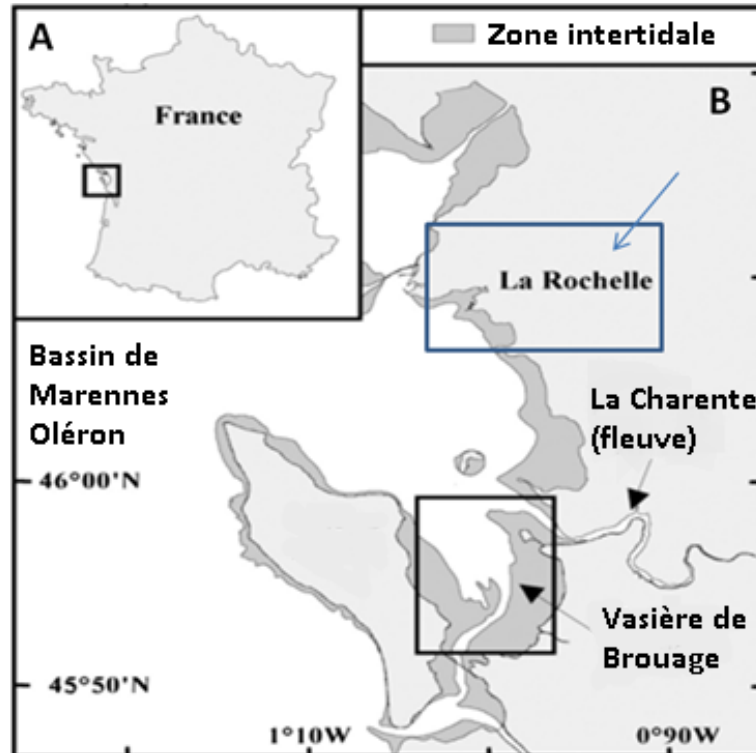
---

Dès 1933, Henrici s'est intéressé aux interactions existant entre les microorganismes et les surfaces (Henrici, 1933). Il a ainsi plongé des lames de microscope en verre dans son aquarium et a observé un dépôt de microorganismes s'épaississant en fonction du temps d'immersion. Plus tard, Zobell a montré que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries accrochées aux parois sont plus nombreuses que celles en suspension (Zobell, 1943). Dans les années 1980, les travaux de Costerton ont mis en évidence que la biomasse microbienne fixée sur des surfaces constituait des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Appelées biofilms, ces structures sont présentes dans tous les environnements et sont retrouvées associées à des surfaces minérales, végétales (feuilles) ou animales (muqueuses, dents etc.). Particulièrement résistants à toutes sortes de stress, les microorganismes vivant en biofilms représentent une importante source de nuisance pour la santé humaine ou vétérinaire, ainsi que dans le domaine industriel (Hall-Stoodley et al., 2004).

La majorité des études menées jusqu'à aujourd'hui s'intéresse principalement aux biofilms responsables d'infections chroniques posant de nombreux problèmes dans le domaine médical. Ces biofilms impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou *Listeria monocytogenes*. Ils posent également des problèmes dans de nombreux secteurs industriels. La formation de biofilms dans les canalisations d'eau potable, en particulier par la bactérie *Legionella pneumophila*, est une réelle préoccupation. Dans l'industrie agro-alimentaire, les biofilms représentent un problème sanitaire sérieux. Ils peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires et engendrent la dégradation des qualités organoleptiques des aliments.

En environnement marin, les biofilms microbiens recouvrent la plupart des surfaces solides. Ils peuvent avoir des impacts négatifs : par exemple lorsqu'ils se forment sur les coques des navires et sont responsables du « biofouling », ils conduisent à une augmentation des forces de friction, une diminution de la vitesse des bateaux et des surcoûts énergétiques considérables (Coester & Cloete, 2005). La formation des biofilms sur les métaux peut également favoriser l'accélération des phénomènes de corrosion susceptibles d'endommager les coques de bateaux ou encore les infrastructures portuaires. Néanmoins, les biofilms marins peuvent aussi jouer un rôle écologique positif. Ils contribuent au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes en participant notamment au cycle du carbone.

Dans le cadre de mon travail de thèse, deux types de biofilms marins issus de la côte Atlantique française (Figure 1) ont constitué nos modèles d'étude.



**Figure 1 : Sites d'échantillonnage pour la collecte des souches marines (Pierre et al., 2014)**

Le premier modèle est un biofilm benthique prélevé sur la vasière intertidale de Brouage située au sud de l'embouchure de la Charente. Ce biofilm est constitué principalement d'une complexe microalgues (essentiellement des diatomées) / produits extracellulaires / procaryotes. Il joue un rôle central dans la productivité des zones littorales en alimentant la production ostréicole de ces zones. Cependant, les connaissances actuelles sur la structuration et le fonctionnement du biofilm sont largement conceptuelles et théoriques. Les biofilms microbiens des vasières intertidales sont des modèles originaux parce qu'ils sont en continuel renouvellement. En effet, il s'agit de biofilms temporaires régis par le mouvement des marées. Les microalgues migrent du sédiment vers la surface à chaque émergence diurne formant ainsi, en association avec d'autres microorganismes, un film biologique temporaire. Puis elles se ré-enfouissent en fin de marée basse ou la nuit, et le biofilm se déstructure (Blanchard et al., 2001).

Le deuxième modèle étudié est un biofilm formé sur acier dans le port des Minimes de La Rochelle. En effet, différentes communautés microbiennes se déposent à la surface du métal et forment un biofilm totalement imbriqué dans les produits de corrosion. Ce biofilm composite « microorganismes / produits de corrosion » constitue un écosystème particulier dans lequel les microorganismes interagissent et influencent le phénomène de corrosion en affectant les processus électrochimiques (phénomène de biocorrosion). Il en résulte des altérations qui nuisent à l'intégrité des structures métalliques et donc leur durabilité.

Les interactions entre bactéries au sein des biofilms marins sont encore peu explorées. Jusqu'à présent, elles ont été essentiellement étudiées au travers des communications entre cellules au sein de biofilms mono-espèces ou bi-espèces, par le biais du « quorum sensing ». D'autres données sont cependant disponibles, et portent principalement sur la recherche de molécules à activité anti-biofilm. Il est également connu que certaines substances extracellulaires jouent un rôle crucial dans l'adhésion et le développement des biofilms bactériens. Les travaux concernant les interactions diatomées / bactéries au sein des biofilms sont également peu nombreux bien que celles-ci soient reconnues comme essentielles à la biogéochimie des écosystèmes marins.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse est d'étudier les interactions microbiennes se produisant au sein des deux biofilms marins originaux par l'intermédiaire des molécules synthétisées par les microorganismes.



***Introduction bibliographique***

---



---

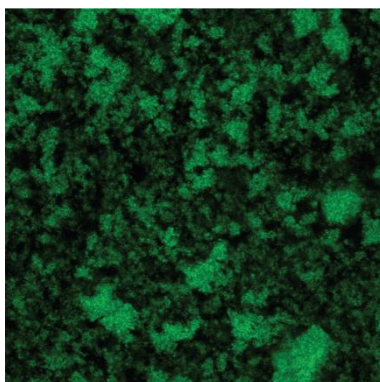
## I. Les biofilms, des forteresses microbiennes

---

### I.1 Généralités

Le terme « biofilm » a été proposé en 1978 par l'équipe de Costerton (Costerton et al., 1978) pour définir le mode de vie sessile des microorganismes adhérant à une surface, par opposition à la vie libre en milieu liquide (mode de vie planctonique). La capacité à former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique microbienne universelle (Tremblay et al., 2014). On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme de biofilms (Richards & Melander, 2009).

Les biofilms microbiens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice polymérique extracellulaire d'origine microbienne (Costerton et al., 1999 ; Hall-Stoodley et al., 2004 ; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009) (Figure 2). En fonction de l'environnement dans lequel le biofilm s'est développé, des matériaux non cellulaires tels que des cristaux minéraux et des particules d'argile peuvent également être retrouvés dans la matrice du biofilm (Rodney, 2002).



**Figure 2 : Biofilm produit par une souche de *Staphylococcus epidermidis* dans un système en microplaque. Image obtenue par microscopie confocale suite à une coloration au FilmTracer™ FM® 1-43 (Tremblay et al., 2014)**

Le mode de vie en biofilms permet aux microorganismes de s'adapter rapidement en fonction des besoins ou des stress environnementaux. Ainsi, les microorganismes se développant en biofilm peuvent présenter des différences au niveau de l'expression génétique et des phénotypes par rapport à leurs homologues planctoniques (Mah & O'Toole, 2001). De nombreux travaux ont montré que la formation d'un biofilm induit une expression

différentielle des gènes, comparée à celle des bactéries planctoniques (Whiteley et al., 2001; Beloin & Ghigo, 2005). Il faut également ajouter que l'ensemble des caractéristiques structurales et physico-chimiques du biofilm confère aux bactéries qui le composent des propriétés spécifiques de morphologie, de croissance, de communication entre les cellules et de résistances aux biocides distinctes de celles des bactéries planctoniques (Roux & Ghigo, 2006).

Le développement tridimensionnel du biofilm conduit à la création de gradients physico-chimiques. Ainsi, contrairement aux cultures classiques réalisées en milieux liquides agités, le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (Costerton et al., 1994).

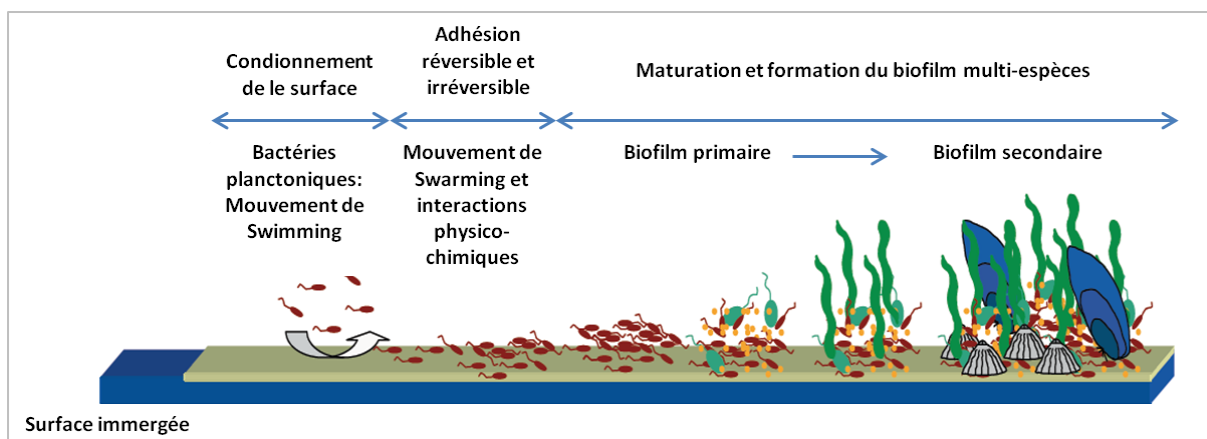
Les biofilms, hétérogènes, sont formés de régions denses dans lesquelles des microorganismes sont entourés d'exopolymères et de régions moins denses parcourues par des canaux permettant à la fois la pénétration de macromolécules, de facteurs nutritionnels, d'oxygène nécessaires au métabolisme des microorganismes et le rejet des débris (Costerton et al., 1994). Ce mode de vie apporte de nombreux avantages aux microorganismes tels que le piégeage des facteurs nutritionnels ou la protection des cellules, ce qui leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Ainsi, les bactéries d'un biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens que leurs homologues planctoniques (Olson et al., 2002; Ceri et al., 2010). La résistance accrue à la plupart des traitements, y compris les désinfectants antimicrobiens et les antibiotiques, permet de distinguer les bactéries en biofilms de leurs « cousines » planctoniques (Stewart & Costerton, 2001). Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels peuvent être résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels (Costerton et al., 1999). De plus, les biofilms permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte.

Toutes les surfaces sont colonisables par les microorganismes, et ce, même si certains matériaux rendent difficile le développement des biofilms. Les microorganismes peuvent, en effet, aussi bien adhérer à une surface biotique qu'à une surface abiotique (Valt, 2008). A titre d'exemple, les biofilms peuvent se développer sur des structures métalliques en milieu marin et engendrer des problèmes de biocorrosion accélérant la dégradation des structures portuaires

(Langumier et al., 2009), ou bien en milieu hospitalier, les biofilms formés par les microorganismes pathogènes peuvent être à l'origine de maladies nosocomiales, comme les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* retrouvés au niveau des poumons des patients atteints de mucoviscidose (Barakat et al., 2014).

## I.2 Formation du biofilm

Tout matériau en contact avec un milieu aqueux est recouvert après quelques semaines d'un gel visqueux constituant un biofilm. Malgré une littérature abondante, les mécanismes d'adhésion et en particulier les étapes initiales lors des premières heures d'immersion ne sont pas encore totalement compris. La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi. Le cycle de formation d'un biofilm bactérien est illustré dans la figure 3.



**Figure 3 : Étapes de formation d'un biofilm bactérien en milieu marin (d'après Haras, 2005)**

### I.2.1 Conditionnement de la surface

Le conditionnement de surface est la première étape de la formation du biofilm (Figure 3), au cours de laquelle cette surface est le siège d'une adsorption spontanée de composés du milieu (molécules organiques et ions) dans les premiers instants suivant l'immersion (La Barre & Haras, 2007). Ceci conduit à la formation d'un film de conditionnement qui modifie les propriétés physico-chimiques de la surface externe du matériau en modifiant la charge

nette et l'énergie libre de surface. Ce conditionnement permet d'influencer défavorablement le comportement des bactéries approchant ces surfaces, ou au contraire de créer des micro-niches favorables à l'adhésion et aux interactions spécifiques (La Barre & Haras, 2007). Compère et coll. (2001), ont montré que dans le milieu marin deux types de composés s'adsorbent successivement sur les surfaces : les molécules riches en azote comme les protéines puis les polysaccharides.

En conditions statiques (flux nul ou réduit) et à une distance de 10 mm, les interactions sont faibles (Pierre, 2010). Si la cellule bactérienne et le substrat portent des charges électrostatiques identiques (généralement négatives), ils ont tendance à se repousser. À une distance moindre, les interactions électrostatiques sont plus fortes mais peuvent devenir attractives de par l'hétérogénéité de distribution des charges autour de la bactérie, en particulier du glycocalyx avec sa viscoélasticité et sa capacité à adsorber de façon différentielle les ions du milieu. Le contact forcé des bactéries avec une surface est favorisé par un flux élevé et turbulent (nombre de Reynolds élevé, parfois supérieur à 5000) en milieu ouvert comme dans les conduites d'eau etc., par contraste avec les conditions statiques qui favorisent la locomotion autonome en mode planctonique (Thomas et al., 2002).

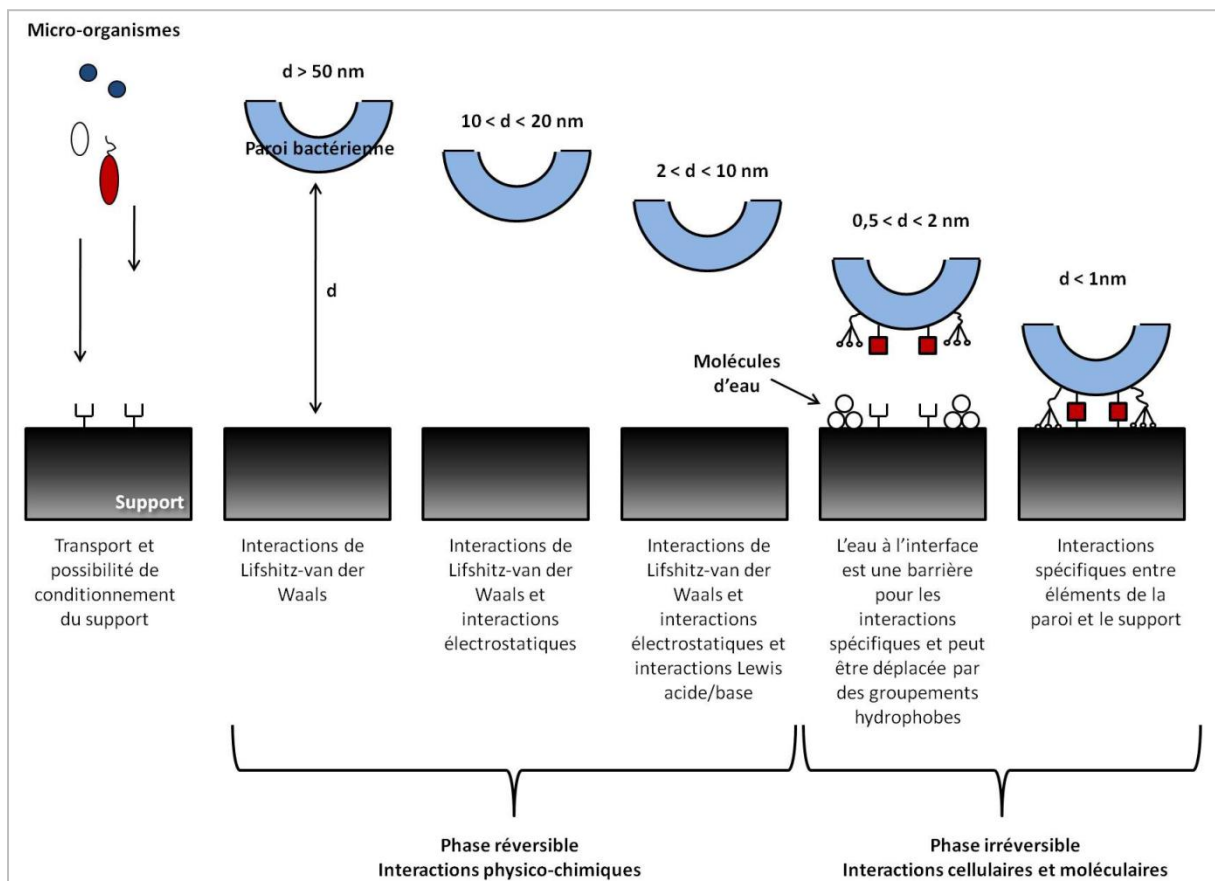
## **I.2.2 Transport et déplacement**

Pour pouvoir adhérer, les bactéries doivent dans un premier temps s'approcher du support. Lorsque les forces de cisaillement sont faibles ou nulles (en conditions statiques ou en écoulement laminaire), plusieurs mécanismes peuvent intervenir comme : (i) le mouvement brownien qui peut à lui seul provoquer la désorption spontanée de particules adsorbées à une surface si les forces d'adhésion sont par ailleurs suffisamment faibles (Van Oss, 1997) ; (ii) la sédimentation qui est due aux forces de gravité et (iii) la convection qui joue un rôle non négligeable dans l'adhésion des micro-organismes (Banks & Bryers, 1992). Ces mécanismes ne faisant pas intervenir les cellules sont dit passifs (Yang et al., 1999). D'autres mécanismes, où les cellules sont actives (dit actifs), peuvent également être impliqués comme la mise en place d'appendices générateurs de mouvements tels que les flagelles (O'Tool & Kloter 1998). Les auteurs ont montré qu'un mutant de *Pseudomonas aeruginosa* ne possédant pas des flagelles n'adhère que très faiblement au support. Le flagelle est donc particulièrement important dans l'approche du support (Vallet et al., 2001). Le chimiotactisme apparaît lorsque les microorganismes mobiles flagellés sont capables de se

déplacer vers des substances nutritives contenues dans le film de conditionnement, tels que des acides aminés ou des sucres, grâce aux signaux détectés par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (Banks & Bryers, 1992).

### I.2.3 L'adhésion microbienne

A partir d'une distance de 50 nm, les micro-organismes peuvent interagir avec la surface par l'intermédiaire d'une succession d'interactions de longue puis de courte distance de nature physico-chimique : on parle alors d'adhésion microbienne (figure 4) (Bussher & Weerkamp, 1987 ; van Loosdrecht et al., 1990). Cette étape d'adhésion initiale peut être divisée en deux étapes principales (Figure 4) : une phase qui correspond à l'adhésion réversible des cellules et une phase dite d'adhésion irréversible des micro-organismes.



**Figure 4 : Schéma descriptif des interactions impliquées dans l'étape d'adhésion initiale (Pierre, 2010)**

**a. Adhésion réversible**

Cette étape est fortement influencée par la nature du support (conditionnement, topographie) et par de nombreux autres facteurs comme le pH, l'osmolarité du milieu et la température (Beloin et al., 2008). Les micro-organismes sont attirés vers le support par les forces de Lifshitz-van der Waals. Une fois la distance entre le micro-organisme et le substrat inférieure à 20 nm, des forces de répulsions électrostatiques rentrent en considération étant donné que les micro-organismes (bactéries notamment) et les surfaces présentent, dans la majorité des cas, une charge globale de surface négative. Cette phase est en général de courte durée (Gauthier & Isoard, 1989). A partir d'une distance inférieure à 5 nm entre le micro-organisme et le substrat, des interactions acide/base de Lewis rentrent également en jeu.

Une fois en contact avec la surface, la bactérie se déplace de sorte à établir un contact optimal selon son axe longitudinal, puis explore la surface par des déplacements de type « swarming » ou « gliding » (Figure 3). Le swarming consiste en un mouvement coordonné d'une population bactérienne sur des surfaces solides ou semi-solides (Keams & Richard, 2004) alors que le gliding (glissement) consiste, pour le microorganisme, à faire des roulades rapides sur lui-même (Mignot et al., 2007). Ainsi, par exemple, la bactérie *Myxococcus xanthus* utilise le gliding comme mouvement exploratoire.

**b. Adhésion irréversible**

En plus des interactions de Lifshitz-van der Waals toujours présentes, des interactions irréversibles de courte distance entrent en jeu. Les acide/base (au sens de Lewis) permettent la formation des liaisons hydrogène. Ces sont de fortes liaisons entre un atome d'hydrogène et un atome électronégatif. Sont retrouvées aussi les interactions hydrophobes et les interactions électrostatiques caractérisées par la formation de ponts entre une charge négative du micro-organisme et une charge négative du substrat, par l'intermédiaire de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Pierre, 2010).

Diverses molécules telles que les adhésines fimbriales ou membranaires, des glycoconjugués et autres récepteurs de surface, participent aussi à l'adhésion irréversible. Différents appendices bactériens sont nécessaires à l'adhésion des bactéries tout en n'étant

pas indispensables au maintien du biofilm. Pour les bactéries à Gram-négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix et pour les bactéries à Gram-positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix (Van Houdt & Michiels, 2005).

Les pili de type I et les flagelles sont essentiels à l'attachement initial à la surface et les pili de type IV ont un rôle dans le déplacement de la bactérie sur la surface. Des souches mutantes pour les gènes codant pour ces structures, *pilA*, *fliC*, *fliM*, *motA*..., ont toutes montré un défaut d'adhésion *in vitro* (La Barre & Haras, 2007). Les pili de type IV de la souche PA01 de *P. aeruginosa* sont les organites fimbriaux porteurs d'adhésines participant à l'adhésion et accompagnant la division cellulaire, indispensables à l'initiation du biofilm ; l'absence du gène *cupA* codant pour les pili de type IV permet l'adhésion d'un mutant incapable de développer de biofilm (Vallet et al., 2001).

Les curli ont un rôle dans l'adhésion de *E. coli* sur des surfaces inertes de toute nature (Vidal et al., 1998) et expliquent partiellement la grande capacité colonisatrice de cette bactérie. Curieusement, les bactéries « sauvages » colonisent tous les types de substrats, et celles issues de lignées cultivées tendent à perdre la capacité à adhérer sur des surfaces lisses.

#### **I.2.4 La colonisation, maturation et structuration du biofilm**

Une fois que les bactéries sont irréversiblement attachées à la surface, leur multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir une partie ou la totalité de la surface. Cette colonisation différentielle est en partie en relation avec les propriétés de surface des bactéries et des matériaux (Ghigo, 2001 ; Kuchma et al., 2005). Au cours de la croissance microbienne au sein du biofilm, les bactéries se multiplient de façon exponentielle jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel. Des canaux de circulation de nutriments/eau et d'évacuation des déchets se créent à l'intérieur du biofilm. L'étape de maturation est divisée en deux phases (Clutterbuck et al., 2007). La première phase est marquée par la régulation génétique permettant la différenciation phénotypique des cellules en biofilm. L'expression de 40% des gènes est modifiée pour *Escherichia coli* (Prigent-Comabaret et al., 1999) contre seulement 4% pour les gènes de *Pseudomonas aeruginosa* (Chicurel 2000). La deuxième phase est marquée par la synthèse active de la matrice organique. Cette matrice est constituée de substances polymériques extracellulaires (SPE) comprenant des molécules organiques telles que des protéines, des polysaccharides, des

acides nucléiques et d'eau. Elle occupe jusqu'à 75-95% du volume du biofilm. Leur production est donc sous contrôle génétique (Ghigo, 2001 ; Kuchma et al., 2005). Après quelques jours/mois, des macroorganismes (mollusque, algues, éponges...) attirés par le potentiel nutritionnel du biofilm se fixent sur les structures tridimensionnelles microbiennes (figure 3) (Aldred & Clare, 2008).

### **I.2.5 Dispersion**

La dispersion du biofilm marque le retour à l'état planctonique. Cette libération des cellules permet d'assurer une diversité microbienne en favorisant la colonisation de nouvelles espèces (Clutterbuck et al., 2007).

Les bactéries peuvent se détacher du biofilm d'une manière passive, par relargage ou par action mécanique d'un flux, mais elles peuvent aussi se détacher par d'autres processus dit actifs. Ce phénomène est fortement lié à l'impact des interactions agissant sur la régulation des gènes des bactéries. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la dispersion est liée à l'induction de l'expression des gènes impliqués dans la motilité (les flagelles) et à la répression du gène *pilA* (les pili) (Kaplan et al., 2003). Les colonies peuvent aussi se disperser dès rupture des liaisons de la matrice extracellulaire environnante. Par exemple, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, une bactérie à l'origine de maladies parodontales, synthétise une enzyme, la Dispersine B, qui hydrolyse les exopolymères du biofilm et libère les bactéries (Kaplan et al., 2003). La dispersion des cellules du biofilm peut aussi être initiée par des changements environnementaux, comme la modification des apports en nutriments du biofilm et les fluctuations des concentrations locales d'oxygène et d'oxyde nitrique (Kaplan et al., 2003).

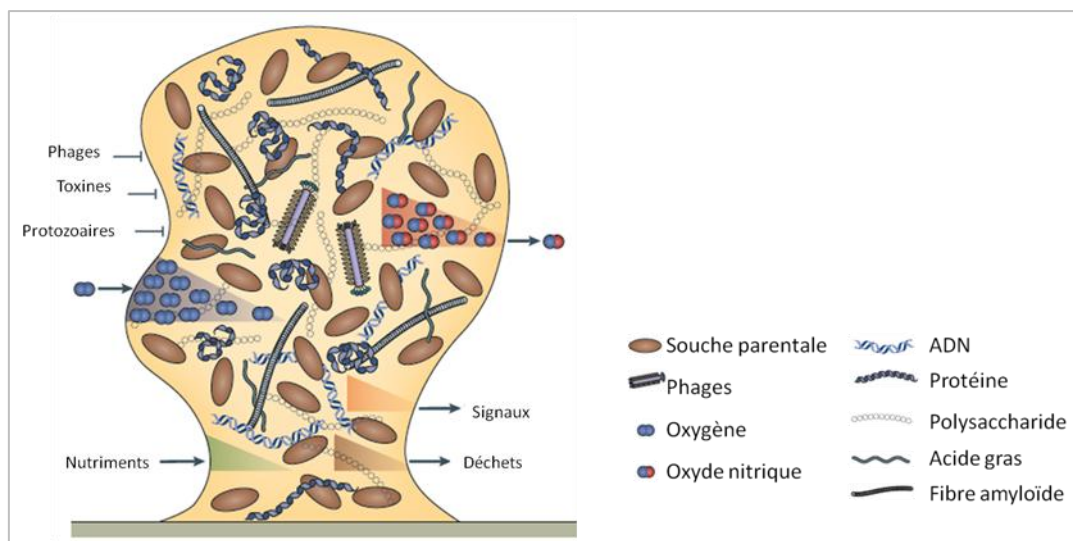
Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver les caractéristiques acquises en biofilm. Par exemple, les bactéries qui se dispersent à partir d'implants médicaux sont capables de déjouer le système de défense immunitaire (phagocytose) et d'engendrer des infections systémiques (Clutterbuck et al., 2007).

## **I.3 La matrice extracellulaire, un bouclier toutes options**



### I.3.1 Les principaux constituants

Cette matrice est souvent produite par les organismes qui constituent le biofilm. Elle est composée d'un ensemble de différents types de biopolymères connus sous le nom substances polymériques extracellulaire (SPE). Ces produits assurent la cohésion des biofilms (Karatan et Watnik, 2009) (Figure 5).



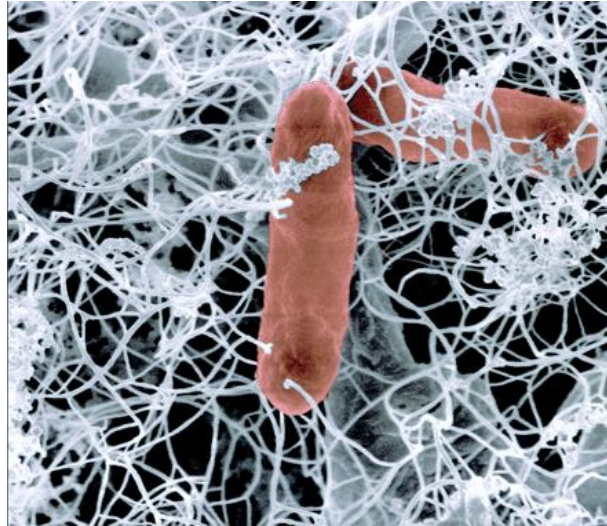
**Figure 5 : Structure et composition des biofilms bactériens (McDougald et al., 2012)**

#### *a. Les exopolysaccharides*

Les polysaccharides représentent la fraction majoritaire de la matrice extracellulaire de nombreux biofilms. La plupart sont de longues molécules, linéaires ou ramifiées, avec une masse moléculaire variant entre  $0,5 \cdot 10^6$  et  $2 \cdot 10^6$  daltons (Frølund et al., 1996; Wingender et al., 2001).

Visualisés par microscopie électronique à balayage, les polysaccharides forment des réseaux complexes. Ils se présentent sous forme filamenteuse et sont attachés à la surface des cellules (Figure 6). Les techniques de microscopie combinées aux marquages spécifiques et analyses biochimiques ont démontré l'omniprésence des polysaccharides non seulement dans les biofilms marins, d'eau douce, des sols et de systèmes d'eau artificielle, mais aussi dans les

biofilms associés à des infections chroniques chez l'homme. Ces dernières années, plusieurs exopolysaccharides ont été isolés et caractérisés à partir d'une vaste gamme d'infections bactériennes (Sutherland, 2007).



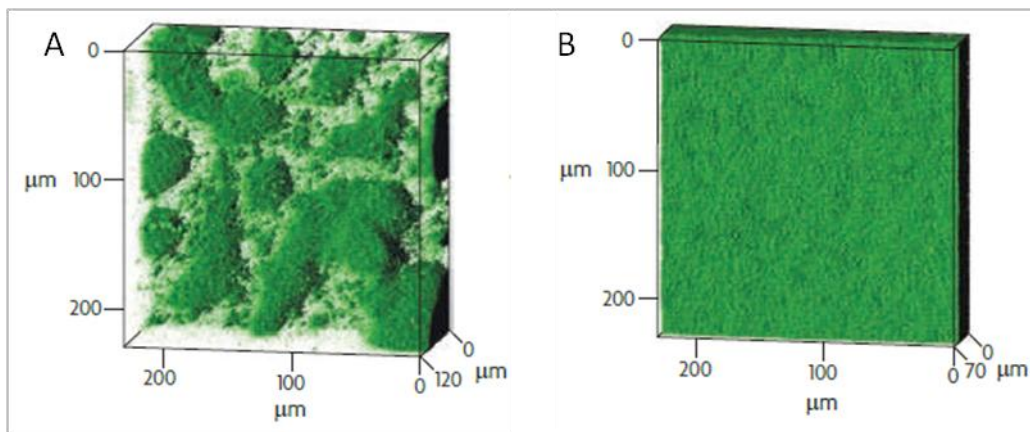
**Figure 6 : Biofilm de bactéries acidophiles vu au microscope électronique à balayage. Cet échantillon a été prélevé à partir d'un forage de 75 m de profondeur situé dans le complexe de la mine de Kempton dans le Maryland (Taylor et al., 2008)**

Plusieurs exopolysaccharides sont des homopolysaccharides (homoglycanes). Des dérivés de saccharose comme les glucanes et les fructanes sont produits dans les biofilms de streptocoques oraux (Flemming & Wingender 2010). La cellulose est souvent retrouvée dans la matrice de diverses espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae* (Zogaj et al., 2001) et *Pseudomonadaceae* (Wingender et al., 2001).

Cependant, la plupart des exopolysaccharides sont des hétéropolysaccharides. Ils se composent d'un mélange de résidus neutres ou chargés. Ils peuvent contenir des substituants organiques ou inorganiques qui affectent grandement leurs propriétés physiques et biologiques. En raison de la présence d'acides uroniques, de nombreux exopolysaccharides connus comme l'alginate et le xanthane, sont polyanioniques (Flemming & Wingender, 2010). Les exopolysaccharides polycationiques peuvent aussi exister. L'adhésine intercellulaire, composée de  $\beta$ -1,6-N-acétylglucosamine liée à des résidus désacétylés, en est un parfait exemple. Cette adhésine a été découverte dans plusieurs biofilms d'agents pathogènes nosocomiaux importants tels que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*

(Götz, 2002). Ces derniers peuvent coloniser les implants médicaux et conduire à des infections graves (Jefferson, 2009).

Les exopolysaccharides microbiens sont très variés, même entre souches d'une même espèce. *Streptococcus thermophilus* par exemple produit des hétéropolysaccharides de compositions monomériques différentes (Vaningelgem et al., 2004). *Pseudomonas aeruginosa*, l'un des modèles les mieux étudiés pour la formation de biofilms, produit au moins trois exopolysaccharides distincts (l'alginate, Pel et Psl) qui contribuent au développement du biofilm et au maintien de son architecture (Ryder et al., 2007). L'alginate est le produit le plus étudié dans la formation de biofilms de *P. aeruginosa* (Tielen et al., 2005). Ce polysaccharide joue un rôle important dans la structure tridimensionnelle du biofilm de *P. aeruginosa* (Grobe et al., 1995). En effet, le biofilm de l'espèce qui produit naturellement ce polysaccharide (*P. aeruginosa* SG81) présente une structure très hétérogène en champignons (Figure 7 A) tandis que l'espèce qui a perdu cette propriété (*P. aeruginosa* SG81R1) forme un biofilm homogène et lisse (Figure 7 B).



**Figure 7 : Images 3D des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Grobe et al., 1995). (A) : *P. aeruginosa* SG81 ; (B) : *P. aeruginosa* SG81R1 ne produisant plus d'alginates**

*b. Les protéines extracellulaires*

La matrice du biofilm peut contenir des quantités considérables de protéines dont les proportions massiques dépassent parfois largement le contenu polysaccharidique (Frølund et al., 1996).

➤ **Les enzymes**

Plusieurs enzymes extracellulaires ont été détectées dans les biofilms. Nombreuses sont celles qui sont impliquées dans la dégradation des biopolymères. Les substrats potentiels de ces enzymes peuvent être des polymères solubles dans l'eau (comme les polysaccharides, les protéines et les acides nucléiques) et des composés insolubles (tels que la cellulose, la chitine et les lipides), ainsi que des particules organiques piégées dans le biofilm (Wingender et al., 1999). Plusieurs catégories d'enzymes sont retrouvées dans les biofilms des milieux aquatiques naturels et artificiels (Tableau 1).

D'une part, ces enzymes constituent un « système digestif » externe qui permet de décomposer les polymères de haut poids moléculaire en petites molécules utilisées comme source de carbone et d'énergie. D'autre part, certaines enzymes peuvent être impliquées dans la dégradation des biopolymères de structure qui engendre le détachement des microorganismes du biofilm (Flemming & Wingender, 2010).

Certaines enzymes extracellulaires isolées à partir de bactéries ou de champignons possèdent un intérêt commercial et sont produits à échelle industrielle. En effet, ces enzymes extracellulaires sont exploitées dans les stations d'épuration et le traitement des eaux usées (Flemming & Wingender, 2010).

**Tableau 1 : Les enzymes retrouvées dans les biofilms aquatiques naturels et artificiels (Wingender & Jaeger, 2002)**

Enzymes	Origine du biofilm
<b>Enzymes dégradant les protéines</b>	
<b>Protéases</b>	Rivières et boues activées
<b>Peptidases</b>	Eaux potables, rivières, milieu marin, eaux usées, égouts et boues activées
<b>Enzymes dégradant les polysaccharides</b>	
<b>Endocellulases</b>	Rivières
<b>Chitinases</b>	Rivières et sédiments
<b><math>\alpha</math>-glucosidases</b>	Rivières, égouts, sédiments, milieu marin, eaux usées et boues activées
<b><math>\beta</math>-glucosidases</b>	
<b><math>\beta</math>-xylosidases</b>	Rivières et sédiments
<b>Enzymes dégradant les lipides</b>	
<b>Lipases</b>	Milieu marin et boues activées
<b>Estérases</b>	Rivières, sédiments et eau potable, égouts

➤ **Protéines structurales**

Les protéines non-enzymatiques sont subdivisées en plusieurs catégories. La première catégorie regroupe les lectines. Il s'agit de protéines capables de se lier spécifiquement et de façon réversible à certains glucides (Tableau 2).

**Tableau 2 : Exemples de protéines de structure**

Protéines	Type de biofilm	Références
<b>Protéines liant les glucanes</b>	Biofilms dentaires de <i>Streptococcus mutans</i>	Lynch et al., 2007
<b>Lectines membranaires</b>	<i>Azospirillum brasiliense</i>	Mora et al., 2008
<b>Lectine galactose-spécifique LecA</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tielker et al., 2005
<b>Lectine fructose-spécifique LecB</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Diggle et al., 2006

La deuxième catégorie regroupe les protéines de haut poids moléculaire liées à la surface des cellules bactériennes et qui favorisent la formation de biofilms de plusieurs espèces (Lasa & Penadés, 2006), comme par exemple la protéine Bap de *S. aureus*. Ces molécules sont impliquées dans la formation et la stabilisation du réseau polysaccharidique du biofilm, en assurant le pontage entre la surface microbienne et les produits extracellulaires.

Les appendices protéiques tels que les pili, les fimbriae et les flagelles sont aussi considérés comme des éléments de structure puisqu'ils interagissent avec les autres composants de la matrice du biofilm. Par exemple, les pili de type IV de *Pseudomonas aeruginosa* se lient à l'ADN extracellulaire du biofilm (van Schaik et al., 2005). Chez *S. typhimurium* et *E. coli*, les fimbriae se lient aux molécules de cellulose, permettant la formation d'une matrice rigide et hydrophobe (Zogaj et al., 2001).

**c. L'ADN extracellulaire**

L'ADN extracellulaire (ADNe) a été retrouvé dans des biofilms d'origines diverses, et particulièrement dans les biofilms des eaux usées (Frølund et al., 1996). Les quantités produites dans la matrice extracellulaire dépendent des espèces microbiennes. Ainsi, l'ADNe est un constituant majeur de la matrice du biofilm de *Staphylococcus aureus*, alors qu'il est

minoritaire dans les biofilms de *S. epidermidis* (Izano et al., 2008). Il est aussi retrouvé majoritairement dans les biofilms de *P. aeruginosa*, et joue le rôle de messenger intercellulaire (Yang et al., 2007). Initialement considéré comme un composé résiduel de cellules lysées, il est clair aujourd'hui qu'il fait partie intégrante de la matrice et joue un rôle important dans le biofilm (Molin & Tolker-Nielsen, 2003). En effet, il intervient dans l'agrégation des cellules du genre *Rhodovulum* (Watanabe et al., 1998). La dégradation de ces molécules d'ADNe par un traitement à la DNase inhibe considérablement la formation de biofilms et peut même disperser un biofilm déjà établi de *P. aeruginosa* (Whitchurch et al., 2002) et *B. cereus* (Vilain et al., 2009).

#### ***d. Les tensioactifs et les lipides***

Contrairement aux polysaccharides, les protéines et l'ADN extracellulaire qui sont des molécules fortement hydratées, d'autres composants de la matrice sont hydrophobes, comme les lipides (Conrad et al., 2003). Il a été montré que les lipopolysaccharides sont cruciaux pour l'adhésion de *Thiobacillus ferrooxidans* sur les surfaces en pyrite (Sand & Gehrke, 2006). *Serratia marcescens* produit également des lipides extracellulaires possédant des propriétés tensio-actives (Matsuyama & Nakagawa, 1996). Les tensio-actifs comme les surfactines et les émulsifiants ont la capacité de disperser les substances hydrophobes et améliorer ainsi leur biodisponibilité (Flemming & Wingender 2010). Les biosurfactants peuvent avoir des propriétés antibactériennes et antifongiques et jouent un rôle important dans le processus d'adhésion et de dispersion (Ron & Rosenberg, 2001). En milieu marin, les biosurfactants générés par les micro-organismes à l'interface air-eau influencent fortement la tension superficielle et, par conséquent, les échanges gazeux entre les océans et l'atmosphère (Leck & Bigg, 2005). Les rhamnolipides peuvent aussi agir comme agents tensio-actifs. Ils sont souvent retrouvés dans la matrice extracellulaire de *P. aeruginosa* (Davey et al., 2003). Ils sont impliqués dans la formation de la structure en forme de champignon, caractéristique des biofilms de *P. aeruginosa*, et aussi dans le phénomène de dispersion (Pamp et al., 2007).

#### ***e. L'eau***

L'eau est de loin la composante la plus importante du biofilm. La matrice extracellulaire fournit un environnement hautement hydraté protégeant les microorganismes du manque d'eau. Les bactéries répondent activement à la dessiccation en produisant massivement des

polymères extracellulaires (Roberson & Firestone, 1992). En effet, les produits extracellulaires sont hygroscopiques et semblent stocker l'eau par des mécanismes non spécifiques (Or et al., 2007).

### **I.3.2 Fonction des produits extracellulaires**

Dans la plupart des biofilms, les microorganismes représentent moins de 10% de la matière sèche totale, tandis que la matrice extracellulaire peut représenter plus de 90%. Les produits extracellulaires constituent l'environnement direct des cellules qui composent le biofilm. La formation et le maintien des structures multicellulaires dépendent essentiellement de la production des polymères sécrétés dans le milieu extracellulaire (Sutherland, 2001). L'architecture du biofilm est influencée par de nombreux facteurs. Les plus importants sont : les conditions hydrodynamiques, la disponibilité des nutriments, la motilité bactérienne, la communication intercellulaire ainsi que les polysaccharides et les protéines sécrétés. Bien que plusieurs rôles aient été décrits pour les SPE (Tableau 3), les modes d'action précis à l'échelle moléculaire restent encore mal compris. (Flemming & Wingender, 2010).

**Tableau 3 : Les principaux rôles et fonctions des substances polymériques extracellulaires dans les biofilms microbiens (Flemming & Wingender, 2010)**

<b>Fonctions</b>	<b>Rôles dans le biofilm</b>	<b>Composants impliqués</b>
<b>Adhésion</b>	Intervention dans les étapes initiales de la colonisation des surfaces biotiques et abiotiques et la consolidation à long terme de l'ensemble du biofilm	Les polysaccharides, les protéines, les molécules d'ADN et les molécules amphiphiles
<b>L'agrégation des cellules bactériennes</b>	Pontage entre les cellules, immobilisation temporaire des populations bactériennes et développement de fortes densités cellulaires	Les polysaccharides, les protéines et les molécules d'ADN
<b>Cohésion des biofilms</b>	Formation d'un réseau de polymères hydraté assurant la stabilité mécanique des biofilms et la communication cellulaire	Les polysaccharides neutres et chargés, les protéines et les molécules d'ADN

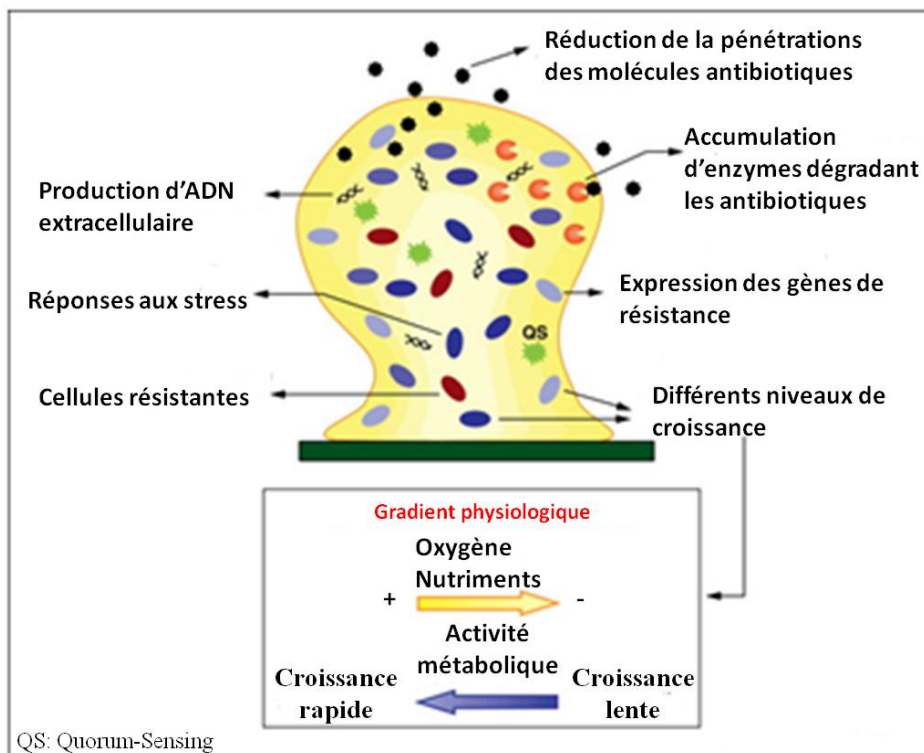
<b>Rétention d'eau</b>	Maintien d'un microenvironnement fortement hydraté autour des composants du biofilm	Les polysaccharides hydrophiles et dans certains cas les protéines
<b>Protection</b>	Résistance aux défenses de l'hôte et tolérance à divers agents antimicrobiens (désinfectants, antibiotiques)	Les polysaccharides et les protéines
<b>Activité enzymatique</b>	Digestion des macromolécules exogènes pour les transformer en éléments nutritifs et libération des cellules du biofilm	Les protéines
<b>Source d'éléments nutritifs</b>	Source de carbone, d'azote et de phosphore	Potentiellement tous les composants de la matrice
<b>Échange génétique d'informations</b>	Transfert horizontal de gènes, impliqués dans la résistance et l'adaptation, entre les cellules du biofilm	Les molécules d'ADN
<b>Donneur et accepteur d'électrons</b>	Activité redox	Les protéines

Les exoproduits des microalgues, et en particulier les diatomées, jouent un rôle important dans l'encrassement des structures en milieu marin mais aussi dans la stabilisation du sédiment (de Brouwer et al., 2005). L'algue verte *Penium margaritaceum* est capable de sécréter de grandes quantités d'exoproduits et principalement des polysaccharides qui favorisent la croissance des bactéries hétérotrophes en constituant un substrat carboné (Domozych et al., 2005). Les champignons (levures et moisissures) produisent également des substances extracellulaires. Les exoproduits de *Candida* spp. (Chandra et al., 2001) sont impliqués dans les processus d'adhésion et de formation de biofilm. L'archée *Sulfolobus solfataricus* produit des polysaccharides qui aident à son adhésion (Zolghadr et al., 2009).

La matrice protège les organismes contre la dispersion, les agents oxydants, les biocides, les antibiotiques, le rayonnement ultraviolet et les défenses immunitaires. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la résistance (ou la tolérance) des biofilms aux agents antimicrobiens (Olson et al., 2002; Anderson & O'Toole, 2008 ; Hall-Stoodley & Stoodley, 2009 ) (figure 8). Les charges électrostatiques de surface peuvent lier certains agents antimicrobiens et les empêcher de pénétrer dans le biofilm. Le métabolisme des bactéries joue



également un rôle très important. Étant donné la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm sont peu actives métaboliquement et peuvent se retrouver sous forme dormante. Ces cellules bactériennes sont probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms. De plus, la proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise le transfert horizontal de gènes et l'acquisition d'une résistance héréditaire (Lewis, 2008). L'hétérogénéité physico-chimique des biofilms s'accompagne d'une hétérogénéité métabolique, source de microenvironnements qui permet la coexistence organisée d'espèces bactériennes avec des propriétés métaboliques différentes et souvent complémentaires. Il en résulte une répartition biologique organisée de nombreux microorganismes dans le biofilm où peuvent cohabiter bactéries, champignons, algues et protozoaires (Roux & Ghigo, 2006).



**Figure 8 : Mécanismes cellulaires de résistance et d'adaptation au sein des biofilms (d'après de la Fuente-Núñez et al., 2013)**

#### I.4 L'omniprésence des biofilms

Les biofilms sont retrouvés dans plusieurs écosystèmes. Ils peuvent être utiles voir même nécessaires comme ils peuvent être source de problèmes notamment dans le domaine médical, industriel ou dans l'environnement.

En médecine, les biofilms sont impliqués dans un nombre important d'infections. Chez l'homme, ils sont la cause de 65% des infections nosocomiales et prothétiques (Costerton et al., 1995) et de 80% des infections bactériennes chroniques (Hall-Stoodley et al., 2004).

La mucoviscidose est une maladie génétique caractérisée par la présence d'un mucus visqueux au niveau des poumons qui favorise la colonisation bactérienne et le développement de biofilms. L'établissement du biofilm de *P. aeruginosa* s'établit suite à une succession de colonisations cellulaires dans le mucus pulmonaire (Clutterbuck et al., 2007). A ce niveau, les bactéries produisent massivement des exopolymères rendant ainsi les biofilms plus résistants aux traitements (Ramsey & Wojzniak, 2005). Les biofilms ont été aussi retrouvés sur les instruments utilisés dans le milieu médical, comme les seringues, les cathéters, les pacemakers et les prothèses. Dans la majorité des cas, la seule solution efficace est le retrait de l'instrument infecté. D'autre part, la contamination des systèmes de climatisation, de ventilation et de distribution d'eau par des biofilms abritant des microorganismes pathogènes, contribue à la propagation des infections en milieux hospitaliers ou non hospitaliers (Donlan & Costerton, 2002). Les biofilms causent aussi des problèmes bucco-dentaires. En effet, en s'attachant aux dents, les bactéries échappent aux conditions acides stomacales (Gibbons & van Houte, 1975). La plaque dentaire est composée de bactéries aérobies et anaérobies enveloppées dans une matrice extracellulaire (Figure 9). Ces biofilms sont essentiellement constitués de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* et d'organismes filamenteux comme *Actinomyces*, *Leptotrichia*, *Nocardia*, *Rothia* spp. Ils affectent progressivement les dents et engendrent des problèmes comme les caries (Loesche, 1986).



**Figure 9 : (A) Plaque dentaire humaine mature. (B) Image en microscopie électronique à balayage montrant une formation dite en épis de maïs (www.ohdq.com).**

En industrie agro-alimentaire, comme les brasseries et les laiteries, les biofilms sont à l'origine de nombreux problèmes d'hygiène et d'altérations de la qualité des produits. La bactérie *Listeria monocytogenes* résiste aux traitements de désinfection, ce qui engendre des problèmes de contaminations alimentaires (Jeyasekaran et al., 2008). Comme cela a été évoqué précédemment, les biofilms peuvent aussi se développer dans les systèmes de circulation d'eau (Figure 10). L'estimation du coût lié à l'encrassement des réseaux d'eau de process en France est de 7 milliards d'euros (www.hydreos.fr). Aux impacts de l'entartrage, baisse d'efficacité énergétique, problèmes de maintenance, s'ajoutent les risques sanitaires. La formation de biofilms dans les canalisations d'eau potable, en particulier par la bactérie *Legionella pneumophila*, est également un problème majeur car l'ajout de chlore ne permet pas d'éliminer les bactéries fixées. Dans l'industrie pétrolière, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable.



**Figure 10 : Biofilm formé dans les systèmes de circulation d'eau potable (www.hydreos.fr)**

Les biofilms sont à l'origine de plusieurs dégradations engendrant des pertes économiques importantes. Des biofilms d'algues et de champignons sont retrouvés sur les façades des bâtiments. Ils sont aussi retrouvés sur les coques des bateaux et les structures portuaires (Figure 11). Les aspects (positifs et négatifs) sont détaillés dans le chapitre suivant.



**Figure 11 : Photographies de salissures sur une coque de bateau  
([www.agriculture.gov.au](http://www.agriculture.gov.au)) et sur des structures portuaires  
([www.eco-guard-systems.co.jp](http://www.eco-guard-systems.co.jp))**

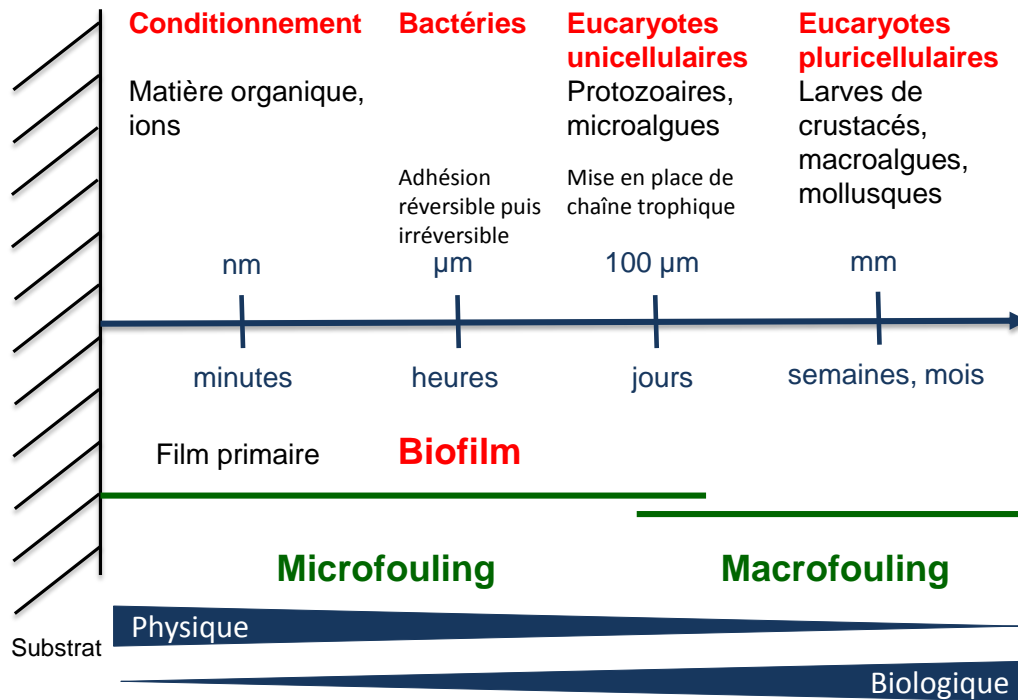
---

## **II. Focus sur le biofilm marin**

---

L'étude des communautés de micro-organismes des biofilms du milieu marin est déterminante pour la compréhension globale du fonctionnement des écosystèmes aquatiques et en particulier de leur rôle dans les phénomènes de biocorrosion marine (Harras, 2005). Afin d'appréhender la complexité de ces écosystèmes, il est nécessaire de connaître la nature des acteurs, leur abondance, les relations qui existent entre eux, et de comprendre l'évolution de ces relations dans l'espace et le temps. Depuis maintenant une quinzaine d'années, les analyses moléculaires environnementales basées sur des banques de séquences d'ADN ribosomique ont permis de décrire un grand nombre d'espèces, dont certaines se sont révélées être encore inconnues (Lanneluc et al., 2015). Cependant, un biais majeur pour la compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes est qu'environ 99 % des organismes microscopiques ne peuvent pas être cultivés (Amann et al., 1995). Ainsi, la physiologie, la biochimie, la génétique, l'écologie ou encore l'évolution de la plus grande partie des organismes du milieu marin restent complètement mystérieuses.

En milieu marin, tout matériau est rapidement colonisé par des micro-organismes formant des biofilms avec des structures tridimensionnelles très diverses qui peuvent inclure des canaux permettant l'écoulement de liquides, de nutriments et de déchets (Davey & O'Toole 2000 ; Stoodley et al., 2002). Avec les diatomées, les bactéries constituent les composantes principales des biofilms qui se forment dans le milieu marin (Salta et al., 2013). La formation de biofilms bactériens est considérée comme étant une des étapes pionnières de l'établissement des salissures, en créant des points d'ancrage pour d'autres micro-organismes, puis des larves et ensuite des macroorganismes. Ce processus de colonisation d'un substrat immergé dans un environnement aquatique est appelé « biofouling ». Il se décompose en quatre grandes séquences selon le modèle proposé par Wahl (Wahl, 1989) (Figure 12) : le conditionnement chimique de la surface par adsorption quasi instantanée de molécules organiques et inorganiques, la colonisation par les bactéries puis par les organismes eucaryotes unicellulaires et enfin les organismes eucaryotes pluricellulaires.



**Figure 12 : Représentation schématique des phases d'établissement des salissures marines sur une surface (d'après Wahl et al., 1989)**

Le microfouling correspond à la formation de biofilms avec fixation des bactéries suivie des micro-algues (diatomées), levures et protozoaires. Au cours du macrofouling, le biofilm microbien évolue vers un système plus complexe incluant des brouteurs, des producteurs primaires pluricellulaires, et ce jusqu'à l'étape finale de la colonisation impliquant la mise en place et la croissance d'invertébrés marins (balanes, moules, tuniciers...) ainsi que de macro-algues. Le macrofouling est donc la colonisation par des organismes pluricellulaires eucaryotes. La nature des phénomènes impliqués évolue progressivement d'un processus physique vers un processus biologique. Le terme biofouling désigne non seulement l'ensemble des organismes vivants qui se développent sur les supports, mais aussi par extension, les détériorations qu'ils occasionnent (Harras, 2005).

## II.1 Les conséquences du développement des biofilms en milieu marin

Les biofilms sont très hétérogènes et sans cesse remodelés selon des facteurs endogènes et exogènes. Les différences peuvent se situer aussi bien au niveau structural (biofilms mono- ou pluri-espèces, épaisseurs et architectures diverses) qu'au niveau des surfaces colonisées. La diversité des biofilms constituerait l'un des éléments clés de leur

robustesse face aux agressions extérieures (Salta et al., 2013). En environnement marin, les biofilms peuvent se former sur des surfaces biotiques et abiotiques d'une grande diversité. Les animaux marins tels que les tortues ou les baleines peuvent être colonisés par des biofilms créant ainsi des relations très spécifiques entre l'hôte et les organismes colonisateurs (Salta et al., 2013). La plupart des activités humaines en milieu marin sont également confrontées aux biofilms et biosalissures : les coques de navires, les pontons des ports, les plates-formes offshore, les installations aquacoles, les équipements océanographiques immergés pendant des durées de quelques jours à plusieurs mois voire des années. Les substrats naturels tels que la vase à marée basse ou encore les rochers immergés, se recouvrent également de biofilms (Salta et al., 2013).

### **II.1.1 Impact positif des biofilms**

La croissance d'un biofilm n'est pas toujours considérée comme un facteur de gêne. Il est par exemple très important en milieu marin en tant qu'élément des réseaux trophiques, tout particulièrement dans l'établissement de la chaîne alimentaire. Par exemple, les biofilms qui se forment à la surface des roches et du sédiment sont une des sources importantes de nourriture pour de nombreux macroorganismes marins (vers, huîtres, moules, poissons...) qui y trouvent une source importante de matière organique. Il a été montré que certains oiseaux pouvaient également s'en nourrir (Kuwaie et al., 2008). Les biofilms ont également un impact positif en conchyliculture, car ils forment des substrats favorisant la fixation des huîtres (Underwood & Kromkamp, 1999). Ainsi, leur développement est recherché à la surface des installations conchylicoles (Falciatore & Bowler, 2002).

Des travaux tendent à développer l'utilisation des biofilms en tant que bioindicateurs et marqueurs du degré de pollution chronique de l'environnement aquatique (Wanner & Bauchrowitz, 2006). En effet, les biofilms interagissent avec les substances dissoutes et en particulier les pesticides, qu'ils peuvent dégrader, et ont la faculté de s'adapter rapidement aux modifications de l'environnement (Wanner & Bauchrowitz, 2006). Une contamination du milieu aquatique par ces substances peut ainsi modifier la structure des biofilms, leur diversité (représentativité des espèces qui le constituent) et leur fonctionnement, altérant, par exemple, leur activité photosynthétique, respiratoire ou enzymatique, de manière transitoire ou irréversible. Les biofilms seraient donc des indicateurs pertinents de la qualité du milieu, capables de fournir un signal d'alerte précoce en cas de pollution aux pesticides ou à tout

autre agent toxique. Parallèlement, les scientifiques cherchent à évaluer les capacités des biofilms à dégrader in situ les polluants afin de développer des applications telles que le traitement d'eaux polluées ou la récupération d'huiles via les biofilms (Wanner & Bauchrowitz, 2006 ; Logan & Regan, 2006).

### **II.1.2 Impact négatif des biofilms**

Les effets négatifs des biofilms sur les matériaux et équipements sont nombreux et posent un problème majeur pour l'industrie et les activités de la mer en général. Ainsi, les dépenses annuelles attribuées à l'existence de salissures marines sont énormes (Compère, 1999).

Dans le cas des navires, les salissures entraînent une augmentation de la rugosité de la coque et donc des forces de friction lors du déplacement dans l'eau, créant ainsi un écran hydrodynamique. Par exemple, un biofilm de 100  $\mu\text{m}$  d'épaisseur entraîne une augmentation de 5 à 15% de la résistance de friction (Characklis, 1990). Un biofilm de 1 mm d'épaisseur entraîne une diminution de la vitesse du navire de 15 % (Callow, 1986 ; Yabla et al., 2004). La biomasse qui adhère sur les coques de navires induit également, dans une moindre mesure, une surcharge pondérale. Pour éviter une perte de vitesse significative des navires, une surconsommation en carburant est nécessaire, augmentant ainsi considérablement les coûts du transport maritime mais aussi l'émission de gaz à effet de serre. A titre d'exemple, le coût global associé aux biosalissures est estimé à 56 millions de dollars par an pour l'ensemble des destroyers américains de la classe DDG-51 (Schultz et al., 2011).

Le biofouling affecte également d'autres structures maritimes, en particulier les bouées, les équipements flottants, les pontons, ... etc., qui subissent ainsi une surcharge pondérale considérable. Au niveau des circuits de refroidissement, les problèmes de salissures marines diminuent l'efficacité du transfert de chaleur et augmentent la consommation en énergie, influençant ainsi le rendement des installations et leur pérennité (Wanner & Bauchrowitz, 2006).

De plus, la présence de biofilms induit une dérive des mesures réalisées par des capteurs océanographiques immergés, comme les détecteurs optiques, caméras sous-marines et capteurs de mesures de pH (Mollica, 1992).



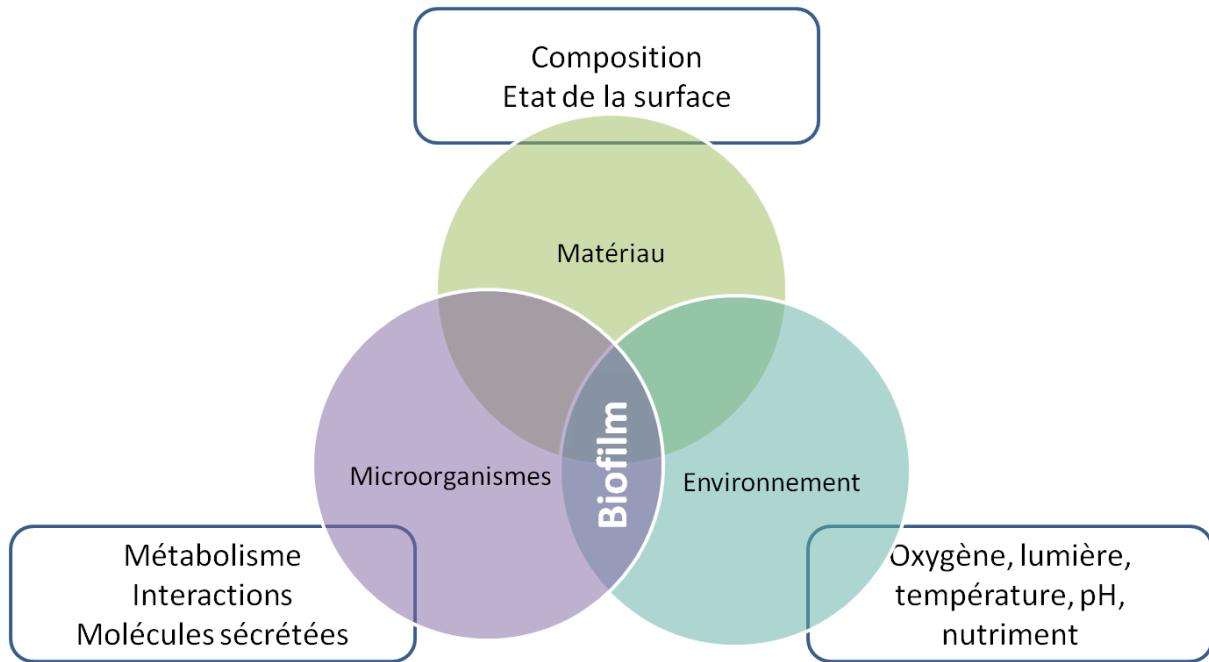
Les biofilms peuvent aussi altérer les propriétés des matériaux colonisés par le biais du phénomène de biocorrosion ou de biodétérioration, dû notamment à une activité métabolique intense de certains types de bactéries telles que les bactéries liées au métabolisme du fer et du soufre. L'influence des micro-organismes peut conduire à des phénomènes de corrosion localisée très sévères associés à des vitesses de corrosion pouvant atteindre 1 cm par an. Le coût de la biocorrosion est estimé à 20% des coûts totaux de lutte contre la corrosion des matériaux en général, soit plusieurs milliards d'euros pour la France (Compère, 1996).

Dans l'ensemble, les biofilms marins sont maintenant reconnus comme un problème majeur pour un large éventail de structures artificielles. Les revêtements antifouling s'avèrent donc indispensables, mais leur renouvellement entraîne une augmentation drastique des coûts d'entretien des infrastructures immergées et leur toxicité pose des problèmes importants pour l'environnement.

## **II.2 Les facteurs influençant la formation des biofilms**

Peu d'études ont rapporté sur la composition en espèces des communautés microbiennes dans les biofilms marins. En particulier, les rôles et les spécificités de surface des colonisateurs sont largement inconnus pour la plupart des types de surface (Salta et al., 2013). De plus, des études comparatives sur la composition microbienne du biofilm sont difficiles à réaliser car l'immersion dans différents sites géographiques s'associe à des différences de conditions environnementales telles que la composition en éléments nutritifs, la température, l'hydrodynamique et la chimie de l'eau, ainsi qu'à des variations saisonnières. Ces paramètres influencent à la fois l'écophysiologie du plancton et du biofilm (Salta et al., 2013). La dynamique des biofilms doit donc être évaluée dans ce contexte.

Les mécanismes de formation des biofilms et leur organisation structurale résultent essentiellement d'interactions entre l'environnement, la flore microbienne et le matériau (Figure 13). Ils sont donc tributaires et influencent tout à la fois des paramètres propres à chacun des trois acteurs, notamment l'oxygénation, le pH, la température, l'accès à la lumière, la quantité de matière organique en ce qui concerne l'environnement, la nature du matériau, la microstructure, l'état de surface pour le matériau, et le métabolisme, les polymères sécrétés et les interactions cellulaires pour les micro-organismes.



**Figure 13 : Facteurs influençant la formation et la structuration des biofilms marins**

Par exemple, il a été démontré que la température (Lau et al., 2005), les nutriments (Chiu et al., 2008), la lumière, le pH et l'oxygène dissous (Nayar et al., 2005) affectent la structure des communautés microbiennes des biofilms tandis que la salinité semble avoir moins d'influence (Lau et al., 2005). La structure des communautés de diatomées dans les biofilms présente des différences significatives selon les surfaces et les saisons. Ces différences ont été attribuées aux changements physico-chimique et biologique à la fois de la colonne d'eau et des surfaces (Patil & Anil, 2005). Des surfaces avec des degrés d'hydrophobie ou d'hydrophilie différents vont présenter des différences au niveau des bactéries pionnières qui vont les coloniser (Dang & Lovell, 2000 ; Lee et al., 2008). Néanmoins, à la suite de 155 jours d'immersion de différents matériaux en haute mer (jusqu'à 4500 m de profondeur), Bellou et coll. (2012) ont constaté que la diversité microbienne au sein des biofilms semble moins affectée par le type de surface que par la profondeur, et que la diversité augmente avec cette dernière. Il semble également que les communautés multi-espèces qui se développent sous une force de cisaillement élevée sont moins diversifiées que celles qui se développent avec des contraintes de cisaillement inférieures (Rochex et al., 2008). L'observation de biofilms d'écosystèmes totalement différents illustre l'influence de tous ces paramètres. Ainsi les biofilms se développant sur des structures métalliques immergées dans l'eau de mer ont une structure complexe en multi-espèces bactériennes,

micro-algues, particules de sédiments et contiennent des produits de corrosion (Lanneluc et al., 2015), alors que des biofilms formés à la surface d'un dispositif médical (type cathéter) présentent une organisation plus simple comprenant souvent une seule espèce bactérienne associée à une matrice exopolymérique (Donlan, 2002).

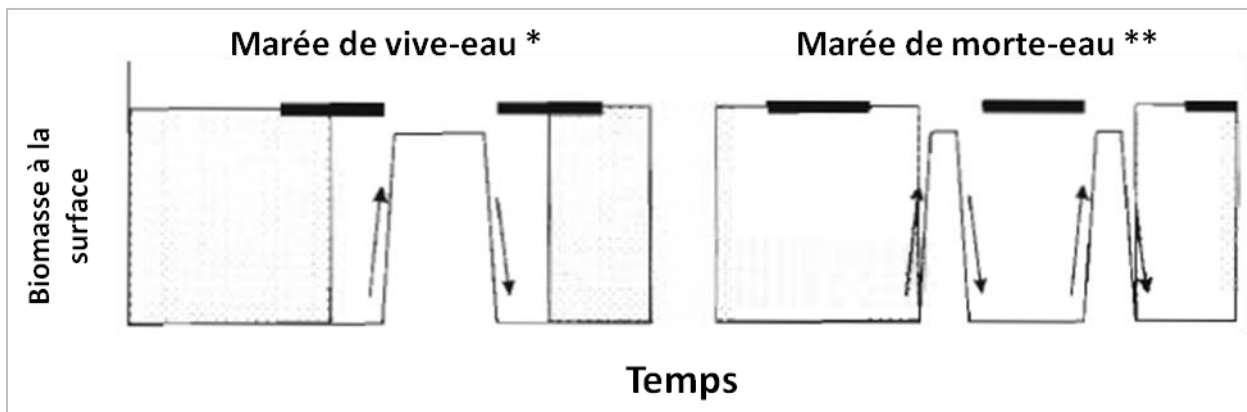
De plus, les biofilms ne présentent pas la même épaisseur ni la même architecture selon les conditions nutritives de l'environnement (Derlon et al., 2008). Par exemple, les biofilms des eaux naturelles sont plus fins que ceux de milieux riches comme la plaque dentaire. L'eau de mer constitue néanmoins un milieu propice au développement des microorganismes de par sa composition riche en éléments nutritifs (matière organique et sels minéraux) et en oxygène dissous ainsi qu'à son effet tampon. L'eau de mer est constituée à 96,5 % d'eau et à 3,5 % de composés dissous (Stumm, 1996). Ceux-ci sont classés en éléments majeurs ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ) et en éléments mineurs aux concentrations beaucoup plus faibles. Les éléments mineurs ne représentent que 0,2 à 0,3 % en masse de la composition globale de l'eau de mer. Cependant, ils se révèlent d'une importance déterminante puisqu'ils comprennent des éléments minéraux et des composés azotés ou phosphorés qui sont indispensables au développement des espèces biologiques. Le pH de l'eau de mer est en général compris entre 7,5 et 8,5. Il varie en fonction du système gaz carbonique / bicarbonate / carbonate mais est aussi lié à la concentration en oxygène dissous. La concentration en oxygène dissous est un paramètre fondamental en milieu marin car une majorité des processus biologiques et électrochimiques en sont fortement tributaires. Cette concentration est essentiellement régulée par les échanges à l'interface air / eau, par la diffusion et par l'activité biologique. Enfin la salinité des eaux de surface dépend principalement de l'évaporation et des précipitations. En environnement littoral, l'influence des cours d'eau peut diminuer la salinité dans les zones d'estuaire.

### **II.3 Le biofilm des vasières intertidales**

Les vasières intertidales sont les vasières du littoral comprises entre les limites extrêmes de la marée. Elles constituent donc une interface clé entre l'océan, l'atmosphère et l'environnement terrestre. Ces vasières jouent un rôle de garde-manger pour de nombreuses espèces animales et de nourricerie pour des poissons juvéniles en fournissant abris et nourriture pour de nombreuses espèces d'intérêt commercial (Beck et al., 2001). Ces zones de forte productivité biologique sont propices à l'installation d'activités aquacoles, en particulier

la conchyliculture, donnant une dimension socio-économique importante à ces vasières (Héral et al., 1989).

Les vasières intertidales sont caractérisées par des fluctuations fréquentes de température, de concentrations en sels, de dessiccation, d'irradiation par les UV, de courants et de vagues, autant de défis pour les micro-organismes qui habitent ce milieu. Ces vasières ont ceci de particulier et d'original que, pour accéder à la lumière nécessaire à leur photosynthèse, les micro-algues du sédiment migrent pendant la marée basse à la surface de ces vasières (Blanchard et al., 2001) (figure 14) où elles forment des biofilms transitoires quasi continus. Puis, lorsque la mer remonte ou pendant la nuit, les microalgues se réenfouissent dans le sédiment (Serôdio et al., 2007) et le biofilm se déstructure. Ces biofilms sont donc systématiquement soumis alternativement à des périodes d'exposition directe au soleil, avec parfois des irradiances saturantes, et à des périodes quelquefois longues d'obscurité pendant les périodes d'immersion ou la nuit. Au cours des flux et des reflux, les transitions entre les différentes conditions de lumière, de salinité et de température sont brusques (Serôdio et al., 2008). Lorsque la marée remonte, une partie des biofilms est remise en suspension et peut alors intégrer la chaîne alimentaire des organismes présents dans l'eau de mer.



**Figure 14 : Synchronisation environnementale de l'évolution de la biomasse dans la couche supérieure de la vasière intertidale de Marennes-Oléron (Blanchard et al., 2001)**

\* Marée de vive-eau : marée soumise à l'influence de la pleine lune ou la nouvelle lune

\*\* Marée de morte-eau : marée non soumise à l'influence de la lune

Ces biofilms vaseux sont essentiellement composés de microalgues (diatomées) (Admiraal et al., 1984, Underwood & Kronkamp, 1999), de bactéries (van Duyl, 2000) et de substances polymériques extracellulaires sécrétées à la fois par les microalgues et les bactéries (van Duyl, 2000 ; Decho, 2000). Des micro-organismes eucaryotes, ainsi que des virus sont également imbriqués dans la matrice de SPE (Yallop et al., 2000).

Les diatomées sont des algues unicellulaires caractérisées par une membrane à deux valves emboîtées (frustule) contenant de l'acide silicique et qui les rend très résistantes d'un point de vue mécanique et chimique. On distingue deux grandes catégories de diatomées en fonction de la géométrie de leur frustule. La première catégorie regroupe les diatomées centrales à symétrie radiale et la deuxième catégorie regroupe les diatomées pennées à symétrie bilatérale. Ces dernières, dites épipéliques (mobiles), sont capables de migrer vers la surface afin de capter la lumière (Consalvey et al., 2004). Cette migration est cyclique et dépend du mouvement des marées

Dans les vasières intertidales européennes, les diatomées peuvent constituer jusqu'à 97% des micro-algues de ce biofilm (de Jonge & Colijn, 1994 ; Méléder et al., 2005), avec comme espèces les plus fréquentes en France (côte Atlantique), *Navicula phyllepta*, *Navicula digitoradiata*, *Navicula gregaria*, *Staurophora wislouchii*, *Gyrosigma fasciola* et *Nitzschia dissipata* (Haubois et al., 2005).

Pour ce qui est des bactéries, on en trouve généralement  $10^9$  par  $\text{cm}^3$  de sédiment (Pascal et al., 2009). Si les bactéries planctoniques représentent une des communautés environnementales les plus étudiées, les bactéries benthiques (du fond marin) restent mal caractérisées, alors même qu'elles sont 1000 fois plus abondantes (Schmidt et al., 1998). Plusieurs études dans différents océans montrent que dans les sédiments marins, les Gammaprotéobactéries sont dominantes, ainsi que parfois les Deltaprotéobactéries (Ravenschlag et al., 2001 ; Zinger et al., 2011 ; Lavergne, 2014). En fait, les communautés bactériennes diffèrent selon la profondeur du sédiment étudié, et les Gammaprotéobactéries sont très largement majoritaires (près de 90%) dans des prélèvements d'échantillons proches de la surface (0-2 cm) (Urakawa et al., 2000), ainsi que dans le biofilm (données personnelles). De plus, les sédiments côtiers se différencient des sédiments profonds par une plus grande quantité de bactéries affiliées aux Clostridia et Bacilli et une plus faible quantité d'Acidobactéries et de Planctomycetes (Zinger et al., 2011).

Les biofilms des vasières intertidales sont le siège de très nombreuses réactions chimiques impliquant des microorganismes et ont un rôle majeur en géochimie marine. Les conditions physico-chimiques et les communautés bactériennes impliquées notamment dans le cycle du soufre qui y sont très présentes, se rapprochent de ce qui est observable au sein des dépôts de corrosion sur des surfaces métalliques. Le sédiment pourrait donc représenter un support d'étude pour la compréhension des mécanismes intervenant dans les biofilms se développant à la surface des matériaux métalliques en milieu marin.

#### **II.4 Le biofilm des structures métalliques portuaires**

Dès qu'une structure métallique est immergée dans l'eau de mer, le processus de corrosion électrochimique du fer se déroule et le métal se recouvre rapidement d'une couche de produits de corrosion. En parallèle, différentes communautés microbiennes, d'origine à la fois planctonique et benthique, viennent se déposer à la surface du métal, adhèrent et se développent en formant un biofilm, cette biomasse étant intimement associée aux produits de corrosion. Nous parlerons ainsi d'un biofilm composite « micro-organismes / produits de corrosion ».

Lors du processus de corrosion, le facteur biologique peut accélérer le phénomène. La corrosion est qualifiée alors de biocorrosion, biodétérioration des matériaux ou encore corrosion influencée par les micro-organismes (MIC, Microbially Influenced Corrosion). En général, les micro-organismes n'utiliseraient pas directement le matériau comme source de nutriments. Cependant, la modification drastique des conditions environnementales à la surface de celui-ci, sous l'influence du métabolisme microbien, est susceptible d'induire une accélération de sa dégradation.

Les procaryotes généralement associés aux processus de biocorrosion des aciers sont impliqués dans les cycles du soufre et du fer : ils utilisent comme accepteur terminal d'électrons un composé dérivé du soufre ou du fer. Les principaux groupes issus de ces métabolismes sont les bactéries sulfato-réductrices (BSR), sulfo-oxydantes (BSO), ferri-réductrices (BFR) et ferro-oxydantes (BFO).

Les BSR sont les micro-organismes les plus fréquemment invoqués dans les phénomènes de biocorrosion des aciers (Bermont-Bouis et al., 2007 ; Langumier et al., 2009 ; Pineau et al., 2008), les bactéries du genre *Desulfovibrio* étant les mieux décrites (Langumier

et al., 2011). Leur métabolisme énergétique est assuré par la réaction d'oxydation d'un substrat généralement organique (lactate, pyruvate, etc...) couplée à la réduction du sulfate, le sulfate jouant le rôle d'accepteur terminal d'électrons lors de la respiration anaérobie. Les ions sulfure, ainsi générés, précipitent avec les ions ferreux en sulfures de fer. De même, les bactéries thiosulfato-réductrices (BTR) ont la capacité de réduire le thiosulfate et de générer des sulfures. Plusieurs micro-organismes fermentaires anaérobies stricts mésophiles et thermophiles appartenant aux genres *Thermotoga*, *Thermosipho* et *Fevidobacterium* sont ainsi capables de réduire le thiosulfate (Widdel, 1988 ; Ravot et al., 1995 ; Magot et al., 1997). Les micro-organismes sulfo-oxydants comprennent des bactéries chimiolithotrophes (qui tirent leur énergie de l'oxydation d'un substrat minéral) et des bactéries photosynthétiques (qui utilisent la lumière comme source initiale d'énergie). Ces deux groupes bactériens ont pour particularité d'assimiler le carbone du CO<sub>2</sub> (source de carbone) tout en oxydant des composés minéraux tels que les sulfures, le soufre élémentaire, le thiosulfate ou le sulfite, afin de générer de l'énergie.

Les BFO sont capables d'oxyder le fer ferreux en fer ferrique pour obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance. Elles sont retrouvées dans des environnements variés. Les plus connues appartiennent aux genres *Acidithiobacillus*, *Acidiphilium* et *Leptospirillum* (Duongruitai et al., 2006). Les BFR utilisent le Fe<sup>III</sup> comme accepteur d'électron pour leur respiration (Sigeo, 2005). Elles peuvent être aéroanaérobies facultatives ou anaérobies strictes. Les bactéries les plus décrites appartiennent aux  $\delta$ -*Proteobacteria* telles que *Geobacter*, *Desulfuromonas* et *Pelobacter*. Certaines bactéries appartenant au  $\gamma$ -*Proteobacteria* telles que *Shewanella* et *Geovibrio ferrireducens* sont aussi affiliées aux BFR (Caccavo et al., 1996).

Les communautés bactériennes au sein des biofilms sur acier en milieu marin sont très diverses mais elles ont été jusqu'à présent très peu étudiées. L'identification précise des espèces impliquées dans ces différents phénomènes est un préalable indispensable à la mise en place de stratégies de lutte contre ces biofilms.

L'abondance bactérienne au sein des biofilms formés sur des coupons d'acier immergés durant quelques semaines à une année, dans différents ports français, a été évaluée (Pineau, 2006 ; Lanneluc et al., 2015). Quels que soient le site et le temps d'immersion, une abondance bactérienne importante a été observée (10<sup>7</sup> à 10<sup>9</sup> bactéries/g de biofilm sec). Dans les couches très épaisses (7-8 mm) de biofilm composite recouvrant l'acier après 11 ans d'immersion, une très forte abondance bactérienne a été observée dans les strates externe et

médiane de ce biofilm (jusqu'à  $2.10^{10}$  bactéries/g de biofilm sec) tandis que la concentration en bactéries s'est avérée particulièrement faible dans la strate interne (Langumier et al., 2011). Il est probable que les conditions environnementales plus extrêmes de cette strate interne en contact avec le métal (conditions anoxiques, pH modifié, concentrations plus élevées en éléments métalliques et éléments traces...) ont limité fortement le développement des bactéries. De plus, l'apport en nutriments provenant de l'environnement extérieur doit être extrêmement restreint car ceux-ci sont probablement consommés au sein des couches externes et médianes. Un dénombrement des bactéries des mêmes échantillons après culture sur un milieu solide riche, en conditions aérobies ou anaérobies, montre que seule une très faible fraction des bactéries est cultivable (entre 0,01 et 1,8%) (Pineau, 2006 ; Langumier et al., 2011 ; Lanneluc et al., 2015). Cette faible capacité à cultiver en laboratoire des bactéries marines fausse l'image que l'on peut avoir des communautés bactériennes présentes.



---

### **III. Les interactions entre microorganismes au sein des biofilms marins**

---

Les biofilms marins doivent être considérés comme des systèmes complexes et non seulement comme la somme des espèces microbiennes présentes, parce que les microorganismes interagissent et se développent de manière inter-dépendante. Au sein des biofilms multi-espèces se produisent de nombreuses interactions, compétitions et coopérations complexes entre les différents microorganismes. Ces interactions sont encore mal comprises. Les bactéries et les diatomées constituent les composantes principales des biofilms qui se forment dans le milieu marin (Salta et al., 2013). Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les interactions cellulaires rencontrées parmi ces deux groupes importants de microorganismes marins.

#### **III.1 La communication entre microorganismes**

##### **III.1.1 Le Quorum Sensing chez les bactéries**

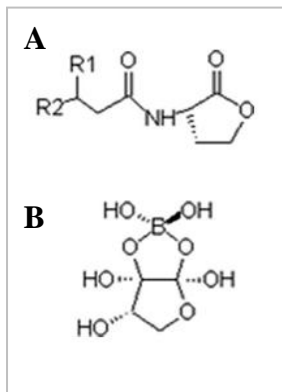
Les interactions entre bactéries de biofilms marins ont été essentiellement étudiées au travers des communications entre cellules au sein de biofilms mono-espèces ou bi-espèces, par le biais du « quorum sensing » (QS) (Pasmore & Costerton, 2003 ; Antonova & Hammer, 2011 ; Nagar et al., 2015). En effet, des molécules de communication intra et interspécifique sont connues pour jouer un rôle dans la régulation des processus d'adhésion et de formation des biofilms (Hammer & Bassler, 2003 ; Waters & Bassler, 2005 ; Dobretsov et al., 2009). Ce système de communication cellulaire, découvert à l'origine sur des bactéries marines, dépend de la densité cellulaire. Les bactéries produisent des signaux qui s'accumulent dans le milieu extracellulaire jusqu'à atteindre un seuil de détection. La détection de ces signaux conduit à des changements dans l'expression des gènes (Waters & Bassler, 2005). L'augmentation du nombre de cellules d'une espèce donnée peut donc induire une modification métabolique ou physiologique de cette population, telle que la motilité (déplacement des cellules vers une zone plus propice à leur développement), la virulence (production de toxines par exemple), ou encore la sporulation (processus de survie dans l'attente de conditions plus propices). Il a été montré notamment que ce système de communication aide à modifier le comportement des cellules planctoniques lors de leur passage à la vie sédentaire (Sauer et al., 2002). Les bactéries pathogènes expriment une faible virulence pendant les premiers stades de l'infection jusqu'à atteindre un nombre seuil de

cellules déclenchant l'expression de certains gènes de virulence (Dong et al., 2007, Nagar et al., 2015). Le QS joue donc un rôle important dans la pathogénicité de plusieurs bactéries. Chez les bactéries marines, les signaux du QS régulent la bioluminescence, la formation de biofilms, la virulence et la production d'antibiotiques (Tableau 4).

**Tableau 4 : Rôles des signaux du quorum sensing**

Signaux du QS	Bactéries cibles	Fonctions régulées	Références
<b>N-acyl homosérine lactones (N-acyl HSL ou AHL)</b>			
<b>C<sub>4</sub>-HSL</b>	<i>Aeromonas hydrophyla</i> ,	Formation de biofilm et production d'enzymes	Swift et al., 1999
<b>C<sub>6</sub>-HSL</b>	<i>A. salmonicida</i>		
<b>C<sub>4</sub>-HSL</b>	<i>Pseudomonas</i> <i>Aeruginosa</i>	Adhésion et maturation du biofilm	Waters & Bassler, 2005
<b>3-OH-C<sub>4</sub>-HSL</b>	<i>Vibrio harveyi</i>	Bio-luminescence et formation de biofilm	Waters & Bassler, 2005
<b>C<sub>4</sub>-HSL</b>	<i>Serratia marcescens</i>	Swarming	Miller & Bassler, 2001
<b>Peptides auto-inducteurs (AI)</b>			
<b>Thiolactone cyclique</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Virulence	Zhang & Dong, 2004
<b>γ-butyrolactones</b> <b>γ-butyrolactone</b>	<i>Streptomyces griseus</i>	Biosynthèse d'antibiotiques	Waters & Bassler, 2005
<b>Furanosyle borate diester</b>	<i>Vibrio harveyi</i>	Luminescence	Chen et al., 2002
<b>CAI-1 non identifié</b>	<i>Vibrio harveyi</i>	Virulence	Miller et al., 2002
<b>Acides</b>			
<b>Cys-11-méthyl-2-acide dodécénoïque</b>	<i>Xanthomonas</i> <i>Campestris</i>	Virulence	Zhang & Dong, 2004

Les molécules signaux du QS sont nombreuses (quelques exemples sont présentés dans le tableau 4). La majorité des bactéries utilise des peptides auto-inducteurs (type AI), dont la taille est très variable (de 5 à plusieurs dizaines d'acides aminés). On trouve aussi des N-acyl homosérine lactones (AHL) chez la plupart des bactéries. Chez les bactéries à Gram négatif, les plus étudiées sont les N-acyl homosérines lactones se liant spécifiquement aux récepteurs cytoplasmiques LuxR, qui sont retrouvées dans plus de 70 espèces (Fuqua et al., 2001 ; Whitehead et al., 2001) (figure 15).

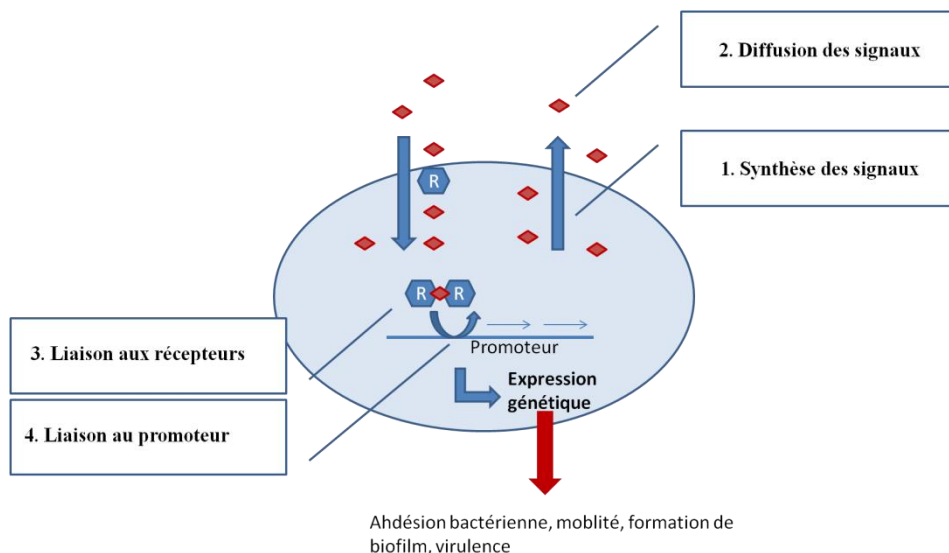


**Figure 15 : Structure de molécules signales produites par les bactéries Gram négatives (Dobretsov et al., 2009)**

**A : Homosérine lactone**

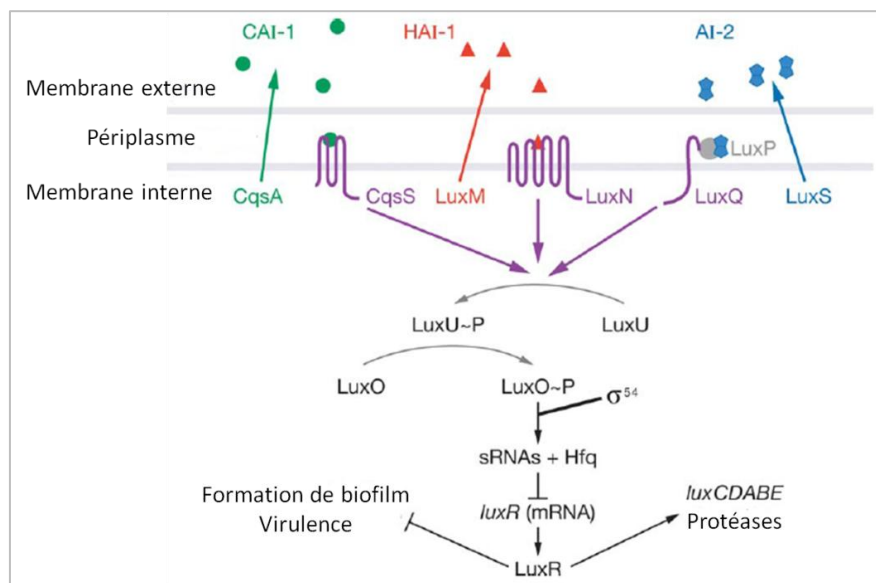
**B : Furanosyle borate AI-2**

Les AHL diffèrent dans la longueur, le degré de saturation et la substitution de la partie acyle. Une fois synthétisées, elles sont transportées en dehors des cellules soit par diffusion (AHL à chaînes courtes), soit par transport actif (AHL à chaînes longues), et sont par la suite internalisées dans les cellules voisines en utilisant les mêmes modes de transport (Figure 16). Lorsque la concentration extracellulaire atteint le seuil de détection, ces molécules se lient aux récepteurs cytoplasmiques de type LuxR, conduisant à la formation de dimères. Ce complexe se lie à des régions spécifiques (type *lux*) au sein de séquences promotrices et active la transcription des gènes responsables de la luminescence, la formation de biofilm et la virulence (Figure 16).



**Figure 16 : Schéma représentatif de la détection des signaux du quorum sensing (AHL) chez les bactéries Gram négatives**

Dans un biofilm hétérogène, certaines bactéries, pour se différencier, reconnaissent uniquement certaines molécules du QS, tandis que d'autres espèces peuvent répondre à divers signaux. Le QS de *Vibrio harveyi* se compose de trois auto-inducteurs et trois récepteurs apparentés fonctionnant en parallèle (Figure 17). *V. harveyi* produit un signal AHL, classiquement produit par les Gram-négatives, appelé HAI-1 (3 OH-C<sub>4</sub>-homosérine lactone, Tableau 4). HAI-1 se lie à un récepteur histidine kinase lié à la membrane (LuxN). Le deuxième signal est un furanosyle diester borate connu comme AI-2 (Tableau 4 ; Figure 15 B). AI-2 se lie avec la protéine LuxP dans le périplasm. Le complexe interagit avec un capteur histidine kinase lié à la membrane, LuxQ. Le troisième signal est une molécule non identifiée appelée CAI-1, produite par l'enzyme CqsA, qui interagit avec un capteur histidine kinase lié à la membrane, CqsS (Henke & Bassler, 2004). Les liaisons des AHL catalysent des cascades de transphosphorylation qui régulent l'expression des gènes par la production de petites molécules d'ARN.

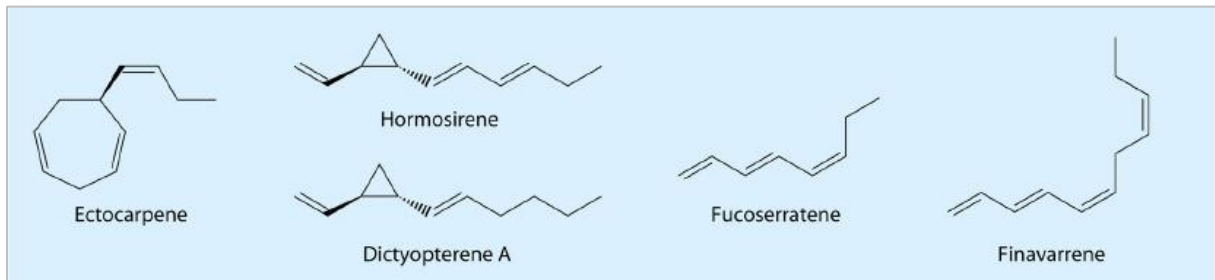


**Figure 17 : Le quorum sensing chez *Vibrio harveyi* (Waters & Bassler, 2006)**

### III.1.2 La signalisation chez les diatomées

Contrairement au quorum sensing chez les bactéries, la communication cellulaire entre les diatomées est encore mal décrite. Les phéromones sont définies comme étant les composés qui coordonnent les interactions entre individus de la même espèce (Karlson & Luscher, 1959). Elles présentent des similitudes de modes d'action avec le QS. En effet, la plupart des phéromones, tout comme les AHL, sont des molécules hydrophobes à base de lipides qui

peuvent traverser la membrane cellulaire sans la nécessité d'un récepteur et coordonnent l'expression des gènes. Les diatomées marines et d'eau douce produisent des hydrocarbures C<sub>8</sub> et C<sub>11</sub> (Figure 18). Ainsi par exemple, *Gomphonema parvulum* produit des homosirenes, des dictyopterines A, et des finavarrenes (Pohnert et al., 1996). *Asterionella formosa* produit des fucoserratenes (Hombeck & Boland, 1998), et *Skeletonema* produit des ectocarpenes (Derenbach et al., 1986) (Figure 18).



**Figure 18 : Les phéromones produites par les diatomées (Amin et al., 2012)**

Un autre mécanisme de signalisation supplémentaire a été découvert chez les diatomées. Initialement observé chez les plantes, l'oxyde nitrique (NO) est considéré comme une molécule signal chez les diatomées. En conditions de stress, le niveau intracellulaire de NO augmente. Vardi et coll. (2006) ont montré l'activation de la production du NO par des dérivés aldéhydes (2E,4E/Z)-décadiénel (DD) chez les deux espèces *Thalassiosira weissflogii* et *Phaeodactylum tricornutum*. La production des DD et d'autres aldéhydes polyinsaturés sont impliqués dans le processus de défense chimique contre les prédateurs (Wichard et al., 2007).

### III.1.3 La communication entre les bactéries et les diatomées

Les diatomées et les bactéries cohabitent depuis plus de 200 millions d'années. Cette cohabitation a favorisé les interactions entre ces deux espèces.

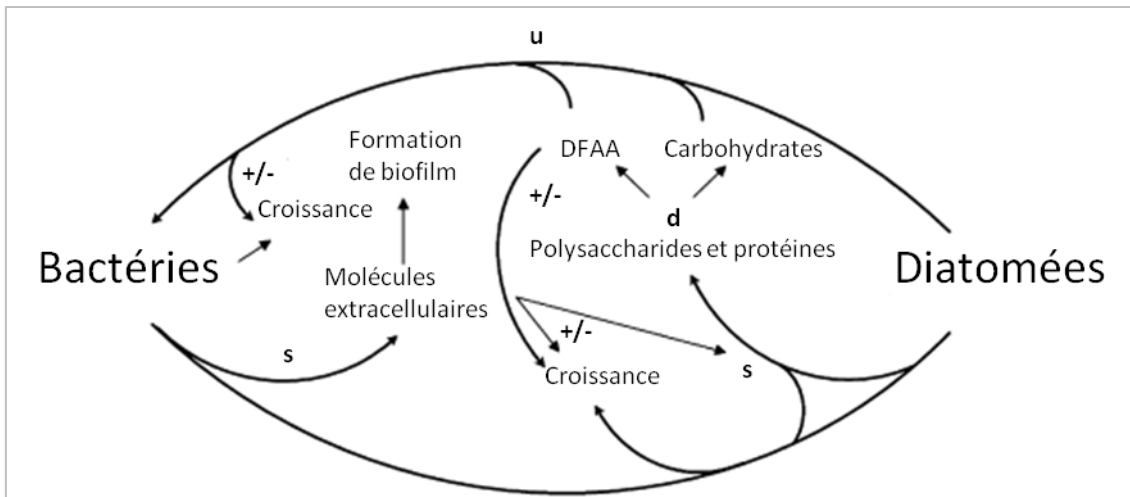
Plus de 5% du génome des diatomées sont supposés être des gènes dérivés des bactéries (Armbrust et al., 2004 ; Bowler et al., 2008). Par exemple, la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* a acquis 784 gènes bactériens qui sont impliqués principalement dans l'utilisation de l'azote et du carbone organique, dans l'assemblage des parois cellulaires

et dans la recombinaison génétique (Bowler et al., 2008 ; Allen et al., 2011). Ce phénomène de transfert de gènes montre que les bactéries et les diatomées ont développé des interactions inter-espèces spécifiques (Amin et al., 2012). De plus, la phycosphère définit la zone autour des microalgues dans laquelle la croissance bactérienne est stimulée par les produits extracellulaires des algues (Bell & Mitchell, 1972). Il s'agit de l'analogie aquatique de la rhizosphère terrestre dans laquelle des interactions spécifiques entre diatomées et bactéries s'établissent.

La bactérie bioluminescente *Vibrio fischeri* colonise certains animaux marins tels que le calmar suite à la sécrétion de NO (Wang, 2010). Le NO est perçu par le gène bactérien *hnox*, qui code pour une protéine de liaison de NO et/ou de l'oxygène. Cette protéine, en plus de la détection du NO généré par l'hôte, régule l'utilisation du fer par la bactérie dans un environnement limité en fer au cours des premiers stades de colonisation (Wang, 2010). La capacité des bactéries à détecter des composés d'origine animale ou végétale suggère que les bactéries marines associées à des diatomées devraient être capables de détecter des phéromones ou des molécules de signalisation excrétées (Amin et al., 2012). Ainsi, ces phéromones ou d'autres molécules signales des diatomées pourraient avoir un double rôle. Par exemple, dans des conditions de stress, le NO libéré par les diatomées dans la phycosphère peut attirer des bactéries algicides capables de détecter le NO et qui attaquent ces cellules stressées ou mourantes. Dans des conditions non stressantes, le NO libéré peut agir comme un signal pour les bactéries synergiques et un agent antimicrobien pour les bactéries qui ne peuvent pas le dégrader (Amin et al., 2012).

### **III.2 Autres interactions entre bactéries et diatomées**

La présence d'espèces bactériennes spécifiques dans la phycosphère de diatomées suggère que ces bactéries sont capables de reconnaître et/ou d'utiliser les exoproduits de diatomées (Amin et al., 2012). Ces facteurs chimiques excrétés jouent un rôle important dans les interactions inter-espèces (Figure 19).



**Figure 19 : Modèle hypothétique des interactions entre bactéries et diatomées au cours de la formation du biofilm (Bruckner et al., 2011)**

+ : induction ; - : inhibition ; d : dégradation ; s : sécrétion ; u : utilisation. DFAA : acides aminés libres dissous

### III.2.1 Synergie entre bactéries et diatomées

Plusieurs molécules, décrites dans la littérature, sont impliquées dans l'établissement d'une relation synergique entre les bactéries et les diatomées (Tableau 5). L'implication des vitamines dans les interactions bactéries/diatomées a été très étudiée. Les bactéries produisent des vitamines nécessaires à la croissance des micro-algues. Ohwada et coll. (1972,1973) ont montré l'existence d'une corrélation entre l'absence de vitamines et le ralentissement de la croissance des diatomées. Les vitamines produites par les bactéries sont hydrosolubles, ce qui permet aux diatomées de les assimiler rapidement avant qu'elles ne diffusent en dehors de la phycosphère.

Le fer est un micro nutriment indispensable au développement des microorganismes. Les bactéries marines du genre *Vibrio* sp. et *Marinobacter* sp. produisent des sidérophores capables de chélater le fer afin de pouvoir ensuite l'assimiler. Ces bactéries transforment ainsi le fer oxydé en forme réduite également assimilable par les diatomées (Yamamoto et al., 1994 ; Amin et al., 2007). Plusieurs espèces de diatomées du genre *Pseudonitzschia* produisent des acides domoïques (DA). Les DA sont capables de chélater le fer et le cuivre (Hampson et al., 1992). La production extracellulaire de DA augmente quand le milieu est appauvri en fer et en cuivre (Maldonado et al., 2002 ; Wells et al., 2005). Pour garantir une biodisponibilité

des ions (fer et cuivre), certaines bactéries sont capables de dégrader les DA produits par les diatomées (Hagstrom et al., 2007).

Les composés organiques produits par les diatomées jouent un rôle important dans la sélection des bactéries hétérotrophes dans la phycosphère (Haynes et al., 2007). Le glycolate est par exemple une petite molécule (C<sub>2</sub>) organique soluble sécrétée par les diatomées phototrophes pour attirer les bactéries.

**Tableau 5 : Les molécules impliquées dans la synergie entre diatomées et bactéries**

<b>Molécules</b>	<b>Rôles</b>	<b>Références</b>
<b>Les vitamines</b>		
<b>Cobalamine = B<sub>12</sub></b>	Co-facteur des méthionine synthétases (MetE) Croissance des diatomées	Amin et al., 2012 Haines & Guillard, 1974 ; Croft et al., 2005
<b>B<sub>1</sub></b>	Croissance des diatomées	Tang et al., 2010
<b>B<sub>7</sub></b>	Croissance des diatomées	Tang et al., 2010
<b>Le fer</b>		
<b>Fer</b>	Nécessaire à la croissance des bactéries et des diatomées	Yamamoto et al., 1994 ; Amin et al., 2007
<b>Cuivre</b>	Nécessaire à la croissance des bactéries et des diatomées	Hampson et al., 1992
<b>Les composés organiques dissous</b>		
<b>Glycolate</b>	Sélection des bactéries dans la phycosphère	Haynes et al., 2007

Plusieurs études ont montré grâce à des co-cultures ou via les surnageants de culture les effets des bactéries sur la croissance des diatomées et la formation de biofilm (Grossart et al., 2003 ; Croft et al., 2005 ; Amin et al., 2012 ; Windler et al., 2015). De la même manière la croissance bactérienne est stimulée par les produits extracellulaires organiques produits par les diatomées (Bellinger et al., 2009). Ce sujet est traité en profondeur dans l'article IV.



### III.2.2 Inhibition des diatomées et des bactéries

#### a. Activités anti-diatomées des bactéries

Les interactions entre les bactéries et les diatomées ne sont pas toujours bénéfiques aux deux parties. Les bactéries peuvent produire des composés qui inhibent ou stoppent la croissance des diatomées et inversement. La bactérie *Kordia algicida* produit une protéase (>30KDa) active contre la croissance des diatomées *Skeletonema*, *Thalassiosira* et *Phaeodactylum*. La sécrétion de cette protéase est régulée par le QS (Paul & Pohnert, 2011). D'autres molécules anti-diatomées s'attachent directement sur la membrane des diatomées pour les lyser. La bactérie marine *Saprospira* sp. a le pouvoir de lyser les cellules de *Chaetoceros ceratosporum* par contact direct (Furusawa et al., 2003).

#### b. Activités antibactériennes des diatomées

Les diatomées ont développé des mécanismes de défense contre les bactéries indésirables. Elles sécrètent des acides gras et des esters qui agissent comme des produits antibactériens (Lebeau & Robert, 2003). Ces molécules hydrophobes restent accrochées à la surface des diatomées pour éviter l'adhésion bactérienne. La diatomée *Navicula delognei* produit trois produits antibactériens, les acides gras hexadécatétraénoïque et octadécatétraénoïque et l'ester (E)-phytol contre les pathogènes *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris* et *Salmonella enterica*.

#### c. Compétition pour les nutriments entre diatomées et bactéries

Dans les océans, la croissance du phytoplancton est limitée par la biodisponibilité des macronutriments comme l'azote et le phosphore et par les micronutriments comme le fer. La croissance bactérienne est aussi régulée par ces nutriments et par la source de carbone. A des concentrations faibles en phosphate, la croissance de la diatomée *Cylindrotheca fusiformis* est ralentie. En co-culture avec des bactéries, la croissance de la diatomée est stoppée, suggérant que les bactéries assimilent plus vite le phosphore (Guerrini et al., 1998).

---

## IV. Stratégies de lutte contre les biofilms

---

Pour des raisons de forte toxicité, l'utilisation de biocides anti-fouling tel que le triorganostannique a été interdite, ce qui a souligné la nécessité de développer de nouvelles stratégies antibiofilm plus respectueuses de l'environnement (Qian et al., 2010). La plupart des composés découverts à ce jour sont des composés isolés à partir d'organismes eucaryotes (Qian et al., 2010). L'inconvénient majeur est la disponibilité limitée de ces molécules. En revanche, les micro-organismes marins présentent un certain nombre d'avantages. D'une part, les cultures en fermenteurs permettent des productions illimitées de biomolécules, et d'autre part, ils sont faciles à manipuler (modification génétique des organismes) (Dobretsov et al., 2006). Les composés produits par les microorganismes marins se sont révélés être des inhibiteurs efficaces de la formation de biofilms. Cette application a été suggérée pour la première fois par Mitchell & Maki en 1988.

Dans ce chapitre sont résumés les principaux modes d'action des produits microbiens antibiofilm (produits par les microorganismes marins essentiellement).

### IV.1 Inhibition de la croissance microbienne par les microorganismes

Certaines molécules ont le pouvoir d'inhiber la formation de biofilm en exerçant une activité anti-croissance.

#### IV.1.1 Exoproduits bactériens

Depuis la découverte des premiers composés antibactériens produits par les bactéries marines *Alteromonas* sp. isolée à partir de l'algue marine *Thalassia* sp., (Fenical, 1993) et *Pseudoalteromonas tunicata* isolée à partir de l'animal marin *Ciona intestinalis* (James et al., 1996), le nombre de nouveaux composés isolés de bactéries marines a considérablement augmenté (Dobretsov et al., 2007). Certains de ces composés sont déjà en essais cliniques pharmacologiques et considérés comme agents de lutte biologique en aquaculture (Blunt et al., 2004). La plupart des métabolites antimicrobiens ont été isolés à partir d'espèces appartenant aux groupes de *Streptomyces*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Roseobacter* et *Bacillus* (tableau 6)

D'après les données actuelles, seuls quelques groupes phylogénétiques de bactéries marines ont la capacité à produire des molécules antibiofilm. La difficulté majeure est la culture des souches marines en conditions de laboratoire. En effet, plus de 99% des bactéries marines sont non-cultivables (Amann et al., 1995 ; Haglund et al., 2002 ; Dobretsov et al., 2007; Lanneluc et al., 2015).

**Tableau 6 : Activité antimicrobienne des bactéries marines hétérotrophes**

Espèces	Sources	Molécules	Modes d'action	Références
<i>Streptomyces griseus</i> SS-20	Vasière de Sagami, Japon	L'aplastomycine	Inhibe la croissance des bactéries Gram-positives : <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>Corynebacterium smegmatis</i>	Hotta et al., 1980
<i>Streptomyces</i> sp. BD 21-2	Sédiments d'eau peu profonde, Plage de Kailua, Hawaï	La bonactine	Inhibe la croissance des bactéries (Gram-positives Gram-négatives) et possède une activité anti-fongique	Schumacher, 2003
<i>Alteromonas aurantia</i> ATCC 33046	Milieu marin (au large de Nice), algues marines : <i>Ulva lactuca</i>	Antibiotiques polyanioniques	Inhibition de la respiration bactérienne de <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gauthier & Breittmayer, 1979
<i>Alteromonas rubra</i>	Milieu marin (au large de Nice), algues marines : <i>Ulva lactuca</i>	Antibiotiques polyanioniques	Inhibition de la respiration bactérienne de <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gauthier, 1976

<b><i>Alteromonas luteoviolacea</i></b>	Milieu marin (au large de Nice), algues marines : <i>Ulva lactuca</i>	Antibiotiques polyanioniques Polysaccharides et protéines	Inhibition de la respiration bactérienne de <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gauthier & Flatau, 1976
<b><i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2</b>	Ascidie <i>Ciona intestinalis</i>	Les protéines AlpP (190 kDa) composées de 2 sous-unités de 60 et 80 kDa, reliées entre par des liaisons non covalentes	Bactériostatique : <i>V. anguillarum</i> , <i>Proteus Vulgaris</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Salmonella typhimurium</i>	James et al., 1996
<b><i>Bacillus pumilus</i> FS55</b>	L'algue brune : <i>Fucus serratus</i>	Molécules antibiotiques	Inhibition de la fixation des bactéries (6,5% de bactéries sensibles pour un spectre de 650 bactéries)	Burgess et al., 2003
<b><i>Bacillus subtilis</i> II-111-5</b>	L'algue rouge : <i>Palmaria palmata</i>			
<b><i>Pseudomonas</i> sp. NUDMB50-11</b>	Le nudibranche <i>Archidoris pseudoargaus</i>	l'acide phénazine-1-carboxylique	Inhibition de la fixation des bactéries (6,5% de bactéries sensibles pour un spectre de 650 bactéries)	Burgess et al., 2003
<b><i>Bacillus licheniformis</i> SAB1</b>	Eponge : <i>Halichondria</i> sp.	Indole, 3-phenylpropionique acid, 4,4'-oxybis (3-phenyl acide propionique)	Antibactérien : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Devi et al., 2010
<b><i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> INH</b>	Pétoncles	Acide isovalérique (3- acide méthylbutanoïque)	Antibactérien : <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051,	Hayashida-Soiza et al., 2008

		) et 2- acide méthylbutyrique (2- acide méthylbutanoïque	<i>Achromobacter</i> <i>sp.</i> IFO13495, <i>Micrococcus</i> <i>Iuteus</i> IFO 3333, <i>Morganella</i> <i>morganii</i> ATCC 25830	
<b><i>Pseudoalteromonas</i> <i>sp.</i> 3J6</b>	Eau de mer	Inconnue	Inhibe la croissance de <i>Vibrio</i> sp. D01 et <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 dans des biofilms multi- espèces	Dheilily et al., 2010
<b><i>Bacillus mojavensis</i> <i>B. firmus</i></b>	Environnement	Des lipopetides : Surfacine A, mycosubtiline, bacillomycine D	<i>Halomonas</i> <i>Marina</i> CCUG16095	Ortega- Morales et al., 2008

Les conditions de culture jouent un rôle important dans la production des composés bioactifs. En effet, *Pseudoalteromonas rubra* et *Pseudoalteromonas luteoviolacea* par exemple, produisent des activités antibactériennes faibles et quasi nulles quand elles sont cultivées sur une gélose nutritive, une gélose contenant du sang ou une gélose de soja, alors que la production est maximale dans le milieu Zobell liquide (Gauthier, 1976).

Certaines bactéries peuvent aussi influencer la croissance d'autres bactéries au sein du même biofilm. En effet, les bactéries « résidentes » peuvent augmenter ou diminuer le recrutement des nouveaux colonisateurs microbiens (Grossart et al., 2003).

Dans les biofilms multi-espèces, les antibiotiques produits par la bactérie *Pseudoalteromonas tunicata* inhibent la croissance des autres souches, jusqu'à ce que ces dernières développent une résistance contre ces antibiotiques ou bien une activité inhibitrice contre la bactérie productrice (Rao et al., 2005).

Plusieurs exoproduits bactériens possèdent des activités contre le développement et l'attachement des larves et des algues en milieu marins (Tableau 7).

Tableau 7 : Activité anti-larvaire et anti-algale des bactéries marines hétérotrophes

Bactéries productrices	Inhibition	Molécules	Référence
<b>Contre les larves</b>			
<i>Alteromonas sp.</i>	Adhésion des balanes : <i>Balanus</i> <i>Amphitrite</i>	Les ubiquinones	Kon-ya et al., 1995
<i>Acinetobacter sp.</i>	Adhésion de <i>B. amphitrite</i>	Le 6-bromoindole-3-carbaldéhyde	Olguin-Urbe et al., 1997
<i>Pseudoalteromonas marina</i>	Adhésion de <i>B. amphitrite</i>	Des molécules de faible poids moléculaire (>500 Da)	Egan et al., 2001
<i>Pseudomonas sp.</i>	Adhésion de <i>B. amphitrite</i>	L'acide Phénazine carboxylique;  L'hydroxy-phenazine;  L'heptylquinol-1;  Le nonylquinol-1;  pyolipique	Burgess et al., 2003
<i>Halomonas (Deleya) marina,</i> <i>Vibrio campbelli</i>	Adhésion de <i>B. amphitrite</i>	Des exopolysaccharides	Maki et al., 2000
<i>Micrococcus sp., Rhodovulum sp. and Vibrio sp.</i>	Adhésion de <i>B. amphitrite</i>	Des polymères extracellulaires	Lau et al., 2003
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Adhésion de <i>B. amphitrite</i>	Des molécules de haut poids moléculaire (>200 kDa)	Qian & Dobretsov, 2002 ; Harder et al., 2004
<i>Vibrio sp.</i>	Développement de <i>Hydroides elegans</i> (ver serpulidé) et de <i>Bugula neritina</i> (bryzoaire arborescent)	Des polysaccharides (>100kDa)	Dobretsov & Qian, 2004

Contre les algues			
<i>Pseudoalteromonas tunicate</i>	Développement d' <i>Ulva lactuca</i>	Des protéines (3-10 kDa)	Egan et al., 2001; 2002
<i>Alteromonas sp.</i>	Croissance de <i>Thalassiosira Weissflogii</i> , <i>Chaetoceros simplex</i> , <i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Le 2-n-pentyl-4-quinolinole	Long et al., 2003

La croissance d'un certain nombre de diatomées et d'autres algues unicellulaires est également inhibée par des bactéries marines. La bactérie *Pseudomonas putida* SK02-HYK0203 inhibe la croissance de la diatomée *Stephanodiscus hantzschii* (Kang et al., 2005). Les lectines produites par la bactérie *Pseudoalteromonas sp.* ont montré une forte capacité à réduire la capacité d'adhésion et de déplacement des diatomées *Amphora coffeaeformis* et *Navicula sp.* (Wigglesworth-Cooksey & Cooksey, 2005).

#### IV.1.2 Exoproduits de diatomées

Les exoproduits de diatomées sont beaucoup moins étudiés que les produits bactériens. La diatomée *Asterionellopsis glacialis* produit des aldéhydes insaturés qui inhibent la croissance de *Vibrio splendidus* et de *Bacillus megaterium* (Adolph et al., 2004). Abreu et coll. (2003) ont montré une corrélation entre la forte abondance de la diatomée *Asterionellopsis glacialis* et la faible abondance bactérienne. *Thalassiosira rotula* produit du décanal qui inhibe la croissance des bactéries *Vibrio splendidus* et *Bacillus megaterium* (Tableau 8). Les aldéhydes produits par les diatomées génèrent des dysfonctionnements physiologiques dans le processus de développement des œufs des copépodes, des larves d'oursins et d'huitres (Romano et al., 2003; Adolph et al., 2004) (Tableau 8).

Tableau 8 : Composés anti-croissance sécrétés par les diatomées marines

Diatomées	Inhibition	Molécule impliquées	Références
<i>Thalassiosira rotula</i> <i>Asterionellopsis glacialis</i>	Croissance de <i>Vibrio splendidus</i> et de <i>Bacillus megaterium</i>	Aldéhydes insaturés : décanales	Adolph et al., 2004
<i>Thalassiosira rotula</i>	Développement des œufs de <i>Sphaerechinus granularis</i> , <i>Crassostrea gigas</i> et de <i>Calanus helgolandicus</i>	Aldéhydes insaturés : 2E,4E-décadiénal, 2E,4E- octadiénal, 5E,7E-9- l'acide oxononadiénoïque, 4Z-décanale; 2E-décanale, décanale	Romano et al., 2003; Adolph et al., 2004
<i>Achnantes parvula</i>	Colonisation de <i>Semibalanus balanoides</i>	Inconnue	Le Tourneux & Bourget, 1988
<i>Amphora tenerrima</i> , <i>Nitzschia frustulum</i>	Colonisation de <i>H. elegans</i>	Inconnue	Harder et al., 2002 ; Lam et al., 2003
<i>Nitzschia frustulum</i>	Adhésion de <i>B. neritina</i>	Inconnue	Dahms et al., 2004

## IV.2 Interférence avec la communication bactérienne

Les biofilms microbiens se forment grâce à un processus de signalisation et de régulation de l'expression des gènes. Ils peuvent être donc perturbés et déstructurés par des molécules qui interfèrent dans ces voies de signalisation.

### IV.2.1 Inactivation des signaux du quorum sensing

La formation du biofilm peut être inhibée par une dégradation enzymatique des signaux impliqués dans la communication (Rajamani et al., 2011 ; Oh et al., 2012). La digestion enzymatique des AHL bactériennes est la piste la plus étudiée dans la dispersion des cellules du biofilm. Certaines bactéries peuvent dégrader les AHL grâce à une combinaison de plusieurs enzymes excrétées (Huang et al., 2003 ; Uroz et al., 2003, 2005).



Les enzymes capables de dégrader les AHL sont les lactone-hydrolases (les lactonases), les acylases et oxydoréductases (Tableau 9). Les lactonases sont les plus étudiées. Il en existe deux familles : les métallo- $\beta$ -lactamases Zn-dépendantes (l'enzyme AiiA inactivant l'autoinducteur de *Bacillus* sp., Dong et al., 2000) et les phosphotriestérases métallo-dépendantes (Uroz et al., 2008). Depuis l'identification de la première enzyme dégradant les AHL, l'AiiA, et le clonage du gène codant pour cette protéine à partir de *Bacillus* sp. 240B1 (Dong et al., 2001), plus de 220 séquences différentes d'AiiA de *Bacillus* sp. ont été déposées dans la base de données du NCBI.

L'AHL-acylase, AiiC, a été isolée et identifiée à partir d'une cyanobactérie filamenteuse fixant l'azote marin *Anabaena* sp. PCC 7120 (Romero et al., 2008). Cette enzyme est produite au cours de la phase exponentielle de croissance, mais disparaît après 24 h. L'enzyme AiiC peut potentiellement être utilisée pour brouiller la signalisation au sein d'un biofilm mixte.

Après l'identification de l'AiiA, l'enzyme et ses diverses formes ont été exprimées dans d'autres bactéries, plantes et algues unicellulaires pour tester leurs applications dans la perturbation de la formation de biofilms. Les bactéries transgéniques exprimant l'AiiA ont également été utilisées en industrie: *E. coli* transgénique micro-encapsulée réduit fortement le phénomène de formation de biofilm sur les membranes des installations des eaux usées (Oh et al., 2012).

**Tableau 9 : Les enzymes qui dégradent les AHL**

Enzyme	Espèce productrice	Référence
<b>AHL-lactonase</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Dong et al., 2002
	<i>Bacillus cereus</i>	
	<i>Bacillus mycoides</i>	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
	<i>Arthrobacter</i> sp.	
<b>AHL-acylase</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	Dong & Zhang, 2005 ; Romero et al., 2008
	<i>Nocardioides</i> sp.	
	<i>Ralstonia</i> sp.	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

#### IV.2.2 Interférence avec le système du quorum sensing

Certaines bactéries produisent des signaux QS qui peuvent interférer avec la signalisation d'autres bactéries (Tableau 10). La production du pigment violacéine par la

bactérie *Chromobacterium violaceum*, induite par une molécule AHL à chaîne courte (C<sub>6</sub>-HSL), est inhibée par une molécule signalé (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) produite par *Pseudomonas aeruginosa* (McLean et al., 1997) (Tableau 10). Cette molécule inhibe aussi la signalisation des bactéries marines pathogènes *Aeromonas hydrophila* et *A. salmonicida* (Swift et al., 1999). *P. aeruginosa* et d'autres bactéries Gram-négatives produisent des dipeptides cycliques qui agissent comme des analogues des molécules d'AHL qui se lient aux récepteurs protéiques des molécules signales (Holden et al., 1999).

**Tableau 10 : Composés naturels marins interférant avec le système du quorum sensing**

Molécules	Espèces productrices	Espèces cibles	Référence
<b>Bactéries</b>			
<b>Des lactones : butenolides et 3- hydroxy-γ- butyrolactones</b>	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Candida albicans</i>	Cho et al., 2001
<b>3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Chromobacterium Violaceum</i> CV026	McLean et al., 1997
<b>Cys-11-méthyl-2-acide dodécénoïque</b>	<i>Xanthomonas campestris</i>	<i>Candida albicans</i>	Zhang & Dong, 2004
<b>Cyanobactéries</b>			
<b>Acide tumonoïque</b>	<i>Blennothrix cantharidosmum</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	Clark et al., 2008
<b>Microalgues</b>			
<b>Lumichrome</b>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rajamani et al., 2008

### IV.3 Perturbation de l'adhésion

#### IV.3.1 Modification des propriétés de surface

Dans la littérature, les polysaccharides sont principalement décrits comme étant d'excellents agents de « coating ». En effet, ils peuvent agir sur les surfaces biotiques et abiotiques.

##### *a. Surfaces abiotiques*

Les biosurfactants et bioémulsifiants ont la capacité de modifier les propriétés physico-chimiques des surfaces en affectant la mouillabilité et l'énergie de la surface. Ces molécules affectent ainsi l'interaction des bactéries avec la surface. Les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Davey et al., 2003) ont un mécanisme d'action de ce type.

Les polysaccharides K2 et Ec300p, produits par *E. coli*, diminuent les énergies de surface et augmentent l'hydrophobicité des surfaces en verre (Valle et al., 2006 ; Rendueles et al., 2011)

Le pré-traitement des surfaces en verre avec le polysaccharide K2 réduit considérablement la formation de biofilm de *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* dans des microfermenteurs (Valle et al., 2006) et le polysaccharide Ec300p inhibe la formation de biofilm de *S. aureus* (Rendueles et al., 2011).

##### *b. Surfaces biotiques*

Les polysaccharides possèdent aussi la capacité de modifier les propriétés de surface des cellules bactériennes. L'hydrophobicité des surfaces des bactéries *E. coli* et *P. fluorescens* diminue quand elles sont cultivées en présence du surnageant de culture de *B. licheniformis* SP1 (Sayem et al., 2011).

L'adhésion et la formation de biofilm d'*E. coli* sur une surface en verre sont inhibées par le polysaccharide K2 (Valle et collal. (2006). Les auteurs ont suggéré dans leur étude que le polysaccharide K2 inhibe l'activité des adhésines (pili, curli et l'adhésine Ag43) impliquées dans l'agrégation des cellules et la formation du biofilm d'*E.coli*.

### IV.3.2 Régulation des facteurs d'adhésion

En analysant le transcriptome de *Lactibacillus acidophilus* A4, Kim et coll. (2009) ont montré que les polysaccharides produits par cette bactérie régulent négativement l'expression des gènes de *E. coli* O157 : H7 impliqués dans la formation de biofilms. Les gènes *crl*, *csgA* et *csgB*, ciblés par les SPE sont nécessaires pour la synthèse de curli impliqués dans l'adhésion et le gène *cheY* code pour des régulateurs de formation de biofilm. L'expression de ces gènes est indispensable pour le maintien de l'architecture du biofilm. Le récepteur d'*E. coli* pour le polysaccharide A4 est encore inconnu (Rendueles et al., 2013).

## IV.4 Destructuration des biofilm formés

### IV.4.1 Enzymes dégradants les polymères de la matrice des biofilms

La matrice extracellulaire des biofilms mono- et multi-espèces est constituée principalement d'un mélange complexe de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (cf paragraphe I.3.1). Les bactéries marines ont la capacité de perturber l'architecture du biofilm en produisant des enzymes capables de dégrader ces composés. Ces effecteurs peuvent être des chitinases, des protéases, des nucléases ou des enzymes dégradant les polysaccharides (Tableau 11).

Le système *agr* de *Staphylococcus aureus* contrôle l'expression d'une protéase extracellulaire qui dégrade les protéines telles que les adhésines (Boles et al., 2008). L' $\alpha$ -amylase isolée à partir de la bactérie marine *Bacillus subtilis* réduit significativement la formation de biofilm de *Vibrio cholera*. En revanche, le même traitement enzymatique n'a pas d'effet sur la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Kalpana et al., 2012). Le traitement de biofilms contenant du poly- $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine par la Dispersine B est efficace pour détacher les biofilms pré-formés de *Staphylococcus epidermidis* (Kaplan et al., 2004).

D'autre part, les nucléases produites par les microorganismes constituant le biofilm ou les nucléases exogènes réduisent considérablement la formation de biofilm (Tableau 11).

**Tableau 11 : Les enzymes qui dégradent les polymères extracellulaires au sein des biofilms**

Enzymes	Organismes producteurs	Modes d'action	Référence
<b>Chitinase</b>	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. S91	Dégradation de la chitine (ChiA et ChiB)	Baty et al., 2000
<b>Nucléase</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Dégradation de l'ADN (thermonucléase)	Mann et al., 2009
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dégradation de l'ADN extracellulaire (DNase exogène)	Whitchurch et al., 2002
<b>Dispersine</b>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Dégradation de l' <i>N</i> -acetylglucosamine	Kaplan et al., 2004
<b>Dispersine B</b>			Manuel et al., 2007
<b>Protéase</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Dégradation des adhésines	Boles & Horswill, 2008
<b>Enzymes qui dégradent les polysaccharides</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	$\alpha$ -amylase	Kalpana et al., 2012

L'utilisation d'enzymes pour éradiquer les biofilms qui causent des problèmes en industrie, dans le domaine marin et dans le domaine médical, est une solution envisageable (Kaplan, 2009). Par conséquent, une meilleure compréhension des activités enzymatiques est nécessaire. Leroy et coll. (2008) ont étudié l'effet des enzymes commerciales sur l'adhésion des bactéries pionnières dans les biofilms marins. Des hydrolases de type protéases, glycosides et lipases ont été utilisées. Dans le cas de *Pseudoalteromonas* sp., les protéases, et plus précisément les savinases, ont montré une forte capacité à inhiber l'adhésion, tandis que les amylases, les pectinases, les cellulases et les xylanases n'ont pas affecté l'adhésion et la formation du biofilm. Ces travaux montrent que les protéines jouent un rôle essentiel dans l'adhésion et la formation de biofilm. La savinase peut soit cibler les protéines libres situées dans la matrice soit les protéines liées à membrane externe de la bactérie.

#### IV.4.2 Les polysaccharides

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans le détachement ou la dispersion du biofilm. Jiang et coll. (2011) ont réussi à isoler et à identifier un polysaccharide de 546 KDa, nommé A101. Ce polysaccharide a montré une activité inhibitrice sur les biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* suggérant ainsi des applications thérapeutiques intéressantes (Jiang et al., 2011).

L'exopolysaccharide PAM galactan produit par *Kingella kingae* possède également la capacité de disperser les cellules du biofilm de *Staphylococcus aureus* (Bendaoud, 2011). Les exopolysaccharides Pel et Psl, produits par *Pseudomonas aeruginosa*, possèdent une activité inhibitrice contre le biofilm mature de *Staphylococcus epidermidis* (Qin et al., 2009). Psl est un pentasaccharide composé de D-mannose, D-glucose et de L-rhamnose (Byrd et al., 2009). Pel est un polysaccharide riche en molécules de glucose dont la structure exacte est encore méconnue (Colvin et al., 2011).

#### IV.4.3 Les bactéries nageuses ou « swimmers »

Houry et coll. (2012) ont examiné les conséquences du mouvement de la bactérie mobile *Bacillus thuringiensis* 407 dans le biofilm de *Staphylococcus aureus*. Ces bactéries se créent des chemins dans la matrice extracellulaire générant ainsi des espaces (pores) vides. Ces pores peuvent jouer un rôle positif en améliorant l'acheminement des nutriments aux communautés microbiennes, comme ils peuvent au contraire jouer un rôle négatif en déstructurant la matrice du biofilm et par conséquent affaiblir le biofilm.

---

### V. Objectifs de l'étude

---

Pour former des biofilms en milieu marin, les bactéries et les microalgues peuvent agir en synergie ou entrer en compétition. Les présents travaux visent à caractériser les interactions (positives et négatives) entre ces microorganismes au sein de deux modèles de biofilms marins et à identifier les molécules naturelles impliquées.

Dans cette optique, ce projet s'est articulé autour de trois axes principaux (figure 20).

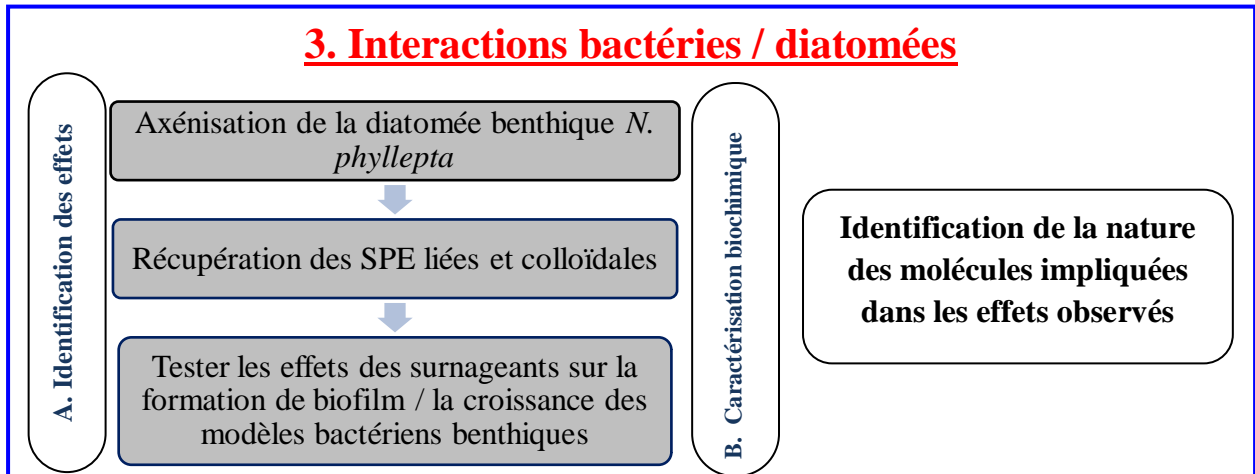
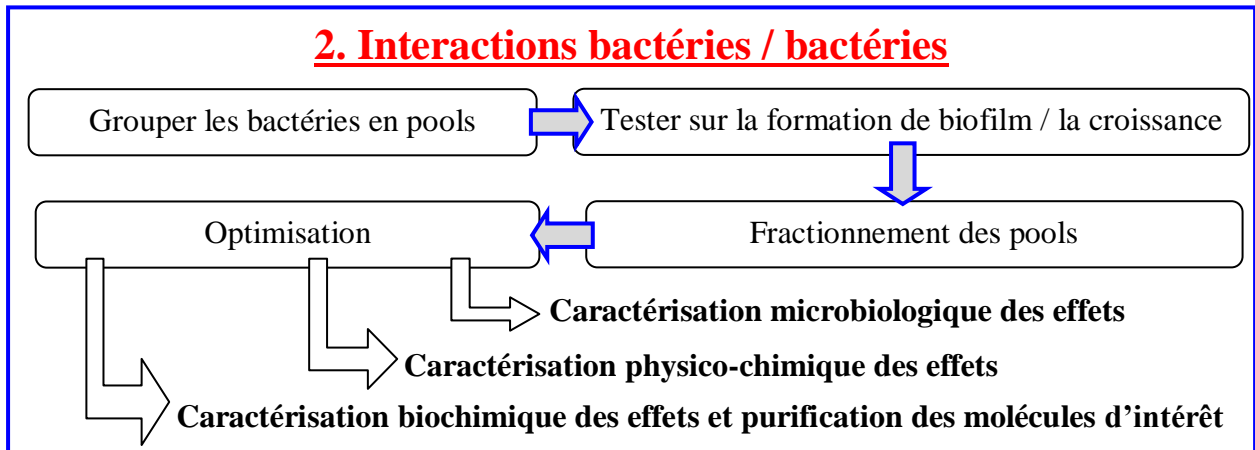
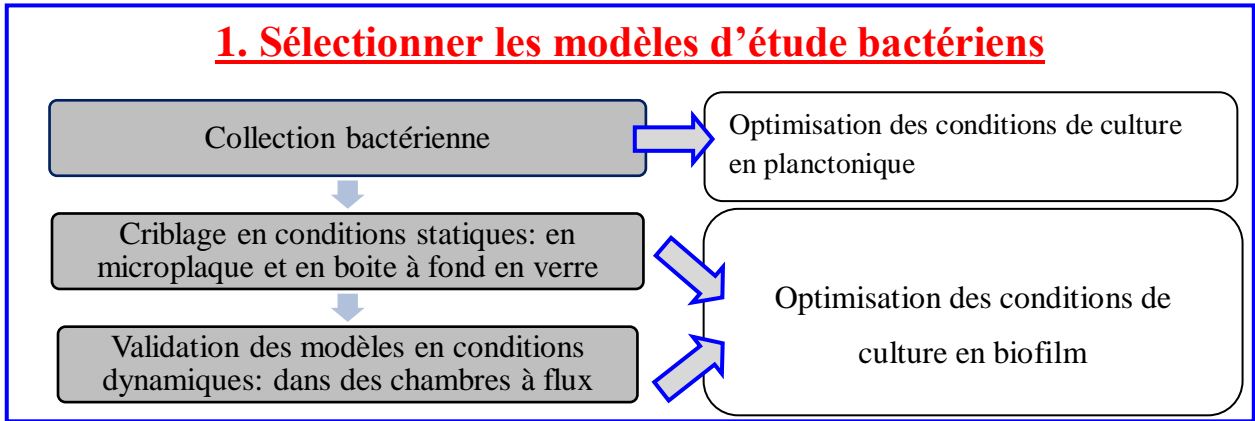
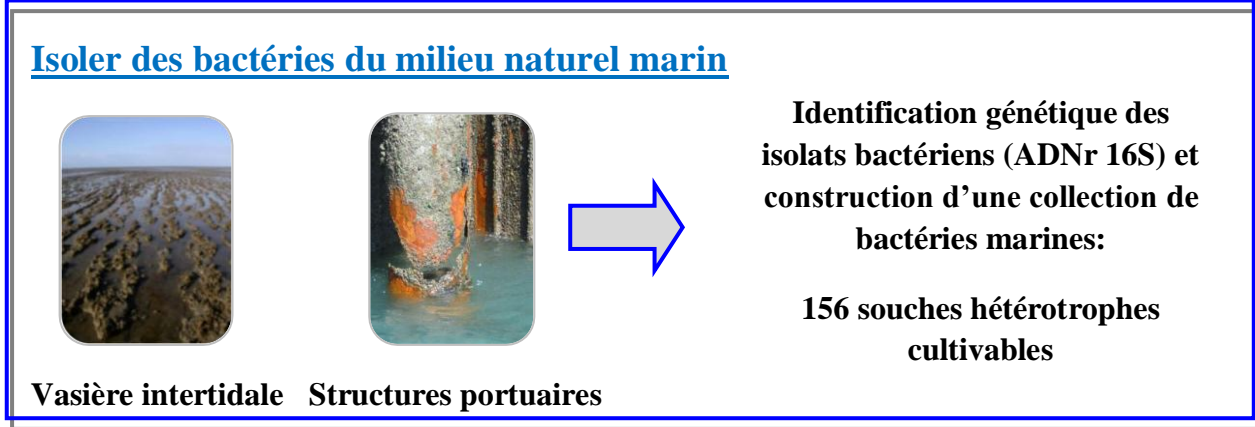


Figure 20 : Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale utilisée lors de ce projet

### **Sélection de modèles microbiens**

---

Au laboratoire LIENSs, une large gamme de bactéries hétérotrophes cultivables (156) a été isolée des deux modèles de biofilms : un biofilm benthique, non permanent, formé sur la vasière intertidale de Brouage, et un biofilm permanent, formé sur acier dans le port de plaisance de La Rochelle. Ces bactéries, identifiées par séquençage de l'ADNr 16S, ont constitué la collection de bactéries marines utilisée aux cours de ces travaux. L'objectif dans ce premier volet de thèse était de sélectionner, si possible à partir de chaque modèle de biofilm, des souches bactériennes aptes à former des biofilms stables, aussi bien en conditions statiques qu'en conditions dynamiques.

### **Interactions bactéries / bactéries**

---

Le but de ce deuxième volet était d'étudier les interactions bactériennes pouvant se produire au sein d'un même biofilm. Un premier objectif était donc de sélectionner, pour chacun des deux modèles de biofilm, des bactéries de la collection dont le sécrétome avait un effet (positif ou négatif) sur la formation des biofilms des bactéries sélectionnées lors du premier volet de l'étude. Le deuxième objectif était de caractériser l'effet des sécrétomes actifs et d'identifier les molécules responsables de ces activités. Dans l'objectif d'applications futures potentielles, leur spectre d'activité a été évalué.

### **Interactions bactéries / microalgues**

---

Dans cette dernière partie, des interactions bactéries / microalgues pouvant se produire dans le biofilm benthique naturel ont été étudiées. Le but de ce travail était d'évaluer l'effet potentiel de microalgues sur les biofilms bactériens sélectionnés dans le premier volet de la thèse. Il s'agissait donc tout d'abord de sélectionner une microalgue cultivable caractéristique du biofilm de la vasière intertidale (une diatomée), afin d'étudier l'effet de son sécrétome sur la formation de biofilms des bactéries benthiques modèles. Pour réaliser cette étude, il fallait répondre à un deuxième objectif, qui était d'axéniser cette culture de diatomées, afin d'obtenir un sécrétome microalgal non contaminé par les sécrétomes des bactéries satellites. Enfin, un dernier objectif était de caractériser l'activité du sécrétome microalgal et la nature biochimique de la molécule active.





***Partie I : Sélection des  
modèles microbiens***

---

Peu d'études ont rapporté la composition des communautés bactériennes dans les biofilms marins naturels formés sur les surfaces biotiques et abiotiques. Le rôle des colonisateurs primaires dit microorganismes "pionniers" dans la formation des biofilms est encore très conceptuel. Le but de ce premier chapitre était d'obtenir des souches bactériennes présentant de fortes capacités à former des biofilms, potentiellement pionnières. Les souches bactériennes proviennent de la collection de bactéries marines isolées à partir des deux biofilms constituant nos modèles d'études. Le premier modèle est un biofilm benthique non permanent échantillonné à partir d'une vasière intertidale, qui joue un rôle central dans le réseau trophique alimentant de nombreuses espèces animales. Les connaissances actuelles sur la structure ainsi que le fonctionnement de ce biofilm est en grande partie théorique. Le biofilm permanent formé sur des structures métalliques immergées dans le port de plaisance de La Rochelle constitue notre second modèle d'étude. Ce biofilm est impliqué dans les premières étapes du phénomène de biocorrosion (Lanneluc et al., 2015), pouvant causer de grands dommages aux infrastructures portuaires et entraîner des pertes économiques importantes. La compréhension des étapes initiales de l'adhésion est donc primordiale pour mieux comprendre et expliquer la formation des biofilms qui peuvent causer des nuisances aux activités industrielles maritimes.

Une collection de 156 bactéries marines hétérotrophes aérobies isolées à partir des deux biofilms naturels a été criblée pour la capacité des bactéries à former des biofilms en microplaque (en polystyrène). Ce protocole a nécessité certaines optimisations pour s'approcher des conditions optimales de croissance et de dosage. Plusieurs paramètres ont été testés :

- Le type de microplaques : fond plat ou fond rond ;
- Les milieux de culture : VNSS, Marine Broth, LB, Zobell ;
- Le temps de formation des biofilms : 24h ou 48h ;
- La concentration du cristal violet : 0,1% ou 0,5% ou 0,8% ou 1% ;

Sur les 25 souches capables de former des biofilms dans ces conditions, seuls quatre bactéries forment un biofilm épais et stable sur des surfaces en verre dans des conditions dynamiques. Observés par microscopie confocale laser à balayage, ces souches forment des

biofilms avec des architectures tridimensionnelles (3D) distinctes : le biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 s'organise sous forme de protubérances comparables à des champignons, le biofilm de *Roseobacter* sp. IV3009 est très homogène et régulier, le biofilm de *Shewanella* sp. IV3014 présente une forme hirsute avec des fibres horizontales, alors que *Roseovarius* sp. VA014 développe un biofilm hétérogène et échevelé.

Ce travail a permis d'obtenir des bactéries marines capables d'adhérer à deux surfaces différentes (polystyrène et verre), dans des conditions à la fois statiques et dynamiques, et à construire des biofilms avec des architectures 3D spécifiques en conditions dynamiques sur verre. Les quatre souches sélectionnées serviront de modèles pour l'étude des interactions qui peuvent se produire entre les microorganismes dans un biofilm marin.

**Les résultats obtenus font l'objet d'un premier article soumis dans «BMC Microbiology», 2015.**

**A/ Article I: Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm abilities and different biofilm 3D architectures**

**Submitted in “BMC Microbiology”**

**Ibtissem Doghri**<sup>1</sup>, Sophie Rodrigues<sup>2</sup>, Alexis Bazire<sup>2</sup>, Alain Dufour<sup>2</sup>, David Akbar<sup>1</sup>, Valérie Sopena<sup>1</sup>, Isabelle Lanneluc<sup>1,\*</sup>, Sophie Sablé<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. La Rochelle, UMR 7266 CNRS, LIENSs, Bât. Marie Curie, Av. Michel Crépeau, F-17042 La Rochelle cedex 01, France.

<sup>2</sup> Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France.

\* The two authors contributed equally to this work

## Abstract

### Background

Few studies have reported the species composition of bacterial communities in marine biofilms formed on natural or on man-made existing structures. In particular, the roles and surface specificities of primary colonizers are largely unknown for most surface types. The aim of this study was to obtain potentially pioneering bacterial strains with high forming-biofilm abilities from two kinds of marine biofilms, collected from two different surfaces of the French Atlantic coast: an intertidal mudflat which plays a central role in aquaculture and a carbon steel structure of a harbour, where biofilms may cause important damages.

### Results

A collection of 156 marine heterotrophic aerobic bacteria isolated from both biofilms was screened for their ability to form biofilms on polystyrene 96-well microtiter plates. Out of 25 strains able to build a biofilm in these conditions, only four bacteria also formed a thick and stable biofilm on glass surfaces under dynamic conditions. These strains developed biofilms with four different three - dimensional architectures when observed by confocal laser scanning microscopy: *Flavobacterium* sp. II2003 biofilms harboured mushroom-like structures, *Roseobacter* sp. IV3009 biofilms were quite homogeneous, *Shewanella* sp. IV3014 displayed hairy biofilms with horizontal fibres, whereas *Roseovarius* sp. VA014 developed heterogeneous and tousled biofilms.

### Conclusions

This work led for the first time to the obtaining of four marine bacterial strains, potentially pioneering bacteria in marine biofilms, able to adhere to two different surfaces and to build specific 3D biofilms. The four selected strains are appropriate models for a better understanding of the colonization of a surface as well as the interactions that can occur between bacteria in a marine biofilm, which are crucial events for the initiation of biofouling which may cause damages in maritime activities and industries.

## **Keywords**

Marine bacteria, Biofilm, Abiotic surfaces, Biofilm 3D structures, French Atlantic coast, Confocal laser scanning microscopy.

## **Background**

Biofilms are generally considered as surface-associated microorganism communities encased in a hydrated polymeric matrix [1]. In marine environment, most of the solid man-made structures as well as natural surfaces are covered by microbial biofilms. Together with diatoms, bacteria constitute the major components of biofilms occurring in the marine environment [2]. Furthermore, all types of bacteria can form biofilms, making this sedentary lifestyle their favourite mode of existence in nature [3]. This mechanism is described as considerably important for survival of marine bacteria by providing a favourable environment [4]. This lifestyle, compared to the planktonic one, indeed improves access to nutrients and protects against stress, antibiotics and predators [1,5].

Quickly after immersion of a clean surface in the sea, microorganisms colonize it and subsequently develop biofilms with highly diverse three-dimensional (3D) structures which can include channels allowing the flow of liquids, nutrients and wastes [6-8]. The early stages of biofilm formation are based on the interactions of free-living bacteria with the surface which generates an initial layer of microorganisms and polymers [5]. Thereafter, growth of the primary colonizing bacteria changes the surface characteristics of the substratum, rendering it suitable for subsequent colonization by other microorganisms. Finally, the mature biofilm community is formed through synergistic and/or competitive interactions [5].

Few studies have reported the species composition of bacterial communities in marine biofilms. In particular, the roles and surface specificities of primary colonizers are largely unknown for most surface types [9]. The early-stage biofilms were dominated by the same major classes of bacteria that were most abundant in planktonic communities, with the latter demonstrating a higher diversity when compared with that of biofilm bacteria [9,10]. The Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria were recognized as the pioneering microorganisms in marine biofilm formation [2,5,9-11]. Then, Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia and Beta, Delta and Epsilon groups of Proteobacteria were identified as minor phyla also belonging to these biofilms [5,8-10,12-14]. However, the bacterial composition of early-stage

biofilms may be affected by the physicochemical properties of the solid surface [5,10] and by the variation of environmental conditions due for example to the seasons or the characteristics of the immersion sites [2].

In the present work, we studied bacteria of two original types of marine biofilms from the French Atlantic coast, displaying different characteristics. The first one is a non-permanent benthic biofilm sampled from an intertidal mudflat, which plays a central role in the production of oysters. Indeed, oyster larvae can directly digest and assimilate bacterial carbon [15]. Moreover, this biofilm, in addition to directly feed the benthic trophic network through active deposit feeders, indirectly feeds the planktonic trophic network through re-suspension of the biofilm in the water column. However, current knowledge on the structure as well as the functioning of this biofilm is largely conceptual and theoretical. The second one is a permanent biofilm formed on carbon steel structures immersed in a French Atlantic harbour and involved in the early stages of the biocorrosion phenomenon [16]. In seawater, complex biofilms closely linked with corrosion products quickly develop on metallic structures. This can influence the deterioration of metal by microorganism activity, thus causing great damages to harbour infrastructures, resulting in economic losses. To date, the initiation of the microbiologically-influenced corrosion processes remains unclear.

Understanding the initial stage of marine biofilm formation is highly important to explain the biofilm formation phenomenon. Unlike the studies in which the structure of pioneering communities, developed on immersed artificial surfaces in seawater, is directly investigated [9, 14], our approach was first to build a collection of culturable marine bacteria isolated from two kinds of biofilms and then to screen for the ability of each isolate to adhere to artificial surfaces and to form biofilms under the same controlled conditions. The objective of this work was to obtain model strains with high forming-biofilm abilities, suitable for further experiments which would allow a better understanding of the colonization of a surface as well as the interactions that can occur between bacteria in a marine biofilm.

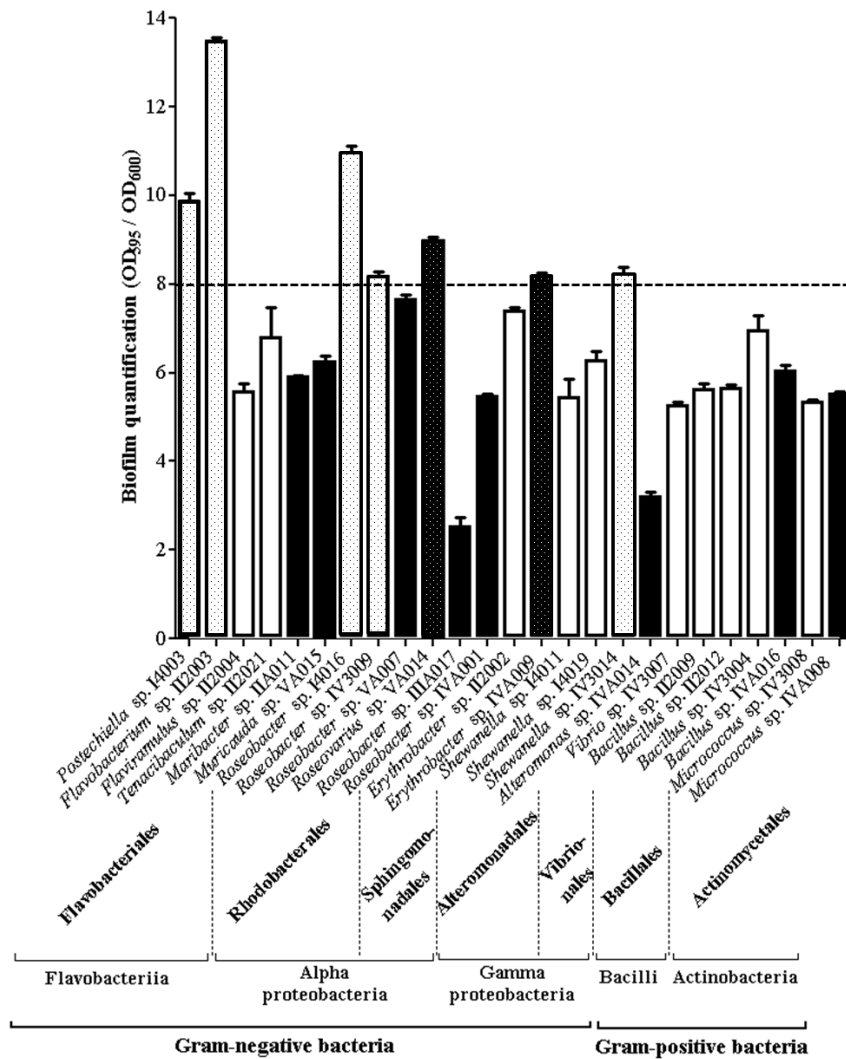
## **Results**

### **Screening of bacteria for their ability to adhere and to form biofilms on polystyrene surfaces**

In order to efficiently select strains able to adhere and to form biofilms, the whole bacterial collection of 156 heterotrophic aerobic bacteria, isolated as described in the “Methods”

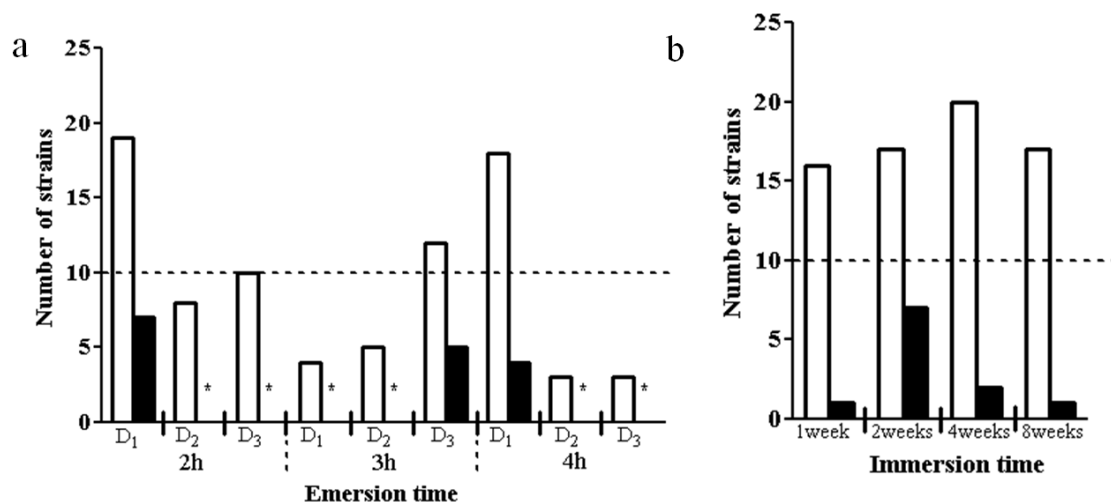


section, was first screened with a rapid method, based on crystal violet staining of biofilms formed in 96-well microtiter plates (polystyrene surfaces). The bacteria that efficiently formed biofilms onto this surface after a 2h adhesion step and 24h of growth were identified by 16S rDNA sequencing. This screening revealed that the biofilm formation ability was very variable according to the bacterial strains (Figure 1).



**Figure 1 Quantification of bacterial biofilm formation on polystyrene microtiter plates under static conditions.** Bacteria were isolated from intertidal mudflat biofilms (white bars) and from corrosion product-microorganism composite biofilms developed on harbor metallic structures (black bars). After 24 h of growth, single-species biofilms were quantified with crystal violet and the ratios of OD<sub>595</sub> (cells grown in biofilm) / OD<sub>600</sub> (planktonic cells) were calculated. The ratios are represented on the y axis. Dotted bars: bacteria with a ratio OD<sub>595</sub> / OD<sub>600</sub> > 8. Bars represent means ± standard deviations for three replicates.

Under our experimental conditions, out of 86 isolates from the intertidal mudflat biofilms, 15 strains were able to form a biofilm with a ratio of cells grown in biofilm / planktonic cells higher than 2 (Figure 1). These biofilm-forming bacteria were distributed in 5 bacterial classes: Flavobacteriia (27%), Gammaproteobacteria (27%), Alphaproteobacteria (20%), Bacilli (20%) and Actinobacteria (6%). The *Flavobacterium* sp. II2003 strain, with a ratio of 13, showed the best ability to form a biofilm on polystyrene. Other bacteria displayed a strong ability to form a biofilm on polystyrene: *Postechiella* sp. I4003, *Roseobacter* sp. I4016 and IV3009 and *Shewanella* sp. IV3014 showed a ratio higher than 8 (Figure 1). The proportion of benthic bacterial strains able to form biofilms according to the sampling time at low tide is presented in Figure 2a. Bacteria forming a biofilm were found at all emersion times (from 2 to 4 h). However, when less than 10 strains were isolated from a sample, no biofilm-forming bacterium was detected in this sample, whatever the emersion time (Figure 2a).



**Figure 2 Proportion of bacterial strains able to form biofilms on polystyrene microtiter plates under static conditions.** Results are presented according to the emersion time for bacteria isolated from mudflat biofilms (a) or the immersion time for bacteria isolated from corrosion product-microorganism composite biofilms (b). Mudflat sampling was performed three times at low tide during three days (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, and D<sub>3</sub>). White bars: number of strains tested. Black bars: number of forming-biofilm strains. \*: no forming-biofilm strain detected.

Concerning the bacteria isolated from biofilms developed on corroded carbon steel immersed in sea water, 10 strains among the 70 isolates were able to form biofilms after 24 h (with a ratio of cells grown in biofilm / planktonic cells higher than 2) (Figure 1). These strains were affiliated to the same taxonomic groups as the benthic bacteria, but the proportion of bacteria from each class varied: 50% Alphaproteobacteria, 20% Flavobacteriia, 10%

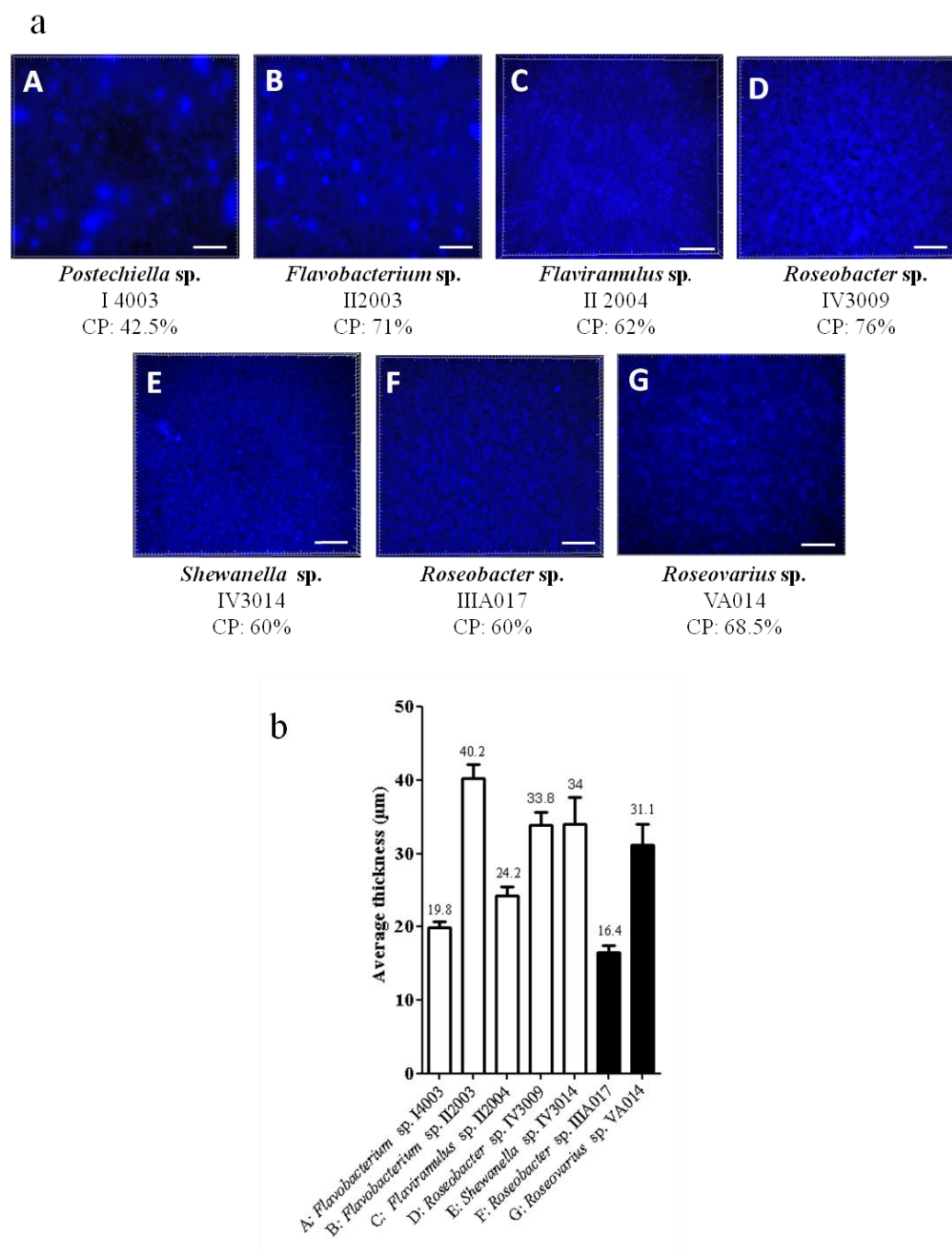
Gammaproteobacteria, 10% Bacilli and 10% Actinobacteria. Under our experimental conditions, the ratios of cells grown in biofilm / planktonic cells obtained for these bacteria were lower than for the benthic bacteria. The ratio of 9, for the *Roseovarius* sp. VA014 strain, was the highest value obtained for bacteria isolated from corroded structures (Figure 1). *Erythrobacter* sp. IVA009 was also interesting with a ratio higher than 8 (Figure 1). The results presented in Figure 2b show that bacteria able to form a biofilm on polystyrene were found in all samples, but the highest number was isolated from the steel immersed for 2 weeks.

In conclusion, this first screening allowed us to detect 15 benthic bacteria and 10 bacteria from corroded structures able to develop a biofilm in 96-well polystyrene microplates.

### **Ability of the selected strains to adhere and to form biofilms under static conditions on glass surfaces**

The above screening method in polystyrene microplates was rapid and convenient to detect the bacterial ability to form biofilms, but did not provide any structural information on these biofilms. To get this kind of information and thus study more accurately stable biofilms, the experiments had to be performed in dynamic conditions with biofilm observation by confocal laser scanning microscopy. Such observations required glass surfaces, and it was uncertain whether strains able to develop a biofilm on polystyrene would also be able to do it on glass. Since the biofilm study in dynamic conditions was labour intensive and time consuming, all bacteria that formed biofilms on polystyrene were then screened for their ability to form a biofilm on glass surfaces, first of all in static conditions. After a 2h adhesion step and 24 h of growth, the biofilm was stained with DAPI, and microscopic fluorescence observations were performed to detect the strains behaviour on the glass surface. Among the previously selected bacteria (15 benthic bacteria and 10 bacteria isolated from corroded structures), only the *Postechiella* sp. I4003, *Flavobacterium* sp. II2003, *Flaviramulus* sp. II2004, *Roseobacter* sp. IV3009 and *Shewanella* sp. IV3014 benthic bacteria and the *Roseobacter* sp. IIIA017 and *Roseovarius* sp. VA014 strains from corroded structures were able to form biofilms under these conditions (Figure 3). Microscopic observations of their biofilms showed a high percentage of colonized surfaces, from 42.5% for *Postechiella* sp. I4003 to 76% for *Roseobacter* sp. IV3009 (Figure 3a). On the bases of the biofilm structures, two types of biofilms could be distinguished (Figure 3a). The *Postechiella* sp. I4003, *Flavobacterium* sp. II2003 and *Roseobacter* sp. IV3009 biofilms were very heterogeneous and contained large cell aggregates whereas the *Roseobacter* IIIA017, *Roseovarius* sp. VA014, *Flaviramulus* sp.

II2004 and *Shewanella* sp. IV3014 biofilms contained more evenly distributed cells. *Flavobacterium* sp. II2003 and *Roseobacter* sp. IIIA017 exhibited the thickest and the thinnest biofilms, with an average of 40.2  $\mu\text{m}$  and 16.4  $\mu\text{m}$  respectively (Figure 3b).

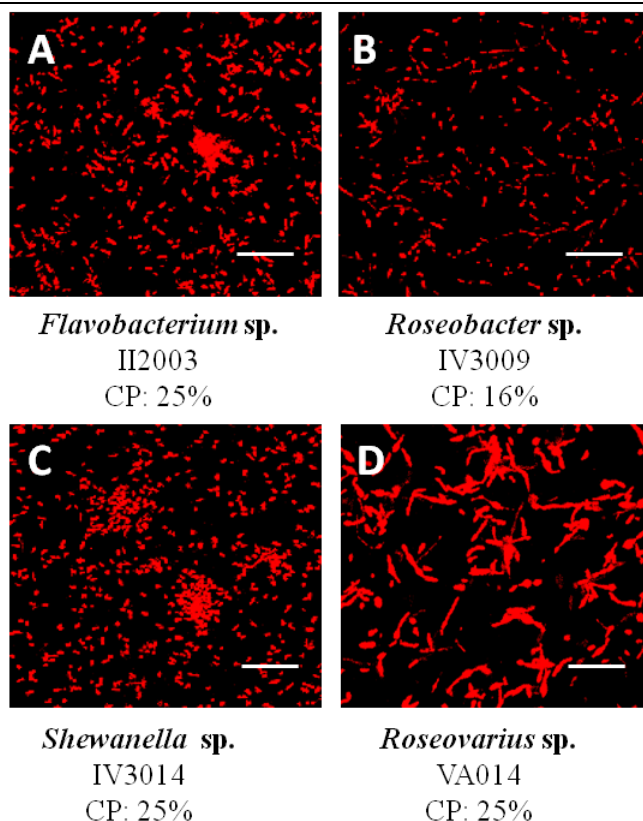


**Figure 3 Fluorescence microscopic 3D reconstitutions and quantification of biofilms formed on glass surfaces under static conditions.** After 24 h of growth under static conditions, biofilms were stained with DAPI. Microscopic 3D images were reconstituted (a) and the average thicknesses of the biofilms were determined (b). A, B, C, D, E: bacterial isolates from mudflat biofilms. F, G: bacterial isolates from corrosion product-microorganism composite biofilms. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ . CP: percentage of colonized surface. These values are averages of data from three independent experiments, with standard deviations lower than 10% of each value.

### **Study of the bacterial biofilm structures under dynamic conditions in flow cells**

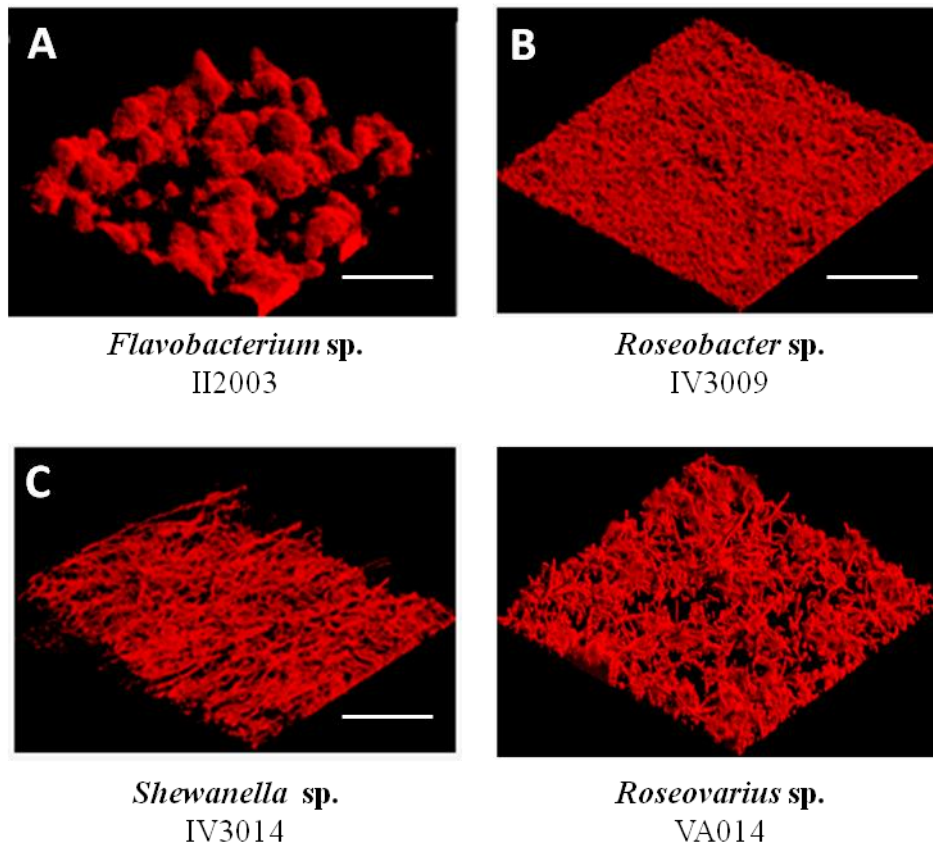
Through the previous steps, seven bacteria have been selected for their capability to form a thick biofilm under static conditions on polystyrene as well as glass surfaces. These bacteria were then studied under dynamic conditions, to further investigate strains able to develop stable biofilms. Thus, bacterial biofilms were grown on glass slides in three-channel flow cells and observed by confocal laser scanning microscopy after staining with the Syto 61 fluorescent dye.

The seven strains were able to attach onto the glass slide during a 2 h adhesion step in artificial seawater without flow, but the biofilms of three strains were not sufficiently stable and only four strains (*Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009, *Shewanella* sp. IV3014 and *Roseovarius* sp. VA014) were able to form biofilms after 24 h of growth under a continuous culture medium flow. The microscopic observations of these four strains are shown in Figures 4 and 5. After the adhesion step, *Flavobacterium* sp. II2003, *Shewanella* sp. IV3014 and *Roseovarius* sp. VA014 began to form aggregates or microcolonies, whereas *Roseobacter* sp. IV3009 cells were more individually attached (Figure 4). *Roseovarius* sp. VA014 cells were more filamentous. About 25% of the glass surfaces were covered for all strains, except for the *Roseobacter* sp. IV3009 strain (16%, Figure 4).



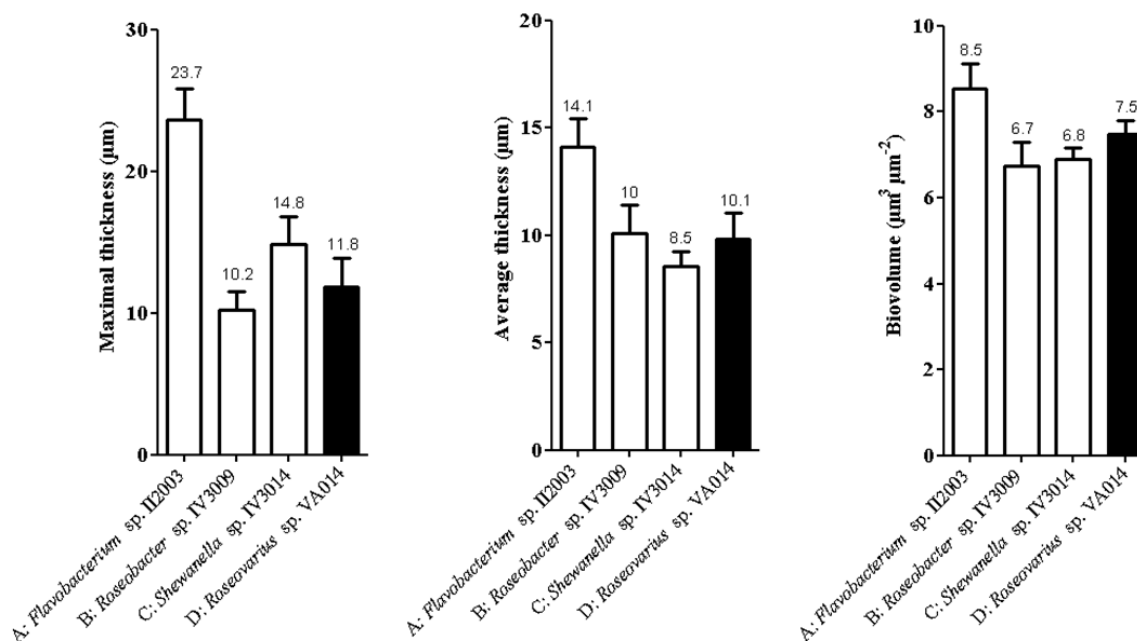
**Figure 4 Confocal laser scanning microscopy images of attached cells after 2 h of adhesion on glass surfaces.** Bacteria were allowed to attach into the flow cells during 2 h in artificial seawater without flow. Syto 61 red was used to stain the attached cells. A, B, C: bacterial isolates from mudflat biofilms. D: bacterial isolate from corrosion product-microorganism composite biofilms. Scale bar: 47 $\mu$ m. CP: percentage of colonized surface. These values are averages of data from three independent experiments, with standard deviations lower than 10% of each value.

After 24 h of biofilm growth, four different 3D architectures were observed (Figure 5). *Flavobacterium sp.* II2003 biofilms harbouring numerous mushroom-like structures with a non-uniform distribution are reminiscent of biofilms of the well-known *Pseudomonas aeruginosa* model [17,18].



**Figure 5 Confocal laser scanning microscopy images of single-species biofilms formed after 24 h of growth on glass surfaces under dynamic conditions.** Biofilms were grown on glass surfaces in flow cells, at 22°C for 24 h, under a flow of Zobell medium. Bacteria were stained with Syto 61 red. A, B, C: 3D views of biofilms of bacterial isolates from mudflat biofilms. D: 3D view of a biofilm of the bacterial isolate from corrosion product-microorganism composite biofilms. Each image is representative of 10 observations. Scale bar: 67.3µm.

Once again, the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilms were the thickest, which led to the highest biovolume (Figure 6). Although not flat, *Roseobacter* sp. IV3009 biofilms were quite homogeneous with a bacterial distribution covering the entire surface (Figure 5). The average and maximal thicknesses were the same (10 µm, Figure 6), confirming the regular distribution of cells and the lack of protruding mushroom-like structures. *Shewanella* sp. IV3014 displayed hairy biofilms with horizontal fibres, whereas *Roseovarius* sp. VA014 developed heterogeneous and tousled biofilms with cell aggregates (Figure 5). The biovolume, the average and the maximal thicknesses of the two latter biofilms were relatively close to those of *Roseobacter* sp. IV3009 biofilms (Figure 6).



**Figure 6** COMSTAT analyses of biofilms formed on glass surfaces, after 24 h of growth under dynamic conditions. A, B, C: bacterial isolates from mudflat biofilms (white bars). D: bacterial isolate from corrosion product-microorganism composite biofilms (black bars).

In conclusion, only four strains, *Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009, *Shewanella* sp. IV3014 from the mudflat and *Roseovarius* sp. VA014 from the steel structure, were able to develop a stable single-species biofilm under dynamic conditions. Each biofilm had a specific structure. Interestingly, these strains were the four bacteria that displayed the thickest biofilms (more than 30 µm) on glass surfaces under static conditions (Figure 3b).

## Discussion

In this work, we studied bacteria that inhabited two types of marine biofilms. Our marine bacterial collection was first screened for the ability of the bacteria to form biofilms in 96-wells microtiter polystyrene plates, in static conditions. Among bacteria fulfilling this criterion, a second screening step allowed us to select the strains able to attach and to develop biofilms on glass surfaces in static conditions. The biofilms of these selected bacteria were then investigated under dynamic conditions. Out of 156 bacterial isolates of our collection, only 15 strains from the mudflat biofilms and 10 strains from the corroded metallic structures were able to form single-species biofilms on polystyrene surfaces. In natural environments, the presence of different bacteria may help to build a biofilm. Moreover, the substratum used



---

differed from that of the original ecosystem, and the adopted experimental approach involved attachment of the bacteria to their support for 2 h only. This could partly explain the low number of bacteria able to attach to polystyrene and to form biofilms. Lee *et al.* [9] showed that pioneer populations in marine biofilms settled within 3~9 h and developed into later stages after 9 h of biofilm formation. The 2-h adhesion step in our experiments was then particularly relevant for pioneer bacteria. As suggested by Lee *et al.* [9], pioneer populations have a rapid growth on substratum surfaces but are generally present in seawater with low abundances. In this work, benthic bacteria were collected at different times at low tide, during the first hours after the beginning of the mudflat biofilm formation, while bacteria isolated from corroded metallic structures were obtained from samples submerged between 1 week and 2 months, where enrichment of other bacterial groups than pioneers could occur. This could partly explain the detection of more forming-biofilm bacteria in the mudflat than on the corroded metallic structures. Otherwise, we observed that the number of mudflat bacteria able to adhere and to develop a biofilm was not related to the time of sampling after the beginning of the low tide (from 2 to 4 h), but was rather associated with the number of bacteria isolated per sample: below a “threshold” of 10 bacteria, no bacterium able to form a biofilm in our conditions was detected (the probability was too low). This is consistent with the low abundances of pioneer bacteria suggested by Lee *et al.* [9]. Surprisingly, for the bacteria isolated from steel substratum, the highest number (and percent) of strains able to adhere and develop on microtiter plates was obtained for the steel immersed for 2 weeks. We expected to find more pioneer bacteria on the steel coupon immersed the shorter time (1 week). We could then hypothesize that pioneer bacteria differ according to the substratum: the bacteria able to adhere on polystyrene in 2 h would not belong to the bacterial group which attaches first on steel, but would be more current in bacteria present on steel after 2 weeks of immersion, after the settlement of other bacteria. Differences in pioneer bacteria according to the surface are consistent with the findings of Dang and Lovell [5] who immersed different experimental surfaces in seawater for 24 or 72h. They observed that the specific surface chemical functional groups influence early stages of surface colonization. In the same way, after a 6-week exposure in the North Sea (UK), the microbial biofilm isolated from glass and polyethylene terephthalate bottles had communities that differed markedly [19]. However, different works showed that bacterial communities did not vary much according to the substratum [9,10,20]. The differences by substratum were slight when compared with differences according to the time, but indeed exist. The authors finally concluded that the composition of the pioneering bacterial population varied with both time course and surface

---

type [9, 10]. Furthermore, in the experiments where the biofilm community composition was reported as similar across all surfaces at early stages of biofilm formation, the different surfaces were all glass slides, with different chemical treatments [8]. Moreover, all surfaces had distinct temporal shifts in community structure over a period of 10 days immersion [8]. These data suggest two biofilm formation models: in the first one, the pioneer bacteria are different according to the surface to colonize; in the second model, bacteria that adhere at the beginning are about the same whatever the surface, because of their great capacity to adhere, but some of them rapidly detach from the substratum because their metabolism is not well adapted to this environment, which favours other bacteria. This could explain the increasing differences over time observed in the biofilm structures. As all the works described by the other authors were performed in natural environments, without isolating bacteria, it was impossible to know if the first adhering strains were the same on the different surfaces and then to discriminate between both models. Therefore, we tested the ability of the 25 bacteria able to form a biofilm on polystyrene to also adhere on steel in 2 h (data not shown). No mudflat bacterium was able to adhere, even in static conditions, and only 2 bacteria issued from the corroded steel were shown to have this ability. These results would favour the first model.

Our work showed that among our marine cultured strains collection, the most important bacterial classes able to form a biofilm in microtiter polystyrene plates were Alphaproteobacteria (5 from the steel and 3 from the mudflat, of which 6 were Rhodobacterales), Flavobacteriia (4 from the mudflat and 2 from the steel, all being Flavobacteriales), Gammaproteobacteria (4 from the mudflat and 1 from the steel, of which 4 Alteromonadales) and Bacilli (3 from the mudflat and 1 from the steel, all being Bacillales). Only 1 strain from each kind of biofilm belonged to the Actinobacteria class. This is consistent with Dang *et al.* [21], who identified members of Alphaproteobacteria (mainly Rhodobacterales), Gammaproteobacteria (mainly Alteromonadales and Oceanospirillales), and Bacteroidetes (mainly Flavobacteriales) groups, as the most common and dominant surface colonizers in their study. Moreover, it is well known that the Alphaproteobacteria, especially the *Roseobacter* clade members, are the dominant and ubiquitous primary surface colonizers whatever the type of surfaces, in temperate coastal waters (Pacific and Atlantic coasts) [5,10,11,21]. This predominance is possibly attributed to their ability to adapt faster than other bacteria to a low level of nutrients [2]. When we likewise identified the bacteria associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel, the culturable bacteria (constituting one part of the bacterial collection we tested

in this work) were distributed as follows: Alphaproteobacteria (30.4%), Gammaproteobacteria (13.9%) and Flavobacteriia (15.2%) for the Gram negative strains, Bacilli (38%) and Actinobacteria (2.5%) for the Gram positive strains [16]. Among these 79 strains isolated from steel structures, 10 were first selected with 4 Rhodobacterales (3 *Roseobacter* and 1 *Roseovarius*). It has been observed by Dang *et al.* [21] that the *Roseobacter* clade was present at each steel colonization stage measured (1 to 7 days of immersion in seawater), suggesting that these bacteria were early surface colonizers, but also participated to the process of biofilm growth, while *Roseovarius* were detected only during the early stages and were considered as pioneer surface colonizers. In our work, two strains belonging to the *Roseobacter* clade, *Roseobacter* sp. IV3009 and *Roseovarius* sp. VA014, were finally selected and are therefore two interesting models of potential pioneering bacteria in marine biofilms.

Among the 5 Gammaproteobacteria able to form a biofilm on polystyrene, 4 were Alteromonadales, with 3 *Shewanella* and 1 *Alteromonas*. *Alteromonas* is an important genus in particle-associated niches, and members of this genus may be significant surface colonizers in coastal marine systems [5]. When Lee *et al.* [9] studied the succession of bacterial communities during the first 36 h of biofilm formation on acryl, glass and steel substratum in seawater, they observed that some species of Gammaproteobacteria, such as *Alteromonas*, were predominant in the genuine pioneers of marine biofilm during the first hours. *Shewanella* sp. can be found from different parts of the world, including the Pacific, Atlantic and Polar Oceans [5,11], but was until now not described as a predominant bacteria found in Atlantic marine biofilms. However, a recent study showed that in Mediterranean Sea, *Shewanella* sp. was included in the community of early biofilms [14]. Although bacteria of this genus are less present in biofilms, *Shewanella* sp. IV3014 was selected in this work for its ability to develop an original hairy biofilm with horizontal fibres under dynamic conditions.

Together with Proteobacteria, bacteria of the Bacteroidetes phylum (containing the Flavobacteriia class), were found on carbon steel coupons at all early immersion stages [16, 21]. These phyla could be competitive throughout the carbon steel surface colonization process, but different Bacteroidetes strains might be involved at different stages [21]. According to Chung *et al.* [22], the Bacteroidetes constitute the third major phylum of biofilms developed on polystyrene surfaces submerged in Hong Kong coastal water for 3 and 6 days. Surprisingly, in our work, the diversity of the Flavobacteriia strains was very high: the 6 polystyrene-adhering bacteria belong to 6 different genera. However, only one, *Flavobacterium* sp. II 2003, was finally able to form a biofilm in dynamic conditions. Both in static and dynamic conditions, *Flavobacterium* sp. II2003 displayed the thickest biofilm

---

compared to the other selected strains. It is known that pathogenic *Flavobacterium* species are responsible for great losses of fish in aquaculture farming worldwide [23,24]. Aquaculture surfaces are easily colonized and persisting *Flavobacterium* sp. inhabiting biofilms might serve as a source of infection or reinfection [23]. Although *Flavobacterium* sp. are important pathogens in the aquaculture setting and have been detected in industrial, domestic, and medical environment biofilms, the manner in which they form biofilms has not been elucidated [23]. Then, the *Flavobacterium* sp. II2003 strain constitutes a very interesting model.

Finally, Firmicutes (containing the Bacilli class) and Actinobacteria were identified as minor phyla found in biofilms formed on acryl, glass and steel substratum in seawater [5,8-10,12-14,22]. Dang *et al.* [21] detected these phyla only during the early stages of steel colonization (1 and 3 days), suggesting that some bacteria of these phyla could be early surface colonizers. In our experiments, 4 bacteria affiliated to Firmicutes (*Bacillus*) were able to form biofilms on polystyrene, which represents a high proportion compared with what occurs in natural environments. However, none of these strains was able to adhere to glass surfaces and they could not be retained as models. The same phenomenon was observed for the two Actinobacteria strains.

## Conclusions

In conclusion, this work allowed us to finally select four bacteria able to form a thick biofilm on polystyrene as well as glass surface under dynamic conditions: *Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009, *Shewanella* sp. IV3014 from the mudflat biofilm, and *Roseovarius* sp. VA014 from the corrosion product-microorganism composite biofilm. Moreover, each of the four strains was able to develop a biofilm with a specific 3D structure. It will then be possible to study potential pioneering bacteria in marine biofilms. Primary colonizers are known to be responsible for the initiation of biofouling and may cause various damages in maritime activities and industries. The paramount importance of the bacterial primary colonizers in surface community formation, dynamics, and function needs to be explored. In future studies, we will investigate the interactions between these high forming-biofilm bacterial models and other marine bacteria from the same ecosystems in order to better understand the initial stage of marine biofilm formation.

## **Methods**

### **Bacterial strains isolation and culture media**

A wide range of heterotrophic aerobic bacteria (156) was isolated from two marine biofilms. Benthic bacteria were collected from the intertidal temperate mudflat biofilm of Marennes-Oléron Bay (45°55'N, 01°06'W, Atlantic Coast of France), during three days at low tide in February and July 2008, at 2 h, 3 h and 4 h after emersion. Mudflat samples were collected using core diameter of 20 cm, and the top 2-3 mm was taken. After sampling, mudflat samples were carried to the laboratory at 4°C and immediately processed. The second source of bacteria was the biofilm associated with the corrosion products formed on carbon steel structures immersed in seawater [16]. Briefly, carbon steel coupons (70 × 70 × 6 mm) were immersed in a harbour of La Rochelle (Atlantic coast, France) for 1 week to 2 months at a constant depth of 1 m. The steel composition (98.2% Fe, 0.122% C, 0.206% Si, 0.641 % Mn, 0.016 % P, 0.031 % S, 0.118 % Cr, 0.02 % Mo, 0.105 % Ni and 0.451 % Cu) was the same as that of the harbour metallic structures. At the end of the experiment, the corroded coupons were carried to the laboratory in sealed bags filled with seawater and immediately processed. The mudflat samples and biofilms scraped from the corroded coupons were resuspended in sterile artificial seawater (sea salts Sigma 35 g l<sup>-1</sup>) and inoculated on Marine Agar (Difco) supplemented with cycloheximide (Sigma 100 µg ml<sup>-1</sup>) to prevent eukaryotic growth. Bacterial isolates were obtained from the plates after incubation at 20°C in aerobic conditions. Strains were conserved as frozen stocks with 25% glycerol at -80°C until further processing. For all subsequent tests, the strains were grown in Zobell broth (pastone Bio-Rad 4g l<sup>-1</sup>; yeast extract Bio-Rad 1g l<sup>-1</sup>; sea salts Sigma 30g l<sup>-1</sup>) at 22°C with shaking (150 rpm).

### **DNA extraction and 16S rRNA gene sequencing**

The isolated bacterial strains were identified by 16S rRNA gene sequencing. The genomic DNA of bacteria was extracted with the Genomic DNA from Tissue Kit (Macherey Nagel) from 1 to 5 ml of overnight culture. Amplification of about 1400 bp of the 16S rRNA gene was carried out using 50 ng of genomic DNA in a total volume of 50 µl. The reaction mixtures contained 0.2 µmol l<sup>-1</sup> 16SUnivF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA<sub>3</sub>') and 16SUnivR (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT<sub>3</sub>') primers, 3 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 320 µmol l<sup>-1</sup> of each dNTP, and 0.04 Taq polymerase Units (Fermentas), in the corresponding 1X buffer. Denaturation at 95°C for 2 min was followed by 30 cycles of amplification (92°C for 30 s,

---

54°C for 30 s, 72°C for 1 min 30). About 300 ng of each amplified DNA were sent to GenoScreen (Lille, France) for sequencing. The 16S rDNA sequences were compared with those in GenBank using the Blast software (National Institutes of Health, USA).

### **Growth of biofilm on polystyrene surfaces (microtiter plates) under static conditions, crystal violet staining**

The ability of the bacterial strains to form biofilms onto polystyrene was tested individually by cultivating each of them in 96-well microtiter plates (MICROTEST™ 96, Falcon) under static conditions and by crystal violet staining. The protocol used was a modified version of that described by O'Toole and Kolter [25]. Cells of an overnight bacterial culture were resuspended after 10 min of at 7000 g centrifugation in artificial seawater to a final optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>) of 0.25 and 150 µl of the resulting bacterial suspensions were loaded per well of the microtiter plates. After incubation for 2 h at 22°C, the wells were gently washed three times with artificial seawater. Thereafter, 150 µl of Zobell medium were transferred in each well and the plate was incubated at 22°C for 24 h. The planktonic fractions were transferred into a new microtiter plate and the absorbance was measured at 600nm. The plates with biofilms were washed three times with artificial seawater. The biofilms were then stained with a 0.8% crystal violet solution for 20 min. The wells were then rinsed with ultra-pure water until the wash-liquid was clear (10 times on average) and 150 µl of 96% ethanol was added to solubilize the attached crystal violet from biofilms. Quantification was carried out by measuring the OD<sub>595</sub>. To be able to compare the results obtained with strains showing different growth speeds, the biofilm formation was expressed as the ratio of OD<sub>595</sub> (cells grown in biofilm)/ OD<sub>600</sub> (planktonic cells). Assays were performed in triplicate for each strain.

### **Growth of biofilm on glass surfaces under static conditions, fluorescence microscopy and image analyses**

For each tested strain, cells of an overnight bacterial culture were resuspended after 10 min of at 7000 g centrifugation in artificial seawater final OD<sub>600</sub> of 0.25. One ml of the resulting bacterial suspension was loaded in a compartment of Petri dishes (CellView diameter 35 mm, Greiner Bio-one) containing four compartments and a glass bottom. After incubation for 2 h at 22°C, the compartments were gently washed with artificial seawater and 1ml of Zobell medium was poured in each compartment. Biofilms were then grown for 24 h at 22°C. The

---

surfaces were then rinsed with artificial seawater and biofilms were stained with  $4 \mu\text{g l}^{-1}$  4-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in the dark for 20 min. After rinsing with ultra-pure water and drying, samples were analysed using a fluorescence microscope DMI6000B system (magnification 1000 X, Leica Microsystems, Germany), over an average of 10 fields. The three dimensional (3D) structures were reconstituted by using IMARIS software. The percentages of colonized surface (%) were calculated using the NIH ImageJ software [26]. All experiments were performed in triplicate.

### **Growth of biofilm on glass surface under dynamic conditions in three channel flow cell, confocal laser scanning microscopy and image analyses**

Bacterial biofilms were grown on glass slides in three-channel flow cells (channel dimensions 1 by 4 by 40 mm, Technical University of Denmark Systems Biology, Denmark) [27]. The flow system was assembled, prepared and sterilized as described by Tolker-Nielsen and Sternberg [28]. The substratum consisted in a microscope glass coverslip (24 x 50 st1, KnittelGlasser, Germany). Flow cells were inoculated with overnight bacterial cultures diluted in artificial seawater to a final  $\text{OD}_{600}$  of 0.1. Bacteria were allowed to attach during 2 h at  $22^\circ\text{C}$  without medium flow. The channels were then washed by applying a flow of artificial seawater for 15 min at a rate of  $2 \text{ ml h}^{-1}$  to remove planktonic cells. Biofilm growth was then performed under a constant flow of Zobell ( $2 \text{ ml h}^{-1}$ ) for 24 h at  $22^\circ\text{C}$ . Microscopic observations were performed by confocal laser scanning microscopy using a TCS-SP2 system (Leica Microsystems, Germany). The 2-h attached cells and the biofilms formed after 24 h on the glass surface were observed by staining bacteria with  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  Syto 61 red. Images were obtained using the Leica confocal software. The surface coverages after the 2 h adhesion step were evaluated using the ImageJ software. The biofilm stacks were analysed with the COMSTAT software (developed in MATLAB, [29]) to estimate the maximal and average thicknesses ( $\mu\text{m}$ ) and the biovolume ( $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ). The values were calculated from three independent experiments from which a total of 15 image stacks were obtained.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Authors' contributions**

ID designed the experimental work, conducted data analysis, participated in writing the manuscript. SR, AB, AD, DA and VS participated in experimental work and helped to draft the manuscript. IL and SS collected the samples, participated in experimental work, supervised the laboratory work and participated in writing the manuscript and in organizing the project. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank the Conseil Général de la Charente Maritime (France) for the PhD grant of Ibtissem Doghri. This work was financially supported by the CNRS "Ecosphère Continentale et Côtière" program 2013-14 (France). The LIENSs and LBCM are supported by the Région Poitou-Charentes and Bretagne (France) and the European FEDER funds.

### **References**

1. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-1322.
2. Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF. Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ Microbiol*. 2013;15:2879-2893.
3. Karatan E, Watnick P. Signals regulatory network and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2009;73:310-347.
4. Jefferson KK. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett*. 2004;236:163-173.
5. Dang H, Lovell CR. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:467-475.
6. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:847-867.



- 
7. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
  8. Huggett M, Nedved B, Hadfield M. Effects of initial surface wettability on biofilm formation and subsequent settlement of *Hydroides elegans*. *Biofouling.* 2009;25:387-399.
  9. Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol.* 2008;46:174-182.
  10. Jones PR, Cottrell M, Kirchman DL, Dexter, SC. Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol.* 2007;53:153-162.
  11. Dang H, Li T, Chen M, Huang G. Crossocean distribution of *Rhodobacterales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:52-60.
  12. Dang H, Lovell CR. Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:496-504.
  13. Webster NS, Smith LD, Heyward AJ, Watts JEM, Webb RI, Blackall LL, Negri AP. Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:1213-1221.
  14. Brian-Jaisson F, Ortalo-Magné A, Guentas-Dombrowsky L, Armougom F, Blache Y, Molmeret M. Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microb Ecol.* 2014;68:94-110.
  15. Douillet P. Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1993;98 123-134.
  16. Lanneluc I, Langumier M, Sabot R, Jeannin M, Refait Ph, Sablé S. On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2015;99:55-65.

- 
17. Klausen M, Gjermansen M, Kreft J-U, Tolker-Nielsen T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* biofilms. FEMS Microbiol Lett. 2006;261:1-11.
  18. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Givskov M, Whitchurch CB, Engel JN, Tolker-Nielsen T. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol. 2008;10:2331-43.
  19. Oberbeckmann S, Loeder MG, Gerdts G, Osborn AM. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. FEMS Microbiol Ecol. 2014;90: 478-92.
  20. Hung O, Thiagarajan V, Qian P. Preferential attachment of barnacle larvae to natural multi-species biofilms: does surface wettability matter? J Exp Mar Biol Ecol. 2008;361:36-41.
  21. Dang H, Chen R, Wang L, Shao S, Dai L, Ye Y, Guo L, Huang G, Klotz MG. Molecular characterization of putative biocorroding microbiota with a novel niche detection of Epsilon- and Zetaproteobacteria in Pacific Ocean coastal seawaters. Environ Microbiol. 2011;13:3059-3074.
  22. Chung H, Lee O, Huang Y, Mok S, Kolter R, Qian P. Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. ISME J. 2010;4:817-828.
  23. Basson A, Flemming LA, Chenia HY. Evaluation of Adherence, Hydrophobicity, Aggregation, and Biofilm Development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like Isolates. Microb Ecol. 2008;55:1-14.
  24. Starliper EC. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. J Adv Res. 2011;2:97-108.
  25. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998;28:449-61.

26. Rasband WS. ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, [imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/), 1997–2012

27. Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A*. 2009;75:90–103.

28. Tolker-Nielsen T, Sternberg C. Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr Protoc Microbiol* 1B. 2011;2:1-17.

29. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*. 2000;146:2395-407.

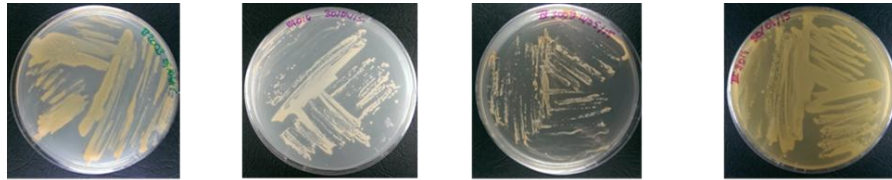
## B/ Caractérisation des modèles bactériens sélectionnés

Les quatre bactéries sélectionnées formant des biofilms stables en conditions statiques et dynamiques sur différents supports (*Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009, *Shewanella* sp. IV3014, *Roseovarius* sp. VA014) ont été caractérisées d'un point de vue macroscopique et microscopique.

### 1. Observations macroscopiques

Le tableau 12 ci-dessous regroupe les observations macroscopiques des colonies des quatre bactéries cultivées sur milieu gélosé Zobell.

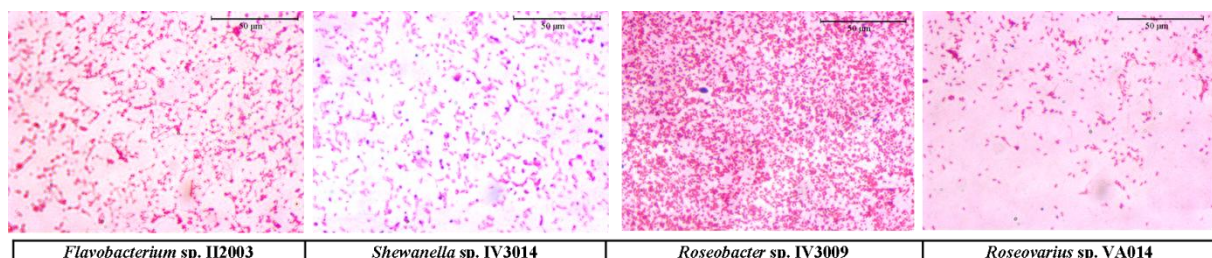
**Tableau 12 : Observation macroscopique des colonies des quatre bactéries marines sélectionnées**



	<i>Flavobacterium</i> sp. II2003	<i>Roseovarius</i> sp. VA014	<i>Roseobacter</i> sp. IV3009	<i>Shewanella</i> sp. IV3014
Couleur	Orange	Blanche	Jaune pâle	Marron
Forme	Ronde	Ronde	Ronde	Ronde
Aspect surface	Bombée	Bombée	Bombée	Bombée
Bord	Régulier	Régulier	Régulier	Régulier
Taille	~2 mm	~ 2 mm	< 1 mm	<1mm
Opacité	Opaque	Opaque	Translucide	Opaque
Consistance	Gel-Adhère la gélose	Crémeuse	Crémeuse	Crémeuse
Types de colonies	Colonies S	Colonies S	Colonies S	Colonies S
Catalase	Catalase -	Catalase -	Catalase -	Catalase -
Oxydase	Oxydase -	Oxydase +	Oxydase -	Oxydase -

### 2. Observations microscopiques et type respiratoire

L'observation microscopique des cellules montrent que les quatre souches sont de petits bacilles à Gram négatif (figure 21). La description microscopique des cellules est présentée dans le tableau 13. Les quatre bactéries sont aérobies strictes.



**Figure 21 : Cellules des quatre bactéries marines après coloration de Gram**

**Tableau 13 : Morphologies des cellules par observation microscopique**

	<i>Flavobacterium</i> sp. II2003	<i>Shewanella</i> sp. IV3014	<i>Roseobacter</i> sp. IV3009	<i>Roseovarius</i> sp. VA014
Forme	Petit bacille	Petit bacille	Petit bacille	Petit bacille
Gram	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -
Regroupement	En chainettes	Pas de regroupements spécifiques	Pas de regroupements spécifiques	Pas de regroupements spécifiques

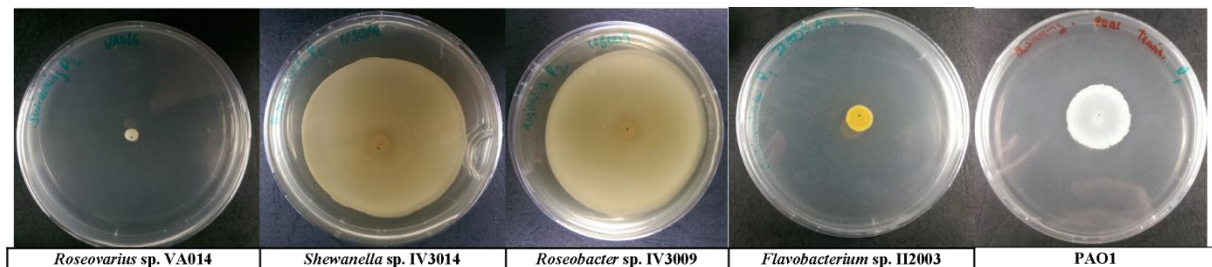
### 3. Test de motilité/mobilité

#### 3.1 Etat Frais

Les observations microscopiques des états frais de chacune des souches ont montré que seules deux bactéries, *Roseovarius* sp. VA014 et *Flavobacterium* sp. II2003, sont mobiles en milieu liquide ce qui suggère qu'elles possèdent des flagelles. *Roseovarius* sp. VA014 se déplace dans tous les sens témoignant d'une ciliature péritriche. *Flavobacterium* sp. II2003 effectue des mouvements dans un seul sens, suggérant une ciliature monotriche.

#### 3.2 Test sur Gélose

Pour les tests de mobilité en milieu gélosé (voir Annexe 1), *Pseudomonas aeruginosa* sp. PAO1 a été utilisé en tant que témoin positif pour le « Swimming », « Swarming » et « Twitching ».



**Figure 22 : Test sur gélose de la mobilité par Swimming**

La figure 22 montre que seules les souches *Shewanella* sp. IV3014 et *Roseobacter* sp. IV3009 présentent un large halo circulaire autour du point d'inoculation comme observé pour le contrôle positif témoignant d'une mobilité de type Swimming. *Flavobacterium* sp. II2003 présente aussi un halo mais moins large autour de la piqure sur la gélose. *Roseovarius* sp. VA014 ne présente pas ce type de mobilité.

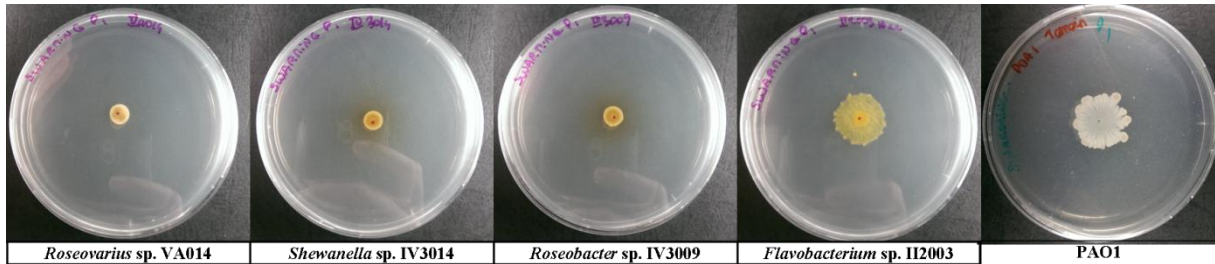


Figure 23 : Test sur gélose de la mobilité par Swarming

La figure 23 montre que seule la bactérie *Flavobacterium* sp. II2003 présente un halo comparable à celui du témoin positif, ce qui signifie qu'elle utilise le Swarming comme mode de mobilité sur milieu gélosé.

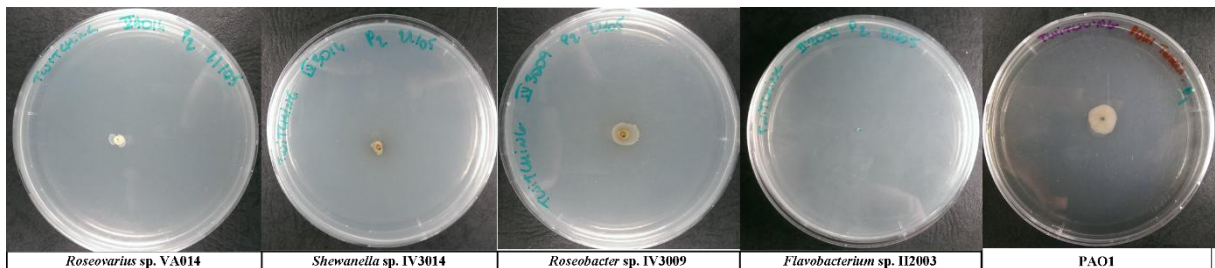


Figure 24 : Test sur gélose de la mobilité par Twitching

La figure 24 montre que les quatre bactéries sélectionnées n'ont pas migré sur la gélose. Aucune ne se déplace donc par Twitching.



***Partie II : Interactions  
bactéries / bactéries***

---



Actuellement, la recherche pour la prévention et le traitement des biofilms dans divers milieux industriels et cliniques est très active et de nombreuses pistes pour de nouvelles molécules antibiofilm naturelles isolées de plantes et de macroorganismes marins ont été identifiées (Francolini & Donelli, 2010; Buommino et al., 2014). En revanche, les composés antibiofilm marins d'origine microbienne sont moins explorés.

Dans un travail précédent (Doghri et al., submitted ; Partie 1 de la thèse), nous avons criblé la collection de bactéries marines cultivables en fonction des capacités de chacune des bactéries à former des biofilms stables. *Flavobacterium* sp. II2003 (issue de la collection du biofilm de la vasière) et *Roseovarius* sp. VA014 (issue de la collection du biofilm des structures métalliques) ont été utilisés pour l'étude des interactions entre bactéries.

Dans cette partie de l'étude, notre objectif était de trouver une bactérie marine, isolée de chaque type de biofilm, sécrétant des composés inhibiteurs ou stimulateurs des biofilms des bactéries modèles sélectionnées. Afin de diminuer le nombre de tests, des cultures de souches (d'un même biofilm) mélangées en pool d'environ 10 bactéries, issues de la même zone d'échantillonnage, ont été effectués. Nous avons, dans un premier temps, sélectionné un pool présentant une forte activité inhibitrice contre chaque type de biofilm et dans un second temps les surnageants des bactéries qui constituaient les pools ont été testé individuellement (Voir partie A). Nous avons focalisé la poursuite de nos travaux sur l'étude des interactions entre deux couples de bactéries, l'un issu du biofilm des structures métalliques corrodées, d'une part et l'autre issu du biofilm benthique, d'autre part. Les modes d'action ont été étudiés et les molécules actives ont été caractérisées biochimiquement. Ces résultats sont présentés dans deux manuscrits (Voir partie B).

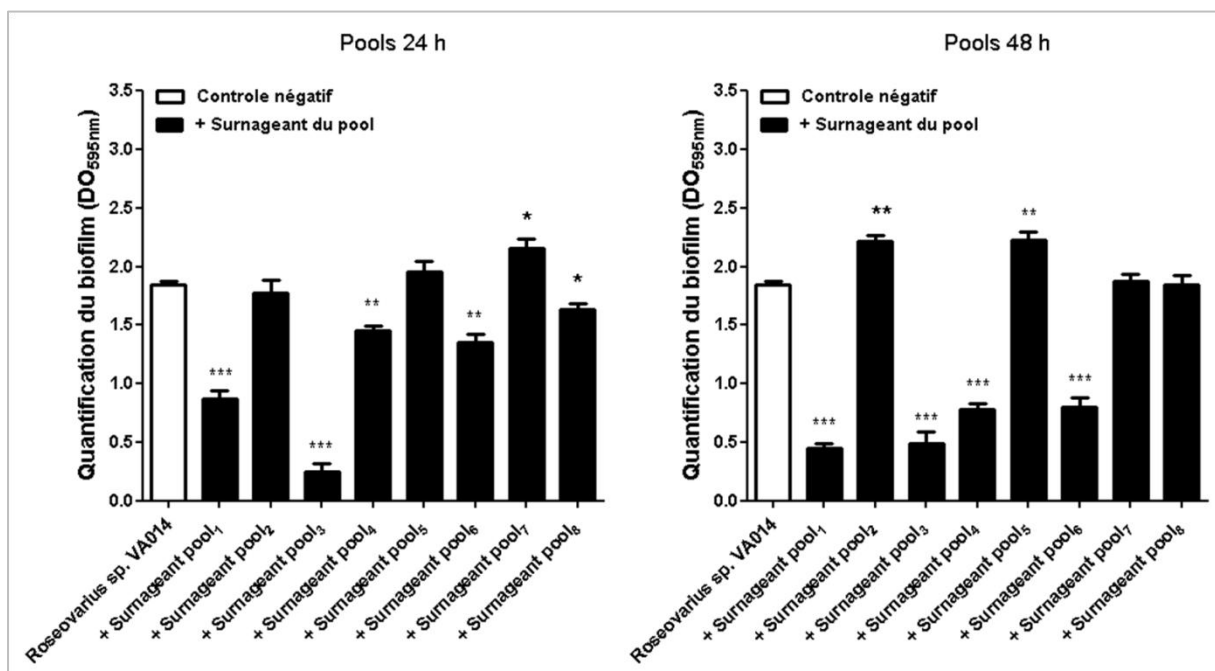
## I. Bactéries du biofilm des structures métalliques corrodées

### A/ Effet du sécrétome de bactéries cultivées en pools sur la capacité à former des biofilms et la croissance de *Roseovarius* sp. VA014

(Protocoles en Annexe 2)

#### 1. Effet des surnageants des pools sur la formation de biofilm

Tous les pools réalisés à partir de la collection des bactéries du biofilm des structures métalliques ont été testés contre le biofilm de *Roseovarius* sp.VA014. Les résultats sont illustrés dans la figure 25.



**Figure 25 : Effet des surnageants sur la formation de biofilm de *Roseovarius* sp. VA014**

Plusieurs effets inhibiteurs ont été obtenus. Le pool 3 présente le plus important pourcentage d'inhibition du biofilm dans ces conditions (80%) aussi bien à 24h qu'à 48h de culture.

## 2. Effet sur la croissance

Les surnageants présentant des activités intéressantes sur la formation des biofilms ont été testés sur la croissance des cellules de *Roseovarius* sp. VA014 en planctonique. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 26. Le surnageant du pool 3 présente, comme la plupart des sécrétomes testés, une inhibition partielle de la croissance de *Roseovarius* sp.

Le pool 3 (24 h) a été sélectionné pour la suite des travaux.

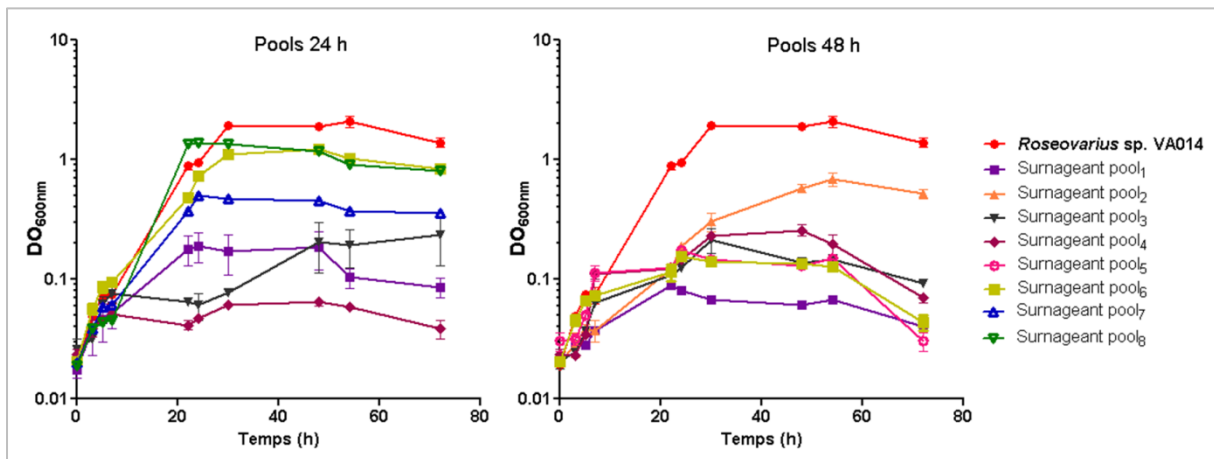


Figure 26 : Effet des surnageants des pools sur la croissance de *Roseovarius* sp. VA014

## 3. Fractionnement du pool sélectionné

Les bactéries constituant le pool 3 ont été cultivées individuellement et les surnageants collectés ont été testés contre *Roseovarius* sp. VA014. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 27.

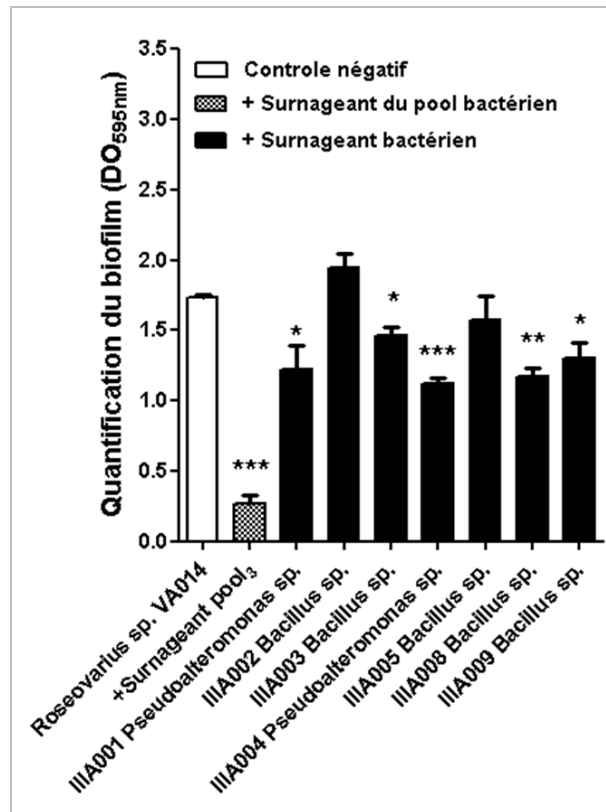


Figure 27 : Fractionnement du pool 3

Après fractionnement, l'effet le plus significatif a été obtenu avec le surnageant de *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004. Il a donc été sélectionné pour la suite de l'étude (Article II).

**B/ Article II: Antibiofilm activity of a marine *Pseudoalteromonas* bacterium against a *Roseovarius* strain**

Ibtissem Doghri<sup>1</sup>, Zhao Jean Michel<sup>1</sup>, Alexis Bazire<sup>2</sup>, Alain Dufour<sup>2</sup>, Florie Desriac<sup>2</sup>, Ingrid Fruitier<sup>1</sup>, Stéphanie Bordenave<sup>1</sup>, Nicolas Bridiau<sup>1</sup>, Marianne Graber<sup>1</sup>, Isabelle Lanneluc<sup>1,\*</sup>, Sophie Sablé<sup>1,\*</sup>

Ibtissem Doghri<sup>1</sup>, [ibtissem.doghri@univ-lr.fr](mailto:ibtissem.doghri@univ-lr.fr)

Alexis Bazire<sup>2</sup>, [alexis.bazire@univ-ubs.fr](mailto:alexis.bazire@univ-ubs.fr)

Alain Dufour<sup>2</sup>, [alain.dufour@univ-ubs.fr](mailto:alain.dufour@univ-ubs.fr)

Florie Desriac<sup>2</sup>, [floriesdesriac@hotmail.fr](mailto:floriesdesriac@hotmail.fr)

Ingrid Fruitier<sup>1</sup>, [ingrid.fruitier@univ-lr.fr](mailto:ingrid.fruitier@univ-lr.fr)

Stéphanie Bordenave<sup>1</sup>, [sbordena@univ-lr.fr](mailto:sbordena@univ-lr.fr)

Nicolas Bridiau<sup>1</sup>, [nicolas.bridiau@univ-lr.fr](mailto:nicolas.bridiau@univ-lr.fr)

Marianne Graber<sup>1</sup>, [marianne.graber@univ-lr.fr](mailto:marianne.graber@univ-lr.fr)

Sophie Sablé<sup>1,\*</sup>, [sophie.sable@univ-lr.fr](mailto:sophie.sable@univ-lr.fr)

Isabelle Lanneluc<sup>1,\*</sup>, [isabelle.lanneluc@univ-lr.fr](mailto:isabelle.lanneluc@univ-lr.fr)

<sup>1</sup> Univ. La Rochelle, UMR 7266 CNRS, LIENSs, F-17042 La Rochelle cedex 01, France.

<sup>2</sup> Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France.

\* S. Sablé and I. Lanneluc equally contributed to this work.

**Corresponding author**

Isabelle Lanneluc, Univ. La Rochelle, UMR 7266 CNRS, LIENSs, F-17042 La Rochelle cedex 01, France. E-mail: [sophie.sable@univ-lr.fr](mailto:sophie.sable@univ-lr.fr)

**Keywords**

Antibiofilm, marine bacteria, *Pseudoalteromonas*, *Roseovarius*, peptide, pathogens

## **Introduction**

In the marine environment, submerged surfaces are the subject of active bacterial colonization. Once attached to the substratum, the bacterial communities form rapidly biofilms and secrete extracellular polymeric substances (EPS) which are major components of the biofilm matrix. Rich in polysaccharides, proteins, lipids, DNA, RNA and water, this matrix protects the microbial cells and insures the stabilization of the biofilm (Costerton et al., 1999; Davies, 2003; Flemming and Wingender, 2010).

Biofilms have great economic importance. They are involved in several infectious diseases both in humans and animals and are present in a wide range of ecosystems (food industries, medical equipments and natural environments) (Francolini and Donelli, 2010; Lequette et al., 2010). Bacteria living in biofilm induce persistent chronic infections because biofilm structure protects against stress, antibiotics and host immune system (Costerton et al., 1999; Dang et al., 2000; Davies 2003). In the marine environment, biofilms on surfaces such as ship hulls serve as a reservoir and means of dissemination for pathogenic bacteria (Shikuma and Hadfield, 2010). Moreover, biofilms can damage maritime infrastructures through the phenomenon of biocorrosion (Compère, 1999). Fouling of ship hulls has also an important economic impact due to increased fuel consumption and maintenance (Schultz et al., 2011). The development of new strategies for the prevention and the treatment of adhesion and biofilm formation is therefore essential. The traditional approach to prevent biofilm formation consists in using biocides that have mostly been developed to target exponentially growing planktonic microorganisms, but these substances are poorly effective against biofilms (Beloin et al., 2014). Moreover, the toxic substances used as antifouling can be harmful to the natural environment (Dobretsov et al., 2006). Alternative preventive and curative approaches are currently being developed to specifically target mechanisms involved in biofilm formation or biofilm tolerance towards antimicrobials (Francolini and Donelli, 2010; Beloin et al., 2014; Buommino et al., 2014). For example, enzymes effectively inhibiting biofilm formation and deconstructing pre-existing biofilms were shown to directly target the components of biofilm matrix by degrading the EPS (Kaplan, 2010). Furthermore, this important field of investigation requires the development of environmentally friendly antibiofilm molecules (Dobretsov et al., 2006; Estrela et al., 2009; Buommino et al., 2014). Marine microbes are promising potential sources of such compounds as they can produce substances that inhibit

the attachment of microorganisms and thus the settlement of invertebrate larvae and macroalgal spores (Dobretsov et al., 2006).

Marine bacteria belonging to the genus *Pseudoalteromonas* are known to produce a variety of compounds of biotechnological interest, including antibiofilm molecules (Holmstrom and Kjelleb, 1999; Holmstrom et al., 2002). Recently, antibiofilm activity secreted by *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 isolated from glass slides immersed in the Morbihan gulf (Brittany, France) (Grasland et al., 2003) and *Pseudoalteromonas* sp. D41 isolated from a Teflon coupon immersed in the Bay of Brest (Brittany, France) (Pradier et al., 2005) were characterized (Dheilly et al., 2010; Klein et al., 2011). Likewise, the Antarctic marine bacterium *P. haloplanktis* TAC125 was shown to strongly inhibit the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* (Papa et al., 2013).

*Roseovarius* sp. VA014 strain was isolated from the bacteria associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel (Lanneluc et al., 2015). This bacterium develops a stable biofilm on steel, polystyrene and glass surfaces (Doghri et al., submitted). Furthermore, members of Alphaproteobacteria (mainly *Roseovarius* and *Roseobacter* strains) are considered as pioneer surface colonizers, particularly on metallic surfaces (Dang et al., 2011). The presence of *Roseovarius* sp. during early colonization events indicate that these bacteria would play an important role in the formation of marine biofilms by influencing the establishment of other colonizers in this environment.

In the current study, the marine *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 strain was identified as producing a high antibiofilm activity against *Roseovarius* sp. VA014. The characterization of this activity showed that *Pseudoalteromonas* sp. exoproducts especially inhibited bacterial adhesion without killing bacteria or inhibiting their growth. The proteinaceous active molecule was purified and tested against broad bacterial spectrum which demonstrated the great potential of this novel molecule.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial strains and growth conditions**

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. The *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 strain producing antibiofilm activity and the target *Roseovarius* sp. VA014 strain were isolated from the same habitat, that is corroded carbon steel coupons immersed in La Rochelle

harbor (Atlantic coast, France) (Lanneluc et al., 2015). Marine isolates were grown in Zobell broth (pastone Bio-Rad, France; 4 g l<sup>-1</sup>; yeast extract Bio-Rad, France; 1 g l<sup>-1</sup>; sea salts Sigma, USA 30 g l<sup>-1</sup>) at 22°C with shaking (150 rpm). Luria-Bertani broth (Difco, France) was used for the growth of non-marine strains, at 37°C or 30°C, with shaking (150 rpm). Solid media were prepared by adding agar (12 g l<sup>-1</sup>, Biokar, France).

**Table 1. Strains used in this study**

Strain	Reference and/or source	Culture conditions
<b>Non marine strains</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> AH478	Malone et al., 2009	Luria-Bertani 37°C
<i>S. aureus</i> ATCC27217	ATCC	
<i>S. aureus</i> RN4220	Nair et al., 2011	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Klausen et al., 2003	
<i>P. aeruginosa</i> PA14	He et al., 2004	
<i>Yersinia enterocolitica</i> CIP106.676	CIP	
<i>Bacillus subtilis</i> ND Food	Bridier et al., 2011	
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407	Sheppard et al., 2013	
<b>Marine strains</b>		
<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	Grasland et al., 2003 / Morbihan Gulf , France	Zobell 22°C
<i>Micrococcus luteus</i>	LBCM	
<i>Zobellia galactanivorans</i>	LBCM	
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2039	DSMZ	
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2040	DSMZ	
<i>Vibrio lentus</i> CIP107166T	CIP	
<i>Vibrio anguillarum</i> CIP6336T	CIP	
<i>Vibrio</i> sp. D01	Pradier et al., 2005 / Bay of Brest, France	
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. IIIA004	Lanneluc et al., 2015 / Atlantic harbor, France	
<i>Roseovarius</i> sp. VA014	Lanneluc et al., 2015 / Atlantic harbor, France	
<i>Roseobacter</i> sp. IV 3009	Doghri et al., submitted / Intertidal mudflat, France	
<i>Shewanella</i> sp. IV 3014	Doghri et al., submitted / Intertidal mudflat, France	
<i>Flavobacterium</i> sp. II2003	Doghri et al., submitted / Intertidal mudflat, France	
<i>Tenacibaculum</i> sp. II2021	Doghri et al., submitted / Intertidal mudflat, France	

ATCC: American Type Culture Collection; CIP: Institut Pasteur Collection; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen collection; LBCM: laboratory LBCM collection.



### **Preparation of the *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 supernatant (SN<sub>IIIA004</sub>)**

*Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 was grown overnight in Zobell broth complemented with 30 g l<sup>-1</sup> of glucose at 22°C with shaking during 48h (optimized conditions to increase the production of active compounds). The supernatant, named SN<sub>IIIA004</sub>, was harvested by centrifuging the culture (15 min, 7000 g at 4°C), filter sterilized through 0.22 µm (Millipore PVDF, Germany) and stored at - 80°C until use. For some experiments, SN<sub>IIIA004</sub> was concentrated 10-fold by lyophilization and named SN<sub>IIIA004</sub> 10X.

### **Antibiofilm assays**

**Microtiter plate assay (static conditions / polystyrene surface).** Bacterial biofilms (marine and non-marine bacteria) were grown in microtiter plates as previously described by Doghri et al. (submitted): cells of an overnight bacterial culture were centrifuged 10 min at 7000 g and resuspended in artificial seawater for marine strains or saline solution (NaCl 9 g l<sup>-1</sup>) for non-marine strains, to a final optical density at 600nm (OD<sub>600</sub>) of 0.25. 150 µl of the resulting suspensions were then loaded per well of a 96-well microtiter plates (MICROTEST™ 96, Falcon, Germany). After a bacterial adhesion step of 2 h at 22°C (marine bacteria) or 30°/37°C (non-marine bacteria), the wells were gently washed three times with artificial seawater or saline solution and 150 µl of Zobell or LB medium were added to each well. After incubation at 22°C or 30°/37°C for 24h, the microplates were washed three times. Then, the bacterial biofilms were stained with a 0.8% crystal violet solution for 20 min and rinsed with ultra-pure water until the wash-liquid was clear. Absorbed crystal violet was then eluted from attached cells with 96% ethanol (150 µl / well) and the quantification was carried out by measuring the OD<sub>595nm</sub>. To investigate the effect of SN<sub>IIIA004</sub> on bacterial adhesion and biofilm formation, wells were inoculated with biofilm-forming cells resuspended in a solution of 50% SN<sub>IIIA004</sub> and 50% artificial seawater. After a 2 h adhesion step, biofilm formation was performed as described above.

**Flow cells assay (dynamic conditions / glass surface).** *Roseovarius* sp. VA014 was grown on glass slides in three-channel flow cells (channel dimensions 1 by 4 by 40 mm, Technical University of Denmark Systems Biology, Denmark) as previously described (Doghri et al., submitted): flow cells were inoculated with overnight bacterial cultures diluted in artificial

seawater to a final OD<sub>600</sub> of 0.1. Bacteria were allowed to attach to the substratum (microscope glass coverslip of 24 x 50 st1, KnittelGlasser, Germany) during 2 h at 22°C without medium flow. The channels were then washed to remove non-attached cells by applying a flow of artificial seawater for 15 min at a rate of 2 ml h<sup>-1</sup> and biofilm growth was performed under a constant flow of Zobell (2 ml h<sup>-1</sup>) for 24 h at 22°C.

To investigate the effect of SN<sub>III A004</sub> on adhesion and biofilm formation of *Roseovarius* sp. VA014, several protocols were tested. (i) A solution of 50% SN<sub>III A004</sub> and 50% artificial seawater was injected without bacterial strains into the flow cell channels and left for 2 h at 22°C without flow to coat the glass surface. Then, channels were rinsed with artificial seawater before inoculating *Roseovarius* sp. VA014 bacteria and performing biofilms as described before. (ii) Flow cells were inoculated with *Roseovarius* sp. VA014 cultures grown 24 h and resuspended in a solution of 50% SN<sub>III A004</sub> and 50% artificial seawater to a final OD<sub>600</sub> of 0.1. After the 2-h adhesion step, biofilm formation was performed as initially described. (iii) SN<sub>III A004</sub> was injected in the channels after the *Roseovarius* sp. VA014 biofilm maturation step and left for 2 h under static conditions at 22°C.

Microscopic observations were performed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a TCS-SP2 system (Leica Microsystems). The biofilms formed were observed by staining cells with 5 µM Syto 61 red during 10 min. The biofilm stacks were analyzed with COMSTAT software (developed in MATLAB, Heydorn et al., 2000) to estimate the maximal and average thicknesses (µm) and the biovolume (µm<sup>3</sup> µm<sup>-2</sup>) of biofilm.

### **Antibacterial assays**

**Agar well diffusion assay.** SN<sub>III A004</sub> activity was assayed on the bacterial growth by adapting the agar well diffusion assay previously described by Sablé et al., (2000). Solid nutrient plates (15 ml) were inoculated with approximately 10<sup>7</sup> of the target bacteria cells. Sterile glass rings (4 mm inside diameter) were placed on agar medium and filled with 30 µl of filter-sterilized samples (SN<sub>III A004</sub> and SN<sub>III A004</sub> 10X). The plates were incubated for 48 h at the optimum growth temperature for each bacterium and clear zones of growth inhibition were measured.

**Liquid antibacterial assay.** Target bacteria grown overnight were resuspended in a solution of 50% SN<sub>III A004</sub> and 50% artificial seawater at an OD<sub>600nm</sub> of 0.25. After incubation for 2h, an aliquot of the cell suspension was serially diluted and 100 µl of each dilution were then plated to count the colony forming units (CFU). The remaining not diluted bacterial suspension was

centrifuged and resuspended at 20% into fresh medium. Growth was monitored by measuring the absorbance of the cultures at 600 nm.

### **Microbial adhesion to solvent (MATS) assays**

The hydrophobic/hydrophilic and Lewis acid-base characteristics of bacterial surface were determined using the MATS method described by Bellon-Fontaine et al., (1996). This partitioning method is based on the comparison between microbial cell affinity to couples of solvents. In each pair, one solvent is a monopolar solvent, the other is an apolar solvent, and both must have similar Lifshitz-van der Waals surface tension components. The monopolar solvent can be acidic (electron accepting) or basic (electron donating). The following couples were used: dichloromethane (electron accepting)/tetradecane and ethyl acetate (electron donating)/decane. All solvents were obtained from Sigma-Aldrich (USA) and were of the highest purity grade. Differences between the results obtained with dichloromethane and tetradecane, on the one hand, and between ethyl acetate and decane, on the other hand, would respectively indicate the electron donor and the electron acceptor character of the bacterial surface. The percentage of cells adhered to tetradecane was used as a measure of cell surface hydrophobicity. Experimentally, a *Roseovarius* sp. VA014 suspension, containing approximately  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$  ( $\text{OD}_{400 \text{ nm}} = 0.8$ ), was prepared in artificial seawater. 1.5 ml of each bacterial suspension was manually mixed manually for 10 s and vortexed for 120 s with 0.25 ml of the solvent under investigation. The mixture was allowed to stand for 15 min to ensure complete separation of the two phases. The solvent phase was carefully removed and the OD of the aqueous phase was measured at 400 nm. The solvent affinity percentage of cells to each solvent was calculated by  $\% \text{ Affinity} = (1 - A/A_0) \times 100$ , where  $A_0$  is the  $\text{OD}_{400 \text{ nm}}$  of the bacterial suspension before mixing and A is the  $\text{OD}_{400 \text{ nm}}$  after mixing.

### **Physico-chemical characterization of the active compound(s)**

To elucidate the biochemical nature of the active compound(s), SN<sub>III A004</sub> was incubated at 37°C in the presence of various enzymes to digest proteins, lipids or nucleic acids. Proteinase K or pronase E was added at a final concentration of 1 mg  $\text{ml}^{-1}$  and the reaction was incubated for 1 h. Lipase acrylic resin form was used at a final concentration of 2 mg  $\text{ml}^{-1}$  and the reaction was incubated for 48 h under shaking. DNaseI (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) or RNaseA (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) was added for 12 h.  $\text{NaIO}_4$  was used at a final concentration of 20 mM to hydrolyze

polysaccharides by cleaving the C-C bonds and by oxidizing the carbon of vicinal hydroxyl groups (Mack et al., 1994, 1996). After an incubation for 2 h at 37°C, the excess of NaIO<sub>4</sub> was neutralized with ethylene glycol (1:100) (Babor et al., 1972) for 2 h at 37°C and the treated samples were dialysed (1000 Da, Spectrum Labs.com, USA). To evaluate the heat sensibility, SN<sub>III A004</sub> was incubated for 1 h at 37°C, 30 min at 50°C, 70°C or 100°C. All treated samples were then assayed for antibiofilm activity by using the microtiter plate assay as described before.

Concentrations of protein solutions were determined by the bicinchoninic acid method (BC protein assay kit, Sigma-Aldrich, USA), using bovine serum albumin as the standard.

### **Biosurfactant assay**

In order to detect the presence of biosurfactant in SN<sub>III A004</sub>, we used the drop-collapse test as described by Tugrul and Cansunar, (2005). Briefly, drops of SN<sub>IV 2006</sub> were placed in wells of a microtiter plate coated with sunflower oil. Drops containing biosurfactant would collapse whereas non-surfactant-containing drops would remain stable. Diluted liquid hand washing cream and distilled water drops were used as controls.

### **Purification of the SN<sub>III A004</sub> antibiofilm compound**

A two steps purification protocol was used. In the first step, the crude supernatant was applied to a HyperSep™ C<sub>18</sub> solid phase extraction column (500 mg, 6 ml, Thermo Scientific, USA). Five stepwise elutions were performed with 100% milli-Q water, 20%, 40%, 60% acetonitrile in milli-Q water and 100% acetonitrile successively. After acetonitrile evaporation, the different fractions were tested for antibiofilm activity towards *Roseovarius* sp. VA014 by using the microtiter plate assay as described before.

The 20% acetonitrile active fraction was concentrated by lyophilisation and resuspension in milli-Q water, filtered and subjected to reverse-phase-high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). This second purification step was performed using a C18 column (3.5 µm, 150 × 4.6 mm, XSELECT CSH 130, Waters, Ireland) and conducted with a Waters system (600 Controller, 2996 Photodiode Array detector and 2707 Autosampler). Separation was performed with the following acetonitrile gradient in milli-Q water: 0 to 20% for 20 min, 20 to 50% for 2 min, 50 to 60% for 2 min, 60 to 90% for 2 min, at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Each eluted fraction, collected according to the chromatographic profile obtained at

215 nm, was concentrated by lyophilisation and resuspension in milli-Q water, and assayed for protein concentration and antibiofilm activity. The purified active fraction was then subjected to an additional RP-HPLC analysis. The applied gradient is shown on Figure 6B. All the collected fractions containing pure active molecule were pooled, concentrated by lyophilisation, and stored at -80°C.

### **Mass evaluation of the purified antibiofilm compound**

To evaluate the molecular weight, the active purified fraction was transferred into a Centricon tube (Millipore, USA) with a 3 KDa NMWL (Nominal Molecular Weight Limit) and centrifuged at 7500 g for 40 min at 4°C.

Mass spectrometric analysis was performed by the "Plateforme Protéomique Structurale et Fonctionnelle" in the Jacques Monod Institute (CNRS- Université Paris Diderot, France). The purified fraction was analyzed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight tandem mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF). The peptide mass obtained was examined using GPS Explorer (Matrix Science Ltd, London, UK) and querying a Swiss-Prot database (bacterial taxonomy).

### **Statistical analyses**

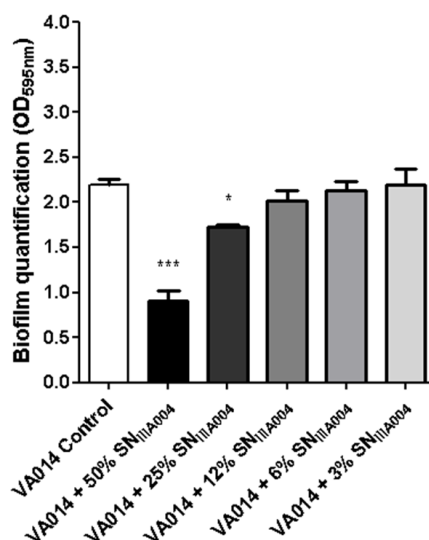
The standard deviations were calculated using Matlab software (Mathworks Inc., Natick, USA). The statistical analyses between different conditions were determined by the Student *t*-test and considered significant if *p* values are < 0.05.

## **Results**

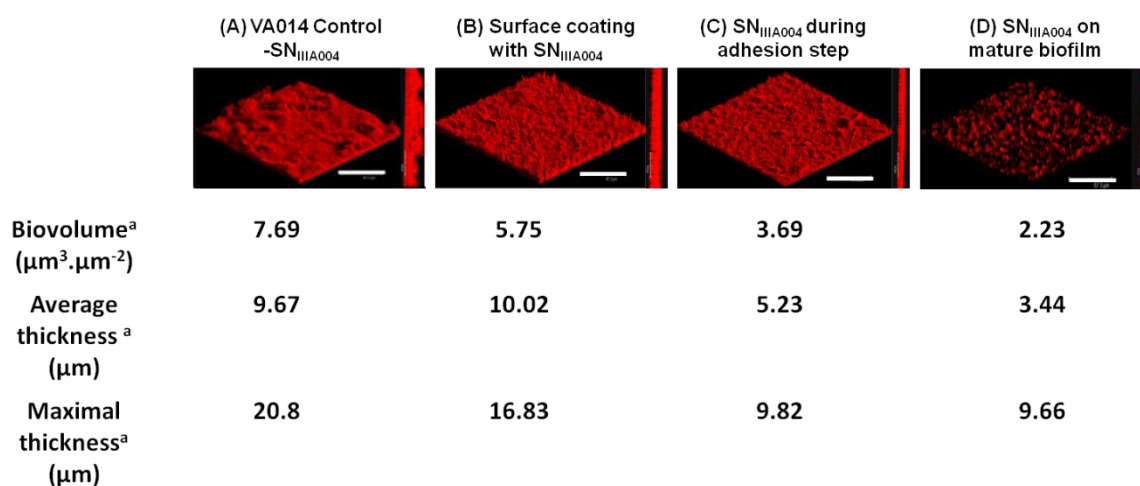
### ***Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 exoproducts inhibit biofilm formation by *Roseovarius* sp. VA014**

The *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 marine bacterium was isolated from a complex biofilm closely linked with corrosion products formed on carbon steel structures immersed in a French Atlantic harbor (Lanneluc et al., 2015). Here, we found that the culture supernatant of this strain, SN<sub>IIIA004</sub>, inhibited the biofilm formation of a bacterium sharing the same habitat, *Roseovarius* sp. VA014 (Figures 1 and 2). When we examined the effect of increasing

SN<sub>III A004</sub> concentrations on biofilm formation in 96-well microtiter plate wells, the *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 secretome showed a dose dependent antibiofilm effect (Figure 1). It prevented the biofilm formation of *Roseovarius* sp. VA014 by 50% at 1:2 dilution (50% SN<sub>III A004</sub>). This concentration was then used for further experiments.



**Figure 1. Inhibition of the *Roseovarius* sp. VA014 biofilm formation by SN<sub>III A004</sub> in microtiter plate.** *Roseovarius* sp. VA014 was mixed for 2 h with serial dilutions of SN<sub>III A004</sub> in 96-well microplates during the adhesion step. The *Roseovarius* sp. VA014 biofilms were then grown at 22°C for 24 h. Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>III A004</sub>. Bars represent means ± standard deviations for three replicates. \*: p < 0.05; \*\*\*: p < 0.001.



**Figure 2. Inhibition of the *Roseovarius* sp. VA014 biofilm formation by SN<sub>III A004</sub> in flow cells chambers.** The *Roseovarius* sp. VA014 biofilms were grown at 22°C for 24 h in Zobell broth after the 2-h adhesion step. (A) Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>III A004</sub>. (B)

SN<sub>III A004</sub> was added before the cells to coat the glass surface for 2 h. (C) SN<sub>III A004</sub> was added at the same time than the cells during the 2-h adhesion step. (D) SN<sub>III A004</sub> was added during 2 h, after biofilm maturation. For each experiment, 3D representation and a side view projection are shown. Average / maximal thickness and biovolumes were calculated, for each experiment, from COMSTAT analyses of 10 images stacks obtained from two independent biofilms. Standard deviations were lower than 10% of each value. Bars = 67.3  $\mu$ m.

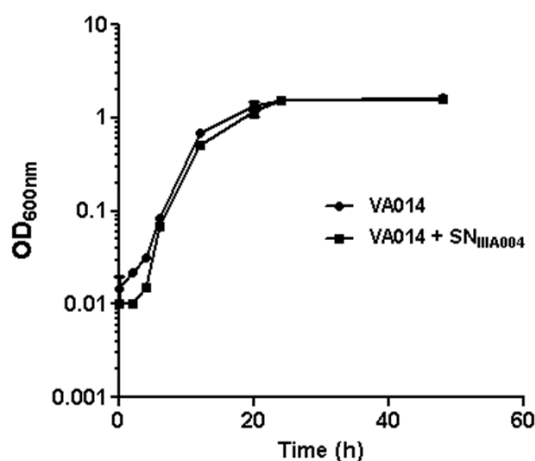
Although the polystyrene microtiter plate assay is a simple means of testing bacterial biofilm inhibition, it measures biofilm formation in static cultures, far from a naturally hydrodynamic environment. Then, the SN<sub>III A004</sub> activity was further studied in a flow cell model (on glass surface) that allowed the continuous flow of fresh nutrients into a chamber. The *Roseovarius* sp. VA014 strain was grown in flow cell in the absence or presence of SN<sub>III A004</sub> and biofilms were subsequently analyzed using confocal laser scanning microscopy (Figure 2). The addition of SN<sub>III A004</sub> before the *Roseovarius* sp. VA014 strain (*i-e* the glass-coating with SN<sub>III A004</sub>, Figure 2B) did not significantly prevent the biofilm formation, which demonstrated that SN<sub>III A004</sub> is devoid of components able to act on the abiotic surface to reduce bacterial adhesion. On the contrary, when added during the 2 h adhesion step, SN<sub>III A004</sub> halved the biofilm formation of *Roseovarius* sp. VA014 (Figure 2C), as observed in static conditions in microtiter plates (Figure 1). These findings demonstrated that SN<sub>III A004</sub> also had biofilm inhibitory activity in flow cell with dynamic medium and that the differences in surface (glass or polystyrene) did not influence the antibiofilm activity.

### **SN<sub>III A004</sub> disrupts the established bacterial biofilm**

While SN<sub>III A004</sub> exhibited an inhibitory activity against bacterial biofilm formation, it was of interest to explore whether the established biofilms were also sensitive to *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 exoproducts. This assay was performed by culturing the target strain in flow cell chamber and by adding SN<sub>III A004</sub> after the establishment of mature biofilm. The results showed a significant reduction of thickness and biovolume of *Roseovarius* sp. VA014 biofilm (Figure 2D): about 60% of mature biofilm disappeared. These findings demonstrated that SN<sub>III A004</sub> contained components able to modify the properties of the already formed biofilm and to destroy it.

### SN<sub>III A004</sub> is devoid of bactericidal activity against free-living cells

Since SN<sub>III A004</sub> inhibited biofilm formation and disrupted the preformed biofilm, we examined whether SN<sub>III A004</sub> contained an antibacterial substance that could be responsible for these effects. Using the agar well diffusion assay, neither crude SN<sub>III A004</sub> nor concentrated SN<sub>III A004</sub> 10X inhibited the growth of *Roseovarius* sp. VA014 (data not shown), indicating that SN<sub>III A004</sub> was neither bactericidal nor bacteriostatic toward this target strain. Furthermore, the pre-incubation of *Roseovarius* sp. VA014 cells in SN<sub>III A004</sub> during 2 h did not prevent the growth of the bacterium (Figure 3) and the number of culturable bacteria was the same whether the bacteria were incubated or not with the supernatant ( $6 \cdot 10^8$  CFU. ml<sup>-1</sup>). This demonstrated that the viability of planktonic bacteria was not affected by the *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 exoproducts. These results suggested that SN<sub>III A004</sub> did not reduce cell viability during the 2h-adhesion step and the subsequent biofilm formation stages.



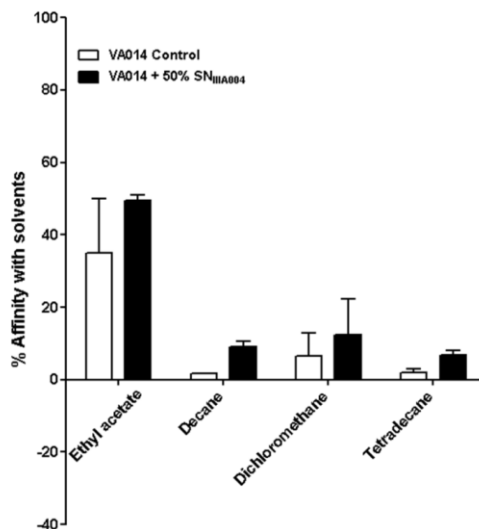
**Figure 3. Growth curves of *Roseovarius* sp. VA014 pre-incubated or not with SN<sub>III A004</sub>.** The growth was monitored by measuring the OD<sub>600nm</sub>. Values are averages of data from three independent experiments.

### SN<sub>III A004</sub> does not affect cell surface properties

Another hypothesis was that SN<sub>III A004</sub> could modify the properties of bacterial surface and thus affected cell adhesion. We used the MATS (Microbial Adhesion To Solvents) method to determine the hydrophobic/hydrophilic and Lewis acid/base characteristics of *Roseovarius* sp. VA014 surface, incubated or not with SN<sub>III A004</sub> during 2 h (Figure 4). This partitioning method is based on the comparison of bacterial cell affinity to a monopolar acidic or basic solvent and an apolar solvent. The solvent affinity percentages of cells to each solvent are shown in Figure 4. For each solvent, no significant affinity differences were observed between treated



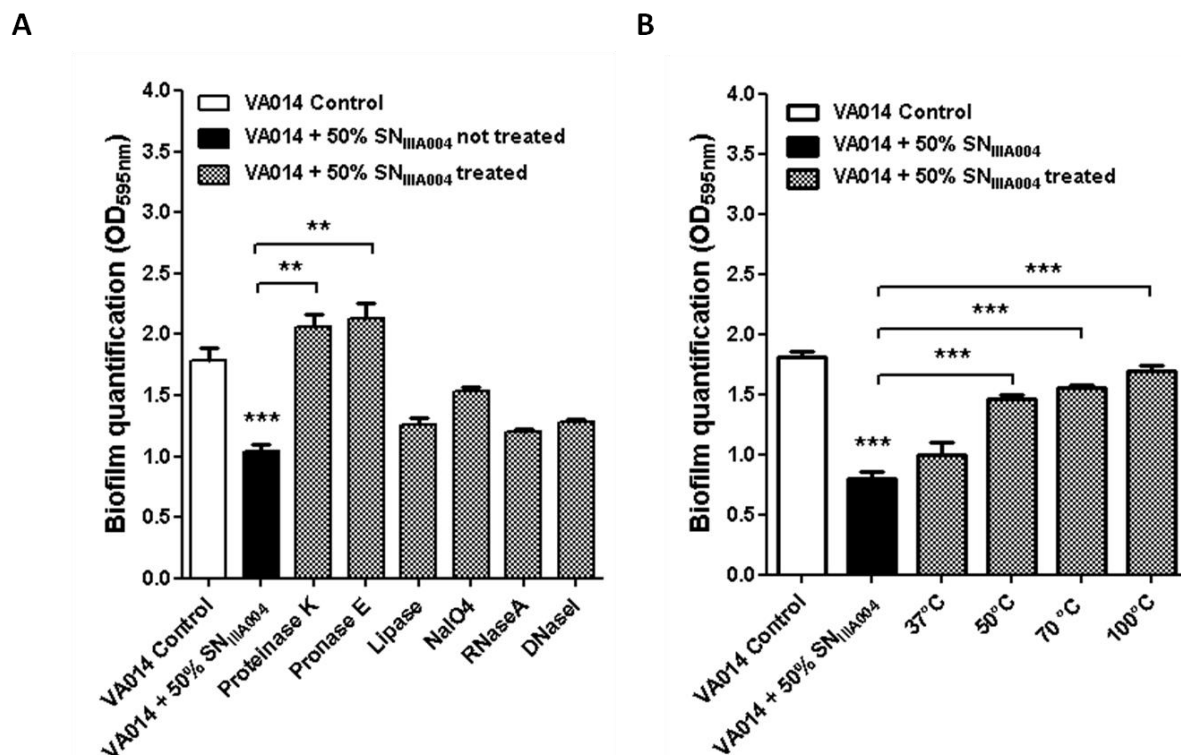
and untreated cells with SN<sub>III A004</sub>. In both cases, the *Roseovarius* sp. VA014 cells presented a hydrophilic character by showing a very low affinity for the apolar solvents (decane, tetradecane). Moreover, the affinity percentage for the basic polar solvent (ethyl acetate) was much higher than for decane, indicating that the cell surface presented an acidic character.



**Figure 4. Affinity of *Roseovarius* sp. VA014 cells to the six solvents used in the MATS method.** *Roseovarius* sp. VA014 cells were pretreated or not (control) with SN<sub>III A004</sub>. Two couples of solvents were used: ethyl acetate (basic) / decane and dichloromethane (acidic) / tetradecane. Affinity percentages were calculated from six experiments obtained from at least two independent treatments.

### Physico-chemical characteristics of SN<sub>III A004</sub> antibiofilm compounds

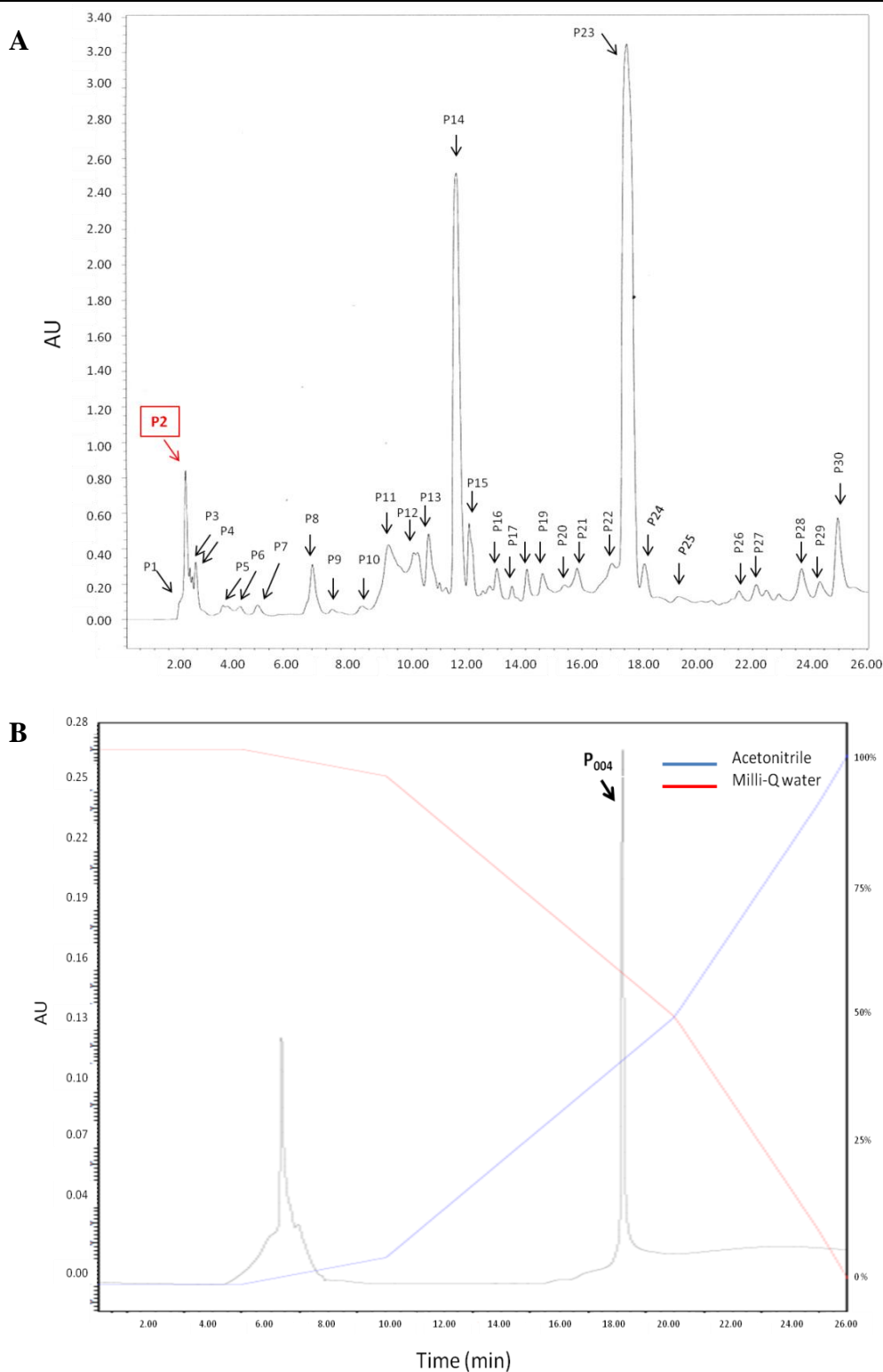
To gain information on the biochemical nature of the active compounds, we examined whether the antibiofilm molecules present in the *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 secretome retained their activity after different treatments (Figure 5). The activity of SN<sub>III A004</sub> was not significantly affected by the lipase, nucleases and NaIO<sub>4</sub> treatments (Figure 5A). Conversely, the antibiofilm activity against *Roseovarius* sp. VA014 was completely lost by treatments with proteinase K and pronase E. This finding was made both under static (Figure 5A) and dynamic (data not shown) conditions. The SN<sub>III A004</sub> antibiofilm compounds were also heat-sensitive (Figure 5B): the inhibitory effect was significantly affected from 50°C and clearly decreased with the increasing temperature. This clearly demonstrated the proteinaceous nature of the active compounds. Moreover, SN<sub>III A004</sub> drops did not collapse and remained stable on oil-coated surface, showing that no biosurfactant compound was present in SN<sub>III A004</sub>.



**Figure 5. Effect of various treatments on the antibiofilm activity of SN<sub>III</sub>A004.** Microtiter plate assay was used. (A) Effect of digestion of proteins (proteinase K, pronase E), lipids (lipase), polysaccharides (NaIO<sub>4</sub>) and nucleic acids (RNaseA, DNaseI) on the antibiofilm activity of SN<sub>III</sub>A004. (B) Effect of increasing heat treatments on the antibiofilm activity of SN<sub>III</sub>A004. Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>III</sub>A004. Bars represent means  $\pm$  standard deviations for three replicates. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### Isolation and purification of the antibiofilm molecule

The proteinaceous molecule responsible of the antibiofilm activity was purified to homogeneity from the stationary-phase culture supernatant of the *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 producer. The 20% acetonitrile fraction (50  $\mu$ g of proteins), obtained by solid-phase extraction on HyperSep C<sub>18</sub> cartridges, showed a specifically antibiofilm activity against *Roseovarius* sp. VA014. This fraction was concentrated by lyophilisation and then subjected to an accurate separation by two successive C<sub>18</sub> RP-HPLC assays. After each separation, only one fraction, corresponding to one OD peak (P2, 10  $\mu$ g of proteins, Figure 6A and P<sub>004</sub>, 3  $\mu$ g of proteins, Figure 6B), presented antibiofilm activity, showing that no other antibiofilm peptides were co-purified. From the final C<sub>18</sub> RP column, the active molecule was eluted in a single peak at 40 % of acetonitrile. The antibiofilm activity of the HPLC purified eluate treated by proteinase K was also highly affected (70% of loss, Figure 7). This confirmed the proteinaceous nature of the molecule responsible for the antibiofilm activity.

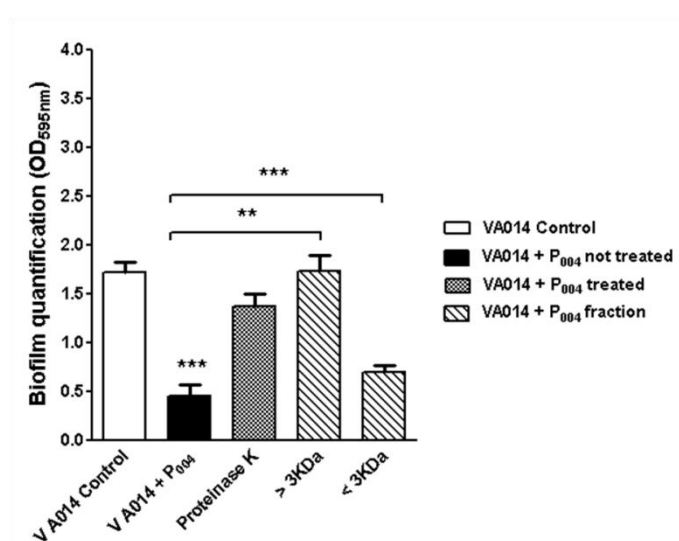


**Figure 6. RP-HPLC elution profile of the SN<sub>III</sub>A004 active fraction** (A) Chromatographic profile of the 20% acetonitrile active fraction eluted by solid-phase extraction on HyperSep C18 cartridges of SN<sub>III</sub>A004. (B) Chromatographic profile of the P2 active fraction eluted by the first RP-HPLC separation. Eluents were milli-Q water and acetonitrile.

## Mass spectrometry analysis and determination of the molecular weight of antibiofilm molecule

The purified eluate was submitted to a centrifugal Centricon filter that retains the components with a molecular weight higher than 3 KDa. The antibiofilm activity was detected in the filtrate only (Figure 7), clearly showing that the molecular weight of the active component was lower than 3 KDa.

Then, mass spectral measurements of the HPLC purified eluate using MALDI TOF-TOF revealed a single peak with a molecular mass of 2224,906 Da. This pure peptide was named P<sub>004</sub>.



**Figure 7. Effect proteinase K treatment on the P<sub>004</sub> antibiofilm peptide purified from SN<sub>III</sub>A004 and molecular weight evaluation.** Microtiter plate assay was used. P<sub>004</sub> was either treated with proteinase K or filtered in a Centricon tube with a 3 KDa NMWL (> 3KDa: retentate; < 3 KDa: filtrate). Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>III</sub>A004. Bars represent means  $\pm$  standard deviations for three replicates. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### Spectrum of action of the P<sub>004</sub> antibiofilm peptide purified from SN<sub>III</sub>A004

The microtiter plate assay was used to determine the spectrum of action of the pure peptide. P<sub>004</sub> (10  $\mu$ g) was assayed against 21 bacterial strains including marine strains and human pathogens (Table 1). All these strains were able to form biofilms in microtiter plates with an OD<sub>595nm</sub> > 1 after crystal violet staining. The percentages of inhibition of P<sub>004</sub> on monospecies biofilms are presented in Table 2. The most sensitive strains, with an inhibition percentage ranging from 62 to 81.5%, were both marine bacteria (*Roseovarius* sp., *Paracoccus* sp. and *Micrococcus luteus*) and well-known human pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Yersinia*

*enterocolitica* and *Pseudomonas aeruginosa*). A second group of bacteria, less sensitive (inhibition percentage from 12 to 45%), included another strain of *S. aureus*, two *Bacillus* strains and several marine bacteria belonging to the *Flavobacteriaceae* family (*Zobellia galactanivorans*, *Tenacibaculum* sp., *Flavobacterium* sp., and *Cellulophaga lytica*). Some strains were not sensitive to the P<sub>004</sub> biofilm-inhibiting peptide (inhibition percentage < 10%), especially marine bacteria of the *Vibrio* genus and one *Pseudomonas aeruginosa* strain.

**Table 2. Spectrum of action of the P<sub>004</sub> antibiofilm peptide purified from SN<sub>III</sub>A004**

Strain	P <sub>004</sub> (10 µg)
	Antibiofilm assays <sup>a</sup>
High inhibition level <sup>b</sup>	
<i>Roseovarius</i> sp. VA014	71.4 ± 2.2
<i>Staphylococcus aureus</i> AH478	71.4 ± 2.2
<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	62.2 ± 1.3
<i>Yersinia enterocolitica</i> CIP106.676	81.5 ± 5.8
<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	77.7 ± 1.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	80.9 ± 2.4
<i>Micrococcus luteus</i>	71.7 ± 8.3
Mild inhibition level <sup>b</sup>	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC27217	45.1 ± 5.3
<i>Zobellia galactanivorans</i>	42.7 ± 0.8
<i>Tenacibaculum</i> sp. II2021	40.2 ± 5.2
<i>Flavobacterium</i> sp. II2003	32.5 ± 1.7
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2039	26.3 ± 3.8
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2040	19.8 ± 2.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407	17.9 ± 1.8
<i>Bacillus subtilis</i> ND Food	12.3 ± 0.9
Non sensitive strains <sup>b</sup>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	-0.38 ± 0.02
<i>Shewanella</i> sp. IV3014	-1.9 ± 0.2
<i>Roseobacter</i> sp. IV3009	-21.1 ± 1.1
<i>Vibrio anguillarum</i> CIP6336T	5.2 ± 0.7
<i>Vibrio lentus</i> CIP107166T	5.8 ± 0.4
<i>Vibrio</i> sp. D01	-12.1 ± 0.2

<sup>a</sup> Inhibition percentage of biofilm formation in the presence of P<sub>004</sub> with microtiter plate assay.

<sup>b</sup> Groups distinguished on the basis of the inhibition percentage of biofilm formation in the presence of P<sub>004</sub>.

## Discussion

This study reports the isolation and characterization of a new antibiofilm compound from the *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 marine bacterium active against various monospecies bacterial biofilms. It is known that marine bacteria are a potential source of effective antibiofilm compounds (You et al., 2007). Some of them were shown to secrete in their environment antibiofilm molecules active against a wide range of Gram positive and Gram negative bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* (Rendueles et al., 2013). Here, we examined the in vitro activity of cell-free supernatant of *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 against the *Roseovarius* sp. VA014 marine strain isolated from the same habitat. This antibiofilm activity was characterized in microtiter plates (static conditions/polystyrene surface) and in flow cell chambers (dynamic conditions/glass surface). Both techniques showed the high antibiofilm potential of this supernatant. SN<sub>IIIA004</sub> was shown to display activity during two stages of biofilm formation: (i) when the supernatant was mixed with *Roseovarius* sp. VA014 cells during the 2h-adhesion step, biofilm growth was inhibited both on polystyrene and glass surfaces and (ii) when the supernatant was added after the *Roseovarius* sp. VA014 biofilm maturation, the mature biofilm was strongly dispersed. The antibiofilm effect of *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 exoproducts is particularly interesting because it combines several activities, as previously demonstrated by Shetye et al., (2014) for maltose derivatives that exhibited an inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation as well as a biofilm dispersion. Disturbing the multicellular structure of bacterial biofilm was suggested as the most promising way to increase antibiotic sensitivity of pathogens in biofilms (Costerton and Stewart, 2001). Interestingly, antibacterial assays with SN<sub>IIIA004</sub> demonstrated the lack of bactericidal or bacteriostatic action against free-living *Roseovarius* sp. VA014 cells. The antibiofilm activity of *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004, therefore, is likely to be mediated by mechanisms different from growth inhibition. By contrast, most of the known antibiofilm molecules are bactericidal or bacteriostatic as for instance the AlpP protein secreted by *Pseudoalteromonas tunicata* (Mai-Prochnow et al., 2004). Among the few natural molecules displaying antibiofilm activity without affecting cell viability, some polysaccharides (Jiang et al., 2011; Rendueles et al., 2013) and biosurfactants (Das et al., 2009) are well known. We showed that the SN<sub>IIIA004</sub> antibiofilm compound was not a surfactant molecule. We further investigated whether this compound could act by modifying the properties of bacterial cells and/or abiotic surfaces. MATS results clearly showed that SN<sub>IIIA004</sub> did not affect the surface

properties of the target *Roseovarius* sp. VA014 cells. Moreover, no glass-coating effect was observed with SN<sub>IIIA004</sub> compounds. All these findings suggested that the SN<sub>IIIA004</sub> antibiofilm compounds did not act on surfaces, whether or not biotic. Other possible mode of action could be considered. Since SN<sub>IIIA004</sub> antibiofilm action is effective during cell adhesion and on mature biofilm without affecting cell multiplication, the antibiofilm compounds could act as signaling molecules that modulate gene expression of target bacteria, as suggested for several antibiofilm polysaccharides (Rendueles et al., 2013). For instance, *Lactobacillus acidophilus* A4 polysaccharides downregulated several *E. coli* genes related to adhesive properties (curli genes) (Kim et al., 2009). Moreover, *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 exoproducts might block lectins or adhesins of fimbriae and pili on the surface of bacteria, as suggested for microbial branched polysaccharides (Zinger-Yosovich and Gilboa-Garber., 2009). In literature, several antibiofilm components were supposed to disrupt established biofilms by interfering with bacterial adhesins (Qin et al., 2009; Jiang et al., 2011). Among the major mechanisms that impair biofilm maturation, there are also the quorum-sensing (QS) inhibitors (Estrela et al., 2009; Beloin et al., 2014). Some enzymes such AHL-lactonases and AHL-acylases degrade signal QS molecules and thus stop the cell communication (Dong et al., 2002; Romero et al., 2008). Other kind of enzymes can directly target the extrapolymeric matrix by degrading its components such as polysaccharides or extracellular DNA. Thus, use of DNaseI (Hymes et al., 2013) or alpha-amylase (Kalpana et al., 2012) or Dispersin B (Kaplan et al., 2004) have been identified as efficient ways to disperse biofilms *in vitro* and *in vivo*.

The antibiofilm effect of SN<sub>IIIA004</sub> during the initial attachment is potentially due to a new molecule. The preliminary physico-chemical characterization supported the hypothesis of a proteinaceous compound because proteases and heat treatments impaired SN<sub>IIIA004</sub> capacity to inhibit biofilm formation. The antibiofilm peptide P<sub>004</sub> was then purified from *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 exoproducts and the mass of 2.224 kDa was determined. To date, no bacterial molecule with both this molecular weight and antibiofilm activity has been described. Marine bacteria belonging to the genus *Pseudoalteromonas* represent a rich source of biologically active substances with anti-microbial, anti-fouling, algicidal and various pharmaceutically-relevant activities (Bowman, 2007). Compounds produced include toxic proteins, polyanionic exopolymers, substituted phenolic and pyrrole-containing alkaloids, cyclic peptides and a range of bromine substituted compounds (Bowman, 2007). However, among the antibiofilm proteinaceous compounds synthesized by *Pseudoalteromonas* strains, only the 190-kDa autotoxic protein produced by *P. tunicata* D2 and designated AlpP was

purified and characterized (James et al., 1996; Mai-Prochnow et al., 2004). Recently, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and D41 were also identified as producing proteinaceous molecules with a specifically antibiofilm activity against a wide range of various bacterial biofilms (Dheilly et al., 2010; Klein et al., 2011). However, the authors reported that the antibiofilm molecules from SN<sub>3J6</sub> were eluted with 50% acetonitrile from a Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> cartridge while SN<sub>D41</sub> antibiofilm molecules were unable to be eluted from the same column either with acetonitrile or with other solvents. These findings support the hypothesis that the antibiofilm molecules of SN<sub>3J6</sub> and SN<sub>D41</sub> are different from the antibiofilm peptide P004 (eluted with 20% acetonitrile from a C<sub>18</sub> cartridge). Other antibiofilm peptides, different from ours, were recently described, but they were bactericidal, and were produced by granular hemocytes of a mangrove crab (peptide of 14 kDa, Sivakamavalli et al., 2015) or chemically synthesized (De Zoysa et al., 2015; Meira Ribeiro et al., 2015).

The new P<sub>004</sub> peptide presents a wide spectrum of action on various bacterial biofilms, with 71% of sensitive strains, including human pathogens *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia enterocolitica*. Then, the potential use of the P<sub>004</sub> peptide is not limited to the marine environment, and medical applications could be envisaged.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Conseil Général de la Charente Maritime (France) for the PhD grant of Ibtissem Doghri, the CPER littoral 2007-14, the CNRS EC2CO program MicroBiEn 2013-14, the Région Poitou-Charente and the Région Bretagne (France) and the European FEDER funds, for their financial support.

### **References**

1. Babor K, Kaláč V, Tihlárík K (1973) Periodate oxidation of saccharides. III. Comparison of the methods for determining the consumption of sodium periodate and the amount of formic acid formed. *Chem zvesti* 27: 676-680.
2. Beloin C, Renard S, Ghigo JM, Lebeaux D (2014) Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol* 18: 61-68.
3. Bellon-Fontaine MN, Rault J, van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf B: Biointerf* 7: 47-53.



4. Bowman JP (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs* 5: 220-241.
5. Buommino E, Scognamiglio M, Donnarumma G, Fiorentino A, D'Abrosca B (2014) Recent advances in natural product-based antibiofilm approaches to control infections. *Mini Rev Med Chem* 14: 1169-82.
6. Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R (2011) The Spatial Architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and *in situ* imaging. *PLoS One* 6: e16177.
7. Compère C (1999) Biofilms en milieu marin. *Tech Sci Meth* 11: 48-54.
8. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
9. Costerton JW, Stewart PS (2001) Battling biofilms the war is against bacterial colonies that cause some of the most tenacious infections known. The weapon is knowledge of the enemy's communication system. *Sci Am* 285: 74-81.
10. Dang H, Lovell CR (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66: 467-475.
11. Dang H, Chen R, Wang L, Shao S, Dai L, Ye Y, Guo L, Huang G, Klotz MG (2011) Molecular characterization of putative biocorroding microbiota with a novel niche detection of Epsilon- and Zetaproteobacteria in Pacific Ocean coastal seawaters. *Environ Microbiol* 13: 3059-3074.
12. Das P, Mukherjee S, Sen R, (2009) Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids Surf B Biointerfaces* 71: 183-186.
13. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-122.
14. De Zoysa GH, Cameron AJ, Hegde VV, Raghobama S, Sarojini V (2015) antimicrobial peptides with potential for biofilm eradication: synthesis and structure activity relationship studies of battacin peptides. *J Med Chem* 58: 625-639.
15. Dheilily A, Soum-Soutera E, Klein GL, Bazire A, Compere C, Haras D, Dufour A (2010) Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Appl Environ Microbiol* 76: 3452-3461.
16. Dobretsov S, Dahms HU, Qian PY (2006) Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling* 22: 43-54.

17. Doghri I, Rodrigues S, Bazire A, Dufour A, Akbar D, Sopena V, Lanneluc I, Sablé S  
Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm  
abilities and different biofilm 3D architectures. Submitted in BMC Microbiol.
18. Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH (2002) Identification of quorum-  
quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. Appl Environ  
Microbiol 68: 1754-1759.
19. Estrela AB, Heck MG, Abraham WR (2009) Novel approaches to control biofilm  
infections. Curr Med Chem 16: 1512-1530.
20. Flemming HC and Wingender J (2010) The biofilm matrix. Microbiol 8: 623-633.
21. Francolini I, Donelli G (2010) Prevention of biofilm-based medical-device related  
infections. FEMS Immunol Med Microbiol 59: 227-238.
22. Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallee-  
Rehel K, Haras D (2003) Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of  
Early-attached Marine Bacteria. Biofouling 19: 307-313.
23. He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J,  
Goodman HM, Rahme LG (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas*  
*aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal  
virulence genes. PNAS 101: 2530-2535.
24. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S  
(2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer  
program COMSTAT. Microbiology 146: 2395-407.
25. Holmstrom C, Kjelleberg S (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated  
with higher organisms and produce active extracellular agents. FEMS Microbiology  
Ecology 30: 285-293.
26. Holmstrom C, Egan S, Franks A, McCloy S, Kjelleberg S (2002) Antifouling  
activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. FEMS  
Microbiology Ecology 41: 47-58.
27. Hymes SR, Randis TM, Sun TY, Ratner AJ (2013) DNase inhibits *Gardnerella*  
*vaginalis* biofilms *in vitro* and *in vivo*. J Infect Dis 207: 1491-1497.
28. James SG, Holmstrom C, Kjelleberg S (1996) Purification and characterization of a  
novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. App Environ Microbiol 62:  
2783-2788.
29. 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.

30. Kalpana BJ, Aarthy S, Pandian SK (2012) Antibiofilm activity of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 167: 1778-1794.
31. Kaplan JB (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 89: 205-218.
32. Kaplan JB, Ragunath C, Velliyagounder K, Fine DH, Ramasubbu N (2004) Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents CH* 48: 2633-2636.
33. Kim, HS, Kim SM, Lee HJ, Park SJ, Lee KH (2009) Expression of the *cpdA* gene, encoding a 3',5'-cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase, is positively regulated by the cAMP-cAMP receptor protein complex. *J Bacteriol* 191: 922-930.
34. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen 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.
35. Klein GL, Soum-Soutera E, Guede Z, Bazire A, Compere C, Dufour A (2011) The antibiofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling* 27: 931-940.
36. Lanneluc I, Langumier M, Sabot R, Jeannin M, Refait Ph, Sablé S (2015) On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel. *Int Biodeterior Biodegrad* 99: 55-65.
37. Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C (2010) Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26: 421-431.
38. Mai-Prochnow A, Evans F, Dalisay-Saludes D, Stelzer S, Egan S, James S, Webb JS and Kjelleberg S (2004) Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl Environ Microbiol* 70: 3232-3238.
39. Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J, Laufs R (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* 62: 3244-3253.
40. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus*

*epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J Bacteriol 178: 175-183.

41. Malone CL, Boles BR, Lauderdale KJ, Thoendel M, Kavanaugh JS, Horswill AR (2009) Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. Journal of Microbiological Methods 77: 251-260.
42. Meira Ribeiro S, de la Fuente-Núñez C, Baquir B, Faria-Junior C, Franco OL, Hancock REW (2015) antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to  $\beta$ -lactam antibiotics. Antimicrob Agents CH 59: 3906-3912.
43. Nair D, Memmi G, Hernandez D, Bard J, Beaume M, Gill S, Francois P, Cheung AL (2011) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. J Bacteriol 193: 2332-2335.
44. Papa R, Parrilli E, Sannino F, Barbato G, Tutino ML, Artini M, Selan L (2013) Antibiofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. Res Microbiol 164: 450-456.
45. Pradier CM, Rubio C, Poleunis C, Bertrand P, Marcus P, Compère C (2005) Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy, and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. J Phys Chem 109: 9540-9549.
46. Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, Tolker-Nielsen T (2009) *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology 155: 2148-2156.
47. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM (2013) Antibiofilm polysaccharides. Environ Microbiol 15: 334-346.
48. Romero M, Diggle SP, Heeb S, Camara M, Otero A (2008) Quorum sensing activity in *Anabaena* sp. PCC7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase. FEMS Microbiol Lett 280: 73-80.
49. Sablé S, Pons A-M, Gendron-Gaillard S, Cottenceau G (2000) Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 66: 4595-4597.

50. Sheppard AE, Poehlein A, Rosenstiel P, Liesegang H, Schulenburg H (2013) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain 407 Cry-. *Genome Announc* 1: e00158-12.
51. Shetye GS, Singh N, Jia C, Nguyen CD, Wang G, Luk YY (2014) Specific maltose derivatives modulate the swarming motility of non swarming mutant and inhibit bacterial adhesion and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chembiochem: Eur J Chem Biol* 15: 1514-1523.
52. Shikuma NJ, Hadfield MG (2010) Marine biofilms on submerged surfaces are a reservoir for *Escherichia coli* and *Vibrio cholera*. *Biofouling* 26: 39-46.
53. Sivakamavalli J, Nirosha R, Vaseeharan B (2015) Purification and characterization of a cysteine-rich 14-kDa antibacterial peptide from the granular hemocytes of mangrove crab *Episesarma tetragonum* and its antibiofilm activity. *Appl Biochem Biotechnol*. In press.
54. Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WM (2011) Economic impact of biofouling on a naval surface ship, *Biofouling*, 27: 87-98.
55. Tugrul T, Cansunar E (2005) Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World J Microb Biot* 21: 851-853.
56. You J, Xue X, Cao L, Lu X, Wang J, Zhang L, Zhou S (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 1137-1144.
57. Zinger-Yosovich, KD, Gilboa-Garber N (2009) Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* and *Ralstonia solanacearum* lectins by plant and microbial branched polysaccharides used as food additives. *J Agric Food Chem* 57: 6908-6913.

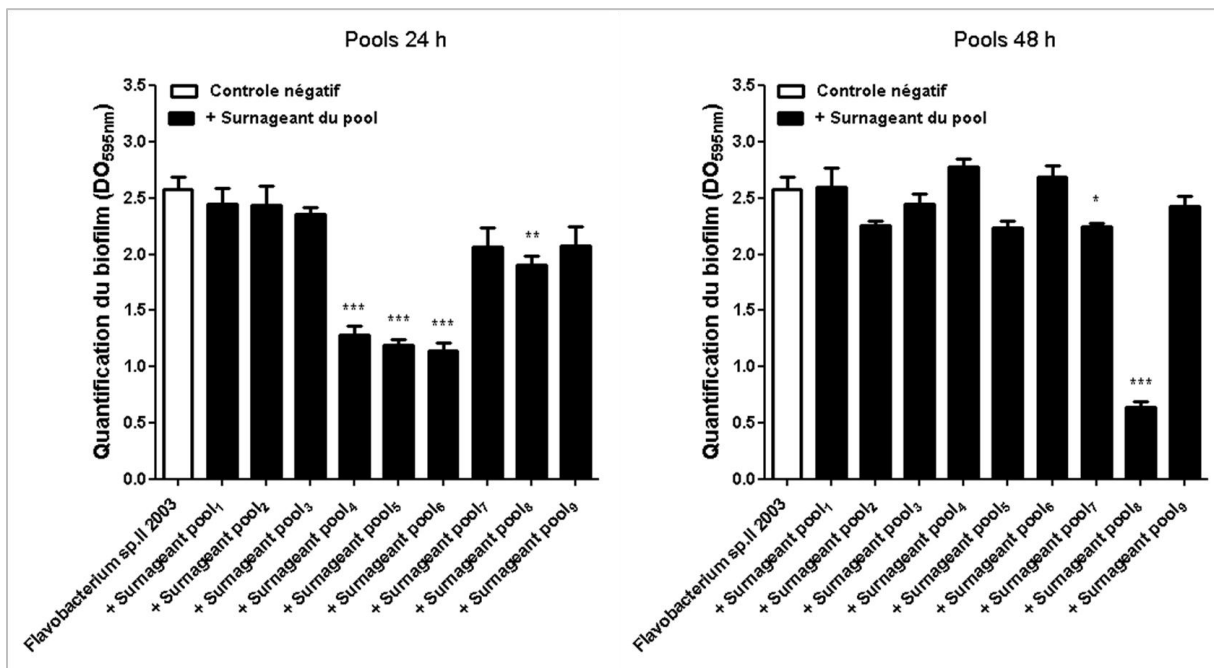
## II. Bactéries du biofilm de la vasière

### A/ Effet du sécrétome de bactéries cultivées en pools sur la capacité à former des biofilms et la croissance de *Flavobacterium* sp. II2003

(Protocoles en Annexe 2)

#### 1. Effet des surnageants de pools sur la formation de biofilm

Les effets des surnageants des pools sur la formation de biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 sont illustrés dans la figure 28.

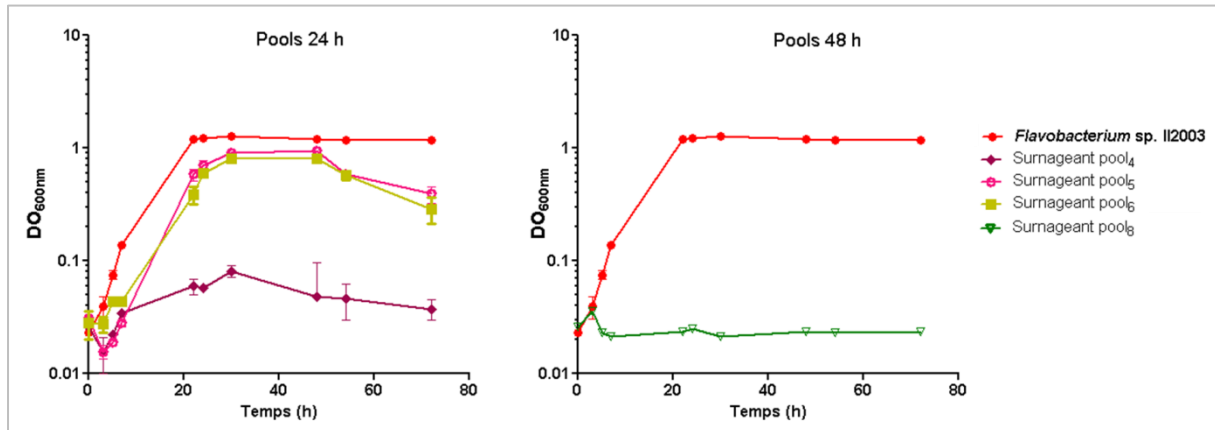


**Figure 28 : Effet des surnageants sur la formation de biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003**

Des activités inhibitrices de la formation de biofilm ont été principalement observées. Les surnageants des pools 4, 5 et 6, à 24 h de culture, engendrent 50% d'inhibition et le surnageant du pool 8, à 48 h de culture, inhibe la formation de biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 à hauteur de 70%.

## 2. Effet des surnageants de pools sur la croissance

L'effet des surnageants actifs 4, 5, 6 et 8, a été investi sur la croissance de *Flavobacterium* sp. II2003. Les 4 surnageants ont été testés contre la bactérie modèle en culture planctonique. Les résultats sont illustrés dans la figure 29.



**Figure 29 : Effet des surnageants des pools sur la croissance de *Flavobacterium* sp. II2003**

Le surnageant 4 (24 h) et 8 (48 h) possèdent des actions inhibitrices très importantes sur la croissance *Flavobacterium* sp. II 2003 ( $\approx 100\%$ ). Les surnageants des pools 5 et 6 inhibent légèrement le développement planctonique de la souche cible. Le pool 6 à 24h de culture présentant une forte activité antibiofilm et une faible activité anticroissance a été sélectionné pour la suite de l'étude.

## 3. Fractionnement du pool sélectionné

Cette partie est détaillée dans l'article III.





**B/ Article III: The antibiofilm activity secreted by a marine *Pseudomonas* sp. bacterium**

Ibtissem Doghri<sup>1</sup>, Marianne Graber<sup>1</sup>, Alexis Bazire<sup>2</sup>, Alain Dufour<sup>2</sup>, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine<sup>3</sup>, Jean-Marie Herry<sup>3</sup>, Ana Caroline Ferro<sup>1</sup>, Valérie Sopena<sup>1</sup>, Sophie Sablé<sup>1,\*</sup>, Isabelle Lanneluc<sup>1,\*</sup>

Ibtissem Doghri<sup>1</sup>, [ibtissem.doghri@univ-lr.fr](mailto:ibtissem.doghri@univ-lr.fr)

Marianne Graber<sup>1</sup>, [marianne.graber@univ-lr.fr](mailto:marianne.graber@univ-lr.fr)

Alexis Bazire<sup>2</sup>, [alexis.bazire@univ-ubs.fr](mailto:alexis.bazire@univ-ubs.fr)

Alain Dufour<sup>2</sup>, [alain.dufour@univ-ubs.fr](mailto:alain.dufour@univ-ubs.fr)

Marie-Noëlle Bellon-Fontaine<sup>3</sup>, [marie-noelle.bellon-fontaine@jouy.inra.fr](mailto:marie-noelle.bellon-fontaine@jouy.inra.fr)

Jean-Marie Herry<sup>3</sup>, [jmherry@jouy.inra.fr](mailto:jmherry@jouy.inra.fr)

Ana Caroline Ferro<sup>1</sup>, [anacarolineferro1@gmail.com](mailto:anacarolineferro1@gmail.com)

Valérie Sopena<sup>1</sup>, [valerie.gauthier@univ-lr.fr](mailto:valerie.gauthier@univ-lr.fr)

Sophie Sablé<sup>1,\*</sup>, [sophie.sable@univ-lr.fr](mailto:sophie.sable@univ-lr.fr)

Isabelle Lanneluc<sup>1,\*</sup>, [isabelle.lanneluc@univ-lr.fr](mailto:isabelle.lanneluc@univ-lr.fr)

<sup>1</sup> Univ. La Rochelle, UMR 7266 CNRS, LIENSs, F-17042 La Rochelle cedex 01, France.

<sup>2</sup> Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France.

<sup>3</sup> Agro-ParisTech-INRA, UMR 0763, MICALIS, F-91300 Massy, France.

\* S. Sablé and I. Lanneluc equally contributed to this work.

**Corresponding author**

Isabelle Lanneluc, Univ. La Rochelle, UMR 7266 CNRS, LIENSs, F-17042 La Rochelle cedex 01, France. E-mail: [isabelle.lanneluc@univ-lr.fr](mailto:isabelle.lanneluc@univ-lr.fr)

**Keywords**

Antibiofilm, marine bacteria, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, surface properties, pathogens

## **Introduction**

Biofilm is the predominant mode of growth for microorganisms in most environments. It is defined as dense bacterial communities of cell-cell and cell-surface attached to a substratum and encased in a self-produced extracellular polymeric matrix, which is necessary for the formation and stabilization of biofilm colonies (Costerton et al., 1999; Davies, 2003; Flemming and Wingender, 2010). Structural components of the extracellular matrix include proteins, DNA, RNA, lipids and polysaccharides (Flemming and Wingender, 2010). This lifestyle, compared with the planktonic one, improves access to nutrients and protects against stress, predators, antibiotics and host immune system (Costerton et al., 1999; Dang et al., 2000; Davies, 2003). Biofilm formation is generally described as a temporal process involving a succession of different stages: a reversible, then an irreversible attachment of microorganisms to conditioned surfaces and finally, a biofilm maturation through synergistic and/or competitive interactions between the different microbial communities (Dang et al., 2000).

Biofilms are known to be responsible for the pathogenic bacteria survival. Thus, biofilms have great importance for human health because of their role in certain infectious diseases and their development in a wide range of ecosystems (food industries, medical equipment and natural environments) (Francolini and Donelli, 2010; Lequette et al., 2010). In marine environment, biofilms can also alter the properties of colonized metallic structures, through the phenomenon of microbiologically influenced corrosion, particularly due to intense metabolic activity of some bacteria (Videla and Herrera, 2005). This phenomenon causes great damages to maritime infrastructures, resulting in serious economic losses. The costs related to the fouling of ship hulls have also an important economic impact due to increased fuel consumption and maintenance (Schultz et al., 2011).

The search for the prevention and treatment of biofilms in various industrial and clinical settings is very active and many tracks for new natural antibiofilm molecules from plants and marine macro-organisms have been identified (Francolini and Donelli, 2010; Buommino et al., 2014). In contrast, despite the major economic challenges, anti-marine-biofilm compounds from microbial origin are less explored. There is a clear need to develop new natural compounds and the high bacterial diversity in marine environment has considerable potential for the discovery of novel molecules which may have applications in controlling biofilm formation. These compounds should target adhesive properties without affecting bacterial

viability in order to avoid the appearance of mutants (Papa et al., 2013). Thus, marine Actinomycetes were demonstrated as promising candidates for marine aquaculture by inhibiting biofilm formation of pathogenic *Vibrio* strains (You et al., 2007). Some marine bacteria such as *Pseudoalteromonas* strains produce antibiofilm compounds with applications in both the marine environment and the medical field (Dheilly et al., 2010; Klein et al., 2011). However, most research on antibiofilm compounds produced by marine bacteria focused on eradication of human pathogenic bacteria (Thenmozhi et al., 2009; Bakkiyaraj and Pandian, 2010; Nithya et al., 2010, 2011; Jiang et al., 2011; Sayem et al., 2011; Kavita et al., 2014; Padmavathi et al., 2014).

In a previous work, we built a collection of culturable marine bacteria and screened it for the capacity of the bacteria to form biofilms (Doghri et al., submitted). *Flavobacterium* sp. II2003 was one of the interesting selected models developing a stable and mushroom-like biofilm. *Flavobacteriales* were identified among the pioneer and sustaining surface colonizers that contribute to initial formation and development of marine biofilms particularly on metallic surfaces (Dang et al., 2011; Lanneluc et al., 2015). Moreover, *Flavobacterium* sp. are known as important pathogens in the aquaculture setting (Duchaud et al., 2007) and have been detected in industrial and medical environment biofilms (Basson et al., 2008). It would then be particularly interesting to find compounds that inhibit the *Flavobacterium* sp. biofilm formation.

In the current study, our objective was to find marine bacteria exhibiting antibiofilm activity against *Flavobacterium* sp. II2003 and to characterize this activity. Among our marine bacterial collection, the *Pseudomonas* sp. IV2006 strain was identified as producing a high antibiofilm activity. The characterization of this activity showed that *Pseudomonas* sp. IV2006 exoproducts especially inhibited bacterial adhesion without killing bacteria or inhibiting their growth. Then, the effects of the exoproducts on biotic (*Flavobacterium* cells) and abiotic (substratum) surfaces were investigated and the physico-chemical characteristics of the active compound(s) were determined.

## **Materials and Methods**

### **Bacterial strains and media**

The marine bacterial collection screened for an antibiofilm activity is composed of 86 benthic bacteria collected at low tide from the intertidal temperate mudflat biofilm of Marennes-

Oléron Bay (45°55'N, 01°06'W, Atlantic Coast of France) (Doghri et al., submitted). The target *Flavobacterium* sp. II2003 strain for antibiofilm assays was isolated from the same location (Doghri et al., submitted). Bacterial strains able to form a biofilm and used for the antibiofilm spectrum activity are listed in Table 1. Marine isolates were grown in Zobell broth (pasteur Bio-Rad, France, 4 g l<sup>-1</sup>; yeast extract Bio-Rad, France, 1 g l<sup>-1</sup>; sea salts Sigma, USA, 30 g l<sup>-1</sup>). Luria-Bertani medium (LB, Difco, France) was used for the growth of non-marine strains and medium M36 (tryptone Bio-Rad, France, 5 g l<sup>-1</sup>; yeast extract Bio-Rad, France, 0.5 g l<sup>-1</sup>; beef extract Bio-Rad, France, 0.2 g l<sup>-1</sup>; sodium acetate Sigma, USA, 0.2 g l<sup>-1</sup>) was used for the freshwater strain. Solid media were prepared by adding agar (12 g l<sup>-1</sup>, Biokar, France).

**Table 1. Bacterial strains able to form a biofilm and used for the antibiofilm spectrum activity**

Strain	Reference and/or source	Culture conditions
<b>Non marine strains</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> AH478	Malone et al., 2009	Luria-Bertani 37°C
<i>S. aureus</i> ATCC27217	ATCC	
<i>S. aureus</i> ATCC29247	ATCC	
<i>S. aureus</i> RN4220	Nair et al., 2011	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Klausen et al., 2003	
<i>P. aeruginosa</i> PA14	He et al., 2004	
<i>Yersinia enterocolitica</i> CIP106.676	CIP	
<i>Bacillus subtilis</i> ND Food	Bridier et al., 2011	
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Spizizen, 1958	
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407	Sheppard et al., 2013	
<b>Marine strains</b>		
<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	Grasland et al., 2003 / Morbihan Gulf, France	Zobell 22°C
<i>Micrococcus luteus</i>	LBCM	
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2039	DSMZ	
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2040	DSMZ	
<i>Tenacibaculum maritimum</i> CIP103528T	CIP	
<i>Vibrio lentus</i> CIP107166T	CIP	
<i>Vibrio anguillarum</i> CIP6336T	CIP	
<i>Roseovarius</i> sp. VA014	Lanneluc et al., 2015 / Atlantic harbor, France	
<i>Roseobacter</i> sp. IV 3009	Doghri et al., submitted / Intertidal mudflat, France	

<i>Shewanella</i> sp. IV 3014	Doghri et al., submitted / Intertidal mudflat, France	
<i>Flavobacterium</i> sp. II2003	Doghri et al., submitted / Intertidal mudflat, France	
<b>Freshwater strain</b>		
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> CIP103534T	CIP	M36 20°C

### **Preparation of culture supernatants**

For the antibiofilm activity screening, benthic bacteria were grown in pools of 8 to 10 strains. Each strain was first individually grown in Zobell broth for 24h at 22°C and then diluted in broth to a final optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 1 before being mixed with the other strains of the pool. Then, 100 ml of Zobell medium were inoculated at 5% with the bacterial pool and incubated at 22°C with shaking during 24h. After the screening step, the selected *Pseudomonas* sp. IV2006 strain was grown in Zobell broth complemented with 30 g l<sup>-1</sup> of glucose at 22°C with shaking during 48h, to optimize the antibiofilm compounds production.

The supernatants (SN) of the pool or individual cultures were harvested by centrifuging the cultures (7000g, 15min g, 4°C), were filter sterilized through 0.22 µm (Millipore PVDF, Germany) and stored at -80°C until use. For some experiments, the selected active supernatant of *Pseudomonas* sp. IV2006, SN<sub>IV2006</sub>, was concentrated 10-fold by lyophilization and named SN<sub>IV2006</sub> 10X.

### **Antibiofilm assays**

***Microtiter plate assay (static conditions / polystyrene surface).*** Bacterial biofilms (marine and non-marine bacteria) were grown in microtiter plates as previously described by Doghri et al., (submitted): cells of an overnight bacterial culture were centrifuged 10 min at 7000 g and resuspended in artificial seawater for marine strains or saline solution (NaCl 9 g l<sup>-1</sup>) for non-marine strains, to a final OD<sub>600</sub> of 0.25. 150 µl of the resulting suspensions were then loaded per well of a 96-well microtiter plate (MICROTEST™ 96, Falcon, Germany). After a bacterial adhesion step of 2 h at 22°C (marine bacteria) or 37°C (non-marine bacteria), the wells were gently washed three times with respectively artificial seawater or saline solution and 150 µl of respectively Zobell or LB medium were added to each well. After incubation at 22°C or 37°C for 24h, the microplates were washed three times. Then, the bacterial biofilms

were stained with a 0.8% crystal violet solution for 20 min and rinsed with ultra-pure water until the wash-liquid was clear. Absorbed crystal violet was then eluted from attached cells with 96% ethanol (150  $\mu$ l / well) and the quantification was carried out by measuring the OD<sub>595nm</sub>.

To investigate the effect of the culture supernatants on adhesion and biofilm formation of *Flavobacterium* sp. II2003 or other strains (marine and nonmarine), wells were inoculated with biofilm-forming cells resuspended in a solution of 50% supernatant and 50% artificial seawater or sterile water for non-marine strains. After a 2-h adhesion step, biofilm formation was performed as described above. The effect of the selected supernatant, SN<sub>IV2006</sub>, was further analyzed against *Flavobacterium* sp. II2003 in two different ways: (i) a solution of 50% SN<sub>IV2006</sub> and 50% artificial seawater without bacterial strains was loaded in the microplate and left for 2h at 22°C to coat the polystyrene surface. Then, wells were rinsed with artificial seawater, *Flavobacterium* sp. II2003 bacteria were inoculated and biofilms were performed as described before. (ii) A solution of 50% SN<sub>IV2006</sub> and 50% artificial seawater was loaded in the wells after the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm maturation step and left for 2 h under static conditions at 22°C. Biofilms were then quantified as classically.

***Flow cells assay (dynamic conditions / glass surface).*** *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm was grown on glass slides in three-channel flow cells (channel dimensions 1 x 4 x 40 mm, Technical University of Denmark Systems Biology, Denmark) as previously described (Doghri et al., submitted): flow cells were inoculated with overnight bacterial cultures diluted in artificial seawater to a final OD<sub>600</sub> of 0.1. Bacteria were allowed to attach to the substratum (microscope glass coverslip of 24 x 50 st1, KnittelGlasser, Germany) during 2 h at 22°C without medium flow. The channels were then washed to remove non-attached cells by applying a flow of artificial seawater for 15 min at a rate of 2 ml h<sup>-1</sup> and biofilm growth was performed under a constant flow of Zobell (2 ml h<sup>-1</sup>) for 24 h at 22°C.

To investigate the effect of SN<sub>IV2006</sub> on adhesion and biofilm formation of *Flavobacterium* sp. II2003, three protocols were followed, as for microplates: (i) a solution of 50% SN<sub>IV2006</sub> and 50% artificial seawater was injected without bacterial strains into the flow cell channels and left for 2 h at 22°C without flow to coat the glass surface. Then, channels were rinsed with artificial seawater before inoculating *Flavobacterium* sp. II2003 bacteria and performing biofilms as described before. (ii) Flow cells were inoculated with *Flavobacterium* sp. II2003 cultures grown for 24 h and resuspended in a solution of 50% SN<sub>IV2006</sub> and 50% artificial

seawater to a final OD<sub>600</sub> of 0.1. After the 2-h adhesion step, biofilm formation was performed as initially described. (iii) SN<sub>IV2006</sub> was injected in the channels after the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm maturation step and left for 2 h under static conditions at 22°C.

Microscopic observations were performed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a TCS-SP2 system (Leica Microsystems). The biofilms formed were observed by staining cells with 5 µM Syto 61 red during 10 min. The biofilm stacks were analyzed with COMSTAT software (developed in MATLAB, Heydorn et al., 2000) to estimate the maximal and average thicknesses (µm) and the biovolume (µm<sup>3</sup> µm<sup>-2</sup>) of biofilm.

### **Antibacterial assays**

**Agar well diffusion assay.** SN<sub>IV2006</sub> activity was assayed on the bacterial growth by adapting the agar well diffusion assay previously described by Sablé et al. (2000). Solid nutrient plates (15 ml) were inoculated with approximately 10<sup>7</sup> of the target bacteria. Sterile glass rings (4 mm inside diameter) were placed on agar medium and filled with 30 µl of filter-sterilized samples (SN<sub>IV2006</sub> and SN<sub>IV2006</sub> 10X). The plates were incubated for 48 h at the optimum growth temperature for each bacterium and clear zones of growth inhibition were measured.

**Liquid antibacterial assay.** Target bacteria grown overnight were resuspended in a solution of 50% SN<sub>IV2006</sub> and 50% artificial seawater at an OD<sub>600nm</sub> of 0.25. After incubation for 2h, an aliquot of the cell suspension was serially diluted and 100 µl of each dilution were then plated to count the colony forming units (CFU). The remaining not diluted bacterial suspension was centrifuged and resuspended at 20% into fresh medium. Growth was monitored by measuring the absorbance of the cultures at 600 nm.

### **Determination of the surface energy properties**

The surface energy properties were investigated on the same surface as that used in flow cells, *i-e* glass coverslip (24 x 50 st1, KnittelGlasser, Germany). The glass surface was prepared and sterilized as in flow cell assay. To eliminate the salt effect, SN<sub>IV2006</sub> was dialysed and then diluted to 50% in ultra-pure water (MilliQ Millipore, USA) instead of seawater. This solution was then used to coat the glass surface during 2 h at 22°C. After a gentle wash with ultra-pure water and air drying for 40 min, the surface energy properties of the treated glass surfaces were determined using contact angle measurements by a goniometer Drop Shape Analyzer-

DSA100 (Germany). Serial contact angle measurements (around 60 measurements on three independently surfaces) were realized for three independent pure liquids: ultra-pure water (Milli-Q Millipore, USA), formamide (Sigma-Aldrich, USA) and diiodomethane (Sigma-Aldrich, USA). The three surface tension components of the coated substratum surface tension ( $\gamma_s$ ), that is Lifshitz–van der Waals ( $\gamma_s^{LW}$ ), electron-donor ( $\gamma_s^-$ ) and electron-acceptor ( $\gamma_s^+$ ) components, were estimated by using the Young-van Oss equation for each liquid (van Oss et al., 1988):

$$\cos \theta = -1 + 2(\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW})^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_s^+ \gamma_L^-)^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_s^- \gamma_L^+)^{1/2} / \gamma_L$$

where  $\gamma_L^{LW}$ ,  $\gamma_L^-$  and  $\gamma_L^+$  are respectively the Lifshitz–van der Waals, electron-donor and electron acceptor values of a particular liquid.

The Lewis acid–base component was deduced from:

$$\gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-}$$

and the total surface free energy was defined by:

$$\gamma_s = \gamma_s^{AB} + \gamma_s^{LW}$$

### **Microbial adhesion to solvent (MATS) assays**

The hydrophobic/hydrophilic and Lewis acid-base characteristics of bacterial surface were determined using the MATS method described by Bellon-Fontaine et al., (1996). This partitioning method is based on the comparison between microbial cell affinity to couples of solvents. In each pair, one solvent is a monopolar solvent, the other is an apolar solvent, and both must have similar Lifshitz-van der Waals surface tension components. The monopolar solvent can be acidic (electron accepting) or basic (electron donating). The following couples were used: (i) chloroform (electron accepting)/hexadecane; (ii) ethyl acetate (electron donating)/decane; (iii) dichloromethane (electron accepting)/tetradecane. All solvents were obtained from Sigma-Aldrich (USA) and were of the highest purity grade. Differences between the results obtained with chloroform and hexadecane (or dichloromethane and tetradecane), on the one hand, and between ethyl acetate and decane, on the other hand, would respectively indicate the electron donor and the electron acceptor character of the bacterial surface. The percentage of cells adhered to hexadecane or tetradecane was used as a measure of cell surface hydrophobicity. Experimentally, a *Flavobacterium* sp. II2003 suspension,



containing approximately  $10^8$  cells  $\text{ml}^{-1}$  ( $\text{OD}_{400 \text{ nm}} = 0.8$ ), was prepared in artificial seawater. 1.5 ml of each bacterial suspension was manually mixed for 10 s and vortexed for 120 s with 0.25 ml of the solvent under investigation. The mixture was allowed to stand for 15 min to ensure complete separation of the two phases. The OD of the aqueous phase was measured at 400 nm. The solvent affinity percentage of cells to each solvent was calculated by % Affinity =  $(1 - A/A_0) \times 100$ , where  $A_0$  is the  $\text{OD}_{400 \text{ nm}}$  of the bacterial suspension before mixing and A is the  $\text{OD}_{400 \text{ nm}}$  after mixing.

### **Biosurfactant assay**

In order to detect the presence of biosurfactant in  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$ , we used the drop-collapse test as described by Tugrul and Cansunar, (2005). Briefly, drops of  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  were placed in wells of a microtiter plate coated with sunflower oil. Drops containing biosurfactant would collapse whereas non-surfactant-containing drops would remain stable. Diluted liquid hand washing cream and distilled water drops were used as controls.

### **Physico-chemical assays and characterization of the active compounds**

To elucidate the biochemical nature of the active compound(s) in  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$ , different treatments were performed. To digest proteins, proteinase K or pronase E was added at a final concentration of  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  and the reaction was incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . To degrade lipids, lipase acrylic resin form was used at a final concentration of  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  and the reaction was incubated for 48 h under shaking at  $37^\circ\text{C}$ . To digest the nucleic acids, DNaseI ( $100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) or RNaseA ( $25 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was added for 12 h at  $37^\circ\text{C}$ .  $\text{NaIO}_4$  was used to hydrolyze polysaccharides by cleaving the C-C bonds and by oxidizing the carbon of vicinal hydroxyl groups (Mack et al., 1994, 1996). We improved the classical treatment (20 mM  $\text{NaIO}_4$ , incubation for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ ) by adding a neutralization step of the excess of  $\text{NaIO}_4$  with ethylene glycol (1:100) (Babor et al., 1972) for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  followed by a final dialysis step (1000 Da, Spectrum Labs.com, USA). To evaluate the heat sensibility,  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  samples were incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , 30 min at  $50^\circ\text{C}$ ,  $70^\circ\text{C}$  and  $100^\circ\text{C}$ . The activity of all treated  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  samples was then evaluated by mixing the bacteria with the treated supernatants during the 2-h adhesion step and by using the microtiter plate assay as described before (compared with a non-treated control).

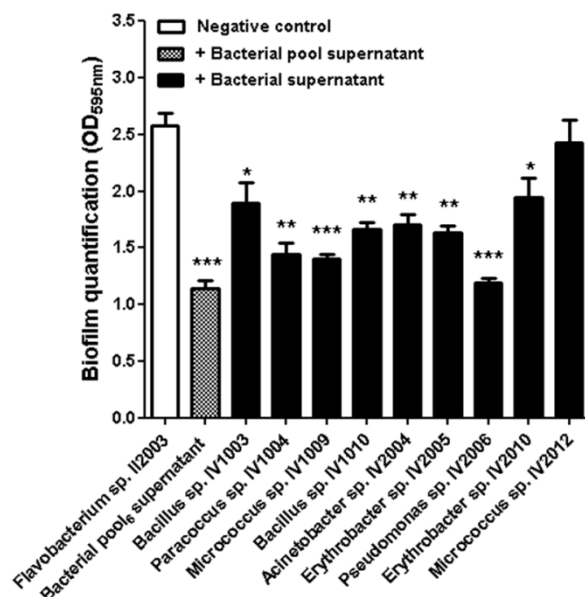
## Statistical analyses

The standard deviations were calculated using Matlab software (Mathworks Inc., Natick, USA). The statistical analyses between different conditions were determined by the Student *t*-test and considered significant if *p* values are < 0.05.

## Results

### Marine bacterial collection screening for an antibiofilm activity against *Flavobacterium* sp. II2003

A wide range of heterotrophic bacteria (86 strains) was previously isolated from mudflat biofilms collected from Marennes-Oléron Bay (Atlantic Coast of France) at low tide. In this work, we screened this collection for an antibiofilm activity against *Flavobacterium* sp. II2003, issued from the same collection, and that was shown to form a stable biofilm (Doghri et al., submitted). To rapidly screen the whole collection, 9 pools of 8 to 10 strains were constituted, and the culture supernatants SN (or secretomes) of each pool were tested for their potential effects on the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm formation by mixing the supernatant with the cells during the 2-h adhesion step in microplate. The pool 6 secretomes presented a high inhibitory activity (70%, Figure 1) on biofilm formation and was then chosen for further studies. The secretomes of each bacterial strain of pool 6 were then individually tested on the biofilm formation of the *Flavobacterium* sp. II2003 strain (Figure 1). The strain showing the highest inhibitory activity, almost identical with the pool<sub>6</sub> one, was *Pseudomonas* sp. IV2006, which was selected.

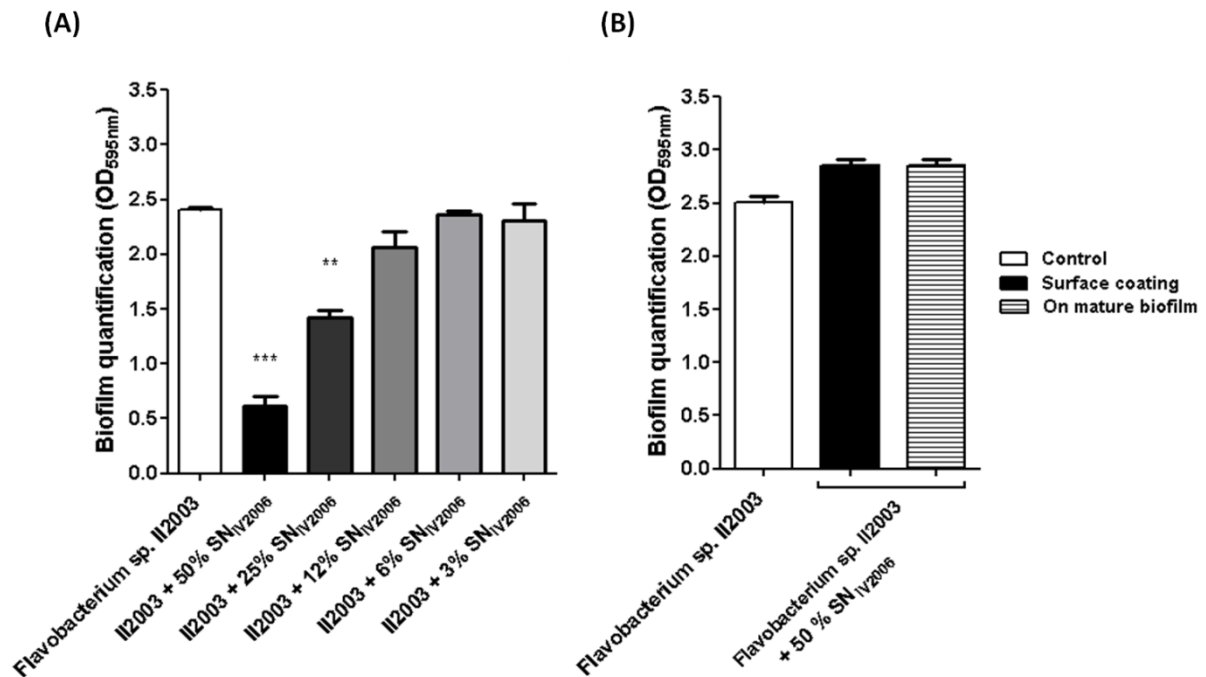


**Figure 1. Effect of the culture supernatants of the pool<sub>6</sub> strains, mixed or individually, on the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm formation.** *Flavobacterium* sp. II2003 was mixed for 2 h with the culture supernatants in 96-well microplates during the adhesion step. The *Flavobacterium* sp. II2003 biofilms were then grown at 22°C for 24 h. Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>IV2006</sub>. Bars represent means ± standard deviations for three replicates. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### Overall characterization of the *Pseudomonas* sp. IV2006 antibiofilm activity in microtiter plates

Antibiofilm compounds production was optimized by increasing the *Pseudomonas* sp. IV2006 culture time from 24h to 48h and by adding glucose (30 g l<sup>-1</sup>) to the culture broth. These new conditions were then used for all experiments. When we examined the effect of increasing SN<sub>IV2006</sub> concentrations on biofilm formation in 96-well microtiter plate wells, the *Pseudomonas* sp. IV2006 secretome showed a dose dependent antibiofilm effect (Figure 2A). We observed a reduction of about 70% of the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm at 1:2 dilution (50% SN<sub>IV2006</sub>). In these conditions, the arbitrary activity of SN<sub>IV2006</sub> was estimated at 27 AU.ml<sup>-1</sup>. This concentration was then used for all following experiments. This test showed that SN<sub>IV2006</sub> affected biofilm formation when it was added to the *Flavobacterium* sp. II2003 culture during the adhesion step. To examine whether SN<sub>IV2006</sub> affected other stages of biofilm formation, we tested its potential substratum coating activity by incubating SN<sub>IV2006</sub> for 2h in microplate wells before the addition of *Flavobacterium* sp. II2003 cells. We also explored the possibility of SN<sub>IV2006</sub> to show an activity against the *Flavobacterium* sp. II2003

mature biofilm. Then, SN<sub>IV2006</sub> was efficient neither to prevent the cell adhesion (and consequently the biofilm formation) nor to deconstruct the mature biofilm (Figure 2B).

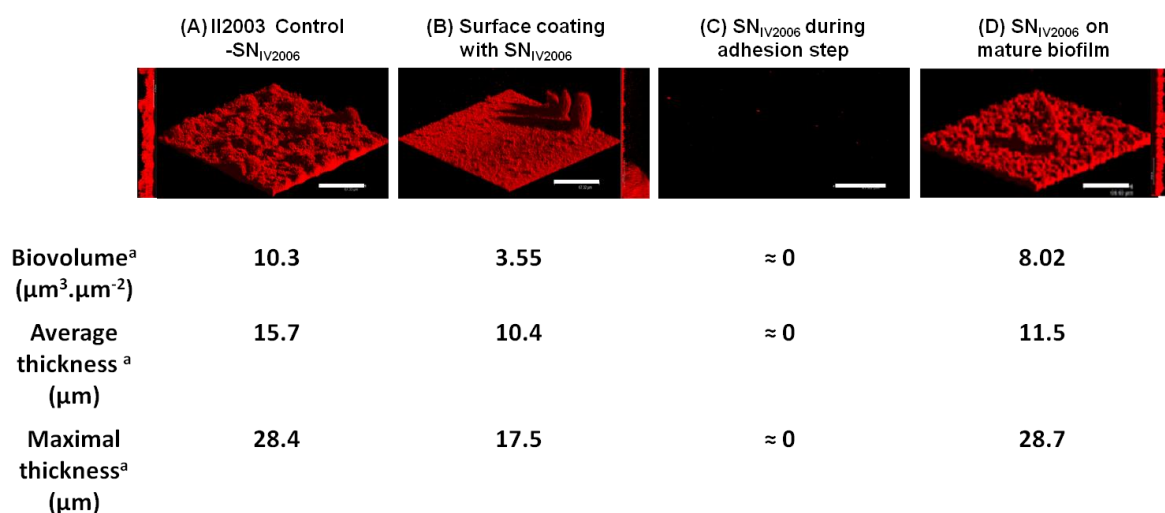


**Figure 2. Effect of SN<sub>IV2006</sub> on the *Flavobacterium sp. II2003* biofilm formation in microtiter plate.** (A) Effect of decreasing SN<sub>IV2006</sub> concentrations during adhesion. (B) Effect of 50% SN<sub>IV2006</sub> by coating the surface and on mature biofilm. Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>IV2006</sub>. Bars represent means  $\pm$  standard deviations for three replicates. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### Overall characterization of the *Pseudomonas sp. IV2006* antibiofilm activity in flow cells

The SN<sub>IV2006</sub> activity was studied in flow cells (on glass surface) for the same three steps than in microplate (Figure 3): after a surface coating with the SN<sub>IV2006</sub>, during the 2-h adhesion step and on mature biofilm. The addition of SN<sub>IV2006</sub> before the *Flavobacterium sp. II2003* strain (*i-e* the glass-coating with SN<sub>IV2006</sub>, Figure 3B) significantly impaired the biofilm formation: we observed a reduction of 60% of the biofilm biovolume compared with the control and a reduction of 30% of the average and the maximal thicknesses. So, the biofilm formed on the treated surface was clearly thinner, except some mushroom-like structures in an area where the molecules of the supernatant were perhaps not adsorbed on the glass surface. Then, when SN<sub>IV2006</sub> was added during the 2-h adhesion step, the biofilm formation of *Flavobacterium sp. II2003* was totally inhibited (Figure 3C). Furthermore, the direct microscopic observations of attached cells in presence of SN<sub>IV2006</sub>, after the 2-h adhesion step,

showed that no bacteria adhered during this step (data not shown), indicating that antibiofilm components of SN<sub>IV2006</sub> influenced the cells attachment on the glass surface. Lastly, SN<sub>IV2006</sub> was not able to modify significantly the properties of the already formed biofilm (Figure 3D), which demonstrated that SN<sub>IV2006</sub> was devoid of components able to destruct the preformed biofilm.

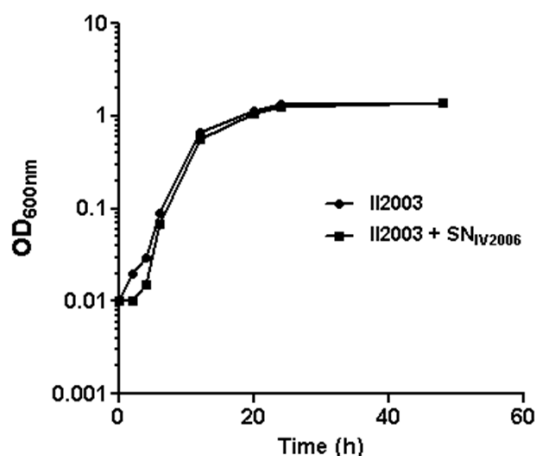


**Figure 3. Effect of SN<sub>IV2006</sub> on the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm formation in flow cell chambers.** The *Flavobacterium* sp. II2003 biofilms were grown at 22°C for 24 h in Zobell broth after the 2-h adhesion step. (A) Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>IV2006</sub>. (B) SN<sub>IV2006</sub> was added before the cells to coat the glass surface for 2 h. (C) SN<sub>IV2006</sub> was added at the same time than the cells during the 2-h adhesion step. (D) SN<sub>IV2006</sub> was added during 2 h after the biofilm maturation. For each experiment, 3D representation and a side view projection are shown. Average / maximal thickness and biovolumes were calculated, for each experiment, from COMSTAT analyses of 10 images stacks obtained from two independent biofilms. Standard deviations were lower than 10% of each value. Bars = 67.3  $\mu\text{m}$ .

### SN<sub>IV2006</sub> is devoid of antibacterial activity against free-living *Flavobacterium* sp. II2003 cells

We examined whether SN<sub>IV2006</sub> contained an antibacterial substance by using two distinct methods. With the agar well diffusion assay, no clear halo of growth inhibition was observed around the wells, indicating that SN<sub>IV2006</sub> was neither bactericidal nor bacteriostatic toward *Flavobacterium* sp. II2003. In the same way, with the liquid antibacterial assay, the pre-incubation of *Flavobacterium* sp. II2003 cells in SN<sub>IV2006</sub> during 2 h did not prevent the growth of the bacterium (Figure 4). Moreover, the number of *Flavobacterium* sp. II2003 cells

was the same whether the bacteria were incubated or not with the supernatant ( $\approx 4 \cdot 10^8$  CFU.  $\text{ml}^{-1}$ ). These results showed that  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  did not reduce cell viability during the 2-h adhesion step and only affected the cells biofilm formation.



**Figure 4. Growth curves of *Flavobacterium* sp. II2003 pre-incubated or not with  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$ .** The growth was monitored by measuring the  $\text{OD}_{600\text{nm}}$ . Values are averages of data from three independent experiments.

### **$\text{SN}_{\text{IV2006}}$ modifies the glass surface properties**

The characterization of the  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  antibiofilm activity on glass surface in flow cells showed that compounds of  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  could inhibit the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm formation by coating the glass surface. We then further studied this activity by investigating the overall glass surface energy properties. We measured the contact angles of water, formamide and diiodomethane on both untreated glass and glass coated with  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  (Table 2), and we determined the corresponding derived surface energy components (Table 3). Variance analysis of the results indicated a significant effect of  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  on water and formamide contact angle measurements compared with the untreated surface ( $P < 0.05$ ). Both water and formamide contact angles decreased after the  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$  glass-coating. Van der Waals component of the free surface  $\gamma^{\text{LW}}$  was 12% higher for the coated surfaces compared with the untreated surfaces. The electron donor component of the treated surface was 30% higher, and conversely, the electron acceptor component was 15% lower. The overall Lewis acid–base component and free surface energy of glass were not significantly modified after contact with  $\text{SN}_{\text{IV2006}}$ , but when looking at the individual surface energy components, the results

demonstrated that the glass-coating with SN<sub>IV2006</sub> made the glass surface on the whole more hydrophilic and more basic.

**Table 2. Contact angle measurements obtained with water, formamide and diiodomethane on glass surface, treated or not with SN<sub>IV2006</sub>**

	Water	Formamide	Diiodomethane
Untreated glass <sup>a</sup>	49.05	39.4	55.1
Glass coated with SN <sub>IV2006</sub> <sup>a</sup>	37	28.06	50.1

<sup>a</sup> Standard deviations lower than 10% of each value

Each value was the mean of around 60 droplets measurements performed on two independently samples.

**Table 3. Surface tension components of the uncoated and coated glass surface calculated from the contact angle measurements: Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), electron-acceptor ( $\gamma^+$ ), electron donor ( $\gamma^-$ ) components, Lewis acid–base component  $\gamma^{AB}$  and total surface free energy  $\gamma_s$ .**

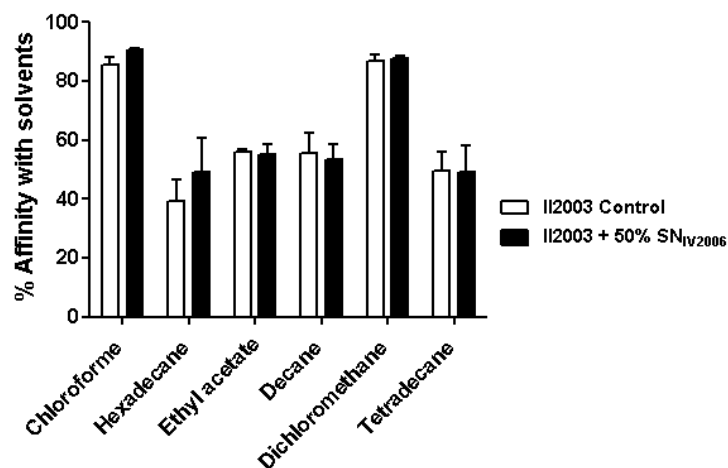
	Surface energy (mJ.m <sup>-2</sup> )				
	$\gamma^{LW}$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^-$	$\gamma^{AB}$	$\gamma_s$
Untreated glass <sup>a</sup>	31.6	2.7	29.0	17.5	49.2
Glass coated with SN <sub>IV2006</sub> <sup>a</sup>	35.6	1.5	38.9	16.6	51.3

<sup>a</sup> Standard deviations lower than 10% of each value

### **SN<sub>IV2006</sub> has no effect on the *Flavobacterium* sp. II2003 cell surface hydrophilic/hydrophobic and Lewis acid/base overall characteristics**

The hydrophobic/hydrophilic and Lewis acid/base characteristics of *Flavobacterium* sp. II2003 surface incubated or not with SN<sub>IV2006</sub> during 2 h, were determined by using the MATS method. This partitioning method is based on the comparison between bacterial cell affinity to a monopolar acidic (electron accepting) or basic (electron donating) solvent and an apolar solvent that have similar Lifshitz-van der Waals surface tension components. Hence, we measured the solvent affinity pourcentages of *Flavobacterium* sp. cells to the 6 following solvents, classified by pairs: chloroform (acidic) / hexadecane, ethyl acetate (basic) / decane and dichloromethane (acidic) / tetradecane. In all cases, no significant affinity pourcentage differences were observed between treated and untreated cells (Figure 5). Both treated and

untreated *Flavobacterium* sp. II2003 cells showed a very high affinity for chloroform and dichloromethane, the acidic solvents, and a relatively high affinity for apolar solvents (hexadecane, decane and tetradecane). These results indicate a broadly basic character and a rather hydrophobic character of the *Flavobacterium* sp. II2003 surface, whether treated or not with SN<sub>IV2006</sub>.



**Figure 5. Affinity percentage of *Flavobacterium* sp. II2003 cells to the six solvents used in the MATS method.** *Flavobacterium* sp. II2003 cells were pretreated or not with SN<sub>IV2006</sub>. Three couples of solvents were used: chloroform (acidic) / hexadecane, ethyl acetate (basic) / decane and dichloromethane (acidic) / tetradecane. Affinity percentages were calculated from six experiments obtained from at least two independent treatments.

#### SN<sub>IV2006</sub> has no surfactant effect

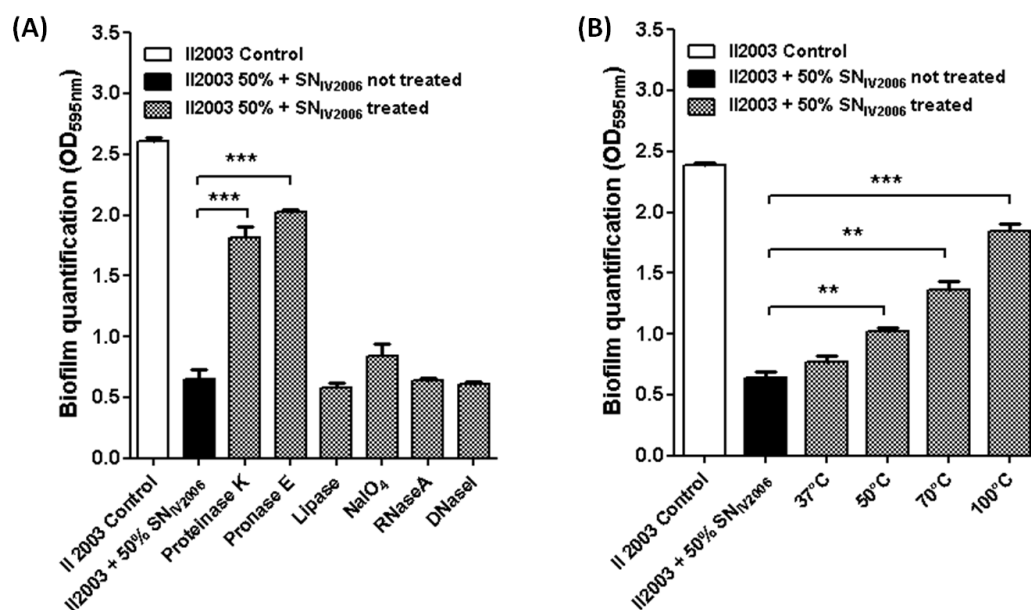
The drop-collapse method was performed in order to detect the presence of biosurfactant in the secretome of *Pseudomonas* sp. IV2006. SN<sub>IV2006</sub> drops did not collapse and remained stable on oil-coated surface, showing that SN<sub>IV2006</sub> had no biosurfactant activity.

#### Physico-chemical characteristics of SN<sub>IV2006</sub> antibiofilm compounds

To gain information on the biochemical nature of the SN<sub>IV2006</sub> active compounds, the *Pseudomonas* sp. IV2006 secretome was submitted to different treatments and antibiofilm activity of treated supernatants was evaluated by using the microtiter plate assay (Figure 6). Neither the lipase, nor the nucleases, nor the NaIO<sub>4</sub> treatments significantly affected the activity of SN<sub>IV2006</sub> (Figure 6A). Conversely, treatments with Proteinase K and Pronase E reduced by 80% the biofilm-inhibiting activity against *Flavobacterium* sp. II2003 (Figure



6A). This result was confirmed under dynamic conditions in flow cells (data not shown). The heat sensitivity of antibiofilm compounds of SN<sub>IV2006</sub> was also investigated (Figure 6B). The inhibitory effect started to be significantly affected from 50°C and clearly decreased with the increasing temperature. All these results indicated that the antibiofilm molecules are likely to be proteinaceous.



**Figure 6. Effect of various treatments on the antibiofilm activity of SN<sub>IV2006</sub>.** Microtiter plate assay was used. (A) Effect of digestion of proteins (proteinase K, pronase E), lipids (lipase), polysaccharides (NaIO<sub>4</sub>) and nucleic acids (DNaseI, RNaseA) on the antibiofilm activity of SN<sub>IV2006</sub>. (B) Effect of increasing heat treatments on the antibiofilm activity of SN<sub>IV2006</sub>. Negative control: bacterial biofilm without SN<sub>IV2006</sub>. Bars represent means  $\pm$  standard deviations for three replicates. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ .

### SN<sub>IV2006</sub> exhibits antibiofilm activity against other marine bacteria and human pathogens

The microtiter plate assay was used to determine the SN<sub>IV2006</sub> spectrum of action on the biofilm-forming abilities. The supernatant activity was assayed against a large variety of marine and non-marine bacteria (22 strains, Table 1). All the chosen strains were able to form biofilms in microplates with an OD<sub>595nm</sub> > 0.6 after crystal violet staining. Table 4 presents the percentages of biofilm inhibition of SN<sub>IV2006</sub> on monospecies biofilms classified in groups according to the obtained effects. The first group represents the most sensitive strains with a biofilm inhibition percentage higher than 50%. This group contains 10 strains including

pathogenic marine bacteria such as *Flavobacterium*, *Tenacibaculum maritimum* and *Vibrio lentus*, human pathogenic species such as *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* and the *Bacillus subtilis* ND Food model strain. The second group consists of strains whose biofilm is moderately inhibited (from 32 to 41%). It includes the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* and human pathogens *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Lastly, group 3 contains non-sensitive strains (< 10%). This group is composed of marine bacteria *Micrococcus luteus*, *Shewanella* sp., *Roseobacter* sp., *Roseovarius* sp., *Vibrio anguillarum* and a non-marine *P. aeruginosa*. The spectrum of action of the potential antibacterial activity of SN<sub>IV2006</sub> was also evaluated, by the agar well diffusion assay (Table 4). Out of 13 strains tested, SN<sub>IV2006</sub> 10X prevented the growth of only one *Yersinia enterocolitica* bacterium, showing that *Pseudomonas* sp. IV2006 produced a specifically antibiofilm activity (without bactericidal or bacteriostatic activity) against a wide range of various bacterial biofilms.

**Table 4. SN<sub>IV2006</sub> spectrum of action determined by using microtiter plate assay for antibiofilm activity and agar well diffusion assay for antibacterial activity**

Group <sup>a</sup> and strain	Antibiofilm assays <sup>b</sup>	Antibacterial assays <sup>c</sup>
<b>1. High inhibition level</b>		
<i>Flavobacterium</i> sp. II2003	70 ± 8.6	-
<i>S. aureus</i> AH478	58 ± 3.3	-
<i>S. aureus</i> ATCC27217	51 ± 2.3	-
<i>S. aureus</i> ATCC29247	57 ± 1.1	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> CIP106.676	70 ± 4.9	30
<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	51 ± 1.2	-
<i>Bacillus subtilis</i> ND Food	55 ± 3.6	ND
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2039	54 ± 4.1	ND
<i>Tenacibaculum maritimum</i> CIP103528T	56 ± 5.3	ND
<i>Vibrio lentus</i> CIP107166T	80 ± 9.2	ND
<b>2. Mild inhibition level</b>		

<i>S. aureus</i> RN4220	38 ± 1.0	-
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	41 ± 3.5	-
<i>Cellulophaga lytica</i> DSM2040	32 ± 1.3	ND
<i>Bacillus thuringiensis</i> 407	41 ± 4.9	ND
<i>Bacillus subtilis</i> 168	37 ± 4.8	ND
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> CIP103534T	39 ± 2.1	ND
<b>3. Non sensitive strains</b>		
<i>Micrococcus luteus</i>	0.5 ± 3.1	-
<i>Shewanella</i> sp. IV 3014	1.3 ± 0.8	-
<i>Roseobacter</i> sp. IV 3009	0.8 ± 0.1	-
<i>Roseovarius</i> sp. VA014	2.6 ± 0.4	-
<i>Vibrio anguillarum</i> CIP6336T	0.3 ± 0.1	ND
<i>P. aeruginosa</i> PA14	- 6 ± 1.1	-

<sup>a</sup> Groups distinguished on the basis of the inhibition percentage of biofilm formation in the presence of SN<sub>IV2006</sub>.

<sup>b</sup> Inhibition percentage of biofilm formation in the presence of SN<sub>IV2006</sub>.

<sup>c</sup> Diameters in mm of the inhibition halos on agar plates. ND not determined

## Discussion

Previous reports indicate that the secondary metabolites from micro-organisms may constitute one of the most promising sources of environmentally friendly active molecules such as antifouling compounds, and that bacteria are the organisms of choice to obtain natural biodegradable products for antifouling coatings (Armstrong et al., 2000; Bhattarai et al., 2007). Indeed, marine bacteria were shown to produce in the culture supernatant antibiofilm compounds against Gram positive and Gram negative bacteria (Rendueles et al., 2013). In the present study, we examined the potential antibiofilm activity of cell-free cultures supernatants of 86 marine benthic bacterial strains. The target bacterium was *Flavobacterium* sp. II2003, able to form stable biofilms, and originated from the same mudflat as the 86 tested bacteria. Several bacteria related to *Flavobacterium* sp. were indeed associated with fish disease (Basson, 2008) and cause major economic losses (Cai, 2013). The natural reservoir of this pathogen is unknown, but its resilience in closed aquaculture systems posits biofilm as the

source of contagion for farmed fish (Cai, 2013). Many *Flavobacterium* species, pathogens and opportunistic pathogens included, were identified in biofilm material collected from industrial, domestic, as well as medical environments (Basson, 2008). Moreover, it is known that the biofilm lifestyle enhances bacterial resistance in particular toward antibiotics. The use of antibiofilm compounds, preventing biofilm formation or deconstructing mature biofilms, is thus a promising strategy to increase the sensitivity of pathogens (Yang et al., 2012; Costerton and Stewart, 2001). Out of the 86 marine benthic bacteria tested, we selected the culture supernatant of *Pseudomonas* sp. IV2006 (SN<sub>IV2006</sub>) which displayed a strong antibiofilm activity against *Flavobacterium* sp. II2003 when it is mixed with the cells during the 2-h adhesion step in microtiter plate. The *Pseudomonas* species (Gammaproteobacteria) are one of the ubiquitous groups of metabolically versatile, eukaryote-associated bacteria with effects on host health and survival, where they display a multitude of behaviours (Silby et al., 2011). *Pseudomonas* sp. strains may often act as opportunistic pathogens e.g. in plants (Buell et al., 2003; Rico et al., 2011), fish (Nishimori et al., 2000; Ferguson et al., 2004) and humans (Kerr and Snelling, 2009; Gaspar et al., 2013). In contrast, they are found in synergistic association with plants (Haas and Defago, 2005; Mendes et al., 2011) and sponges (Keller-Costa et al. 2014) where they play beneficial roles in disease control. Keller-Costa et al., (2014) pointed out the antibacterial, antiprotozoan and antifungal activities of *Pseudomonas* bacteria isolated from the *Ephydatia fluviatili* freshwater sponge. Moreover, *Pseudomonas fluorescens* was shown to produce several compounds of different classes exhibiting strong antimicrobial activities, such as glycolipids (Kim et al., 2000), cyclic lipopeptides (de Bruijn et al., 2007), phenazines (Turner and Messenger, 1986) and polyketides (Gross and Loper, 2009). In another study, Farmer et al., (2014) isolated various *Pseudomonas* sp. strains from soil that inhibited the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* without inhibiting growth.

We characterized the SN<sub>IV2006</sub> activity in microtiter plate assay (static conditions/polystyrene surface) as well as in flow cell chambers (dynamic conditions/glass surface) and both techniques showed the high antibiofilm potential of this supernatant. We observed that: (i) when the supernatant was added before the *Flavobacterium* sp. II2003 cells (coating step), the biofilm formation was significantly inhibited on glass surface but not on polystyrene surface, (ii) when the supernatant was added at the same time than the *Flavobacterium* sp. II2003 cells (adhesion step), the biofilm was totally non-existent on glass and was strongly inhibited, but to a less extent, on polystyrene surface, and (iii) when the supernatant was added after the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm maturation, the mature biofilm was not destructed.

To explain the effects obtained, we tested different hypotheses. We first investigated whether SN<sub>IV2006</sub> could display a bactericidal or a bacteriostatic activity during the 2 h contact between SN<sub>IV2006</sub> and the bacterial cells (adhesion step). Interestingly, experiments highlighted the lack of such activity against free-living *Flavobacterium* sp. II2003, making the SN<sub>IV2006</sub> activity specifically directed against biofilms. Few natural molecules were reported to display antibiofilm activity without also being antibacterial. Such molecules were quorum sensing inhibitors (Estrela et al., 2009) or biosurfactants (Das et al., 2009). A bacterial exopolysaccharide, whose mode of action is not known, was also shown to inhibit biofilm formation and to disrupt established biofilm of different bacteria without affecting their growth (Jiang et al., 2011).

Since SN<sub>IV2006</sub> did not reduce cell viability during the adhesion step but affected bacterial attachment on glass surfaces, we hypothesized that SN<sub>IV2006</sub> could modify the biotic or abiotic surface properties. We then examined the effect of the SN<sub>IV2006</sub> components on the overall surface properties of *Flavobacterium* sp. II2003 cells using MATS method. This showed that the surface of this bacterium was overall relatively hydrophobic and basic, and that SN<sub>IV2006</sub> had no effect on these properties. Another hypothesis was that SN<sub>IV2006</sub> could induce the modification of the abiotic surface characteristics. Indeed, the finding of a glass coating-effect of SN<sub>IV2006</sub> suggested that the supernatant could contain molecules able to adsorb to this surface and to play a negative role during bacterial attachment. The goniometric studies showed that the glass treatment with SN<sub>IV2006</sub> significantly reduced water and formamide contact angles. Hence, after the coating protocol, the glass surface became more hydrophilic, less acidic and more basic. As the MATS method showed that the surface of *Flavobacterium* sp. II2003 cells (treated or not with SN<sub>IV2006</sub>) exhibited an overall rather hydrophobic and basic character, the adhesion decrease could be explained by a repulsion between cells and the coated glass surface. It is known that adsorption to a substratum surface of amphipathic molecules such as surfactants, alters hydrophobicity of the surface and thus causes interference in microbial adhesion (Desai and Banat, 1997; Das et al., 2009; Rendueles et al., 2013). For instance, pretreatment of glass surfaces with *Escherichia coli* supernatants containing antibiofilm K2 polysaccharides reduced the biofilm formation by *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* and *P. aeruginosa* in microfermentors (Valle et al., 2006). Similarly, pre-coating of glass slides with purified *E. coli* Ec300p polysaccharide inhibited *S. aureus* biofilm formation in a flow reactor (Rendueles et al., 2013). As SN<sub>IV2006</sub> components, K2 and Ec300p surfactant polysaccharides were shown

to increase the hydrophilicity of the surface (Valle et al., 2006; Rendueles et al., 2013). In other studies, biosurfactant lipopeptides from a marine *Bacillus circulans* strain (Das et al., 2009) and from a freshwater *Pseudomonas fluorescens* strain (Janek et al., 2012) displayed anti-adhesive properties against various bacteria. Moreover, it has been demonstrated that the presumed SN<sub>IV2006</sub> molecules involved in the coating phenomenon were hydrophilic because they were eluted with water from Sep-Pak Plus Environmental C<sub>18</sub> cartridges (data not shown). All these findings suggested that the reduced bacterial attachment due to the coating effect of SN<sub>IV2006</sub> could result from a hydrophilic biosurfactant molecule. However, we showed that the SN<sub>IV2006</sub> active molecules were not surfactants. Other possible modes of action have to be considered to explain the adhesion inhibition. Antibiofilm compounds might block lectins or sugar binding proteins present on the surface of bacteria, or block adhesins of fimbriae and pili (Zinger-Yosovich and Gilboa-Garber., 2009). They may also act as signaling molecules that modulate the gene expression of recipient bacteria (Kim et al., 2009).

A preliminary physico-chemical characterization of the compounds responsible for the main SN<sub>IV2006</sub> inhibiting activity, observed on both glass and polystyrene surfaces, when SN<sub>IV2006</sub> is added at the same time as *Flavobacterium* sp. II2003 (e.g. during the 2-h adhesion step), supports the hypothesis of a compound of proteinaceous nature: proteases and heat treatments impaired about totally the capacity of SN<sub>IV2006</sub> to inhibit biofilm formation. The best known example of such proteinaceous compound is the antibacterial / antibiofilm protein AlpP secreted by *Pseudoalteromonas tunicate* D2 (James et al., 1996). Klein et al., (2011) identified also a *Pseudoalteromonas* sp. bacterium able to produce a specifically antibiofilm activity against a wide range of various bacterial biofilms. They also demonstrated that the activity was supported by proteinaceous molecule(s).

To summarize the inhibiting effects of SN<sub>IV2006</sub> on the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm formation, we can observe two important actions : (i) a coating effect that significantly inhibit the biofilm formation only on glass surface but not on polystyrene surface and (ii) an antibiofilm effect exerted during the adhesion step on both the glass and polystyrene surfaces. SN<sub>IV2006</sub> could contain two active compounds. One hydrophilic molecule would be active during coating on glass only, and the other, of proteinaceous nature, would be active after, on both glass and polystyrene surfaces, perhaps because it would act on the *Flavobacterium* sp. II2003 and not on the abiotic surface. The two compounds would have a cumulative effect on glass surface, which would explain the total absence of biofilm when added during the adhesion step. Interestingly, the SN<sub>IV2006</sub> active molecules involved in antibiofilm activity

exerted during the 2-h adhesion step were eluted with 20% acetonitrile from Sep-Pak Plus Environmental C<sub>18</sub> cartridges in a distinct fraction than the coating-molecules (data not shown). This confirms the presence of two distinct types of active molecules in SN<sub>IV2006</sub>. Understanding the mode of action of SN<sub>IV2006</sub> antibiofilm compounds will require purification and identification of the responsible molecules.

Finally, the major interest of the antibiofilm *Pseudomonas* sp. IV2006 exoproducts is their wide spectrum of action. Marine as well as human pathogenic bacteria able to form biofilms were used as target bacteria, and 73% of the strains were sensitive. It is particularly interesting to note that the antibiofilm activity of SN<sub>IV2006</sub> molecules is effective against several strains of fish pathogenic *Flavobacterium* species (both marine and freshwater strains) and related strains *Tenacibaculum maritimum* and *Cellulophaga lytica*. Moreover, the SN<sub>IV2006</sub> antibiofilm compounds significantly impaired the biofilm formation of human pathogenic bacteria involved in both medical environment such as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and food industry such as *Yersinia enterocolitica*. Then, wide applications of the SN<sub>IV2006</sub> compounds both in aquaculture and human health could be envisaged.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Conseil Général de la Charente Maritime (France) for the PhD grant of Ibtissem Doghri, the CPER littoral 2007-14, the CNRS EC2CO program MicroBiEn 2013-14, the Région Poitou-Charente and the Région Bretagne (France) and the European FEDER funds, for their financial support.

### **References**

1. Armstrong E, Boyd KG, Burgess JG (2000) Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotechnol Annu Rev* 6: 221-241.
2. Babor K, Kaláč V, Tihlárík K (1973) Periodate oxidation of saccharides. III. Comparison of the methods for determining the consumption of sodium periodate and the amount of formic acid formed. *Chem zvesti* 27: 676-680.

3. Bakkiyaraj D, Pandian SK (2010) *In vitro* and *in vivo* antibiofilm activity of a coral associated actinomycete against drug resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biofouling* 26: 711-717.
4. Basson A, Flemming LA, Chenia HY (2008) Evaluation of Adherence, Hydrophobicity, Aggregation, and Biofilm Development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like Isolates. *Microb Ecol* 55: 1-14.
5. Bellon-Fontaine MN, Rault J, van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid–base properties of microbial cells. *Colloids Surf B: Biointerf* 7: 47-53.
6. Bhattarai HD, Ganti VS, Paudel B, Paudel B, Lee YK, Lee HK, Hong YK, Shin HW (2007) Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 243-249.
7. Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R (2011) The Spatial Architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and *in situ* imaging. *PLoS One* 6: e16177.
8. Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nelson WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q, Khouri H, Fedorova N, Tran B, Russell D, Berry K, Utterback T, Van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng WL, Ramos AR, Alfano JR, Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Schneider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM, Collmer A (2003) The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10181-10186.
9. Buommino E, Scognamiglio M, Donnarumma G, Fiorentino A, D'Abrosca B (2014) Recent advances in natural product-based antibiofilm approaches to control infections. *Mini Rev Med Chem* 14: 1169-82.
10. Cai W, De La Fuente L, Arias CR (2013) Biofilm formation by the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: development and parameters affecting surface attachment *Appl Environ Microbiol* 79:5633-42.
11. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.



12. Costerton JW, Stewart PS (2001) Battling biofilms the war is against bacterial colonies that cause some of the most tenacious infections known. The weapon is knowledge of the enemy's communication system. *Sci Am* 285: 74-81.
13. Dang H, Lovell CR (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66: 467-475.
14. Dang H, Chen R, Wang L, Shao S, Dai L, Ye Y, Guo L, Huang G, Klotz MG (2011) Molecular characterization of putative biocorroding microbiota with a novel niche detection of Epsilon- and Zetaproteobacteria in Pacific Ocean coastal seawaters. *Environ Microbiol* 13: 3059-3074.
15. Das P, Mukherjee S, Sen R, (2009) Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids Surf B Biointerfaces* 71: 183-186.
16. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-122.
17. de Bruijn I, de Kock MJD, Yang M, de Waard P, van Beek TA, Raaijmakers JM. (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 63: 417-428.
18. Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol Biol Rev* 61: 47-64.
19. Dheilly A, Soum-Soutera E, Klein GL, Bazire A, Compere C, Haras D, Dufour A (2010) Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Appl Environ Microbiol* 76: 3452-3461.
20. Doghri I, Rodrigues S, Bazire A, Dufour A, Akbar D, Sopena V, Lanneluc I, Sablé S Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm abilities and different biofilm 3D architectures. Submitted in *BMC Microbiol*.
21. Duchaud E, Boussaha M, Loux V, Bernardet JF, Michel C, Kerouault B, Mondot S, Nicolas P, Bossy R, Caron C, Bessières Ph, Gibrat JF, Claverol S, Dumetz F, Le Hénaff M, Benmansour A (2007) Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nat Biotechnol* 25: 763-769.
22. Estrela AB, Heck MG, Abraham WR (2009) Novel approaches to control biofilm infections. *Curr Med Chem* 16: 1512-1530.
23. Farmer JT, Shimkevitch AV, Reilly PS, Mlynek KD, Jensen KS, Callahan MT, Bushaw-Newton KL, Kaplan JB (2014) Environmental bacteria produce abundant and diverse antibiofilm compounds. *J Appl Microbiol* 117: 1663-1673.

24. Ferguson HW, Collins RO, Moore M, Coles M, MacPhee DD (2004) *Pseudomonas anguilliseptica* infection in farmed cod, *Gadus morhua* L. J Fish Dis 27: 249-253.
25. Flemming HC and Wingender J (2010) The biofilm matrix. Microbiol 8: 623-633.
26. Francolini I, Donelli G (2010) Prevention of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol 59: 227-238.
27. Gaspar MC, Couet W, Olivier J-C, Pais AACC, Sousa JJS (2013) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 32: 1231-1252.
28. Grasland B, Mitalane J, Briandet R, Quemener E, Meylheuc T, Linossier I, Vallee-Rehel K, Haras D (2003) Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-attached Marine Bacteria. Biofouling, 19(5): 307-313.
29. Gross H, Loper JE (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. Nat Prod Rep 26: 1408-1446.
30. Haas D, Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat Rev Microbiol 3: 307-319.
31. He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM, Rahme LG (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. PNAS 101(8): 2530-2535.
32. James SG, Holmstrom C, Kjelleberg S (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. App Environ Microbiol 62(8): 2783-2788.
33. Janek T, Łukaszewicz M, Krasowska A (2012) Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. BMC Microbiology 12: 24
34. 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.
35. Kavita K, Singh VK, Mishra A, Jha B (2014) Characterisation and antibiofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. Carbohydr Polym 101: 29-35.
36. Keller-Costa T, Jousset A, van Overbeek L, van Elsas JD, Costa R (2014) The freshwater sponge *Ephydatia Fluviatilis* harbours diverse *Pseudomonas* species (*Gammaproteobacteria*, *Pseudomonadales*) with broad-spectrum antimicrobial activity. PLoS ONE 9: e88429.

37. Kerr KG, Snelling AM (2009) *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect* 73: 338-344.
38. Kim BS, Lee JY, Hwang BK (2000) *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. *Pest Man Sci* 56: 1029-1035.
39. Kim HS, Kim SM, Lee HJ, Park SJ, Lee KH (2009) Expression of the cpdA gene, encoding a 3',5'-cyclic AMP (cAMP) phosphodiesterase, is positively regulated by the cAMP-cAMP receptor protein complex. *J Bacteriol* 191: 922-930.
40. Klein GL, Soum-Soutéra E, Guede Z, Bazire A, Compère C, Dufour A (2011) The antibiofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling* 27: 931-940.
41. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen 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.
42. Lanneluc I, Langumier M, Sabot R, Jeannin M, Refait Ph, Sablé S (2015) On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel. *Int Biodeterior Biodegrad* 99: 55-65.
43. Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C (2010) Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26: 421-431.
44. Malone CL, Boles BR, Lauderdale KJ, Thoendel M, Kavanaugh JS, Horswill AR (2009) Fluorescent reporters for *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods* 77: 251-260.
45. Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JH, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PA, Raaijmakers JM (2011) Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 332: 1097-1100.
46. Nair D, Memmi G, Hernandez D, Bard J, Beaume M, Gill S, Francois P, Cheung AL (2011) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J Bacteriol* 193: 2332-2335.
47. Nishimori E, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H (2000) *Pseudomonas plecoglossicida* sp nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 83-89.

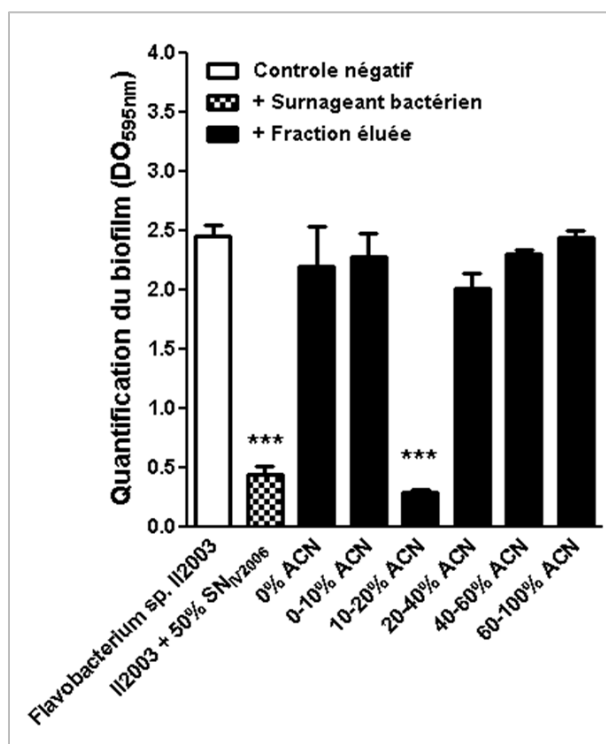
48. Nithya C, Begum MF, Pandian SK (2010) Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 341-358.
49. Nithya C, Devi MG, Pandian SK (2011) A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species. *Biofouling* 27: 519-528.
50. Padmavathi AR, Abinaya B, Pandian SK (2014) Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) of marine bacterial origin inhibits quorum sensing mediated biofilm formation in the uropathogen *Serratia marcescens*. *Biofouling* 30: 1111-1122.
51. Papa R, Parrilli E, Sannino F, Barbato G, Tutino ML, Artini M, Selan L (2013) Antibiofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Res Microbiol* 164: 450-456.
52. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM (2013) Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol* 15(2): 334-346.
53. Rico A, McCraw SL, Preston GM (2011) The metabolic interface between *Pseudomonas syringae* and plant cells. *Curr Opin Microbiol* 14: 31-38.
54. Sablé S, Pons A-M, Gendron-Gaillard S, Cottenceau G (2000) Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66 (10): 4595-4597.
55. Sayem SM, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, De Felice M, Varcamonti M (2011) Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact* 10: 74.
56. Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WM (2011) Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 27: 87-98.
57. Sheppard AE, Poehlein A, Rosenstiel P, Liesegang H, Schulenburg H (2013) Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Cry-. *Genome Announc* 1: e00158-12.
58. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC, Levy SB, Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35: 652-680.
59. Spizizen J (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 1072-1078
60. Thenmozhi R, Nithyanand P, Rathna 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.

61. Tugrul T, Cansunar E (2005) Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World J Microb Biot* 21: 851-853.
62. Turner JM, Messenger AJ (1986) Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv Microb Physiol* 27: 211-275.
63. Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, Ghigo JM (2006) Broad spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12558-12563.
64. van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ (1988) Interfacial Lifshitz–van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem Rev* 88: 927-941.
65. Videla HA, Herrera LK (2005) Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *Int Microbiol* 8: 169-180.
66. Yang L, Liu Y, Wu H, Song Z, Høiby N, Molin S, Givskov M (2012) Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65: 146-157.
67. You J, Xue X, Cao L, Lu X, Wang J, Zhang L, Zhou S (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 1137-1144.
68. Zinger-Yosovich, KD, Gilboa-Garber N (2009) Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* and *Ralstonia solanacearum* lectins by plant and microbial branched polysaccharides used as food additives. *J Agric Food Chem* 57: 6908-6913.

## C/ Purification des molécules actives et caractérisation des effets

### 1. Purification des molécules protéiques impliquées dans l'inhibition de la formation de biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 pendant la phase d'adhésion

Nous avons souhaité purifier, comme déjà décrit dans l'article II, le(s) actif(s) antibiofilm. Nous avons donc adopté la même méthodologie décrite dans l'article II. La première étape de fractionnement par la technique Extraction Phase Solide (colonne Sep-Pak C<sub>18</sub>) permettait d'obtenir une fraction enrichie en molécules actives et qui était débarrassée d'un maximum de contaminants. Les résultats illustrés dans la figure 30 ont été observés avec une quantité de 38 µg de protéines par puits.



**Figure 30 : Fractionnement du surnageant de *Pseudomonas* sp. IV2006**

La figure 30 ci-dessus montre que l'activité inhibitrice de la formation du biofilm a été observée dans la fraction Sep-Pak 10-20% d'acétonitrile avec plus de 80% d'inhibition. Il est donc nécessaire de purifier la ou les molécule(s) responsable(s) de l'activité avec d'autres techniques plus précises comme la CLHP en phase inverse.

## 2. Caractérisation de l'effet d'absorption du surnageant de *Pseudomonas* sp. IV2006

Comme décrit dans l'article III, le surnageant de *Pseudomonas* sp. IV2006 présente une activité inhibitrice du biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 en agissant en partie sur la surface abiotique (spécifiquement la surface en verre). Nous avons cherché à savoir si cet effet est engendré par les mêmes molécules actives responsables de l'inhibition pendant la phase d'adhésion ou bien par d'autres composants du surnageant.

Dans un premier temps, nous avons examiné par goniométrie si les molécules contenues dans les fractions obtenues par Sep-Pak modifiaient les propriétés physico-chimiques de la surface en verre.

Les résultats obtenus en traitant la surface avec le surnageant brut présente de fortes similitudes à ceux obtenus avec la fraction Sep-Pak éluée sans acétonitrile (Tableaux 14 et 15). Les effets observés correspondent à une diminution du caractère acide et à une augmentation du caractère basique et du caractère hydrophile de la surface en verre. Le traitement de la surface avec les autres fractions n'affecte pas ses propriétés physico-chimiques. Sachant que les molécules responsables de l'activité pendant la phase d'adhésion sont élués dans la fraction Sep-Pak 10-20% d'acétonitrile, les résultats montrent que les effets d'inhibition observés pendant la phase d'adsorption et la phase d'adhésion ne sont pas engendrés par les mêmes molécules. Dans ce cas en particulier, la nature hydrophile saccharidique des molécules responsables de l'effet pendant la phase d'adsorption pourrait être suggérée.

**Tableau 14 : Mesures des angles de contact avec l'eau, le formamide et diiodométhane sur les surfaces traitées**

	Eau <sup>a</sup>	Formamide <sup>a</sup>	Diiodométhane <sup>a</sup>
Verre non traité	49,05	39,4	55,1
SN <sub>IV2006</sub>	37	28,06	50,1
Fraction 0% ACN	34,91	29,1	48,9
Fraction 0-20% ACN	53,13	48,77	53,7
Fraction 20-100% ACN	44,47	34,06	52,39

<sup>a</sup> ecrat type < 10%**Tableau 15 : Calcul des composants de l'énergie de surface à partir des mesures d'angles de contact : interaction Lifshitz-van der Waals ( $\gamma^{LW}$ ), caractère acide ( $\gamma_s^+$ ), caractère basique ( $\gamma_s^-$ ), interaction acide-base au sens de Lewis ( $\gamma^{AB}$ ) et l'énergie libre de surface ( $\gamma_s$ )**

	Energie de surface (mJ.m <sup>-2</sup> )				
	$\gamma^{LW}$	$\gamma_s^+$	$\gamma_s^-$	$\gamma^{AB}$	$\gamma_s$
Verre non traité	31,6	2,7	29,0	17,5	49,2
SN <sub>IV2006</sub>	35,6	1,5	38,9	16,6	51,3
Fraction 0% ACN	36,9	1,4	39,5	16,2	51,1
Fraction 0-20% ACN	32,2	0,5	31,4	7,7	30,2
Fraction 20-100% ACN	32,6	1,9	32,1	15,8	48,7

<sup>a</sup> ecrat type < 10%





***Partie III : Interactions  
bactéries / microalgues***

---

A marée basse, les biofilms des vasières intertidales se forment à la surface. Ils sont en partie responsables de la forte productivité de ces zones marines. Sur la côte atlantique européenne, ces biofilms sont principalement composés de la diatomée *Navicula phyllepta*, de bactéries et de substances polymériques extracellulaires (SPE) microbiennes. Pour mieux comprendre les interactions entre des microorganismes constituant ces biofilms, nous avons d'abord axénisé une culture de *N. phyllepta* avec une nouvelle méthodologie simple et efficace, afin d'éliminer les bactéries satellites vivant en association avec les diatomées. Les SPE liées et colloïdales sécrétées par la diatomée pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire, ont été ensuite récoltées et leurs effets sur la formation de biofilm des bactéries marines modèles ont été testés.

Les trois souches bactériennes utilisées dans cette étude sont les bactéries issues du biofilm de la vasière de Brouage, sélectionnées dans la partie I, et qui sont *Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009 et *Shewanella* sp. IV3014. Les SPE liées récoltées en phase stationnaire ont révélés des activités intéressantes agissant au cours des premières étapes cruciales de la mise en place du biofilm. En effet, la formation du biofilm de la souche *Flavobacterium* sp. II2003 a été considérablement inhibée, et à l'inverse, le développement des biofilms par les deux autres souches a été stimulé. Les molécules impliquées dans ces activités ont été biochimiquement caractérisées. Les polysaccharides se sont révélés être responsables de ces effets sur les biofilms.

Ce travail souligne la complexité des biofilms naturels benthiques composés principalement de microalgues et de bactéries. En outre, ces résultats soulignent la possibilité d'utiliser les diatomées axéniques comme une source attrayante de nouveaux composés bioactifs.

Ces résultats font l'objet d'un manuscrit en préparation (Article IV).

**Article IV: Cell-bound exopolysaccharides from an axenic culture of the intertidal mudflat *Navicula phyllepta* diatom affects biofilm formation by benthic bacteria.**

**Ibtissem Doghri**<sup>1</sup>, Johann Lavaud<sup>1</sup>, Alain Dufour<sup>2</sup>, Alexis Bazire<sup>2</sup>, Isabelle Lanneluc<sup>1,\*</sup>, Sophie Sablé<sup>1,\*</sup>

Ibtissem Doghri<sup>1</sup>, [ibtissem.doghri@univ-lr.fr](mailto:ibtissem.doghri@univ-lr.fr)

Johann Lavaud<sup>2</sup>, [johann.lavaud@univ-lr.fr](mailto:johann.lavaud@univ-lr.fr)

Alain Dufour<sup>2</sup>, [alain.dufour@univ-ubs.fr](mailto:alain.dufour@univ-ubs.fr)

Alexis Bazire<sup>2</sup>, [alexis.bazire@univ-ubs.fr](mailto:alexis.bazire@univ-ubs.fr)

Isabelle Lanneluc<sup>1,\*</sup>, [isabelle.lanneluc@univ-lr.fr](mailto:isabelle.lanneluc@univ-lr.fr)

Sophie Sablé<sup>1,\*</sup>, [sophie.sable@univ-lr.fr](mailto:sophie.sable@univ-lr.fr)

<sup>1</sup> Univ. La Rochelle, UMR 7266 CNRS, LIENSs, F-17042 La Rochelle cedex 01, France.

<sup>2</sup> Univ. Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM, F-56100 Lorient, France.

\* The two authors contributed equally to this work

**Corresponding author**

Sophie Sablé, Univ. La Rochelle, UMR 7266 CNRS, LIENSs, F-17042 La Rochelle cedex 01, France. E-mail: [sophie.sable@univ-lr.fr](mailto:sophie.sable@univ-lr.fr)

**Keywords**

Diatoms, bacteria, marine biofilms, exopolysaccharides, algae-bacteria interactions.

## **Introduction**

Biofilms are described in literature as micro-organisms fixed on a surface (natural surfaces as well as solid man-made structures) and encased in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS) of microbial origin (Costerton). The stable environment offered by the EPS matrix cradles the development of a large span of microbial communities, several of which can be deleterious for the surfaces or responsible for the survival of pathogenic bacteria. These biofilms can also constitute a major source of organic matter which directly supplies food webs, as observed in intertidal mudflat biofilms. Intertidal mudflats are among the most productive marine zones in the world (Admiraal et al., 1984) and may provide up to 50% of the primary production of estuaries, in particular because of the formation of biofilms at their surface (Underwood and Kromkamp, 1999). Thus, these mudflats serve as pantry for many animal species and nursery for juvenile fishes by providing shelters and food to numerous species, especially of commercial interest (Beck et al., 2001).

One of the peculiarities of the intertidal mudflat biofilms lies in its transient character. During daily tidal emersion periods, autotrophic micro-algae migrate vertically through the sediment to the surface to access to the light needed for photosynthesis (Consalvey et al., 2004). When micro-algae and heterotrophic prokaryotes are associated with surfaces, they secrete a matrix of mucilaginous EPS and form a biofilm surrounding the particles of intertidal sediments (Consalvey et al., 2004; Decho, 2000). Then, during immersion and/or night periods, the motile micro-algae migrate downward into deeper sediment (Consalvey et al., 2004), a part of the biofilm biomass is resuspended into the water column and the temporary biofilm disappears (Colijn 1982; Serôdio et al. 1997).

This original transient biofilm is mainly composed of micro-algae which constitute the microphytobenthos (Admiraal et al., 1984; MacIntyre and Cullen, 1996; Underwood and Kromkamp, 1999), prokaryotes (mainly bacteria) (van Duyl et al., 2000), and a wide range of EPS (Decho, 1990, 2000; van Duyl et al., 2000). The EPS matrix can limit sediment desiccation by maintaining high pore water content, stabilize sediment grains and protect micro-organisms against exogenous stress (Orvain et al., 2014; Flemming and Wingender 2010). In the biofilm matrix, EPS are rich in polysaccharides, proteins, glycoproteins, uronic acids, lipids and many other compounds (Chiovitti et al., 2003; Pierre et al., 2010, 2012; Underwood et al., 2004). It has been shown that epipellic diatoms secrete 30 to 60% of photoassimilated carbon as EPS into the surrounding sediment (Middelburg et al., 2000; Smith and Underwood, 2000; Underwood et al., 1995). In European intertidal mudflat

---

biofilms, epipelagic diatoms are dominant among the whole microphytobenthic community, where they can represent up to 97% (de Jonge and Colijn, 1994; Méléder et al., 2005). In the French Atlantic coast, the dominant diatom species is *Navicula phyllepta* (Haubois et al., 2005). Bacteria, also very abundant, with generally  $10^9$  cells by ml of sediment (Pascal et al., 2009), remain largely uncharacterized (Gontang et al., 2007). The bacterial communities depend on the depth of the studied sediment, and Gammaproteobacteria are highly predominant (almost 90%) in samples close to the surface (Urakawa et al., 2000).

Inside mudflat biofilms, multiple interactions such as synergy, competition or defense reactions occur between micro-algae and prokaryotes. However, works on these associations are limited, although these micro-organisms are recognized as essential to the biogeochemistry of marine ecosystems (Amin et al., 2012). Within the mudflat biofilms, there is a strong correlation between the diatom biomass and the bacterial abundance (Cammen, 1991; van Duyl et al., 1999; Hamels et al., 2001). The presence of bacteria associated to diatoms, termed “satellite” bacteria (Schäfer et al., 2002), seems essential to the optimal growth of some diatom strains (Bruckner et al., 2008, 2011; Amin et al., 2012). Diatom aggregation is also enhanced in the presence of bacteria (Bruckner et al., 2008; Lubarsky et al., 2010; Gärdes et al., 2011). The modification of the diatom metabolism by bacteria results in a stimulation of the algal EPS secretion on which bacteria feed (Underwood and Paterson, 2003; Bruckner et al., 2008; Gärdes et al., 2011). Several stimulating bacterial substances are suspected, including vitamins and dissolved free amino acids (Amin et al., 2012; Bruckner et al., 2011). These stimulations appear to be highly dependent on the identity of the bacteria (Bruckner et al., 2011; Gärdes et al., 2011). Bacterial growth is enhanced by the organic carbon produced by diatoms (Bellinger et al., 2009) as well as by the decomposition of dead diatoms releasing internal compounds (Walksman et al., 1937). The carbon photosynthetically assimilated by diatoms is transferred to bacteria in few hours, indicating a rapid utilization of labile carbon sources, likely including EPS (Bellinger et al., 2009; Cook et al., 2007; Goto et al., 2001; Middelburg et al., 2000). To remain within the “phycosphere”, where bacterial growth is stimulated by extracellular products of the alga (Bell and Mitchell 1972), bacteria often need to attach to the surface of diatoms. Mechanisms underlying attachment remain unclear, but they likely involve extracellular molecules such as polysaccharides or proteins (Amin et al., 2012). Bacteria also release EPS in response to the presence of phytoplankton, likely to initiate attachment (Rinta-Kanto et al., 2012). EPS are thus crucial intermediaries between bacteria and diatoms. This symbiotic relationship between micro-algae and bacteria is observed in nature as well as in most algal culture collections, which thus are not axenic.

However, interactions between diatoms and bacteria have not always beneficial consequences. Although little studied, it has been shown that many diatoms have defense mechanisms against unwanted and/or algicidal bacteria (Amin et al., 2012). Diatoms secrete fatty acids, esters and polyunsaturated aldehydes that can act as antibacterial compounds and influence the bacterial community structure (Lebeau and Robert, 2003; Ribalet et al., 2008). However, some diatom-associated bacteria were shown to be resistant to bioactive polyunsaturated aldehydes, suggesting that satellite bacteria may have developed resistance to toxic molecules released by diatoms (Ribalet et al., 2008).

It is then clear that numerous interactions occur between bacteria and diatoms inside the intertidal mudflat biofilms, but to our knowledge, nothing is known about the effect of diatoms on the bacterial biofilm formation. In a previous work (Doghri et al., submitted), we selected three bacterial strains from intertidal mudflat biofilms of the French Atlantic coast that were potentially pioneer bacteria, able to attach to different surfaces and to build specific 3D biofilms. These bacterial strains are appropriate models for a better understanding of the colonization of a surface as well as of the interactions that can occur between microorganisms in a marine biofilm. These events are crucial for the initiation of biofouling, which may cause various damages in maritime activities and industries. The aim of this study was to investigate for the first time the specific effects of the diatom secretions (i.e. the secretome, mainly composed of EPS) on the formation of bacterial biofilms. The diatom chosen belongs to the *N. phyllepta* species, since it is one of the most abundant diatom species in temperate intertidal mudflats. To avoid the presence of additional EPS secreted by satellite bacteria, we first axenized a *N. phyllepta* culture and then examined the effects of different fractions of EPS secreted by this diatom on our benthic bacterial biofilm models.

## Materials and Methods

### Diatom and bacterial strains isolation and culturing

*Benthic diatom.* *N. phyllepta* (Culture Collection Yerseke, CCY9804) cells were grown in batch cultures at 20°C in sterile artificial F/2 seawater Medium (Tropic Marin salt, Guillard et al., 1962) with a light intensity of 75  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a 16 h light: 8 h dark photoperiod (white fluorescent tubes, L58W/840, OSRAM, Munich, Germany). Diatom cultures were started with a concentration of 0.3  $\mu\text{g chlorophyll } a \text{ (Chl } a) \text{ ml}^{-1}$  using a Chl *a* spectrophotometric quantification (Jeffrey and Humphrey, 1975). Specific growth rates,  $\mu$

(day<sup>-1</sup>), were calculated from regression of the natural logarithm of the Chl *a* (mg ml<sup>-1</sup>) during their exponential growth phase. During its growth, *N. phyllepta* form a biofilm in the flask bottom that can be visually observed.

**Benthic bacteria.** The three bacterial strains used in this study, *Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009, *Shewanella* sp. IV3014, were isolated from the intertidal temperate mudflat biofilm of the Marennes-Oléron Bay (French Atlantic coast) and were selected for their ability to form biofilms on different surfaces, under static and dynamic conditions (Doghri et al., submitted). Strains were conserved as frozen stocks with 25% glycerol at -80°C. For all tests, the strains were grown at 22°C in Zobell broth (pasteurized Bio-Rad 4 g l<sup>-1</sup>; yeast extract Bio-Rad 1 g l<sup>-1</sup>; sea salts Sigma 30 g l<sup>-1</sup>) supplemented with agar (12g l<sup>-1</sup> Biokar) for solid medium.

### **Axenization of *N. phyllepta***

In order to obtain axenic diatom cultures, different strategies were investigated, combining mechanical cell separation and antibiotic treatments (Fig. 1 and Table 1). According to Shishlyannikov et al. (2011), two pretreatments of the diatom suspensions were tested, and compared with a non-pretreated control (Fig. 1, Physico-chemical pretreatments). The suspensions, incubated or not with Triton X-100, were filtered through a polycarbonate membrane with a pore size of 5 µm (Millipore, USA) put on a Whatman membrane by using a manual filtration unit (Sartorius, Germany). Diatom cells were then washed with artificial seawater and transferred to F/2 medium. Antibiotics were added to the pretreated or the control diatom suspensions which were grown under the conditions described above, with regular soft cell resuspensions (Fig. 1, Antibiotic treatments). The different tested antibiotic combinations are listed in Table 1. Diatom cells were then harvested by filtration, rapidly washed with culture medium, and resuspended in F/2 medium. The degree of axenization was checked by: (i) bacterial numbering with epifluorescence microscopy after DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining; (ii) plating diatom cell suspensions on nutrient-rich agar (Zobell agar) (Fig. 1, Checking). This technique was used to confirm the DAPI numbering and for routinely checking the stability of the axenization over weeks. For the DAPI numbering, diatom cell samples were fixed in formaldehyde (final concentration 2 %) and diluted in di-sodium pyrophosphate 10 mM with 0.1 % of Tween 80. After incubation for 30 min at 4°C, samples were stained with DAPI (1 mg/L) for 15 min and filtered through a polycarbonate membrane with a pore size of 0.2 µm (Nuclepore track-etch Membrane,



Whatman Schleicher & Schuell, USA). The membranes were mounted on a glass slide in a non-fluorescent oil drop and bacterial cells were counted with an epifluorescence microscope (Leica DMRB, mercury steam light, magnification 1000X, filter UV A Leica) over an average of 5 fields.

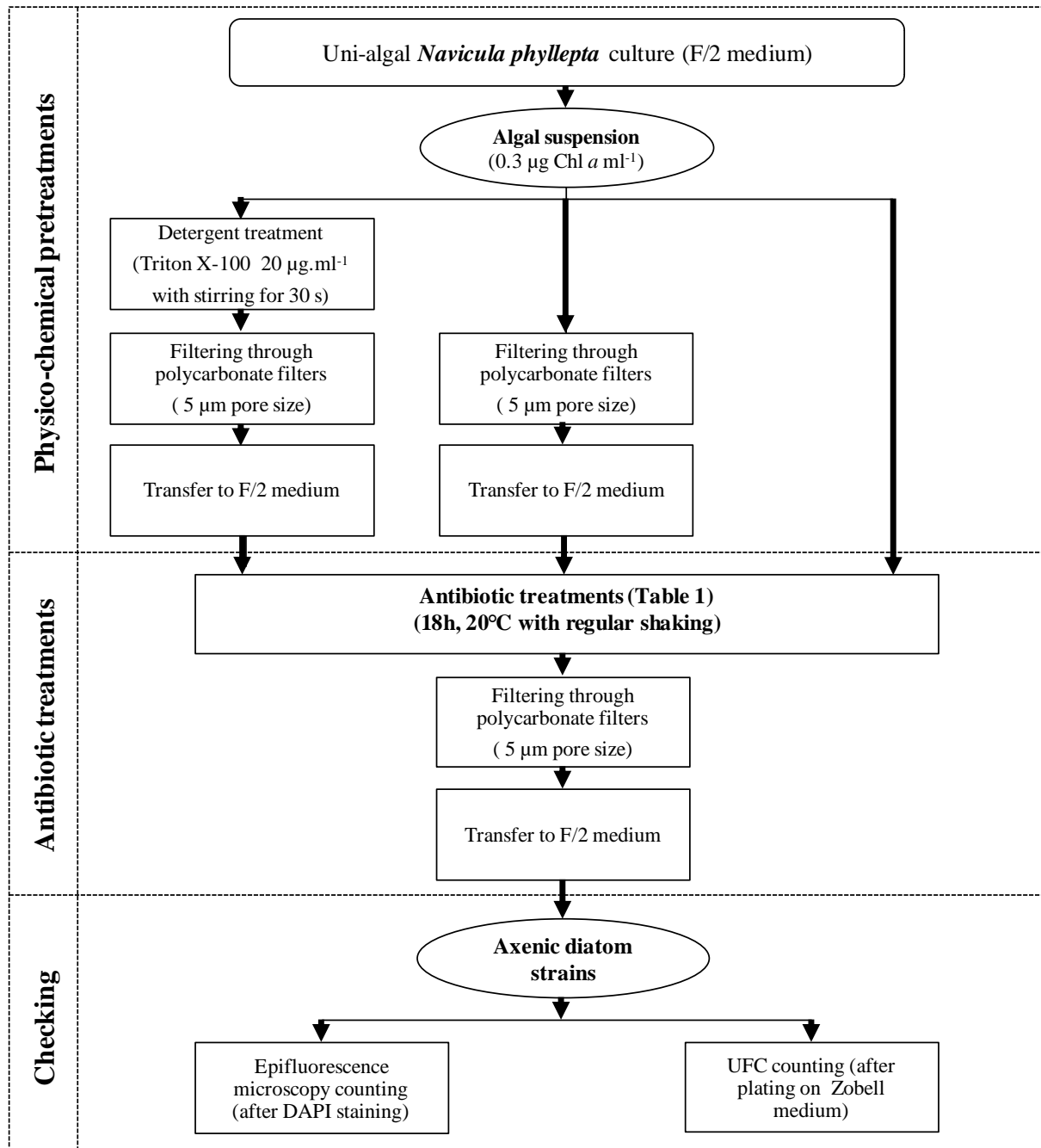


Figure 1. Key steps of the axenization protocol of the *N. phyllepta* diatom culture.

**Table 1. Antibiotics tested alone or in combination for the axenization of the *N. phyllepta* cultures**

<b>Antibiotics</b>	<b>Solvent(s)</b> <b>(%/%)</b>	<b>Final concentration</b> <b>(<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>)</b>
Ampicillin (Ap)	Ethanol / Water (50 / 50)	100
Tetracycline (Tc)	Ethanol / Water (50 / 50)	50
Streptomycin (Sm)	Water	100
Kanamycin (Km)	Water	50
Km + Sm	Water	100/100
Ap + Sm	Ethanol / Water (25 / 75)	100/100
Ap + Tc + Km	Ethanol / Water (25 / 75)	100/50/30
Ap + Tc + Sm + km	Ethanol / Water (25 / 75)	100/50/100/30
Ciprofloxacin (Cip)	Water	5
Imipenem (Ipm)	Water	98

**Extraction of EPS from axenic cultures of *N. phyllepta***

The full protocol is described in Fig. 2. It was adapted from the protocol described by Takahashi et al. (2009). The diatom cultures were sampled after 6 and 12 days of growth (Fig. 2), which corresponds to the middle of the exponential growth phase and the stationary growth phase, respectively. Samples were centrifuged to harvest the supernatants containing the colloidal EPS fraction. To extract the EPS bound to the diatom cells, the pellets were resuspended in F/2 medium containing activated cation exchange resin (Dowex Marathon C, Na<sup>+</sup>, Sigma-Aldrich, USA) and left under soft shaking. After centrifugation, both colloidal

and bound EPS fractions were filtered (Millipore PVDF filters, USA) and concentrated by lyophilization. The salt excess was removed by dialysis and EPS samples were then stored at -80°C until further use.

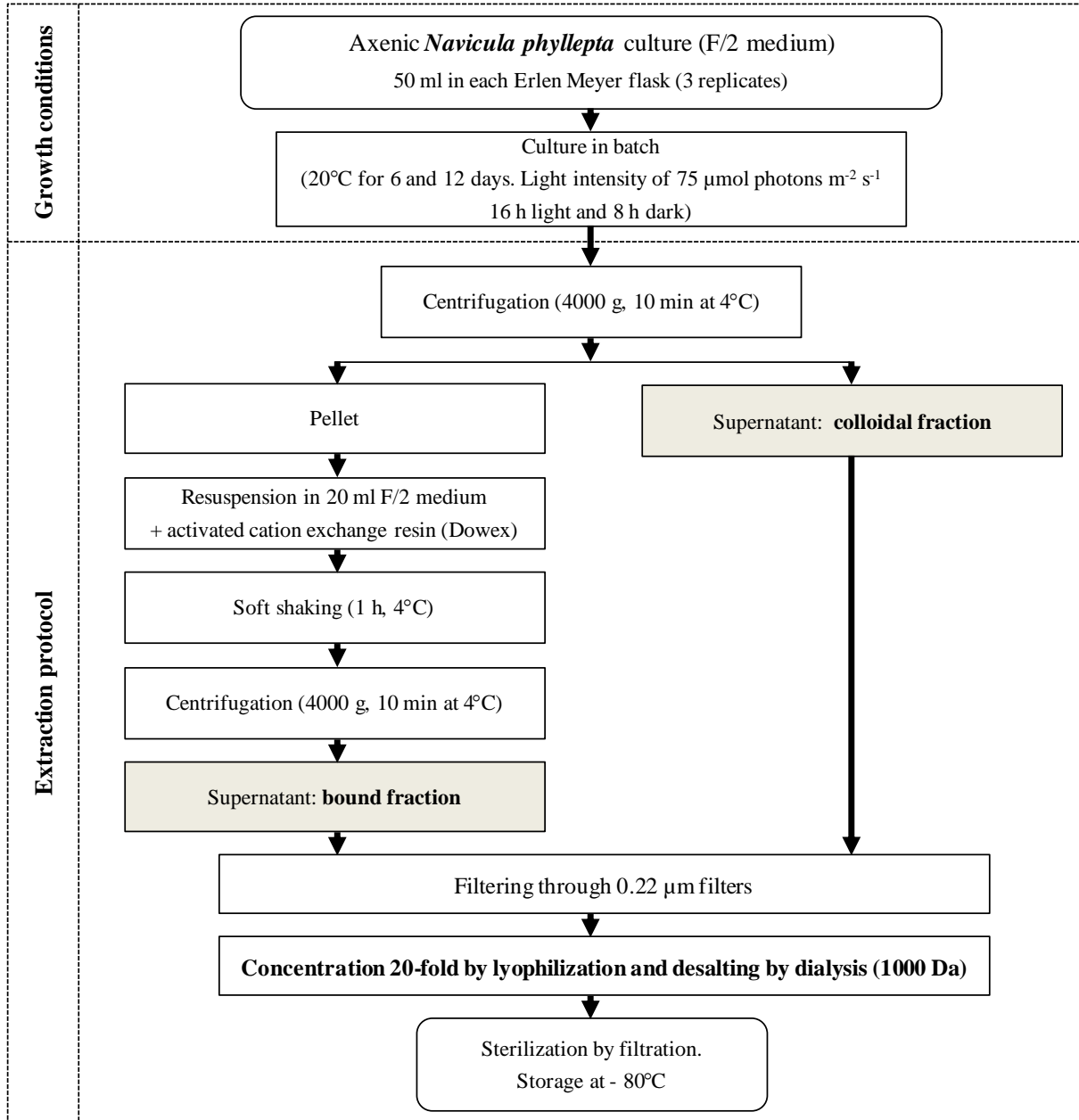


Figure 2. Protocol for the extraction of EPS from axenic *N. phyllepta* cultures.

### **Antibacterial assay**

Antibacterial (ie bactericidal or bacteriostatic) activity of EPS was searched for by using the agar well diffusion assay previously described by Sablé et al., (2000). Sterile glass rings (4 mm inside diameter) were placed on solid nutrient plates (15 ml of Zobell agar inoculated with  $10^7$  of the target bacteria) and filled with 30  $\mu$ l of the EPS 20X samples to be tested. The plates were incubated at 22°C for 48 h to allow bacterial growth and compound diffusion.

### **Effect of the diatom EPS on bacterial biofilm formation**

**Microtiter plate assay: static conditions.** According to Pitts et al., (2003), the EPS fractions were mixed to bacterial suspensions during the adhesion step. After overnight growth (Zobell broth, shaking at 150 rpm, 22°C) and harvesting by centrifugation (7000 g, 10 min), bacteria were resuspended in artificial seawater (for the control) or in EPS fractions to a final optical density at 600nm ( $OD_{600}$ ) of 0.25. 150  $\mu$ l of the resulting suspensions were then loaded ( $10^8$  UFC  $ml^{-1}$ ) of a 96-well microtiter plate (MICROTEST™ 96, Falcon, USA). After a bacterial attachment step of 2 h at 22°C, the wells were gently washed three times with artificial seawater and 150  $\mu$ l Zobell medium were added to each well. After incubation at 22°C for 24h, to let the bacterial biofilms grow, the microplates were washed three times with artificial seawater. The bacterial biofilms were stained with a 0.8% crystal violet solution for 20 min and rinsed with ultra-pure water until the wash-liquid was clear (10 times on average). Absorbed crystal violet was then eluted from attached cells with 96% ethanol (150  $\mu$ l / well) and the absorbance was measured with a plate reader at 595 nm (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Germany) to quantify the biofilms.

**Flow cells assay: dynamic conditions.** Bacterial biofilms were grown on glass slides in continuous culture three-channel flow cells (channel dimensions 1 by 4 by 40 mm, Technical University of Denmark Systems Biology, Denmark) as described by Pamp et al. (2008). Flow cells were inoculated with 24 h grown bacterial cultures diluted in artificial seawater (for the control) or in EPS fractions to a final  $OD_{600}$  of 0.1. Bacteria were allowed to attach to the glass slide during 2 h at 22°C without medium flow. Channels were washed to remove non-attached bacteria by applying a flow of artificial seawater for 15 min at a rate of 2  $ml\ h^{-1}$  and biofilm growth was allowed for 24 h at 22°C under a constant flow of Zobell medium (2  $ml\ h^{-1}$ ). The biofilms were then stained with 5  $\mu$ M Syto 61 red and observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a TCS-SP2 system (Leica Microsystems, Germany). The

biofilm stacks were analyzed with the COMSTAT software (developed in MATLAB, Heydorn et al., 2000) to estimate the maximal and the average thicknesses ( $\mu\text{m}$ ) and the biovolume ( $\mu\text{m}^3 \mu\text{m}^{-2}$ ) of each biofilm.

### **Biochemical assays and characterization of the diatom EPS active fraction**

Proteins assays were carried out with a bicinchoninic acid protein assay kit (Sigma-Aldrich, USA), using bovine serum albumin as a standard (Smith et al., 1985). The sugar content was determined using the phenol-sulfuric acid assay, using glucose as standard (Dubois et al., 1956). To elucidate the biochemical nature of the putative active component(s) of the active diatom EPS fraction, different treatments were performed to digest proteins, lipids, nucleic acids and polysaccharides. Proteinase K or Pronase E was added to a final concentration of  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  and the reaction was incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . Lipase acrylic resin form was used at a final concentration of  $2 \text{ mg ml}^{-1}$  and the reaction was incubated for 48 h under shaking at  $37^\circ\text{C}$ . DNaseI ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) or RNaseA ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was added for 12 h at  $37^\circ\text{C}$ .  $\text{NaIO}_4$  was used to hydrolyze polysaccharides by cleaving the C-C bonds and by oxidizing the carbon of vicinal hydroxyl groups (Mack et al., 1994, 1996). We improved the classical treatment ( $20 \text{ mM NaIO}_4$ , incubation for 12 h at  $37^\circ\text{C}$ ) by adding a neutralization step of the excess of  $\text{NaIO}_4$  with ethylene glycol (1:100) (Babor et al., 1972) for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  followed by a final dialysis step (1000 Da, Spectrum Labs.com, USA).

### **Statistical analyses**

All values presented in the “Results” part are the average of three independent experiments. The standard deviations were calculated using Matlab software (Mathworks Inc., Natick, USA). The statistical analyses between different conditions were determined by the Student *t*-test and considered as significant if *p* values are  $< 0.05$ .

## **Results**

### **Axenization of the *N. phyllepta* diatom**

To increase the effectiveness of antibiotics used to remove the satellite bacteria associated with diatoms ( $8.5 \times 10^5 \text{ Bact ml}^{-1}$ ), different pretreatments were investigated (Fig. 1). While the

detergent treatment reduced the bacterial load by 40 %, it affected considerably the viability of the diatom cells (Chl *a* amount in cultures decreased by more than 50%) and the ability of *N. phyllepta* to form a biofilm (visual observation of a monolayer of Diatoms in the flask bottom). The filtration without detergent treatment reduced the bacterial contamination by up to 30 % without affecting the biological properties of diatoms. This pretreatment was then chosen. After validation of this step, different antibiotics (Ampicillin (Ap), Ciprofloxacin (Cip), Imipenem (Ipm), Kanamycin (Km), Streptomycin (Sm), and Tetracycline (Tc)) were tested, alone or combined (Table 1). The antibiotic treatments containing Ap, Tc, or Ipm were quickly discarded owing to the modification of the visual aspect (i.e. pigmentation), the ability to form biofilms and the growth rate of the diatom cultures. The most promising antibiotic combinations are shown in Table 2. The Cip and Sm treatments reduced the bacterial contamination by 90% according to DAPI counting and by 60% according to agar medium plating. The Km treatment also reduced significantly the bacteria growing on agar medium. Nevertheless, the strongest effect was exerted by the Sm + Km mix which completely removed bacterial contamination. The growth rate of the obtained axenic diatom cultures was  $\sim 1.2 \text{ day}^{-1}$ , which is the same for untreated diatom cultures.

**Table 2. Numeration of bacteria associated with diatoms after treatment with antibiotics not toxic for the *N. phyllepta***

Antibiotic treatment	Microscopic counting (DAPI) (Bacteria ml <sup>-1</sup> )	Counting by plating on agar medium (UFC ml <sup>-1</sup> )
<b>Cip</b>	$6.5 \cdot 10^4 \pm 1.1 \cdot 10^4$	$7.5 \cdot 10^4 \pm 7.8 \cdot 10^3$
<b>Sm</b>	$6.2 \cdot 10^4 \pm 6.1 \cdot 10^3$	$5.1 \cdot 10^4 \pm 10^2$
<b>Km</b>	$5.1 \cdot 10^4 \pm 1.1 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^2 \pm 7$
<b>Km+Sm</b>	$< 3.6 \cdot 10^3$	$< 3 \cdot 10^2$
<b>None</b>	$8.5 \cdot 10^5 \pm 10^4$	$1.4 \cdot 10^5 \pm 2.7 \cdot 10^4$

### Lack of antibacterial effect of the *N. phyllepta* EPS fractions

Antibacterial assays showed that neither the colloidal nor the bound EPS fractions harvested after 6 (D<sub>6</sub>, exponential phase) or 12 days (D<sub>12</sub>, stationary phase) of diatom culture had a

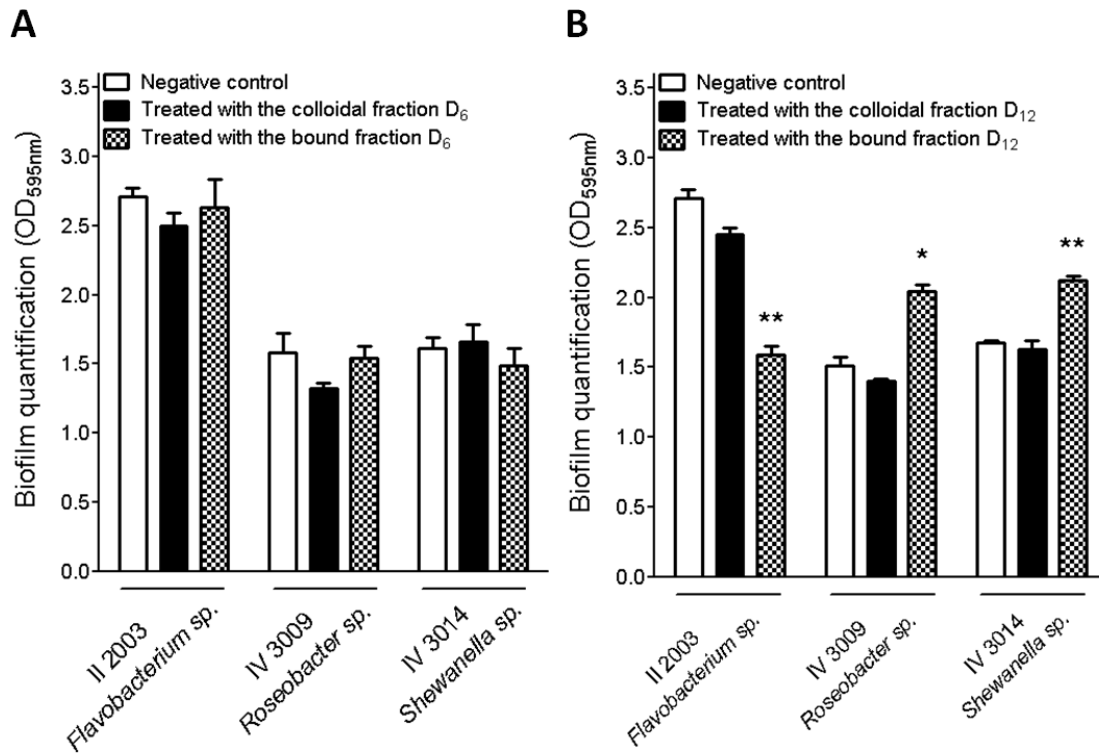
---

bactericidal or bacteriostatic activity against the three marine target bacterial strains, *Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009 and *Shewanella* sp. IV3014.

### Effects of the *N. phyllepta* EPS fractions on bacterial biofilm formation

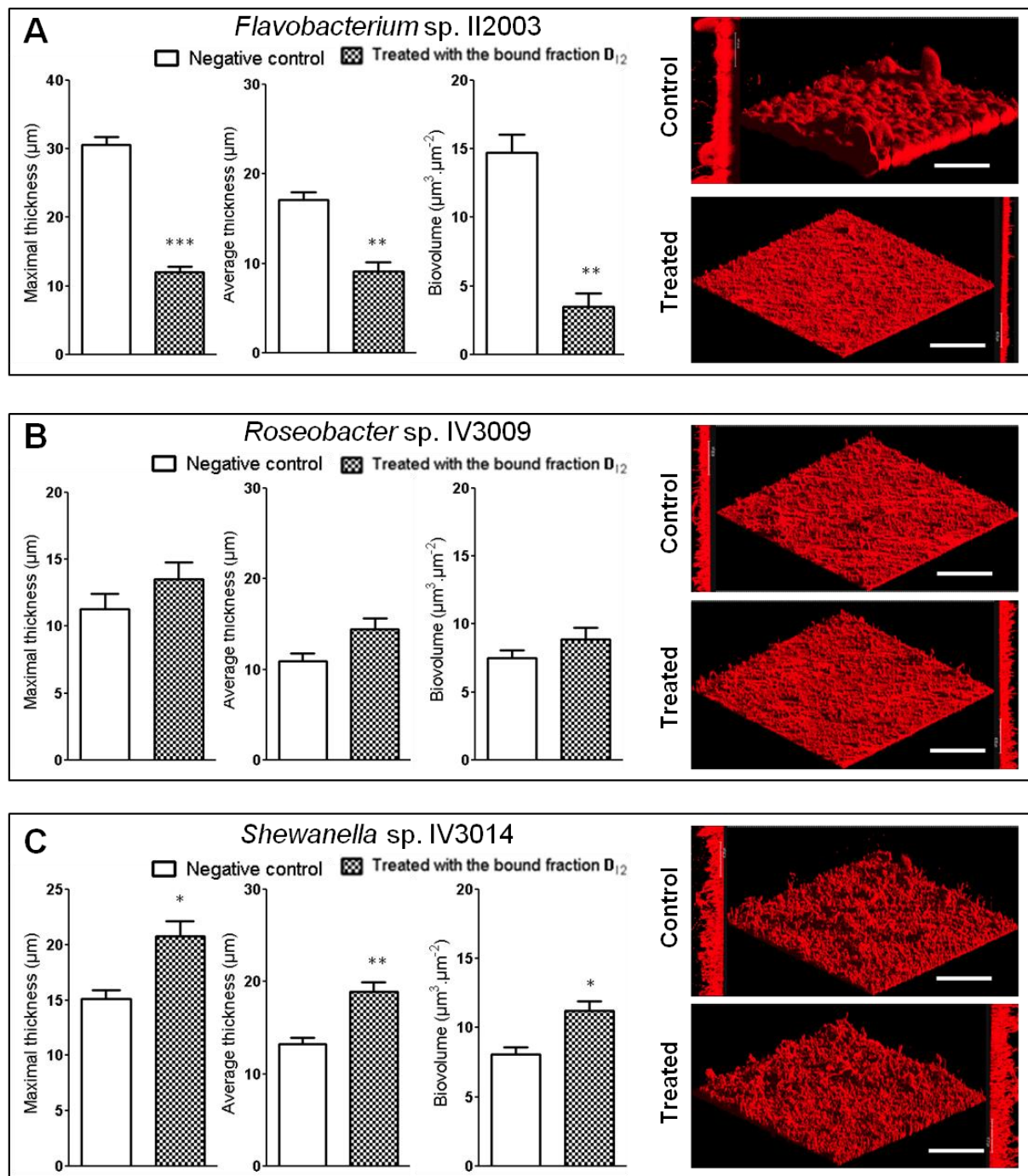
The effects of the *N. phyllepta* secretome (both colloidal and bound EPS fractions) were tested on the bacterial biofilm formation for our three intertidal mudflat bacterial model strains. In static conditions (microtiter plate assay), the D<sub>6</sub> colloidal and bound EPS fractions (Fig. 3A), as well as the D<sub>12</sub> colloidal EPS fraction (Fig. 3B), did not show any significant activity on bacterial biofilm formation. On the contrary, the D<sub>12</sub> bound secretome fraction showed significant effects on the three bacterial strains. Interestingly, this EPS fraction reduced by more than 40% the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm, but improved by more than 30% the biofilms formed by *Roseobacter* sp. IV3009 and *Shewanella* sp. IV3014 (Fig. 3B).

The activity of the D<sub>12</sub> bound EPS fraction on bacterial biofilm formation was further tested by growing the biofilms under dynamic conditions (on glass surface, flow cells assay). The antibiofilm activity against *Flavobacterium* sp. II2003 was also observed in these conditions: compared with the non-treated sample, the treated biofilm was very thin (-76% of the biovolume, -47% of the average thickness and -60% of the maximal thickness of the biofilm) and it lost its mushroom-like 3D structures (Fig 4. A). While the positive effect of D<sub>12</sub> bound EPS was not significant anymore under dynamic conditions for *Roseobacter* sp. IV3009 (Fig 4. B), it was maintained for *Shewanella* sp. IV 3014 (Fig. 4C): the biofilm had been stimulated, as revealed by an increased biovolume (+40%), as well as increased average and maximal thicknesses (+43% and +37%, respectively), without modification in the hairy architecture compared with the control biofilm. The results obtained under static and dynamic conditions were thus consistent.



**Figure 3. Effect of EPS fractions from axenic *N. phyllepta* cultures on bacterial biofilm formation in static conditions.** Biofilms of *Flavobacterium* sp. (II2003), *Roseobacter* sp. (IV3009) and *Shewanella* sp. (IV3014) were grown in 96-well microplates at 22°C for 24 h. Bacterial strains were mixed during the adhesion step with the EPS fractions collected after 6 (D<sub>6</sub>) or 12 (D<sub>12</sub>) days of the *N. phyllepta* growth. (A): D<sub>6</sub> EPS fractions ; (B): D<sub>12</sub> EPS fractions. Negative control: bacterial biofilm without any diatom EPS fraction. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .





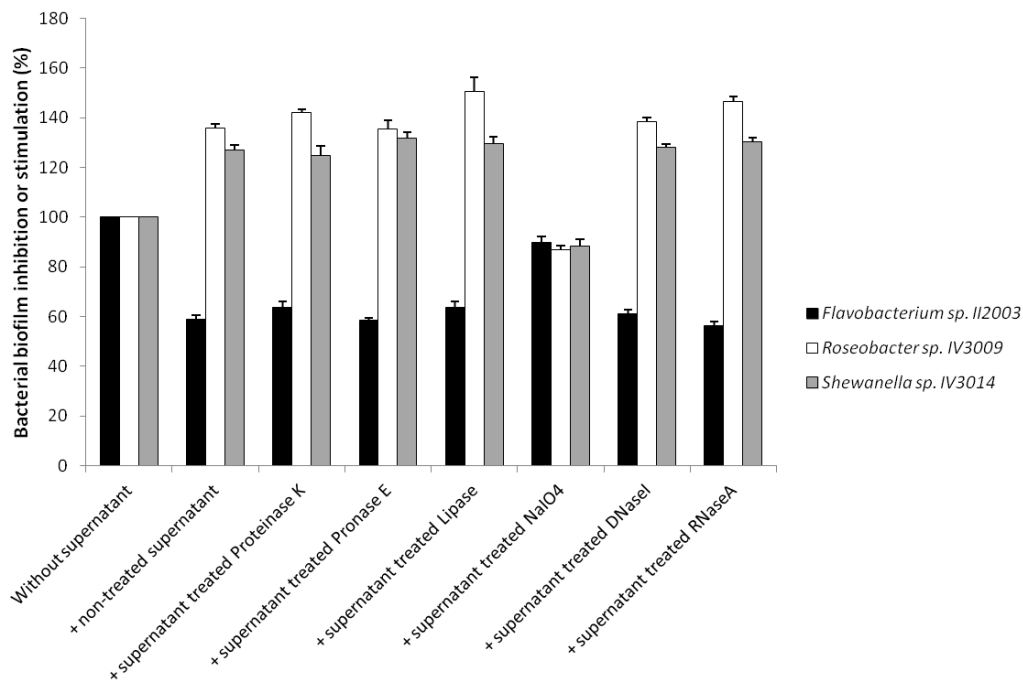
**Figure 4. Effect of EPS bound fraction D<sub>12</sub> from axenic *N. phyllepta* cultures on bacterial biofilm formation in dynamic conditions.** Biofilms of *Flavobacterium sp.* (II2003) (A), *Roseobacter sp.* (IV3009) (B) and *Shewanella sp.* (IV3014) (C) were grown in flow-cell chambers for 24 h, after 2 h of adhesion in the presence or not of the EPS fraction. Biofilms were stained with Syto 61 red. 3D images of the biofilms (top and side views) are shown on the right (bars = 67.3 μm) and the corresponding COMSTAT analysis output on the left. Negative control: bacterial biofilm not treated with diatom EPS fractions. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

### Biochemical characterization of *N. phyllepta* active EPS fraction

The carbohydrate and protein contents of all EPS fractions were quantified (Table 3), in order to compare the active and inactive fractions. It is noticeable that carbohydrate and protein quantities were higher at D<sub>12</sub> than at D<sub>6</sub>. Moreover, the carbohydrate content was higher than the protein one in each sample, and the active fraction (D<sub>12</sub> bound EPS) was the most concentrated in sugars. The *N. phyllepta* D<sub>12</sub> bound EPS fraction was further analyzed. It was submitted to different treatments to gain information on the chemical nature of the putative active compounds (Figure 5). Neither proteases nor lipase nor nuclease treatments significantly affected the activity of the D<sub>12</sub> bound EPS fraction. On the contrary, the NaIO<sub>4</sub> treatment significantly reduced the antibiofilm activity (by 90%) against *Flavobacterium* sp. II2003, and totally cancelled the stimulating activity for *Roseobacter* sp. IV3009 and *Shewanella* sp. IV3014. NaIO<sub>4</sub> is known to be very efficient to hydrolyze polysaccharides by oxidizing the carbons bearing vicinal hydroxyl groups and cleaving the C-C bonds (Bendaoud et al., 2011). These results indicated that the active compounds in the three cases were polysaccharides.

**Table 3. Determination of protein and carbohydrate contents in the *N. phyllepta* EPS fractions**

	D <sub>6</sub> EPS fractions		D <sub>12</sub> EPS fractions	
	Colloidal	Bound	Colloidal	Bound
<b>Proteins (mg l<sup>-1</sup>)</b>	36.3 ± 2.9	45.9 ± 2.3	114 ± 8.7	151 ± 5.4
<b>Carbohydrates (mg l<sup>-1</sup>)</b>	45 ± 3.5	198 ± 9.1	178 ± 6.9	690 ± 12.4



**Figure 5. Effect of various treatments on the capacity of the *N. phyllepta* D<sub>12</sub> bound EPS to still inhibit or stimulate the bacterial biofilm formation.** The reference values of the inhibiting or stimulating effects of the *N. phyllepta* EPS on the bacterial biofilm formation are indicated in the “None (control)” line. The percentages of inhibition or stimulation of the *N. phyllepta* D<sub>12</sub> bound EPS were determined using the microtiter plate assay. \*\*\*: significant at the 0.001 level.

## Discussion

### Successful strategy to purify the *N. phyllepta* cultures from their satellite bacteria

Axenization of diatoms by the removal of bacteria is essential for various experiments such as investigation of the physiology and the biochemistry of individual strains (Bruckner et al., 2009). In our work, pure uni-algal cultures were needed to ascertain that the studied compounds were indeed produced by *N. phyllepta*, and not by accompanying bacteria. Depending on the sampling origin and on the diatom strain, the axenization protocol can be completely different. In particular, benthic diatoms are often difficult to purify because of the mucilage that surrounds the cells (Bruckner et al., 2009). Moreover, many diatoms in co-culture with bacteria grow denser and faster than when they are axenic (Bruckner et al. 2008). During this work, we achieved to purify the intertidal benthic diatom *N. phyllepta*, without changing its main biological properties (growth and biofilm formation), thanks to a

combination of antibiotics (kanamycin + streptomycin) used after a filtering step. This is in accordance with Bruckner et al. (2009) who noticed that for most freshwater benthic diatoms studied, physical separations and antibiotic treatments have to be combined to remove associated bacteria. These authors succeeded in removing the satellite bacteria from some diatom strains with a combination of penicillin G, streptomycin and chloramphenicol without affecting their biological properties in cultures. However, this combination could not be used in our case as chloramphenicol generally inhibits the growth of marine diatoms, including *Navicula* (Khandeparker et al. 2014). As reported by Bruckner et al. (2009), the physical and antibiotic treatment combination used for the axenization depends on the strains. Recently, Windler et al. (2012) described a simple protocol for freshwater benthic diatom axenization including treatment of the cultures with the imipenem antibiotic. However, in our work, the imipenem treatment generated a disturbance of *N. phyllepta* cell attachment and biofilm formation. Windler et al. (2015) observed the same phenomena for the freshwater *Achnantheidium minutissimum* diatoms purified with this antibiotic and they attributed this physiological change to the absence of associated bacteria in the diatom cultures and the reduced production of EPS by the axenic diatom. To optimize the success of our axenization method, diatom cells were treated during the latency growth phase during which the bacterial load is low. Moreover, this approach allowed us to overcome problems due to the excretion of protective substances (such as EPS) by bacteria and diatoms during the growth phase (Orvain et al., 2014; Flemming and Wingender 2010). Additionally, resuspending the cells by shaking at regular intervals enhanced the efficiency of the method by disturbing the diatom-bacteria biofilm formation and then by decreasing the protection toward antibiotics.

### **EPS produced by *N. phyllepta* exhibit activity on bacterial biofilm formation**

Several studies reported the direct (co-cultures) or indirect (via sterile supernatants) effects of bacteria on the algal growth, biofilm formation or metabolism (Amin et al., 2012; Croft et al., 2005, Grossart et al., 2006, Windler et al., 2015). Reciprocally, bacterial growth is largely described as being enhanced by the organic carbon produced by diatoms, possibly including EPS (Bellinger et al., 2009; Cook et al., 2007; Goto et al., 2001; Middelburg et al., 2000; Underwood and Paterson, 2003). However, the influence of diatoms on marine bacterial biofilm formation has never been described so far. The main objective of our work was to investigate the effects of the EPS produced by axenic diatom *N. phyllepta* biofilms on the ability of three benthic bacterial models to form a biofilm. The examined bacterial strains were

---

able to react to one or several molecules secreted by *N. phyllepta*, suggesting that a direct diatom-bacteria contact was not required, as already reported for the bacterial impact on *Achnantheidium minutissimum* biofilm formation (Windler et al., 2015). Moreover, the *N. phyllepta* strain produced the active molecule(s) when cultivated separately from bacteria, which means that the synthesis and the secretion of these molecules were not regulated by bacteria. Nevertheless, one needs to keep in mind that such result highly depends on the micro-organisms (algae and bacteria) used and the experimental approach. In our experimental conditions, the secretome part of axenic *N. phyllepta* active on the early stages of bacterial biofilm formation was the bound EPS fraction harvested during the stationary phase of diatom growth. The main begotten effects we observed were (i) a strong inhibition (-40 %) of the biofilm formation of *Flavobacterium* sp. II2003 under both static and dynamic conditions, and (ii) a stimulation of the biofilm formation, again under both conditions for *Shewanella* sp. IV3014 (up to 40 %), and only under static conditions for *Roseobacter* sp. IV3009. As stated above, the results first depend on the bacterial strains considered, and, to a lesser extent, on the experimental approach. In our case, it is likely that the difference in the surface properties between static (polystyrene) and dynamic (glass) conditions may influence early stages of surface colonization and subsequent biofilm formation of the bacterial strains (Dang and Lovell, 2000; Lee et al., 2008, Jones et al., 2006). It is therefore essential to investigate different conditions of growth and/or biofilm formation to confirm (or not) the significance of the positive or the negative effect of the algal secretome on the bacterial biofilm.

### **The active *N. phyllepta* EPS are polysaccharides**

The biochemical characterization of the active bound EPS fraction demonstrated that the inhibiting/stimulating activity can be assigned to polysaccharides, which were very abundant in the active fraction. In fact, the carbohydrate concentration in both bound and colloidal algal EPS fractions was approximately 4 fold higher during the stationary phase (D<sub>12</sub>) than during the exponential growth phase (D<sub>6</sub>). This is in accordance with Underwood and Paterson (2003) who reviewed the production rates, patterns and composition of benthic diatom EPS in culture and field studies: for all examined taxa including *Navicula* species, when grown in batch culture, the concentrations of extracellular carbohydrates in the medium significantly increase during the transition from exponential growth to stationary phase. On the other hand, we observed lower amounts of proteins (up to 4.6 fold less for bound EPS) compared with the

---

amount of carbohydrates, which is in agreement with the literature. Indeed, carbohydrates and proteins represent about 80% and 5%, respectively, of the weight of EPS in *N. salinarum* (Staats et al., 1999; Underwood and Paterson, 2003). Moreover, the significant increase of total carbohydrate content and decrease of cellular protein content were observed for axenic *N. phyllepta* cultures (Scholz, 2014). EPS (colloidal and bound fractions) extracted directly from mudflat microphytobenthic biofilms also predominantly consisted of polysaccharides, and only small quantities of proteins were present (Pierre et al., 2010, 2012; Underwood and Paterson, 2003).

### **Mode of action of the *N. phyllepta* EPS on the bacterial biofilm formation**

Regardless of specific interaction mechanisms with (a)biotic surfaces during biofilm formation, the nature of the molecules produced by micro-algae can affect the bacterial metabolism and consequently stimulate or inhibit biofilm formation. In the “phycosphere” model of Bell and Mitchell (1972), bacterial growth was proposed to be stimulated by micro-algal extracellular substances. In fact, algal organic substances are generally considered as energy and carbon sources for bacteria (Bellinger et al., 2009) and EPS in particular might play a positive role on bacterial metabolism by supplying nutrients (Bellinger et al., 2009; Cook et al., 2007; Goto et al., 2001; Middelburg et al., 2000). This is not the case for *N. phyllepta* EPS with *Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009 and *Shewanella* sp. IV3014 bacterial strains, because diatom EPS inhibited or enhanced the bacterial biofilm formation but were neither bactericidal nor bacteriostatic. Failing to directly act on cell multiplication, micro-algal polysaccharides could act as signaling molecules that modulate gene expression of target bacteria (Rendueles et al., 2013). For instance, *Lactobacillus acidophilus* A4 polysaccharides caused down regulation of several *E. coli* genes related to biofilm formation (curli genes) (Kim et al., 2009).

Concerning the physico-chemical aspect of the biofilm formation, the stimulating or inhibiting effect of micro-algal EPS can be due to modifications on the one hand of the substratum and on the other hand of the bacterial surface (Grossart et al., 2006). Indeed, microbial EPS can modify the properties of abiotic and biotic surfaces (Rendueles et al., 2013). Studies utilizing culture supernatants or purified polysaccharides as surface coating have provided further evidence that polysaccharides alter the physico-chemical properties of abiotic surfaces by modifying the wettability and charge of the surface and hence affect the interaction of bacteria with the surface (Valle et al., 2006; Rendueles et al., 2011).

---

Additionally, polysaccharides are suspected to change the physical properties of Gram-negative and Gram-positive bacteria cell surfaces such as the cell surface hydrophobicity (Sayem et al., 2011). These properties are known to be used by bacteria during the adhesion phase of biofilm formation and the further development of micro-colonies (Wang et al., 2004; Mack et al., 1996; Leid et al., 2005; Paul et al., 2000).

In our study, diatom polysaccharides can show a powerful biofilm inhibition activity independent of antibacterial activity which leads to ascribe the algal polysaccharide activity as specifically antibiofilm. Several studies identified antibiofilm molecules from bacteria. EPS polysaccharides were specifically shown to (i) disturb the bacterial cell-cell communication that is essential during biofilm formation (Valle et al., 2006), (ii) interfere with bacterial adherence and biofilm formation (Langille et al., 2000) or (iii) disrupt established biofilms by interfering with bacterial adhesins (Qin et al., 2009, Jiang et al., 2011). However, very few polysaccharides from diatoms were described as negatively impacting bacteria or other micro-organisms, and they were not studied in the marine context: (i) polysaccharides isolated from the *Chlorella* and *Spirulina* micro-algae were shown to inhibit binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin in vitro (Loke et al., 2007) and (ii) a sulfated polysaccharide named naviculan and isolated from *N. directa* showed antiviral activities against herpes simplex and influenza A viruses (Lee et al., 2006).

### **Interest for the diatoms to modulate the formation of the bacterial biofilms and potential biotechnological applications**

Our experiments with axenic diatom secretomes and different benthic bacterial biofilm models clearly demonstrate that specific interactions between algae and bacteria are instrumental for bacterial biofilm formation. Specific algae-bacteria interactions have largely been neglected so far, but are presumably as important as nutrient supply and grazing in controlling the development of microphytobenthic biofilms (Grossart et al., 2006). In our work, it was striking to observe that the active diatom secretome fraction showed two opposite effects on the bacterial biofilm formation, depending on the strains. One can hypothesize that *N. phyllepta* would favor some satellite bacteria for its own (or a reciprocal) benefit, and conversely, would inhibit attachment of others, useless or detrimental for the diatom (Amin et al., 2012). The study of marine biofilms raises a growing interest, especially for human activities, and marine diatoms are considered as attractive sources of compounds for biotechnological applications (Fu et al., 2015). Previous reports indicate that secondary

---

metabolites from micro-organisms may constitute one of the most promising sources of environmentally friendly active molecules such as antifouling compounds (Armstrong et al., 2000; Bhattarai et al., 2007). As *Flavobacterium* species are important pathogens in the aquaculture setting (Duchaud et al., 2007) and have been detected in industrial, domestic, as well as medical environment biofilms (Basson et al., 2008), it was then particularly interesting to find a diatom secretome able to strongly inhibit the *Flavobacterium* sp. biofilm formation. Moreover, it is crucial to understand the first steps of marine biofilm formation in order to efficiently prevent biofouling or conversely to stimulate the biofilm formation, as it is known for example that biofilms improve larval settlement and metamorphosis of oysters (Yu et al., 2010). Among our three bacterial models, *Shewanella* sp. IV3014 and *Roseobacter* sp. IV3009 belong to genera known to be dominant among the pioneers (Salta et al., 2013). Hence, the compounds of the *N. phyllepta* secretome responsible for the *Shewanella* sp. IV3014 or *Roseobacter* sp. IV3009 biofilm stimulation should be identified, as well as the molecule(s) inhibiting the *Flavobacterium* sp. II2003 biofilm.

## Conclusion

In this study, we showed that cell-bound exopolysaccharides produced by axenic cultured marine benthic diatoms (*Navicula phyllepta*) affect the preferential mode of life of bacterial benthic strains (i.e. biofilm) without being bactericidal or bacteriostatic. Depending on the bacterial strain, the biofilm formation ability was inhibited or stimulated, pointing out the complexity of the benthic natural biofilms that assemble together several micro-algal and bacterial strains. These observations confirm the existence of complex physico-chemical interactions between micro-organisms in natural biofilms, especially in our model, i.e. the transitory biofilm forming at the surface of sediment of intertidal mudflats during daily emersion. This study also further strengthens the assumption that marine diatoms hide a high potential source for new active compounds. Interestingly, *N. phyllepta* polysaccharides showed specific antibiofilm activity on pathogen bacteria such as *Flavobacterium* sp. Further investigations are needed to elucidate the interactions between model organisms in co-cultures and the detailed characterization of the active molecules.



## **Acknowledgments**

The authors thank the Conseil Général de la Charente Maritime (France) for the PhD grant of Ibtissem Doghri, the CPER littoral 2007-14, the CNRS EC2CO program MicroBiEn 2013-14, the Région Poitou-Charente and the Région Bretagne (France) and the European FEDER funds, for their financial support.

## **References**

1. Admiraal W, Peletier H, Brouwer T (1984) The seasonal succession patterns of diatom species on an intertidal mudflat - an experimental analysis. *Oikos* 42: 30-40.
2. Amin SA, Parker M, Armbrust EV (2012) Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 667-84.
3. Armstrong E, Boyd KG, Burgess JG (2000) Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms. *Biotech Ann Rev* 6: 22-241.
4. Babor K, Kaláč V, Tihlárík K (1973) Periodate oxidation of saccharides. III. Comparison of the methods for determining the consumption of sodium periodate and the amount of formic acid formed. *Chem zvesti* 27: 676-680.
5. Basson A, Flemming LA, Chenia HY (2008) Evaluation of Adherence, Hydrophobicity, Aggregation, and Biofilm Development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like Isolates. *Microb Ecol* 55: 1-14.
6. Beck MW, Heck KL, Able KW, Childers DL, Eggleston DB, Gillanders BM, Halpern B, Hays CG, Hoshino K, Minello TJ, Orth RJ, Sheridan PF, Weinstein MP (2001) The identification, conservation and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience* 51: 633-641.
7. Bell W, Mitchell R (1972) Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol Bull* 143: 265-77.
8. Bellinger B, Underwood G, Ziegler S, Gretz M (2009) Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms determined through isotopic enrichment. *Aquat Microb Ecol* 55: 169-187.
9. Bendaoud M, Vinogradov E, Balashova NV, Kadouri DE, Kachlany SC, Kaplan JB (2011) Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide. *J Bacteriol* 193: 3879-3886.

- 
10. Bhattarai HD, Ganti VS, Paudel B, Lee YK, Lee HK, Hong YK, Shin HW (2007) Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402. World J Microb Biotech 23: 243-249.
  11. Blanchard GF, Guarini JM, Orvain F, Sauriau PG. (2001) Dynamic behaviour of benthic microalgal biomass in intertidal mudflats. J Exp Mar Biol Ecol 264: 85-100.
  12. Bruckner CG, Bahulikar R, Rahalkar M, Schink B, Kroth PG (2008) Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances. Appl Environ Microbiol 74: 7740-7749.
  13. Bruckner CG, Kroth PG (2009) Protocols for the removal of bacteria from freshwater benthic diatom cultures. J Phycol 45: 981-986.
  14. Bruckner CG, Rehm C, Grossart HP, Kroth PG (2011) Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria. Environ Microbiol 13:1052-1063
  15. Cammen L (1991) Annual bacterial production in relation to benthic microalgal production and sediment oxygen uptake in an intertidal sandflat and an intertidal mudflat. Mar Ecol Prog Ser 71: 13-25.
  16. Chiovitti A, Higgins MJ, Harper RE, Wetherbee R, Bacic A (2003) The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (*Bacillariophyceae*). J Phycol 39: 543-554.
  17. Colijn F (1982) Light absorption in the waters of the Ems-Dollard Estuary and its consequences for the growth of phytoplankton and microphytobenthos. Neth J Sea Res 15: 196-216.
  18. Cook PLM, Veuger B, Böer S, Middelburg JJ (2007) Effect of nutrient availability on carbon and nitrogen incorporation and flows through benthic algae and bacteria in near-shore sandy sediment. Aquat Microb Ecol 49: 165-180.
  19. Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC (2004) The ups and downs of life in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. Diatom Research 19: 181-202.
  20. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Science 284: 1318-1322.
  21. Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ, Smith AG (2005) Algae acquire vitamin B<sub>12</sub> through a symbiotic relationship with bacteria. Nature 438: 90-93.

- 
22. Dang H, Lovell CR (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 66: 467-475.
  23. Decho AW (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 28: 73-153.
  24. Decho AW (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Res* 20: 1257-1273.
  25. De Jonge VN, Colijn F (1994) Dynamics of microphytobenthos biomass in the Ems estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 104: 185-196.
  26. Doghri I, Rodrigues S, Bazire A, Dufour A, Akbar D, Sopena V, Lanneluc I, Sablé S Marine bacteria from the French Atlantic coast displaying high forming-biofilm abilities and different biofilm 3D architectures. Submitted in *BMC Microbiol*.
  27. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
  28. Duchaud E, Boussaha M, Loux V, Bernardet JF, Michel C, Kerouault B, Mondot S, Nicolas P, Bossy R, Caron C, Bessières Ph, Gibrat JF, Claverol S, Dumetz F, Le Hénaff M, Benmansour A (2007) Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnol* 25: 763-769.
  29. Falciatore A, Bowler C (2002) Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu Rev Plant Biol* 53: 109-130.
  30. Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8: 623-633.
  31. Fu W, Wichuk K, Brynjólfsson S (2015) Developing diatoms for value-added products: challenges and opportunities. *N Biotechnol* doi: 10.1016/j.nbt.2015.03.016.
  32. Gärdes A, Iversen MH, Grossart H-P, Passow U, Ullrich MS (2011) Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *ISME J* 5: 436-445.
  33. Gontang EA, Fenical W, Jensen PR (2007) Phylogenetic Diversity of Gram-Positive Bacteria Cultured from Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol*. 73: 3272-3282.
  34. Goto N, Mitamura O, Terai H (2001) Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae. *J Exp Mar Biol Ecol* 257: 73-86.
  35. Grossart HP, Levold F, Allgaier M, Simon M, Brinkhoff T (2005) Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ Microbiol* 7: 860-873.

- 
36. Grossart HP, Czub G, Simon M (2006) Algae–bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environ Microbiol* 8: 1074-1084.
  37. Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervaceae* (Cleve Gran). *Can J Microbiol* 8: 229-239.
  38. Hamels I, Muylaert K, Casteleyn G, Vyverman W (2001) Uncoupling of bacterial production and flagellate grazing in aquatic sediments: a case study from an intertidal flat. *Aquat Microb Ecol* 25: 31-42.
  39. Haubois AG, Sylvestre F, Guarini JM, Richard P, Blanchard GF (2005) Spatio-temporal structure of the epipellic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France. *Estuar Coast Shelf S*, 64: 385-394.
  40. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiol* 146: 2395-407.
  41. Heip CHR, Goosen NK, Herman PMJ, Kromkamp J, Middelburg JJ, Soetaert K (1995) Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries. *Oceanogr Mar Biol*, 33: 1-149.
  42. Hünken M, Harder J, Kirst GO (2008) Epiphytic bacteria on the Antarctic ice diatom *Amphiprora kufferathii* Manguin cleave hydrogen peroxide produced during algal photosynthesis. *Plant Biol* 10: 519-526.
  43. Jeffrey SW, Humphrey GR (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen Bd* 167: 191-194.
  44. 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.
  45. Jones PR, Cottrell M, Kirchman DL, Dexter, SC (2006) Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb Ecol* 53: 153-162.
  46. Kaczmarek I, Ehrman JM, Bates SS, Green DH, Léger C, J Harris (2005) Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* 4: 725-741.
  47. Khandeparker L, DeCosta PM, Anil AC, Sawant SS (2014) Interactions of bacteria with diatoms: influence on natural marine biofilms. *Mar Ecol* 35: 233-248.

- 
48. Kim Y, Oh S, Kim SH (2009) Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem Biophys Res Commun* 379: 324-329.
  49. Langille S, Geesey G, Weiner R (2000) Polysaccharide-specific probes inhibit adhesion of *Hyphomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces. *J Ind Microbiol Biotechnol* 25: 81-85.
  50. Lebeau TL, Robert JMR (2003) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. II. Current and putative products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 624-632.
  51. Lee JB, Hayashi K, Hirata M, Kuroda E, Suzuki E, Kubo Y, Hayashi T (2006) Antiviral sulfated polysaccharide from *Navicula directa*, a diatom collected from deep-sea water in Toyama Bay. *Biol Pharm Bull* 29: 2135-2139.
  52. Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH, Lee DH (2008) Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J Microbiol* 46: 174-182.
  53. Loke MF, Lui SY, Ng BL, Gong M, Ho B (2007) Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50: 231-238.
  54. Lubarsky HV, Hubas C, Chocholek M, Larson F, Manz W, Paterson DM, Gerbersdorf SU.(2010) The stabilisation potential of individual and mixed assemblages of natural bacteria and microalgae. *PLoS One* 5: e13794.
  55. MacIntyre H, Cullen J (1996) Primary production by suspended and benthic microalgae in a turbid estuary: time-scales of variability in San Antonio Bay, Texas *Mar Ecol Prog Ser* 145: 245-268.
  56. Mack D, Nedelmann M, Krokotsch A, Schwarzkopf A, Heesemann J, Laufs R (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* 62: 3244-3253.
  57. Mack D, Fischer W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, Laufs R (1996) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* 178: 175-183.
  58. Mann KH (1982) *The Ecology of Coastal Waters: A Systems Approach*. Blackwell Oxford 332.
-

- 
59. Méléder V, Barillé L, Rincé Y, Morançais M, Rosa P, Gaudin P (2005) Spatio-temporal changes in microphytobenthos structure analysed by pigment composition in a macrotidal flat (Bourgneuf Bay, France). *Mar Ecol Prog Ser* 297: 83-99.
60. Middelburg JJ, Barranguet C, Boschker HTS, Herman PMJ, Moens T, Heip CHR (2000) The fate of intertidal microphytobenthos carbon: an in situ  $^{13}\text{C}$ -labeling study. *Limnol Oceanogr* 45: 1224-1234.
61. Orvain F, De Crignis M, Guizien K, Lefebvre S, Mallet C, Takahashi E, Dupuy C (2014) Tidal and seasonal effects on the short-term temporal patterns of bacteria, microphytobenthos and exopolymers in natural intertidal biofilms (Brouage, France). *Journal of Sea Research* 92: 6-18.
62. Orvain F, Galois R, Barnard C, Sylvestre A, Blanchard G, Sauriau PG (2003) Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microb Ecol* 45: 237-251.
63. Pamp SJ, Sternberg C, Tolker-Nielsen T (2008) Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* 75: 90-103.
64. Pascal PY, Dupuy C, Richard P, Mallet C, Châtelet EAD, Niquil N (2009) Seasonal variation in consumption of benthic bacteria by meio- and macrofauna in an intertidal mudflat. *Limnol Oceanogr* 54: 1048-1059.
65. Paul ND, Leslie AP, Kolter R (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* 182: 3593-3596.
66. Pierre G, Graber M, Orvain F, Dupuy C, Maugard T (2010) Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biochem. Syst Ecol* 38: 917-923.
67. Pierre G, Graber M, Rafiliposon B, Dupuy C, Orvain F, Crignis M, Maugard T (2012) Biochemical composition and changes of extracellular polysaccharides (ECPS) produced during microphytobenthic biofilm development (Marennes-Oléron, France). *Microb Ecol* 63: 157-169.
68. Pitts B, Hamilton MA, Zilverc N, Stewart SS (2003) A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods* 54: 269-276.
69. Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S, Tolker-Nielsen T (2009) *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 155: 2148-2156.

- 
70. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM (2013) Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol* 15(2): 334-346.
  71. Rendueles O, Travier L, Latour-Lambert P, Fontaine T, Magnus J, Denamur E, Ghigo JM (2011) Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated anti-adhesion polysaccharides. *mBio* 2: e00043-00011.
  72. Ribalet F, Intertaglia L, Lebaron P, Casotti R (2008) Differential effect of three polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates. *Aquat Toxicol* 86: 249-255.
  73. Rinaudi LV, Gonzalez JE (2009) The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *J Bacteriol* 191: 7216-7224.
  74. Rinta-Kanto JM, Sun S, Sharma S, Kiene RP, Moran MA. (2012) Bacterial community transcription patterns during a marine phytoplankton bloom. *Environ. Microbiol.* 14: 228-239.
  75. Sablé S, Pons AM, Gendron-Gaillard S, Cottenceau G (2000) Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66: 4595-4597.
  76. Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand JF (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ Microbiol* 15: 2879-2893.
  77. Sapp M, Schwaderer AS, Wiltshire KH, Hoppe HG, Gerdts G, Wichels A (2007) Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae?. *Microb Ecol* 53: 683-699.
  78. Sayem SA, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, De Felice M, Varcamonti M (2011) Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact* 10: 74.
  79. Schäfer H, Abbas B, Witte H, Muyzer G (2002) Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiol Ecol* 42: 25-35.
  80. Scholz B (2014) Effects of varying pH on the growth and physiology of five marine microphytobenthic diatoms isolated from the Solthörn tidal flat (southern North Sea, Germany). *Phycologia* 53: 252-264.
  81. Schmidt JL, Deming JW, Jumars PA, Keil RG (1998) Constancy of bacterial abundance in surficial marine sediments. *Limnol Oceanogr* 43: 976-982.
  82. Serôdio J, da Silva JM, Catarino F (1997) Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using in vivo chlorophyll a fluorescence. *J Phycol* 33: 542-553.
-

- 
83. Serôdio J, Vieira S, Barroso F (2007) Relationship of variable chlorophyll fluorescence indices to photosynthetic rates in microphytobenthos. *Aquat Microb Ecol* 49: 71-85.
  84. Shishlyannikov SM, Zakharova YR, Volokitina NA, Mikhailov IS, Petrova DP, Likhoshway YV (2011) A procedure for establishing an axenic culture of the diatom *Synedra acus subsp. radians* (Kütz.) Skabibitsch. from Lake Baikal. *Limnol Oceanogr Methods* 9: 478-484.
  85. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
  86. Smith DJ, Underwood GJC (2000) The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *J Phycol* 36: 321-333.
  87. Staats N, de Winder B, Stal LJ, Mur LR (1999) Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur J Phycol* 34: 161-169.
  88. Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2009) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar Freshwater Res* 60: 1201-1210.
  89. Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: Dynamic, changes in composition, and pathways of production. *J Phycol* 40: 293-301.
  90. Underwood G, Kronkamp R (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Adv Ecol Res* 29: 93-153.
  91. Underwood G, Paterson D (2003) The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Adv Bot Res* 40: 183-240.
  92. Underwood GJC, Paterson DM, Parkes RJ (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnol Oceanogr* 40: 1243-1253.
  93. Urakawa H, Yoshida T, Nishimura M, Ohwada K (2000) Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environ Microbiol* 2: 542-54.



- 
94. Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P, Ghigo JM (2006) Broad spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA 103: 12558-12563.
  95. van Duyl, F.C., de Winder, B., Kop, A.J., Wollenzien, U. (1999) Tidal coupling between carbohydrate concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats. Mar. Ecol. Prog. Ser. 191, 19-32.
  96. van Duyl FC, Winder BD, Kop AJ, Wollenzien U (2000) Consequences of diatom mat erosion for carbohydrate concentrations and heterotrophic bacterial activities in intertidal sediments of the Ems-Dollard estuary. Cont Shelf Res 20: 1335-1349.
  97. Walksman SA, Stokes JL, Butler MR (1937) Relation of bacteria to diatom in seawater. J Mar Biol Assoc UK 22: 359-373.
  98. Wang X, Preston JF, Romeo T (2004) The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. J Bacteriol 186: 2724-2734.
  99. Windler M, Gruber A, Kroth PG (2012) Technical Note: Purification of benthic diatoms from associated bacteria using the antibiotic imipenem. J Endocytobiosis Cell Res 62-65.
  100. Windler M, Leinweber K, Bartulos CR (2015) Biofilm and capsule formation of the diatom *Achnantheidium minutissimum* are affected by a bacterium. J Phycol 51: 343-355.
  101. Yu X, He W, Li H, Yan Y, Lin C (2010) Larval settlement and metamorphosis of the pearl oyster *Pinctada fucata* in response to biofilms. Aquaculture 306: 334-337.
  102. Zeng Y, Zou Y, Chen B, Grebmeier JM, Li H, Yu Y, Zheng T (2011) Phylogenetic diversity of sediment bacteria in the northern Bering Sea. Polar Biology 34: 907-919.
  103. Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DBM, Martiny JBH, Sogin M, Boetius A, Ramette A (2011) Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. PLoS One 6: e24570.



*Discussion générale  
& perspectives*

---

Dans le présent travail, nous avons étudié des bactéries et diatomées issues de deux types originaux de biofilms marins, de la côte Atlantique française, présentant des caractéristiques différentes. Le premier modèle est un biofilm benthique non permanent isolé à partir de la vasière intertidale de Brouage, jouant un rôle positif en alimentant le réseau trophique benthique (Douillet, 1993). Le second modèle est un biofilm permanent formé sur les structures métalliques immergées dans le port de plaisance à La Rochelle et impliqué dans les premières étapes du phénomène de biocorrosion de ces structures (Lanneluc et al., 2015).

Le principal objectif de ce travail de thèse était de comprendre les processus par lesquels les acteurs microbiens de biofilms marins interagissent et donc à plus long terme influencent leur environnement. Pour ce faire, certaines interactions (positives ou négatives) entre microorganismes, au sein des deux modèles de biofilm, ont été caractérisées. Les molécules impliquées dans ces activités ont été identifiées et des applications potentielles ont été suggérées.

Pour atteindre ces objectifs, le projet s'est articulé autour de trois principaux chapitres : (i) sélection des modèles bactériens, (ii) étude des interactions bactéries / bactéries et (iii) étude des interactions bactéries / diatomées.

### ***Sélection des modèles bactériens ayant des capacités à former des biofilms stables***

La première partie a concerné l'identification et la sélection de bactéries marines présentant de fortes aptitudes à former des biofilms sous différentes conditions expérimentales. Ces bactéries potentiellement pionnières dans la formation du biofilm dans l'environnement sont importantes à étudier afin de mieux comprendre les phénomènes de colonisation des surfaces ainsi que les interactions qui pourraient se produire entre les bactéries. La compréhension des étapes initiales d'adhésion est en effet très importante pour expliquer le phénomène de formation des biofilms. Contrairement aux études dans lesquelles la structure des communautés pionnières, développées sur des surfaces artificielles immergées dans l'eau de mer, a été directement étudiée (Lee et al., 2008 ; Brian-Jaisson et al., 2014), notre approche a consisté à établir une collection de bactéries marines cultivables (156 souches hétérotrophes), isolées à partir des deux types de biofilms et ensuite à étudier la capacité de chaque isolât à former des biofilms stables dans des conditions contrôlées. Ces résultats font l'objet d'une publication soumise dans la revue BMC Microbiology (Article I).

Un test en microplaque de 96 puits sur une surface en polystyrène, en conditions statiques, a été développé pour évaluer rapidement le potentiel d'adhésion et de formation de biofilm des microorganismes. De façon surprenante, 16% seulement des bactéries de la collection ont montré une forte capacité à former des biofilms dans les conditions testées. Bien que le mode de vie sédentaire en biofilm soit considéré comme le mode préférentiel d'existence dans la nature des microorganismes (Karatan & Watnick, 2009 ; Richards & Melander, 2009), les bactéries marines testées n'ont pas adhéré facilement à la surface de polystyrène. De cette présélection, nous avons retenu sept bactéries formant un biofilm abondant et stable sur microplaque ( $DO_{595nm} / DO_{600nm} > 8$ ). La capacité à former des biofilms des sept souches a été confirmée sur une surface en verre, toujours en conditions statiques (boîtes « cellview »). Des essais d'adhésion des bactéries sur des coupons d'acier au carbone, dont la composition est identique à celle des structures métalliques portuaires, ont été réalisés en condition statiques (résultats non présentés). L'étude des biofilms formés dans ces conditions était complexe en raison de l'abondance des produits de corrosion qui se forment très rapidement (apparition à partir de 2h) lors de la mise en contact des cellules bactériennes avec les coupons en présence de milieu de culture liquide. Ces produits de corrosion sont marqués non spécifiquement par les techniques de marquage des cellules avec des fluorochromes (exemple du DAPI) et peuvent aussi émettre naturellement de la fluorescence lors des observations au microscope à épifluorescence. Néanmoins, nous avons pu mettre en évidence qu'après une phase d'adhésion de 2h, seules les bactéries isolées des biofilms de la biocorrosion, donc isolées à partir du même type de surface, adhéraient *in vitro* sur les coupons métalliques, à l'inverse des bactéries isolées du biofilm benthique (résultats non présentés).

Bien que le test en microplaque de polystyrène soit un moyen simple de tester la formation de biofilms bactériens, il mesure la formation de biofilms dans des cultures statiques, mais pas dans un environnement naturellement hydrodynamique. C'est pourquoi des expérimentations en conditions dynamiques dans des chambres d'adhésion en flux (« flow cells »), sur une surface en verre, ont été entreprises, ce qui a permis l'établissement d'un flux continu de nutriments frais lors de la croissance des bactéries en biofilm. Cette méthodologie expérimentale a permis de sélectionner quatre bactéries modèles appartenant aux classes des Flavobacteria (*Flavobacterium* sp. II2003), Alpha-Proteobacteria (*Roseobacter* sp. IV3009 et *Roseovarius* sp. VA014) et Gamma-Proteobacteria (*Shewanella* sp. IV3014). *Roseovarius* sp. VA014 est la seule bactérie issue des biofilms sur structures métalliques tandis que les 3

autres souches sélectionnées sont issues du biofilm des vasières intertidales. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Dang et coll. (2011) qui ont identifié des membres des groupes Alpha-Proteobacteria (principalement des bactéries de l'ordre des Rhodobacterales), Gammaproteobacteria (principalement des Alteromonadales et Oceanospirillales), et Bacteroidetes (principalement des Flavobacteriales) comme étant les espèces majoritairement retrouvées pendant les premières étapes de colonisation en milieu marin. Les quatre bactéries modèles, sélectionnées dans ce travail de thèse, ont été caractérisées d'un point de vue microscopique et macroscopique. Ces quatre modèles sont des bactéries Gram-négatives présentant différents types de mobilité.

***Etude des interactions entre bactéries : criblage des activités produites par les bactéries en culture issues des deux types de biofilm***

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons examiné les effets des produits extracellulaires des bactéries marines de la collection sur la croissance en biofilm et en vie libre planctonique des modèles bactériens précédemment sélectionnés. Afin de cribler rapidement la collection entière de bactéries, des cultures de souches issues d'un même biofilm, donc d'un même habitat, ont été réalisées en mélange (par moyenne de 10 souches en mélange) et le surnageant de ces mélanges de souches a été récolté. Neuf « pools » issus du biofilm benthique et huit « pools » issus des structures corrodées ont été constitués. Le criblage des activités des différents surnageants de culture a été réalisé en microplaques pendant les premières étapes de formation du biofilm (pendant la phase des 2h d'adhésion). En se basant sur l'activité des surnageants sur la formation de biofilm et la croissance en planctonique des souches modèles, nous avons sélectionné un pool issu de chaque type de biofilm présentant une forte activité inhibitrice de la formation de biofilm tout en ne possédant pas d'activité vis-à-vis de la croissance en liquide des bactéries. Dans ce chapitre, nous avons sélectionné deux pools inhibant respectivement le biofilm de la souche *Flavobacterium* sp. II2003, issue du biofilm benthique, et celui de la souche *Roseovarius* sp. VA014, issu du biofilm des structures métalliques corrodées. Le pool 6 des souches de la vasière intertidale induit 50% d'inhibition du biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 tandis que le pool 3 des souches des structures métalliques inhibe à 80% la formation du biofilm de la souche *Roseovarius* sp. VA014. Ces pools ont été décomposés et les surnageants des souches cultivées individuellement ont été testés de la même manière que les pools. Une souche issue de chaque pool, donc de chaque type de biofilm, sécrétant des molécules actives dans le

milieu de culture, a ainsi été sélectionnée. La souche *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 produit des molécules antibiofilm contre *Roseovarius* sp. VA014 et la souche *Pseudomonas* sp. IV2006 inhibe le biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003. Nous avons donc focalisé la poursuite de nos travaux sur l'étude des interactions entre deux couples de bactéries : *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 / *Roseovarius* sp. VA014 issues du biofilm des structures métalliques corrodées, d'une part et *Pseudomonas* sp. IV2006 / *Flavobacterium* sp. II2003 issues du biofilm benthique, d'autre part.

Les conditions de culture et de production des surnageants actifs ont été optimisées de manière identique pour les deux souches productrices, au niveau des critères suivants : composition du milieu de culture (milieu Zobell additionné de glucose), conditions de culture (culture dans 100 ml de milieu sous agitation orbitale à 150 rpm dans un erlen meyer de 500 ml) et temps de culture (48h de culture à 22°C). Du glucose a notamment été rajouté en quantité élevée (30 g/l) dans le milieu de culture afin de favoriser la sécrétion des molécules antibiofilm comme cela avait été décrit Petry et coll. (2000). Les molécules à activité antibiofilm sont produites en milieu riche, ce qui laisse suggérer que les bactéries ne produisent pas ces molécules en réponse à un stress vis-à-vis d'un manque de nutriments. De plus, la production est maximale après 48h de croissance ce qui correspond à la phase stationnaire de croissance de bactéries. Nous pouvons ainsi supposer que les composés à activité antibiofilm seraient des métabolites secondaires non essentiels à la croissance des bactéries, bien que leur apportant un avantage certain dans le milieu naturel vis-à-vis des autres bactéries présentes dans le biofilm.

Les activités antibiofilm des surnageants de *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 et de *Pseudomonas* sp. IV2006 ont été confirmées en conditions dynamiques et les effets observés ont été caractérisés.

#### ***Activité antibiofilm des exoproduits de Pseudoalteromonas sp. IIIA004 vis-à-vis de Roseovarius sp. VA014***

Le surnageant de *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 (SN<sub>IIIA004</sub>) n'affecte ni la croissance de la souche cible (*Roseovarius* sp. VA014) ni les propriétés physico-chimiques des surfaces biotiques (surface de la cellule cible) et abiotiques (surface en verre), mais il possède une activité antibiofilm pendant les premières heures d'adhésion de *Roseovarius* sp. VA014 (50% d'inhibition de formation du biofilm) et une activité de dispersion du biofilm mature (60% de biofilm dispersé). Les exoproduits de *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 ont donc une activité

spécifiquement antibiofilm. L'activité observée pendant les deux heures d'adhésion a été biochimiquement caractérisée. Le surnageant actif a montré une sensibilité aux protéases et à la chaleur, suggérant ainsi la nature protéique du ou des composés responsables de l'activité antibiofilm. Nous avons par la suite purifié une molécule responsable de l'activité antibiofilm en exploitant le caractère hydrophobe des protéines. En utilisant des colonnes de chromatographie C<sub>18</sub> (Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> et CLHP phase inverse), nous avons séparé et purifié une molécule active, de nature protéique, de masse 2224 Da (masse déterminée par spectrométrie de masse MALDI TOF-TOF). A 10 µg (pour 10<sup>8</sup> cellules), cette molécule P<sub>004</sub> présente un large spectre d'activité comprenant des bactéries marines et des bactéries pathogènes humaines. À notre connaissance, aucune molécule d'origine bactérienne avec cette masse et possédant une activité antibiofilm n'a été décrite jusqu'à présent. Bien que les bactéries marines appartenant au genre *Pseudoalteromonas* soient connues pour produire de nombreuses substances biologiquement actives incluant des anti-microbiens, des anti-fouling, des algicides (Bowman, 2007), très peu ont été purifiées et caractérisées. La célèbre molécule présentant à la fois une activité antibiofilm et antibactérienne produite par *Pseudoalteromonas tunicata* D2 est une grosse protéine de 190-kDa (James et al., 1996 ; Mai-Prochnow et al., 2004). *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 a également été identifié comme produisant une activité antibiofilm (Papa et al., 2013). Néanmoins, la nature saccharidique du ou des composés actifs a été démontrée. Récemment, les activités antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 ont été décrites (Dheilly et al., 2010 ; Klein et al., 2011) et sont portées par des molécules de nature protéique (Klein et al., 2011). Toutefois, le spectre d'activité des surnageants de ces deux souches (SN<sub>3J6</sub> et SN<sub>D41</sub>) présente des différences (*Vibrio* sp. D01 est fortement inhibé par SN<sub>3J6</sub> mais est insensible à P<sub>004</sub>) et quelques similitudes (*Paracoccus* sp. 4M6 est sensible à tous les surnageants et à P<sub>004</sub>) avec celui du peptide pur P<sub>004</sub> de notre étude. De plus, les auteurs ont rapporté que les molécules antibiofilm de SN<sub>3J6</sub> ont été éluées avec 50% d'acétonitrile à partir d'une cartouche Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> tandis que les molécules antibiofilm de SN<sub>D41</sub> n'étaient jamais éluées à partir de la même colonne avec de l'acétonitrile ou avec d'autres solvants. Sachant que le peptide antibiofilm P<sub>004</sub> est élué avec 20% d'acétonitrile à partir d'une cartouche de Sep-Pak Plus C<sub>18</sub>, ces résultats laissent supposer que les molécules antibiofilm de SN<sub>3J6</sub> et SN<sub>D41</sub> sont différentes du peptide P<sub>004</sub>.

La première perspective de mon travail de thèse serait de poursuivre la caractérisation biochimique de cette molécule. D'autres analyses spectrométriques (Infra-Rouge, RAMAN, RMN...) devraient nous apporter des renseignements sur la séquence et la structure de cette



molécule. Une approche par biologie moléculaire pourrait également être intéressante. L'identification du système génétique codant pour ce peptide et son clonage dans *Escherichia coli* permettrait de produire plus aisément et en plus grande quantité cette molécule.

Le surnageant de *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 est particulièrement intéressant pour la double activité antibiofilm qu'il exerce vis de la souche cible *Roseovarius* sp. VA014 à la fois pendant la phase d'adhésion des cellules et sur le biofilm mature. Néanmoins, seule l'activité exercée pendant les 2h de la phase d'adhésion a été bien caractérisée dans ce travail et attribuée à l'action du peptide P<sub>004</sub>. Il est fondamental de poursuivre nos travaux en déterminant si l'activité sur la dispersion du biofilm mature de *Roseovarius* sp. VA014 est aussi induite par le peptide P<sub>004</sub> ou au contraire est engendrée par d'autres types de molécules.

#### ***Activité antibiofilm des exoproduits de Pseudomonas sp. IV2006 vis-à-vis de Flavobacterium sp. II2003***

De la même manière que SN<sub>IIIA004</sub>, le surnageant de *Pseudomonas* sp. IV2006 (SN<sub>IV2006</sub>) possède une activité spécifiquement antibiofilm vis-à-vis de *Flavobacterium* sp. II2003. En effet, aucune activité bactéricide et/ou bactériostatique de SN<sub>IV2006</sub> n'a été mise en évidence vis-à-vis de *Flavobacterium* sp. II2003. De plus, SN<sub>IV2006</sub> n'a présenté aucun effet sur les caractéristiques physico-chimiques globales (hydrophilie / hydrophobie et acide de Lewis / base) de la surface cellulaire de la souche cible *Flavobacterium* sp. II2003. Concernant l'activité antibiofilm, plusieurs effets ont été observés avec les exoproduits de *Pseudomonas* sp. IV2006 vis-à-vis de la souche cible selon les conditions et les surfaces testées : (i) SN<sub>IV2006</sub> inhibe fortement sur polystyrène en conditions statiques (en microplaque, 80 % d'inhibition de formation du biofilm) et totalement sur verre en conditions dynamiques (en chambre d'adhésion en flux, 100% d'inhibition de formation du biofilm) la formation de biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 pendant la phase d'adhésion de 2h; (ii) SN<sub>IV2006</sub> possède également une activité inhibitrice de la formation du biofilm liée à un conditionnement de la surface abiotique, effet s'exerçant par mise en contact de la surface avec SN<sub>IV2006</sub> avant l'ajout des cellules de *Flavobacterium* sp. II2003. Ce deuxième effet est observé uniquement sur la surface en verre en chambre en flux (40 % d'inhibition de formation du biofilm) et n'est pas visible avec la surface en polystyrène. Les deux effets de SN<sub>IV2006</sub> ont été étudiés d'un point de vue biochimique et physico-chimique.

Nous avons montré, d'une part, que l'activité observée pendant les deux heures d'adhésion est portée par une ou plusieurs molécules de nature protéique. La purification de la ou les molécules active(s) a été entamée et nous avons isolé une fraction enrichie en composé(s) antibiofilm, éluée avec 20% d'acétonitrile, à partir du SN<sub>IV2006</sub>, sur une colonne de séparation basse pression Sep-Pak Plus C<sub>18</sub>. D'autre part, nous avons mis en évidence que SN<sub>IV2006</sub> modifiait les propriétés physico-chimiques de la surface en verre, la rendant plus hydrophile et plus basique, ce qui entrainerait une diminution de l'adhésion des cellules de *Flavobacterium* sp. II2003 possédant des caractéristiques de surface globalement plutôt hydrophobe et basique. Les modifications des propriétés de la surface abiotique doivent être liées à une adsorption sur le verre de molécules de nature plutôt hydrophile, contenues dans SN<sub>IV2006</sub>. En effet, la ou les molécules actives responsables de cet effet ne sont pas retenues sur une colonne Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> et sont éluées avec de l'eau dans une fraction distincte des molécules responsables de l'autre activité.

Par conséquent, des composés différents ayant des effets distincts et cumulatifs sont responsables de l'activité antibiofilm de la bactérie *Pseudomonas* sp. IV2006 (SN<sub>IV2006</sub>) vis-à-vis de *Flavobacterium* sp. II2003: un composé hydrophile, actif sur le verre seulement, durant le conditionnement de la surface et un autre composé de nature protéique exerçant son activité probablement sur les cellules bactériennes, durant la phase d'adhésion aussi bien sur le verre que sur le polystyrène. La purification des principes actifs responsables de ces activités antibiofilm doit être poursuivie par HPLC afin d'obtenir les molécules pures antibiofilm, dont la séquence et la structure pourront par la suite être déterminées. Les exoproduits des bactéries du genre *Pseudomonas* et leur implication dans la formation du biofilm ont été peu décrits dans la littérature. Il a été montré que *Pseudomonas fluorescens* produisait des composés antibactériens comme des glycolipides (Kim et al., 2000) et des lipopeptides cycliques (de Bruijn et al., 2007). Récemment, Farmer et coll. (2014) ont décrit l'activité spécifique antibiofilm de différentes souches de *Pseudomonas* sp. sur *Staphylococcus aureus* sans caractériser le type de molécules actives

### ***Etude des interactions entre bactéries : conclusions et perspectives***

Pour conclure cette deuxième partie sur l'étude des interactions entre des bactéries issues des deux types de biofilms, l'activité antibiofilm des deux bactéries étudiées *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 et *Pseudomonas* sp. IV2006, vis-à-vis de leur souche cible, est particulièrement intéressante car dans les deux cas, elle combine plusieurs effets. Dans

l'environnement naturel, ces souches vivent dans les mêmes biofilms que leur souche sensible, respectivement *Roseovarius* sp. VA014 et *Flavobacterium* sp. II2003. Les deux bactéries produisent des activités spécifiquement antibiofilm mais n'inhibent pas la croissance de leur souche cible en planctonique. Nous pouvons supposer qu'en milieu naturel, *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 et *Pseudomonas* sp. IV2006 essaieraient de 'dominer' dans les biofilms marins en affectant le développement en biofilm d'une grande variété d'autres bactéries marines. Néanmoins, afin de mieux comprendre le rôle de ces bactéries d'un point de vue écologique par rapport aux autres populations microbiennes, il convient d'approfondir le spectre d'activité des exoproduits libérés par ces bactéries vis-à-vis de bactéries marines très proches et plus éloignées d'un point de vue phylogénétique. Nous pourrions vérifier notamment si la souche productrice est auto-immune à sa propre activité antibiofilm et si d'autres souches de *Pseudoalteromonas* et *Pseudomonas* sont sensibles ou résistantes respectivement à l'activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 et *Pseudomonas* sp. IV2006. Les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* sont connues notamment pour influencer la formation de biofilm dans différentes niches écologiques marines (Bowman, 2007). Elles influencent la germination et la métamorphose de diverses espèces d'invertébrés et d'algues marines (Holmström et al., 1996; Holmström & Kjelleberg, 1999) ou bien peuvent agir comme agents de défense au niveau de la flore et la faune marines (Dobretsov et al., 2006 ; Holmström et al., 2002). Les études ont été jusqu'à présent limitées à un groupe relativement petit de souches de *Pseudoalteromonas* et *Pseudomonas* par rapport à la diversité connue des genres suggérant que beaucoup plus de découvertes de nouveaux produits naturels ainsi que des connexions écologiques qui doivent avoir lieu dans l'écosystème marin, restent à comprendre.

Au niveau des applications potentielles des molécules antibiofilm produites par *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 et *Pseudomonas* sp. IV2006, d'autres perspectives à ce travail sont envisageables. Il faudrait vérifier l'action antibiofilm mesurée sur certaines bactéries pathogènes en testant les molécules anti-biofilm sur différentes souches pathogènes de la même espèce. Néanmoins l'utilisation potentielle des molécules antibiofilm produites par *Pseudoalteromonas* sp. IIIA004 et *Pseudomonas* sp. IV2006 est particulièrement intéressante et envisageable aussi bien en aquaculture qu'en santé humaine car elles affectent aussi bien des bactéries marines pathogènes des poissons (telles que des bactéries des genres *Flavobacterium*, *Tenacibaculum* et *Vibrio*) que des pathogènes humains (tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Yersinia enterocolitica*).

Enfin, la compréhension du mécanisme d'action des molécules antibiofilm devra également être explorée. Cibler des mutants insensibles aux molécules purifiées permettrait d'identifier les gènes inactivés et donc de déduire le mode d'action spécifique de ces antibiofilms. Une autre démarche consisterait à caractériser les protéomes de souches cibles en présence ou en absence de ces molécules inhibitrices. Voir si ces molécules auraient des effets sur les constituants de la matrice des biofilms pourrait être examiné grâce à des marquages spécifiques de ces constituants et une visualisation ensuite en microscopie confocale.

### ***Etude des interactions entre bactéries et microalgues issues du biofilm benthique***

Dans le troisième chapitre de thèse nous nous sommes intéressés aux interactions bactéries / diatomées issues de biofilm benthique. Nous avons examiné les effets du sécrétome de la diatomée *Navicula phyllepta*, l'espèce dominante des vasières intertidales de la côte Atlantique française (Haubois et al., 2005), sur les trois bactéries modèles précédemment sélectionnées (Partie I), issues du même habitat, *Flavobacterium* sp. II2003, *Roseobacter* sp. IV3009, et *Shewanella* sp. IV3014. Dans un premier temps, nous avons développé une technique simple et efficace, à base d'antibiotiques, permettant d'axéniser les cultures de la diatomée *Navicula phyllepta*. Cette étape s'est imposée au début de cette étude puisque dans l'environnement naturel comme dans les collections de souches, les diatomées vivent souvent associées à des bactéries satellites (Bruckner et al., 2009, 2011; Amin et al., 2012). Afin d'étudier les exoproduits de ces microalgues, il est donc nécessaire de se débarrasser de ces microorganismes dont les produits peuvent fausser les expérimentations. Nous ne pouvons exclure néanmoins que ces bactéries satellites doivent influencer le métabolisme des diatomées et que l'expression de certains gènes par les diatomées peut varier en présence ou en absence de ces bactéries satellites (Amin et al., 2012). Il existe plusieurs protocoles de purification décrits dans la littérature (Article IV) que nous avons reproduits. Néanmoins, aucun des protocoles déjà décrits n'a fonctionné dans nos conditions, montrant que la démarche à adopter dépend de la souche de diatomée et de son origine. .

Dans un second temps, nous avons cherché à identifier les types d'interactions (positives et négatives) entre diatomées et bactéries pouvant être retrouvées dans le contexte d'un biofilm benthique. L'objectif était d'évaluer l'effet des exoproduits de *N. phyllepta* sur la capacité des trois bactéries modèles à former des biofilms. Les diatomées des vasières intertidales sont connues pour produire largement dans leur sécrétome des substances

polymériques extracellulaires (SPE) qui participent à la structuration spécifique du biofilm observé à la surface des vasières intertidales (Consalvey et al., 2004 ; Decho, 2000). Par simplification, nous avons donc nommé SPE les exoproduits de la diatomée *N. phyllepta*. Dans ce travail, les diatomées ont été cultivées *in vitro* en biofilm et les SPE colloïdales et liées aux cellules ont été récupérées à deux temps de culture différents (au milieu de la phase exponentielle J<sub>6</sub> et en phase stationnaire J<sub>12</sub>). La fraction liée J<sub>12</sub> présente une activité intéressante vis-à-vis des trois bactéries modèles en conditions statiques en microplaque. En effet, une inhibition de la formation du biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 (40 %) et une stimulation du biofilm de *Roseobacter* sp. IV3009 (35 %) et *Shewanella* sp. IV3014 (30 %) ont été observées. Afin de confirmer ces effets, nous avons reproduit les expérimentations en conditions dynamiques dans des chambres d'adhésion en flux (« flow cells »). Deux effets sur trois ont été confirmés (50 % d'inhibition du biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 et 45 % de stimulation du biofilm de *Shewanella* sp. IV 3014) montrant ainsi l'importance des conditions expérimentales adoptées. Ces activités ont été biochimiquement caractérisées et la nature saccharidique des molécules impliquées dans ces activités a été démontrée. Les diatomées du genre *Navicula* sont connues pour produire de grandes quantités de polysaccharides tout particulièrement en fin de croissance (Underwood & Paterson, 2003). Il a été démontré que cette matière organique est rapidement consommée par les bactéries environnantes (Middelburg et al., 2000 ; Goto et al., 2001 ; Cook et al., 2007 ; Bellinger et al., 2009;). Les bactéries *Roseobacter* sp. IV3009 et *Shewanella* sp. IV3014 pourraient ainsi utiliser les polysaccharides contenus en plus grande quantité dans les SPE liées J<sub>12</sub> comme source de carbone pour leur croissance, ce qui expliquerait la stimulation de la formation de leur biofilm. Les effets négatifs attribués aux polysaccharides vis-à-vis du biofilm de *Flavobacterium* sp. II2003 sont dus à un mécanisme d'action encore non élucidé. Seuls quelques rares composés antibactériens (des acides gras, des esters ou bien des aldéhydes polyinsaturés) produits par des diatomées marines ont été décrits (Lebeau & Robert, 2003 ; Ribalet et al., 2008). Par contre, plusieurs polysaccharides d'origine bactérienne présentant une activité antibiofilm sont connus. Par exemple, certains peuvent perturber la communication cellulaire pendant la formation des biofilms (Valle et al., 2006), interférer dans le processus d'adhésion (Langille et al., 2000), ou disperser le biofilm mature (Qin et al., 2009 ; Jiang et al., 2011). En perspective de ce travail de thèse, il serait donc intéressant de déterminer la nature exacte des molécules impliquées en les purifiant et d'élucider leurs modes d'action. Nous pourrions ainsi examiner si les molécules actives contenues dans les SPE de la diatomée s'adsorbent sur les surfaces aussi bien abiotiques que biotiques et agissent

ainsi en modifiant les propriétés de la surface sur laquelle les bactéries adhèrent ou bien les propriétés globales de la surface des cellules bactériennes. Ceci nous orienterait vers un effet au niveau de l'adhésion des cellules. Un effet de dispersion du biofilm mature pourra également être recherché pour la ou les molécules actives isolées de *N. phyllepta*.

Ce travail est original car il aborde des interactions entre les diatomées marines et des bactéries vivant dans le même environnement encore peu explorées à ce jour. Dans ce travail, il est intéressant de constater que le sécrétome actif de *N. phyllepta* a deux effets opposés sur la formation d'un biofilm bactérien, selon les souches. On peut ainsi émettre l'hypothèse que dans le biofilm benthique, *N. phyllepta* favoriserait certaines bactéries satellites pour son propre (et réciproque) profit, et, inversement, inhiberait l'attachement des autres bactéries, inutiles ou nuisibles pour la diatomée (Amin et al., 2012). Etudier à l'inverse les effets des bactéries sélectionnées sur la diatomée *N. phyllepta* élargirait nos connaissances et nous permettrait de mieux comprendre le rôle écologique des interactions entre ces microorganismes au sein des biofilms des vasières intertidales.

---

## **Conclusion finale**

---

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail de thèse confirment d'une part que les microorganismes marins (bactéries et diatomées) possèdent un fort potentiel de production de molécules à activité antibiofilm comme cela a déjà été suggéré par différents auteurs (Armstrong et al., 2000 ; Bhattarai et al., 2007 ; You et al., 2007). Ces molécules pourraient être valorisées et exploitées dans plusieurs domaines d'applications aussi bien dans le domaine marin (aquaculture, industrie navale, structures portuaires) que dans le domaine médical (santé humaine, animale). D'autre part, ces travaux mettent en évidence l'existence de nombreuses interactions de type compétitions et/ou coopérations entre bactéries et bactéries/diatomées dans les biofilms marins. En effet, dans la nature, les biofilms sont très complexes et composés de plusieurs communautés microbiennes de différentes espèces. Comme la distribution des espèces microbiennes et la composition chimique des biofilms marins peuvent être très variables, l'influence que peuvent avoir entre eux les microorganismes est complexe. A travers des molécules excrétées, les microorganismes ont la capacité de favoriser ou d'inhiber la croissance et/ou la formation de biofilm d'autres microorganismes. Ces activités sont souvent dues à la production de composés antibiotiques

et/ou antibiofilms ainsi qu'à des signaux chimiques de stimulation, l'ensemble de ces composés étant essentiellement non caractérisés à ce jour.





***Références bibliographiques***

---

# ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Abreu PC, Roering LR, Gracia V, Odeberecht and Biddanda B**, « Decoupling between bacteria and the surf-zone diatom *Asterionellopsis glacialis* at Cassino Beach, Brazil », *Aquatic Microbial Ecology* 32, 2003, 219-228.

**Admiraal W, Peletier H and Brouwer T**, « The seasonal succession patterns of diatom species on an intertidal mudflat - an experimental analysis », *Oikos* 42, 1984, 30-40.

**Adolph, Bach S, Blondel M, Cueff A, Moreau M, Pohnert G, Poulet SA, Wichard T and Zuccaro A**, « Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla », *The Journal of Experimental Biology* 207, 2004, 2935-2946.

**Aldred N and Clare AS**, « The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings », *Biofouling* 24, 2008, 351-363.

**Allen AE, Dupont CL, Oborník M, Horák A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, Zheng H, Johnson DA, Hu H, Fernie AR and Bowler C**, « Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms », *Nature* 473, 2011, 203-207.

**Amann RI, Ludwig W and Schleifer KH**, « Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation », *Microbiological Reviews* 59, 1995, 143-169.

**Amin SA, Parker MS and Armbrust EV**, « Interactions between Diatoms and Bacteria », *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 76, 2012, 667-84.

**Amin SA, Küpper FC, Green DH, Harris WR and Carrano CJ**, « Boron binding by a siderophore isolated from marine bacteria associated with the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* », *Journal of the American Chemical Society* 129, 2007, 478-479.

**Anderson GG and O'Toole GA**, « Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms », *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322, 2008, 85-105.

**Antonova ES and Hammer BK**, « Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholerae* », *FEMS Microbiology Letters* 322, 2011, 68-76.

**Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kröger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP and Rokhsar DS**, « The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism », *Science* 306, 2004, 79-86.

**Armstrong E, Boyd KG and Burgess JG**, « Prevention of marine biofouling using natural compounds from marine organisms », *Biotechnology Annual Review* 6, 2000, 221-241.

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Banks MK and Bryers JD**, « Deposition of bacterial cells onto glass and biofilm surfaces », *J Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 6, 1992, 81-86.

**Barakat R, Goubet I, Manon S, Berges T and Rosenfeld E**, « Unsuspected Pyocyanin Effect in Yeast under Anaerobiosis », *Microbiologyopen* 3, 2014, 1-14.

**Baty AM, Eastburn CC, Techkarnjanaruk S, Goodman AE and Geesey GG**, « Spatial and temporal variations in chitinolytic gene expression and bacterial biomass production during chitin degradation », *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2000, 3574-3585.

**Beck MW, Heck KL, Able KW, Childers DL, Eggleston DB, Gillanders BM, Halpern B, Hays CG, Hoshino K, Minello TJ, Orth RJ, Sheridan PF and Weinstein MP**,

« The identification, conservation and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates », *Bioscience* 51, 2001, 633-641.

**Bell W and Mitchell R**, « Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products », *The Biological Bulletin* 143, 1972, 265-277.

**Bellinger B, Underwood G, Ziegler S and Gretz M**, « Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms determined through isotopic enrichment », *Aquatic Microbial Ecology* 55, 2009, 169-187.

**Bellou N, Papathanassiou E, Dobretsov S, Lykousis V and Colijn F**, « The effect of substratum type, orientation and depth on the development of bacterial deep-sea biofilm communities grown on artificial substrata deployed in the eastern Mediterranean », *Biofouling* 28, 2012, 199-213.

**Beloin C and Ghigo JM**, « Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms », *Trends in Microbiology* 13, 2005, 16-19.

**Beloin C, Houry A, Froment M, Ghigo JM and Henry N**, « A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics », *PLoS Biology* 6, 2008, e167.

**Beloin C, Renard S, Ghigo JM and Lebeaux D**, « Novel approaches to combat bacterial biofilms », *Current Opinion in Pharmacology* 18, 2014, 61-68.

**Bendaoud M, Vinogradov E, Balashova NV, Kadouri DE, Kachlany SC and Kaplan JB**, « Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella Kingae* exopolysaccharide », *Journal of Bacteriology* 193, 2011, 3879-3886.

**Bermont-Bouis D, Janvier M, Grimont PAD, Dupont I and Vallaeyts T**, « Both sulfate-reducing bacteria and *Enterobacteriaceae* take part in marine biocorrosion of carbon steel », *Journal of Applied Microbiology* 102, 2007, 161-168.

**Bhattarai HD, Ganti VS, Paudel B, Paudel B, Lee YK, Lee HK, Hong YK and Shin HW** « Isolation of antifouling compounds from the marine bacterium, *Shewanella oneidensis* SCH0402 », *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 2007, 243-249.

**Bjarnsholt T, Jensen P, Burmolle M, Hentzer M, Haagensen JAJ, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Hoiby N and Givskov M**, « *Pseudomonas*

*aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxyde and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent », *Microbiology* 151, 2005, 373-383.

**Blanchard GF, Guarini JM, Orvain F and Sauriau PG**, « Dynamic behaviour of benthic microalgal biomass in intertidal mudflats », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 264, 2001, 85-100.

**Blunt JW, Copp BR, Munro MH, Northcote PT and Prinsep MR**, « Marine natural products », *Natural Product Reports* 21, 2004, 1-49.

**Boles BR and Horswill AR**, « Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms », *PLoS Pathogens* 4, 2008, e1000052.

**Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otilar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, Fournet J, Haruta M, Huysman MJ, Jenkins BD, Jiroutova K, Jorgensen RE, Joubert Y, Kaplan A, Kröger N, Kroth PG, La Roche J, Lindquist E, Lommer M, Martin-Jézéquel V, Lopez PJ, Lucas S, Mangogna M, McGinnis K, Medlin LK, Montsant A, Oudot-Le Secq MP, Napoli C, Obornik M, Parker MS, Petit JL, Porcel BM, Poulsen N, Robison M, Rychlewski L, Rynearson TA, Schmutz J, Shapiro H, Siaut M, Stanley M, Sussman MR, Taylor AR, Vardi A, von Dassow P, Vyverman W, Willis A, Wyrwicz LS, Rokhsar DS, Weissenbach J, Armbrust EV, Green BR, Van de Peer Y and Grigoriev IV**, « The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes », *Nature* 456, 2008, 239-244.

**Bowman JP**, « Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas* », *Marine Drugs* 5, 2007, 220-241.

**Bruckner CG and Kroth PG**, « Protocols for the removal of bacteria from freshwater benthic diatom cultures », *Journal of phycology* 45, 2009, 981-986.

**Bruckner CG, Rehm C, Grossart HP and Kroth PG**, « Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria ». *Environmental Microbiology* 13, 2011, 1052-1063.

**Brian-Jaisson F, Ortalo-Magné A, Guentas-Dombrowsky L, Armougom F, Blache Y, Molmeret M**, « Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean sea exhibiting different abilities of biofilm formation ». *Microbial Ecology* 68, 2014, 94-110.

**Burgess JG, Boyd KG, Armstrong E, Jiang Z, Yan L, Berggren M, May U, Pisacane T, Granmo A and Adams DR**, « The Development of a marine natural product-based antifouling paint », *Biofouling* 19, 2003, 197-205.

**Byrd MS, Sadovskaya I, Vinogradov E, Lu H, Sprinkle AB, Richardson SH, Ma L, Ralston B, Parsek MR, Anderson EM, Lam JS and Wozniak DJ**, « Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* PSL exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production », *Molecular Microbiology* 73, 2009, 622-638.

## AB CDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Caccavo Jr F, Frolund B, Van Ommen Kloeke F and Nielsen PH**, « Deflocculation of activated sludge by the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* BrY », *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1996, 1487-1490.

**Callow M**, « A world-wide survey of slime formation on antifouling paints, Algal biofouling, studies environmental science », *Elsevier*, 1986, 1-20.

**Ceri H, Olson ME and Turner RJ**, « Needed, new paradigms in antibiotic development », *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 11, 2010, 1233-1237.

**Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T and Ghannoum MA**, « Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance », *Journal of Bacteriology* 183, 2001, 5385-4394.

**Characklis WG**, « Biofilms and microbial fouling », *Wiley*, 1990, 523-584.

**Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczer I, Bassler BL and Hughson FM**, « Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron », *Nature* 415, 2002, 545-549.

**Chicurel M**, « Bacterial biofilms and infections. Slimebusters », *Nature* 408, 2000, 284-286.

**Chiu J, Zhang R, Wang H, Thiyagarajan V and Qian P**, « Nutrient effects on intertidal community: from bacteria to invertebrates », *Marine Ecology Progress Series* 358, 2008, 41-50.

**Cho KW, Lee HS, Rho JR, Kim TS, Mo SJ and Shin J**, « New lactone-containing metabolites from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces* », *Journal of Natural Products* 64, 2001, 664-667.

**Clark BR, Engene N, Teasdale ME, Rowley DC, Matainaho T, Valeriote FA and Gerwick WH**, « Natural products chemistry and taxonomy of the marine *Cyanobacterium blennothrix cantharidosmum* », *Journal of Natural Products* 71, 2008, 1530-1537.

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

**Coester SE and Cloete TE**, « Biofouling and biocorrosion in industrial water systems ». *Critical Reviews in Microbiology* 31, 2005, 213-232.

**Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GC and Parsek MR**, « The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa* », *PLoS Pathogens* 7, 2011, e1001264.

**Compère C**, « Biofilms en milieu marin », *Techniques Sciences Méthodes* 11, 1999, 48-54.

**Conrad A, Suutari MK, Keinänen MM, Cadoret A, Faure P, Mansuy-Huault L and Block JC**, « Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs », *Lipids* 38, 2003, 1093-1105.

**Consalvey M, Jesus B, Perkins RG, Brotas V, Underwood GJ and Paterson DM**, « Monitoring migration and measuring biomass in benthic biofilms: the effects of dark/far-red adaptation and vertical migration on fluorescence measurements », *Photosynthesis Research* 81, 2004, 91-101.

**Cook PLM, Veuger B, Böer S and Middelburg JJ**, « Effect of nutrient availability on carbon and nitrogen incorporation and flows through benthic algae and bacteria in near-shore sandy sediment », *Aquatic Microbial Ecology* 49, 2007, 165-180.

**Costerton JW, Geesey GG and Cheng KJ**, « How bacteria stick », *Scientific American* 238, 1978, 86-95.

**Costerton JW, Lewandowski Z, Debeer D, Caldwell D, Korber D and James G**, « Biofilms, the customized microniche », *Journal of Bacteriology* 176, 1994, 2137-2142.

**Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR and Lappin-Scott HM**, « Microbial biofilms », *Annual Review of Microbiology* 49, 1995, 711-745.

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

**Croft MT, Lawrence AD, Raux-Deery E, Warren MJ and Smith AG**, « Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria », *Nature* 438, 2005, 90-93.

## ABC**D**EFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Dahms HU, Dobretsov S and Qian PY**, « The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan *Bugula neritina* », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 313, 2004, 191-209.

**Dang H and Lovell CR**, « Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16s rRNA genes », *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2000, 467-475.

**Dang H, Chen R, Wang L, Shao S, Dai L, Ye Y, Guo L, Huang G, Klotz MG**, « Molecular characterization of putative biocorroding microbiota with a novel niche detection of Epsilon- and Zetaproteobacteria in Pacific Ocean coastal seawaters », *Environmental Microbiology* 13, 2011, 3059-3074.

**Davey ME and O'toole GA**, « Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics », *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 64, 2000, 847-867.



**Davey ME, Caiazza NC and O'Toole GA**, « Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 », *Journal of Bacteriology* 185, 2003, 1027-1036.

**de Brouwer JFC, Wolfstein K, Ruddy GK, Jones TER and Stal LJ**, « Biogenic stabilization of intertidal sediments: the importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms », *Microbial Ecology* 49, 2005, 501-512.

**de Bruijn I, de Kock MJD, Yang M, de Waard P, van Beek TA and Raaijmakers JM**, « Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species », *Molecular Microbiology* 63, 2007, 417-428.

**de Jonge VN and Colijn F**, « Dynamics of microphytobenthos biomass in the Ems estuary measured as chlorophyll-a and carbon », *Marine Ecology Progress Series*, 1994, 79-95.

**de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L and Hancock RE**, « Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies », *Current Opinion in Microbiology* 16, 2013, 580-589.

**Decho AW**, « Microbial biofilms in intertidal systems: an overview », *Continental Shelf Research* 20, 2000, 1257-1273.

**Derenbach JB and Pesando D**, « Investigations into a small fraction of volatile hydrocarbons. III. Two diatom cultures produce ectocarpene, a pheromone of brown algae », *Marine Chemistry* 19, 1986, 337-341.

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

**Devi P, Wahidullah S, Rodrigues C and Souza LD**, « The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: A source of antimicrobial compounds », *Marine Drugs* 8, 2010, 1203-1212.

- Dheilly A, Soutera E, Klein GL, Bazire A, Compere C, Haras D and Dufour A**, « Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6 », *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2010, 3452-3461.
- Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Cámara M, Williams P and Winzer K**, « The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* », *Environmental Microbiology* 8, 2006, 1095-1104.
- Dobretsov S and Qian PY**, « The role of epibiotic bacteria from the surface of the soft coral *Dendronephthya* sp. in the inhibition of larval settlement », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 299, 2004, 35-50.
- Dobretsov S, Dahms HU and Qian PY**, « Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites », *Biofouling* 22, 2006, 43-54.
- Dobretsov S, Dahms HU, Yili H, Wahl M and Qian PY**, « The effect of quorum-sensing blockers on the formation of marine microbial communities and larval attachment », *FEMS Microbiology Ecology* 60, 2007, 177-188.
- Dobretsov S, Teplitski M and Paul V**, « Mini-Review: Quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling », *Biofouling* 25, 2009, 413-427.
- Domozych DS, Kort S, Benton S and Yu T**, « The extracellular polymeric substance of the green alga *Penium margaritaceum* and its role in biofilm formation », *Biofilms* 2, 2005, 129-144.
- Dong YH, Xu JL, Li XZ and Zhang LH**, « AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora* », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 3526-3531.
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF and Zhang LH**, « quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an n-acyl homoserine lactonase », *Nature* 411, 2001, 813-817.
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL and Zhang LH**, « Identification of quorum-quenching n-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species », *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2002, 1754-1759.

**Dong YH and Zhang LH**, « Quorum sensing and quorum-quenching enzymes », *Journal of Microbiology* 43, 2005, 101-109.

**Dong YH, Wang LH and Zhang LH**, « Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications », *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science* 362, 2007, 1201-1211.

**Donlan RM**, « Biofilms: microbial life on surfaces », *Emerging Infectious Diseases* 8, 2002, 881-890.

**Donlan RM and Costerton JW**, « Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms », *Clinical Microbiology Reviews* 15, 2002, 167-193.

**Douillet P**, « Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae », *Marine Ecology Progress Series* 98, 1993, 123-134.

**Duongruitai N, Warren AD and Tuovinen OH**, « Microbial populations identified by fluorescence *in situ* hybridization in a constructed wetland treating acid coal mine drainage », *Journal of environmental quality* 35(2006), 1329-1337.

## ABCDEF GHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Egan S, James S, Holmstrøm C and Kjelleberg S**, « Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* », *FEMS Microbiology Ecology* 35, 2001, 67-73.

**Egan S, James S and Kjelleberg S**, « Identification and characterization of a putative transcriptional regulator controlling the expression of fouling inhibitors in *Pseudoalteromonas tunicata* », *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2002, 372-378.

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Falciatore A and Bowler C**, « Revealing the molecular secrets of marine diatoms », *Annual Review of Plant Biology* 53, 2002, 109-130.

**Fenical W**, « Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource », *Chemical Reviews* 93, 1993, 1673-1683.

**Flemming HC and Wingender J**, « The biofilm matrix », *Nature Reviews. Microbiology* 8, 2010, 623-633.

**Frølund B, Palmgren R, Keiding K and Nielsen PH**, « Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin », *Water Research* 30, 1996, 1749-1758.

**Fuqua C, Parsek MR and Greenberg EP**, « Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing », *Annual Review of Genetics* 35, 2001, 439-468.

**Furusawa G, Yoshikawa T, Yasuda A and Sakata T**, « Algicidal activity and gliding motility of *Saprospira* Sp. SS98-5 », *Canadian Journal of Microbiology* 49, 2003, 92-100.

## ABCDEF **G**HIJKLMN OPQRSTUVWXYZ

**Gauthier MJ**, « *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium », *Canadian Journal of Microbiology* 26, 1976, 459-466.

**Gauthier MJ and Flatau GN**, « Antibacterial activity of marine violet-pigmented *Alteromonas* with special reference to the production of brominated compounds », *Canadian Journal of Microbiology* 22, 1976, 1612-1619.

**Gauthier MJ and Breittmayer VA**, « A new antibiotic-producing bacterium from seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov. », *International journal of systematic bacteriology* 29, 1979, 366-372.

**Gauthier Y and Isoard P**, « L'adhésion des bactéries sur les surfaces. Industries alimentaires et agricoles. 106, 1989, 31-33.

**Ghigo JM**, « Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development », *Nature* 412, 2001, 442-445.

**Gibbons RJ and Houte JV**, « Bacterial adherence in oral microbial ecology », *Annual Review of Microbiology* 29, 1975, 19-44.

**Goto N, Mitamura O and Terai H** « Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257, 2001, 73-86.

**Götz F**, « *Staphylococcus* and biofilms », *Molecular Microbiology* 43, 2002, 1367-1378.

**Grobe S, Wingender J and Trüper HG**, « Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems », *The Journal of Applied Bacteriology* 79, 1995, 94-102.

**Grossart HP, Kiørboe T, Tang K and Ploug H**, « Bacterial colonization of particles: growth and interactions », *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2003, 3500-3509.

**Guerrini F, Mazzotti A, Boni L and Pistocchi R**, « Bacterial-algal interactions in polysaccharide production », *Aquatic Microbial Ecology* 15, 1998, 247-253.

## ABCDEFGHIJKLMN**H**OPQRSTUVWXYZ

**Haglund AL, Tornblom E, Bostrom B and Tranvik L**, « Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm », *Microbial Ecology* 43, 2002, 232-241.

**Hagstrom JA, Granéli E, Maneiro I, Barreiro A, Petermann A and Svensen C**, « Release and degradation of amnesic shellfish poison from decaying *Pseudo-nitzschia multiseriis* in presence of bacteria and organic matter », *Harmful Algae* 6, 2007, 175-188.

**Haines KC and Guillard RRL**, « Growth of vitamin B<sub>12</sub>-requiring marine diatoms in mixed laboratory cultures with vitamin B<sub>12</sub>-producing marine bacteria<sub>12</sub> », *Journal of Phycology* 10, 1974, 245-252.

**Hall-Stoodley L and Stoodley P**, « Evolving concepts in biofilm infections », *Cellular Microbiology* 11, 2009, 1034-43.

**Hall-Stoodley L, Costerton JW and Stoodley P**, « Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases », *Nature Reviews. Microbiology* 2, 2004, 95-108.

**Hammer BK and Bassler BL**, « Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* », *Molecular Microbiology* 50, 2003, 101-104.

**Hampson DR, Huang XP, Wells JW, Walter JA and Wright JL**, « Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain », *European Journal of Pharmacology* 218, 1992,1-8.

**Haras D**, « Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention », *Matériaux & Techniques* 93, 2005, 27-41.

**Harder T, Lam C and Qian PY**, « Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by marine biofilms: an investigation of monospecific diatom films as settlement cues », *Marine Ecology Progress Series* 229, 2002, 105-112.

**Harder T, Dobretsov S and Qian PY**, « Waterborne polar macromolecules act as algal antifoulants in the seaweed *Ulva reticulata* », *Marine Ecology Progress Serie* 274, 2004, 133-141.

**Haubois AG, Sylvestre F, Guarini JM, Richard P and Blanchard GF**, « Spatio-temporal structure of the epipellic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France, Estuarine », *Coastal and Shelf Science* 64, 2005, 385-394.

**Hayashida-Soiza G, Uchida A, Mori N, Kuwahara Y and Ishida Y**, « Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain », *Journal of Applied Microbiology* 105, 2008, 1672-1677.

**Haynes K, Hofmann TA, Smith CJ, Ball AS, Underwood GJ and Osborn AM**, « Diatom-derived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments », *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2007, 6112-6124.

**Henke JM and Bassler BL**, « Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* », *Journal of Bacteriology* 186, , 2004, 3794-3805.

**Henrici AT**, « Studies of freshwater bacteria. A direct microscopic technique », *Journal of Bacteriology* 25, 1933, 277-287.

**Héral M, Bacher C, Deslous-Paoli JM**, « La capacité biotique des bassins ostréicoles ». *L'homme et les ressources halieutiques* (Ifremer), 1989, 225-259.

**Holden MT, Ram Chhabra S, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D, Rice S, Givskov M, Salmond GP, Stewart GS, Bycroft BW, Kjelleberg S and Williams P**, « Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria », *Molecular Microbiology* 33, 1999, 1254-1266.

**Holmström C, James S, Egan S and Kjelleberg S**, « Inhibition of common fouling organisms by marine bacterial isolates with special reference to the role of pigmented bacteria », *Biofouling* 10, 1996, 251-59.

**Holmström C, Kjelleberg S**, « Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce active extracellular agents », *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 1999, 285-293.

**Holmström C, Egan S, Franks A, McCloy S, Kjelleberg S**, « Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species ». *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 2002, 47-58.

**Hombeck M and Boland W**, « Biosynthesis of the algal pheromone fucoserratene by the freshwater diatom *Asterionella formosa* (Bacillariophyceae) », *Tetrahedron* 54, 1998, 11033-11042.

**Hotta K, Okami Y and Umezawa H**, « Studies on new aminoglycoside antibiotics, istamycins, from an actinomycete isolated from a marine environment. II. Possible involvement of plasmid in istamycin production », *The Journal of Antibiotics* 33, 1980, 1510-1514.

**Houry A, Gohar M, Deschamps J, Tischenko E, Aymerich S, Gruss A and Briandet R**, « Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 2012, 13088-13093.

**Huang S and Hadfield MG**, « Composition and density of bacterial biofilms determine larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans* », *Marine Ecology Progress Series* 260, 2003, 161-172.

**Huang YL, Dobretsov S, Ki JS, Yang LH and Qian PY**, « Presence of acyl-homoserine lactone in subtidal biofilm and the implication in larval behavioral response in the polychaete *Hydroides elegans* », *Microbial Ecology* 54, 2007, 384-392.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Izano IA, Amarante MA, Kher WB and Kaplan JB**, « Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms », *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2008, 470-476.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**James SG, Holmström, and Kjelleberg S**, « Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2 », *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1996, 2783-2788.

**Jefferson KK**, « Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends », *Ullrich*, 2009, 175-186.

**Jeyasekaran G, Karunasagar I and Karunasagar I**, « Effects of sanitizers on *Listeria* biofilm on contact surface », *Asian Fisheries Science* 13, 2000, 209-213.

**Jiang P, Li J, Han F, Duan G, Lu X, Gu Y and Yu W**, « Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* Sp. QY101 », *PloS One* 6, 2011, e18514.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Kalpna BJ, Aarthy S and Pandian SK**, « Antibiofilm activity of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens », *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167, 2012, 1778-1794.



**Kang YH, Kim JD, Kim BH, Kong DS and Han MS**, « Isolation and characterization of a bio-agent antagonistic to diatom, *Stephanodiscus hantzschii* », *Journal of Applied Microbiology* 98, 2005, 1030-1038.

**Kaplan JB, Ragunath C, Vellyagounder K, Fine DH and Ramasubbu N**, « Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2004, 2633-2636.

**Kaplan JB**, « Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes », *The International Journal of Artificial Organs* 32, 2009, 545-554.

**Kaplan JB, Ragunath C, Ramasubbu N and Fine DH**, « Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity », *Journal of Bacteriology* 185, 2003, 4693-4698.

**Karatan E and Watnick P**, « Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms », *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73, 2009, 310-347.

**Karlson P and Luscher M**, « Pheromones': A New Term for a Class of Biologically Active Substances », *Nature* 183, 1959, 55-56.

**Kim BS, Lee JY, Hwang BK**, « *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* », *Pest Management Science* 56, 2000, 1029-1035.

**Kim Y, Oh S and Kim SH**, « Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 », *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, 2009, 324-329.

**Kuchma SL, Connolly JP and O'Toole GA**, « A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type iii secretion in *Pseudomonas aeruginosa* », *Journal of Bacteriology* 187, 2005, 1441-1454.

**Kuwae T, Beninger PG, Decottignies P, Mathot KJ, Lund DR and Elnor RW**, « Biofilm grazing in a higher vertebrate: the western sandpiper, *calidris mauri* », *Ecology* 89, 2008, 599-606.

# ABCDEFGHIJKL MNOPQRSTUVWXYZ

**La Barre S and Haras D**, « Encounters with marine bacteria », *Journal de la Société de Biologie* 201, 2007, 281-289.

**Lam C, Harder T and Qian PY**, « Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by surface-associated settlement cues of marine benthic diatoms », *Marine Ecology Progress Series* 263, 2003, 83-92.

**Langille S, Geesey G and Weiner R**, « Polysaccharide-specific probes inhibit adhesion of *Hyphomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces ». *Biotechnology Journal of Industrial Microbiology* 25, 2000, 81-85.

**Langumier M, Sabot R, Obame-Ndong R, Jeannin M, Sablé S and Refait PH**, « Formation of Fe(III)-containing mackinawite from hydroxysulphate green rust by sulphate reducing bacteria », *Corrosion Science* 51, 2009, 2694-2702.

**Langumier M, Lanneluc I, Sabot R, Jeannin M, Refait Ph and Sablé S**, « Quelles sont les bactéries présentes dans les biofilms formés sur acier en milieu marin ? », *Matériaux & Techniques* 99, 2011, 591-603.

**Pierre G**, « Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion », Thèse l'université de La Rochelle, 2010.

**Lanneluc I, Langumier M, Sabot R, Jeannin M, Refait Ph and Sablé S**, « On the bacterial communities associated with the corrosion product layer during the early stages of marine corrosion of carbon steel », *International Biodeterioration & Biodegradation* 99, 2015, 55-65.

Lasa I and Penadés JR, « Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation », *Research in Microbiology* 157, 2006, 99-107.

**Lau SCK, Thiyagarajan V and Qian PY**, « The bioactivity of bacterial isolates in Hong Kong waters for the inhibition of barnacle (*Balanus amphitrite* Darwin) settlement », *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 282, 2003, 43-60.

**Lau SCK, Thiagarajan V, Cheung S and Qian P**, « Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates », *Aquatic Microbial Ecology* 38, 2005, 41-51.

**Lavergne C.** Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais : Influence des facteurs biotiques et abiotiques par une approche multi-échelle, Thèse l'université de La Rochelle, 2014.

**Le Tourneux F and Bourget E**, « Importance of physical and biological settlement cues used at different scales by the larvae of *Semibalanus balanoides* », *Marine Biology* 97, 1988, 57-66.

**Lebeau T and Robert JM**, « Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products », *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 2003, 624-632.

**Leck C and Bigg EK**, « Biogenic particles in the surface microlayer and overlaying atmosphere in the central arctic ocean during summer », *Tellus B* 57, 2005, 305-316.

**Lee JW, Nam JH, Kim YH, Lee KH and Lee DH**, « Bacterial Communities in the Initial Stage of Marine Biofilm Formation on Artificial Surfaces », *Journal of Microbiology* 46, 2008, 174-82.

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

**Lewis K**, « Multidrug tolerance of biofilms and persister cells », *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322, 2008, 107-131.

**Loesche WJ**, « Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay », *Microbiological Reviews* 50, 1986, 353-380.

**Logan BE and Regan JM**, « Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells », *Trends in Microbiology* 14, 2006, 512-518.

**Long RA, Qureshi A, Faulkner DJ and Azam F**, « 2-n-pentyl-4-quinolinol produced by a marine *Alteromonas* sp. and its potential ecological and biogeochemical roles », *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2003, 568-576.

**Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz JE and Banas JA**, « Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture », *FEMS Microbiology Letters* 268, 2007, 158-165.

## ABCDEFGHIJKLMN OPQRSTUVWXYZ

**Magot M, Ravot G, Campagnolle X, Ollivier B, Patel PKC, Fardeau ML, Thomas P, Crolet JL and Garcia JL**, « *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. Nov., SP. Nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells International », *Journal of systematic bacteriology* 47, 1997, 818-824.

**Mah TF and O'Toole GA**, « Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents », *Trends in Microbiology* 9, 2001, 34-39.

**Mai-Prochnow A, Evans F, Dalisay-Saludes D, Stelzer S, Egan S, James S, Webb JS, Kjelleberg S**, « Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate* » *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2004, 3232-3238.

**Maki JS, Rittschof D, Costlow JD and Mitchell R**, « Inhibition of attachment of larval barnacles, *Balanus amphitrite*, by bacterial surface films », *Marine Biology* 97, 1988, 199-206.

**Maki JS, Ding L, Stokes J, Kavouras JH and Rittschof D**, « Substratum/bacterial interactions and larval attachment: films and exopolysaccharides of *Halomonas marina* (ATCC 25374) and their effect on barnacle cyprid larvae, *Balanus amphitrite* Darwin », *Biofouling* 16, 2000, 159-70.

**Maldonado MT, Hughes MP, Rue EL and Wells ML**, « The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudonitzschia multiseries* and *Pseudonitzschia australis* », *Limnology and Oceanography* 47, 2002, 515-526.

**Mann EE, Rice KC, Boles BR, Endres JL, Ranjit D, Chandramohan L, Tsang LH, Smeltzer MS, Horswill AR and Bayles KW**, « Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation », *PloS One* 4, 2009, e5822.

**Manuel SGA, Ragunath C, Sait HB, Izano EA, Kaplan JB and Ramasubbu N**, « Role of active-site residues of Dispersin B, a biofilm-releasing beta-hexosaminidase from a periodontal pathogen, in substrate hydrolysis », *The FEBS Journal* 274, 2007, 5987-5999.

**Matsuyama T and Nakagawa Y**, « Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions », *Journal of Microbiological Methods* 25, 1996, 165-175.

**McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD and Kjelleberg S**, « should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal », *Nature Reviews. Microbiology* 10, 2012, 39-50.

**McLean RJC, Whiteley M, Stickler DJ and Fuqua WC**, « Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones », *Microbiology* 143, 1997, 3703-3711.

**Méléder V, Barillé L, Rincé, Y, Morançais M, Rosa P and Gaudin P**, « Spatio-temporal changes in microphytobenthos structure analysed by pigment composition in a macrotidal flat (Bourgneuf Bay, France) », *Marine Ecology Progress Series* 297, 2005, 83-99.

**Middelburg JJ, Barranguet C, Boschker HTS, Herman PMJ, Moens T and Heip CHR** « The fate of intertidal microphytobenthos carbon: an in situ <sup>13</sup>C-labeling study », *Limnology Oceanography* 45, 2000, 1224-1234.

**Mignot T, Shaevitz JW, Hartzell PL and Zusman DR**, « Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility ». *Science*, 315, 2007, 853-856.

**Miller MB and Bassler BL**, « Quorum sensing in bacteria », *Annual Review of Microbiology* 55, 2001, 165-199.

**Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK and Bassler BL**, « Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae* », *Cell* 110, 2002, 303-314.

**Mitchell R and Maki JS**, « Microbial surface films and their influence on larval settlement and metamorphosis in the marine environment », *Marine biodeterioration: advanced techniques applicable to the Indian Ocean*, 1988, 489-497.

**Mollica A**, « Biofilm and corrosion on active-passive alloys in seawater ». *International Biodeterioration & Biodegradation* 29, 1992, 213-229.

**Molin S and Tolker-Nielsen T**, « Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure », *Current Opinion in Biotechnology* 14, 2003, 255-261.

**Mora P, Rosconi F, Franco Fraguas L, and Castro- Sowinski S**, « *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium », *Archives of Microbiology* 189, 2008, 519-524.

ABCDEFGHIJKLM**N**OPQRSTUVWXYZ

**Nagar V, Sinha V and Bandekar JR**, « Diverse profiles of N-Acyl Homoserine L-Lactones, biofilm, virulence genes and integrons in food-borne *Aeromonas* isolates », *Journal of Food Science*, 2015.

**Nayar S, Goh B and Chou L**, « Settlement of marine periphytic algae in a tropical estuary », *Estuarine Coastal and Shelf Science* 64, 2005, 241-248.

ABCDEFGHIJKLM**O**PQRSTUVWXYZ

**Oh HS, Yeon KM, Yang CS, Kim SR, Lee CH, Park SY, Han JY and Lee JK**, « Control of membrane biofouling in MBR for wastewater treatment by quorum

quenching bacteria encapsulated in microporous membrane ». *Environmental Science & Technology* 46, 2012, 4877-4884.

**Ohwada K and Taga N**, « Distribution and seasonal variation of vitamin B12, thiamine and biotin in the sea », *Marine Chemistry* 1, 1972, 61-73.

**Ohwada K**, « Seasonal cycles of vitamin B12, thiamine and biotin in Lake Sagami. Patterns of their distribution and ecological significance », *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 58, 1973, 851-871.

**Olguin-Uribe G, Abou-Mansour E, Boulander A, Debard H, Francisco C and Combaut G**, « 6-Bromoindole-3-carbaldehyde, from an *Acinetobacter* sp. bacterium associated with the ascidian *Stomoza murrayi* », *Journal of Chemical Ecology* 23, 1997, 2507-2521.

**Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG and Read RR**, « Biofilm Bacteria: Formation and Comparative Susceptibility to Antibiotics », *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Vétérinaire* 66, 2002, 86-92.

**Or D, Phutane S and Dechesne A**, « Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils », *Vadose zone journal* 6, 2007, 298-305.

**Ortega-Morales BO, Chan-Bacab MJ, Mirnada-Tello E, Fardeau ML, Carrero JC and Stein T**, « Antifouling activity of sessile bacilli derived from marine surfaces », *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35, 2008, 9-15.

## ABCDEFGHIJKLMNO**P**QRSTUVWXYZ

**Pamp SJ, Gjermansen M and Tolker-Nielsen T**, « The Biofilm Mode of Life. Mechanisms and Adaptations », *Horizon Bioscience*, 2007, 37-69.

**Pascal PY, Dupuy C, Richard P, Mallet C, Armynot du Châtelet E and Niquil N**, « Seasonal variation in consumption of benthic bacteria by meio- and macrofauna in an intertidal mudflat », *Limnology and Oceanography* 54, 2009, 1048-1059.

**Papa R, Parrilli E, Sannino F, Barbato G, Tutino ML, Artini M, Selan L,** « Antibiofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 », *Research in Microbiology* 164, 2013, 450-456.

**Pasmore M and Costerton JW,** « Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology », *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30, 2003, 407-413.

**Patil JS and Anil AC,** « Biofilm Diatom Community Structure: Influence of temporal and substratum variability », *Biofouling* 21, 2005, 189-206.

**Paul C and Pohnert G,** « Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis », *PloS One* 6, 2011, e21032.

**Petry S, Furlan S, Crepeau MJ, Cerning J, Desmazeaud M,** « Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium », *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2000, 3427-3431.

**Pierre G, Zhao JM and Orvain F,** « Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes-Oléron, France) », *Journal of Sea Research* 92, 2014, 26-35.

**Pineau S,** « Interactions entre les communautés bactériennes et les processus de corrosion accélérée des structures métalliques en environnement marin », Thèse l'université de Technologie de Compiègne, 2006.

**Pineau S, Sabot R, Quillet L, Jeannin M, Caplat Ch, Dupont-Morrall I and Refait PH,** « Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase », *Corrosion Science* 50, 2008, 1099-1111.

**Pohnert G and Boland W,** « Biosynthesis of the algal pheromone hormosirene by the freshwater diatom *Gomphonema parvulum* (Bacillariophyceae) », *Tetrahedron* 52, 1996, 10073-10082.

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



## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Qian PY and Dobretsov SV**, « Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro and macrofouling », *Biofouling* 18, 2002, 217-228.

**Qin Z, Yang L, Qu D, Molin S and Tolker-Nielsen T**, « *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis* », *Microbiology* 155, 2009, 2148-2156.

**Qian PY, Xu Y, and Fusetani N**, « Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives », *Biofouling* 26, 2010, 223-234.

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

**Rajamani S, Teplitski M, Kumar A, Krediet CJ, Sayre RT and Bauer WD**, « N-acyl homoserine lactone lactonase, AiiA, inactivation of quorum-sensing agonists produced by *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) and characterization of aiiA-transgenic algae », *Journal of Phycology* 47, 2011, 1219-1227.

**Rajamani S, Bauer WD, Robinson JB, Farrow Iii JM, Pesci EC, Teplitski M, Gao M, Sayre RT and Phillips DA**, « The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial quorum-sensing receptor », *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 21, 2008, 1184-1192.

**Ramsey DM and Wozniak DJ**, « Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis », *Molecular Microbiology* 56, 2005, 309-322.

**Rasmussen TB and Givskov M**, « Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects », *Microbiology* 152, 2006, 895-904.

**Rao D, Webb JS, and Kjelleberg S**, « Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata* », *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2005, 1729-36.

**Ravenschlag K, Sahn K and Amann R**, « Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard) », *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2001, 387-395.

**Ravot G, Ollivier B, Magot M, Patel BKC, Crolet JL, Fardeau ML and Garcia JL**, « Thiosulfate reduction : an important physiological feature shared by members of thermotogales », *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1995, 2053-2055.

**Roberson EB and Firestone MK**, « Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. », *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1992, 1284-1291.

**Rendueles O, Travier L, Latour-Lambert P, Fontaine T, Magnus J, Denamur E and Ghigo JM**, « Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides », *mBio* 2, 2011, e00043-00011.

**Rendueles O, Kaplan JB and Ghigo JM**, « Antibiofilm polysaccharides », *Environmental Microbiology* 15, 2013, 334-346.

**Ribalet F, Intertaglia L, Lebaron P and Casotti R**, « Differential effect of three polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates », *Aquatic Toxicology* 86, 2008, 249-255.

**Richards JJ and Melander C**, « Controlling Bacterial Biofilms », *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 10, 2009, 2287-2294.

**Rochex A, Godon J, Bernet N and Escudié R**, « Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities », *Water Research* 42, 2008, 4915-4922.

**Romano G, Russo GL, Buttino I, Ianora A and Miralto A**, « a marine diatom-derived aldehyde induces apoptosis in copepod and sea urchin embryos », *The Journal of Experimental Biology* 206, 2003, 3487-3494.

**Romero M, Diggle SP, Heeb S, Camara M and Otero A**, « Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: identification of AiiC, a novel AHL-acylase », *FEMS Microbiology Letters* 280, 2008, 73-80.

**Ron EZ and Rosenberg E**, « Natural roles of biosurfactants », *Environmental Microbiology* 3, 2001, 229-236.

**Roux A and Ghigo JM**, « Les biofilms bactériens », *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* 159, 2006, 261-268.

**Ryder C, Byrd M, and Wozniak DJ**, « Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development », *Current Opinion in Microbiology* 10, 2007, 644-648.

## ABCDEFGHIJKLMN**OPQR**STUVWXYZ

**Sabag-Daigle A, Soares JA, Smith JN, Elmasry ME and Ahmer BMM**, « The acyl homoserine lactone receptor, SdiA, of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium does not respond to indole », *Applied and Environmental Microbiology* 78, 2012, 5424-5431.

**Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR and Briand JF** « Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics », *Environmental Microbiology* 15, 2013, 2879-2893.

**Sand W and Gehrke T**, « Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (iii) ions and acidophilic bacteria », *Research in Microbiology* 157, 2006, 49-56.

**Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW and Davies DG**, « *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm », *Journal of Bacteriology* 184, 2002, 1140-1154.

**Sayem SMA, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A and Zanfardino A**, « Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis* », *Microbial Cell Factories* 10, 2011, 74.

**Schmidt JL, Deming JW, Jumars PA and Keil RG**, « Constancy of bacterial abundance in surficial marine sediments », *Limnology and Oceanography* 43, 1998, 976-982.

**Schultz MP, Bendick JA, Holm ER and Hertel WM**, « Economic impact of biofouling on a naval surface ship », *Biofouling* 27, 2011, 87-98.

**Schumacher RW, Talmage SC, Miller SA, Sarris KE, Davidson BS and Goldberg A**, « Isolation and structure determination of an antimicrobial ester from a marine sediment-derived bacterium », *Journal of Natural Products* 66, 2003, 1291-1293.

**Serôdio J, Vieira S and Barroso F**, « Relationship of variable chlorophyll fluorescence indices to photosynthetic rates in microphytobenthos », *Aquatic Microbial Ecology* 49, 2007, 71-85.

**Serôdio J, Vieira S and Cruz S**, « Photosynthetic activity, photoprotection and photoinhibition in intertidal microphytobenthos as studied *in situ* using variable chlorophyll fluorescence », *Continental Shelf Research* 28, 2008, 1363-1375.

**Sigee D**, « Microbial diversity and freshwater ecosystems. Freshwater Microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment », *Wiley*, 2005, 1-43.

**Stewart PS and Costerton JW**, « Antibiotic Resistance of Bacteria in Biofilms », *Lancet* 358, 2001, 135-138.

**Stoodley P, Sauer K, Davies DG and Costerton JW**, « Biofilms as complex differentiated communities », *Annual Review of Microbiology* 56, 2002, 187-209.

**Stumm W and Morgan JJ**, « Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters, 3<sup>rd</sup> ed », *Wiley Interscience*, 1996.

**Sutherland IW**, « The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment », *Trends in Microbiology* 9, 2001, 222-227.

Sutherland IW, « Comprehensive Glycoscience. Analysis of glycans; Polysaccharide functional properties », *Elsevier* 2, 2007, 521-558.

**Swift S, Lynch MJ, Fish L, Kirke DF, Tomas JM, Stewart GSAB and Williams P**, « Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila* », *Infection and Immunity* 67, 1999, 5192-5199.

## ABCDEFGHIJKLMNOPS**T**UVWXYZ

**Tang YZ, Koch F and Gobler CJ**, « Most harmful algal bloom species are vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>12</sub> auxotrophs », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2010, 20756-20761.

**Taylor ES and Lower SK**, « Thickness and surface density of extracellular polymers on *Acidithiobacillus ferrooxidans* », *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2008, 309-311.

**Thomas WE, Trintchina E, Forero M, Vogel V and Sokurenko EV**, « Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force ». *Cell* 109, 2002, 913-923.

**Tielen P, Strathmann M, Jaeger KE, Flemming HC and Wingender J**, « Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* », *Microbiological Research* 160, 2005, 165-176.

**Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F and Jaeger KE**, « *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation », *Microbiology* 151, 2005, 1313-1323.

**Tremblay YDN, Hathroubi S and Jacques M**, « Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health », *Canadian Journal of Veterinary Research* 78, 2014, 110-116.

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRST**U**VWXYZ

**Underwood G and Kronkamp R**, « Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries », *Advances in Ecological Research* 29, 1999, 93-153.

**Urakawa H, Yoshida T, Nishimura M and Ohwada K**, « Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling », *Environmental Microbiology* 2, 2000, 542-554.

**Underwood G and Paterson D**, « The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms », *Advances in Botanical Research* 40, 2003, 183-240.

**Uroz S, D'Angelo-Picard C, Carlier A, Elasri M, Sicot C, Petit A, Oger P, Faure D and Dessaux Y**, « Novel bacteria degrading n-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plant-pathogenic bacteria », *Microbiology* 149, 2003, 1981-1989.

**Uroz S, Chhabra SR, Camara M, Williams P, Oger P and Dessaux Y**, « N-acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities », *Microbiology* 151, 2005, 3313-3322.

**Uroz S, Oger PM, Chapelle E, Adeline MT, Faure D and Dessaux Y**, « A *Rhodococcus* qsdA-encoded enzyme defines a novel class of large-spectrum quorum-quenching lactonases », *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2008, 1357-1366.

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ **V**WXYZ

**Vallet L, Olson JW, Lory S, Lazdunski A and Filloux A**, « the chaperone/usher pathways of *pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, n° 12, 2001, 6911-9616.

**Valle J, Da Re S, Henry N, Fontaine T, Balestrino D, Latour-Lambert P and Ghigo JM**, « Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2006, 12558-12563.

**Valt A**, « Etude de deux procédés de polymérisation d'un précurseur gazeux dans un plasma radiofréquence basse pression et liquide déposé sur un substrat activé par décharge à barrière diélectrique à pression atmosphérique : application aux propriétés antifouling », Thèse en génie des procédés et technologies avancées, 2008.

**van Duyl FC, Winder BD, Kop AJ and Wollenzien U**, « Consequences of diatom mat erosion for carbohydrate concentrations and heterotrophic bacterial activities in intertidal sediments of the Ems-Dollard estuary », *Continental Shelf Research* 20, 2000, 1335-1349.

**van Houdt R and Michiels CW**, « biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface », *Journal of Applied Microbiology* 109, 2010, 1117-1131.

**van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W and Zehnder AJ**, « Influence of interfaces on microbial activity », *Microbiological Reviews* 54, 1990, 75-87.

**van Oss CJ**, « The Predominant Electron-Donicity of Polar Solid Surfaces », *The Journal of adhesion* 63, 1997, 1-3.

**van Schaik EJ, Giltner CL, Audette GF, Keizer DW, Bautista DL, Slupsky CM, Sykes BD and Irvin RT**, « DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili », *Journal of bacteriology* 187, 2005, 1455-1464.

**Vaningelgem F, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Vancanneyt M, Swings J and De Vuyst L**, « Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics », *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2004, 900-912.

**Vardi A, Formiggini F, Casotti R, De Martino A, Ribalet F, Miralto A and Bowler C**, « A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms », *PLoS Biology* 4, 2006, e60.

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

**Vilain S, Pretorius, JM., Theron J and Broezel VS**, « DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular dna to form biofilms », *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2009, 2861-2868.

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ **W**XYZ

**Wahl M**, « Marine epibiosis .I. Fouling and antifouling: some basic aspects », *Marine Ecology Progress Series* 58, 1989, 175-189.

**Wang Y, Dufour YS, Carlson HK, Donohue TJ, Marletta MA and Ruby EG**, « H-NOX-mediated nitric oxide sensing modulates symbiotic colonization by *Vibrio fischeri* », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2010, 8375-8380.

**Wanner O and Bauchrowitz M**, « Les biofilms sont omniprésents », *EAWAG News* 60, 2006, 4-7.

**Watanabe M, Sasaki K, Nakashimada Y, Kakizono T, Noparatnaraporn N and Nishio N**, « Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. », *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 1998, 682-691.

**Waters CM and Bassler BL**, « Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria », *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 2005, 319-346.

**Waters CM and Bassler BL**, « The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers », *Genes & Development* 20, 2006, 2754-2767.

**Weiss Nielsen M, Sternberg C, Molin S, Regenberg B**, « *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells », *Journal of visualized experiments* 47, 2011.

**Wells ML, Trick CG, Cochlan WP, Hughes MP and Trainer VL**, « Domoic acid: the synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms », *Limnology and Oceanography* 50, 2005, 1908-1917.



**Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PS and Mattick JS**, « Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation », *Science* 295, 2002.

**Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpson NJL and Salmond GPC**, « Quorum-sensing in gram-negative bacteria », *FEMS Microbiology Reviews* 25, 2001, 365-404.

**Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S and Greenberg EP**, « Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms », *Nature* 413, 2001, 860-864.

**Wichard T, Gerecht A, Boersma M, Poulet SA, Wiltshire K and Pohnert G**, « Lipid and fatty acid composition of diatoms revisited: rapid wound-activated change of food quality parameters influences herbivorous copepod reproductive success », *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 8, 2007, 1146-1153.

**Wigglesworth-Cooksey B and Cooksey KE**, « Use of fluorophore-conjugated lectins to study cell-cell interactions in model marine biofilms », *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2005, 428-435.

**Windler M, Leinweber K, Bartulos CR**, « Biofilm and capsule formation of the diatom *Achnanthis minutissimum* are affected by a bacterium », *Journal of Phycology* 51, , 2015, 343-355.

**Wingender J, Neu TR and Flemming HC**, « Microbial Extracellular Polymeric Substances », *Springer*, 1999, 1-19.

**Wingender J and Jaeger KE**, « Encyclopedia of environmental microbiology », *Wiley*, 2002, 1207-1223.

**Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, and Flemming HC**, « Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa* », *Methods in Enzymology* 336, 2001, 302-314.

[www.agriculture.gov.au](http://www.agriculture.gov.au)

[www.eco-guard-systems.co.jp](http://www.eco-guard-systems.co.jp)

[www.hydreos.fr](http://www.hydreos.fr)

www.ohdq.com

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ Y Z

**Yallop M, Paterson D and Wellsbury P**, « Interrelationships between rates of microbial production, exopolymer production, microbial biomass, and sediment stability in biofilms of intertidal sediments », *Microbial Ecology* 39, 2000, 116-127.

**Yamamoto S, Okujo N, Yoshida T, Matsuura S and Shinoda S**, « Structure and iron transport activity of vibrioferrin, a new siderophore of *Vibrio parahaemolyticus* », *Journal of Biochemistry* 115, 1994, 868-874.

**Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M and Tolker-Nielsen T**, « Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* », *Microbiology* 153, 2007, 1318-1328.

**Yebra DM, Kiil S and Dam-Johansen K**, « Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings », *Progress in Organic Coatings* 50, 2004, 75-104.

**You J, Xue X, Cao L, Lu X, Wang J, Zhang L and Zhou S**, « Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66 », *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 2007, 1137-1144.

## ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ Z

**Zhang LH and Dong YH**, « Quorum sensing and signal interference: diverse implications », *Molecular Microbiology* 53, 2004, 1563-1571.

**Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DBM, Martiny JBH, Sogin M, Boetius A and Ramette A**, « Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems », *PLoS ONE* 6, 2011, e24570.

**Zobell CE**, « The effect of solid surfaces upon bacterial activity », *Journal of Bacteriology* 46, 1943, 39-56.

**Zogaj X, Nimt M, Rohde M, Bokranz W and Römling U**, « The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix », *Molecular Microbiology* 39, 2001, 1452-1463.

**Zolghadr B, Klingl A, Koerdt A, Driessen AJ, Rachel R and Albers SV**, « Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus* », *Journal of Bacteriology* 192, 2010, 104-110.



# *Annexes*

---

## Annexe 1 : Composition des milieux de culture

<b>Zobell</b>	1L = 4g de pastone, 1g d'extrait de levure Biorad, pH = 7,4
<b>EDMA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1L = 30g sea salts Sigma</li> <li>• 1L = NaCl (23,4g/l) ; KCl (1,5g/l); MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O (1,2g/l); CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O (0,15g/l) ; CaCl<sub>2</sub> (0,15g/l)</li> </ul>
<b>Marine Agar (MA)</b>	1L = 40,2g Marine Broth (poudre – Conda, Promadisa), et 12 g d'Agar (Biokar diagnostics – Agar bactériologique Type E)
<b>Marine Broth (MB)</b>	1L = 40.2 g de Marine Broth (Conda-Promadisa)
<b>Bouillon Cœur Cerveille (BHI)</b>	1L = 37g Bouillon cœur cervelle (Biokar) et 12g/l Agar (Biokar diagnostics – Agar bactériologique Type E)
<b>Milieu Yeast Extract-Tryptone (TY)</b>	1L = 10g de tryptone (Biokar A1401HA), 5g d'extrait de levure, (extrait autolytique de levure –Biokar, A1202HA), si milieu solide on ajoute 15g d'agar (Agar Bactériologique Type E - Biokar, A1012HA)

## ➤ Milieux utilisés pour l'étude de la mobilité

<b>Swimming</b>	0.3% d'Agar soit 0.6g et 8.04g de MB
<b>Twitching</b>	1.5 % d'Agar soit 3g et 8.04g de MB
<b>Swarming</b>	0.53 % d'Agar soit 1.06g et 8.04g de MB

---

**Annexe 2 : Effet du sécrétome de bactéries sur la formation de biofilm et la croissance bactérienne****➤ Préparation des surnageants**

Vu le nombre important de bactéries à tester, nous avons adopté une stratégie expérimentale permettant de diminuer le nombre de tests à réaliser et qui consiste à regrouper les batteries en pools constitués d'une dizaine de souches. Les surnageants des pools, présentant des effets intéressants à étudier, vont être fractionnés et on s'intéressa alors à l'effet du surnageant de chaque bactérie séparément.

Afin de préparer les surnageants de pools bactériens (un pool  $\approx$  10 souches), des précultures de 24h dans du zobell avec une  $DO_{600nm}$  ajustée à 1 sont préparées pour chaque souche constituant le pool. Dans un tube à essai, sont mélangés 1 ml de chaque préculture. Deux erlens contenant 100 ml de Zobell sont inoculés à 5% et sont mis à incuber à 22°C pendant 24 h et 48 h. Les cultures sont ensuite centrifugées à 9000g pendant 20 minutes et les surnageants sont filtrés au moyen de filtres 0,22 $\mu$ m.

**➤ Effet sur la formation de biofilm**

Des précultures, des bactéries sélectionnées, avec une  $DO_{600nm}$  ajustée à 1 sont préparées dans du Zobell. Les cultures sont centrifugées à 9000g puis resuspendues dans de l'EDMA 2X. Dans des microplaques de 96 puits sont répartis 75  $\mu$ l de cette suspension complétée à volume égal par les surnageants des pools à tester (pour un volume final de 150  $\mu$ l), un Blanc (EDMA 2X+surnageant) et un contrôle négatif (suspension bactérienne seule). Les plaques sont mises à incuber à 22°C pendant 2 h puis sont lavées doucement à l'EDMA. Un volume de 150 $\mu$ l de Zobell est déposé dans les puits et une incubation de la plaque pendant 24 h est effectuée à 22°C. Le milieu de culture et les bactéries planctoniques sont ensuite récupérés par pipetage. Un volume de 150  $\mu$ l de cristal violet à 0.8% (v/v) est alors ajouté dans chaque puits.

Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, plusieurs lavages à l'eau ultrapure permettent d'enlever l'excès de cristal violet. Le colorant est alors solubilisé par l'ajout de 150  $\mu$ l d'une solution d'éthanol absolu. La coloration est ainsi proportionnelle à la quantité de bactéries qui se sont développées en biofilm dans chaque puits. La concentration en colorant est mesurée à 595nm.

➤ **Effet sur la croissance bactérienne**

A partir de précultures dont la  $DO_{600nm}$  a été ajustée à 1, le milieu Zobell estensemencé à 2%. Dans des tubes à essais, 100  $\mu$ l de cette préparation sont mélangés à un volume de 2,5 ml de Zobell 2X, à volume égal est rajouté le surnageant (volume final 5ml), un Blanc (Zobell 2X+ surnageant) ; un contrôle négatif (culture bactérienne seule). 300  $\mu$ l de chaque culture sont déposés dans les puits d'une microplaque. La croissance bactérienne est ainsi suivie sous agitation à 22°C et pendant 72 h par mesure de la DO à 600nm.



