



HAL
open science

Etude du quorum sensing des bactéries organisées en biofilm en vue de la mise en place des biocides non toxiques

Emmanuel Gozoua

► To cite this version:

Emmanuel Gozoua. Etude du quorum sensing des bactéries organisées en biofilm en vue de la mise en place des biocides non toxiques. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Toulon; Université Nangui Abrogoua (Abidjan), 2019. Français. NNT: 2019TOUL0008 . tel-02493272

HAL Id: tel-02493272

<https://theses.hal.science/tel-02493272>

Submitted on 27 Feb 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »

Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par

Emmanuel GOZOUA

Soutenu le 04 Juin 2019 pour obtenir le grade de Docteur en Aspects moléculaires et cellulaires de
la biologie Spécialité : Microbiologie / Biologie moléculaire

ETUDE DU QUORUM SENSING DES BACTERIES ORGANISEES EN BIOFILM EN VUE DE LA MISE EN PLACE DE BIOCIDES NON TOXIQUES

THÈSE dirigée par :

Pr Yves BLACHE

Co-encadrée par :

Pr Maëlle MOLMERET

MEMBRES DU JURY

Mme Chantal IOBBI-NIVOL	Directeur de Recherche CNRS, Marseille	Rapporteur
M. Philippe MICHAUD	Professeur, Polytech Clermond Ferrand	Rapporteur
M. Jean-Michel BOLLA	Directeur de Recherche INSERM, Marseille	Examineur
Mme Claudine BARAQUET	Maitre de conférences, Université de Toulon	Examineur
Mme Rose A. KOFFI-NEVRY	Professeure, Université Nangui A. d'Abidjan	Co-directrice
Mme Maëlle MOLMERET	Professeure, Université de Toulon	Co-encadrant
M. Yves BLACHE	Professeur, Université de Toulon	Directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu j'aimerais remercier Dieu pour m'avoir donné la force et le courage d'aller jusqu'au terme de ces travaux.

Je remercie l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) pour avoir financé la première année de cette thèse.

Merci infiniment au ministère de l'enseignement supérieur de la République de Côte d'Ivoire et à M. N'guessan Yao (membre du ministère) pour m'avoir fait l'honneur de m'attribuer la bourse hors Côte d'Ivoire. Je suis entièrement reconnaissant pour tout le soutien moral que ce dernier m'a également apporté.

J'aimerais dire infiniment merci à mon directeur de thèse M. Yves Blache (Professeur à l'université de Toulon) qui a eu confiance en moi dès le début et a accepté la direction de cette thèse. Merci également à Mme Rose Koffi-Nevry (Professeur à l'université Nangui Abrogoua d'Abidjan), ma co-directrice, qui fut d'abord mon enseignante à l'université Nangui Abrogoua d'Abidjan (Côte d'Ivoire) et qui m'a initié à la recherche en Microbiologie de par son encadrement en Licence, Maîtrise et Master.

J'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe de recherche Biofouling et aspect moléculaire en particulier Mme Molmeret Maëlle (Professeure à l'université de Toulon) et Mme Baraquet Claudine (Maître de conférence à l'université de Toulon) pour l'encadrement de ce travail. J'exprime mes sincères reconnaissances à celles-ci pour m'avoir initié à l'étude génomique et à la q-PCR.

Mes remerciements vont également à l'endroit de tous les membres du laboratoire MAPIEM en particulier M. Chailan Jean-François (Professeur à l'université de Toulon), le directeur du MAPIEM, pour m'avoir accueilli dans le laboratoire.

Je remercie l'université de Toulon avec en sa tête M. Eric Boutin (Président de l'université), pour m'avoir accepté au sein de cette Université. Merci également à mon université d'origine, l'Université Nangui Abrogoua d'Abidjan, Côte d'Ivoire, avec en sa tête M. Tano Yao (Président de l'université) pour avoir contribué au bon déroulement de cette cotutelle.

Je remercie l'école doctorale ED548 avec en sa tête la directrice, Mme Muriasco Elisabeth (Professeure à l'université de Toulon) et Mme Casanova Patricia (Secrétaire de l'ED548). Merci chères madames pour votre disponibilité et votre assistance.

J'aimerais également dire merci à tout le conseil de l'ED548 pour les moments d'échange et de partage. Ce fut un honneur et une belle expérience pour moi d'être membre élu de ce conseil.

Je tiens à remercier M. Michaud Philippe (Professeur à l'institut polytechnique de Clermont Ferrand) et Mme Iobbi-Nivol Chantal (Directeur de recherche CNRS, Marseille) pour avoir

accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. Je leur exprime ici toute ma reconnaissance pour leur disponibilité.

Je tiens à remercier M. Bolla Jean-Michel (Directeur de Recherche à l'INSERM, Marseille) qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury et de juger ce travail.

Je remercie Mme Ayé Mireille épouse Daché (docteur en Microbiologie), ma devancière, pour m'avoir accueilli à Toulon. Elle m'a permis de m'installer, de m'intégrer et de démarrer les premières manipes de cette thèse sous son encadrement.

Je remercie M. Bottzeck Olivier pour m'avoir régulièrement fourni des molécules au laboratoire toutefois que j'en ai eu besoin pour les tests biologiques.

Je n'oublie pas tous mes collègues et amis du laboratoire Mapiem ainsi que tout le personnel.

Mes remerciements vont également à l'endroit de ma mère Zolou G. Rachel, qui joue un rôle indispensable dans ma vie depuis la disparition de mon père feu Gozoua Gilbert. Merci Maman, seul Dieu te récompensera.

J'aimerais dire merci à ma fiancée Ouhi Elodie, pour tout son soutien et son affection pour moi. Merci infiniment chérie !

Je remercie également ma fille Gozoua Zranlou Rachel Vanessa, pour tout le bonheur qu'elle m'apporte.

J'adresse un remerciement à tous mes frères : M. Guetti Franck, M. Gozoua Benjamin et M. Gozoua David ainsi que la grande famille Gozoua pour leur prière et leur amour pour moi.

Je ne saurais terminer sans adresser un vibrant hommage à mes défunts frères qui n'ont pu vivre avec moi ce moment précieux. Il s'agit de feu Gozoua Basile et feu Gozoua Michel. De là où vous êtes, que Dieu vous accorde la paix et la tranquillité.

Productions scientifiques

Article soumis:

Emmanuel Gozoua, Rose Koffi-Nevry, Yves Blache (2019) Biostimulation in marine bacteria: interplay between a potent antibiofilm compound (AS162) and Quorum Sensing autoinducers to regenerate biofilm formation.

Communications orales

Emmanuel Gozoua, Maëlle Molmeret, Claudine Baraquet et Yves Blache. « towards smart biocide-free antifouling strategies against marine bacteria design of marine natural products analogues ». 7^{ème} conférence internationale sur l'environnement, l'industrie et la microbiologie appliquée (BioMicroWorld 2017) à Madrid (Espagne), octobre 2017.

Emmanuel Gozoua, Maëlle Molmeret, Claudine Baraquet et Yves Blache. « Potentialisation de l'effet antifouling de 3 analogues synthétiques mis en place au Laboratoire Mapiem ». 4^{ème} regroupement du collège doctoral inter-régional en Biotechnologie végétale et agroalimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Meknès (Maroc) Mars 2017.

Emmanuel Gozoua, Maëlle Molmeret, Claudine Baraquet et Yves Blache. « Stratégie d'inhibition du biofilm d'une bactérie marine développant un système de communication appelé Quorum Sensing ». 3^{ème} regroupement du collège doctoral inter-régional en Biotechnologie végétale et agroalimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Abidjan (Côte d'Ivoire) Mars 2016.

Emmanuel Gozoua, Maëlle Molmeret, Claudine Baraquet et Yves Blache. « Etude du système de communication (Quorum Sensing) d'une bactérie marine ». 2^{ème} regroupement du collège doctoral inter-régional en Biotechnologie végétale et agroalimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Yaoundé (Cameroun) Avril 2015.

Emmanuel Gozoua, Rose Koffi-Nevry et Yves Blache. « Etude du système de communication (Quorum Sensing) d'une bactérie marine ». 1^{er} regroupement du collège doctoral inter-régional en Biotechnologie végétale et agroalimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Hammamet (Tunisie), Novembre 2014.

Communication par affiche

Emmanuel Gozoua, Rose Koffi-Nevry et Yves Blache. « Etude du système de communication (Quorum Sensing) de *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 organisée en biofilm ». 1^{er} regroupement du collège doctoral inter-régional en Biotechnologie végétale et agroalimentaire de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF). Yaoundé (Cameroun) Avril 2015.

Liste des sigles et abréviations

ABC:	ATP binding cassette
ADN:	Acide desoxyribonucléique
AF:	Antifouling
AHL:	Acyl homosérine lactone
AI :	Auto induction
AIP:	Autoinducteur peptidique
ARN:	Acide ribonucléique
ATP:	Adenosine triphosphate
CCCP :	Carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone
CE:	Classification enzymatique
CE ₅₀ :	Concentration efficace 50 (concentration pour éliminer 50% d'effet)
DCOIT :	Dichlorooctylisothiazoline
DGC :	Diguanylate cyclase
DL ₅₀ :	Dose létale 50 (ou médiane)
DPD:	(2,4)-Dinitro-benzyl pentane-(2,4)-dione
EPS :	Exopolysaccharides
HPLC:	Chromatographie liquide à haute performance
IC ₅₀ :	Inhibitory concentration 50 (mediane)
IMO :	Internationale maritime organisation
LPS:	Lipopolysaccharides
MATE:	Multidrug and toxic exclusion
MDR:	Multidrug resistant
MFP:	Membrane fusion protein
MFS:	Major facilitator superfamily
MTA:	S-methyl thioadenosine
MTAN:	Méthylthioadénosine nucleosidase
PaβN :	Phenylalanine arginine β-naphtylamide
PEG:	Peptydoglycane
PMBN :	Polymyxin B-nanopeptide hydrochloride
QQ :	Quorum quenching
QS :	Quorum sensing
QSI :	Quorum sensing inhibitor
RND:	Resistance nodulation division
SAM :	Self-assembled monolayer
SAM:	S-adenosine methionine
SRH:	S-adenosyl-homocystéine
TBT :	Tributylétain
TBTO:	Tributylétain oxide
TCMS :	Thiocyanatométhyl sulfurique
TCMTB :	Thiocyanatométhylthiobenzothiazole
TDA :	Tryptophane desaminase

Table des illustrations-Figures

Figure 1 : Images du biofouling présent sur différentes structures marines	8
Figure 2: Etapes de formation d'un biofilm bactérien.....	9
Figure 3 : Adsorption protéique sur une surface	11
Figure 4 : Représentation schématique du test de quantification du biofilm par la technique du BFRT	24
Figure 5 : Courbe de Baier démontrant l'importance relative du biofilm biologique par rapport à la tension superficielle critique du substrat (Baier, 2006)	32
Figure 6: Détection de quorum de type LuxI / LuxR dans les bactéries à Gram négatif.	41
Figure 7 : Structure moléculaire des AHLs.	42
Figure 8 : Structures chimiques de 23 AHLs produits chez une souche marine du genre <i>Vibrio</i>	43
Figure 9: Exemple d'un système de régulation en cascade des AHLs chez une espèce marine du genre <i>Vibrio</i>	46
Figure 10 : Modèle pour la production d'AI-2 et l'internalisation chez <i>S. enterica</i> sérovar <i>Typhimurium</i>	48
Figure 11 : Diagramme schématique indiquant deux types de systèmes de détection de quorum à médiation peptidique dans une bactérie à Gram positif, <i>Streptococcus mutans</i>	50
Figure 12 : Disposition des systèmes de screening (QGIS):	52
Figure 13 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux présentes chez <i>Escherichia coli</i>	62
Figure 14 : Représentation schématique d'une membrane bactérienne chez les bactéries à Gram positifs et chez les bactéries à Gram négatifs	67
Figure 15: Agents antirésistants et antivirulents sélectionnés et leurs mécanismes d'action chez <i>Staphylococcus aureus</i>	69
Figure 16: Description schématique de l'orientation des gènes vio sur l'ADN de <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC12472 en fonction du promoteur (P)	77
Figure 17: Description schématique de la biosynthèse <i>in vivo</i> de violacéine.....	79
Figure 18 : Représentation schématique du protocole d'extraction de la violacéine	104
Figure 19 : Représentation schématique de l'hypothèse de la régulation de la violacéine basée sur les AHLs exogènes chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	115
Figure 20 : Carte génomique de <i>P. ulvae</i> TC14.....	117
Figure 21 : Arbre phylogénétique du genre <i>Pseudoalteromonas</i> basé sur l'alignement des séquences du gène de l'ARNr 16S	119
Figure 22 : Représentation schématique d'un assemblage de 10 génomes basé sur les profils Pfam des génomes sélectionnés	122

Figure 23 : Représentation schématique d'un assemblage de 10 génomes basé sur les profils COG des génomes sélectionnés	123
Figure 24 : Mécanisme général de régulation d'une fonction bactérienne par le système QS basé sur les AHLs.....	125
Figure 25: Courbes d'évaluation des quantités de cDNA issues des séquences <i>luxR</i> présomptives retrouvées chez <i>P. ulvae</i> TC14	129
Figure 26: Role du LuxR solo dans la régulation QS des bactéries productrices d'AHLs	131
Figure 27: Mécanisme de synthèse d'AI-2.....	133
Figure 28 : Modèle de cascade de signalisation QS par AI-3 dans EHEC.....	135
Figure 29 : Suivi de la production du taux de cDNA issu de la séquence <i>tda</i>	137
Figure 30 : Représentation schématique de l'opéron <i>vio</i> chez <i>P. ulvae</i> TC14.	138
Figure 31 : Taux d'expression de l'opéron <i>vio</i> chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	138
Figure 32 : Suivi du taux de production des cDNA issus de la séquence <i>csgD</i>	140
Figure 33 : Représentation schématique de l'action de la Dgc sur le c-di-GMP	141
Figure 34 : Suivi de la production de cDNA issus de la séquence <i>dgc</i>	142
Figure 35 : Effet des trois analogues synthétiques sur la croissance chez <i>P. ulvae</i> TC14 et chez les deux autres bactéries	149
Figure 36 : Effet des analogues sur l'adhésion des bactéries.....	151
Figure 37 : Effet d'OB1 sur le biofilm chez les bactéries	155
Figure 38 : Effet d'AS194 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries	157
Figure 39 : Effet d'AS162 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries	159
Figure 40 : Effet du farnésol sur la production de violacéine chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	162
Figure 41 : Inhibition de la production de violacéine par l'eugénol chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	163
Figure 42 : Effet des combinaisons sur l'adhésion chez <i>P. ulvae</i> TC14	165
Figure 43 : Effet de combinaison d'AS162 et 3-oxo-C6 HSL sur l'adhésion chez <i>P. lypolitica</i> TC8 et <i>Paracoccus sp.</i> 4M6.....	166
Figure 44 : Effet de Combinaison des analogues avec les inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez <i>P. ulvae</i> TC14	168
Figure 45 : Effet de combinaison des analogues et des inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez TC8 et 4M6.....	169
Figure 46 : Effet de la combinaison des composés antifouling et des activateurs de QS sur l'adhésion chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	172
Figure 47 : Effet de la combinaison d'AS162 avec les activateurs de QS sur l'adhésion chez TC8 et 4M6.....	173

Figure 48 : Effet de la combinaison des analogues aux les activateurs de QS chez TC14	176
Figure 49 : Effet de la combinaison des analogues avec les activateurs de QS sur la formation de biofilm chez TC8 et 4M6.....	177
Figure 50 : Evaluation de la toxicité des perméabilisants chez les trois souches après 48h ..	187
Figure 51 : Effet de la combinaison des analogues avec les perméabilisants sur l'adhésion chez TC14, TC8 et 4M6.	189
Figure 52 : Effet de la combinaison des analogues avec les perméabilisants sur la formation de biofilm chez TC14, TC8 et 4M6.....	193
Figure 53 : Evaluation de la toxicité des coumarines chez les trois souches après 48h.....	197
Figure 54 : Effet de la combinaison des analogues avec les coumarines sur l'adhésion chez TC14, TC8 et 4M6	199
Figure 55 : Effet de la combinaison des analogues avec les coumarines sur la formation de biofilm chez TC14, TC8 et 4M6	203

Table des illustrations-Tableaux

Tableau 1 : Quelques enzymes utilisées dans la lutte contre les biofilms et/ou biofouling	34
Tableau 2 : Composés antifouling issus d'organismes marins	38
Tableau 3: Informations issues des structures chimiques des 23 AHLs produits chez une souche marine du genre <i>Vibrio</i>	44
Tableau 4 : Description des souches marines étudiées.....	87
Tableau 5 : Composition du milieu VNSS	89
Tableau 6 : Composition chimique du milieu MA.....	90
Tableau 7 : Composition chimique du Sea Salt (Sigma Aldrich)	91
Tableau 8 : Composition chimique du LB.....	92
Tableau 9: Composition chimique du tampon PBS	92
Tableau 10 : Molécules utilisées comme modulateurs du QS chez TC14	93
Tableau 11 : Analogues marins synthétisés au laboratoire MAPIEM	94
Tableau 12 : Les composés adjuvants	95
Tableau 13 : Listes et caractéristiques des amorces utilisées	108
Tableau 14 : Programme d'incubation pour une rétro-transcription d'ARN en cDNA.....	110
Tableau 15 : Données statistiques du génome de <i>P. ulvae</i> TC14	116
Tableau 16 : Résultats d'analyse du pourcentage moyen d'identité des nucléotides.....	121
Tableau 17 : Liste des gènes annotés <i>luxR</i> dans le génome de <i>P. ulvae</i> TC14.....	128
Tableau 18 : CE ₅₀ de l'inhibition d'adhésion des trois composés chez les différentes souches bactériennes.....	153
Tableau 19 : CE ₅₀ des différents composés sur la formation de biofilm chez les souches bactériennes.....	160
Tableau 20 : CE ₅₀ des combinaisons sur l'adhésion des souches	167
Tableau 21 : CE ₅₀ des combinaisons sur la formation du biofilm chez les différentes souches bactériennes.....	169
Tableau 22 : CE ₅₀ des combinaisons des trois composés et des activateurs de QS sur l'adhésion des souches.....	174
Tableau 23 : CE ₅₀ des combinaisons sur le biofilm des souches après 48h	178
Tableau 24 : Détermination des CE ₅₀ des combinaisons sur l'adhésion des souches et leur taux de réduction.....	191
Tableau 25 : Détermination des CE ₅₀ des combinaisons sur la formation de biofilm des souches et leur taux de réduction	195
Tableau 26 : Détermination des CE ₅₀ des combinaisons des analogues avec les coumarines sur l'adhésion des souches et leur taux de réduction.	201

Tableau 27 : Détermination des CE₅₀ des combinaisons sur le biofilm des souches et leur taux de réduction.....205

Sommaire

Remerciements	i
Productions scientifiques.....	iv
Liste d'abréviations	vi
Table des illustrations-Figures.....	viii
Table des illustrations-Tableaux.....	x
Sommaire	xii

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Chapitre I : Revue bibliographique	6
-------------------------------------------------	----------

1- Généralités sur les biofilms.....	7
---------------------------------------------	----------

1-1 Origines et définitions des biofilms.....	7
-----------------------------------------------	---

1-2 Etapes de formation des biofilms	8
--------------------------------------------	---

1-2.1 Adhésions	10
-----------------------	----

1-2.2 Colonisation	11
--------------------------	----

1-2.3 Maturation	12
------------------------	----

1-2.4 Dispersion	13
------------------------	----

1-3 Développement de biofilms en milieu naturel : avantages et inconvénients.....	14
-----------------------------------------------------------------------------------	----

1-3.1 Avantages.....	14
----------------------	----

1-3.1.1 Pour les microorganismes eux-mêmes.....	14
-------------------------------------------------	----

1-3.1.2 Pour des activités humaines	14
-------------------------------------------	----

1-3.2 Problèmes engendrés par les biofilms	15
--------------------------------------------------	----

1-3.2.1 Au plan sanitaire	15
---------------------------------	----

1-3.2.2 Au plan industriel	15
----------------------------------	----

1-3.2.3 Au plan environnemental	16
---------------------------------------	----

1-3.2.4 Problèmes économiques.....	16
------------------------------------	----

1-3.2.5 Problèmes écologiques.....	17
------------------------------------	----

2- Méthodes de lutte contre les biofilms	18
-------------------------------------------------------	-----------

2-1 Principales techniques de détection et de quantification des biofilms sur une surface abiotique.....	18
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

2-1.1 Techniques de détection et quantification des biofilms en microplaques	18
------------------------------------------------------------------------------------	----

2-1.1.1 Tests colorimétriques	18
-------------------------------------	----

2-1.1.2 Tests métaboliques.....	21
---------------------------------	----

2-1.1.3 Tests moléculaires	22
----------------------------------	----

2-1.1.4 Test magnétiques	23
--------------------------------	----

2-1.1.5 Test radioactifs	24
--------------------------------	----

2-1.2	Techniques physiques de détection et quantification des biofilms	25
2-1.3	Techniques microscopiques de détection et quantification des biofilms.....	26
2-2	Stratégies antifouling (AF)	28
2-2.1	Historiques et définitions	28
2-2.2	Utilisation des composés chimiques à caractère toxique.....	28
2-2.2.1	Tributylétain (TBT)	28
2-2.2.2	Cuivre.....	30
2-2.2.3	Biocides "Booster".....	30
2-2.3	Stratégies physico-chimiques selon Baier	31
2-2.4	Stratégies enzymatiques.....	33
2-2.5	Nouvelles approches antifouling basées sur les stratégies respectueuses de l'environnement	34
2-2.5.1	Démarches biométriques	34
2-2.5.2	Activités AF des bactéries.....	39
3-	Quorum sensing.....	40
3-1	Définitions	40
3-2	Auto-induction	40
3-2.1	Notion d'autoinducteurs	41
3-2.2	Les différents types d'autoinducteurs.....	41
3-2.2.1	Les acyl homocérines lactones (AHL).....	46
3-2.2.2	Les acyl borodiester AI-2	45
3-2.2.3	Les autoinducteurs chez les bactéries à gram positif.....	48
4-	Stratégies AF basées sur l'inhibition du QS (QSI).....	50
4-1	Définition du QSI.....	50
4-2	Différentes méthodes QSI.....	51
4-2.1	Méthode QSI par interférence avec le QS	51
4-2.2	QSI d'origine biologique	51
4-2.3	Méthode QSI issue de la modification du PH.....	53
4-2.4	Méthode QSI basée sur les activités enzymatiques ou quorum quenching (QQ)	53
4-2.5	Méthode QSI basée sur les analogues d'AHL	54
4.2.6	Mécanismes d'inhibition des principaux types de QS.....	55
4-2.6.1	Inhibition du système AHL	55
4-2.6.2	Inhibition du système AI-2.....	56
4-2.6.3	Inhibition du système peptidique (AI-3) chez les Gram-positifs	57
4-2.7	Impact du QSI sur la formation de biofilms	58
5-	Méthodes de lutte contre les biofilms impliquant la résistance bactérienne	60
5-1	Définitions et types de résistance bactérienne	60

5-2 Biofilms et résistance bactérienne.....	60
5-3 Modes de résistance bactérienne	61
5-3.1 Modulation des pompes d'efflux.....	61
5-3.1.1 Résistance par modulation des pompes d'efflux	61
5-3.1.2 Classifications des pompes d'efflux	62
5-3.1.3 Mécanismes de résistance bactérienne basés sur les pompes d'efflux	64
5-3.1.4 Mode de résistance bactérienne basée sur la réduction de la perméabilité membranaire.....	66
5-3.2 Stratégies de lutte contre la résistance bactérienne	68
5-3.2.1 Inhibition des pompes d'efflux.....	70
5-3.2.2 Perméabilisation de la membrane bactérienne	71
5-3.3 Méthodes de lutte contre la résistance bactérienne développée au sein d'un biofilm	73
6- Souches bactériennes étudiées dans le cadre de la thèse	74
6-1 Origine, conditions de prélèvements et de conservation	74
6-2 Genre <i>Pseudolateromonas</i>	74
6-2.1 L'espèce <i>Pseudoalteromonas ulvae</i>	76
6-2.1.1 Caractères morphologiques et culturels de <i>P. ulvae</i>	76
6-2.1.2 Production de pigment par <i>P. ulvae</i>	76
6-2.1.3 Propriétés chimiques de la violacéine.....	77
6-2.1.4 Biosynthèse de la violacéine	77
6-2.1.5 Le QS comme facteur de régulation de la violacéine chez le genre <i>Pseudoalteromonas</i>	80
6-2.1.6 Formation de biofilm du genre <i>Pseudoalteromonas</i>	81
6-2.2 Les autres souches bactériennes étudiées au cours de cette thèse	81
6-2.2.1 <i>Pseudoalteromonas Lipolytica</i> TC8	81
6-2.2.2 <i>Paracoccus</i> 4M6.....	82
7. Contexte général et objectifs de la thèse	84
Chapitre II : Matériel méthodes	86
1-Matériel.....	87
1-1 Souches marines.....	87
1-2 Biosenseurs	88
1-3 Cryoconservation des souches bactériennes	88
1-4 Milieux de culture et solutions	88
1-4.1 Väätänen Nine Salt Solution (VNSS) et VNSS agar.....	88
1-4.2 Marine broth (MB) et Marine agar (MA)	90
1-4.3 Sea Salt (SS).....	91

1-4.4 Luria Bertani broth (LB) ou LB agar.....	91
1-4.5 Tampon PBS	91
1-5 Réactifs, antibiotiques et autres composés	92
1-5.1 Préparation des réactifs et antibiotiques	92
1-5.2 Description des molécules à tester	93
1-5.2.1 Les molécules commerciales utilisées comme modulateurs du QS chez TC14	93
1-5.2.2 Les composés synthétisés au Laboratoire MAPIEM.....	94
1-5.2.3 Les perméabilisants membranaires et les modulateurs de pompes d'efflux	94
1-6 Analyse moléculaire de la souche <i>P. ulvae</i> TC14.....	96
1-6.1 Séquençage du génome de <i>P. ulvae</i> TC14 sur JGI/IMG	96
1-6.2 Extraction d'ADN chez <i>P. ulvae</i> TC14	96
1-6.3 Extraction et purification d'ARN chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	96
1-6.4 La retro-transcription de l'ARN en banque cDNA	96
1-6.5 qRT-PCR.....	96
2-Méthodes.....	98
2-1 Cultures des souches bactériennes en conditions planctoniques	98
2-2 Tests biologiques réalisés	98
2-2.1 Tests d'adhésion	99
2-2.1.1 Principes d'adhésion	99
2-2.1.2 Protocole d'adhésion.....	99
2-2.2 Tests de biofilm.....	101
2-2.2.1 Principes	101
2-2.2.2 Protocole de marquage du biofilm au cristal violet (CV)	102
2-2.3 Dosage de la violacéine chez <i>P. ulvae</i> TC14	103
2-2.3.1 Caractérisation de la violacéine.....	103
2-2.3.2 Extraction et dosage de la violacéine.....	103
2-2.4 Tests de mobilité.....	104
2-2.4.1 Swimming	104
2-2.4.2 Swarming	105
2-3 Caractérisation moléculaire du système QS chez <i>P. ulvae</i> TC14	105
2-3.1 Condition de culture bactérienne et d'extraction du génome	105
2-3.2 Séquençage et assemblage du génome	106
2-3.3 Design (ou préparation) d'amorces issues des différents gènes identifiés	106
2-3.4 Vérification des primers par PCR	108
2-3.5 Technique de la reverse transcription Quantitative PCR (RT-qPCR).....	109
2-3.5.1 Extraction de l'ARN chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	109
2-3.5.2 Production et purification des cDNA.....	110

2-3.5.3 q-RT PCR.....	110
2-4 Analyses statistiques.....	111
Chapitre III : Caractérisation du système QS chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	113
1-Introduction.....	114
2-Séquençage du génome complet de <i>P. ulvae</i> TC14.....	115
3-Analyse phylogénique de <i>P. ulvae</i> TC14 basée sur le gène ARNr 16S.....	118
4- Analyse et comparaison des génomes les plus proches de celui de <i>P. ulvae</i> TC14	120
5- Recherche de gènes impliqués dans le QS chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	123
5-1 Recherche des gènes spécifiques au système d'auto-induction basé sur les AHLs (LuxI/LuxR) chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	124
5-1.1 Rappel : Description et rôle du complex LuxI/LuxR dans la mise en place du QS ..	124
5-1.2 Recherche du couple luxI/luxR chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	125
5-2 Evaluation du taux de production de cDNA correspondants aux séquences présumptives de LuxR chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	128
5-2.1 Suivi et évaluation de la production de cDNA issus des <i>luxR</i> présumptifs	128
5-2.2 L'hypothèse de la régulation de QS par des LuxR solos chez TC14	130
6- Recherche de gènes AI-2 et ceux du système Peptidique (AI-3) chez TC14.....	132
6-1 Signal AI-2.....	132
6-1.1 Rappels : généralités sur la mise en place du signal AI-2 chez une bactérie Gram négatif.....	132
6-1.2 Recherche des gènes AI-2 chez <i>P. ulvae</i> TC14	134
6-2 Signal peptidique.....	134
6-2.1 Rappel : descriptions générales du signal peptidique (AI-3).....	134
6-2.2 Identification du système peptique chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	135
7- Etude de l'expression des gènes régulateurs de la violacéine chez <i>P. ulvae</i> TC14...136	136
7-1 Caractérisation des gènes <i>tda</i> chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	136
7-1.1 Role du Tda dans la production de violacéine chez <i>P. ulvae</i> TC14	136
7-1.2 Identification du gène <i>tda</i> et suivi de sa production du taux de cDNA chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	136
7-2 Présentation de l'opéron <i>vio</i> Chez <i>P. ulvae</i> TC14	137
7-3 Evaluation de l'expression de l'opéron <i>vio</i> Chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	138
8- Caractérisation d'autres gènes impliqués dans la mise en place du QS et/ ou la formation de biofilm.....	139
8-1 Caractérisation du gène <i>csgD</i> chez <i>P. ulvae</i> TC14	139
8-1.1 Description et rôle du gène <i>csgD</i> dans la formation de biofilm.....	139
8-1.2 Identification et caractérisation de <i>csgD</i> chez <i>P. ulvae</i> TC14	140

8-2 Caractérisation de la diguanylate cyclase (Dgc) chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	141
8-2.1 Description et rôle des DGC dans la communication bactérienne aboutissant à la formation de biofilm	141
8-2.2 Identification et caractérisation de DGC chez <i>P. ulvae</i> TC14	142
9- Conclusion	143
Chapitre IV : .Evaluation de l'impact de la modulation du QS sur l'effet anti-adhésif et antibiofilm cher <i>P. ulvae</i> TC14 de trois analogues.....	146
1- Introduction	147
2- Evaluation de l'effet antifouling des trois composés mis au point au laboratoire MAPIEM chez <i>P. ulvae</i> TC14 et deux autres bactéries marines	148
2-1 Effet des trois composés sur la croissance des bactéries	150
2-2 Evaluation de l'effet antifouling des trois composés.....	150
2-2.1 Effet sur l'adhésion des bactéries.....	153
2-2.2 Evaluation des CE ₅₀ des trois composés sur l'adhésion chez les différentes souches.....	153
2-2.3 Effet des composés sur la formation de biofilm chez les bactéries	154
2-2.3.1 Effet d'OB1 sur la formation de biofilm chez les bactéries.....	154
2-2.3.2 Effet d'AS194 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries.....	156
2-2.3.3 Effet d'AS162 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries.....	158
2-2.3.4 Détermination des CE ₅₀ des trois composés sur le biofilm chez les différentes souches	160
3- Evaluation de l'effet des composés actifs sur le QS chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	160
3-1 Effet du farnesol sur la production de violacéine chez <i>P. ulvae</i> TC14	161
3-2 Effet de l'eugénol sur la production de violacéine chez <i>P. ulvae</i> TC14	162
4-Evaluation de l'impact de la modulation du QS sur l'effet antifouling des trois composés par approche combinatoire	163
4-1 Evaluation de l'impact de l'inhibition du QS (QSI) sur l'effet antifouling des trois composés.....	164
4-1.1 Effet de la combinaison des QSI et des trois composés antifouling sur l'adhésion chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	164
4-1.2 Effet des combinaisons sur l'adhésion chez TC8 et 4M6.....	165
4-1.3 Mise en évidence de la restitution de l'adhésion chez les bactéries par la détermination des CE ₅₀ des différentes combinaisons	166
4-1.4 Effet de la combinaison des QSI et des trois composés antifouling sur la formation du biofilm chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	167
4-1.5 Effet des combinaisons sur le biofilm chez <i>P. lypolitica</i> TC8 et <i>Paracoccus sp.</i> 4M6.....	169
4-1.6 Détermination des CE ₅₀ des combinaisons sur le biofilm chez <i>P. ulvae</i> TC14 et les deux autres souches.....	170

4-2 Evaluation de l'impact de l'activation du QS sur l'effet antifouling des trois composés (OB1, AS194 et AS162) par approche combinatoire.....	171
4-2.1 Effet des combinaisons sur l'adhésion	171
4-2.1.1 Chez <i>P. ulvae</i> TC14.....	171
4-2.1.2 Chez <i>P. lypolitica</i> TC8 et <i>Paracoccus sp.</i> 4M6.....	173
4-2.1.3 Détermination des CE50 des combinaisons de composés antifouling et des activateurs de QS sur l'adhésion des souches.....	174
4-2.2 Effet des combinaisons des composés antifouling et les activateurs de QS sur la formation de biofilm des souches.....	175
4-2.2.1 Effet des combinaisons sur la formation de biofilm après 48h chez TC14.....	175
4-2.2.2 Effet de la combinaison d'AS162 et la 3-oxo-C8 HSL sur la formation de biofilm chez TC8 et 4M6.....	177
4-2.2.3 Détermination des CE ₅₀ d'inhibition des combinaisons sur la formation de biofilm chez les souches.....	178
5- Conclusion.....	179

Chapitre V : Evaluation de la potentialisation de l'effet antifouling des composés par la perméabilisation membranaire et par l'inhibition des pompes d'efflux183

1-Introduction.....184

2-Potentialisation de l'effet antifouling des composés naturels par les perméabilisants membranaires185

2-1 Fonctions et représentations schématiques des perméabilisants..... 185

2-2 Etude de la toxicité des perméabilisants membranaires seuls chez *P. ulvae* TC14 et les autres souches 186

2-3 Potentialisation de l'effet antifouling des composés naturels par combinaison avec les perméabilisants 187

2-3.1 Effet de la combinaison des composés naturels et des perméabilisants sur l'adhésion des bactéries.....188

2-3.2 Mise en évidence de la potentialisation de l'effet d'anti-adhésion par la détermination des CE₅₀ de l'effet d'anti-adhésion des combinaisons et les pourcentages de réduction des CE₅₀..... 190

2-3.3 Effet des combinaisons des composés naturels et des perméabilisants sur la formation de biofilm chez les trois souches.....192

2-3.4 Détermination des CE₅₀ de combinaisons des composés naturels et des perméabilisants sur la formation de biofilm chez les souches et le pourcentage de réduction de ces CE₅₀.....194

3-Potentialisation de l'effet d'anti -adhésion des composés naturels par approche combinatoire avec les inhibiteurs des pompes d'efflux (EP).....196

3-1 Présentation et structures des coumarines testées dans cette étude..... 196

3-2 Evaluation de la toxicité des coumarines..... 197

3-3 Potentialisation de l'effet d'anti-adhésion des composés naturels par leurs combinaisons avec les coumarines.....	198
3-4 Détermination de la CE ₅₀ de l'effet d'anti-adhésion des combinaisons des trois analogues synthétiques avec les coumarines et les taux de réduction des CE ₅₀	200
3-5 Effet des combinaisons d'analogues synthétiques avec les coumarines sur la formation de biofilm chez les trois souches.....	202
3-6 Calcul des CE ₅₀ de combinaisons et leur taux de réduction sur les sur la formation de biofilm des souches.....	204
4-Conclusion.....	206
Conclusion générale et perspectives.....	209
1-Conclusion générale.....	210
2-Perspectives.....	215
Références bibliographiques.....	219
Résumé.....	268

Introduction générale

Le biofouling est un processus biologique qui correspond à l'agrégation de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires) et de macroorganismes (algues, éponges, balanes, invertébrés...) sur une surface naturelle ou synthétique immergée (**Characklis, 1981**). La formation de ce type de structure sur les coques de navires engendre d'importants dégâts à la fois économiques et écologiques (**Yebra et al., 2004**). En effet, la formation de biofouling sur les coques de navires peut conduire à une augmentation de la consommation de carburant d'environ 40% (**Champ 2003**), et à la délocalisation d'espèces marines non natives voir invasives (**Piola et al., 2009**). Ainsi, le biofouling est dommageable aux structures artificielles immergées dans le transport maritime, dans l'aquaculture et dans l'industrie pétrolière offshore. Au-delà de ces considérations environnementales, les biofilms représentent un enjeu de santé publique important, étant impliqués dans les infections médicales et dans les contaminations en industries agro-alimentaires (**Geske et al., 2005**).

La formation du biofilm bactérien se déroule en plusieurs étapes séquentielles dans le temps : en quelques minutes des composés organiques et inorganiques sont adsorbés sur la surface et les bactéries vont s'immobiliser de manière réversible puis irréversible sur ce substrat nutritif. Des substances polymériques extracellulaires (EPS, majoritairement composées de protéines et de polysaccharides) sont alors produites. L'EPS est une matrice extracellulaire contribuant au maintien des communautés bactériennes adhérees (**Allison, 2003**). Enfin, le biofilm croit et se développe, les cellules se multiplient, communiquent entre elles via des molécules signal et changent de métabolisme afin de consolider le biofilm et de coloniser la surface (**Davies et al., 1998**).

Dans le but de contrôler le biofilm et les salissures marines en général, des techniques physiques ou chimiques ont été utilisées depuis plusieurs années. Ces techniques consistent en la filtration de l'eau, au traitement par les UV, au grattage en continu des surfaces. En outre, de nombreux procédés chimiques préventifs ou

curatifs utilisent des produits biocides comme des métaux (cuivre, argent), des produits oxydants (chlore, brome, ozone) ou des produits non oxydants de synthèse (bactéricides, fongicides, algicides issus de l'agriculture). Ces procédures de lutttes ont non seulement été mises en place avec des coûts très élevés mais produisent des effets toxiques qui persistent à long terme dans l'environnement. En clair, les peintures antifouling se sont avérées toxiques en raison des dommages collatéraux infligés aux écosystèmes marins et aux organismes non ciblés (**Alzieu, 1996**).

La sensibilisation accrue aux conséquences désastreuses résultante de l'utilisation des biocides antisalissures toxiques a incité l'investissement dans la recherche et le développement de solutions alternatives respectueuses de l'environnement. Une des technologies alternatives les plus prometteuses est le développement de revêtements incorporant des composés actifs d'origine naturelle. De nombreuses substances aux propriétés antifouling ont été extraites de divers organismes marins qu'ils soient microscopiques (bactéries, champignons) ou macroscopiques (algues, éponges, coraux, gorgones). L'origine naturelle de ces molécules ne garantit pas leur non-toxicité, mais elles présentent l'avantage d'avoir été sélectionnées au cours de l'évolution. (**Andjouh et al., 2015**). Ainsi, la potentialisation de l'effet antifouling des composés biogéniques passe nécessairement par une meilleure compréhension des étapes de formation de biofilm et une connaissance des paramètres qui leur sont liés. L'un des principaux paramètres liés à la formation de biofilm chez les bactéries Gram négatif est le système de communication bactérienne connu sous le terme de Quorum sensing (QS). (**Decho et al., 2011**).

En mode de vie privilégié des bactéries, c'est-à-dire en biofilm, les bactéries peuvent communiquer grâce à un système de communication intra- et inter-espèces et inter-genres, qui répond au nom de quorum sensing (**Li et Tian, 2012**). Le Quorum sensing est le mécanisme utilisé par les bactéries Gram négatif comme

positif pour réguler l'expression de divers gènes, de manière synchronisée et dépendante de la densité cellulaire (**Kristensen et al., 2008**). Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques incluant la production de facteurs de virulence (**Yebra et al., 2004**), l'émission de bioluminescence (**Characklis, 1981**), la production de pigments (**Davies et al., 1998**), la formation de biofilm ou la motilité (**McClellan et al., 1997**).

Cette étude s'inscrivant dans le cadre de la mise en place d'une stratégie antifouling respectueuse de l'environnement s'intéressera principalement à l'espèce *Peudoalteromonas ulvae* (TC14) isolée de la rade de Toulon. Le choix de cette bactérie Gram négatif repose sur sa capacité à former le biofilm et la production d'un pigment pourpre connu sous le nom de violacéine. En outre, la violacéine se présente chez *P. ulvae* TC14 comme un phénotype qui semble régulé par le QS du moins en présence d'AHLs exogènes (**Aye et al., 2015**).

Le but de ce travail est de se servir de *P. ulvae* TC14 comme d'un outil de criblage pour la mise au point de composés antifouling respectueux de l'environnement. Pour cela, une caractérisation du système QS de *P. ulvae* TC14 et une étude de l'interaction entre ce système QS et la formation de biofilm seront faites dans la première partie de cette étude. Dans la deuxième partie, il sera question d'évaluer l'impact de la modulation du QS sur la formation de biofilm. Enfin, la dernière partie de cette étude prendra en compte les paramètres liés à la protection de la cellule bactérienne favorisant ainsi la limitation de l'effet antifouling des composés naturels. Il s'agit notamment des facteurs liés à la perméabilité membranaire et l'extrusion active des composés antifouling.

Chapitre I :

Revue bibliographique

1- Généralités sur les biofilms

1-1 Origines et définitions du biofilm/biofouling

Le terme « biofilm » a été proposé dans les années 1980 par différents auteurs dont notamment **Costerton et al. (1978)**. La définition du biofilm a évolué au cours du temps et représente à l'heure actuelle un consortium de micro-organismes (bactéries, champignons, micro-algues). Les biofilms se présentent ainsi comme des structures hétérogènes constituées par des populations bactériennes englobées dans une matrice extracellulaire, fixées sur des surfaces naturelles ou artificielles (**Lahaye 2006**). La communauté microbienne est alors enveloppée dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires aboutissant à la formation d'une structure tridimensionnelle complexe, fortement adhérente à la surface contaminée telles les particules tellurique ou tissus végétaux (**Characklis et al., 1989**). Les biofilms renferment en leur sein de nombreuses communications intercellulaires assurant la coopération des micro-organismes acteurs (**Bosgraud et al. 2003**).

En milieu marin, les biofilms sont associés à la notion de biofouling. Le biofouling se définit comme l'accumulation indésirable de microorganismes, de plantes et d'animaux sur des surfaces immergées, artificielles ou non (**Rascio, 2000**). Du fait de la qualité nutritive véhiculée par l'eau de mer comparée à celle de l'air, les structures et les équipements marins immergés ou en atmosphère humide sont plus sujets à ce type de colonisation biologique (**Wahl, 1989**). Ainsi, dans le cadre des activités humaines liées au milieu marin, le biofouling apparaît sur des surfaces très variées parmi lesquelles peuvent être cités les coques de bateaux (**Figure 1A**), les pipelines (**Figure 1B**), le matériel aquacole (**Figure 1C**), ou les infrastructures pétrolières (**Figure 1D**). Toutes les activités aquatiques sont impactées par ce phénomène qui engendre des problèmes tant économiques qu'écologiques (**Evans et Clarkson, 1993**).

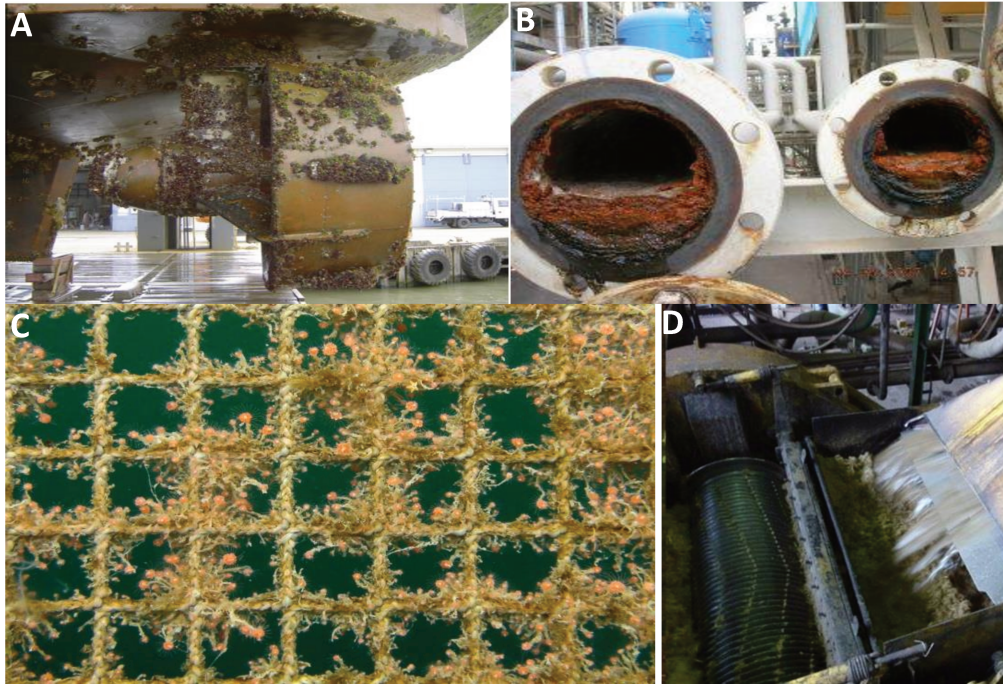
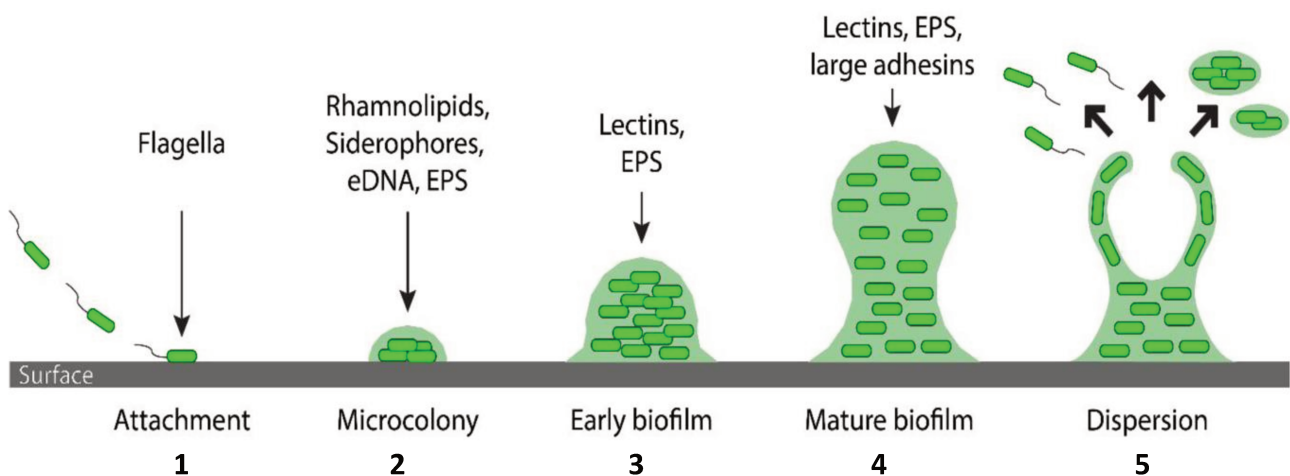


Figure 1 : Images de Biofouling présent sur différentes structures marines :
 A) Biofouling présent sur la coque d'un navire (Omae I, 2003) ; B) Pipeline recouvert de biofouling (source :<https://cathodicme.com/mgps-systems/marine-growth-prevention-system>), C) Biofouling présent sur les mailles d'un filet aquacole (Source :<https://www.sintef.no/en/ocean/initiatives/biofouling>); D) Biofouling présent sur une infrastructure pétrolière (source :<https://www.cbecl.info/2015/01/feasibility-report-and-project-profile.html>).

1-2 Étapes de formation des biofilms

La formation d'un biofilm se subdivise en cinq étapes principales. Après le conditionnement très rapide de la surface, les bactéries se déplacent dans le milieu liquide grâce à la force du flux, à la gravitation et aux mouvements de leurs flagelles. Lorsque les bactéries sont au voisinage d'une surface, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent et conduisent à une interaction réversible avec la surface. Dans un second temps, à mesure que les cellules se divisent, le nombre de bactéries associées à la surface augmente et l'adhésion devient irréversible c'est-à-dire non limitée par une quelconque séparation de la cellule avec le support. Cette transition vers une adhésion irréversible correspond à la synthèse de structures à la surface de la bactérie, qui s'accompagne d'une

profonde modification du profil d'expression des gènes (Schembri *et al.*, 2003; Beloin *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2004). Les bactéries forment alors des amas à la surface et produisent des polysaccharides extracellulaires (EPS). La troisième étape est caractérisée par la formation de microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et de bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation. Enfin, le stade de maturation correspond au développement des microcolonies et à la structuration du biofilm : les microcolonies se développent en des structures au sein desquelles les cellules sont englobées dans la matrice extracellulaire. Les espaces séparant les microcolonies deviennent les canaux du biofilm à l'intérieur desquels les fluides nutritifs peuvent circuler. Certaines bactéries peuvent se détacher du biofilm mature et rentrer dans la phase de dissémination. Cette dernière étape permet la colonisation de nouvelles surfaces. Ces étapes sont illustrées dans la **figure 2** ci-dessous :



Source : (Molin et Tolker, 2003)

Figure 2 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien. (1) Les bactéries planctoniques évoluant librement dans un milieu liquide se déposent sur une surface. (2) celles-ci s'organisent en amas (adhésion réversible). (3) encrage irréversible des cellules sur la surface via des appendices cellulaires et les exopolymères autoproduits. (4) Maturation du biofilm, acquisition d'une structure tridimensionnelle. (5) En fin de maturation, un certain nombre de cellules retournent à l'état planctonique et peuvent former plus loin un nouveau biofilm.

1-2.1 Adhésion

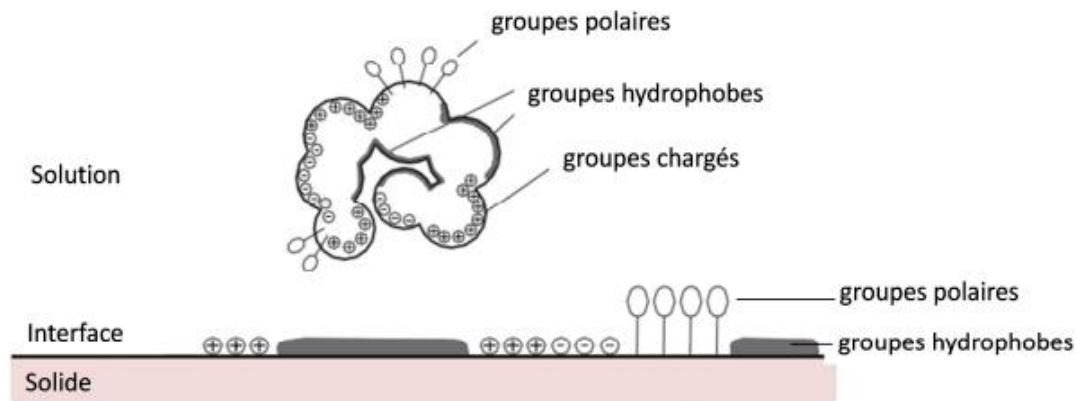
La première étape de la formation d'un biofilm est l'adsorption des molécules en solution liquide ou sur surface inerte (phénomène rapide). (**Fournier et Hooper 2000**).

L'adhésion bactérienne sur une surface peut être décrite comme un processus en deux étapes successives : une première étape physique, instantanée et réversible qui est l'étape d'attachement des bactéries sur la surface. Les microorganismes vont pouvoir adhérer à la surface par des liaisons physicochimiques (interactions électrostatiques, de Van Der Waals ou hydrophobes lorsque les interactions sont gouvernées par l'entropie) et par des interactions liées au mouvement brownien (i.e. mouvements incessants et aléatoires en solution) (**Van et al., 1988**). Une seconde étape non instantanée liée à la physiologie des bactéries (nécessitant que les liaisons créées entre les bactéries et la surface durant l'étape d'attachement soient maintenues et consolidées), irréversible du point de vue chimique et cellulaire.

Par ailleurs, l'un des facteurs influençant l'adhésion bactérienne est l'adsorption protéique. En effet, la surface d'une protéine présente des groupements hydrophobes et hydrophiles, chargés positivement et/ou négativement, des régions polaires et apolaires. Différentes interactions auront donc lieu entre la protéine et la surface suivant leurs caractéristiques physico-chimiques respectives (**Figure 3**). Ceci peut amener à une dénaturation de la protéine (destruction de la structure tertiaire) ou à un changement de sa conformation au contact avec la surface (**Larsericdotter et al., 2005**).

Outre les caractéristiques propres des bactéries, l'adhésion bactérienne est influencée par de nombreux autres facteurs (**Katsikogianni et Missirlis, 2004**). Parmi ceux-ci, figurent la nature de la surface du point de vue acido-basique et la présence éventuelle de charges, qui si elles existent jouent un rôle important par rapport aux simples forces de van der Waals qui sont plus faibles (**Speranza et**

al., 2004). Un autre facteur à prendre en compte est la rugosité de la surface : les irrégularités d'une surface, la présence de trous et l'augmentation de la porosité sont trois facteurs augmentant le nombre de bactéries adhérant à la surface (Scheuerman *et al.*, 1998).



Source : (Larsericdotter *et al.*, 2005)

Figure 3 : Adsorption protéique sur une surface. L'adsorption des protéines sur une surface (accumulation de protéines) conduit à la formation d'un film sub-, mono- ou multicouche qui peut être « conditionnant ».

1-2.2 Colonisation

Dès l'adhésion, les micro-organismes se multiplient et stimulent la synthèse des polysides entrant dans la composition des polymères exocellulaires du biofilm, dits exopolymères. L'adhésion qui produit ces exopolymères aboutit à la formation d'une matrice de substances polymériques exocellulaires ou extracellulaires (EPS). Les micro-organismes sont interpénétrés dans cette matrice et constituent un « tissu » avec des échanges entre strates de bactéries par la circulation de nutriments. La production d'exopolymères n'a lieu que si le micro-organisme possède l'information génétique correspondante. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* active l'expression d'un gène promoteur *algC* dès que son adhésion en biofilm est effectuée pour la formation d'une matrice faite d'alginate (Davies *et al.*, 1993). L'arrêt de la multiplication bactérienne ne

correspond pas à un arrêt de la formation du biofilm. L'activité énergétique sous forme d'ATP est toujours présente 4 mois après l'arrêt de la multiplication bactérienne (**Van der et al., 1989**). La croissance d'un biofilm peut se faire sur des mois et des années. La formation du biofilm aboutit à des structures en fonction des conditions de croissance du milieu.

Dans des conditions favorables, lorsque les micro-organismes sont fixés de manière irréversible au support, les cellules peuvent se multiplier, proliférer et interagir entre elles (**Bellon-Fontaine et al., 2008**). Il y a alors accroissement de la biomasse et production de métabolites sécrétés par les micro-organismes. Cette phase de croissance est caractérisée par trois étapes, à savoir (i) une phase dynamique de croissance, (ii) une phase linéaire de croissance, qui traduit une évolution à taux constant et maximale du biofilm et (iii) une phase de ralentissement, qui correspond à un début d'équilibre du biofilm entre le taux de multiplication et d'accumulation des micro-organismes et le taux de détachement de matière. Enfin, en plus de la multiplication des cellules constitutives du biofilm, la croissance de ce dernier peut également être attribuée à des cellules planctoniques venant s'adhérer à sa surface (**Boutaleb 2007**).

1-2.3 Maturation

La phase de maturation du biofilm se caractérise par une augmentation de la taille de la structure via la multiplication cellulaire et la synthèse importante des EPS. Le biofilm va alors acquérir une structure tridimensionnelle, par exemple, celle dite en « champignon » retrouvée chez des biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*. (**Davey et al., 2003**). Ainsi, les EPS, principalement des polysaccharides, des protéines, des lipides et de l'ADN extracellulaire, forment une matrice dont la cohésion et la stabilité mécanique jouent un rôle crucial dans le maintien du micro-consortium (**Flemming et Wingender, 2010; Flemming et al., 2016**). La matrice ainsi formée constitue l'environnement proche de la communauté microbienne ; elle favorise son développement par ses

effets de protection (rôle de barrière de diffusion) et de sorption (rétention de composés). Les EPS interagissent en effet entre eux, ainsi qu'avec les molécules organiques ou inorganiques du milieu environnant, rendant encore bien plus complexe la composition chimique du biofilm. Le potentiel de croissance d'un biofilm bactérien est ainsi conditionné par la disponibilité en nutriments, la diffusion de ces nutriments et l'évacuation des déchets (**Dunne, 2002**). Les EPS permettent non seulement la rétention d'eau, d'exo-enzymes ou de composés nutritifs, qui sont utiles pour les cellules du biofilm mais ils tiennent également un rôle de barrière à la diffusion de biocides qui pourraient être néfastes aux cellules bactériennes.

1-2.4 Dispersion

Un cycle de croissance et de détachement cellulaire, historiquement baptisé « sloughing » par les Anglo-saxons, en référence à la mue des serpents, s'établit suite à l'étape de maturation. Le détachement des bactéries peut être vu comme un phénomène actif qui interviendrait suite à un stress nutritionnel (**Kirov et al., 2005**). Les bactéries se détacheraient alors de manière volontaire pour repasser dans un mode de vie planctonique afin de trouver de meilleures ressources en colonisant de nouvelles surfaces (**O'Toole et al., 2000 ; Sauer et al., 2004**). Ce détachement bactérien est précédé d'une nouvelle synthèse de flagelles chez les bactéries (**Kirov, 2007**). Le détachement des bactéries peut aussi s'effectuer de manière passive et être dû au mouvement de fluides provoquant les phénomènes d'érosion (pertes de petites molécules) ou de « desquamation » (pertes de biomasses importantes) (**Piciooreanu et al., 2001**). D'une manière générale, les forces de cisaillement, la multiplication cellulaire et une dégradation enzymatique semblent contribuer favorablement à la dispersion des micro-organismes. Le c-di-GMP semble également jouer un rôle significatif dans cette étape de dispersion, comme cela a été montré chez *Pseudomonas putida* (**Morici, 2007**). Cette capacité des bactéries sessiles à quitter le biofilm leur permet de trouver une autre niche à coloniser.

1-3 Développement de biofilms en milieu naturel : avantages et inconvénients

1-3.1 Avantages

1-3.1.1 Pour les microorganismes eux-mêmes

La vie communautaire (sous-forme de biofilms) protège les micro-organismes qui y participent en leur conférant de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques, synergies entre micro-organismes, expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress (**Costerton et al. 1999 ; Tomlin et Wang. 2005, Glinel et al., 2008**). Quelques études moléculaires récentes menées sur les biofilms ont montré des modifications de l'expression génétique et des phénotypes entre les formes planctoniques et sessiles. Ces changements permettent d'expliquer l'adaptation des biofilms à des conditions environnementales stressantes et l'acquisition d'avantages évolutifs (**Clutterbuck et al., 2007, Goller et Romeo 2008**). Ainsi, les bactéries composant un biofilm sont plus résistantes à la réponse immunitaire de l'hôte et aux agents antibactériens que leurs congénères vivant sous forme planctonique (**Clutterbuck et al., 2007**).

1-3.1.2 Pour des activités humaines

a- Traitement des eaux usées

Les biofilms sont utilisés dans des procédés d'autoépuration des lacs et le système de boues activées dans certaines stations d'épuration. Ce phénomène est facilité par la capacité des microorganismes à dégrader les polluants présents dans les effluents. Certaines bactéries, présentes dans des cours d'eau ou des lacs jouent un rôle non négligeable dans le cycle des métaux, dont elles sont en mesure de réduire les concentrations dans l'eau. (**Wanner et Bauchrowitz 2006**).

b- Domaine industriel

Les biofilms bactériens peuvent être utiles de par leurs propriétés de synthèse de certaines substances chimiques (éthanol, poly-3-hydroxybutyrate, benzaldéhyde, plastiques) ou encore par leurs propriétés électriques qui en font de bons candidats pour les bio-piles (**Wanner et Bauchrowitz 2006**).

1-3.2 Problèmes engendrés par les biofilms

1-3.2.1 Au plan sanitaire

Les biofilms peuvent constituer un problème majeur pour la santé humaine, de nombreux cliniciens les citant comme la cause de diverses infections bactériennes chroniques (**Parsek et Fuqua, 2003**). Les cellules bactériennes sont protégées par la croissance dans un biofilm et, bien que les anticorps produits en réponse aux antigènes du biofilm puissent éliminer les cellules planctoniques diffusées du biofilm, ils ne peuvent pas atteindre les cellules sessiles dans le biofilm et peuvent endommager les tissus environnants (**Costerton et al., 2003**). De même, les antibiotiques ne parviennent souvent pas à éradiquer les biofilms, ne supprimant que les symptômes d'infection en détruisant les cellules planctoniques (**Stewart et Costerton, 2001**). En conséquence, les infections chez les animaux et les humains peuvent persister pendant des années avec des symptômes récurrents après chaque période de traitement antibiotique jusqu'à ce que la surface colonisée soit retirée chirurgicalement. Par ailleurs, Certaines bactéries telles que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, sont responsables de la formation de la plaque dentaire. La plaque dentaire est définie comme un ensemble hétérogène adhérent à la surface des dents ou logé dans l'espace gingivo-dentaire (**Gibbons et van Houte 1975**).

1-3.2.2 Au plan industriel

Le domaine de l'industrie agro-alimentaire n'échappe pas à la problématique des biofilms. Ainsi, les produits alimentaires sont le plus souvent exposés aux dégradations et altérations par les microorganismes se développant en biofilms.

Ils sont présents dans tous les secteurs : laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, salaisonneries, etc. Parmi les bactéries affectant l'hygiène alimentaire, le cas de *Listeria monocytogenes* est le plus souvent évoqué. Ce germe responsable de listériose est capable de coloniser des surfaces en quelques heures entre deux procédures de nettoyage (**Jeyasekaran et al., 2000**). Dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable. Les canalisations d'eaux potables sont sujettes au développement des biofilms qui ne peuvent être totalement éliminés par l'ajout de chlore (**Coester et Cloete, 2005**).

1-3.2.3 Au plan environnemental

a- Environnement terrestre

Les phénomènes tels que la dégradation des bâtiments et l'altération de nombreuses surfaces qu'elles soient naturelles ou artificielles, tirent leur origine du développement des biofilms. Ceci génère évidemment un impact économique important (**Wanner et Bauchrowitz 2006**).

b- Environnement marin

Les effets indésirables des biofilms en milieu marin concernent surtout les navires. En effet, la formation de biofilms sur les coques de bateaux appelée phénomène de « biofouling » conduit à une augmentation de force de friction, une diminution de la vitesse des bateaux et des surcoûts énergétiques considérables (**Coester et Cloete, 2005**). Les corrosions provoquées par les biofilms peuvent conduire à la perforation des coques de bateaux (**Wanner et Bauchrowitz 2006**). Ce phénomène engendre d'énormes conséquences aussi bien économiques qu'écologiques (**Lejars et al., 2012**).

1-3.2.4 Problèmes économiques

Le développement du biofilm et/ ou du biofouling sur les coques des navires engendre d'énormes incidences économiques. En effet, la présence de biofilms

provoque la rugosité des coques des bateaux entraînant ainsi un accroissement de la trainée hydrodynamique. Selon **Shultz et al., en 2007**, cette trainée varie en fonction de l'épaisseur de la salissure. Ceci engendre la diminution de la vitesse de navigation d'où une élévation de la consommation de carburant et donc du coût opérationnel des navires (**Shultz et al., 2011**). Les coûts primaires issus de l'augmentation de la consommation de carburant due au biofouling pour toute la classe de navires militaires DDG-51 ont été estimés à environ 56 millions de dollars par an (**Salta et al., 2013**).

1-3.2.5 Problèmes écologiques

Le développement de biofilm ou biofouling dans le milieu marin engendre un grand nombre d'incidences écologiques. En effet les biofilms provoquent une forte consommation du carburant par les navires. La consommation abusive de carburant engendre ainsi l'émission de composés nocifs et de polluants toxiques constituant un danger pour les organismes marins. Un autre danger qui mine l'environnement marin est l'émission des biocides incorporés dans les revêtements antifouling. Ceci a un effet néfaste sur les organismes marins (**Preston et Shackelford, 2002**). Le biofouling associé aux bateaux (coques, ballasts) engendre également une importante délocalisation d'espèces marines qui peuvent provenir des différentes régions du globe. En effet, dans plusieurs zones marines, l'on assiste à une invasion d'espèces exotiques ce qui affecte la valeur environnementale et sociale ainsi que la stabilité de ces zones. Une autre des conséquences concerne les capteurs immergés pendant des temps très longs en milieu marin qui perdent du fait de l'obstruction leur fonctionnalité initiale. De même, les caméras sous-marines perdent également leur efficacité en raison de voile biologique qui se développe sur la partie optique (**Langumier et al 2010**).

2- Méthodes de lutte contre les biofilms

2-1 Principales techniques de détection et de quantification des biofilms sur une surface abiotique

2-1.1 Techniques de détection et quantification des biofilms en microplaques

2-1.1.1 Tests colorimétriques

Test au cristal violet : la coloration est l'une des premières méthodes adoptées pour la quantification de la biomasse des biofilms (**Christensen et al., 1985 ; Stepanovic et al., 2000**). En bref, cette méthode est basée sur la coloration des molécules chargées négativement par un colorant basique de couleur violette appelé cristal violet (CV). Celui-ci se lie indifféremment aux bactéries chargées négativement et les polysaccharides de l'EPS (**Maki et al., 1977**). Après coloration le CV absorbé est élué en utilisant un solvant (l'éthanol ou l'acide acétique). La quantité de colorant solubilisé par le solvant (mesuré par l'absorbance optique à 590 nm) correspond à la taille du biofilm. Cette méthode comporte néanmoins quelques insuffisances à savoir sa faible reproductibilité du fait de nombreuses étapes qu'elle implique. De plus, parce que les cellules vivantes et mortes ainsi que la matrice de biofilm sont colorées par CV, cette méthode ne fournit aucune information sur la quantité réelle de bactéries vivantes mais il peut être adapté pour évaluer une efficacité globale anti-biofilm sans distinguer la croissance de la production de matrice. Pour évaluer la croissance bactérienne, le biofilm doit être détaché des surfaces et les bactéries énumérées par les méthodes conventionnelles des UFC (unités formant colonies). Cette approche implique la réalisation de dilutions en série et de dépôts des suspensions sur des boîtes de milieu de croissance afin de déterminer en énumérant les colonies, la concentration des bactéries initialement présentes dans l'échantillon. La procédure de détachement est le point faible de toutes ces méthodes puisque selon son efficacité elle peut affecter les résultats (**Bouza et al., 2005**).

Pour surmonter le faible rendement en détachement, d'autres méthodes ont été adoptées comme la sonication en s'assurant qu'elle ne tue pas elle-même des bactéries en présence ni leur croissance sur boîte de milieu gélosé. (**Bouza et al., 2005 ; Widmer et Frei, 2003**). De plus une partie des bactéries peut parfois en biofilm être sous une forme dormante ou VBNC (viable mais non cultivable), qui ne sera pas prise en compte dans l'énumération des bactéries par UFC. Enfin, du fait de nombreuses étapes de resuspension, décollement, dilution et culture sur boîte, les numérisations des UFC peuvent montrer une valeur d'écart type très élevée.

Test au Bleu de 1,9-diméthylméthylène (DMMB) : Il s'agit d'un test colorimétrique utilisé pour quantifier spécifiquement le biofilm issu de *Staphylococcus aureus* en utilisant le bleu de 1,9-diméthylméthylène (DMMB) (**Toté et al., 2008**). En bref, cette méthode tient compte du fait que le constituant principal d'EPS des biofilms de *S. aureus* est le polysaccharide intercellulaire (PIA), composé de N-acétylglucosamine lié à la poly- β -1,6 (**Götz, 2002**). Le PIA a donc été considéré par certains auteurs comme une cible logique pour la détection du biofilm de *S. aureus*. Compte tenu du fait que le colorant cationique DMMB est couramment utilisé pour détecter spécifiquement les glycosaminoglycanes (GAG) dans les échantillons biologiques (**Barbosa et al., 2003**) et compte tenu de la similarité structurelle entre PIA et GAG, le DMMB a été utilisé pour la détection spécifique des EPS des biofilms de *S. aureus*. Après complexation de DMMB avec des polysaccharides du biofilm de *S. aureus*, la quantité de colorant DMMB libérée après solubilisation peut être quantifiée de manière spectrophotométrique, donnant une information sur la quantité de matrice produite par la bactérie. Cette méthode est facile à réaliser, économique et nécessite peu de temps d'exécution. La principale limitation de cette méthode semble être qu'elle est limitée aux rares espèces bactériennes (c'est-à-dire certains *S. aureus*) possédant du PIA dans la matrice du biofilm. De plus, ce test fournit des informations médiocres et inexacts sur la quantité de bactéries vivantes. Pour

surmonter cette dernière limite, les auteurs proposent de combiner le test DMMB décrit avec une expérience complémentaire utilisant la résazurine (test décrit ci-après) pour déterminer le nombre de bactéries viables dans le biofilm, rendant ainsi le test plus complexe et plus long (Toté et al., 2008).

Test LIVE / DEAD : cette méthode repose sur l'utilisation de deux colorants différents pour la liaison aux acides nucléiques. Le premier colorant est le Syto9 (488 nm), capable de traverser toutes les membranes bactériennes et de se lier à l'ADN des bactéries à Gram négatif. Le deuxième colorant est l'iodure de propidium qui ne traverse que les membranes bactériennes endommagées. Les échantillons sont observés entre lame et lamelle en utilisant une microscopie à EPI fluorescence pour évaluer la population bactérienne vivante et morte. Le principal inconvénient de cette méthode est la nécessité d'observer une partie de l'échantillon statistiquement pertinente, représentative de la population totale. En tout état de cause, comme il est impossible de compter la totalité des cellules bactériennes, la méthode ne fournit que des résultats semi-quantitatifs (Boulos et al., 1999 ; Jin et al., 2005).

Dosage à la Fluorescéine di-acétate (FDA). Cette technique utilise un marqueur incolore et soluble dans la membrane cellulaire, la fluorescéine-di-acétate (FDA). Après son passage à travers la membrane bactérienne, la FDA est hydrolysée (à l'intérieur de la cellule) par les estérases cellulaires en fluorescéine qui fluoresce dans le jaune. Le signal peut être mesuré par spectrophotométrie. Les cellules mortes ne sont pas capables de métaboliser la FDA, de sorte qu'il n'y a pas de signal fluorescent. Cette méthode a été utilisée pour quantifier la croissance du biofilm *Candida albicans* à la surface des disques en silicone. La fluorescence de *C. albicans* a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques équipé de filtres d'excitation et d'émission de 486 nm et 535 nm, respectivement (Honraet et al., 2005 ; Tawakoli et al., 2012). Bien que facile à réaliser et peu coûteuse, cette méthode présente un champ d'examen limité du fait de l'épaisseur

du biofilm mature. Elle ne présente que des résultats semi-quantitatifs car la fluorescéine ne pouvant totalement traverser la matrice du biofilm (**Tawakoli et al., 2012**).

2-1.1.2 Tests métaboliques

Test à la résazurine : la résazurine (7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one-10-oxyde) est un colorant qui n'endommage pas les cellules vivantes. La résazurine bleue est non fluorescente, et est également connue sous le nom de bleu Alamar, elle peut être réduite par l'activité métabolique cellulaire et convertie en résorufine qui est un composé rose fluorescent (processus irréversible) pour atteindre un état incolore complètement réduit toujours sous l'action des cellules vivantes (processus réversible). La résorufine rose-fluorescente peut être mesurée par spectrophotométrie. Dans de nombreuses études sur les antimicrobiens, la résazurine a été utilisée pour détecter ces microorganismes et pour quantifier la proportion de cellules viables dans le biofilm (**Punithavathy et al., 2012 ; Peeters et al., 2008**). Cependant, certaines limitations doivent être prises en compte. Ce test est très sensible à l'efficacité respiratoire bactérienne, elle-même liée à la phase de croissance, à l'âge et à l'épaisseur du biofilm microbien. De plus, le temps de réduction de la résazurine étant lié à l'espèce et à la souche, certaines conditions expérimentales sont difficiles à normaliser. Une diminution de la réduction de la résazurine a été décrite en présence de composés antibactériens, réduisant ainsi la fiabilité de cette méthode dans les recherches sur les biofilms (**Mariscal et al., 2009 ; Sandberg et al., 2009 ; Skogman et al., 2012**)

Test au 2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5-phénylamino carbonyl - Sel d'hydroxyde tétrazolium (XTT) : Comme décrit ci-dessus pour le dosage de la résazurine, cette méthode implique également l'utilisation d'un indicateur redox pour dénombrer les cellules viables sur le plan spectrophotométrique dans le biofilm. En bref, cette méthode repose sur le fait que le métabolisme respiratoire microbien des cellules viables est capable de

réduire le 2,3-bis (2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5-[(phénylamino) carbonyl] - Sel d'hydroxyde de tétrazolium 2H (XTT) à un formazan soluble dans l'eau. Le nombre de bactéries viables dans le biofilm peut être déduit de la mesure de l'absorbance du surnageant après la réduction métabolique du XTT (**Adam et al., 2002**). Les principales limites de cette méthode sont liées à la complexité et à l'hétérogénéité de la structure et de la composition du biofilm montrant un métabolisme à différents gradients et à la prédisposition du biofilm mature à ralentir ou partiellement conserver la réduction et la libération de XTT et de formazan, respectivement (**Honraet et al., 2005**).

2-1.1.3 Tests moléculaires

Test PCR et qRT-PCR : la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est largement utilisée comme méthode de diagnostic. Cette méthode permet d'identifier efficacement la présence de séquences génétiques spécifiques liées à des espèces bactériennes individuelles, y compris lorsqu'elles sont en biofilm. Néanmoins, la PCR et la qPCR en tant que telles ne conviennent pas aux études quantitatives du biofilm et, étant donné qu'elles amplifient indifféremment l'ADN des cellules viables et des cellules mortes elles ne peuvent pas être utilisées pour le dénombrement des cellules vivantes. Pour surmonter ces problèmes, une transcription inverse en temps réel PCR (PCR en temps réel) a été adoptée. La qRT-PCR est l'une des techniques d'analyse génique les plus puissantes et les plus sensibles actuellement disponibles. Alors que dans l'analyse PCR traditionnelle, les résultats sont collectés à la fin de la réaction, lors du qRT-PCR, le signal fluorescent est mesuré en temps réel à chaque cycle d'amplification et est directement proportionnel au nombre d'amplicons générés. De plus, comme la PCR amplifie tous les ADN présents dans l'échantillon, l'ARNm bactérien qRT-PCR, présentant une courte durée de vie, a été proposé comme indicateur prometteur de la viabilité cellulaire (**Sheridan et al., 1998**) afin de quantifier un microorganisme spécifique dans le biofilm (**Warwick et al., 2004 ; Guilbaud et al., 2005**). Cependant, une méthode plus récente, a permis de détecter *Legionella*

pneumophila. Cette méthode se base sur la détection de la région précurseur de la séquence de l'ARNr 16S de *L. pneumophila* à l'aide de sondes spécifiques. En plus de l'amplification de la région ARNr 16s, une détection par q-PCR *L. pneumophila* à partir d'extraits d'ARN, a été possible (Boss et al., 2018)

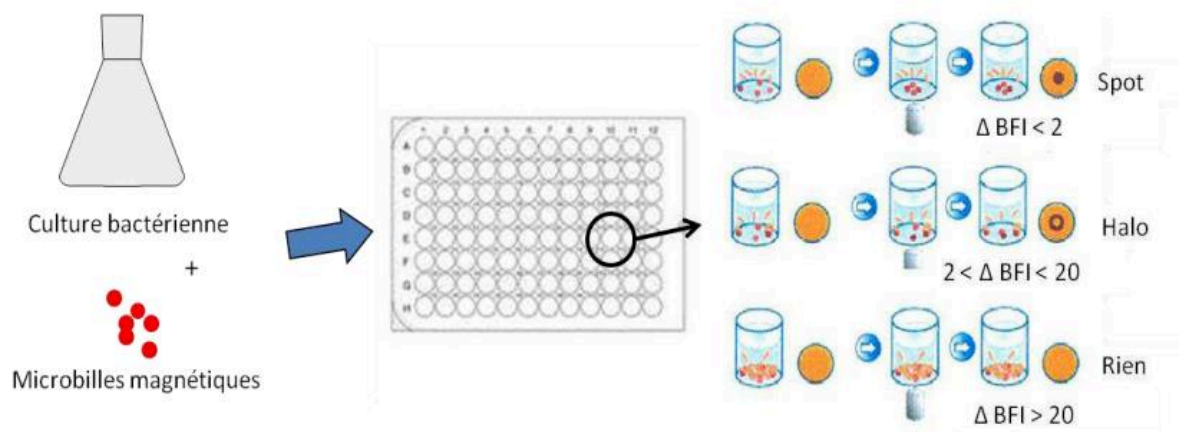
Les inconvénients de cette méthode sont liés à la préparation des échantillons qui doivent être exempts de contaminants et / ou d'inhibiteurs de PCR et au choix de la séquence d'amorces pour surmonter l'amplification de la séquence génique non fonctionnelle aux fins de l'enquête. L'autre limitation de cette méthode est due aux coûts élevés et à la difficulté d'exécution, nécessitant un équipement scientifique coûteux et un personnel technique qualifié.

Test à l'hybridation par fluorescence in situ (FISH) : la technique d'hybridation par fluorescence in situ (FISH) est une approche utilisant des sondes oligonucléotidiques marquées par des marqueurs fluorescents. Ces sondes peuvent être spécifiquement conçues pour lier le gène de l'ARNr, particulièrement abondant dans les cellules viables ou pour lier une molécule représentative d'une cible d'intérêt spécifique. Grâce à l'approche génétique, cette méthode peut également être adoptée pour des études sur le biofilm multi-espèces. Il convient de noter que l'approche FISH peut détecter des bactéries ou des bactéries viables mais non cultivables (VNBC) présentant un faible métabolisme (dormant) dans le biofilm. En combinant la technique FISH avec la microscopie confocale à balayage laser, il est possible d'identifier et de visualiser topographiquement différentes espèces dans un biofilm multispécifique. Les principales limites sont liées à la procédure de préparation complexe et au fait que la technique prend du temps et est coûteuse (Thurnheer et al., 2004 ; Machado et al., 2012). De plus, cette technique fournit des résultats de haute qualité.

2-1.1.4 Test magnétique

Une technique de quantification de biofilm, le Biofilm Ring Test[®] (BFRT[®]) a été mise au point sur la base de la mobilité de microbilles magnétiques ajoutées

au sein de la matrice des biofilms (**Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Chavant *et al.*, 2007**). Le BFRT® permet d'évaluer la quantité de biofilm bactérien formé en microplaques en mesurant la mobilité des microbilles après aimantation du centre du puits de la microplaque. En absence de biofilm, les microbilles sous l'influence du champ magnétique migrent au centre du puits et forment un spot foncé. S'il y a formation d'un biofilm, les microbilles sont piégées dans la matrice extracellulaire et ne peuvent pas migrer au centre du puits lors de l'aimantation. Pour obtenir une mesure quantitative de la migration concentrique des microbilles, les microplaques sont scannées avec un lecteur développé par Biofilm Control®.



Source : (**Briand-jaisson *et al.*, 2014**)

Figure 4 : Représentation schématique du test de quantification du biofilm par la technique du BFRT. L'absorbance à 600 nm d'une culture bactérienne en début de phase stationnaire a été ajustée à 1 puis la culture a été diluée au 1/250ème dans du milieu contenant 0,004 % (v/v) de Tween® 20 et 10 µL/mL de solution de microbilles (TON006N) vendues spécifiquement pour ce test. Ensuite, 200 µL de cette suspension ont été déposés dans les puits de barrettes spécifiques puis incubés 24 h, 48 h ou 72 h à 20°C, sans agitation. Les résultats ont été exprimés en Index de Formation de Biofilm (Δ BFI). (**Briand-jaisson *et al.*, 2014**).

2-1.1.5 Test radioactif

C'est une méthode de quantification de biofilm ou de l'activité métabolique des bactéries du biofilm en microplaque, basée sur l'incorporation de substances radioactives, telles que la [^{14}C] leucine ou la [^3H] thymidine. L'utilisation d'un radiotraceur par les bactéries donne en effet une idée sur leur activité métabolique, ce qui se traduit par un marquage des bactéries elles-mêmes. Des trois méthodes précitées, **Vesterlund *et al.*, 2005** ont montré qu'elle était la plus sensible.

2-1.2 Techniques physiques de détection et quantification des biofilms

Test Désorption-Electro-Pulvérisation-Ionisation (DESI) et la spectrométrie de masse (SM) : La SM est une technique analytique puissante utilisée pour quantifier les matériaux connus et révéler les propriétés chimiques de différentes molécules. Dans cette méthode, la substance à étudier est traversée par un faisceau d'électrons de sorte que toutes les molécules sont ionisées avec la production d'ions gazeux. Les ions sont ensuite séparés dans le spectromètre de masse et sont caractérisés par leurs rapports masse / charge et leurs abondances relatives. Les données fournissent un spectre de masse typique de chaque composé car il est directement lié à sa structure chimique. Cette technique a des chances qualitatives et quantitatives de pouvoir identifier et quantifier des composés inconnus. Pour surmonter ce problème, la SM est couplée à la DESI. L'analyse par spectrométrie DESI est effectuée à la pression atmosphérique et l'échantillon est maintenu dans les conditions ambiantes (**Machado *et al.*, 2012 ; Song *et al.*, 2009**). C'est une analyse non destructive d'échantillons complexes permettant la caractérisation chimique du biofilm microbien dans différents états et conditions de croissance (**Sauer *et al.*, 2002**). Cependant, les méthodes SM et DESI sont des méthodes coûteuses et chronophages et nécessitent un équipement de pointe ainsi qu'un personnel qualifié.

2-1.3 Techniques microscopiques de détection et quantification des biofilms

Microscopie confocale-RAMAN (CRM) : en spectroscopie Raman, un faisceau laser électromagnétique de longueur d'onde connue atteint l'échantillon à analyser. En mesurant son rayonnement diffusé et le décalage d'énergie, on peut obtenir des informations sur les caractéristiques chimiques de l'échantillon (**Yuanqing et Tong, 2012**). En utilisant la spectroscopie Raman, des informations peuvent être acquises sur les empreintes chimiques de différents biofilms. Cependant, une enquête en profondeur dans l'épaisseur du biofilm est un défi difficile (**Yuanqing et Tong, 2012 ; Pätzold et al., 2006**). La principale limitation est liée à la mise en place de conditions expérimentales permettant d'obtenir des signaux de haute qualité.

Microscopies électroniques : la microscopie électronique tire parti de la résolution supérieure permise par l'utilisation d'un faisceau d'électrons, c'est-à-dire de longueur d'onde courte et rayonnement de haute énergie. La microscopie électronique à transmission (TEM) montre une capacité unique d'imagerie de l'intérieur des biofilms et des caractéristiques intracellulaires, mais nécessite que l'échantillon soit préparé sous forme de tranches ultra-minces (**Ridgway et al., 1983 ; Allan-Wojtas et al., 2010**). Inversement, la microscopie électronique à balayage (MEB) a été largement utilisée pour visualiser la surface des microcolonies dans les biofilms (**Maclean et al., 2008 ; Alhede et al., 2012**). De plus, la MEB peut être utilisée en synergie avec le faisceau ionique focalisé (FIB). Ce dernier permettant le broyage de certaines zones de l'échantillon, cela permet d'étudier l'intérieur des biofilms en enlevant les couches superficielles exposées et/ou en coupant les sections (**Maclean et al., 2008, Wallace et al., 2011**). De plus, la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX) permet d'acquérir des spectres de composition locaux et des cartes de cellules bactériennes et de biofilms (**Ridgway et al., 1983 ; Shiekh et al., 2006**). La principale limitation de la MEB réside dans la nécessité de préparer des

échantillons fastidieux pour déshydrater et les rendre appropriés aux opérations sous vide. Dans ce cas, l'échantillon peut être rapidement congelé de sorte que les structures bactériennes vulnérables soient préservées (**Karcz et al., 2012**).

Microscopie aux rayons X (XM) : l'échantillon est illuminé par un rayonnement doux focalisé aux rayons X, mono- ou poly-chromatique. Il a été prouvé que différents XM permettent une imagerie à haute résolution et une cartographie de la composition d'échantillons biologiques sans préparation spécifique et avec des dommages de rayonnement réduits par rapport à la XM. En particulier, la microscopie à rayons X à transmission par balayage (STXM) a été largement utilisée pour étudier la composition des cellules bactériennes et des biofilms avec une résolution nominale de 25 nm (**Maclea et al., 2008**). La STXM peut également fonctionner en synergie avec d'autres méthodes basées sur les rayons X, telles que la fluorescence des rayons X. En particulier, ces deux techniques ont été utilisées récemment pour détecter l'arsenic dans des bactéries d'eau douce oxydant le Fe (II) (**Hitchcock et al., 2012**). De toute évidence, le besoin d'instruments complexes et coûteux représente la limite majeure à la diffusion des techniques

Microscopie à sonde et balayage : la topographie de l'échantillon est reconstruite en analysant le signal provenant d'une sonde tranchante à dimension nanométrique, qui analyse l'échantillon à proximité de sa surface. Parmi les techniques SPM (scanning probe microscopy), la microscopie à force atomique (AFM) est la plus répandue pour la caractérisation d'échantillons microbiologiques tels que les cellules bactériennes et les biofilms. L'AFM permet une haute résolution à l'échelle du nanomètre, une analyse non destructive, des opérations à la fois dans l'air et dans l'eau, et ne nécessite aucune préparation d'échantillons spécifique. En raison de ces caractéristiques, l'AFM a été utilisé pour visualiser la surface de bactéries et du biofilm (**Bolshakova et al., 2001**), ainsi que pour surveiller (également en temps réel) les processus liés à la

multiplication bactérienne (**Beech et al., 2002**), production EPS (**Pantanella et al., 2011**) et la prédation, par exemple, par *Bdellovibrio bacteriovorus* et *Escherichia coli* (**Nunez et al., 2003**).

2-2 Stratégies antifouling (AF)

2-2.1 Historiques et définitions

Les Phéniciens (1500–300 av. J.-C.) sont crédités de la première avancée sous la forme de feuilles de plomb et de cuivre pour empêcher la formation de biofilm bactérien sur leurs bateaux en bois (**WHOI, 1952**). Vers la fin du XVIIIe siècle et jusqu'au XIXe siècle, des revêtements contenant du cuivre, de l'arsenic et du mercure étaient de plus en plus utilisés sur les coques de navires (**WHOI, 1952**). Le cuivre était un biocide efficace et largement utilisé, mais son efficacité était relativement courte, de sorte que le nettoyage et la réplication de la peinture étaient fréquents tous les dix-huit mois (**Dolmetsch et al., 1998**).

Ainsi, le principe des stratégies antifouling (AF) consiste à éliminer les organismes vivants qui se fixent sur les surfaces immergées grâce à la libération de substances nocives. La principale stratégie AF consiste en l'utilisation de revêtements afin d'empêcher la fixation des organismes marins sur les coques des navires. (**Dafforn et al., 2011**). Plusieurs approches AF utilisant divers types de biocides ont été développées jusqu'à ce jour, allant des composés chimiques, aux analogues synthétiques de molécules naturelles. L'utilisation généralisée des peintures AF à couvrir 70% de la flotte mondiale actuelle, a conduit à d'énormes retombées économiques (**Champ, 2003 ; Yebra et al., 2004**).

2-2.2 Utilisation des composés chimiques à caractère toxique

2-2.2.1 Tributylétain (TBT)

Avec la découverte de l'efficacité antifouling des TBT, le biofilm de la coque était considéré comme un problème du passé (**Minchin et Gollasch, 2003**). Le TBT a été utilisé pour la première fois dans les systèmes d'eau douce pour

éradiquer les mollusques abritant le ver parasite *Schistosoma*. A partir du début des années 1960, le TBT a été introduit comme biocide dans les peintures marines AF (Lewis, 1998). Initialement, le TBT était incorporé dans les peintures conventionnelles qui reposaient sur une lixiviation passive à partir d'une matrice soluble ou une lixiviation par contact pour libérer des substances toxiques de surface (Lewis, 1998). Les peintures classiques avaient une durée de vie limitée d'environ deux ans et ont été remplacées dans les années 1970 par des peintures autopolissantes (durée de vie > 5 ans). Dans les peintures SPC (Self Polishing Coating), le copolymère TBT fournit à la fois la matrice de biocide et de peinture, hydrolysant dans l'eau de mer pour libérer le TBT.

Les autorités ont pris conscience pour la première fois des problèmes liés au TBT au début des années 80, lorsque plusieurs exploitations ostréicoles en France ont connu des déclinés importants dûs à la réduction du développement larvaire et aux malformations de la carapace affectant 80 à 100% des huîtres (Alzieu et al., 1986). L'utilisation du TBT a ensuite été interdite sur les navires de moins de 25 mètres en France (Alzieu et al., 1986). Cette interdiction visait principalement les bateaux de plaisance car ils passaient de longues périodes dans des marinas fermées et étaient donc perçus comme le principal facteur de contamination par le TBT via le lessivage passif (Alzieu et al., 1986). Cela a entraîné des restrictions sur les petits navires au Royaume-Uni (1987), aux États-Unis (1988), au Canada (1989), en Australie (1989) et dans l'UE (1989). Les navires de commerce ont continué à utiliser le TBT, bien que ceux-ci soient généralement limités à l'utilisation de systèmes SPC à faible taux de libération de TBT. En novembre 2001, l'Organisation maritime internationale (OMI) a interdit l'application du TBT à tous les navires après le 1^{er} janvier 2003 et exigé son absence comme revêtement actif sur tous les navires après le 1^{er} janvier 2008 (OMI, 2001). Toutefois, certaines mesures d'anticipation ont été prises dans certaines régions de l'Union européenne aboutissant à l'interdiction de l'application des peintures au TBT à toutes sortes de navires. En Australie, l'enregistrement de toutes les

peintures antisalissures contenant du TBT en mars 2003 a été effectué. Il est probable que le TBT continue à être utilisé sur les navires nationaux dans les pays non signataires (**Antizar-Ladislao, 2008**).

2-2.2.2 Cuivre

Le cuivre a longtemps été utilisé, à la fois dans des peintures moins coûteuses pour les petites embarcations ou comme co-biocide pour améliorer les performances de certaines peintures au TBT (**Nichols, 1988 ; Young et al., 1979**). Après l'interdiction du TBT, le cuivre est devenu le biocide antisalissure prédominant, mais son utilisation dans les peintures AF est restée sous surveillance dans plusieurs pays. Des restrictions sur les taux de rejet de cuivre ont été introduites au Canada et au Danemark. Ainsi, le gouvernement Canadien exige via Santé Canada (une agence publique), que les peintures AF contenant du cuivre aient un taux de libération inférieur de 40lg / cm² / Jour (**HC, 1994**). Une autre stratégie a été de cibler des navires particuliers, des zones écologiquement sensibles ou des environnements contaminés par le cuivre. Les peintures AF contenant du cuivre ne sont plus utilisées sur les petits bateaux de la côte baltique de la Suède (**KEMI, 2006**). Les objectifs de réduction des contaminations au cuivre ont pu être fixés dans plusieurs marinas situées à San Diego et en Californie par exemple. Cette mesure d'interdiction du cuivre nécessitera une transition vers des produits moins toxiques (**California Regional Water Quality Control Board (CRWQCB), 2005 ; Carson et al., 2009**).

2-2.2.3 Biocides "Booster"

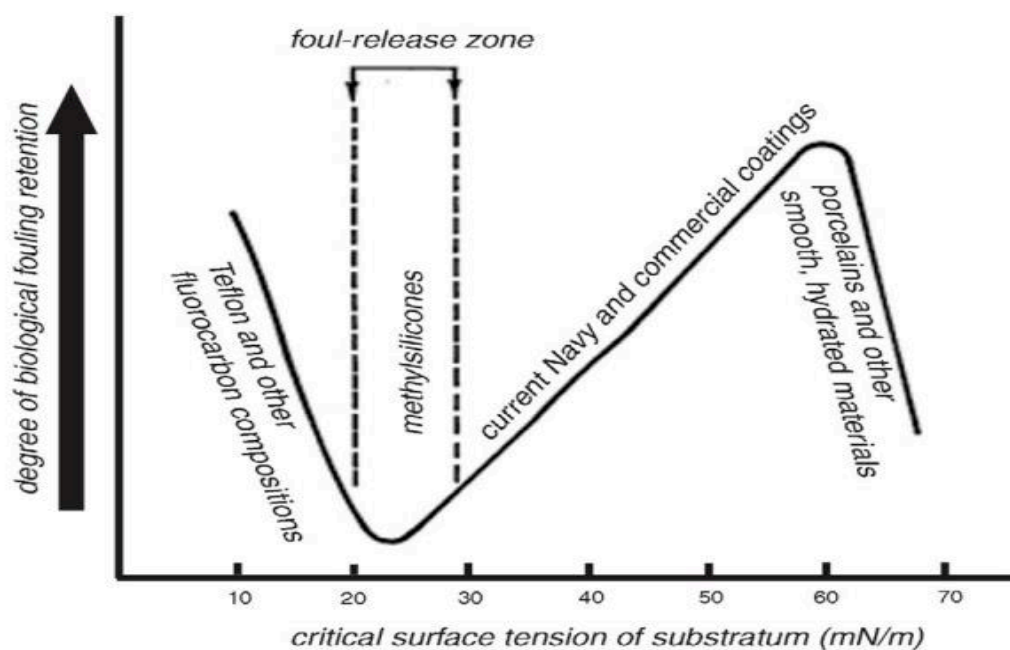
Malgré la forte toxicité du cuivre pour de nombreux organismes marins, certains groupes d'algues sont résistants (**Foster, 1977 ; Reed et Moffat, 1983**). Par conséquent, la plupart des peintures AF à base de cuivre sont enrichies de biocides supplémentaires pour cibler la colonisation de la coque par les micro- et macro-algues. Environ 18 sont actuellement utilisés dans le monde, notamment le chlorothalonil, le dichlofluanide, l'Irgarol, le Thiocyanatométhyl sulfirique

(TCMS), le thiocyanatométhylthio-benzothiazole (TCMTB), le diuron, la dichloro-octylisothiazoline (DCOIT, Sea Nine) et le zineb. (Boxall et al., 2000 ; Thomas, 2009 ; Voulvoulis et al., 1999). Ce sont souvent des herbicides (par exemple, Irgarol et diuron) qui ont des effets négatifs sur le taux de croissance des organismes photosynthétiques (Voulvoulis et al., 1999). La législation existe aujourd'hui dans certains pays pour réglementer l'utilisation de certains biocides « booster » dans les peintures AF, par exemple, le diuron et Irgarol.

2-2.3 Stratégies physico-chimiques selon Baier

La chimie de surface est un facteur important dans la formation, la stabilité et la libération des microorganismes adhérant aux surfaces. Les travaux de Baier à la fin des années 1960 ont mis en évidence une corrélation entre l'adhésion relative des organismes organisés en biofilm et l'énergie de la surface (Baier, 2006). La courbe de Baier (Figure 5), telle que cette relation est connue, a été confirmée dans plusieurs environnements marins et biomédicaux (Groupil et al., 1973). Une caractéristique clé de la courbe de Baier est qu'un biofilm minimal est généralement obtenu à une tension superficielle critique de 22-24 mN/m. Cette tension de surface, souvent appelée énergie de surface, est approximativement égale à la composante dispersive de l'eau. Dans un système aqueux, l'eau doit humidifier le système lorsque les protéines et les cellules sont éliminées. Pour les solides ayant une énergie de surface d'environ 22 mN/m, le coût thermodynamique de l'eau pour humidifier la surface est minimisé. L'un des moyens de faire varier systématiquement l'énergie de surface sans modifier le matériau consiste à utiliser une monocouche appelée « Self Assembled Monolayer (SAM) ». Les SAM sont des composés hydrophiles électriquement neutres permettant de résister à l'adsorption des protéines. Ces monocouches sont constituées de composés dipolaires de type poly-éthylène-glycol (PEG). La capacité de résistance à l'adsorption des protéines par les SAM est dépendante de leur longueur de chaîne et de la densité de surface (Ostuni et al., 2001). Bien que les énergies de surface pour le PEG et ses oligomères dépassent typiquement la

zone de faible adhésion cellulaire définie par Baier, il est largement reconnu que ces matériaux présentent une résistance à l'adsorption des protéines et au biofilm bactérien (Ekblad et al., 2008). Le mécanisme de résistance aux protéines du PEG de haut poids moléculaire est bien expliqué par la répulsion stérique (Jeon et al., 1991). La déshydratation du PEG est thermodynamiquement défavorable car elle conduit à un confinement des chaînes polymères qui présentaient auparavant une entropie élevée. Enfin, la conformation de la chaîne des SAM affecte la pénétration de l'eau dans la surface du SAM et est également un déterminant important de la résistance à l'adsorption des protéines (Balamurugan et al., 2005). (Figure 5).



Source : (Baier, 2006)

Figure 5 : Courbe de Baier démontrant l'importance relative du biofilm biologique par rapport à la tension superficielle critique du substrat.

2-2.4 Stratégies enzymatiques

La littérature sur les enzymes pour les applications antifouling peut être divisée en deux catégories. Un groupe se concentre sur la protection générale des surfaces contre le biofilm formé par des organismes de toute nature. Les enzymes mentionnées dans cette catégorie de sources sont censées avoir une activité antisalissure et pourraient avoir une activité contre les organismes macroscopiques et microscopiques. L'autre groupe de sources se concentre plus étroitement sur la prévention de la formation de biofilm et ces enzymes ciblent donc les micro-organismes. Dans le **tableau 1**, la distinction entre l'activité antifouling et la prévention du biofilm est utilisée pour organiser les informations sur les différents types d'enzymes proposés pour prévenir le bio-encrassement. Les deux catégories se concentrent sur la protection des surfaces et les références qui ne concernent pas le recouvrement de surface ont donc été omises. En outre, les enzymes revendiquées comme ayant une activité étroite de prévention de l'encrassement microbien sont souvent mentionnées dans d'autres sources pour avoir une activité antisalissure large. Dans le **tableau 1**, les enzymes ont été triées en fonction de leur numéro de classification enzymatique (numéro CE), ce qui est lié aux activités catalytiques similaires de diverses enzymes (**Moss et al., 2006**). Notez que les allégations d'activité antisalissure ou de prévention du biofilm ont été énoncées pour toutes les classes de fonctionnalité enzymatique. Les sections suivantes exploreront le support théorique et empirique de ces revendications. La classe enzymatique 1 (CE 1) couvre la catalyse de l'oxydation ou de la réduction. Par conséquent, ces enzymes sont collectivement appelées oxydoréductases (**Hamade et al., 1998**).

Tableau 1 : Quelques enzymes utilisées dans la lutte contre les biofilms et/ou biofouling

Enzymes	Application	Références
Oxidoreductases	Biofouling Biofilm	(Hamade <i>et al.</i> , 1998) (Johansen, 2000)
Oxidases (Avec l'Oxygène comme accepteur)	Biofouling Biofilm	(Huijs et Klijnsstra, 2006) (Johansen <i>et al.</i> , 1997)
Peroxydases	Biofouling Biofilm	(Harvey <i>et al.</i> , 1995) (Johansen, 2000)
Tranferases	Biofouling	(Hamade <i>et al.</i> , 1998)
Transaminases	Biofilm	(Barton <i>et al.</i> , 2004)
Hydrolases	Biofouling Biofilm	(Hamade <i>et al.</i> , 1998) (Johansen, 2000)
Esterases	Biofilm	(Marion <i>et al.</i> , 2005)
Phospho-monoester hydrolases, Phosphatases	Biofilm	(Allermann et Schneider, 2001)
Glycosylases	Biofilm	(Johansen, 2000)
Aminopeptidases	Biofouling Biofilm	(Pettitt <i>et al.</i> , 2004) (Leroy <i>et al.</i> , 2008)
Carboxypeptidases	Biofouling	(Bonaventura <i>et al.</i> , 1999)
Endopeptidase, proteases	Biofouling	(Asuri <i>et al.</i> , 2007)
Lyases	Biofouling	(Manyak <i>et al.</i> , 2005)
Isomereses	Biofouling	(Hamade <i>et al.</i> , 1998)
Ligases	Biofouling	(Hamade <i>et al.</i> , 1998)

2-2.5 Nouvelles approches antifouling basées sur les stratégies respectueuses de l'environnement

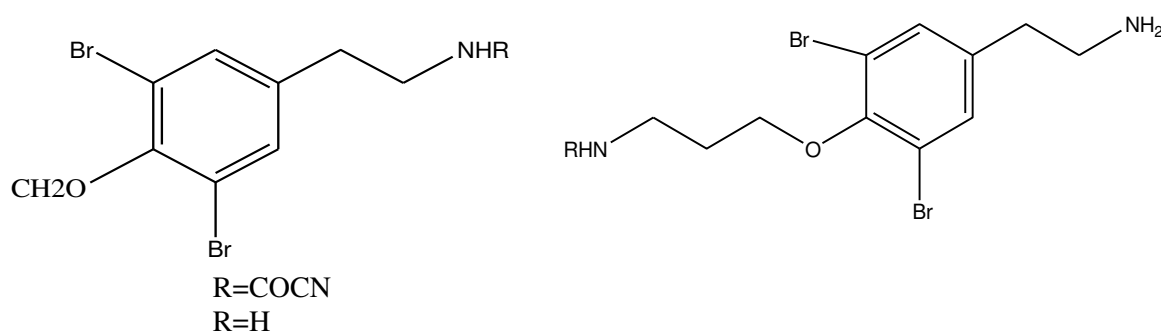
2-2.5.1 Démarches biométriques

Les revêtements antifouling utilisés jusque-là, généraient encore des taux élevés de pollution dans le milieu marin. Dans ce contexte, l'organisation maritime internationale (International Maritime Organization (IMO)) a décidé d'interdire l'application de revêtements à base de TBTO à partir de 2003. En 2008,

l'interdiction devient totale, aucun navire possédant un revêtement de ce type n'est autorisé à circuler. De nombreuses recherches sont donc axées sur des nouvelles solutions afin de concevoir des alternatives antifouling respectueuses de l'environnement. La nouvelle stratégie AF à adopter devrait être conforme aux critères de l'OMI (large spectre d'activité, faible toxicité pour les mammifères, faible solubilité dans l'eau, absence de bioaccumulation dans le réseau trophique et de persistance dans l'environnement, compatibilité avec les matrices des revêtements et rapport qualité/prix favorable). En outre, les nouvelles orientations de la recherche sur cette stratégie antifouling s'activent à mettre un important lien entre l'industrie, l'écologie et la gestion de l'environnement (**Richards et al., 2009**).

Des activités antifouling et/ou anti-biofilm ont été démontrées chez de nombreux organismes marins microscopiques (bactéries, champignons) et macroscopiques (algues, éponges, coraux, gorgones). En effet, de nombreuses substances aux propriétés antifouling ont été extraites de divers organismes marins. Après caractérisations, certaines de ces substances ont démontré de faibles toxicités et de hauts ratios thérapeutiques, ce qui les positionne comme de bons composés antifouling. En outre, le milieu marin est riche en espèces non encore explorées (estimées à 1-2 millions) qui peuvent être de nouvelles sources pour la découverte d'autres substances biologiquement intéressantes. Par exemple, les éponges marines offrent un grand potentiel dans la recherche de composés antifouling, car plusieurs recherches ont montré des propriétés très intéressantes des dérivés de ces organismes marins (**Hattori et al., 1998 ; Fusetani, 2004 ; Dobretsov et al., 2004 ; Ortlepp et al., 2007 ; Qiu et al., 2008 ; Limna et al., 2009 ; Hertiani et al., 2010 ; Blihoghe et al., 2011 ; Wright et al., 2011 ; Wu et al., 2012 et Xu et al., 2012**). Ces composés sont repartis en plusieurs groupes dont quelques uns sont énumérés ci-dessous :

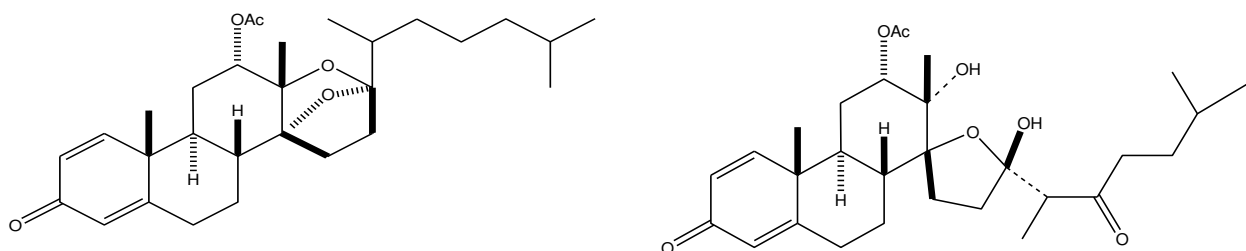
Dérivés bromotyrosines : Les métabolites dérivés de la bromotyrosine sont souvent présents dans les éponges marines des familles des aplysinidés et des pseudocératinidés, en particulier *Pseudoceratina* (= *Psammaplysilla*) *purpurea*. Parmi les six bromotyrosines antisalissures isolées à partir de *P. purpurea* collectées à différents endroits au Japon, la cératinamine (**Pick et al., 2006**), qui contient une fonctionnalité cyanoformamide, sans précédent dans les produits naturels, est particulièrement intéressante. Elle a montré une puissante activité antifouling contre des organismes marins avec une valeur de CE₅₀ de 5,0 µg/mL. Les cératinamides A (**Ullah et al., 2009**) et B (**Nicholas et al., 2002**) et la psammaplysine A (**Alzieu et al., 1986**) ont présenté une activité plus puissante avec des valeurs de concentrations efficaces médianes (CE₅₀) de 0,10, 2,40 et 0,27 µg/mL, respectivement. Quelques analogues sont présentés sur le **Schema 1**.



Schema 1 : Dérivés bromotyrosines

Terpénoïdes : les éponges marines des familles Axinellidae et Dictyonellidae produisent des sesquiterpènes et des diterpènes contenant des fonctionnalités isocyano, isothiocyano, thiocyano et formamide, exerçant de nombreuses activités biologiques, antifongiques, cytotoxiques, ichtyotoxiques et antipaludiques. Cependant, aucune activité antifouling n'a été signalée jusqu'à ce que certain nombre d'isocyanotépénoïdes et de composés apparentés provenant principalement de l'éponge marine *Acanthella cavernosa* et des nudibranches du genre *Phyllidia* soient isolés (**Schéma 2**). Les terpénoïdes, particulièrement importants, sont le kalihinène (**Tsukamoto et al., 1996**), le kalihipyran (**Fusetani,**

2004), le 15-formamidokalihinéne (**Fusetani, 2011**) et le 10 β formamidokalihinol A (**Sipkema et al., 2005**) qui inhibent tous le biofouling à des concentrations inférieures à 0,1 $\mu\text{g/mL}$, alors que leur toxicité vis-à-vis de la plupart des organismes marins était très faible du point de vue de dose létale médiane ($\text{DL}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).



Schema 2 : Dérivés stéroïdes

Stéroïdes : trois D-sécostéroïdes (Schéma 3), isolés d'un corail mou japonais *Dendronephthya sp.* ont montré une puissante activité antifouling contre les cyprides de type B. amphitrite ($\text{IC}_{50} 2,2 \mu\text{g/mL} \pm 1$). Ces composés ont également inhibé le développement des larves présentes dans diverses espèces d'éponges marines avec une concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) = 5,0 $\mu\text{g/mL}$ (**Trepos et al., 2014**).

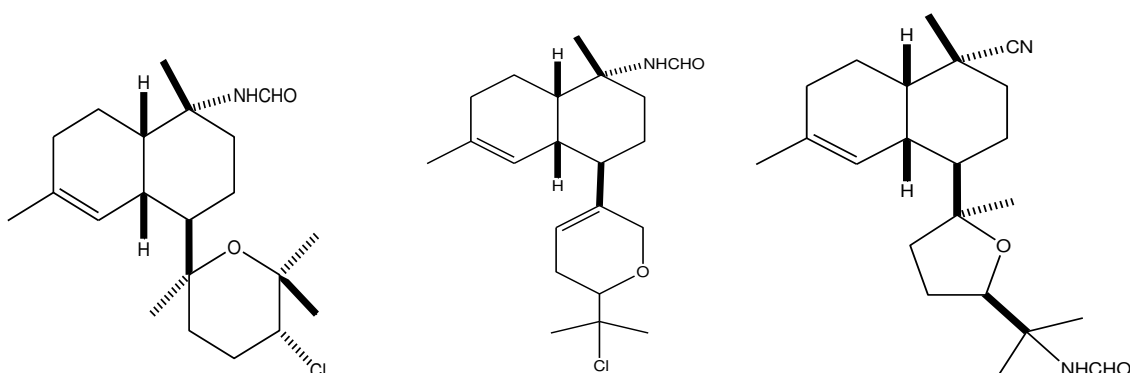


Schéma 3 : Dérivés terpénoïdes

Autres dérivés antifouling : les organismes marins possèdent des molécules actives ayant des propriétés diverses. Dans un objectif de défense ou de compétition entre les organismes, certains composés sont métabolisés donnant

ainsi des dérivés capables de lutter contre le biofouling et/ou le biofilm. Ainsi, les tests antifouling réalisés sur ces molécules portent sur différents organismes cibles des bactéries, des micro- et macroalgues et des invertébrés (balanes, moules, bryozoaires, etc) représentant un large panel des espèces impliquées dans le processus de biofouling en milieu marin. Les composés répertoriés ici pour leur activité antifouling témoignent d'une grande diversité chimique : ce sont des terpènes (sesquiterpènes, diterpènes, méroditerpènes), des composés aromatiques, des dérivés lipidiques, des composés halogénés, des oses ou des alcaloïdes. Des exemples ont été répertoriés dans le **tableau 2** ci-dessous :

Tableau 2 : Composés antifouling issus d'organismes marins

Organismes	Composés	Cibles	Activités testées	Références
<i>Delisea pulchra</i>	Furanones halogénées (fimbrolidés)	Bactérie marine <i>Ulva lactuca</i> <i>Balamus amphitrite</i>	Inhibition de croissance Inhibition de l'adhésion et de la germination Anti-adhésion	(Paul et al., 1987)
<i>Caulerpa flexilis</i>	Flexiline	Bactérie marine et champignon	Inhibition de croissance	(Paul et al., 1987)
<i>Zostera sp</i> (plante aquatique)	Acide zosterique	<i>Pseudomonas</i> <i>putrida</i> Bactérie du lac Erié	Anti-adhésion	(Newby et al., 2006) (Xu et al., 2005)
<i>Agelas sp</i> (éponge)	Dérivé de l'oroïdine	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Inhibition de la formation du biofilm	(Huigens et al., 2007) (Richards et al., 2009)
<i>Agelas sp</i>	Dérivés de l'oroïdine	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> <i>Acinetobacter</i> <i>baumanii</i>	antibiofilm	(Ballard et al., 2009) (Ballard et al., 2008)
<i>Delisea pulchra</i> (alque rouge)	Furanones halogénées	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	Inhibition du quorum sensing	(Hentzer et al., 2002)
<i>Erylus formosus</i> et <i>Ectyoplasia ferox</i> (éponges)	Triterpènes glycosylés	Bactérie marine	Anti-adhésion	(Kubaneck et al., 2002)

2-2.5.2 Activités AF des bactéries

Certaines bactéries marines sont des agents prometteurs car elles peuvent elles-mêmes produire des agents antifoulings. Par exemple, des chercheurs ont identifié les bactéries cultivables ayant une activité antifouling (AF) associée à l'éponge *Aplysina gerardogreeni*. Les résultats ont montré que 87% des extraits bactériens étaient actifs contre les microfoulers testés. Seize d'entre eux peuvent être considérés comme possédant un potentiel antifouling et appartiennent aux genres *Bacillus*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Pseudobacter*, *Pseudovibrio*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus* et *Terribacillus*. (Hentschel et al., 2003 ; Usher et al., 2004; Erwin et al., 2011 ; Vasundhara et al. , 2012 ; Satheesh et al., 2012 et Papaleo et al., 2012).

3- Quorum sensing

3.1-Définitions

Malgré leur nature unicellulaire, les bactéries peuvent communiquer les unes avec les autres au moyen de la détection du quorum. Le processus se produit lorsque des molécules de signal appelées autoinducteurs, sont sécrétées et s'accumulent au sein d'une communauté bactérienne (**Waters et Bassler, 2005**). Ce mode de communication bactérienne est appelé quorum sensing (QS). Les autoinducteurs sont produits en phase de croissance bactérienne. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, ces autoinducteurs interagissent avec un régulateur transcriptionnel, permettant l'expression spécifique, en réponse à une forte concentration de cet autoinducteur, d'un groupe de gènes. Les déterminants génétiques du QS sont organisés en un réseau de régulation complexe incluant un spectre de régulateurs transcriptionnels et post-transcriptionnels qui affectent la synthèse de l'autoinducteur AHL. Des facteurs autres que la densité bactérienne, affectent la production et l'accumulation d'AHL (**Max et al., 2003**).

3-2 Auto-induction

3-2.1 Notion d'autoinducteurs

La notion d'autoinducteurs (petites molécules diffusibles induisant, en fonction de leur concentration qui reflète la concentration bactérienne l'expression de certains gènes) a été introduite par **Kaplan et Greenberg en 1985** dans le modèle de régulation de la luminescence chez *Vibrio fischeri* renommée *Aliivibrio fischeri* (**Urbanczyk et al., 2007**). Ce modèle de régulation a maintenant été étendu à une centaine d'espèces bactériennes, y compris chez les Archaea (**Kaplan et Greenberg, 1985**).

Outres les AHLs considérés comme faisant partie des autoinducteurs de type 1 (AI-1), il existe d'autres groupes de petites molécules impliqués dans le QS bactérien. Il s'agit des autoinducteurs-2 (AI-2) et des autoinducteurs-peptidiques (AIP). Selon les différentes voies de synthèses des molécules autoinductrices, les

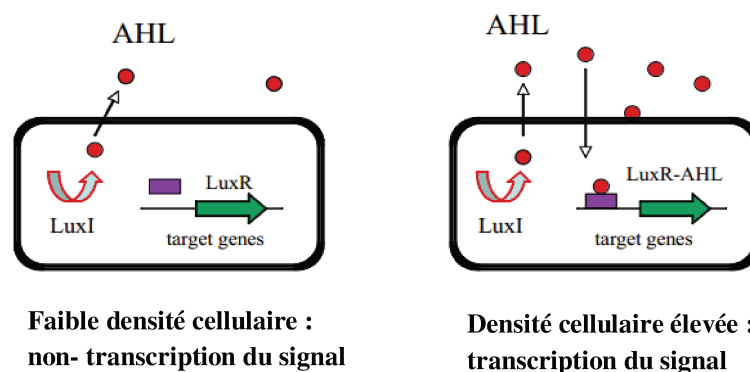
bactéries génèrent différents AI pour remplir leurs fonctions de régulation dépendantes du QS (Williams, 2007).

3-2.2 Les différents types d'autoinducteurs

3-2.2.1 Les acyl homosérines lactones (AHL)

a- Définitions et structures

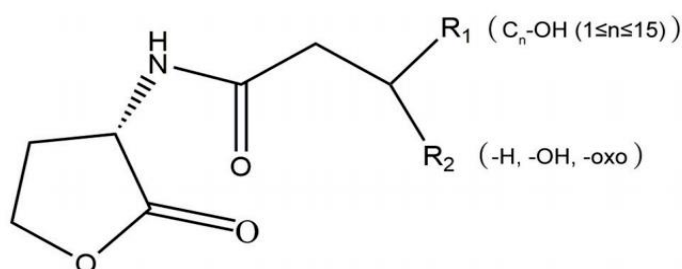
Un mécanisme de QS dépendant d'AHL a été décrit pour la première fois chez le vibrion marin *Vibrio fischeri* où il contrôle la bioluminescence en fonction de la densité de la population bactérienne (Nealson et al., 1970). Les AHLs sont des petites molécules détectant le quorum générées et libérées dans l'environnement par des bactéries à Gram négatif (Figure 6). Ceux-ci jouent un rôle crucial dans divers processus biologiques liés aux infections chez les bactéries gram négatifs, notamment la survie, la colonisation, l'invasion et la pathogénéicité (Liu et al., 2018).



Source : (Fuqua et Greenberg, 2002).

Figure 6 : Détection de quorum de type LuxI / LuxR dans les bactéries à Gram négatif. La protéine de type LuxI est une auto-synthase qui catalyse la formation d'une acyl-homosérine lactone (AHL). La AHL diffuse librement à travers la membrane cellulaire à haute densité cellulaire. Le LuxR est un régulateur transcriptionnel qui se lie à la AHL diffusante et active à son tour la transcription de ses gènes cibles (Fuqua et Greenberg, 2002).

Les AHLs sont un groupe de petites molécules amphipathiques (**Figure 7**) et leur structure commune est constituée d'un cycle hydrophile homosérine lactone et d'une chaîne latérale acyle hydrophobe (**O'Connor et al., 2015**). Les différences dans les structures moléculaires dépendent du nombre de carbone (4-18), du groupe substituant sur le troisième carbone (-H, -OH ou -oxo) et de la présence ou de l'absence de doubles liaisons non saturées dans les chaînes latérales acyles (**Kumari et al., 2006**)



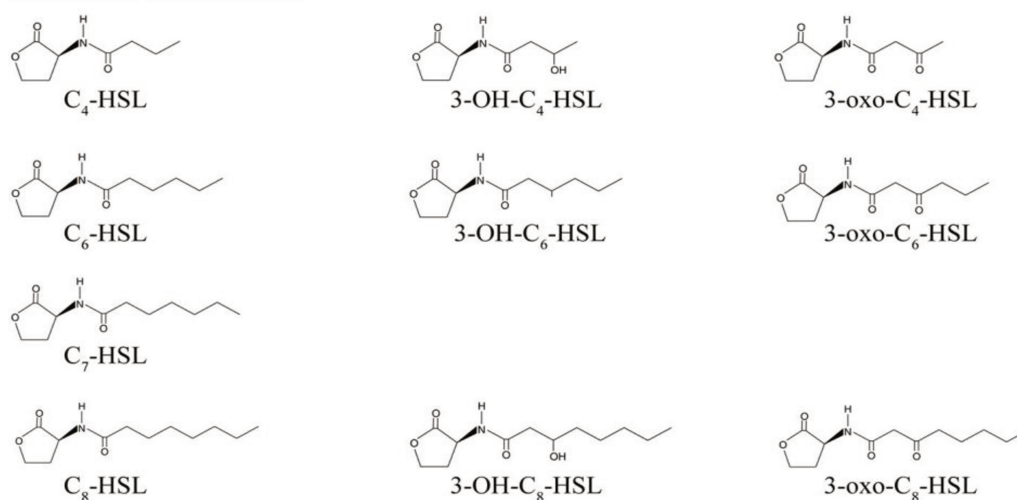
Source :(**O'Connor et al., 2015**).

Figure 7 : Structure moléculaire des AHLs. (n): nombre de carbone ; (R1): nombre de carbone compris entre 1 et 15 inclus à partir du 4^{ème} atome de carbone de la chaîne latérale acyle de la molécule AHL;(R2): les groupes non substitués (-H) ou substituants (-OH, -OXO) sur le 3^{ème} atome de carbone de la chaîne latérale acyle (**O'Connor et al., 2015**).

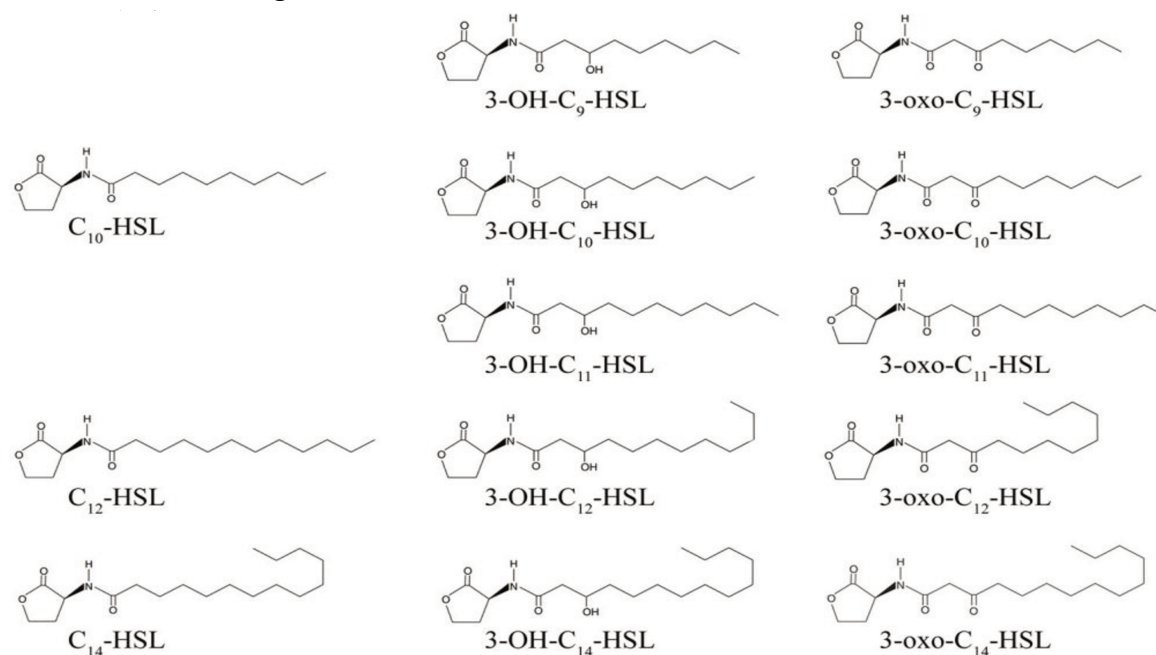
Ces différences entraînent la diversité des structures moléculaires des AHLs (**Figure 8 ; Tableau 3**) et de leurs voies de sécrétion. Chez les bactéries du genre *Vibrio* par exemple, les AHLs à chaîne latérale courte (<8 atomes de carbone sur la chaîne latérale acyle, C₍₄₋₈₎-HSL) (**Figure 8A**) peuvent pénétrer directement dans la membrane cellulaire et être libérés dans l'environnement proche lors de la synthèse tandis que les AHLs à chaîne latérale longue (> 8 atomes de carbone sur la chaîne latérale acyle , C_(10 -18)-HSL) (**Figure 8B**), au contraire, ne peuvent être libérés que par des voies d'efflux actives, telles que la 3-oxo-C12-HSL exportée des membranes via une pompe MexAB-OprM codée par mexAB-oprM active (**Pearson et al., 1999**). Par conséquent, la diversité des AHLs indique non

seulement des différences dans l'application des méthodes de détection, mais sert également de base à diverses régulations fonctionnelles.

A- AHLs à courtes chaînes



B- AHLs à longues chaînes



Source : (Liu et al., 2018)

Figure 8 : Structures chimiques de 23 AHLs produits chez une souche de *Vibrio harveyi* (renommé *V. campbellii*). Les AHLs sont repartis en 2 groupes dont A (AHLs à courtes chaînes) et B (AHLs à longues chaînes). Au sein des 2 groupes il y a présence de substitution –OH et -OXO pour certains AHLs.

Tableau 3 : Informations issues des structures chimiques des 23 AHLs produits chez une souche marine du genre *Vibrio* (Liu et al., 2018).

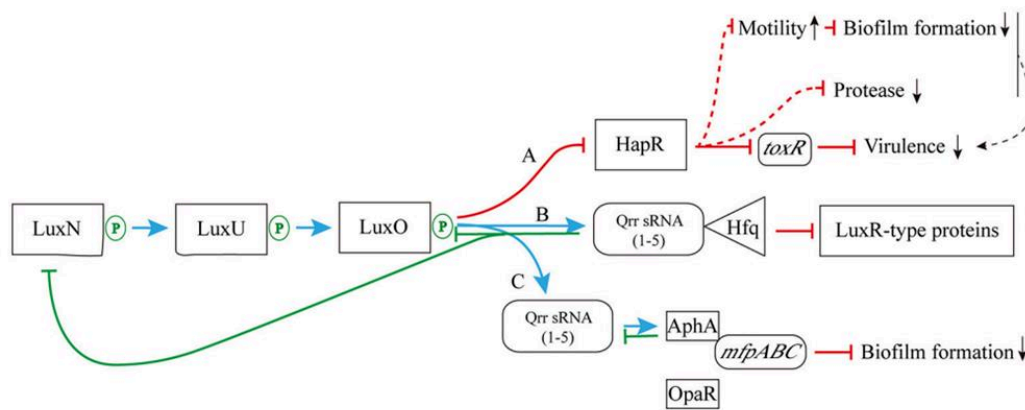
Noms des AHLs	Abréviations	Formules brutes	Masses molaires (g/mol)
N-Butyryl-DL-homoserine lactone	C ₄ -HSL	C ₈ H ₁₃ NO ₃	171.2
N-Hexanoyl-L-homoserine lactone	C ₆ -HSL	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	199.2
N-heptanoyl-L-homoserine lactone	C ₇ -HSL	C ₁₁ H ₁₉ NO ₃	213.3
N-Octanoyl-L-homoserine lactone	C ₈ -HSL	C ₁₂ H ₂₁ NO ₃	227.3
N-Decanoyl-DL-homoserine lactone	C ₁₀ -HSL	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	255.4
N-Dodecanoyl-DL-homoserine lactone	C ₁₂ -HSL	C ₁₆ H ₂₉ NO ₃	283.4
N-Tetradecanoyl-DL-homoserine lactone	C ₁₄ -HSL	C ₁₈ H ₃₃ NO ₃	311.5
N-(3-Hydroxybutyryl)-L-homoserine lactone	3-OH-C ₄ -HSL	C ₈ H ₁₃ NO ₄	187.2
N-(3-Hydroxyhexanoyl)-L-homoserine lactone	3-OH-C ₆ -HSL	C ₁₀ H ₁₇ NO ₄	215.2
N-(3-Hydroxyoctanoyl)-DL-homoserine lactone	3-OH-C ₈ -HSL	C ₁₂ H ₂₁ NO ₄	243.3
N-(3-Hydroxynonanoyl)-L-Homoserine lactone	3-OH-C ₉ -HSL	C ₁₃ H ₂₃ NO ₄	257.3
N-(3-Hydroxydecanoyl)-L-Homoserine lactone	3-OH-C ₁₀ -HSL	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄	271.4
N-(3-Hydroxyundecanoyl)-L-Homoserine lactone	3-OH-C ₁₁ -HSL	C ₁₅ H ₂₇ NO ₄	269.4
N-(3-Hydroxydodecanoyl)-DL-homoserine lactone	3-OH-C ₁₂ -HSL	C ₁₆ H ₂₉ NO ₄	299.4
N-(3-Hydroxytetradecanoyl)-DL-homoserine lactone	3-OH-C ₁₄ -HSL	C ₁₈ H ₃₃ NO ₄	327.4
N-(3-Oxobutyryl)-L-homoserine lactone	3-oxo-C ₄ -HSL	C ₈ H ₁₁ NO ₄	185.2
N-(β-Ketocaproyl)-DL-homoserine lactone	3-oxo-C ₆ -HSL	C ₁₀ H ₁₅ NO ₄	213.2
N-(3-Oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone	3-oxo-C ₈ -HSL	C ₁₂ H ₁₉ NO ₄	241.3
N-(3-Oxononanoyl)-L-homoserine lactone	3-oxo-C ₉ -HSL	C ₁₃ H ₂₁ NO ₄	255.3
N-(3-Oxodecanoyl)-L-homoserine lactone	3-oxo-C ₁₀ -HSL	C ₁₄ H ₂₃ NO ₄	269.3
N-(3-Oxoundecanoyl)-L-homoserine lactone	3-oxo-C ₁₁ -HSL	C ₁₅ H ₂₅ NO ₄	283.3
N-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone	3-oxo-C ₁₂ -HSL	C ₁₆ H ₂₇ NO ₄	297.4
N-(3-Oxotetradecanoyl)-L-homoserine lactone	3-oxo-C ₁₄ -HSL	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	325.4

Source : (Liu et al., 2018)

b- Mécanisme de régulation des AHLs

Les AHLs sont sécrétés dans l'environnement immédiatement via différentes voies de sécrétion après leur production. Les AHLs à chaîne latérale courte sont directement libérés de la cellule lors de la synthèse, tandis que les AHLs à chaîne latérale longue sont activement sécrétés dans l'environnement (Milton, 2006). D'une manière générale, il existe deux systèmes de transduction QS à médiation AHL, à savoir le système direct « LuxI/R » et le système de régulation en cascade. Parmi les deux, le système direct « LuxI/R » exploré pour la première fois chez *V. fischeri* est le plus connu (Engebrecht et Silverman, 1984). La bioluminescence de *V. fischeri* renommé *Aliivibrio fischeri*, par exemple, est le résultat de l'activation de protéines de l'opéron *luxCDABE*, par l'intermédiaire de

LuxR associé au signal QS. Il s'agit de la première régulation QS identifiée chez les bactéries. Dans le système LuxI/R, la protéine LuxI agit en tant que AHL synthase, et la protéine LuxR agit en tant que ligand des AHLs (**Figure 6**). Le système « LuxI/R » permet aux cellules bactériennes de former un complexe récepteur/AHL, qui peut ensuite se lier au domaine de l'ADN permettant la transcription des gènes régulés par le QS tels que l'opéron *lux* (**Choi et Greenberg, 1992**). Dans une cascade régulatrice d'AHL, la concentration d'AHL augmentant jusqu'à un seuil de détection, la protéine LuxN est la clé pour former ensuite un complexe récepteur-AHL et mener à bien une transduction du signal QS. En outre, sous le rôle de système à deux composants (LuxN/O), la phosphorylation de la protéine LuxO favorise directement la liaison compétitive des régulateurs de transcription en aval AphA (contre OpaR) à l'opéron de fusion membranaire *mfpABC* via l'activation de l'expression des ARN régulateurs du quorum, qui inhibe finalement la formation du biofilm (**Zhou et al., 2013**). Comme présenté sur la **figure 9** ; Il existe également plusieurs mécanismes de rétroaction sur la cascade QS liée aux ARN régulateurs du quorum (**Ball et al., 2017**). L'expression accrue des ARN régulateurs du quorum pourrait directement supprimer l'expression des protéines LuxO et LuxN afin de maintenir l'ensemble du système d'hébergement dynamique (**Feng et al., 2015**).



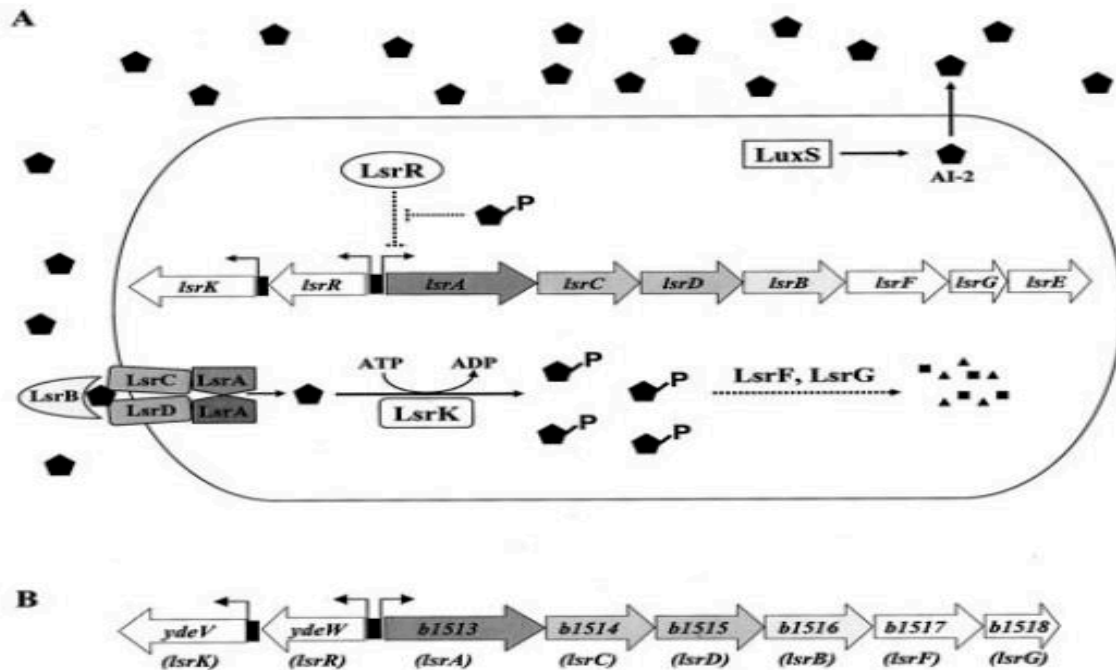
Source : (Liu et al., 2018)

Figure 9: Exemple de synthèse du système de régulation en cascade des AHLs issus de trois espèces de *Vibrio* (*V. fischeri*, *V. harveyi* et *V. cholerae*). (A) les protéines de type LuxI synthétisent et libèrent des AHLs dans l'environnement; (B) une concentration élevée d'AHL inhibe la phosphorylation de la protéine LuxN; (C) l'inhibition de la transcription de *sypG* et *sypK* par LitR inhibe la combinaison des ARN régulateurs du quorum et de Hfq (la molécule de Chaperon) et favorise la production de protéines de type LuxR; (D) l'inhibition de la phosphorylation de la protéine LuxN arrête l'inhibition de HapR, ce qui entraîne une augmentation directe de l'expression de ToxR, une régulation indirecte de la motilité bactérienne et une régulation accrue de la formation de biofilm et de la production de protéase, et favorise la virulence bactérienne; (E) l'inhibition de l'expression des ARN régulateurs du quorum est en faveur de la combinaison de OpaR à *mfpABC*, augmente davantage la formation de biofilm; (F) le complexe protéique AHL-LuxR active les voies fonctionnelles en aval. Flèche pleine bleue : régulation positive ; flèche bleue en pointillés : régulation positive indirecte ; connecteur en T rouge : régulation négative ; connecteur en T vert : régulation négative dans la voie de retour ; flèche pleine à double tête : libération directe ; flèche pointillée à deux têtes : transport transmembranaire actif ; cercle P gris barré : phosphorylation non satisfaite ; flèche du haut : expression améliorée ; flèche vers le bas : expression affaiblie.

3-2.2.2 Les acyl borodiesters AI-2

Un auto-inducteur appelé AI-2, découvert à l'origine chez la bactérie *Vibrio harveyi*, est fabriqué par de nombreuses espèces de bactéries Gram-négatives et Gram-positives. La production d'AI-2 dépend de la synthèse d'autoinducteur

LuxS. Dans tous les cas, une synthase de l'AI-2 hautement homologue de *V. harveyi* appelée LuxS est nécessaire pour la production d'AI-2 (Surette et Bassler, 1999). Récemment, la voie biosynthétique pour la synthèse d'AI-2 a été décrite (Schauder et Bassler, 2001 ; Schauder et al., 2001). Les enzymes LuxS synthétisent la 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) qui est hautement active et s'interconvertit spontanément entre plusieurs dérivés. Différentes bactéries répondent à des dérivés DPD distincts qui sont collectivement appelés "AI-2". L'interconversion de ces molécules représente vraisemblablement l'étape critique permettant aux bactéries de répondre à leur propre AI-2 et à celle produite par d'autres espèces bactériennes, faisant de l'AI-2 une molécule de signalisation régissant la communication bactérienne interspécifique. La transmission du signal de la plupart des microorganismes Gram négatifs et positifs dépend du système de détection de quorum LuxS / AI-2 (Ma et al., 2012 ; Yu et al., 2012). La détection du quorum par le gène LuxS a été impliquée dans la virulence bactérienne, les infections à persistance et la formation de biofilms chez des bactéries telles que *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* et *Actinobacillus* (Gao et al., 2016 ; Wang et al., 2017). Néanmoins, la relation entre les niveaux d'expression du gène LuxS et l'aptitude à la formation de biofilms de certaines bactéries pathogènes telles que *E. faecalis* restent controversées ou même inconnues (Yang et al., 2018).



Source : (Schauder et Bassler, 2001)

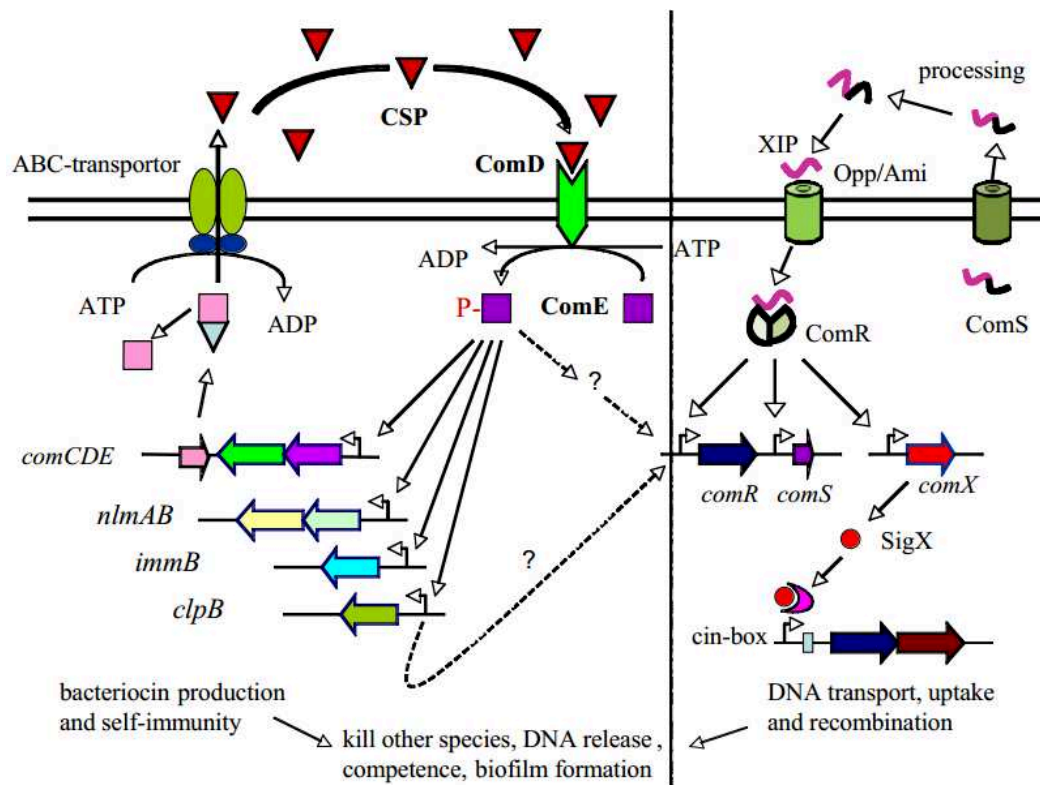
Figure 10 : Modèle pour la production d'AI-2 et l'internalisation chez *S. enterica* sérovar *typhimurium*. (A) AI-2 (pentagones) est synthétisée par LuxS et s'accumule de manière extracellulaire. AI-2 est internalisée par le transporteur Lsr appartenant aux ABC transporteurs), et l'AI-2 internalisée est phosphorylée par la kinase LsrK. Le phospho-AI-2 (AI-2 phosphorylée) est l'inducteur de la transcription de l'opéron *lsr* et se lie à LsrR, le répresseur de l'opéron *lsr*, en l'inactivant. LsrF et LsrG sont nécessaires pour le traitement ultérieur de l'AI-2 internalisée. Les lignes pointillées indiquent des processus hypothétiques. (B) L'opéron *E. coli* b1513 est homologue de l'opéron *lsr* de *S. enterica* sérovar *Typhimurium*. Les désignations des gènes de l'ISR sont indiquées sous les annotations. *lsrB* code la protéine de liaison périplasmique AI-2. Les gènes *lsrC* et *lsrD* codent les protéines de canaux, et *lsrA* code l'ATPase qui fournit de l'énergie pour le transport AI-2. *lsrF* est similaire aux gènes spécifiant les aldolases, et *lsrG* code une protéine avec une fonction inconnue. Il n'y a pas de *lsrE* dans l'opéron *lsr* *E. coli*. Les gènes *ydeV* et *ydeW* codent des protéines homologues de la kinase LsrK et du répresseur LsrR, respectivement. (Schauder et Bassler, 2001)

3-2.2.3 Les autoinducteurs chez les bactéries à Gram positif

Les autoinducteurs des bactéries à Gram positif sont des oligopeptides de 5 à 17 acides aminés qui sont le plus souvent modifiés en période post-traditionnelle par l'ajout de cycles lactones ou thiolactones, lanthionines et isoprényles. Ces

oligopeptides autoinducteurs sont détectés par des protéines transmembranaires à deux composants transduisant les signaux par une cascade de phosphorylation (Novick, 2003).

De subtiles variations sont reconnues par les récepteurs à deux composants et assurent la spécificité du signal. Les bactéries à Gram positifs produisent normalement un précurseur de peptide signal, qui est clivé à partir de la séquence consensus double-glycine et l'autoinducteur peptide (AIP) actif est ensuite exporté à travers un transporteur ABC spécifique d'un peptide dans leurs environnements. La plupart des peptides de signalisation dans les bactéries à Gram positifs comportent entre 5 et 25 acides aminés et certains contiennent des chaînes latérales inhabituelles (Novick, 2003 ; Claverys *et al.*, 2006). La détection des peptides de signalisation dans les bactéries à Gram positifs est médiée par un système de transduction de signal à deux composants, qui consiste en une protéine histidine kinase membranaire détectant l'AIP et une protéine régulatrice de la réponse cytoplasmique permettant à la cellule de répondre au peptide via la régulation de l'expression des gènes (Dunny et Leonard, 1997 ; Schauder et Bassler, 2001 ; Novick, 2003 ; Davey et O'Toole, 2000).



Source : (Yung et Xiaolin, 2012)

Figure 11 : Diagramme schématisique indiquant deux types de systèmes de détection de quorum à médiation peptidique dans une bactérie à Gram positif, *Streptococcus mutans*. Le système de détection du quorum ComCDE régule principalement la production de bactériocines et de protéines d'auto-immunité vis-à-vis de la bactériocine, tandis que le système de détection du quorum ComRS contrôle le développement de la compétence via le contrôle de *sigX* qui code un autre facteur sigma, SigX (ComX). CSP est un peptide signal ComC; XIP est un peptide mature induit par *sigX*. Opp / Aml est un transporteur ABC (importateur de peptides).

4- Stratégies AF basées sur l'inhibition du QS (QSI)

4.1 Définition du QSI

Les QSI sont définis comme étant l'ensemble des mécanismes d'extinction du quorum pour limiter la croissance et la coordination des bactéries participant à la communication QS (Defoirdt et al., 2004 ; Rasmussen et Givskov, 2006). Lorsque ces processus reposent sur la sécrétion d'enzymes conduisant à un clivage du signal QS, on parle de quorum quenching (QQ). Ces enzymes peuvent

être des acylases ou des lactonases conduisant à des métabolites agissant en tant qu'inhibiteurs du QS (Dong et Zhang, 2005).

4. 2 Différentes méthodes QSI

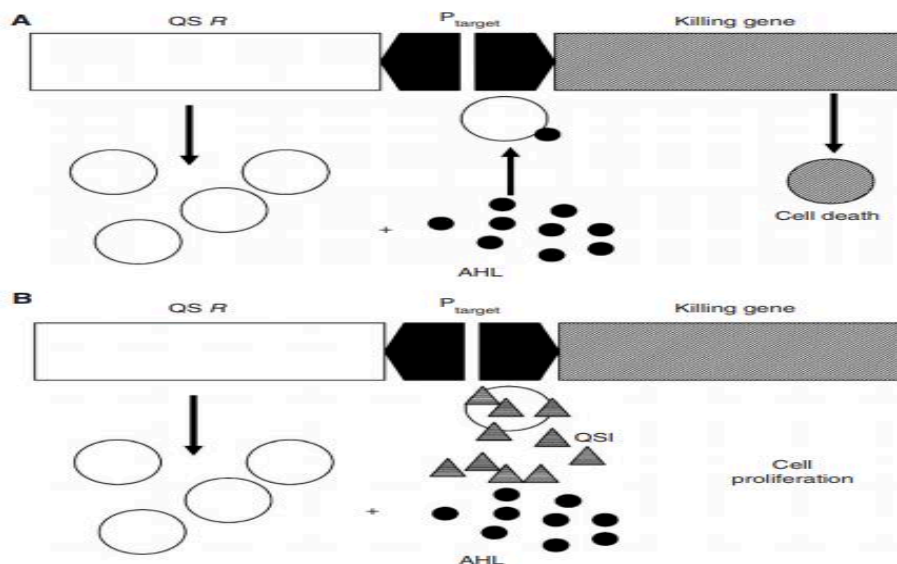
4-2.1 Méthode QSI par interférence avec le QS

Il existe généralement trois cibles différentes dans les systèmes QS des Gram-négatifs - le générateur de signal, la molécule de signal et le récepteur de signal. Une stratégie évidente consiste à rechercher des composés qui empêchent la synthèse des molécules de signal par l'AHL synthase codée par luxI. Si aucune AHL n'est produite, la bactérie ne sera pas en mesure de détecter le quorum atteint. Les gènes contrôlés par le QS ne seront donc pas activés. Si la production du signal ne peut être empêchée, les signaux eux-mêmes peuvent être ciblés en tenant compte de la dégradation. Trois options se présentent : une dégradation métabolique, chimique ou enzymatique. Enfin, la cible la plus approfondie est le récepteur de signal LuxR. En empêchant les molécules signal de se lier à la protéine LuxR, il ne peut plus agir en tant que régulateur transcriptionnel. Cette stratégie repose sur la chimie des petites molécules et comme décrit dans les sous-stratégies suivantes avec ce type d'interférence (Thomas et Michael, 2006).

4-2.2 QSI d'origine biologique

La découverte de composés QSI nécessite des systèmes de criblage capables d'identifier la présence d'activités QSI de composés purs ou mélangés (tels que des extraits de plantes, de champignons, d'algues ou microbiens). Beaucoup de ces systèmes utilisent un promoteur contrôlé par QS fusionné à un gène / opéron rapporteur tel que l'opéron de violacéine de *C. violaceum*, l'opéron *lux* de *V. fischeri*, le gène *lacZ* d'*Escherichia coli* ou de la *gfp* (green fluorescent protein) d'*Aequorea victoria*. En présence de molécules signal AHL ajoutées de manière exogène, ces promoteurs sont activés pour exprimer les gènes correspondants. En présence d'une activité QSI exogène, l'expression des gènes est réduite ou supprimée, de sorte qu'un résultat positif du screening se manifeste par un signal

réduit. Malheureusement, un composé ou un extrait qui ralentit la croissance mais ne tue pas la bactérie « rapporteur », comme les concentrations létales d'antibiotiques, affectera la synthèse des protéines et, à son tour, réduira le signal du gène rapporteur. Si le taux de croissance bactérienne est également surveillé de près et que l'activité spécifique du rapporteur est calculée par le quotient de l'ensemble de l'intensité de signal sur l'ensemble de croissance bactérienne, cette situation peut conduire à la notation d'un « faux positif ». Pour contourner ces problèmes, il serait préférable de développer un système alternatif dans lequel la croissance de la bactérie modèle indique la présence d'une activité QSI. Pour cela une étude menée par **Rasmussen et al., 2005** a montré que plusieurs bactéries génétiquement modifiées, appelées sélecteurs QSI (QSI), basées sur les systèmes Lux et Rhl/las ont été développées. Ces bactéries sont tuées en présence de molécules signal AHL mais sauvées en présence à la fois d'AHL et d'un candidat QSI. Cette technique est illustrée sur la **figure 12** ci-dessous.



Source : (Rasmussen et al., 2005)

Figure 12 : Disposition des systèmes de screening (QSI) : (A) Un régulateur de récepteur / réponse AHL est activé par AHL fourni de manière exogène. L'homologue de LuxR activé (QS R) régule à la hausse l'expression d'un promoteur régulé par QS (P_{target}) qui

contrôle l'expression d'un gène (killing gene) codant pour une protéine toxique conduisant à un arrêt de croissance ou à la mort cellulaire. (B) Si un composé QSI est présent, la réception du signal AHL est bloquée et l'expression du gène destructeur (killing gene) est empêchée, ce qui permet la croissance de la bactérie modèle (**Rasmussen et al., 2005**).

4-2.3 Méthode QSI issue de la modification du pH

En raison de la nature du cycle homosérine lactone, les AHLs sont instables à des pH supérieurs à 7 (**Yates et al., 2002**). Lorsque les AHLs sont exposés à un pH alcalin, la molécule subit une lactonolyse (ouverture de cycle) et l'activité biologique est perdue (**Byers et al., 2002; Yates et al., 2002**). Au cours de leur croissance, les souches telles que *P. aeruginosa*, *E. carotovora* et *Yersinia pseudotuberculosis* sont à la base de l'élévation du pH du milieu. Cette élévation du pH affaiblit le niveau d'AHLs endogènes. Dans ces conditions, même les AHLs fournis de manière exogène perdent rapidement leur capacité à activer les systèmes QS. En effet, la cinétique de l'ouverture du cycle dépend de plusieurs facteurs, dont la longueur de la chaîne latérale acylée ainsi que de la température. Les températures élevées augmentent le taux d'ouverture des anneaux. Les molécules AHL ayant des chaînes latérales étendues (telles que 3-oxo-C12 HSL) subissent une lactonolyse plus lente que leurs homologues à chaîne courte. Cette dépendance indique que, pour être actifs aux pH physiologiques, les AHLs ont pour la plupart une longueur de chaîne latérale d'au moins 4 atomes de carbone (**Byers et al., 2002; Yates et al., 2002**).

4-2.4 Méthode QSI basée sur les activités enzymatiques ou quorum quenching (QQ)

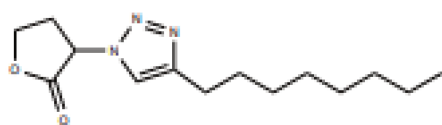
Une famille étroitement apparentée d'enzymes dégradant les AHLs (QQ) a été trouvée chez plusieurs espèces de *Bacillus*, notamment *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *B. mycoides* isolées de l'environnement. Cette enzyme catalyse la réaction de lactonolyse et diminue donc la quantité de AHLs bioactifs (**Dong et al., 2001 ; Lee et al., 2002**). L'inactivation complète de la 3-oxo-C6 HSL à 20 mM peut être

réalisée en deux heures par une culture en suspension (**Dong et al., 2002**). Comme prévu, la virulence d'*Erwinia Caratovora* vis-à-vis de la pomme de terre, des aubergines, du chou chinois, de la carotte, du céleri, du chou-fleur et du tabac peut être atténuée lorsque le QQ est exprimé par un plasmide transformé dans la bactérie. Fait intéressant, les plants de tabac transgéniques exprimant l'enzyme sont beaucoup moins susceptibles d'être contaminés par *E. carotovora* que leurs homologues de type sauvage. Cela suggère en effet que la production d'enzymes dégradant l'AHL constituerait un mécanisme de protection et un avantage pour les plantes. La production d'enzymes capables de dégrader les AHLs ne se limite pas à *Bacillus*. Des homologues de QQ capables de dégrader les AHLs, ont été identifiés chez *Agrobacterium tumefaciens*, *Arthrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Comamonas sp.* et *Rhodococcus sp.* (**Carlier et al., 2003; Park et al., 2003; Uroz et al., 2003**). La production de lactonases peut également constituer une stratégie bactérienne dans la compétition avec les souches productrices d'AHL dans l'environnement. Les enzymes de dégradation de l'AHL présentent un intérêt commercial potentiel, mais leur application est probablement limitée à une utilisation topique en raison des problèmes importants rencontrés lors de la distribution systémique d'agents protéiques.

4-2.5 Méthode QSI basée sur l'utilisation d'analogues d'AHL

La stratégie d'inhibition du QS la plus étudiée est probablement l'utilisation de petites molécules pour bloquer l'activation des homologues de LuxR. Le blocage du site récepteur AHL avec un analogue de l'AHL constitue une approche pharmacologique classique de l'antagonisme des récepteurs. **Schaefer et al. (1996)** ont identifié des analogues de la 3-oxo-C6 HSL, avec des substitutions dans la chaîne latérale acyle, capables de déplacer la 3-oxo-C6 HSL (AHL native) marquée au tritium de LuxR. Les composés capables de se lier au LuxR ont non seulement été en mesure de déplacer l'AHL, mais ont également pu activer la protéine LuxR. Par conséquent, ces composés ne sont pas de vrais inhibiteurs de QS mais sont des agonistes compétitifs (**Schaefer et al., 1996**). Une banque de

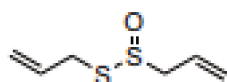
composés similaires a été testée en utilisant la protéine TraR d'*A. tumefaciens* où la plupart des composés agissaient en tant qu'inhibiteurs mais, de manière surprenante, lorsque *traR* était surexprimé, les composés agissaient en tant qu'inducteurs du QS (Zhu et al., 1998).



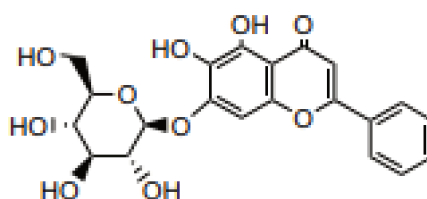
Triazolylidihydrofuranone



Ajoene



Allicin



Baicalin hydrate

Schéma 4 : Sélection de QSI ciblant le système AHL (Brackman et al., 2011a)

4.2.6 Mécanismes d'inhibition des principaux types de QS

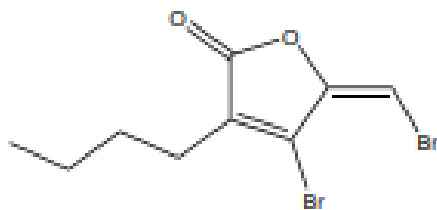
4-2.6.1 Inhibition du système AHL

Les molécules de signal AHL sont formées lorsqu'un dérivé d'acide gras lié à une protéine porteuse d'acyle est transféré au groupe amino de S-adenosyl-méthionine (SAM) par une protéine de la famille LuxI. Compte tenu de la nature de cette réaction et des précurseurs impliqués, des inhibiteurs de la SAM ou de la biosynthèse des acides gras peuvent être utilisés comme QSI. La S-adenosyl-homocystéine (SAH), la sinefungin, la 5-methylthioadenosine (MTA), divers analogues de SAM et la cycloleucine, un inhibiteur de la biosynthèse de SAM, inhibent la production d'AHL (Parsek et al., 1999 ; Hanzelka et Greenberg, 1996). L'antibiotique azithromycine interfère avec la synthèse de la C₄-homosérine lactone (C₄-HSL) et de la 3-oxo-C₁₂-HSL chez *P. aeruginosa* et réduit

ainsi l'adhésion bactérienne aux surfaces de polystyrène (**Favre-Bonté et al., 2003**). De plus, le traitement à l'azithromycine a significativement amélioré la réduction des biofilms dans un modèle murin d'infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* (**Hoffmann et al., 2007**).

4-2.6.2 Inhibition du système AI-2

La synthèse de l'AI-2 implique deux étapes enzymatiques principales. Premièrement, l'adénine est extraite de la SAH par la méthylthioadénosine nucléosidase (MTAN) (codée par *pfs*), ce qui entraîne la production de S-ribosylhomocystéine (SRH). Ensuite, LuxS clive la SRH pour former la DPD et l'homocystéine. De plus, MTAN est également impliqué dans le système AHL du QS, et LuxS et MTAN ne se trouvent que dans des bactéries, ce qui en fait des cibles attrayantes. Plusieurs inhibiteurs de LuxS et de MTAN ont été décrits. La S-anhydroribosyl-L-homocystéine et la S-homoribosyl-L-cystéine bloquent respectivement les étapes initiale et finale du mécanisme réactionnel LuxS (**Zhao et al., 2003 ; Alfaro et al., 2004**). Sur la base de ces molécules, **Shen** et ses collaborateurs en **2006** ont synthétisé plusieurs inhibiteurs de LuxS plus puissants. Différents peptides capables d'inhiber LuxS ont également été développés (**Han et Lu, 2009 ; Zhang et al., 2009**). À partir d'immucilline et de DADMe-immucilline, plusieurs autres inhibiteurs de MTAN (par exemple, BuTDADMe-immucilline-A et p-Cl-PhT-DADMe-immucilline-A), actifs aux concentrations pico et femtomolaires, ont été développés (**Lee et al., 2005 ; Longshaw et al., 2010**). Enfin, plusieurs peptides présentant une homologie avec le site C de LuxS ont affecté la production d'AI-2 et la formation de biofilm d'*Edwardsiella tarda* (**Zhang et al., 2009**).

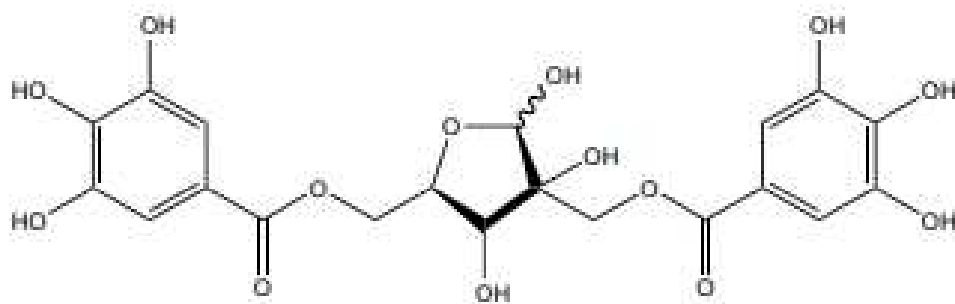


Furanone naturelle

Schéma 5 : Sélection de QSI ciblant le système AI-2. La Furanone naturelle est un composé capable de bloquer les systèmes QS de type AI-2 et AHL chez les bactéries, affectant ainsi la formation de biofilms (**Brackman et al., 2011b**)

4-2.6.3 Inhibition du système peptidique (AI-3) chez les Gram- positifs

Les protéines impliquées dans la synthèse du signal peptidique et les modifications post-traductionnelles du peptide chez les bactéries à Gram positif sont également des cibles intéressantes, mais à ce jour, aucun inhibiteur ciblant spécifiquement ces protéines n'a été rapporté. En revanche, différents inhibiteurs peptidiques linéaires ciblant la signal peptidase de type I SpsB réduiraient la production de AIP-I (**Buzder-Lantos et al., 2009 ; Kavanaugh et al., 2007**). Par ailleurs, l'un des peptides inhibiteurs de QS les plus étudiés est le peptide inhibiteur de RNAPIII (RIP). Le RIP, plusieurs analogues du RIP et l'hamamelitannin, un analogue non peptidique (**schéma 6**), interfèrent avec le système RAP / TRAP QS (**Kiran et al., 2008 ; Cirioni et al., 2013**). Plusieurs groupes ont présenté des preuves de l'effet anti-biofilm des analogues de RIP et / ou de RIP contre *Staphylococcus spp.* (**Kiran et al., 2008**). De plus, il a été démontré que le RIP, les analogues du RIP et l'hamamelitannin (**schéma 6**) augmentaient la sensibilité des biofilms aux antibiotiques (**Balaban et al., 2005 ; Brackman et al., 2011b ; Kiran et al., 2008**).



Hamamelitannin

Schéma 6 : Sélection de QSI ciblant le système peptidique chez les Gram positifs.

4-2.7 Impact du QSI sur la formation de biofilms

Le QS est généralement impliqué dans le développement et l'entretien des biofilms. De nos jours, plusieurs stratégies de lutte contre les biofilms bactériens prenant en compte l'aspect écologique reposent sur l'inhibition du QS. Ainsi, la sécrétion de composés qui détruisent les AHLs et bloquent donc le QS peut être bénéfique pour les algues dans leur compétition avec les organismes organisés en biofilm (**Borchardt et al., 2001**). Les méthodes QSI se présentent comme une alternative des stratégies antifouling. Par ailleurs, les bactéries vivent principalement sous la forme de communautés sessiles ou de biofilms associés à la surface (**Costerton et al., 1987**). Par conséquent, il est très intéressant d'interférer avec le QS chez les bactéries en mode de croissance en biofilms. Pour le clinicien, le principal problème est que les bactéries vivant dans les biofilms peuvent souvent résister aux réponses immunitaires de l'hôte et sont nettement plus tolérantes aux divers traitements antimicrobiens. Des valeurs allant jusqu'à 1000 fois plus (par rapport aux cultures planctoniques) pour les antibiotiques et les métaux lourds ont été rapportées (**Allison et al., 1993; Anwar et al., 1990; Teitzel et Parsek, 2003**). En ce qui concerne les antibiotiques, ce niveau dépassera souvent les doses délivrables les plus élevées, ce qui rend impossible un traitement efficace (**Costerton et al., 1987, 1999; Drenkard, 2003; Hoiby et**

al., 2001). Le mécanisme de tolérance sous-jacent est multi-factoriel et comprend des facteurs tels que la pénétration restreinte, l'activité métabolique hétérogène et l'expression de certains gènes conférant une tolérance accrue aux composés antimicrobiens. Bien que **Mah** et ses collaborateurs (2003) aient identifié un gène, *ndvB*, établissant un lien entre la tolérance accrue du biofilm de *P. aeruginosa* et la tobramycine, cela ne semble pas être un facteur répandu, car cette découverte ne s'étend pas aux autres isolats (**Mah et al.**, 2003). Plusieurs études indiquent cependant que la tolérance accrue est, au moins en partie, liée à l'expression génique dépendante du QS. Un biofilm formé par un mutant *lasI* de *P. aeruginosa* était beaucoup plus susceptible de se détacher et de se disperser en présence de biocides que son homologue de type sauvage (**Davies et al.**, 1998). De même, la plupart des bactéries, présentes dans un biofilm formé par un double mutant *lasR/rhlR* pourraient être tuées par 20 mg / ml de tobramycine, une concentration qui ne nuit pas à un biofilm de type sauvage. Une situation similaire est observée si le mutant déficient en QS est traité avec du peroxyde d'hydrogène. Les cellules du biofilm sont beaucoup plus sujettes à la destruction que les cellules de biofilm dotées de systèmes QS fonctionnels (**Bjarnsholt et al.**, 2005). Ces résultats ont évidemment des implications pour les composés QSI. En effet, **Hentzer et al.** (2003) ont démontré qu'un traitement par la tobramycine, contrairement au biofilm non traité, permettait de tuer facilement un biofilm de *P. aeruginosa* traité avec les composés de furanone halogénées. Par conséquent, les molécules QSI peuvent aider à améliorer l'efficacité des composés antifouling chez des bactéries organisées en biofilm.

5- Stratégies AF visant les facteurs de résistance bactérienne

5-1 Définitions et types de résistance bactérienne

Le phénomène de résistance bactérienne regroupe tous les mécanismes moléculaires et physiologiques permettant à une bactérie de développer une tolérance aux agents antimicrobiens. Le phénomène de résistance bactérienne est généralement évalué par l'action d'antibiotiques ou groupe d'antibiotiques. En effet, les antibiotiques sont à l'origine des molécules naturelles synthétisées par les microorganismes dans le but d'une autodéfense. Chaque antibiotique, qu'il soit bactériostatique (limitant la croissance cellulaire sans éliminer la bactérie) ou bactéricide (élimination directe de la bactérie), possède un mécanisme d'action vis-à-vis d'une cible spécifique. Cette cible peut être : la paroi bactérienne, les protéines, le matériel génétique (ADN et/ou ARN) ou le métabolisme de l'acide folique (**Bbosa et al., 2014**).

En outre, il existe deux types distincts de résistance : la résistance intrinsèque et la résistance acquise (**Sandoval-Motta et Aldana, 2016**). En effet, la résistance naturelle, ou intrinsèque, concerne toutes les bactéries d'une même espèce et préexiste à l'utilisation d'agents antimicrobiens. Le patrimoine génétique qu'elles partagent les rend insensibles et est transmissible à la descendance, ce qui donne à cette résistance un caractère permanent. Par ailleurs, une bactérie naturellement sensible peut acquérir une résistance ; cette nouvelle résistance ne concerne cependant pas toutes les souches d'une même espèce. Elle est plus aléatoire puisqu'elle résulte d'une modification de son capital génétique (**Courvalin, 2008**).

5-2 Biofilms et résistance bactérienne

Généralement, la présence de micro-organismes dans des biofilms peut renforcer leur résistance aux agents antimicrobiens. Cela peut être dû à une diminution de la pénétration de substances antimicrobiennes telles que les antibiotiques, à une diminution du taux de croissance des cellules du biofilm et /

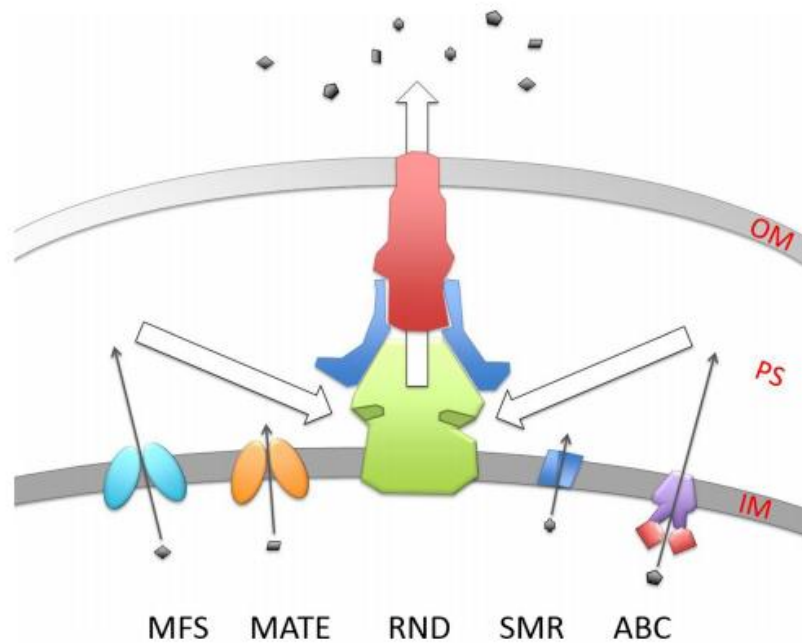
ou à une diminution du métabolisme des cellules bactériennes dans les biofilms. De plus, la présence de cellules persistantes et l'expression de gènes de résistance spécifiques dans les biofilms peuvent contribuer à cette tolérance. Le traitement antimicrobien n'élimine souvent pas les biofilms du site de l'infection. Pour cette raison, des agents anti-biofilms innovants avec des cibles et des modes d'action novateurs sont nécessaires (Fux et al., 2005).

5-3 Modes de résistance bactérienne

5-3.1 Modulation des pompes d'efflux

5-3.1.1 Définitions des pompes d'efflux

La résistance par exportation active, à diverses substances antimicrobiennes peut être effective chez les bactéries grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces protéines sont soit spécifiques à une classe d'antibiotique ou soit responsables du Multidrug resistant (MDR). Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques ternaires avec une pompe transmembranaire, une protéine périplasmique de jonction et une porine de la membrane externe. Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont de type RND comme AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *Pseudomonas aeruginosa*. Chez les bactéries à Gram positif, les systèmes d'efflux ne sont constitués que de la pompe. Les plus étudiés sont les pompes MFS comme NorA ou QacA chez *Staphylococcus aureus* et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae*. Quelques transporteurs ont aussi été décrits chez les mycobactéries (Vincent, 2004). Les principales familles de pompes d'efflux sont représentées sur la **figure 13** ci-dessous :



Source : (Tahmina et al., 2017).

Figure 13 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux présentes chez *Escherichia coli*. La membrane interne (IM) et la membrane externe (OM) séparent l'espace périplasmique (PS). Les petites formes grises représentent une variété d'antibiotiques et les flèches indiquent le sens de déplacement des antibiotiques à travers les transporteurs. Le transporteur RND fait partie d'un complexe tripartite composé des trois sous-unités : la pompe à membrane interne, par ex. ColB AcrB (vert), et le pore de la membrane externe, par ex. TolC (rouge) chez *E. coli*, qui sont liés ensemble par une protéine localisée périplasmique, ou ArcA (bleu) chez *E. coli*. Les transporteurs ABC consistent en un corps transmembranaire en violet et des domaines de liaison ATP en rouge. Les familles MFS et MATE sont des gènes uniques qui forment deux domaines, représentés par les deux ovales. Enfin, les familles de protéines SMR doivent se dimériser pour former le transporteur actif (Tahmina et al., 2017).

5-3.1.2 Classifications des pompes d'efflux

Les pompes d'efflux comprennent plusieurs classes basées sur la forme d'utilisation d'énergie fournie. Ainsi, la dissipation de proton est propre aux familles MFS, RND et SMR. La famille MATE utilise l'ion sodium (Na^+) comme source d'énergie tandis que celle d'ABC tire sa source énergétique de l'hydrolyse d'ATP (Vincent, 2004).

La famille MFS (Major Facilitator Superfamily) : les transporteurs MFS sont des protéines d'environ 400 acides aminés et sont présents chez des organismes allant des bactéries aux eucaryotes supérieurs. L'analyse des profils d'hydropathie (détermination de la nature hydrophobe des régions d'acides aminés) et l'alignement des motifs conservés ont permis de diviser cette famille en deux sous-familles, les pompes à 12 segments transmembranaires (TMS) et les pompes à 14 TMS (**Putman et al., 2000 ; Paulsen et al., 1996**). À noter que ce type de pompes est inhibé par la réserpine. Ces transporteurs fonctionnent généralement sans protéine associée, excepté chez quelques bactéries à Gram négatif (**Zgurskaya, 2002**).

La famille SMR (Small Multidrug Resistance) : les transporteurs SMR sont uniquement présents chez les procaryotes. Ce sont les plus petites protéines d'efflux avec une structure primaire d'environ 110 acides aminés. Les transporteurs SMR sont constitués de quatre TMS et, du fait de leur petite taille, pourraient être assemblés en oligomères, notamment en trimères (**Putman et al., 2000**). Les pompes SMR n'exportent que des cations lipophiles notamment certains antiseptiques et désinfectants comme les ammoniums quaternaires.

La famille RND (Resistance-Nodulation cell Division) : les transporteurs RND sont retrouvés essentiellement chez les bactéries à Gram négatif, chez lesquelles ils jouent un rôle important dans la résistance naturelle et acquise vis-à-vis de nombreux antibiotiques, souvent en synergie avec l'imperméabilité de la membrane externe (**Poole, 2004 ; Zgurskaya, 2002 ; Li et Nikaido, 2004**). Généralement codés par des gènes chromosomiques, ils sont constitués d'environ 1000 acides aminés et comprennent 12 TMS avec deux larges boucles périplasmiques hydrophiles impliquées dans la reconnaissance du substrat (**Putman et al., 2000**). Pour permettre le transport à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, les pompes RND s'associent en complexe protéique

tripartite avec une protéine périplasmique ou MFP (Membrane Fusion Protein) et une porine de la membrane externe ou OMF (Outer Membrane Factor).

La famille MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) : les transporteurs MATE ont une topologie membranaire analogue à celle des pompes MFS. Actuellement décrits chez les bactéries à Gram négatif, ils utilisent un gradient électrochimique d'ions Na⁺ (**Borges-Walmsley et al., 2003**) ; **Li et Nikaido, 2004**).

La famille ABC ou NBD (Nucleotide-Binding Domain) : les transporteurs qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP sont appelés transporteurs ABC (ATP-binding cassette) et constituent la plus vaste famille de protéines connues. Ces pompes sont très largement impliquées dans la résistance de type MDR des cellules cancéreuses mais seules quelques-unes ont été décrites chez les procaryotes (**Putman et al., 2000** ; **Li et Nikaido, 2004**).

5-3.1.3 Mécanismes de résistance bactérienne basés sur les pompes d'efflux

Les pompes d'efflux sont des complexes protéiques associés à la membrane bactérienne qui conduisent activement à l'extrusion de substrats potentiellement nocifs pour la bactérie, tels que des métaux lourds, des toxines et des agents antimicrobiens, depuis le cytoplasme ou le périplasma vers l'extérieur de la cellule (**Muylaert et Mainil, 2012**). Quel que soit l'état physiologique de la bactérie (résistante ou sensible), les pompes d'efflux sont présentes (**Piddock, 2006**).

Les transporteurs ABC : Ceux-ci utilisent l'énergie de l'ATP. Ces transporteurs, rencontrés chez les bactéries et eucaryotes, sont des protéines de 600 acides aminés environ, comportant quatre domaines dont deux hydrophobes transmembranaires, et deux domaines cytoplasmiques liant et hydrolysant l'ATP. Le mécanisme de transport se compose de quatre étapes : (1) Liaison du substrat

qui induit une augmentation de l'affinité des domaines cytoplasmiques pour l'ATP. (2) Fixation de l'ATP qui induit un réarrangement des domaines transmembranaires dans une conformation de faible affinité pour le substrat. (3) Libération du substrat et hydrolyse de l'ATP. (4) Libération d'ADP et d'orthophosphate inorganique (Pi) qui induit un retour à la conformation ouverte initiale de la pompe dont l'affinité pour le substrat est forte (**Linton, 2007**).

Les transporteurs SMR : Ce sont des petites protéines d'environ 100 acides aminés organisées en quatre hélices transmembranaires. Les transporteurs SMR exportent des composés cationiques aromatiques tels que les ammoniums quaternaires ou certains antibiotiques. Le mécanisme de ce système de transport repose sur six étapes : (1) Libération de deux protons dans le cytoplasme, un proton par monomère. (2) Fixation du substrat cationique(S+). (3) Changement conformationnel du transporteur : la poche s'ouvre vers le périplasme (chez les bactéries à Gram négatif) ou le milieu extracellulaire. (4) Libération du substrat dans le périplasme ou le milieu extracellulaire. (5) Reprotonation des résidus glutamates. (6) Réorientation du site de liaison du côté cytoplasmique (**Schuldiner, 2012**).

Les transporteurs MFS : Constitués d'environ 400 acides aminés, les MFS constituent les familles de transporteurs ayant le plus grand effectif, et qui se retrouvent chez les bactéries ou eucaryotes. Le mécanisme de transport se décrit en six étapes : (1) Libération d'un proton de D34 dans le cytoplasme via E26. (2) Fixation du substrat (S) sur un site distinct de D34. (3) Changement conformationnel de la protéine qui s'ouvre vers le périplasme (chez les bactéries à Gram-négatif) ou le milieu extracellulaire (chez les bactéries à Gram-positif). (4) Libération du substrat dans le périplasme ou le milieu extracellulaire. (5) Liaison d'un proton sur le résidu D34. (6) Retour du transporteur à sa conformation initiale (**Fluman, 2012**).

Les transporteurs MATE : Ce sont des protéines constituées de 450 acides aminés comportant 12 segments transmembranaires. NorM est le premier transporteur de cette famille et celui-ci a été découvert chez *Vibrio parahaemolyticus*. Cette famille de transporteur fonctionne en six étapes : (1) Liaison d'un ion Na⁺ impliquant les segments TMS 7 et TMS 8 (bâtonnet jaune épais). (2) Mouvement des TMS 7 et TMS 8 (flèche rouge) vers le segment TMS 10 (bâtonnet jaune fin) et libération du substrat. (3) Changement conformationnel du transporteur qui s'ouvre vers le cytoplasme. (4) Fixation d'une nouvelle molécule de substrat déclenchant le mouvement des TMS 7 et TMS 8 (flèche rouge) et fragilisant la liaison du Na⁺. (5) Libération de l'ion Na⁺ dans le cytoplasme. (6) Retour du transporteur à sa conformation tournée vers le périplasma (chez les bactéries à Gram-négatif) ou le milieu extracellulaire (chez les bactéries à Gram positif) (Nikaido et Pagès, 2012).

Les transporteurs RND : Les transporteurs de cette famille sont des systèmes tripartites. Ils sont uniquement présents chez les bactéries à Gram négatif et permettent la liaison entre le cytoplasme de la bactérie et le milieu extracellulaire, à travers la double membrane bactérienne. La particularité des RND se base sur leur large spécificité leur permettant de transporter diverses molécules ayant des structures différentes (Nikaido et Pagès 2012).

5-3.1.4 Mode de résistance bactérienne basée sur la réduction de la perméabilité membranaire

La membrane externe joue un rôle très important dans la physiologie des bactéries à Gram négatif en les rendant résistantes aux facteurs de défense de l'hôte tels que le lysozyme, la P-lysine et diverses protéines leucocytaires, qui sont parfois très toxiques pour la cellule (Bhat *et al.*, 1991). La classification primaire des bactéries est basée sur leurs propriétés de coloration de Gram qui les divisent en deux groupes pour une grande majorité d'entre elles : les bactéries à Gram négatifs et les bactéries à Gram positifs. Comme présentées sur la **figure 14**, les

bactéries à Gram négatif ont une paroi externe recouvrant une couche (relativement mince) de peptidoglycane (PG) et une membrane interne. En revanche, les bactéries à Gram positifs ont une épaisse couche de PG qui sert de paroi externe et une membrane cellulaire interne. (Hancock, 1997 ; Nikaido, 2003).

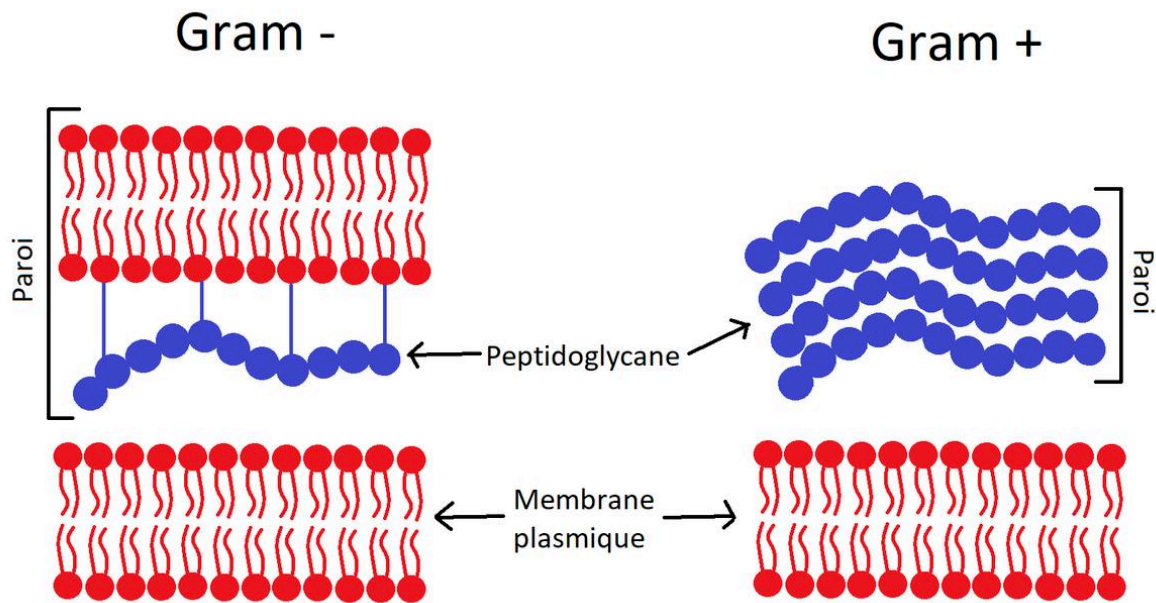


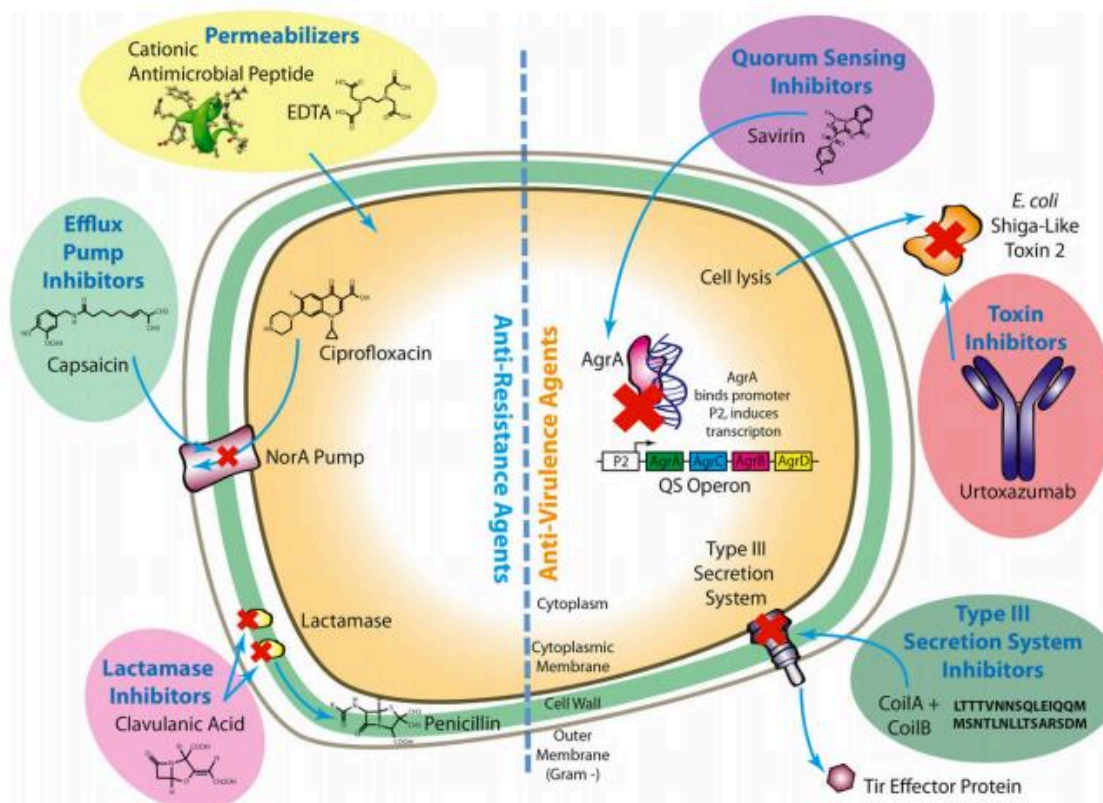
Figure 14 : Représentation schématique d'une membrane bactérienne chez les bactéries à Gram positifs et chez les bactéries à Gram négatifs (<https://www.google.fr/search?q=membrane+bact%C3%A9rienne&tbm>). Chez les Gram négatifs, il y a présence d'une paroi externe bien différenciée de la couche relativement mince de PG recouvrant la membrane plasmique (interne). Chez les Gram positifs la couche de PG relativement épaisse sert de paroi recouvrant la membrane interne.

La réduction de la perméabilité membranaire est en effet principalement fonction de la membrane externe trouvée dans les bactéries à Gram-négatif et dépend en grande partie de la structure hydrophobe du composant lipidique du lipopolysaccharide et des porines. Les porines sont des canaux protéiques nécessaires pour le transport de petites molécules hydrophiles comme les nutriments et les ions à travers la membrane externe (Raetz, 2007 ; Pagès *et al.*, 2008). De même, les antibiotiques hydrophiles pénètrent la membrane via ces

canaux, comme les phénicolés, les β - lactamines et les fluoroquinolones (Nikaido, 2003; Kojima et Nikaido, 2013; Neves, 2005). La réduction de la taille des porines ou leur expression réduite (voire inexistante) peut ainsi inhiber l'influx d'antibiotiques à l'intérieur de la bactérie, entraînant une diminution de l'accumulation de celui-ci et donc de son activité (Cohen, 1988).

5-3.2 Stratégies de lutte contre la résistance bactérienne

La lutte contre la résistance bactérienne repose sur des molécules anti-résistantes. Les molécules anti-résistantes ont été associées en tant qu'adjuvants aux antibiotiques dans les travaux de Gill et al en 2015. Un adjuvant ne possède généralement pas d'activité antibactérienne intrinsèque mais il permet à un antibiotique d'avoir une meilleure action sur sa cible lorsqu'il lui est associé. Ainsi, une approche combinatoire est jugée opportune afin de potentialiser les effets des antimicrobiens (Bolla et al., 2011). Il existe plusieurs classes de composés constituant les adjuvants. Parmi celles-ci il existe les composés inhibiteurs de la pompe à efflux (Abuzaid et al., 2012), et perméabilisants de la membrane externe (Urakawa et al., 2010). Une représentation schématique de ces composés est montrée dans la Figure 15 (ci-dessous).



Source : (Bolla et al., 2011)

Figure 15 : Agents antirésistants et antivirulents sélectionnés et leurs mécanismes d'action chez *Staphylococcus aureus*. Les peptides cationiques (Hancock, 1997) et EDTA (Hancock et Wong, 1984) sont des agents perméabilisants de la membrane externe qui rendent la membrane externe plus sensible à la pénétration d'antibiotiques. La capsaïcine (Kalia et al., 2012) est un inhibiteur de pompe à efflux qui agit sur la pompe NorA de *S. aureus* pour empêcher l'efflux de l'antibiotique ciprofloxacine de l'intérieur de la cellule. L'acide clavulanique (Totir et al., 2007) est un inhibiteur de la lactamase qui inhibe l'action de celle-ci sur la pénicilline, augmentant ainsi l'efficacité. La Savirin (Sully et al., 2014) est un inhibiteur sensible au quorum qui arrête la liaison de AgrA au promoteur P2, qui se trouve en amont d'un opéron détectant le quorum de *S. aureus*. La liaison de AgrA au promoteur P2 induit la transcription de l'opéron détectant le quorum, de sorte que l'action empêche l'expression du gène sensible au quorum. L'urtoxazumab (Lopez et al., 2010) est un inhibiteur de toxines qui inactive la toxine 2 de type *E. Shiga-like* de *E. coli*. La toxine 2 est produite par les gènes du phage en fin de cycle puis libérée de la cellule lors de la lyse. La toxine est ensuite liée et inactivée par l'anticorps anti-urtoxazumab. CoilA et CoilB (Larzabal et al., 2013 ; Larzabal et al., 2010) sont des peptides qui inhibent l'assemblage de

l'appareil à système de sécrétion de type III. En empêchant la formation du système de sécrétion de type III, la sécrétion de protéines effectrices (telles que Tir) est efficacement stoppée.

5-3.2.1 Inhibition des pompes d'efflux

La surexpression de la pompe d'efflux est un mécanisme important de résistance bactérienne entraînant l'expulsion d'antibiotiques à partir de cellules bactériennes. L'inhibition de la pompe est donc une stratégie qui pourrait rétablir la puissance des composés antibactériens actuels contre les bactéries résistantes et peut-être conduire au développement de nouveaux composés.

Les pompes à efflux RND interviennent dans la résistance intrinsèque de nombreux Gram négatifs et, lorsqu'ils sont exprimés, conduisent à des phénotypes de résistance multiple aux médicaments chez les Enterobacteriaceae et *Pseudomonas aeruginosa*. Ils constituent donc des cibles potentielles pour de nouveaux agents susceptibles de restaurer la sensibilité à différents antibiotiques (**Biot et al., 2011**). Parmi les inhibiteurs possibles, citons le phénylalanine-arginine β -naphthylamide (PABN), un inhibiteur double perméabilisant et inhibiteur de la pompe à efflux. Ce composé inhibe l'action d'efflux de nombreuses pompes de la famille RND et est capable de réduire la résistance intrinsèque et mutationnelle à plusieurs composés antimicrobiens (tableau 2) (**Biot et al., 2011; Lamers et al., 2013**).

Une autre cible qui a fait l'objet de nombreuses recherches est la pompe à efflux NorA de *S. aureus*, qui confère une résistance à plusieurs agents antimicrobiens, y compris les fluoroquinolones (**Kumar et Schweizer, 2005**), donnant lieu à un phénotype de multirésistance. De nombreux composés de différentes sources et de différentes classes ont été testés pour leur capacité à désactiver la pompe NorA et à rétablir l'activité des antibiotiques par rapport à *S. aureus* résistant (**Figure 15**). Des recherches ont également été menées pour mettre au point des fluoroquinolones afin d'éviter les efflux via les pompes NorA afin d'améliorer leur efficacité antimicrobienne (**Ince et al., 2002**).

Une autre possibilité pour réduire les effets délétères des pompes à efflux implique l'utilisation d'acides nucléiques peptides anti-sens, également connus sous le nom de PNA. Les PNA sont des homologues synthétiques d'acides nucléiques dans lesquels le squelette du polynucléotide phosphate est remplacé par un polymère pseudopeptidique flexible. Les PNA agissent en tant que médiateurs anti-sens en se liant avec une haute spécificité à des séquences complémentaires d'ADN et d'ARN et en inhibant l'expression et la traduction de gènes (**Paulasova et Pellestor, 2004**). Un composé de PNA a été utilisé pour sensibiliser *Campylobacter jejuni* en diminuant l'expression de la pompe d'efflux CmeABC, qui confère généralement une résistance à plusieurs antimicrobiens, notamment la ciprofloxacine et l'érythromycine (**Zhang et al, 2009**).

5-3.2.2 Perméabilisation de la membrane bactérienne

Les bactéries à Gram négatif sont intrinsèquement résistantes à la plupart des antibiotiques en raison de la barrière de perméabilité fournie par la membrane externe (**Hancock, 1985; Hancock, 1997**). La membrane externe est une barrière semi-perméable comprenant une bicouche asymétrique perforée par des protéines formant des canaux appelées porines. La zone des canaux par lesquels des antibiotiques hydrophiles tels que les b-lactames peuvent passer est assez petite (<1% de la surface) et limite donc le taux d'absorption dans la cellule, conduisant à une plus grande efficacité des autres mécanismes de résistance tels que b-lactamases et des pompes à efflux. La couche externe de la membrane est occupée par le lipopolysaccharide (LPS), une molécule poly anionique inhabituelle, qui est stabilisée par le pontage croisé de cations divalents. Cela sert à limiter le passage de composés hydrophobes qui ne peuvent pas se répartir facilement dans la membrane. Les agents qui extraient ou déplacent les cations divalents de cette membrane la rendent de plus en plus perméable aux substances hydrophobes et hydrophiles et même aux petites protéines comme le lysozyme (**Hancock et Wong, 1984 ; Scott et al., 1999**). Il existe en effet plusieurs polycations, par exemple des polymyxines, des aminosides, des peptides antimicrobiens

cationiques et des macrolides dibasiques (azithromycine) qui sont reconnus dans le processus de la perméabilisation membranaire (**Hancock, 1997**). Ils interagissent sur ce site localisé au niveau de la membrane externe, ce qui provoque une déstabilisation locale de la membrane et donc une perméabilité aux interactions, un processus appelé « self-promoted uptake ». Dans le même temps, d'autres composés, y compris les antibiotiques, peuvent plus facilement pénétrer dans la membrane perméabilisée (**Scott et al., 1999**).

Ainsi, les perméabilisants représentent une méthode par laquelle l'activité des antimicrobiens, sévèrement limitée par la présence de la membrane externe, peut être augmentée. Ces composés sont typiquement cationiques et amphiphiles ou des chélateurs, qui peuvent être développés à partir de peptides, de composés analogues aux peptides, de polymères ou de lipides, tels que, par exemple, des peptides antimicrobiens (**Hancock, 1997 ; Scott et al., 1999**) et de l'acide cholique (**Savage, 2001 ; Schmidt et al., 2001**).

Ces propriétés physico-chimiques sont assez générales et, par conséquent, certains agents sont des agents perméabilisants beaucoup plus efficaces que d'autres (**Vaara, 1991**). Une étude a examiné l'aptitude de divers composés à perméabiliser la membrane externe des souches de *P. aeruginosa* et a démontré l'efficacité de l'acide citrique, de la polyL-lysine, de l'EDTA et du nonapeptide de polymyxine B (PMBN), une version désacylée de la polymyxine sans activité antibiotique mais conservant l'activité de perméabilisation membranaire de la polymyxine B (**Hancock et Wong, 1984**).

D'autres études ont montré que les peptides cationiques sont absorbés par l'absorption « self-promoted uptake » (**Hancock, 1997**) et peuvent donc agir comme des agents perméabilisants montrant une synergie dans la pompe à efflux de *P. aeruginosa* avec la ciprofloxacine, la carbénicilline et l'acide nalidixique (**Hancock, 1997**). L'amélioration de l'activité bactéricide de l'endolysine EL188 de bactériophage hautement muralytique a également été étudiée et une synergie

a été démontrée avec l'EDTA, l'acide citrique, la poly-L-lysine et le perméabilisant PMBN (**Briers et al., 2011**). Dans un autre exemple, les diamines ont été utilisées pour améliorer la perméabilisation de la membrane, montrant une amélioration des effets bactéricides causés par la novobiocine et la tyrocidine et une induction de la fuite d'ion K^+ du cytoplasme bactérien (**Ando et al., 2012**).

5-3.3 Méthodes de lutte contre la résistance bactérienne développée au sein d'un biofilm

Diverses explications ont été fournies pour expliquer la résistance adaptative dans les biofilms, notamment la diffusion limitée d'antibiotiques, la liaison à des composants de la matrice tels que l'ADN, la croissance et le métabolisme limités des cellules au sein du biofilm, la présence de persistants et la régulation positive des mécanismes de résistance dans le cadre du profil transcriptionnel modifié des biofilms (**De La Fuente-Nunez et al., 2013**). Dans le but de sélectionner une nouvelle classe d'adjuvants, des études ont été menées sur des peptides synthétiques. Parmi ceux-ci, le peptide 1018, un petit peptide synthétique cationique qui a été développé à partir de la bacténécine, un antibiotique peptidique isolé à partir des cellules sanguines du bovin (**Wu et al., 2010 ; Wiczorek, 1999**) avait non seulement une activité antibiofilm à large spectre (**De La Fuente-Nunez et al., 2014**), mais aussi une forte synergie avec des antibiotiques hautement utilisés (ceftazidime, tobramycine, imipénème et ciprofloxacine) (**Reffuveille et al., 2014**). Il a également été démontré précédemment que le peptide humain LL-37 et le peptide synthétique 1037 issu d'une librairie aléatoire, empêchent la formation de biofilms à des concentrations ne représentant que des fractions de leur CMI (**Overhage et al., 2008 ; De La Fuente-Nunez et al., 2012**). De nombreux autres agents anti-biofilm sont en cours de développement et ont récemment été discutés (**De La Fuente-Nunez et al., 2013**).

6- Souches bactériennes étudiées dans le cadre de la thèse

6-1 Origine, conditions de prélèvements et de conservation

Les bactéries étudiées au cours de cette thèse font partie d'une collection de souches isolées de la Méditerranée dans la rade de Toulon. L'isolement de ces bactéries s'est fait dans le cadre des travaux de **Camps en 2011**. Ces souches dénommées « Toulon Collections » (TC), appartiennent principalement aux genres *Halobacillus*, *Persicivirga*, *Polaribacter*, *Agarivorans*, *Shewanella*, *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas*.

Les souches bactériennes ont été isolées de la Méditerranée dans la rade de Toulon à partir de plaques de polystyrène, de silicone ou de silicones fluorées immergées dans l'eau de mer. La première campagne s'est déroulée en février 2008 au lieu-dit le Mourillon et s'inscrit dans le cadre de la thèse soutenue par Mercedes Camps en 2011 (**Camps, 2011**). Les plaques ont été immergées 6 heures puis les bactéries ayant adhéré ont été récupérées. Dix souches ont ainsi été isolées mais deux souches n'ont pas pu être cultivées à posteriori (TC2 et TC3). Une partie de ces souches a été partiellement identifiée et caractérisée (**Camps, 2011**). La deuxième campagne d'isolement de bactéries a débuté en juin 2010 à partir de plaques en silicone fluorées immergées 24 heures dans le port militaire de Toulon. Cinq souches ont pu ainsi être isolées (TC11 à TC15). Toutes les plaques récupérées lors de ces 2 campagnes ont été immergées à 1 m de profondeur (**Brian-Jaisson et al., 2014**)

6-2 Genre *Pseudolateromonas*

Les espèces appartenant au genre *Pseudoalteromonas* ont été isolées d'hôtes eucaryotes telles que les algues marines, les moules, les éponges et les tuniciers. (**Egan et al., 2001**). *Pseudoalteromonas* a été découvert en association avec des surfaces vivantes et il pourrait produire des composés bioactifs dans le cadre de son autodéfense contre des spores d'algues, des larves d'invertébrés, des bactéries et des champignons (**Carola et al., 2002**).

Ce genre bactérien est constitué de bacilles Gram négatif, à la fois pigmentés et non pigmentés, aérobies strictes, mobiles à l'aide de flagelles latéraux et/ou polaires, possédant un métabolisme chimio-hétérotrophe (**Bozal et al., 1997**).

Récemment décrit, le genre *Pseudoalteromonas* est le résultat d'une révision taxonomique approfondie basée sur les relations phylogénétiques entre les membres des genres *Alteromonas*, *Shewanella* et *Moritella*. En effet, **Gauthier et al. (1995)** ont suggéré à travers leurs travaux que le genre *Alteromonas* se subdivisait en deux genres, la majorité des espèces étant reclassée dans le nouveau genre *Pseudoalteromonas*, laissant *Alteromonas macleodii* comme la seule espèce d'*Alteromonas*.

En plus des espèces telles que *P. tunicata*, *P. luteolitica*, *P. lipolytica*, l'espèce marine *Pseudoalteromonas ulvae* a été isolée de la surface de l'algue marine *Ulva lactuca*. Il a été démontré que cette bactérie inhibe le peuplement des larves de l'invertébré marin *Balanus amphitrite* et la germination des spores de l'algue verte *U. lactuca* et d'une espèce de l'algue rouge *Polysiphonia* (**Egan et al., 2000**).

6-2.1 *Pseudoalteromonas ulvae*

Cette espèce largement décrite par **Egan et al., 2001**, a été isolée de différents endroits dans le monde : la Méditerranée plus précisément la rade de Toulon pour la souche TC14 (**Brian-Jaisson et al., 2014**), les côtes orientales de l'Australie (**Egan et al., 2001**), les eaux côtières danoises (**Skovhus et al., 2007; Bernbom et al., 2011**);). Basé sur la séquence d'identité de l'ADNr 16S, *P. ulvae* semble être proche de l'espèce *P. tunicata* (**Egan et al., 2001 ; Brian-Jaisson et al., 2014**). Selon **Skovhus et al., 2007**, les deux espèces formeraient le sous-groupe antifouling.

6-2.1.1 Caractères morphologiques et culturels de *P. ulvae*

P. ulvae est une bactérie Gram négatif en forme de bâtonnet, strictement aérobie, oxydase et catalase positive, mobile par le moyen d'un seul flagelle polaire. Les souches *P. ulvae* UL12T, *P. ulvae* UL13 et *P. ulvae* TC14 utilisent le

glucose, le maltose, le citrate, le mannose et le tween 20 comme seule source de carbone et non le lactose, le sucrose, le tréhalose, le fructose, la raffinose, le sorbitol, la xylose, le cellobiose, l'érythritol, l'arabinose, le rhamnose, la L-glutamine et la DL-serine (**Egan et al., 2001 ; Brian-Jaisson et al., 2014;**). En plus, la souche *P. ulvae* TC14 ne produit pas de β -glucuronidase et de α -glucosidase (**Brian-Jaisson et al., 2014**). Sa température optimale de croissance est de 23°C. Elle croît difficilement à 4°C et aucune croissance n'est observée à partir de 35°C. Sa gamme de pH de croissance varie de 5,5 à 12, avec un optimum à pH 8. Pour croître, les souches de *P. ulvae* ont besoin d'un apport en ions Na⁺ dans une concentration optimale de 1 à 2,5% de NaCl. *P. ulvae* TC14 croît en milieux VNSS et MB où elle forme des colonies violettes (**Brian-Jaisson et al., 2014**). Les souches UL12T et UL13 décrites par **Egan et al. (2001)** se développent sur VNSS, LB20, TBS avec 2% de NaCl, mais ne forment de colonies violettes qu'en VNSS (**Egan et al., 2001**). D'autres caractéristiques de l'espèce ont été mises en évidence par **Brian-Jaisson et al., 2014**. Elles se résument au fait que la souche *P. ulvae* TC14 est mobile par swimming, faiblement mobile par swarming et pas mobile par twitching. Elle est hydrophile, pour être capable d'adhérer fortement aux solvants polaires tels que le chloroforme (70%).

6-2.1.2 Production de pigment par *P. ulvae*

Certaines espèces de *Pseudoalteromonas* produisent divers métabolites primaires et secondaires, notamment des antibiotiques, des exopolymères, des enzymes hydrolytiques et des pigments. Les souches telles que *P. luteoviolacea*, *P. tunicata* et *P. ulvae* produisent un pigment pourpre. Chez *P. luteoviolacea*, ce pigment a été décrit comme étant la violacéine et la déoxyviolacéine, (**Skovhus et al., 2007**). Par ailleurs, la production d'un pigment similaire avait été constatée chez *Pseudoalteromonas* sp. 520P1 et *Pseudoalteromonas* sp 710P1 et celui-ci a été caractérisé comme étant la violacéine (**Yada et al., 2008**). Finalement, le pigment produit par la souche *P. ulvae* TC14 a été caractérisé comme étant la violacéine par **Aye et al., 2015**.

6-2.1.3 Propriétés chimiques de la violacéine

La violacéine est un pigment antibiotique à large spectre, de couleur pourpre, produite en condition aérobie par certaines bactéries telluriques comme *C. violaceum* (Demoss et Evans, 1959). C'est un pigment insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol et l'acétone. Son absorption maximale dans le méthanol serait de 585 nm (Blosser et Gray, 2000).

6-2.1.4 Biosynthèse de la violacéine

Depuis plus de 50 ans, la violacéine produite par *C. violaceum* fait l'objet de recherche visant à mieux comprendre le mode de régulation particulier qui contrôle sa synthèse, à connaître les paramètres qui influencent sa production et à mettre en évidence ses intérêts biomédicaux et biotechnologiques (Dessaux *et al.*, 2004).

Le groupe de gènes de biosynthèse de la violacéine avait été précédemment décrit comme comprenant quatre gènes, *vioABCD*. Un cinquième gène (*vioE*) était essentiel pour la biosynthèse de la violacéine, en particulier pour la production du décalage caractéristique (de 1 à 2) du noyau indole (Sanchez *et al.* 2006).

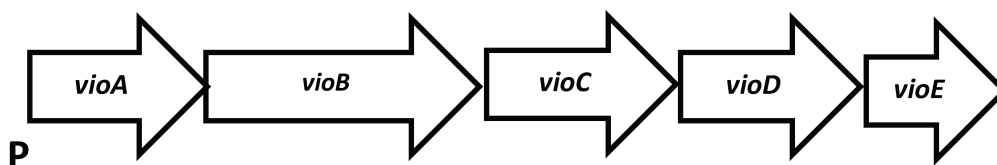
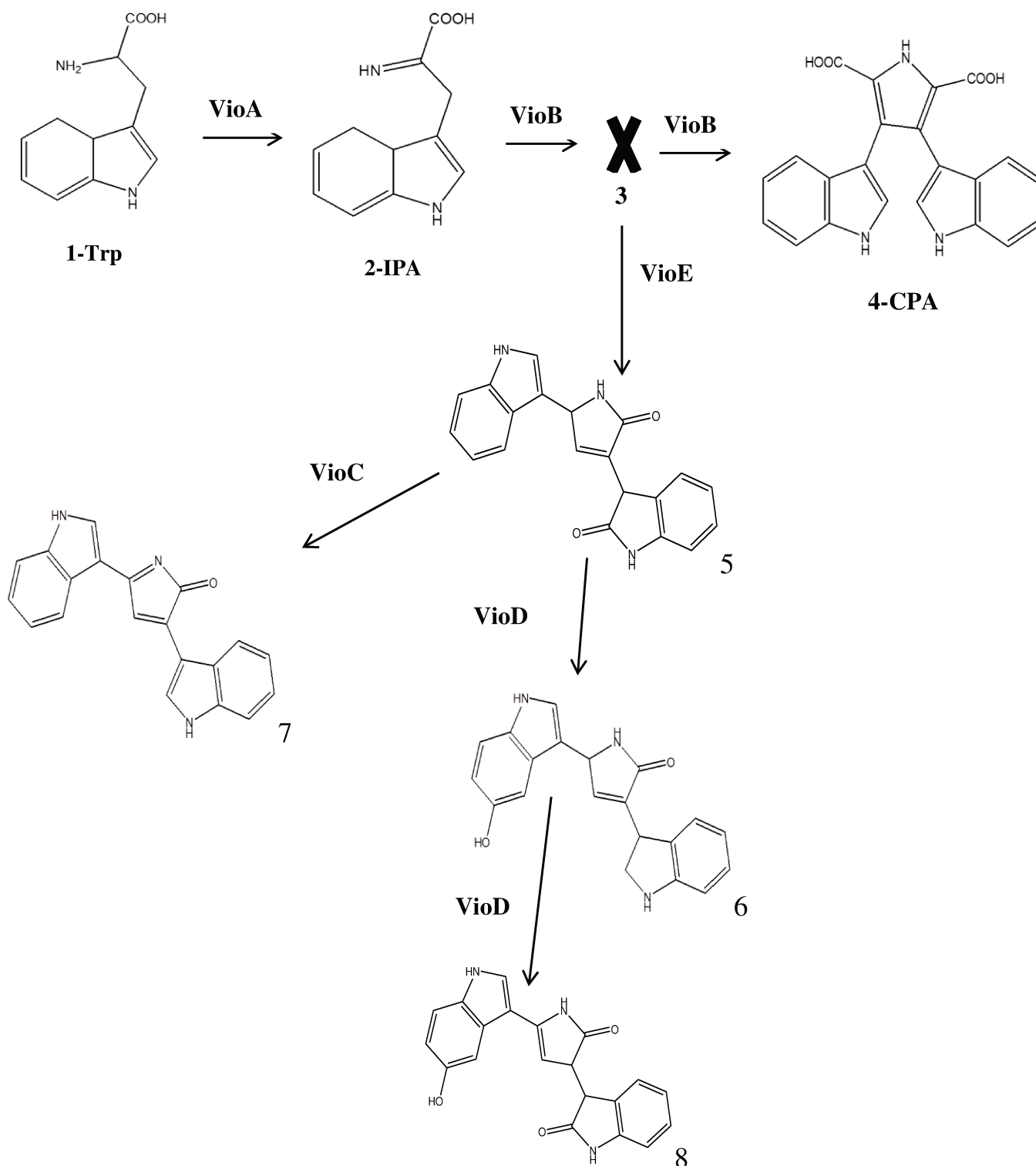


Figure 16 : Description schématique de l'orientation des gènes *vio* sur l'ADN de *Chromobacterium violaceum* ATCC12472 en fonction du promoteur (P) (Sanchez *et al.* 2006).

La description structurale de la molécule de violacéine donne lieu à trois unités : le 5-hydroxyindole, la 2-pyrrolidone et l'oxindole (DeMoss et Evans, 1960). Les voies de biosynthèse de la violacéine et des indolo-carbazoles comprennent une fusion par décarboxylation de deux unités tryptophane. Cependant, dans le

cas de la violacéine, l'un des tryptophanes subit un décalage inhabituel (de 1 à 2) du cycle indole. Ainsi, la formation de la violacéine est le résultat d'une suite de réactions d'oxydation et d'isomérisation. La biosynthèse de la violacéine est décrite dans la **figure 17** ci-dessous.



Source : (Balibar et Walsh, 2006)

Figure 17 : Description schématique de la biosynthèse *in vivo* de violacéine (Balibar et Walsh, 2006). Le tryptophane (Trp), principal précurseur de la violacéine est oxydé en imine (IPA) sous l'action de **VioA**. Deux molécules d'IPA subiront une dimérisation oxydative sous l'action de **VioB**. Ce qui conduit donc à la formation d'une molécule **X**

(contenant 2 imines). La molécule **X** subit une tautomérisation : elle est soit conduite spontanément vers la formation de l'acide chromopyrolique (**4**) (**CPA**) par condensation intramoléculaire, ou soit elle est transformée en prodéoxyviolacéine (**5**) par décalage du groupement indole sous l'action de **VioE**. La prodéoxyviolacéine pourrait soit être directement oxydée en un composé (**7**) ou soit elle est hydrolysée par **VioD** en proviolacéine (**6**). La proviolacéine subira elle aussi une hydrolyse mais cette fois sous l'action de **VioC** pour donner la violacéine (**Balibar et Walsh, 2006**).

6-2.1.5 Le QS comme facteur de régulation de la violacéine chez le genre *Pseudoalteromonas*

La détection du quorum sensing bactérien (QS) est un mécanisme de communication entre cellules et de régulation des gènes qui permet aux bactéries de coordonner la mobilité, la formation de biofilms, la résistance au stress et la production de métabolites secondaires dont le pigment bactérien en réponse à des seuils de concentrations de signaux QS (**Dobretsov et al., 2009**).

Chez *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, un certain nombre de caractéristiques phénotypiques, notamment la production du pigment violet, la violacéine, le cyanure d'hydrogène, les antibiotiques et les exoprotéases, sont connues pour être régulées par l'AHL endogène N-hexanoyl-L-homosérine lactone (HHL) (**Chernin et al., 1998**). Ainsi, *Chromobacterium violaceum* est reconnue comme étant une bactérie dont la production de violacéine est induite par l'AHL (**McClellan et al., 1997**).

En ce qui concerne le genre *Pseudoalteromonas*, très peu d'études ont décrit le système de communication de type QS. Cependant, les résultats d'une étude menée par **Wang et al en 2008** ont suggéré que la production de violacéine dans la souche *Pseudoalteromonas* 520P1 était contrôlée par le QS. En effet, les molécules de signalisation ont été extraites de la culture bactérienne et identifiées par la suite comme étant la N-(3 oxooctanoyl) -homosérine lactone et la N-tétradécanoyl-homosérine lactone. Ces molécules ont été par la suite définies

comme celles qui induisent la production de violacéine chez *Pseudoalteromonas* 520P1 (Wang *et al.*, 2008).

6-2.1.6 Formation de biofilm du genre *Pseudoalteromonas*

Le genre *Pseudoalteromonas* a été décrit dans plusieurs études comme étant capable de former un biofilm. Les espèces *P. tunicata* (Rao *et al.*, 2005), *P. ruthenica* (Saravanan *et al.*, 2006), *Pseudoalteromonas* sp. J36 (Dheilly *et al.*, 2010), *Pseudoalteromonas* sp. D41 (Ritter *et al.*, 2011) et *P. ulvae* TC14 (Brian-Jaisson *et al.*, 2014) en ont été des illustrations. Dans cette étude la formation de biofilm de *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 sera entre autre évaluée. Déjà, les études menées par **Brian-Jaisson et collaborateurs (2014)** ; **Aye et collaborateurs (2015)** sur l'évaluation de la formation de biofilm de *P. ulvae* TC14 en BFRT et en cristal violet ont révélé que la souche est capable de former un biofilm mature en microplaque dès 24h en milieu VNSS et en milieu MB.

6-2.2 Les autres souches bactériennes étudiées au cours de cette thèse

En plus de *P. ulvae*, deux souches dénommées *Pseudoalteromonas lypolitica* TC8 et *Paracoccus* sp. 4M6 ont été étudiées. Les différents aspects évalués chez *P. ulvae* tels que la capacité d'adhésion au polystyrène et la formation de biofilm ont été examinés chez *P. lypolitica* TC8 et *Paracoccus* sp. 4M6.

6-2.2.1 *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8

Issue du genre *Pseudoalteromonas* préalablement décrit comme un bacille Gram négatif, l'espèce *Pseudoalteromonas lypolitica* est mobile au moyen d'un flagelle polaire. Les cellules sont droites, légèrement incurvées et en forme de tige (de 0,5 à 0,8 mm de largeur et de 1,0 à 2,0 mm de longueur) aux extrémités arrondies et chimio-organotrophes. Les colonies sur MA (Marine Agar) ont un diamètre de 1 à 2 mm, sont lisses, circulaires et non pigmentées après 48 h. La croissance de *Pseudoalteromonas lipolytica* nécessite du Na⁺ ou de l'eau de mer. Les colonies sont observées en présence de 0,5 à 15,0% de NaCl. La concentration optimale de NaCl pour la croissance est de 3,0%. La croissance à pH 5,5–9,5 et

15–37 °C (croissance optimale à pH 7,0–8,0 et 25 °C) est observée. Aucune croissance n'est détectée à 4 °C ou au-dessus de 45 °C (**Xu et al., 2010**).

Par ailleurs, l'adhésion et la formation de biofilm de *Pseudoalteromonas lipolytica* ont été évaluées par **Aye et al., 2015** et **Andjouh et Blache, 2015** en milieu VNSS et MA. Les résultats ont montré une bonne capacité d'adhésion et de formation de biofilm dès 24h par la souche TC8 en microplaque.

6-2.2.2 *Paracoccus* sp. 4M6

Le genre *Paracoccus* est composé de bactéries à Gram négatif. Il est oxidase et catalase positif, et présentent une grande polyvalence métabolique. À l'heure actuelle, le genre *Paracoccus* comprend 17 espèces reconnues. Phylogénétiquement, le genre appartient à la sous-classe des Protéobactéries (**Lee et al., 2004**).

Paracoccus sp. 4M6 a également montré une bonne capacité d'adhésion et de formation de biofilm dans les mêmes conditions que *P. lipolytica* TC8 et *P. ulvae* TC14 (précédemment décrites) au cours des travaux menés par **Aye et al., 2015**.

7- Contexte général et objectifs de la thèse

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche de stratégies antifouling respectueuses de l'environnement. Son intérêt se portera principalement sur une bactérie marine nommée *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 issue de la collection du laboratoire MAPIEM. En effet, cette souche productrice d'un pigment pourpre décrit comme étant la violacéine a selon des études précédentes, une bonne capacité d'adhésion et de formation de biofilm en surface synthétique. En outre une étude menée par **Aye et collaborateurs (2015)** a montré que la formation de biofilm et la production de violacéine chez cette souche seraient régulées par des AHLs exogènes. En revanche, elle ne semble pas en produire car aucune n'a été détectée par LCMS. L'un des objectifs de cette thèse est donc de poursuivre la caractérisation moléculaire du QS de *P. ulvae* TC14 par la recherche et l'évaluation de la fonctionnalité des gènes du QS. Il sera également recherché des composés actifs sur le QS permettant l'inhibition du biofilm et d'évaluer si par des méthodes combinatoires des composés de différentes cibles, l'efficacité antibiofilm est augmentée.

La caractérisation moléculaire du QS chez *P. ulvae* TC14 constituera le chapitre 3 de cette étude. Dans cette partie les résultats du séquençage complet du génome de *P. ulvae* TC14 seront présentés ainsi que les différents gènes impliqués dans le QS de cette bactérie.

Le chapitre 4 portera sur la recherche de modulateurs du QS. Dans cette partie de l'étude, les résultats de l'effet des molécules telles que les AHLs (3-oxo-C6-HSL et 3-oxo-C8-HSL), le farnesol, l'eugénol, et acides gras sur la violacéine seront présentés. Ces résultats nous permettront de sélectionner les molécules actives sur le QS de *P. ulvae* TC14.

Une approche combinatoire entre les QSIs ainsi sélectionnés et les composés antifouling mis au point au laboratoire Mapiem a été effectuée dans le chapitre 5. Ce chapitre décrira l'effet de la combinaison d'un composé antifouling et d'un

anti-QS sur l'adhésion et la formation de biofilm par la bactérie. Ceci permettra de savoir si les composés modulateurs du QS pourront renforcer l'effet des composés antifouling ou bien au contraire, restaureront le biofilm chez *P. ulvae* TC14 et deux autres bactéries marines *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6.

Le dernier chapitre de cette étude présentera les résultats de la recherche de stratégies antifouling visant les facteurs de résistance bactériennes chez *P. ulvae* TC14 et les deux autres espèces marines *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6. L'objectif de ce chapitre est de trouver des composés ayant des propriétés différentes et permettant de potentialiser l'effet des composés antifouling dont on dispose. En effet, il conviendra de rechercher des stratégies antifouling visant d'autres cibles telles que les pompes d'efflux et les membranes bactériennes afin de diversifier les moyens de lutte contre le développement du biofilm.

Chapitre II :


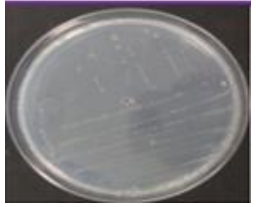

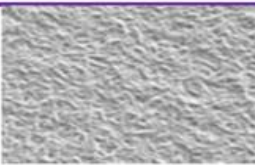

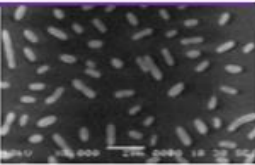
Matériel méthodes

1- Matériel

1-1 Souches marines

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est constitué de bactéries d'origine marine, isolées de la rade de Toulon, appartenant à la collection (TC pour Toulon Collection) du laboratoire MAPIEM. Au sein de cette collection, deux souches appartenant au genre *Pseudoalteromonas* ont été sélectionnées : *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 et *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. Une souche marine, *Paracoccus* sp. 4M6, isolée de l'Océan Atlantique et fournie par le laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines de Lorient (LBCM), a été utilisée comme contrôle positif dans certains tests. Les différentes bactéries sont décrites dans le **Tableau 4** ci-dessous :

Tableau 4 : Description des souches marines étudiées

Souches	TC14	TC8	4M6
Taxonomie	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i>	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	<i>Paracoccus</i> sp.
Type de Gram	Bacille Gram-	Bacille Gram-	Bacille Gram-
Morphologie	Petite Colonie violette 1,5 mm X 1.5mm	Petite colonie jaunâtre ou beige 1,5 mm X 1.5mm	Petite colonie blanchâtre 1,5 mm X 1.5mm
Lieu de prélèvement	Port militaire de Toulon	Mourillon (Toulon)	Golfe du Morbihan
Surface utilisée	Silicone fluorée ELP08/55554/13	Silicone ELP08/55554/13	Verre
Image sur VNSS Agar			
Image au MEB			
Références	(Briand-jaisson et al., 2014)	(Camps et al., 2011)	(Grasland et al., 2003)

1-2 Biosenseurs

Les biosenseurs utilisés dans cette étude proviennent des genres *Vibrio harveyi* et *Chromobacterium violaceum*. Chez *V. harveyi* les mutants tels que BB170 (muté dans *luxI*) et BB886 (muté dans *luxR*) ont été utilisés pour la recherche du type d'auto-induction chez *P. ulvae* TC14. En ce qui concerne *Chromobacterium violaceum*, la souche sauvage ATCC 12472 et la souche mutée CV026 ont été utilisées afin d'établir un lien entre la production de violacéine et le type d'AHLs présents chez *P. ulvae* TC14. En effet, l'ATCC 12472 produit la violacéine à partir de la C6-HSL intrinsèque (McLean et al., 2004) et la *C. violaceum* CV026 produit la violacéine à la détection de la C6-HSL exogène et les AHLs à chaîne latérales courtes (McLean et al., 1997 ; Rumbaugh et al., 2011).

1-3 Cryoconservation des souches bactériennes

Toutes les souches bactériennes (marines et biosenseurs) ont été conservées par cryogénéisation dans des cryotubes stériles de 1,8 mL (Thermo Scientific). Les cryotubes ont été préparés à partir de 750 µL de culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} \geq 0,6$) plus 750 µL de glycérol stérile soit 50% de bactérie en solution finale. Pour chaque souche bactérienne, plus d'un cryotube ont été préparés et conservés à -80°C.

1-4 Milieux de culture et solutions

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pour réaliser cette étude. Il s'agit des milieux spécifiques aux bactéries marines et des milieux essentiellement utilisés pour la croissance des biosenseurs qui sont des souches terrestres.

1-4.1 Väätanen Nine Salt Solution (VNSS) et VNSS agar

Le milieu *Väätanen Nine Salt Solution* (VNSS) a été utilisé pour la croissance des bactéries marines. C'est un milieu non commercial, donc préparé directement au laboratoire à partir des différents réactifs présentés dans le **Tableau 13**. Sa préparation se fait en deux phases comme indiqué dans le Tableau. D'abord, la préparation du NSS à partir de neuf sels, puis celle du VNSS par ajout des

éléments organiques au NSS (Mardén *et al.*, 1985). Après ajout de l'amidon, le milieu devient trouble et il s'avère nécessaire de le porter à ébullition jusqu'à ce qu'il devienne limpide. Son pH après autoclavage est de 7,6. Le VNSS agar (VNSSA) quant à lui a été obtenu par ajout de 1,5% (p/v) d'agar (Sigma Aldrich, France). Dans cette étude, le milieu VNSS a été utilisé pour les cultures planctoniques et sessiles des souches marines.

Tableau 5 : Composition du milieu VNS

Réactifs	Quantité (g/L)
Préparation du NSS	
NaCl	17,600
Na₂SO₄	1,470
NaHCO₃	0,008
KCl	0,250
KBr	0,040
MgCl₂ 6H₂O	1,870
CaCl₂	0,310
SrCl₂	0,010
H₃BO₃	0,010
Préparation du VNSS	
Peptone	1,000
Extrait de levure	0,500
Glucose	0,500
Amidon	0,500
FeSO₄ 7H₂O	0,500
Na₂HPO₄	0,010

1.4.2 Marine broth (MB) et Marine agar (MA)

Le milieu Marine Broth (MB) (Becton, Dickson and company) est aussi un milieu spécifique aux bactéries marines. Certaines bactéries marines de notre laboratoire exigent ce milieu pour leur croissance. C'est un milieu plutôt délicat à la préparation, car après autoclavage, il a tendance à devenir turbide. Pour y remédier, il faut le filtrer sur une membrane de 0,2 μm (PVDF, Millipore), ce qui risque toutefois de modifier sa composition chimique finale (Tableau 14). Son pH après autoclavage est de 7,6. Il est donc surtout utilisé sous sa forme gélosée, le milieu Marine agar (MA) (Becton, Dickson and company). Sa composition diffère de celle du MB seulement dans la concentration de l'élément MgCl_2 (8,8 g/L au lieu de 5,9 g/L) et aussi par la présence de l'agar (1,5%) (p/v).

Tableau 6 : Composition chimique du milieu MA

Réactifs	Quantité (g/L)
Peptone	5,0000
Yest extract	1,0000
NaCl	19,4500
Na ₂ SO ₄	3,2400
Na ₂ CO ₃	0,1600
KCl	0,5500
KBr	0,0800
MgCl ₂	8,8000
CaCl ₂	1,8000
SrCl ₂	0,0340
H ₃ BO ₃	0,0220
C ₆ H ₅ FeO ₇	0,1000
NAF	0,0024
(NH ₄)NO ₃	0,0016
Na ₂ HPO ₄	0,0080
Na ₂ SiO ₃	0,0040
Agar	15,0000

1.4.3 Sea Salt (SS)

Le Sea Salt (Sigma Aldrich, St Quentin, France) ou eau de mer artificielle (artificial sea water ou ASW) est une solution dépourvue de source de sucre et de carbone organique. Sa composition permet de maintenir les bactéries marines dans des conditions proches de celles de l'eau de mer. Il a été utilisé pour induire un état de « stress » nutritif chez les bactéries marines, afin de favoriser l'adhésion et la formation d'un biofilm *in vitro*. Il contient les éléments chimiques décrits dans le **Tableau 7**.

Tableau 7 : Composition chimique du Sea Salt (Sigma Aldrich)

Réactifs	Quantité (mg/L)
Cl	19290,00
Na	10780,00
SO ₄	2660,00
Mg	1320,00
K	420,00
Ca	450,00
HCO ₃	200,00
Sr	8,80
Br	56,00
B	5,60
I	0,24
Li	0,30
Elément trace	0,50

1.4.4 Luria Bertani broth (LB) ou LB agar

Le milieu LB (Sigma Aldrich, France) est un milieu nutritif commercial, généralement utilisé pour la croissance des souches non marines ou pathogènes. C'est un milieu non tamponné qui a un pH de 7,2 après autoclavage. Dans cette étude, il a servi à faire pousser tous les biosenseurs.

Sa composition chimique très simple est reportée dans le **Tableau 8**

Tableau 8 : Composition chimique du LB

Réactifs	Quantité (g/L)
NaCl	5
Tryptone	10
Extrait de levure	5

1.4.5 Tampon PBS

Le PBS est une solution tampon phosphate saline qui sert de façon générale à rincer les cellules, afin d'enlever les traces de milieu ou de composés (marqueurs) avant tout traitement ou lecture. Dans cette étude, il a servi aux lavages des biofilms des bactéries marines au cours des récoltes de biofilms. Pour la composition chimique voir Tableau 17. Son pH après autoclavage est de 7,4.

Tableau 9: Composition chimique du tampon PBS

Réactifs	Quantité (g/L)
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

1-5 Réactifs, antibiotiques et autres composés

1-5.1 Préparation des réactifs et antibiotiques

Les réactifs tels que le Syto 61 et le Syto 9 (Sigma Aldrich) ont été utilisés à une concentration de 1µM pour le marquage des bactéries adhérentes en microplaques noires polystyrène (Grosseron).

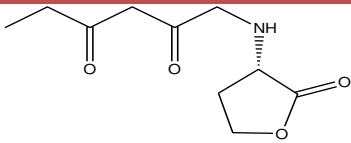
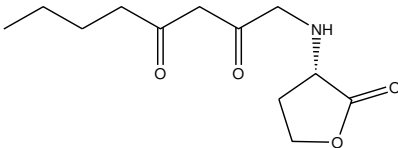
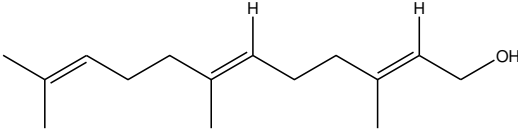
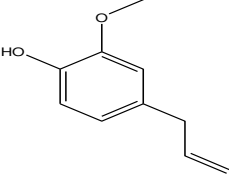
Les antibiotiques tels que le chloramphénicol et la kanamycine (Sigma Aldrich) ont été préparés respectivement à 5 mg/mL et à 10 mg/mL, dans de l'éthanol absolu (VWR) et dans de l'eau distillée stérile. Ils ont servi à la mise en culture de *V. harveyi* (MM32, BB170 et BB886) dans le but de maintenir leurs plasmides.

1-5.2 Description des molécules à tester

1-5.2.1 Les molécules commerciales utilisées comme modulateurs du QS chez *P. ulvae* TC14

Parmi les molécules utilisées au cours de cette thèse, deux AHLs commerciaux fournis par Sigma Aldrich, soit la *N*-(3-oxohexanoyl)-*L*-homoserine lactone 3-oxo-C6-HSL et la *N*-(3-oxooctanoyl)-*L*-homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL) 3-oxo-C8-HSL ont été utilisées à une concentration stock de 5 mM en solution stock, resuspendues dans du milieu de culture et avec 10% de DMSO. A ces deux AHLs, les molécules telles que Farnesol et eugénol également fournies par Sigma Aldrich ont été utilisées dans cette étude. Les informations concernant ces quatre molécules sont énumérées dans le **tableau 10** ci-dessous :

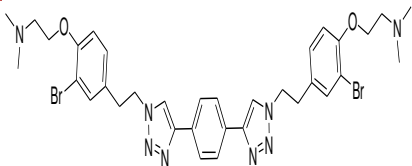
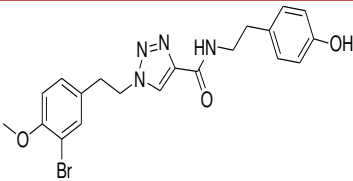
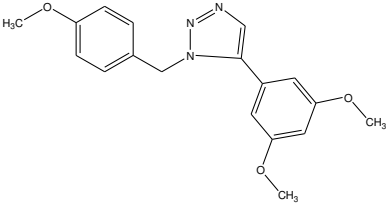
Tableau 10 : Molécules utilisées comme modulateurs du QS chez TC14

Composés	Structures	Masse moléculaires (g/mol)
<i>N</i> -(3-oxohexanoyl)- <i>L</i> -homoserine lactone 3-oxo-C6-HSL		213,00
<i>N</i> -(3-oxooctanoyl)- <i>L</i> -homoserine lactone (3-oxo-C8-HSL)		241,00
Farnesol		222,37
Eugénol		164,20

1-5.2.2 Les composés synthétisés au Laboratoire MAPIEM

Des tests antibiofilm chez les bactéries marines ont été réalisés avec des analogues de produits naturels marins au laboratoire. Ces composés (**Tableau 11**) ont été préparés à un stock de 10 mM, testés seuls et en combinaison avec d'autres molécules.

Tableau 11 : Composés marins synthétisés au laboratoire MAPIEM

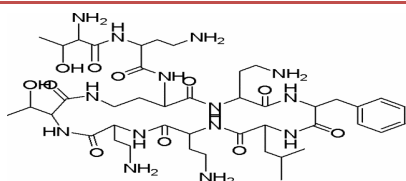
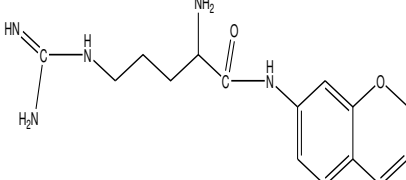
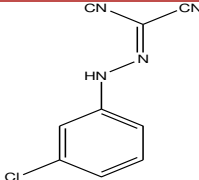
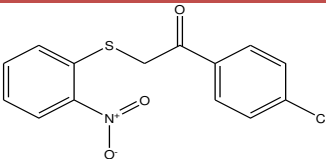
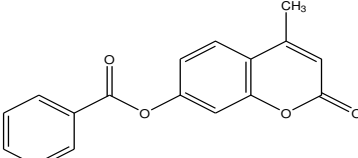
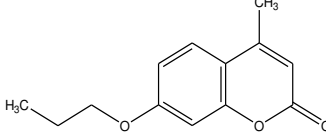
Composés	Structures	Masses molaires (g/mol)	Références
AS162		752,54	Andjouh et Blache, 2019
AS194		462,00	Andjouh et Blache, 2015
OB1		325,00	Linares et al., 2011

1-5.2.3 Les perméabilisants membranaires et les modulateurs de pompes d'efflux

Des composés de types perméabilisant décrits par **Stutzmann A. (Stutzmann et al., 2017)**, ont été testés seuls et en combinaisons avec les composés synthétisés, sur l'adhésion et la formation de biofilm par les bactéries marines. A cette gamme de molécule, il a été ajouté six composés de la classe des coumarines

préalablement décrit par **Slobodníková et al., 2016** comme étant des composés susceptibles de moduler les pompes d'efflux bactériennes. Ces composés utilisés comme adjuvants sont présentés dans le **tableau 12** ci-dessous.

Tableau 12 : Les composés adjuvants

Composés	Structures	Masses molaires (g/mol)	Références
Les perméabilisants membranaires			
Polymyxin B nonapeptide hydrochloride (PMBN)		963,152	Stutzmann et al. en 2017
Chloramphenicol and Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN)		519,47	
Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)		204,62	
Les modulateurs des pompes d'efflux (dérivés de coumarine)			
VL2		307,50	UMR_MD1, U1261 INSERM, SSA, MCT Faculté de Pharmacie, Aix-Marseille Université
VL17		280,00	
VL19		218,00	

1-6 Analyse moléculaire de la souche *P. ulvae* TC14

1-6.1 Séquençage du génome de *P. ulvae* TC14

Le génome complet de TC14 ainsi que toutes les informations liées aux paramètres d'extraction du génome ont été soumis à Molecular Research LP DNA laboratory (USA) pour séquençage.

1-6.2 Extraction d'ADN chez *P. ulvae* TC14

Une culture de 10 ml de *P. ulvae* TC14 préparée sur la nuit a été effectuée. L'extraction d'ADN a été faite à l'aide de QIAquick gel extraction kit (50) de chez QIAGEN. Les échantillons d'ADN ont été conservés à -20°C.

1-6.3 Extraction et purification d'ARN chez *P. ulvae* TC14

L'ARN a été extrait à partir d'un RNeasy mini kit (50). Celui-ci a été ensuite purifié à l'aide du kit Rneasy clean up (50). Une PCR a été réalisée et un gel 1% d'agarose a été visualisé pour vérifier l'absence de contamination par l'ADN. L'ensemble des échantillons d'ARN obtenu a été conservé à -80°C.

1-6.4 La rétro-transcription de l'ARN en banque cDNA

La production d'ADN complémentaire à partir de nos échantillons de RNA s'est faite à partir du kit High capacity cDNA reverse transcription de chez Thermo Fisher Scientific. Les solutions NAOH et HCL ont été successivement utilisées au cours de cette étape à 1N pour la séparation du cDNA de la membrane bactérienne. Nos échantillons de cDNA ont été ensuite purifiés à l'aide du Qiaquick PCR purification kit de chez QIAGEN.

1-6.5 qRT-PCR

La PCR quantitative s'est faite à l'aide de l'instrument Lightcycler 480 de chez Roche pour les premiers échantillons. Les plaques blanches de 96 puits et le réactif SYBR GREEN I Master fournis également par Roche ont été utilisés, accessible sur le site de l'IUT de l'UTLN. L'analyse des résultats s'est faite à l'aide du logiciel LightCycler® 480 SW 1.5.1. L'expérience s'est poursuivie avec un

appareil de marque Bio-rad disponible dorénavant au laboratoire MAPIEM et le réactif SYBR GREEN de type Bio-rad.

2 -Méthodes

2-1 Cultures des souches bactériennes en conditions planctoniques

Les différentes souches bactériennes récupérées des cryotubes préalablement conservés à -80°C ont été mises en culture sur milieu gélosé en boîte de Pétri (VNSS, MBA et LBA). Quelles que soient les conditions de cultures (planctonique ou sessile), une préculture de 5 ou 10 mL est réalisée à partir d'un ou plusieurs clones dans un flacon de 30 mL ou 60 mL.

Les précultures sont réalisées durant une nuit à 20°C sous agitation 120 rpm pour les souches *P. ulvae* TC14, *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6. En ce qui concerne les souches biosenseurs *C. violacuem* CV026 et de *V. harveyi* les précultures ont été incubées à 30°C sous agitation 120 rpm. Une culture de 25 mL ($DO_{600}=0,1$) est ensuite réalisée à partir des précultures dans un erlenmeyer de 250 mL et mise à incubation à 20°C pour TC14, TC8 et 4M6 et 30°C pour *C. violacuem* CV026 et de *V. harveyi*.

La culture a été ensuite incubée jusqu'à la phase post-exponentielle de croissance, soit en début de phase stationnaire, phase propice à la formation de biofilm, à la production de molécules du QS (**Lazazzera, 2000a**) telles que les AHLs (**Fuqua et al., 1994**) et les quinolones (**Diggle et al., 2003**).

2-2 Tests biologiques réalisés

Les AHLs commerciales, les molécules commerciales ainsi que tous les composés, ont été testées sur différents types de mobilités, l'adhésion et la formation de biofilm chez les souches marines. L'effet des AHLs et celui des molécules commerciales a été évalué sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14 et *C. violacuem* CV026.

2-2.1 Tests d'adhésion

2-2.1.1 Principes d'adhésion

Les bactéries marines *P. ulvae* TC14, *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus* sp. 4M6 ont la capacité de s'attacher aux surfaces naturelles ou synthétiques. Ces bactéries ont été décrites pour avoir une bonne capacité d'adhésion sur polystyrène (**Brian-Jaisson et al., 2014**).

2-2.1.2 Protocole d'adhésion

Le protocole utilisé pour réaliser le test d'adhésion a été adapté à partir du protocole du test anti adhésion, mis au point par **Camps et al., en 2011** et repris par **Aye et al., en 2015**. Ce protocole a été repris au cours de cette thèse à la différence que les molécules testées dans ce cas-ci sont des AHLs commerciales, et les composés synthétisés au laboratoire.

❖ Préparation des différentes molécules à tester

Les AHLs, les molécules commerciales, les composés synthétisés au laboratoire et autres molécules ont été préalablement solubilisées dans du DMSO, de sorte à obtenir une concentration stock de 10 mM, puis diluées dans l'ASW, pour atteindre les concentrations de 10, 50, 100, 150 et 200 μ M.

❖ Préparation des bactéries

Les bactéries marines (TC14, TC8 et 4M6) ont été au préalable mises en culture dans du VNSS liquide à 20°C sous agitation 120 rpm jusqu'en début de phase stationnaire. Les cultures ont été ensuite centrifugées à 6000 rpm pendant 10 min. Ensuite, le milieu VNSS a été retiré et remplacé par l'ASW, de sorte à obtenir une concentration bactérienne finale égale à 0,8 ($DO_{600nm} = 0,8$). L'ASW permet de maintenir les bactéries en vie tout en limitant leur croissance, favorisant ainsi leur adhésion.

❖ Ensemencement des microplaques

Les microplaques noires (Fluoronunc F96), ont été utilisées pour réaliser le test d'adhésion des bactéries marines en présence des AHLs commerciales. Quatre AHLs ont été testées par microplaque, à quatre concentrations finales différentes (5, 50, 100 et 200 μM). Les échantillons « tests » ont été réalisés en triplicats avec 100 μL de solution d'AHL et 100 μL d'inoculum bactérien. Parmi les échantillons « témoins », l'échantillon « blanc » a aussi été préparé en triplicats, à partir de 100 μL de solutions d'AHL et de 100 μL d'ASW sans bactéries. L'objectif du « blanc » est de vérifier l'absence d'interaction entre les AHLs, le marqueur et l'ASW lors de la lecture en microplaque et d'éliminer le bruit de fond lié au marquage. D'autres types de témoins ont également été réalisés dans cette étude. Il s'agit (i) du témoin bactérien d'adhésion, constitué de bactéries seules sans AHL, réalisé en deux triplicats, à partir de 100 μL d'inoculum bactérien et de 100 μL d'ASW. Il sert de référence d'adhésion. (ii) le témoin solvant, réalisé en triplicats à partir de 100 μL de DMSO et 100 μL de suspension bactérienne. Il correspond au pourcentage maximal de solvant toléré par les bactéries et permet de vérifier qu'une éventuelle activité pro-adhésion ou anti-adhésion observée ne soit pas liée à un effet du solvant. Après ensemencement, la microplaque a été incubée à 20°C sous agitation 120 rpm pendant 15h à 24h. Après la période d'incubation, les bactéries non-adhérées ont d'abord été éliminées par retournement de la plaque. Ensuite, les bactéries adhérentes ont subi trois lavages successifs avec une solution de NaCl à 36 g/L (200 μL par puits), puis elles ont été marquées avec un marqueur fluorescent de l'ADN, le SYTO® RED 61 à 1 μM . Par la suite, les microplaques ont été incubées à l'obscurité pendant 20 min. Après 20 min, le marqueur a été retiré par retournement de la plaque et un dernier lavage a été fait avec la solution de NaCl, suivi de la lecture de la fluorescence dans chaque puits à partir d'un lecteur de microplaque (TECAN, Infit M 200 pro) aux longueurs d'excitation $\lambda_{\text{ex}} = 628 \text{ nm}$ et d'émission $\lambda_{\text{em}} = 645 \text{ nm}$. Chaque essai a été réalisé en triplicat.

Le pourcentage d'adhésion a été calculé selon la formule mathématique suivante :

$$\% \text{ adhésion} = (\text{IFT}-\text{IFPdt}) / (\text{IFTB}-\text{IFBlc}) \times 100$$

Avec:

***IF**= Intensité de Fluorescence

***IFT** = Moyenne des triplicats d'IF pour chaque concentration d'échantillon test (Molécule testée) (Molécule + bactéries + marqueur)

***IFPdt** = Moyenne des triplicats d'IF des échantillons blancs (Molécule + marqueur sans bactéries)

***IFTB** = Moyenne des six réplicats d'IF du témoin bactérien (Bactéries +marqueur)

***IFBlc** = Moyenne des réplicats du blanc milieu (ASW + marqueur)

Un ratio d'adhésion (IFTB-IFBlc) supérieur ou égal à 2,5 a été choisi comme indicateur d'adhésion bactérienne (Aye et al., 2015).

2-2.2 Tests de biofilm

2-2.2.1 Principes

La phase d'adhésion des cellules bactériennes en surface est suivie de la formation de biofilm. La masse de biofilm peut être évaluée par plusieurs techniques entre autres, celle du Biofilm Ring Test (BFRT) et du marquage au Cristal Violet (CV). Dans cette thèse, la technique de marquage de la masse de biofilm au CV a été privilégiée.

Le CV est une des méthodes colorimétriques les plus connues pour marquer l'ADN des bactéries présente dans la matrice d'un biofilm. Il permet de colorer

les cellules chargées négativement aussi bien que les polysaccharides des EPS (Li *et al.*, 2003 ; Amaya *et al.*, 2012 ; Pantanella *et al.*, 2013).

2-2.2.2 Protocole de marquage du biofilm au CV

Le test au CV a été réalisé tel que décrit par Li Y. (Li *et al.*, 2012) avec quelques modifications. Les différentes étapes telles que la réalisation des pré-cultures et cultures bactériennes dans du VNSS, les centrifugations et dilutions dans de l'ASW (jusqu'à $DO_{600}=0,8$) effectuées au cours du test d'adhésion ont été reprises pour le test du CV. La différence est que le test du CV a été réalisé dans les microplaques transparentes de 96 puits. Ces microplaques soigneusement remplies (200 μ L/puits) par les différents échantillons à tester, ont été incubées à 20°C en condition humide sous agitation à 120 rpm. La formation de biofilm a été mesurée à 24, 48 et 72 heures. Après le temps d'incubation, trois rinçages au NaCl (200 μ L/puits) sont appliqués à chaque plaque afin d'éliminer les bactéries non adhérentes. Les cellules sont ensuite fixées à une température de 50 °C pendant 30 min afin d'évaporer la quantité résiduelle de NaCl et faciliter la pénétration du CV à travers la membrane. La masse cellulaire (biofilm) ainsi fixée est marquée par ajout de 200 μ L de CV (à 0.01%) dans chaque puit. Après 15 min de repos, les puits sont à nouveau rincés au NaCl par trois fois, afin d'éliminer l'excès de CV. Les plaques sont ensuite séchées à température ambiante pendant 10 min. Après séchage, 200 μ L d'éthanol (100%) sont ajoutés dans chaque puits et l'ensemble est laissé sous agitation pendant 15 min. Un transvasement est fait dans de nouvelles plaques et le taux de CV solubilisé par l'éthanol est déterminé au TECAN (TECAN, Infini M200 pro) à une longueur d'onde de 570 nm. Le résultat des tests tiendra compte de la moyenne des triplicats pour chaque concentration d'échantillon test. Le pourcentage de biofilm est calculé comme celui de l'adhésion (voir 2-2.1.2 Protocole d'adhésion/ ensemencement en microplaque).

2-2.3 Dosage de la violacéine chez *P. ulvae* TC14

2-2.3.1 Caractérisation de la violacéine

Comme précédemment mentionné, *P. ulvae* TC14 produit un pigment pourpre caractéristique de la violacéine. L'intérêt porté sur la violacéine dans cette étude est dû au fait que ce pigment soit reconnu comme impliqué dans le mécanisme du QS chez *P. ulvae* TC14 (Aye et al., 2015).

2-2.3.2 Extraction et dosage de la violacéine

L'extraction du pigment pourpre de *P. ulvae* TC14 a été réalisée suivant les protocoles décrits par Wang et al. (2008) et Lu et al. (2009). Un millilitre de culture de bactéries en conditions planctoniques ou sessiles réalisée en milieux VNSS, MB ou LB a été centrifugé à 6000 g pendant 10 min, dans une mini centrifugeuse (Eppendorf mini Spin). Après la centrifugation, le surnageant de culture a été rejeté, puis le culot bactérien a été suspendu dans 1 mL d'éthanol absolu (Fischer, France). La suspension éthanolique obtenue a été soumise à une ultrasonication au bain à ultra-son (Branson Ultrasonic Cleaner) à 245 Watts pendant 20 minutes, dans le but de lyser les cellules jusqu'à ce qu'elles deviennent complètement blanches (après environ 20 min). Après cela, l'extrait éthanolique a été séparé du culot par centrifugation à 10000 g pendant 20 min et l'absorbance du pigment violet a été mesurée à 575 nm au spectrophotomètre (Thermo Scientific, Genesys 20). Le protocole d'extraction et de dosage du pigment est illustré dans la **Figure 18**.

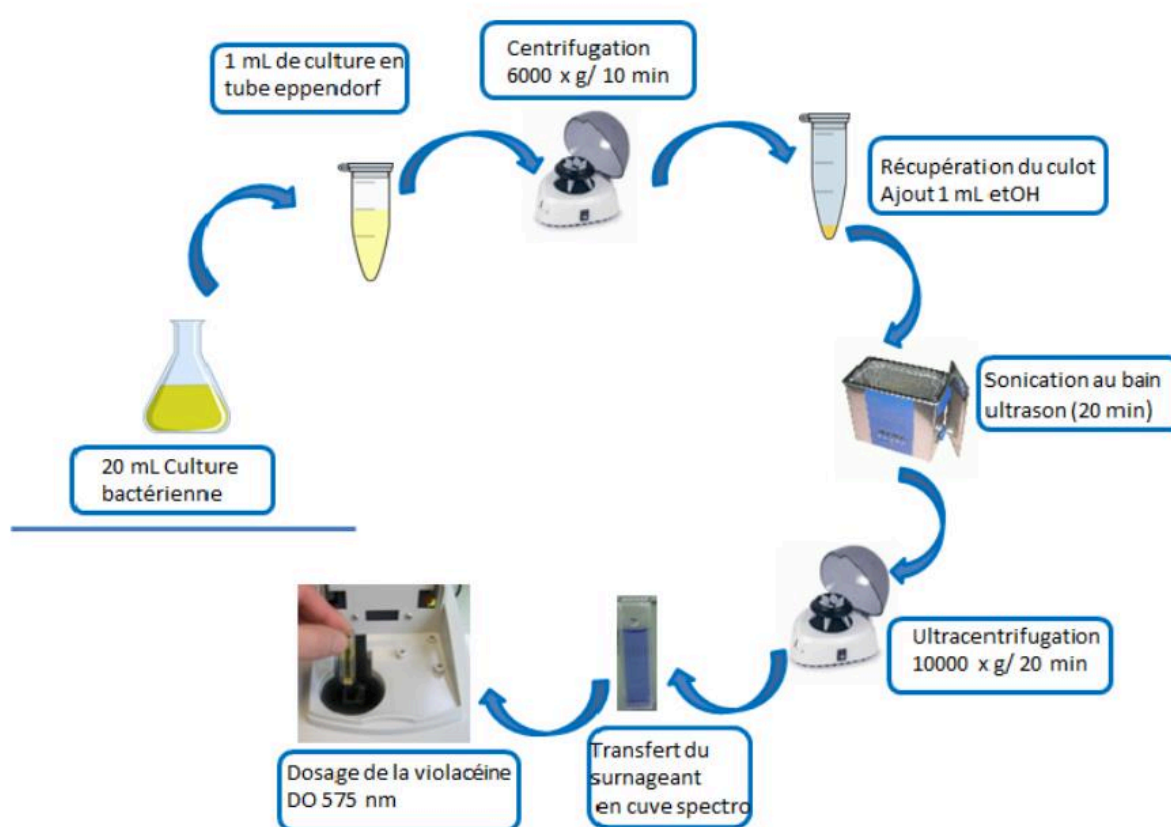


Figure 18 : Représentation schématique du protocole d'extraction de la violacéine

2.2.4 Tests de mobilité

Les différentes classes de molécules utilisées dans cette étude ont été testées sur la mobilité des différentes souches marines. Ainsi, les deux types d'AHL (3-oxo-C6 HSL et 3-oxo-C8 HSL) ont été testés sur le swimming et le swarming de *P. ulvae* TC14. Les dérivés de bromotyrosines ont été également testés sur ces deux types de mobilités. En outre, des combinaisons AHL+ Bromotyrosine ont été testées sur la mobilité des bactéries.

2-2.4.1 Swimming

Le swimming est un des modes de déplacement des bactéries en milieu liquide ou semi-solide. Il est dû à la présence de flagelles qui permet aux cellules de nager de façon individuelle. Le but est de vérifier l'effet des molécules sur la mobilité par swimming des bactéries marines.

Pour cela, 10 mL de la préculture de chaque bactérie testée ont été mis en culture dans un milieu liquide VNSS jusqu'en phase post exponentielle. Parallèlement, une gélose molle de VNSS a été préparée par ajout de 0,3% (m/v) d'agar. La molécule à tester est rajoutée à une concentration finale de 50 μ M par incorporation dans la gélose, avant d'être coulée dans les boîtes de Pétri. Une fois les boîtes séchées, 5 μ L de culture de bactéries ont été déposées sous la forme d'une goutte au centre de chaque boîte de Pétri. Un témoin sans molécule a été réalisé. Les boîtes ont été ensuite incubées à 20°C en conditions statiques. La mesure du diamètre des halos formés par les bactéries mobiles a été effectuée après 48h d'incubation. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2-2.4.2 Swarming

Ce type de mobilité consiste en un déplacement en petits groupes de bactéries de manière organisée sur une surface solide et humide résultant d'une activité intercellulaire ainsi que d'une différenciation morphologique des cellules. Ces modifications permettent aux bactéries de coloniser rapidement de nouvelles surfaces. Le test a consisté à déposer 5 μ L d'une culture de bactérie en phase post exponentielle de croissance sous forme de goutte au centre d'une boîte de Pétri contenant une gélose VNSS solide avec 0,5% d'agar (m/v) à laquelle les molécules ont été au préalable rajoutées, à une concentration finale de 50 μ M. Un témoin sans molécules a été réalisé. La mesure du diamètre des halos formés par les bactéries mobiles a été faite après 48h d'incubation. Chaque triplicat de mesures a été répété trois fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

2-3 Caractérisation moléculaire du système QS chez *P. ulvae* TC14

2-3.1 Condition de culture bactérienne et d'extraction du génome

Une culture sur la nuit de *P. ulvae* TC14 a été réalisée à 20 °C sous agitation à 120 rpm dans du VNSS. Un volume de 2 mL a été prélevé et centrifugé pendant 3 min à 8000 tour/min. L'ADN est ensuite extrait du culot à l'aide du kit QIAamp

genomic DNA kits de chez QIAGEN. La concentration de l'ADN obtenu a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop 2000c spectro de chez Thermofisher Scientific. Ainsi, un volume de 50 µL d'ADN génomique d'une concentration de 338,8 ng/µL, conditionné dans de l'eau distillée a été obtenu et conservé à -20°C. L'ADN a ensuite été envoyé à Molecular Research Laboratory (USA) pour le séquençage.

2-3.2 Méthode de séquençage et assemblage du génome

Le séquençage a été effectué à l'aide du kit de préparation d'échantillon d'ADN Nextera (Illumina) en suivant le guide de l'utilisateur du fabricant. La concentration initiale en ADN a été évaluée en utilisant le kit de test Qubit® dsDNA HS (Life Technologies). Cette méthode a été décrite par **Rothberg J. (Rothberg et al., 2011)** comme étant la mieux adaptée au séquençage de génome d'une grande longueur. Ainsi, 50 ng d'ADN ont été utilisés pour le séquençage. L'échantillon a subi la fragmentation et l'addition simultanées de séquences d'adaptateur. Ces adaptateurs sont utilisés lors d'une PCR à cycle limité (5 cycles) dans laquelle des indices uniques ont été ajoutés à l'échantillon. Après la préparation du génome, la concentration finale de l'ADN a été mesurée à l'aide du kit de test Qubit® dsDNA HS (Life Technologies) et la taille moyenne du génome a été déterminée à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). La bibliothèque a été diluée (à 10,0 pM) et son extrémité appariée séquencée pendant 500 cycles à l'aide du système HiSeq. L'assemblage du génome a été fait à l'aide du logiciel d'analyse de séquence NGEN V12 Ngen, l'annotation avec RAST et la couverture est > 50x.

2-3.3 Design (ou préparation) des amorces issues des différents gènes identifiés

Les primers de *luxR* du système de QS (aucun gene homologue à *luxI* n'a été trouvé) ainsi que de certains gènes homologues aux genes *vio* de *C. violaceum* impliqués dans la production de violacéine ont été désignés. Huit gènes présumés

de *luxR* ont été détectés sur le génome de *P. ulvae* TC14. En plus des gènes *luxR*, ceux de l'opéron violacéine (opéron *vio*). Au total 14 gènes (soit 8 *luxR*, 3 gènes de l'opéron *vio* ainsi que le gène *csgD*, *dgc* et *tda*, impliqués dans la formation de biofilm via le QS ont été retenus pour analyse. A partir des séquences de ces gènes, des amorces ont été définies grâce au site Primer-blast de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Ces séquences de primer ont été fournies à Eurogentec, Belgique pour la production des oligonucléotides. Ces primers obtenus à 50 µM dilué dans de l'eau miliQ ont été conservés à -20°C.

Tableau 13 : Listes et caractéristiques des amorces utilisées

Gènes	Locus tag	Séquences des amorces	Pb
<i>luxR1</i>	B1199_03300	5'-GCATGCCGAACCTAGATGGA-3' 3'-CGAGCTGACCGCTGATAACT-5'	220
<i>luxR2</i>	B1199_02065	5'-AGTCGACACCAACCTACCTG-3' 3'-GGCGAGCAGCATTAAATGGG-5'	115
<i>luxR3</i>	B1199_01515	5'-GAAGGGTTAGCACTGGCGAT-3' 3'-ACGAGAGGTCACGTCATTTCG-5'	119
<i>luxR4</i>	B1199_05620	5'-TATTGGACGATGTTTCGTGGCT-3' 3'-GTAACCGCTTCTTCTCCGGT-5'	64
<i>luxR5</i>	B1199_01760	5'-CCGCATCCGAGAGGATTACC-3' 3'-TATTTGCGCTGCTAACCCGA-5'	241
<i>luxR6</i>	B1199_00340	5'-CACTGTGCCTTCGGCTAAGA-3' 3'-TCGAGCAAGTGCATCAAGGT-5'	197
<i>luxR7</i>	B1199_10560	5'-CAAAGAAGCCCCGAGTGAGT-3' 3'-CGCGGCATCAACACGATTAG-5'	265
<i>luxR8</i>	B1199_07575	5'-ATGCTATCACTTGGCGCTGA-3' 3'-CTTGAGGTGACATTGCCGGA-5'	597
<i>vioA</i>	B1199_06360	5'-CTAGGCCACAAGAGCTGCAT-3' 3'-CGCCAGGTATAGCCTGCATT-5'	256
<i>vioB</i>	B1199_06365	5'-CGATCGAATCGTCCAACCCT-3' 3'-GCTGATGCAAATCTGGCAGG-5'	109
<i>vioD</i>	B1199_06375	5'-AGTCGTGGTATCAAACGGCAT-3' 3'-GCATGCGATCTTCCACACTT-5'	394
<i>vioE</i>	B1199_06380	5'-ATGGTGTTCACACGGCCT-3' 3'-CTCCGGTGATCATAACGTACCAG-5'	89
<i>csgD</i>	B1199_12530	5'-AGTGCCTGCCTAGAGTTC-3' 3'-CGCTATCAGTTACGCACTCT-5'	87
<i>dgc</i>	B1199_06350	5'-ACTGACTTGCAGGCTATC-3' 3'-TGGTATCGGTTGGGCAATGG-5'	150
<i>tda</i>	B1199_06385	5'-GCCTACTGGCACTAAGGTCG-3' 3'-TCAGTGTCTCGTTTGGAGCG-5'	119

2-3.4 Vérification des primers par PCR

Les différents primers ont été vérifiés par PCR sur le génome de *P. ulvae* TC14. Une PCR a donc été réalisée avec 5µL de chaque fragment de primer en présence de 0,2 µg d'ADN génomique grâce au kit Promega Madison WI (USA). Les bandes ont été visualisées en électrophorèse sur un gel de 1Kb contenant 1% d'agarose. La visualisation des bandes a été effectuée à l'aide d'un appareil à Translumination UV de longueurs d'onde variables de marque ETNA (European Technological Network Alliance).

2-3.5 Technique de la reverse transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)

La RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est retro-transcrit grâce à une retro-transcriptase inverse permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc).

L'objectif était de vérifier le niveau des gènes cités plus haut à différents temps de croissance de *P. ulvae* TC14 et d'éventuellement être en mesure de spéculer sur quel gène *luxR* est susceptible de répondre à la présence des AHLs. Les ARN totaux ont donc été extraits du génome de *P. ulvae* TC14 purifiés, la synthèse et la quantification des ADNc produits ont été faites par technique de rétro-transcription à l'aide d'un kit High Capacity cDNA (Themofischer Scientific). Ces ADNc ont été ensuite quantifiés par PCR avec les amorces designées plus haut.

2-3.5.1 Extraction de l'ARN chez *P. ulvae* TC14

Des prélèvements ont été faits suivant une cinétique de croissance à partir d'une culture planctonique de TC14 ($DO_{600}=0,1$) de 25 mL dans un erlenmeyer (250 mL). Les temps de prélèvement sont compris entre 1 et 33h conformément aux différentes phases de croissance de *P. ulvae* TC14. Neuf échantillons de 1mL de culture, prélevés à 1h, 3h, 5h, 7h, 10h, 15h, 23h, 28h et 33h ont été mis dans des tubes Ependorf. Un volume de 2 mL de RNAprotect Bacteria reagent (QIAGEN) a été ajouté puis centrifugé à 8000tr/min pendant 10 min. Les culots obtenus ont été conservés à -80°C . L'extraction des ARN totaux s'est faite à l'aide du RNeasy mini kit et la purification à l'aide du kit RNeasy clean up. Les ARN ont été dosés au Nanodrop. Une étape de PCR a été faite afin de vérifier l'état de pureté de l'ARN. Ces échantillons d'ARN ont été ensuite conservés à -80°C . Trois réplicats biologiques ont été réalisés pour cette étude.

2-3.5.2 Production et purification du cDNA

La production d'ADN complémentaire monocaténaire s'est faite à l'aide du kit High capacity CDNA reverse transcription. Un volume de 10 μ L d'ARN est mis en présence de 10 μ L d'un master mix contenant une reverse transcriptase. Le mélange obtenu est traité selon un programme basé sur une série d'incubation optimisé en fonction du protocole de High capacity cDNA Reverse Transcription kits. Le détail de ce programme est présenté dans le **tableau 14** ci-dessous :

Tableau 14 : Programme d'incubation pour une rétro-transcription d'ARN en cDNA

Etapes	1	2	3	4
Température (°C)	25	37	85	4
Durée (min)	10	120	5	illimitée

Une étape de purification a suivi celle de la production d'ADNc. Le kit de QIAquick PCR purification a été utilisé à cet effet. La concentration d'ADNc obtenu a été évaluée au Nanodrop et l'ADNc conservé à -20°C.

2-3.5.3 La RT q-PCR

Des plaques de 96 puits ont servi à la technique de quantification du cDNA. Une dilution de chaque échantillon de cDNA a été faite jusqu'à atteindre la concentration de 0,2 ng/ μ L. Par ailleurs, de l'ADN génomique a été préparé afin d'établir la gamme standard. Une dilution en cascade a été faite à partir d'un échantillon de DNA génomique de 2 ng/ μ L. Un lot de 6 échantillons de DNA génomique de concentrations comprises entre 2 et 0,00002 ng/ μ L a été obtenu et utilisé comme gamme standard. L'expérience s'est déroulée par ajout de 5 μ L de chaque échantillon dans des puits selon un plan de plaque bien établi. Des puits témoins ont été constitués par ajout d'eau en lieu et place du DNA. Des volumes de 5 μ L de primer et 10 μ L du Master mix contenant le Sybr green (pour le

marquage du DNA génomique et du cDNA) ont été rajoutés dans chaque puits. Les plaques ont été soumises à la lecture dans un appareil RT-qPCR (lightcycler480 ou Bio-Rad) et les résultats ont été traités à l'aide du logiciel correspondant (lightcycler480 SW 1.5.1 ou Bio-Rad CFX Maestro).

2-4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques réalisées dans cette étude ont été effectuées à partir du logiciel GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). L'analyse des données (différents bio-essais) a été effectuée en utilisant les tests ANOVA à un ou deux facteurs (ANOVA one ou two-way). Les effets de traitements ont été séparés avec les post tests à comparaison multiple Bonferroni ou Tukey. Les différences significatives ont été acceptées à partir de $p < 0,05$.

Chapitre III :
Caractérisation du système QS chez *P. ulvae* TC14

1- Introduction :

L'objectif général de cette partie est de caractériser le système Quorum Sensing chez *P. ulvae* TC14. En effet, deux études précédentes effectuées au laboratoire MAPIEM (**Brian-Jaisson et al., 2014** et **Ayé et al, 2015**) ont montré que cette souche avait la capacité de former un biofilm important (**Brian-Jaisson et al., 2014**) et qu'elle pouvait produire un composé identifié comme de la violacéine (**Ayé et al, 2015**). La violacéine est généralement contrôlée par le QS, tel que cela a été montré chez *Chromobacterium violaceum* (**McClellan et al, 1997**). L'étude réalisée par **Ayé**, a montré que *P. ulvae* TC14 ne produisait pas d'AHL mais que certaines AHLs exogènes pouvaient réguler la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14, suggérant l'existence d'un récepteur d'AHL fonctionnel LuxR, (**Ayé et al, 2015**). L'hypothèse était donc que cette souche possédait probablement un gène *luxR*, donc une protéine réceptrice des AHLs qui pouvaient potentiellement moduler l'expression de l'opéron de la violacéine (*vioABCDE*), mais qu'elle ne possédait pas de gène *luxI* puisqu'aucune AHL n'avait été détectée (**Figure 19**). Une caractérisation plus précise du système QS de *P. ulvae* TC14 permettrait de vérifier quels autres phénotypes sont également contrôlés par le QS, tel que l'adhésion ou la formation du biofilm.

Dans ce chapitre, l'objectif est donc d'identifier les gènes impliqués dans le système QS de *P. ulvae* TC14. La première étape a été de séquencer et d'analyser le génome complet de la souche *P. ulvae* TC14. Cette analyse génomique a principalement visé à identifier quels gènes du QS étaient présents en se focalisant sur le système d'auto-induction AI-1 (*luxI* et *luxR*), ceux du système AI-2 (LuxS, LuxQ et LuxP) ainsi que ceux des autres systèmes, même s'ils sont globalement bien moins décrits (**Waters et Bassler, 2005**). Le deuxième objectif était de vérifier l'expression de ces gènes par RT-qPCR ainsi que leur niveau d'expression dans différentes conditions. Il est important de préciser que cette souche n'étant pas pour le moment génétiquement manipulable, il n'a pas été possible pour nous d'effectuer ces vérifications via l'obtention de mutants du système QS.

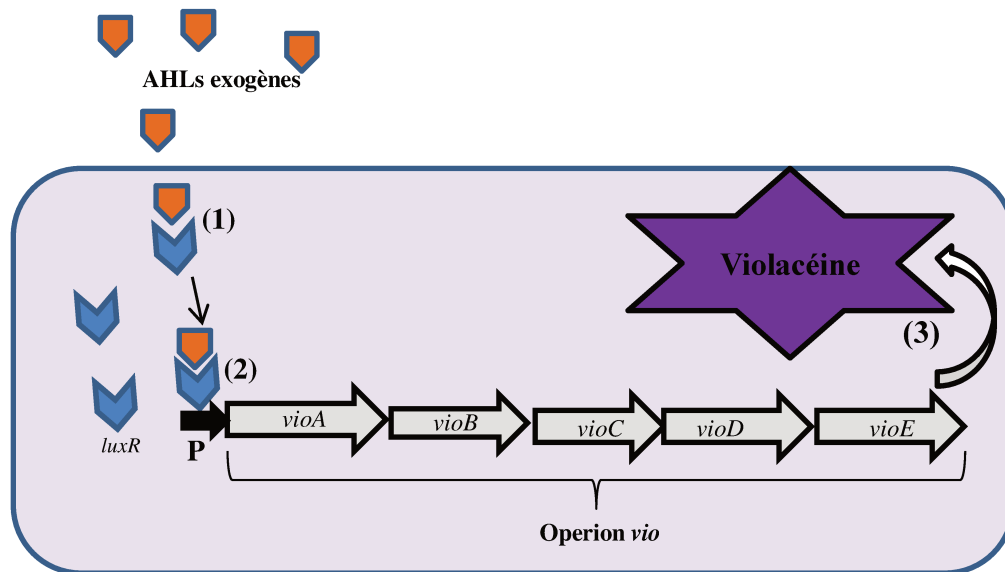


Figure 19 : Représentation schématique de l’hypothèse de la régulation de la violacéine basée sur les AHLs exogènes chez *P. ulvae* TC14. (1) Les AHLs exogènes pénètrent la cellule bactérienne et se lient à leurs récepteurs spécifiques LuxR. (2) L’ensemble AHL-récepteur active les gènes de l’opéron *vio* via le promoteur (P) qui vont ensuite réguler l’expression de la violacéine (3).

2- Séquençage du génome complet de *P. ulvae* TC14

Le séquençage du génome de la souche *P. ulvae* TC14 a été effectué par Molecular Research LP (MR DNA), par la méthode Illumina Hiseq 2500. Un total de 2 293 242 paires de base a été séquencé soit 100% du volume génomique. Les séquences de gènes codant sont au nombre de 1983 et le pourcentage G+C du nombre de base est de 41,55%. Toutes ces informations sont résumées dans le **tableau 15** et la **figure 20** ci-dessous.

Tableau 15 : Données statistiques du génome de *P. ulvae* TC14

Caractéristiques	Nombres	Pourcentage du volume génomique
DNA, nombre total de paires de bases	4586484	100%
DNA, nombres de bases codantes	4114902	89,72%
DNA, G+C nombre de bases	1905706	41,55%
Nombre d'échafauds	14	100%
Nombre total de gènes	4110	100%
Nombre de gènes codant	3966	96,50%
Nombre de gènes RNA	288	3,50%
Famille COG	1682	64,08%
Famille KOG	508	19,35%
Famille pfam	2274	68,89%
Nombre de gènes codant pour les protéines de COGs	2625	63,87%
Nombre de gènes codant pour les protéines de KOGs	696	16,93%
Nombre de gènes codant pour les protéines de Pfam	3301	80,32%
Nombre de gènes codant pour les protéines transmembranaires	978	23,80%

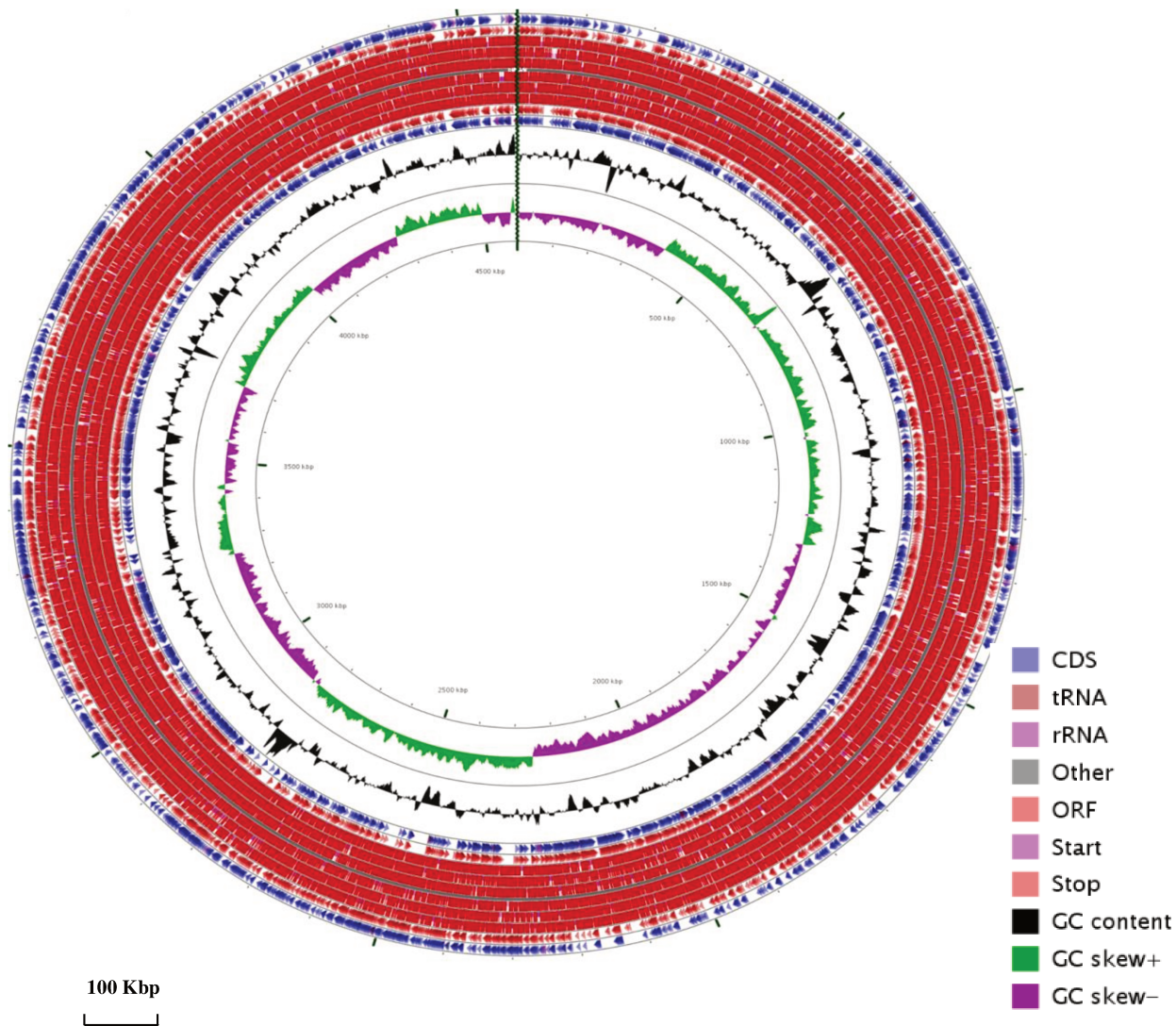


Figure 20 : Carte génomique de *P. ulvae* TC14. La carte génomique a été obtenue avec CGView.

3- Analyse phylogénétique de *P. ulvae* TC14 basée sur le gène de l'ARNr16S

Lors de l'étude de **Brian-Jaisson *et al.*, 2014** sur l'identification de *P. ulvae* TC14 grâce à l'analyse phylogénétique du gène de l'ARNr16S les résultats ont montré que l'espèce la plus proche était *P. tunicata*. Nous avons donc confirmé cette analyse phylogénétique à travers cette étude en montrant que *P. ulvae* TC14 appartient bien à l'espèce *ulvae* et que la plus proche parente est *P. tunicata*. (**Figure 21 et 22**). En revanche, le nombre de nouveaux isolats a complexifié l'interprétation et l'identification des espèces qui seraient leurs plus proches parents. Certaines souches sont regroupées dans des unités taxonomiques bien qu'ayant des affiliations différentes. D'autre part, certains bootstraps sont inférieurs à 70%, ce qui démontre une certaine incertitude quant à leur réel positionnement. Par exemple les différents membres de l'espèce *piscida* ne sont pas regroupés dans une seule unité taxonomique. Ceci suggère que le gène de l'ARNr 16S n'est pas assez discriminant dans cette partie de l'arbre et que d'autres marqueurs phylogénétiques doivent être utilisés. Ceci n'est pas le cas pour l'espèce *ulvae* Puisqu'elle est regroupée avec *P. ulvae* UL12 et le bootstrap qui separe *P. ulvae* de *P. tunicata* est de 93%.

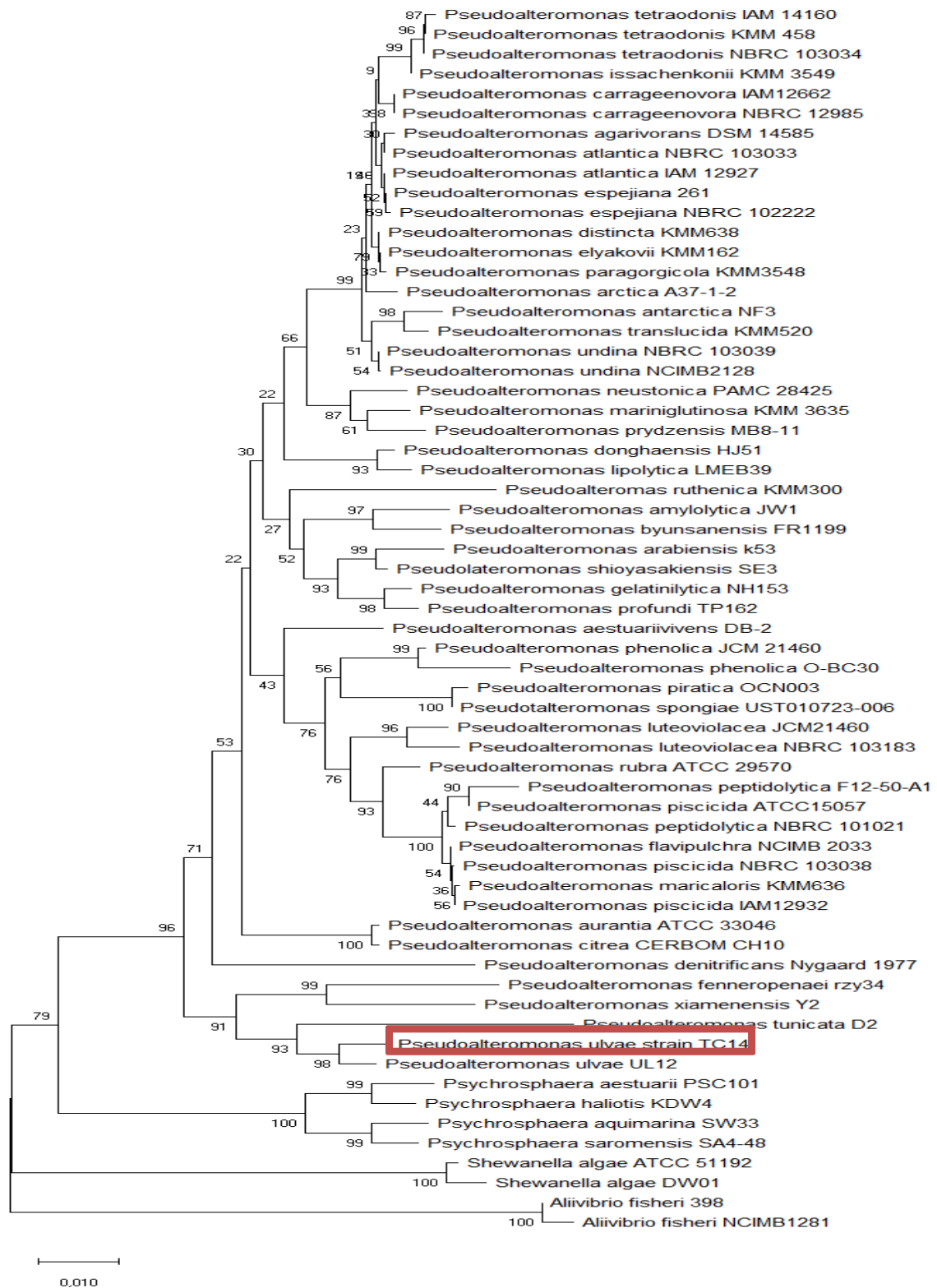


Figure 21 : Arbre phylogénétique du genre *Pseudoalteromonas* basé sur l'alignement des séquences du gène de l'ARNr 16S. Cet arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode des jonctions voisines (Saitou et Nei, 1987). L'arbre optimal avec la somme de la longueur de la branche = 0,70118879 est montré. Le pourcentage d'arbres

de réplication dans lesquels les taxons associés regroupés dans le test d'amorçage (1 000 réplicats) sont indiqués à côté des branches (**Felsenstein 1985**). L'arbre est dessiné à l'échelle 0,01 avec des longueurs de branches dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode de Kimura à 2 paramètres (**Kimura 1980**) et sont exprimées en unités du nombre de substitutions de bases par site. Cette analyse a impliqué 62 séquences de nucléotides. Toutes les positions ambiguës ont été supprimées pour chaque paire de séquences (option de suppression par paire). Il y avait un total de 1537 positions dans le jeu de données final. Des analyses évolutives ont été menées sur MEGA X (**Kumar et al., 2018**).

4- Analyse et comparaison des génomes des souches les plus proches

Cette étude n'a pu être effectuée que sur les souches dont le génome est séquencé et disponible sur le site <https://img.jgi.doe.gov>. Par exemple, les souches *P. xiamenensis* Y2 et *P. fenneropenaei* rzy34, qui sont les souches les plus proches de *P. ulvae* et *P. tunicata* sur l'arbre phylogénétique (**Figure 21**), n'ont pas leur génome disponible dans cette base de données.

Nous avons voulu vérifier et affiner ces résultats avec l'aide des données génomiques en effectuant une analyse deux à deux du pourcentage moyen d'identité des nucléotides (ANI), correspondant à une mesure des similarités génomiques entre les régions codantes des 2 génomes. Grâce aux outils disponibles sur le site <https://img.jgi.doe.gov/> (**Tableau 16**), nous pouvons observer que *P. tunicata* D2 possède l'ANI la plus importante (75,7913%) puis *P. flavipulchra* NCIMB2033 (72,2736%) suivie de *P. phenolica* KCTC 12086 (71,6685%). Nous précisons ici qu'un certain nombre de souches identifiées par analyse du gène de l'ARNr 16s n'ayant pas leur génome séquencé, ce qui est le cas pour *P. ulvae* UL12 par exemple, il n'a été possible de faire l'analyse ANI que sur la base des génomes séquencés disponibles sur IMG JGI.

Tableau 16 : Résultats d'analyse du pourcentage moyen d'identité des nucléotides. L'ANI (Average Nucleotide Identity) est une mesure du niveau de similarité des nucléotides entre les régions codantes de deux génomes. L'AF (Alignement Fraction) est le quotient du BBH (Bidirectionnel Best Hit) par la longueur des gènes du génome 1. Le BBH étant l'indicatif de l'orthologie permettant de définir l'homologie entre deux gènes et par ailleurs permet de prédire qu'un seul gène d'un génome est l'orthologue d'un seul gène de l'autre génome.

Genome1 ID	Genome1 Name	Genome2 ID	Genome2 Name	ANI1->2	ANI2->1	AF1->2	AF2->1
2718218507	<i>P. ulvae</i> TC14	2519899641	<i>P. piscicida</i> ATCC 15057	71.1341	71.1350	33.876	29.248
2718218507	<i>P. ulvae</i> TC14	638341157	<i>P. tunicata</i> D2	75.7913	75.7993	64.726	59.834
2718218507	<i>P. ulvae</i> TC14	2630968884	<i>P. flavipulchra</i> NCIMB 2033 = ATCC BAA-314	72.2728	72.2736	36.223	37.019
2718218507	<i>P. ulvae</i> TC14	2684623173	<i>P. phenolica</i> KCTC 12086	71.6685	71.6826	35.168	33.138
2718218507	<i>P. ulvae</i> TC14	2728369620	<i>P. luteoviolacea</i> DSM6061	71.0796	71.0802	32.462	25.309
2718218507	<i>P. ulvae</i> TC14	2541047006	<i>P. rubra</i> ATCC 29570	70.5949	70.5936	32.371	25.072

Formules de calcul de L'ANI et de l'AF :

$$gANI_{G1 \rightarrow G2} = \frac{\sum_{bbh} (\text{Percent Identity} * \text{Alignment length})}{\text{lengths of BBH genes}}$$

$$AF_{G1 \rightarrow G2} = \frac{\text{lengths of BBH genes}}{\sum \text{length of genes in genome 1}}$$

G1 : Génome 1 ; G2 : Génome 2

Les analyses de clustering (regroupement) des génomes basés sur des profils fonctionnels similaires (pfam en **figure 22** et COG en **figure 23**) permettant de mettre en lumière une relative proximité « fonctionnelle » des échantillons testés *in silico*, confirme que *P. tunicata* D2 est la plus proche « fonctionnellement » de *P. ulvae* TC14. En revanche, la figure 23 basée sur la comparaison des COG (Clusters of Orthologous Groups) montre que *P. rubra* ATCC 29570 et *P. piscida* ATCC 15057 qui apparaissaient plus loin dans l'arbre phylogénétique, semblent être plus proche fonctionnellement de *P. ulvae* que les souches *P. phenolica* KCTC 12086 et *P. flavipulchra* NCIMB2033. En s'intéressant en particulier à la

fonction production de violacéine, il est intéressant de noter que parmi ces souches, seules *P. tunicata*, *P. luteoviolacea* et *P. ulvae* possèdent l'opéron *vio* impliqué dans la production de violacéine. Or *P. luteoviolacea* apparaît plus éloignée phylogénétiquement et d'un point de vue fonctionnel que *P. piscida* par exemple du couple *P. ulvae* et *P. tunicata*. L'une des hypothèses serait que cet opéron n'aurait donc probablement pas été acquis d'un ancêtre commun à toutes les *Pseudoalteromonas* mais aurait été horizontalement transféré d'une part chez *P. ulvae* et *P. tunicata*, et d'autre part chez *P. luteoviolacea*.

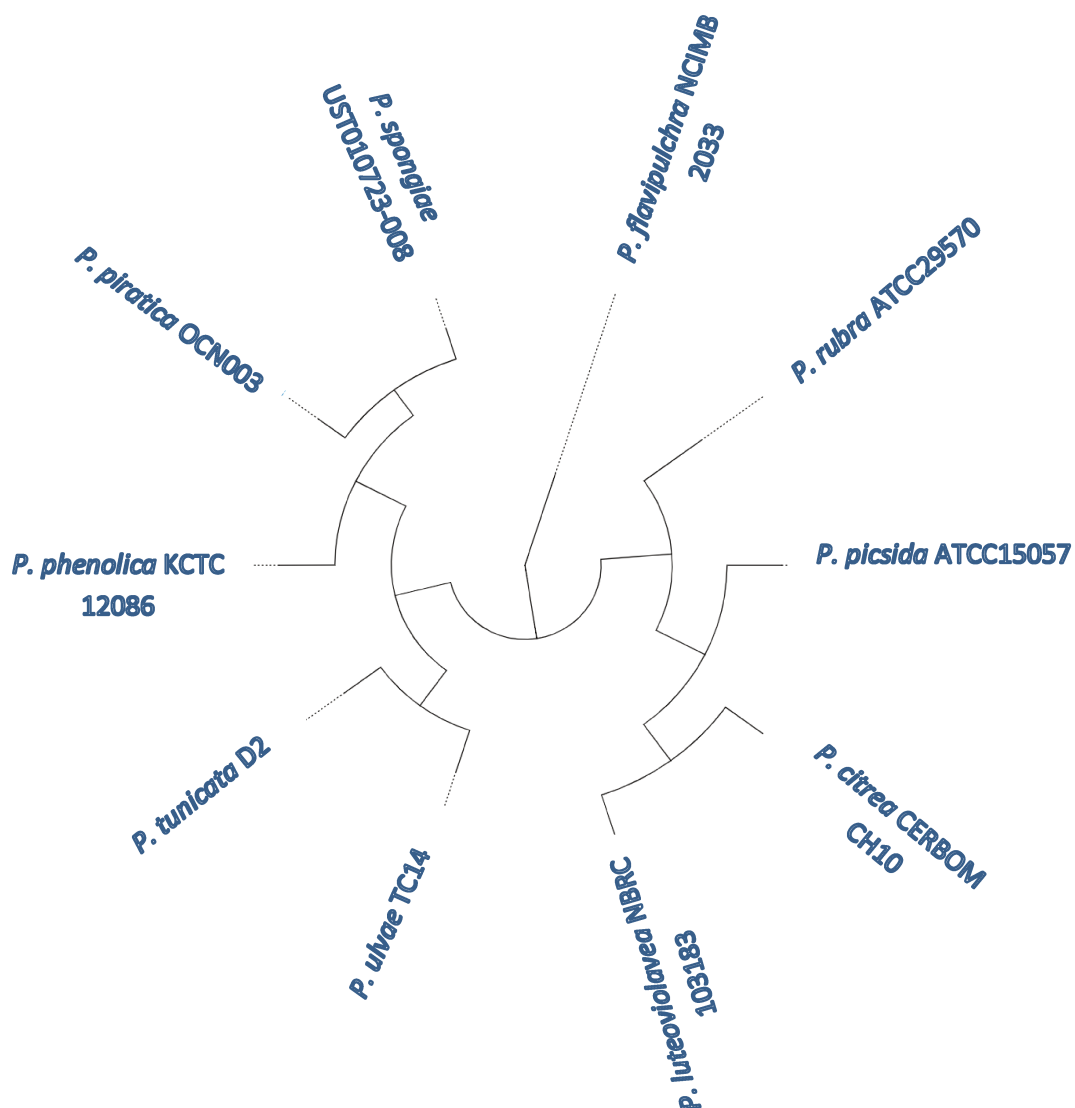


Figure 22 Représentation schématique d'un assemblage de 10 génomes basé sur les profils Pfam des génomes sélectionnés. Le Pfam fournit une classification

complète et précise des familles et domaines de protéines. L'arbre a été généré sur le site <https://img.jgi.doe.gov/>.

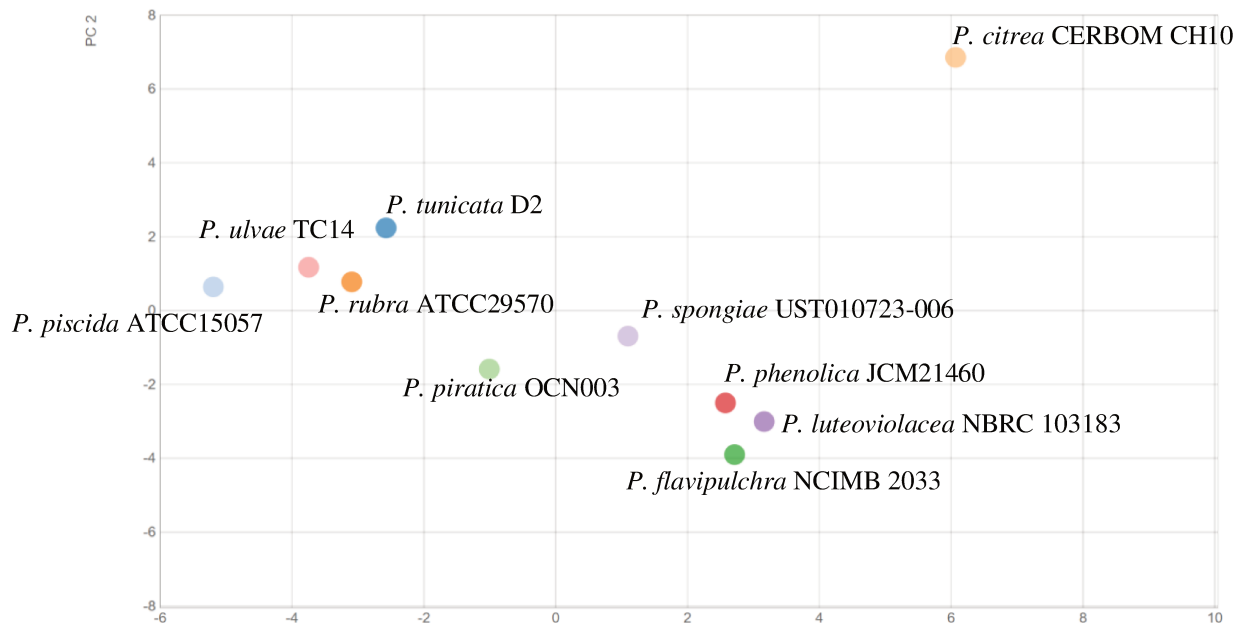


Figure 23 Représentation schématique d'un assemblage de 10 génomes basé sur les profils COG des génomes sélectionnés. Les COG sont classés dans des classifications fonctionnelles. Cette ACP a été générée sur le site <https://img.jgi.doe.gov/>.

5- Recherche de gènes impliqués dans le QS chez *P. ulvae* TC14

Le système de communication bactérienne appelé Quorum sensing (QS) précédemment décrit dans cette étude repose sur différents types de petites molécules diffusibles qui sont synthétisées par différents gènes : *luxI/luxR* et *luxS/luxP/luxQ*, qui sont propres aux systèmes AI-1 et AI-2. Ainsi, nous avons consulté le répertoire protéique fourni par les données du séquençage génomique de *P. ulvae* TC14. Les gènes ayant des annotations identiques à celles des gènes recherchés et qui ont été retrouvés sur le génome de *P. ulvae* TC14 ont retenu notre attention pour des analyses bio-informatiques.

Par ailleurs, des séquences nucléiques et protéiques des gènes QS préalablement caractérisés chez d'autres bactéries de genres *Vibrio*, *Shewanella*, *Pseudoalteromonas* et *Chromobacterium* ont servi dans cette étude. Ainsi, des recherches BLASTN (comparaison de séquences nucléiques) et BLASTP

(comparaisons de séquences protéiques) ont été faites sur le génome de *P. ulvae* TC14 afin de vérifier l'identité et de détecter des séquences homologues.

5-1 Recherche des gènes spécifiques au système d'auto-induction basé sur les AHLs (luxI/luxR) chez *P. ulvae* TC14

5-1.1 Rappel : description et rôle du complexe LuxI/LuxR dans la mise en place du QS

Le couple LuxI/LuxR est un complexe protéique synthase/récepteur qui a été décrit pour la première fois chez une bactérie marine nommée *Vibrio fischeri* (renommée *Aliivibrio fischeri* (**Fuqua et Greenberg, 2002**)). Chez cette bactérie, le QS est impliqué dans l'activation par signal des gènes de bioluminescence ou gènes *lux*. Cette activation relève d'une densité de molécules signal appelées acyl homosérine lactones (AHLs). Ces AHLs sont synthétisées par LuxI avant de diffuser à travers la membrane bactérienne. Lorsqu'elles atteignent une densité extracellulaire appelée « quorum », elles pénètrent de nouveau dans la cellule et se fixent à leur récepteur spécifique (LuxR). Le rôle du couple LuxI/LuxR dans le mécanisme de régulation d'une fonction bactérienne par le QS est schématisé dans la **figure 24** ci-dessous :

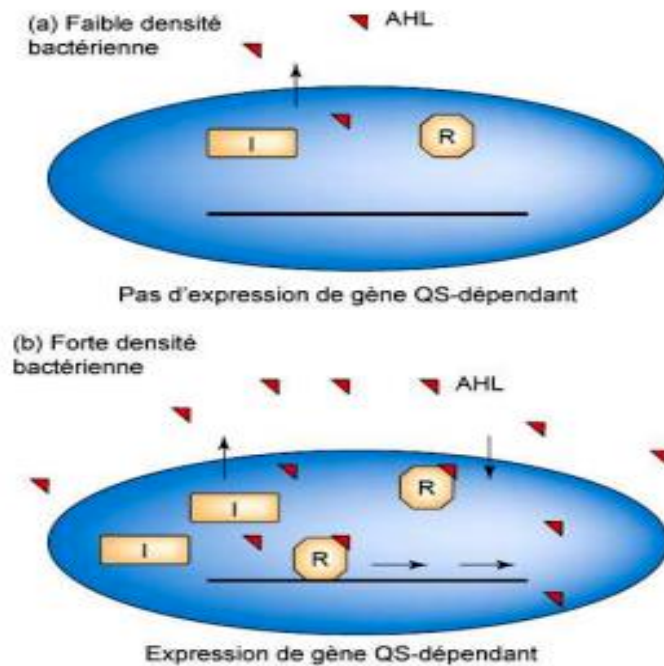


Figure 24 : Mécanisme général de régulation d'une fonction bactérienne par le système QS basé sur les AHLs. La synthase LuxI (I) produit un niveau basal d'AHLs à faible densité bactérienne. Lorsque le nombre de cellules bactérienne s'accroît, l'AHL s'accumule et se lie à son récepteur spécifique LuxR (R) afin d'induire l'activation de gènes QS dépendants. (Zhang 2003).

5-1.2 Recherche du couple LuxI/LuxR chez *P. ulvae* TC14

LuxI : Parmi les 4110 gènes codants que contient le génome de TC14 selon les données du séquençage, aucun gène n'a été annoté LuxI. La recherche de la présence de domaines de type pfam00765 (InterPro001690) associés aux gènes homologues à *luxI* d'*A. fisheri* (*lasI*, ou *rhlI* de *P. aeruginosa*) ne donne aucun résultat lorsque l'on regarde spécifiquement le génome de *P. ulvae* TC14.

En faisant une recherche basée sur le pfam00765 associé au domaine de la synthase d'autoinducteur de type *luxI* que l'on retrouve chez *A. fisheri*, *lasI* et *rhlI* de *P. aeruginosa* sur le génome de *P. ulvae* TC14 et toutes les autres souches séquencées appartenant aux genres *Pseudoalteromonas* (au total représentant 33

espèces différentes) disponible sur <https://img.jgi.doe.gov/>, seuls les génomes des souches de *P. luteoviolacea* contiennent ce pfam et aurait donc un *luxI*. Ces 8 gènes (parmi les 16 espèces de *P. luteoviolecea*) de type *luxI* ne semblent pas être associés à un gène *luxR*. Les résultats ont donc montré qu'aucune famille de protéines ne jouait le rôle de synthase AHL chez *P. ulvae* TC14. Il est intéressant de noter qu'avec le pfam17327 correspond aux homologues de *luxM*, également une AHLs synthase, sur les 65 génomes sélectionnés de *Pseudoalteromonas* représentant 33 espèces différentes), aucun n'a donné de résultats.

Par ailleurs, nos recherches ont pris en compte une autre famille de protéine pouvant synthétiser les AHLs chez les Gram négatifs. Il s'agit du complexe AinS / LuxM (appartenant respectivement à *A. fischeri* et *Vibrio harveyi* (**Fuqua et Greenberg, 2002**). Ces protéines ne présentent aucune similarité avec la famille des protéines LuxI. Toutefois, celles-ci sont reconnues pour être productrices d'AHLs chez ces bactéries (**Gilson et al., 1995**). Pour ce qui concerne *P. ulvae* TC14, nos recherches ont donc révélé l'absence du complexe AinS/LuxM.

LuxR : Les recherches effectuées sur le génome de *P. ulvae* TC14 ont révélé la présence de 8 séquences de gènes annotées « LuxR » sur le site <https://img.jgi.doe.gov/> mais aucune d'entre elles ne possèdent le pfam03472 (InterPro IPR005143). Cependant, d'autres souches de *Pseudoalteromonas* telles que des souches de *P. luteoviolacea*, de *P. piscida* ou de *P. rubra* possèdent ce pfam (parmi les 33 espèces différentes séquencées et référencées sur le site JGI IMG). En revanche celles-ci ne semblent pas être à côté d'un *luxI*.

Par conséquent, les analyses des protéines des groupes pfam et COG des différentes séquences *luxR* retrouvées chez *P. ulvae* TC14 ont révélé pour la plupart, leur appartenance aux familles des gènes régulateurs transcriptionnels *luxR* mais n'ont pas révélé de séquences homologues au domaine de liaison aux AHLs.

Les analyses des protéines des groupes pfam et COG des différentes séquences *luxR* retrouvées chez *P. ulvae* TC14 ont révélé pour la plupart, leur appartenance aux familles des gènes régulateurs transcriptionnels *luxR* mais n'ont pas révélé de séquences homologues au domaine de liaison aux AHLs.

Toutes ces informations sont résumées dans le **tableau 17** ci-dessus :

Tableau 17 : Liste des gènes annotés LuxR dans sur génome de *P. ulvae* TC14

N°	Locus tag	Numéro d'identification	Famille de gènes	Annotation issue du séquençage
1	B1199_03300	2721734215	<i>luxR</i>	DNA-binding response regulator
2	B1199_02065	2721733968	<i>luxR</i>	DNA-binding response regulator LuxR family transcriptional regulator
3	B1199_01515	2721733858	<i>luxR</i>	Transcriptionnel regulator LuxR family system response regulator NarL
4	B1199_05620	2721736060	<i>luxR</i>	Lux R family system response regulator UvrY
5	B1199_01760	2721733907	<i>luxR</i>	Lux R family DNA-binding response regulateur
6	B1199_00340	2721733623	<i>luxR</i>	Transcriptionnel regulator LuxR family Transcriptionnel regulator LuxR family
7	B1199_10560	2721735666	<i>luxR</i>	DNA-binding response regulator
8	B1199_07575	2721735070	<i>luxR</i>	DNA-binding response regulator

5-2 Evaluation du taux de production de cDNA correspondants aux séquences présomptives de *luxR* chez *P. ulvae* TC14

5-2.1 Suivi et évaluation de la production de cDNA issus des *luxR* présomptifs

Parallèlement à l'analyse bioinformatique et dans l'hypothèse que ces *luxR* seraient « atypiques », le niveau d'expression de ces 8 gènes a été comparé à différents temps de la culture de *P. ulvae* TC14. Pour cela, une analyse en q-PCR

a permis d'évaluer l'expression de ces séquences *luxR*. Les résultats sont présentés dans la **figure 25** ci-dessous.

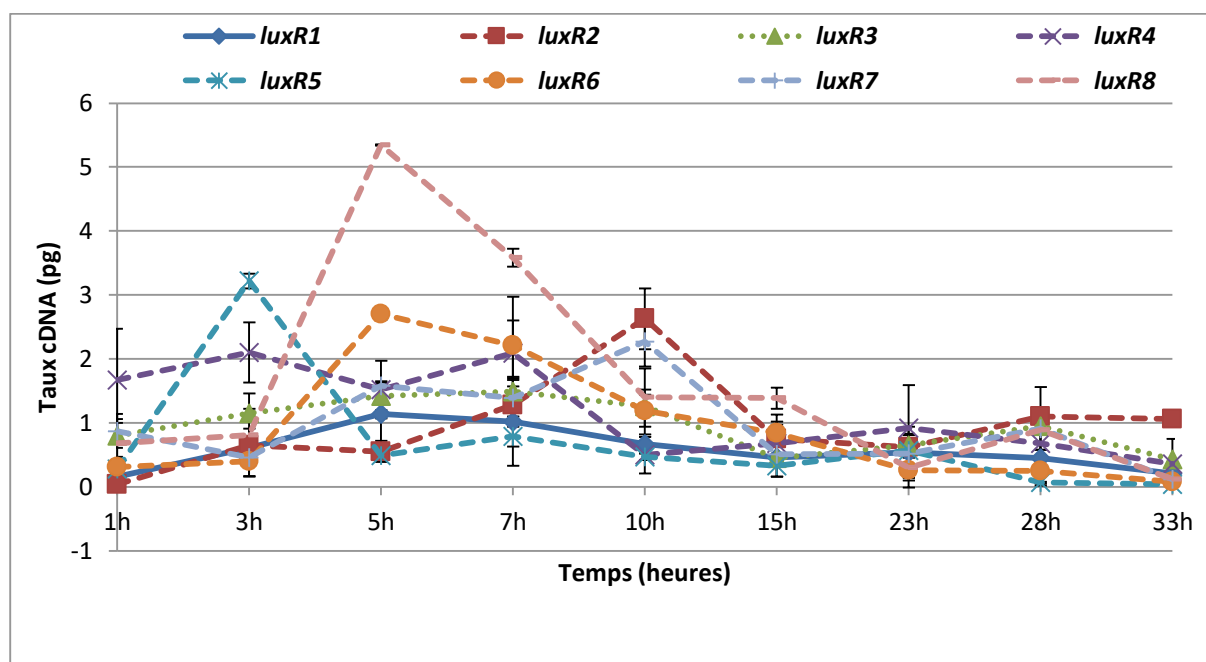


Figure 25 : Courbes d'évaluation des quantités de cDNA issues des séquences *luxR* présumptives retrouvées chez *P. ulvae* TC14. Des primers préalablement sélectionnés sur NCBI à partir des séquences *luxR* présumptives retrouvées sur le génome de *P. ulvae* TC14 ont servi à l'amplification des DNA monocaténaïres issus des ARN totaux prélevés à des heures comprises entre 1h et 33h. L'expérience a été effectuée plusieurs fois à l'aide d'un appareillage q-PCR (Bio Rad). Le marquage a été effectué à l'aide de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix de chez Bio-Rad.

Pour mieux évaluer l'expression des séquences présumptives de *luxR* retrouvées chez *P. ulvae* TC14, un suivi de la production de cDNA par la technique q-PCR a été réalisé. Les résultats obtenus ci-dessus (**Figure 25**) montrent une production relativement élevée de cDNA (5,3438 Pg) issue de la séquence *luxR8* et cela autour de 5 heures d'incubation. Les séquences *luxR5* et *luxR6* atteignent des pics respectivement à 3h (3,22pg) et 5h (2,70 pg), qui se trouvent être en dessous de celui de la séquence numéro 8. Toujours dans l'ordre décroissant du taux de production de cDNA par les séquences présumptives de *LuxR* testées sur la figure 13, on retrouve les séquences numéro 2, 4 et 7. Celles-ci montrent des pics qui se

trouvent être au-dessus de 2 pg mais faibles par rapport aux taux de cDNA issus des séquences 5 et 6. Quant aux deux dernières séquences c'est-à-dire *luxR1* et 3, les taux de production de cDNA pour chacune d'elles restant inférieur à 2 pg pendant toute la durée de suivi (de 1h à 33h), il s'avère que ces séquences admettent les plus faibles taux de cDNA.

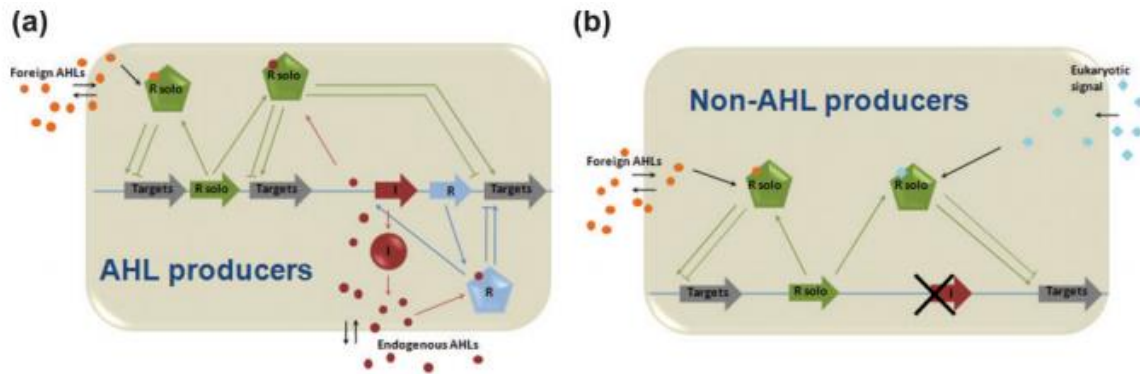
L'expression des séquences présumées de *luxR* a été évaluée à travers le taux de production de cDNA sur la **figure 25**. Le suivi de cette production peut être théoriquement découpé en deux phases en fonction des phases de croissance de *P. ulvae* TC14. En effet, celle-ci croît en VNSS exponentiellement jusqu'à 10h puis sa croissance ralentit fortement (**Brian- Jaisson et al., 2014; Ayé et al., 2015**). Or nous pouvons observer ici que le niveau des gènes *luxR* est globalement plus élevé jusqu'à 10h, alors qu'après leur niveau chute. Les cellules bactériennes ont tendance à produire la majeure partie des gènes *luxR* avant la phase post exponentielle ou stationnaire. Chacun de ces gènes en revanche présente des pics d'expression à des moments différents. Ces résultats ne permettent pas d'identifier un des gènes *luxR* comme candidat « atypique » potentiel.

5-2.2 L'hypothèse de la régulation de QS par des LuxR solos chez *P. ulvae* TC14

a- Définitions et rôle des LuxR solos dans le système QS des bactéries

La détection du QS basé sur les molécules signalétiques AHLs, marque généralement la présence d'une paire de protéine constituée d'une synthase de la famille des LuxI et d'un régulateur transcriptionnel LuxR. Cependant, des études récentes sur un grand nombre de protéobactéries ont montré que celles-ci possèdent généralement une protéine de la famille LuxR pour laquelle il n'existe pas de synthase apparentée LuxI (**Subramoni et Venturi 2009**). Ces LuxR agissant seuls sans recourir à un générateur de signaux apparenté (LuxI), ont été désignés par l'appellation « LuxR solos ». Ce type de récepteur a d'ailleurs été

décrit dans plusieurs études, pour avoir des rôles divers dans la communication inter-espèces bactériennes et inter-domaines. Le mode de fonctionnement du LuxR solos est présenté dans la **Figure 26** ci-dessous :



Source : (Subramoni et Venturi 2009)

Figure 26 : Rôle du LuxR solo dans la régulation QS des bactéries productrices ou non d’AHL. (a) Dans la bactérie productrice d’AHLs, le LuxR solo (**R solo**) peut se lier aux AHLs endogènes (produits par la bactérie) et/ou aux AHLs exogènes (produits par d’autres microorganismes). (b) Dans la bactérie non productrice d’AHLs, les AHLs solos (**R solo**) peuvent non seulement se lier aux AHLs fournis par d’autres microorganismes mais aussi à d’autres AHLs provenant d’organismes eucaryotes.

b- Notion de LuxR solo chez *P. ulvae* TC14

Le système QS de *P. ulvae* TC14 tel que décrit dans cette étude, présente des similarités avec un système QS basés sur des LuxR solos. En effet, les travaux de **Ayé et al., 2015** suggèrent que chez *P. ulvae* TC14 répond à la présence d’AHLs exogènes et qu’elle posséderait donc un récepteur de type LuxR (**Ayé et al., 2015**). Cependant, ce système QS basé sur les AHLs, est dépourvu de la protéine synthase LuxI. En outre, aucun analogue de *luxI* tel qu’*ains* ou *luxM* n’a pu être détecté sur le génome de *P. ulvae* TC14.

Ces résultats se rapprochent de ceux d’**Ayé et al., 2015** qui ont montré par des techniques chromatographiques l’absence d’AHLs endogènes chez *P. ulvae*

TC14. En revanche, ces auteurs ont suggéré que l'absence de production d'AHLs chez cette bactérie pouvait être, semble-t-il, comblée par des AHLs exogènes. Ceci permettrait à la bactérie de réguler son biofilm et la production de violacéine.

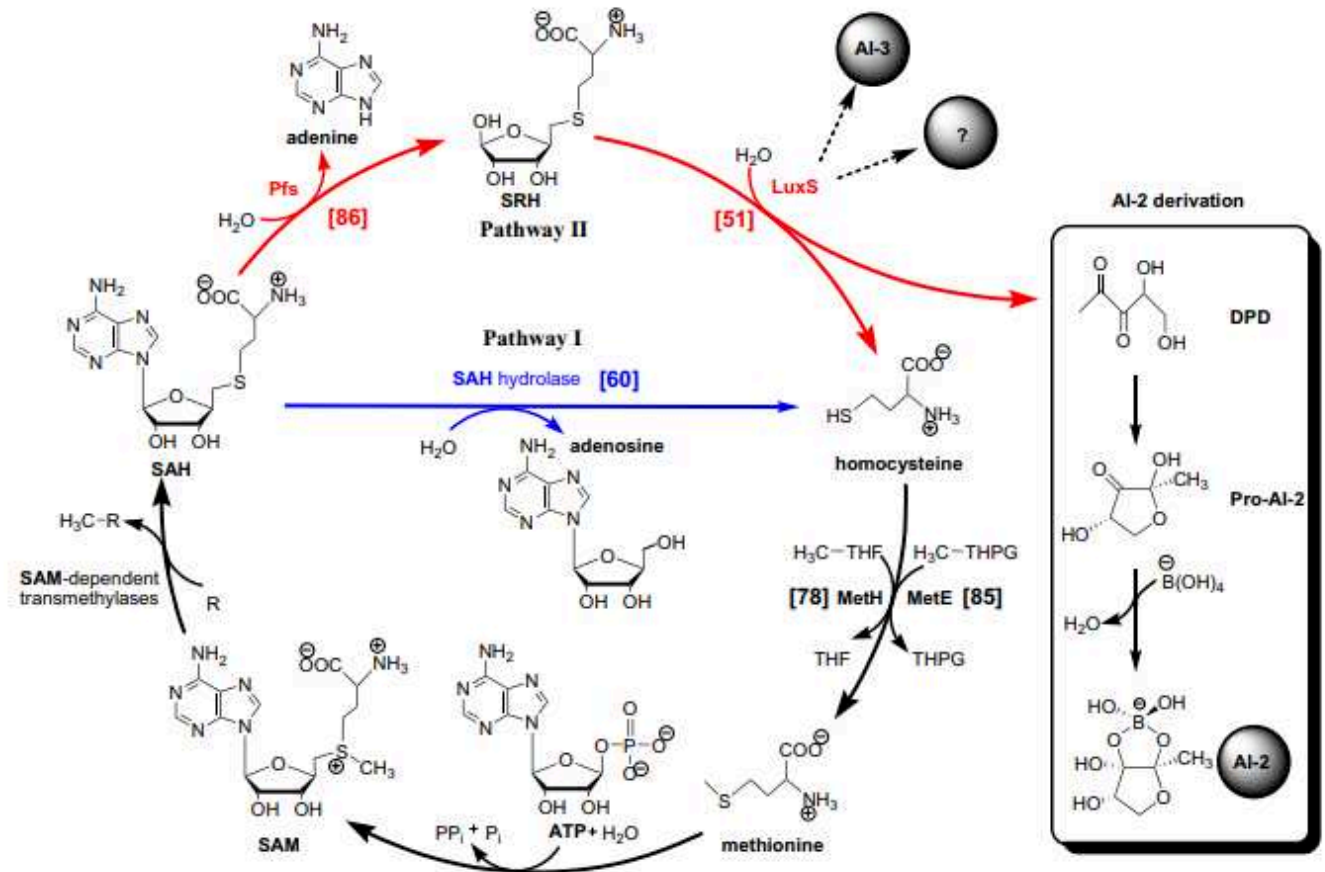
Au-delà de la non-production d'AHLs par *P. ulvae* TC14 décrite par **Aye et al**, nous avons confirmé à travers ce chapitre que cette bactérie ne possède pas de gène *luxI* mais pourrait posséder un régulateur transcriptionnel atypique de type *luxR* capable de se fixer aux AHLs exogènes, bien que nous n'ayons pas formellement identifié de candidat. C'est parce que les domaines classiques de liaison aux AHLs ne semblent pas exister dans le génome de *P. ulvae* TC14, que nous suspectons qu'un récepteur non conventionnel existe chez cette bactérie.

6- Recherche de gènes AI-2 et ceux du système Peptidique (AI-3) chez *P. ulvae* TC14

6-1 Signal AI-2

6-1.1 Rappels : généralités sur la mise en place du signal AI-2 chez une bactérie Gram négatif

L'autoinducteur de type 1 basé sur les AHLs, précédemment décrit dans cette étude cohabite le plus souvent avec l'AI-2 basé sur un furanosyl-borodiester chez des bactéries telles que *V. harveyi* et *Vibrio cholera* (**Sun et al, 2004**). L'enzyme LuxS responsable de la dernière étape enzymatique de la synthèse de l'AI-2 est présente dans un large éventail phylogénétique de genres bactériens et l'AI-2 produite par des organismes hétérologues déclenche la luminescence dans les souches rapporteuses de *V. harveyi*. La structure de l'autoinducteur-2 (AI-2) a été déterminée dans un complexe avec la protéine de détection LuxP. Il est synthétisé en deux étapes enzymatiques (par l'enzyme Pfs et l'enzyme LuxS) à partir de S-adénosyl-homocystéine (SAH), conduisant à la 4,5-dihydroxy 2,3 pentanedione (DPD) qui subit une cyclisation spontanée et est ensuite complexée avec borate pour former AI-2. Ce mécanisme est décrit dans **la figure 27** ci-dessous.



Source : (Sun et al, 2004)

Figure 27 : Mécanisme de synthèse d'AI-2. Suite au transfert du méthyle du S adenosyl méthionine (SAM) par des transméthylases, le SAH (S adenosyl homocystéine) est formé. Le SAH présentant une toxicité, est éliminé en deux phases. La première phase concerne la conversion enzymatique en deux étapes par les enzymes **Pfs** et **LuxS** produisant de l'adénine, de l'homocystéine et de la **DPD** (4,5-dihydroxy-2,3- pentanedione). L'action de **Pfs** est séparée de celle de **LuxS** par la formation de S-ribosylhomocystéine (**SRH**). Le **DPD** subit une cyclisation thermodynamiquement favorable en la forme R ou S de la 2,4-dihydroxy-2-méthylidihydro-3-furanone (**pro-AI-2**). Le **pro-AI-2** va ensuite s'hydrater pour former la molécule **AI-2**. Cette dernière voie existe chez certains organismes et il est rare d'avoir les deux composants. Par ailleurs, l'**homocystéine** produite est utilisée pour former la méthionine. Cette étape se déroule sous l'action de deux enzymes dont la méthionine synthase dépendante de la cobalamine (**MetH**) et méthionine synthase indépendante de la cobalamine (**MetE**). La méthionine est convertie en SAM dans une réaction catalysée par la SAM synthétase (MetK).

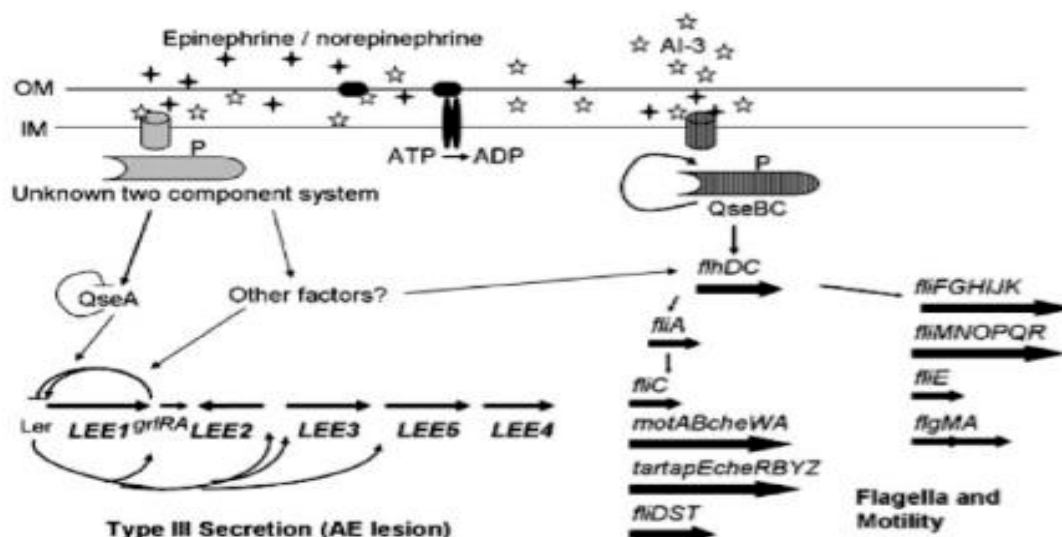
6-1.2 Recherche des gènes AI-2 chez *P. ulvae* TC14

Les bactéries peuvent posséder plusieurs systèmes QS permettant de réguler différents phénotypes tels que la production de certaines moléculaires ou la formation du biofilm. Il convient alors de vérifier la présence d'autres types d'auto-induction chez cette bactérie afin de mieux comprendre le fonctionnement de son système QS. Pour cela, les gènes spécifiques de l'AI-2 ont été pris en compte dans nos recherches sur le génome *P. ulvae* TC14. Comme précédemment décrit, le système AI-2 a pour synthase LuxS et pour récepteurs LuxPQ. Ces gènes ont été décrit chez *Vibrio harveyi* et *Salmonella typhimurium* (Taga et al., 2001). Cependant, les BLASTP et BLASTN réalisés chez TC14 au cours de cette étude n'ont révélé aucune séquence homologue de gènes AI-2. Les COG et Pfam associés aux gènes de type *luxS* ou *pfs* ne montrent aucune similarité fonctionnelle dans le génome de *P. ulvae* TC14. Ceci marque donc l'absence de ce système d'auto-induction chez *P. ulvae* TC14.

6-2 Signal peptidique

6-2.1 Rappel : Descriptions générales du signal peptidique (AI-3)

L'un des types d'induction QS couramment rencontré chez les bactéries à Gram positif se repose sur les oligopeptides. Cette classe de molécules induit le QS en réponse à la densité cellulaire. La différence de ce type d'autoinduction avec celui des AHLs c'est que les oligopeptides ne peuvent diffuser seuls à travers la membrane plasmique d'où la nécessité de transporteurs membranaires actifs (Miller et Bassler, 2001). Ce système peptidique rarement rencontré chez les Gram négatif a été néanmoins décrit chez une souche d'*E. coli* par Sperandio et al., 2003. Chez cette souche, la régulation du QS est assurée par un système à deux composantes dénommé QS *E coli* (QSe). Ainsi, QSeA et QSeBC régulent la transcription des gènes du flagelle et de la motilité. La description schématique de ce système peptidique est présentée dans la **figure 28** ci-dessous.



Source : (Walters et al., 2006)

Figure 28 : Modèle de cascade de signalisation QS par AI-3 dans EHEC. L'AI-3 et l'Epinephrine/norepinephrine semblent être reconnus par le même récepteur et interagissent avec les capteurs kinase une fois à l'intérieur du périplasme. La kinase de détection QseC fait partir du système à deux composants QseBC qui régule le flagelle. Un autre système à deux composants est supposé reconnaître le signal et activer la transposition de LEE en activant la transcription du LEE1 (Walters et al., 2006).

6-2.2 Identification du système peptique chez *P. ulvae* TC14

Les recherches sur le génome de *P. ulvae* TC14 ont révélé la présence des gènes codant pour le système à deux composants QseBC. Les BLASTP/N ont révélé des homologies de ceux-ci avec des gènes *qseBC* issus des bactéries du genre *Pseudomonas* et *E. coli*. Le gène *qseB* retrouvé avec le locus tag B1199-07755 est présenté à travers les familles COG0745 et pfam00072 des bases de données du site <https://img.jgi.doe.gov/> comme étant une composante peptidique spécialisée dans la transduction du signal. Aussi, *qseC* présente chez *P. ulvae* TC14 (B1199-07750), d'ailleurs très proche de *qseB*, assure également la transduction du signal peptidique. Dans les deux cas, le signal peptidique est transmis sous forme d'histidine kinase avec transfert d'énergie assurée par une ATPase. Cette fonction ainsi décrite est proche de celle des mêmes types de gènes décrits chez *E. coli* et

Pseudomonas (Walters et al., 2006). Par contre la composante QseA n'a pas été retrouvée chez *P. ulvae* TC14. Ces résultats suggèrent que la transmission du signal peptidique est basée sur le système à double composante de type *qseBC* chez *P. ulvae* TC14. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de mieux situer le rôle de cette composante dans le système QS de cette bactérie.

7- Etude de l'expression des gènes régulateurs de la violacéine chez *P. ulvae* TC14

Dans l'objectif de mieux comprendre les résultats obtenus avec les gènes *luxR* et de valider notre approche RT-qPCR, nous avons entrepris d'étudier l'expression des gènes impliqués dans des phénotypes généralement régulés par le QS

7-1 Caractérisation du tryptophane désaminase (Tda) chez *P. ulvae* TC14

7-1.1 Rôle du Tda dans la production de violacéine

Le tryptophane est connu pour être le principal précurseur de la violacéine chez des bactéries productrices de ce pigment. Ainsi, chez *C. violaceum*, l'implication du tryptophane désaminase dans la dégradation du tryptophane conduisant à la dimérisation oxydative est une étape importante dans la formation de la violacéine (Balibar et Walsh, 2006). Bien que le mécanisme de production de la violacéine chez *P. ulvae* TC14 soit moins décrit dans la littérature, il est possible de faire un rapprochement de celui-ci avec le mécanisme général décrit chez *C. violaceum*. Ainsi, le rôle du Tda semble être capital dans la mise en place de ce pigment. Il conviendrait de faire une identification du gène codant pour la Tda sur le génome de *P. ulvae* TC14 afin de tenter une caractérisation de la séquence correspondante.

7-1.2 Identification du gène *tda* et suivi de sa production du taux de cDNA chez *P. ulvae* TC14

Le gène *tda* a été identifié sur le génome de *P. ulvae* TC14 en position B1199-6385. Cette séquence a été décrite comme étant de la famille des tryptophanes synthétases contribuant à la synthèse des substances antibactériennes chez les

procaryotes. Un suivi de la production du taux de cDNA issu de cette séquence a été réalisé par q-PCR. Les résultats sont présentés sur la **figure 29** ci-dessous.

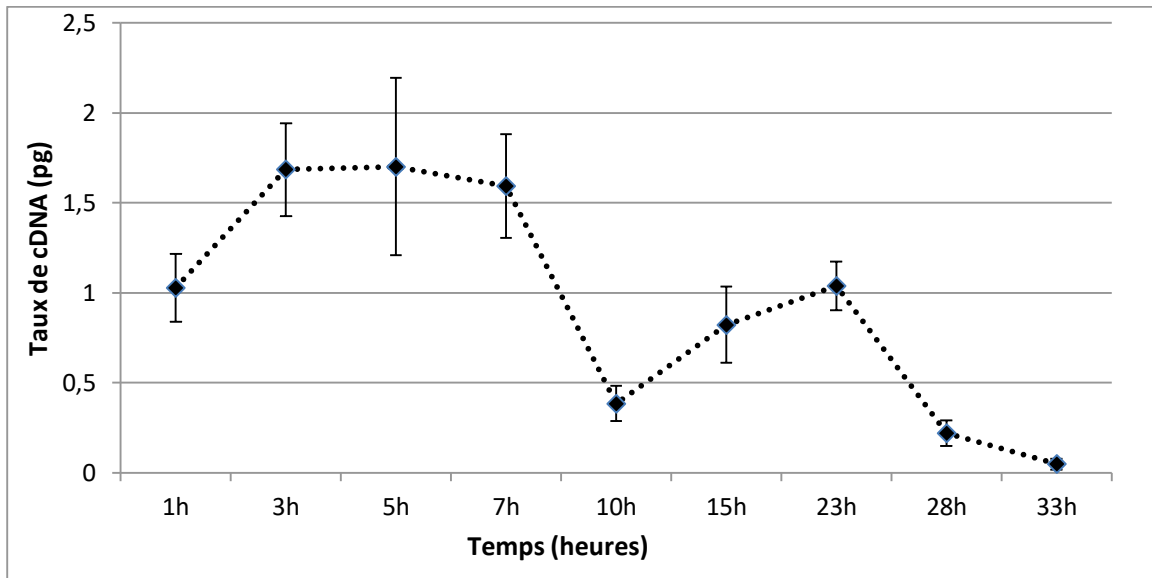


Figure 29 : Suivi de la production du taux de cDNA issu de la séquence *tda*.

Ces résultats montrent que le niveau d'expression le plus élevé du gène *tda* s'effectue autour de 5h ce qui correspond au milieu de la phase exponentielle de croissance de *P. ulvae* TC14. Ce niveau d'expression chute à 10h, correspondant à la fin de la phase exponentielle de croissance et au début de la phase post exponentielle.

7-2 Présentation de l'opéron violacéine chez *P. ulvae* TC14

Les résultats de séquençage du génome *P. ulvae* TC14 révèlent la présence du groupe de gènes *vio* comprenant cinq ORF (*vioABCDE*). En termes de nombre d'ORF (5) ces résultats se rapprochent de ceux de **Sanchez et collaborateurs en 2006** qui ont retrouvé le même nombre dans l'opéron *vio* chez *C. violaceum*. Par ailleurs, l'opéron *vio* peut comporter 4 ORF (*vioABCD*) chez certaines bactéries (**August et al., 2000**). Une représentation schématique de l'opéron *vio* chez *P. ulvae* TC14 est décrite dans la **figure 30** ci-dessous.

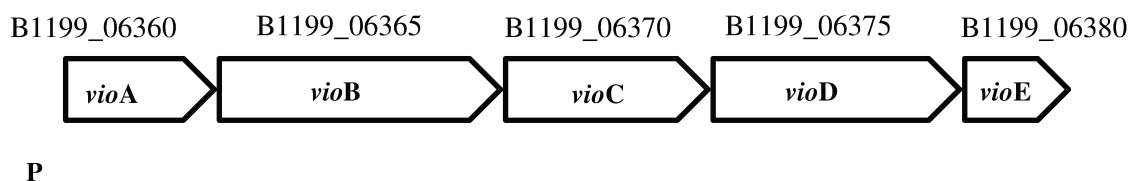


Figure 30 : Représentation schématique de l'opéron *vio* chez *P. ulvae* TC14. L'opéron *vio* constitué de cinq ORF *vioABCDE* a les locus tags suivants : B1199_06360, B1199_06365, B1199_06370, B1199_06375 et B1199_06380. Le promoteur (P) est situé en début du gène *vioA*.

7-3 Evaluation de l'expression de l'opéron *vio* Chez *P. ulvae* TC14

L'expression de l'opéron *vio* a été étudiée dans les mêmes conditions que celle des séquences présomptives de *luxR*. Ainsi, des amorces issues des gènes *vioA*, *vioD* et *vioE* ont servi à l'amplification en q-PCR des cDNA. Ces trois gènes ont été étudiés à titre représentatif de l'opéron *vio*. Ces ADN monocaténares ont été préalablement produits à partir des RNA totaux extraits de *P. ulvae* TC14 à des temps compris entre 1h et 33h. Les résultats sont présentés dans la **figure 31** ci-dessous :

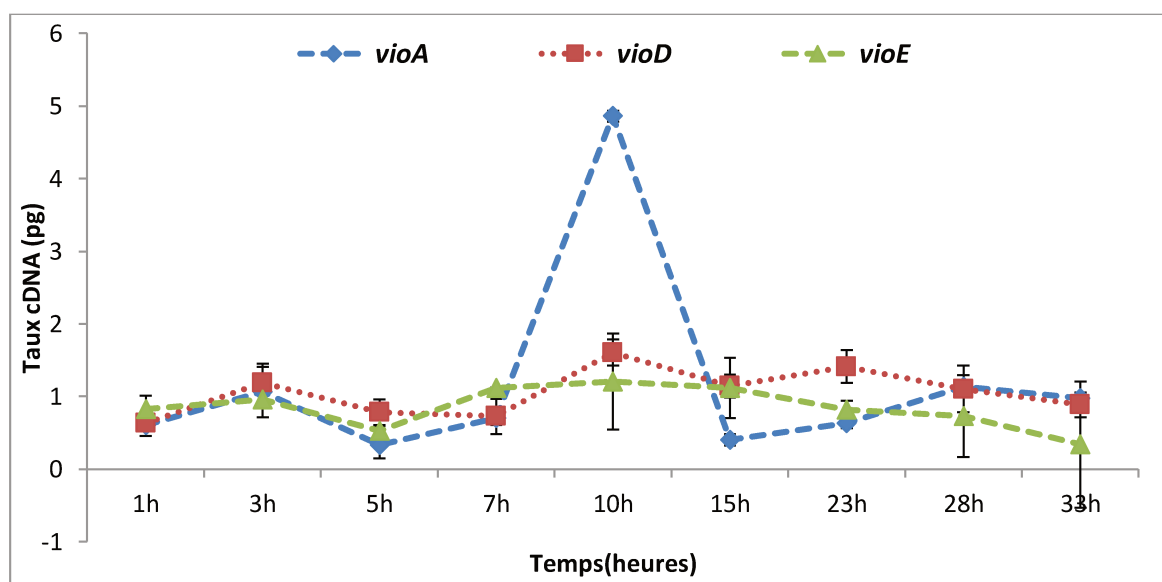


Figure 31 : Taux d'expression de l'opéron *vio* chez *P. ulvae* TC14.

Les résultats montrent la production du taux le plus élevé de cDNA (issu de la séquence *vioA* à 10h, correspondant au début de la phase post-exponentielle de croissance de la bactérie alors que l'expression des gènes *vioD* et *vioE* sont relativement faibles. Il peut paraître logique que le niveau d'expression du gène *tda* précède celui du gène *vioA* puisqu'il est nécessaire à la production de la violacéine.

8- Etude de l'expression d'autres gènes impliqués dans la mise en place du QS et/ ou la formation de biofilm

Certains gènes reconnus pour leur rôle non négligeable dans la régulation du QS et/ou la formation du biofilm bactérien ont été également détectés sur le génome de *P. ulvae* TC14. Après l'identification par BLASTP et BLASTN, nous avons tenté d'évaluer leur expression génique dans les mêmes conditions que les gènes précédemment décrits. Ces gènes sont *csgD* (curli biosynthesis regulator) et *dgc* (dyguanylate cyclase)

8-1 Caractérisation du gène *csgD* chez *P. ulvae* TC14

8-1.1 Description et rôle du gène *csgD* dans la formation de biofilm

Plusieurs structures extracellulaires, notamment les lipopolysaccharides, les flagelles et les pili et le curli interviennent dans adhésion initiale des cellules bactériennes à une surface solide et / ou dans les étapes ultérieures de la formation de biofilm (Olsen et al., 1989; Vidal et al., 1998). Dans *E. coli*, les curli favorisent à la fois l'adhésion initiale et l'interaction cellule-cellule (Prigent-Combaret et al., 2000). Les gènes impliqués dans la production de curli sont regroupés en deux opérons divergents : l'opéron *csgAB*, codant les composants structurels de curli; et l'opéron *csgDEFG*, codant les gènes nécessaires à l'exportation de la sous-unité curli et à la stabilisation des fibres (Chapman et al., 2002). Ainsi, le *csgD* est un facteur de transcription nécessaire à l'expression de *csgAB* (Hammar et al., 1995) et donc à la production des curli. Le gène *csgD*

pourrait contribuer à la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. En outre une étude menée par Lee et al., 2009 a montré que le gène *SdiA* connu pour être homologue de *luxR* car pouvant détecter des AHLs, permet de réprimer le *csgD* et par conséquent réduit la formation de biofilm chez *E. coli*. (Lee et al., 2009). Ainsi le *csgD* pourrait se présenter comme un intermédiaire dans la régulation du biofilm par le QS. Même si *sdiA* n'a pas été retrouvé chez *P. ulvae* TC14, il est possible que d'autres séquences de gènes jouent ce même rôle. Il a semblé nécessaire de faire de *csgD* un control de l'expression des séquences *luxR*.

8-1.2 Identification et expression de *csgD* chez *P. ulvae* TC14

Sur le génome de *P. ulvae* TC14, le gène *csgD* peut être observé en position 12530. Les BLASTP et BLASTN effectués ont montré une forte homologie avec des séquences *csgD* issues de *E. coli*, *Pseudoalteromonas sp* et *Vibrio harveyi*. Les séquences ainsi identifiées chez TC14 ont été analysées par la technique q-PCR. Les résultats sont présentés dans la **figure 32** ci-dessous.

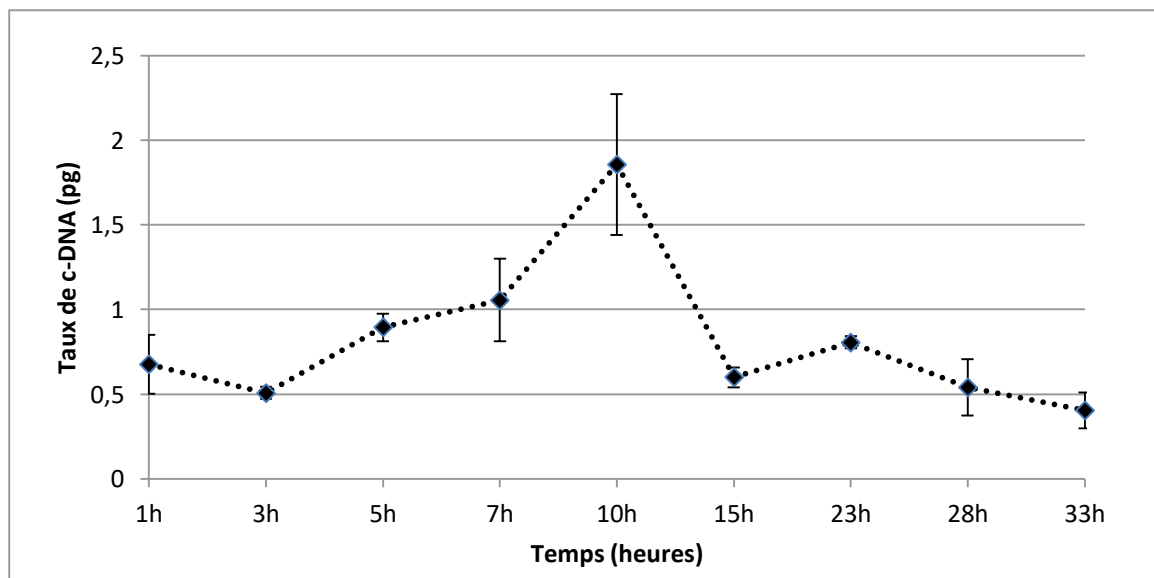


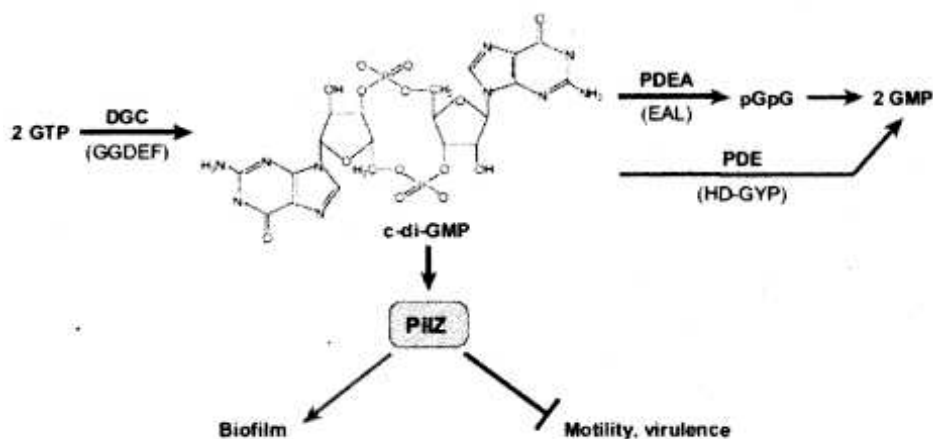
Figure 32 : Suivi du taux de production des cDNA issus de la séquence *csgD*

Les résultats montrent que le taux de production de cDNA correspondant au gène *csgD* varie entre 0,4 pg et 1,85pg. La valeur maximale (1,85pg) est atteinte après 10h d'incubation, c'est-à-dire en début de phase post-exponentielle de croissance de *P. ulvae* TC14.

8-2 Etude de l'expression du gène de la diguanylate cyclase *dgc* chez *P. ulvae* TC14

8-2.1 Description et rôle des *dgc* vis-à-vis de la formation de biofilm

Le gène diguanylate cyclase (*dgc*) code pour une enzyme assurant la synthèse d'un messenger secondaire appelé c-di-GMP (Schirmer et Jenal, 2009). Dans la majorité des bactéries étudiées jusqu'à présent, les concentrations intracellulaires de c-di-GMP déterminent si une bactérie choisit les modes de vie planctoniques mobiles ou les biofilms sédentaires. À des concentrations intracellulaires élevées, le c-di-GMP favorise la production d'exopolysaccharides et d'autres facteurs d'adhésion afin de faciliter la formation de biofilm. D'autre part, le c-di-GMP retarde l'expression de flagelles. Le mode général d'action de *dgc* sur le c-di-GMP est décrit dans la **figure 32** ci-dessous.



Source : (Tamayo *et al.* 2007)

Figure 33 : Représentation schématique de l'action de la Dgc sur le c-di-GMP. Dans la partie intracellulaire du c-di-GMP se trouve 2 enzymes antagonistes dont

diguanylate cyclase (DGC) et phosphodiesterase (PDE) respectivement des enzymes de synthèse et de dégradation. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine **GGDEF** pour les **DGC** et **EAL** pour les **PDE**. Le c-di-GMP est ainsi synthétisé via l'utilisation de 2 molécules de GTP par les **DGC**. Il est ensuite dégradé en **pGpG** par **2 GMP** ou directement dégradé en **2 GMP** par **HD-GYP**. Le c-di-GMP lie différents récepteurs protéiques ou riborégulateurs pour réguler négativement l'expression de gènes de virulence et la mobilité, et réguler positivement diverses fonctions reliées à la formation de biofilms (**Tamayo et al. 2007**).

8-2.2 Identification et caractérisation de *dgc* chez *P. ulvae* TC14

Le gène *dgc* a été détecté sur le génome de *P. ulvae* TC14 locus tag (B1199-6350) au cours de nos recherches. Cette séquence de *dgc* ainsi identifiée a été soumise à une analyse de l'expression génique par la technique de RT-q-PCR. Les résultats de l'évaluation du taux de production de cDNA issus de la séquence du gène *dgc* sont présentés dans la **figure 34** ci-dessous.

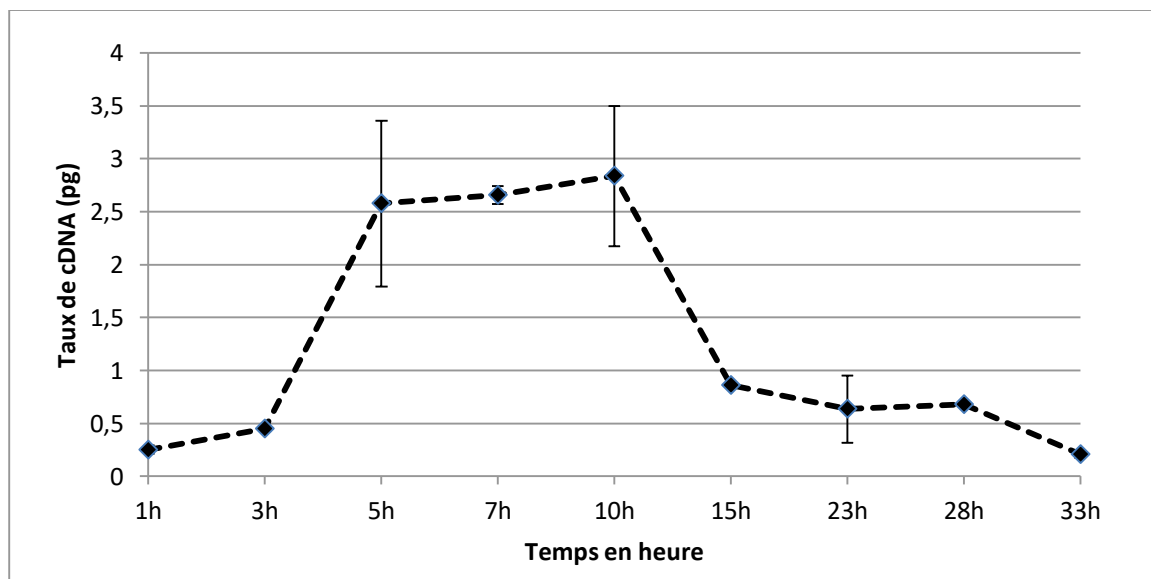


Figure 34 : Suivi de la production de cDNA issus des *dgc*

La production de *dgc*, qui est impliquée dans la production de c-di-GMP, (**figure 34**) admet une augmentation à partir de 3h. Cette augmentation se poursuit lentement jusqu'à 10h. Au-delà de 10h, le taux de cDNA connaît une chute. Il a été montré que lorsque le niveau de c-di-GMP, synthétisé par le *dgc* est haut, il promeut le mode de vie sous la forme sessile et biofilm (**Tamayo et al. 2007**). En

phase post exponentielle après 10h de croissance bactérienne, *P. ulvae* TC14 est donc dans l'état permettant le mieux l'adhésion et la formation du biofilm.

9- Conclusion

Dans ce chapitre, il a été question de caractériser le système QS chez TC14 dans l'objectif d'avoir une large vision sur son fonctionnement. Ainsi, ces recherches ont essentiellement porté sur les principaux gènes régulateurs de trois types d'auto-induction notamment le système AHL, l'AI-2 et le système peptique. Par ailleurs, la violacéine a été définie dans les travaux d'**Aye et al., 2015**, comme un facteur modulé par des AHLs exogènes. Il nous a donc semblé nécessaire de caractériser l'opéron *vio* afin d'évaluer le taux d'expression et de pouvoir si possible établir un lien avec le QS. D'autres gènes qui sont éventuellement impliqués dans l'adhésion, la production de biofilm et de violacéine chez *P. ulvae* TC14 ont été également identifiés et caractérisés.

Huit séquences présomptives de *luxR* ont été retrouvées dans le génome de *P. ulvae* TC14. Cependant, ces séquences ne présentent pas le domaine de liaison aux AHLs, et aucune autre séquence dans le génome ne possède les domaines appropriés (pfam, interpro) comme indication de leur fonctionnalité. Comme **Ayé et al.**, avaient montré que la violacéine, l'adhésion et la formation du biofilm étaient modulées par la présence d'AHLs, notre hypothèse était qu'il existe un récepteur possédant un domaine de liaison aux AHLs atypique chez *P. ulvae* TC14. Dans l'objectif de voir si les profils d'expression des gènes *luxR* candidats pouvaient donner des informations quant à la potentielle fonctionnalité d'un des candidats, les profils d'expression des gènes de l'opéron *vio*, du gène *csgD* impliqué dans la formation des curli (exprimés en conditions sessiles), de la diguanylate cyclase *dgc* impliqué dans la synthèse de c-di-GMP régulant la formation du biofilm ont été étudiés à différents temps. Il semblerait que bien que les gènes *tda*, *vioA*, *dgc*, *csgD* semblent avoir des profils d'expression qui pourraient correspondre à ce que l'on attend pendant la croissance des bactéries,

aucune information claire n'a pu être mise en évidence concernant les gènes *luxR* présumés. Nous avons prévu d'étudier l'expression des gènes *luxR* en présence ou absence des AHLs connues pour moduler l'expression du biofilm et de la violacéine (**Pantanella et al., 2007**) mais pour des raisons techniques et de temps, nous n'avons pu compléter ces expériences qui nous auraient peut-être permis d'en savoir plus. Il est aussi possible qu'aucune de ces séquences n'ait de fonction particulière et que l'explication concernant la modulation de certains phénotypes par des AHLs doit être trouvée ailleurs.

Chapitre IV :

Evaluation de l'impact de la modulation du QS sur l'effet anti-adhésif et antibiofilm chez *P. ulvae* TC14 de trois analogues synthétisés au laboratoire Mapiem

1- Introduction

Le laboratoire MAPIEM dispose d'un large répertoire de composés naturels issus d'organismes marins ou de molécules synthétiques conçues sur les bases de modèles connus. Un grand nombre de ces molécules a été criblé au cours des travaux de recherche précédents notamment ceux de **Linares et al., en 2011** d'une part et ceux d'**Andjouh et Blache, 2015** d'autre part. Les premiers auteurs ont montré que la molécule dénommée OB1 (Olivier Bottzeck 1) avait un effet inhibiteur significatif sur l'adhésion et la formation de biofilm chez les bactéries marines telles que *Paracoccus sp.* 4M6 et *Pseudoalteromonas sp.* D41. Pour ce qui concerne les seconds auteurs, ceux-ci ont réussi à élaborer des composés ayant un effet antifouling important sur *P. ulvae* TC14 et *P. lipolytica* TC8. Parmi ces composés se retrouvent l'AS194 (Andjouh Sofyane 194) et AS162 (Andjouh Sofyane 162). Dans ce chapitre nous avons réévalué l'effet antifouling de ces trois molécules (OB1, AS194 et AS162) sur *P. ulvae* TC14 et deux autres bactéries marines *Paracoccus sp.* 4M6 et *P. lipolytica* TC8.

Par ailleurs, l'une des stratégies antifouling respectueuses de l'environnement recherchée de nos jours repose sur l'inhibition du QS des bactéries. Dans ce cadre, des travaux réalisés par **Aye et al., 2015** ont permis de répertorier une classe de molécules actives sur le QS. Parmi ces molécules, il y a des AHLs commerciaux notamment la 3-oxo-C6 HSL et la 3-oxo-C8 HSL. L'effet de ces molécules sur le QS chez TC14 a été testé par la capacité de chacune d'elles à activer ou inhiber la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14. Ainsi, les tests préliminaires réalisés au cours de ces recherches ont montré que la 3-oxo-C6 HSL inhibait la violacéine et la 3-oxo-C8 HSL quant à elle, augmentait significativement la production de ce pigment chez *P. ulvae* TC14. Ces deux molécules ayant des effets opposés sur la modulation de la violacéine chez *P. ulvae* TC14 puisque la production de violacéine est régulée par le QS chez *C. violaceum* (choisi comme biosenseur de référence dans la thèse de Mireille Ayé). En outre, chez *C. violaceum*, la violacéine est régulée par le QS. Ce qui nous permet d'établir un

lien entre la production de violacéine et le QS chez TC14 même si cela n'a pas encore été clairement défini. En plus de ces deux AHLs commerciaux, d'autres molécules connues pour être actives sur le QS de plusieurs bactéries marines ont été testées dans cette étude. Il s'agit du farnésol et l'eugénol.

Ces quatre molécules (3-oxo-C6HSL, 3-oxo-C8HSL, farnésol et eugénol) actives sur le QS ont été combinées à chacun des composés antifouling (OB1, AS194 et AS162) décrits plus haut. L'effet des différentes combinaisons a été déterminé sur l'adhésion et le biofilm chez *P. ulvae* TC14, *Paracoccus* sp. 4M6 et *P. lipolytica* TC8.

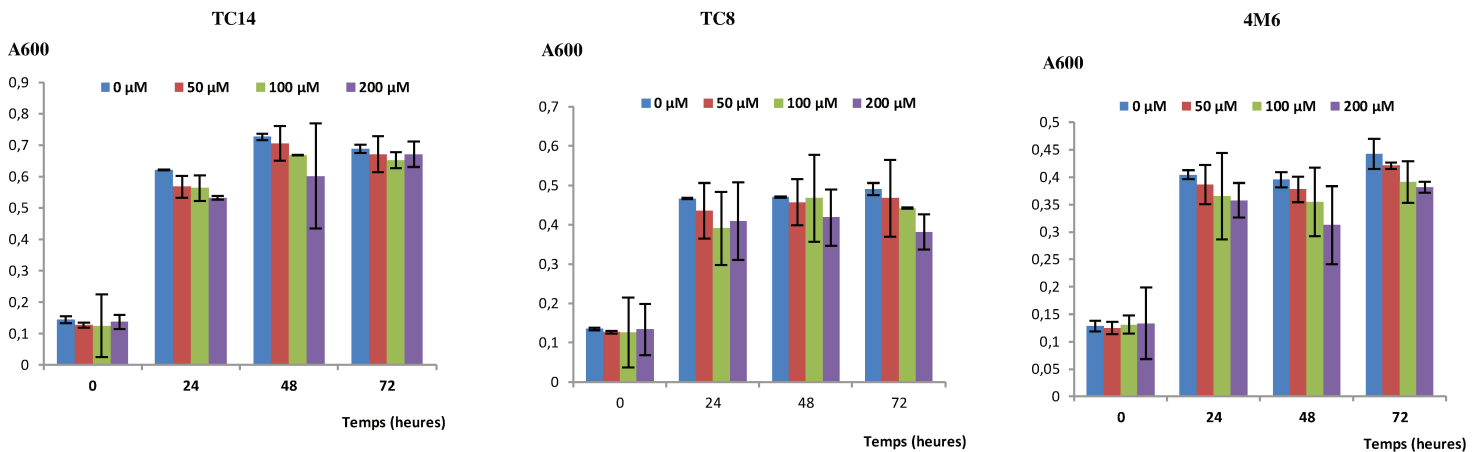
L'objectif de ce chapitre a été de vérifier l'impact de la modulation du QS (inhibition ou activation) sur l'effet antifouling des composés naturels. Autrement, il était question d'évaluer une potentialisation de l'effet antifouling de ces composés ou encore une inhibition de cet effet par la modification du fonctionnement du QS.

2- Evaluation de l'effet antifouling des trois composés mis au point au laboratoire MAPIEM chez *P. ulvae* TC14 et deux autres bactéries marines

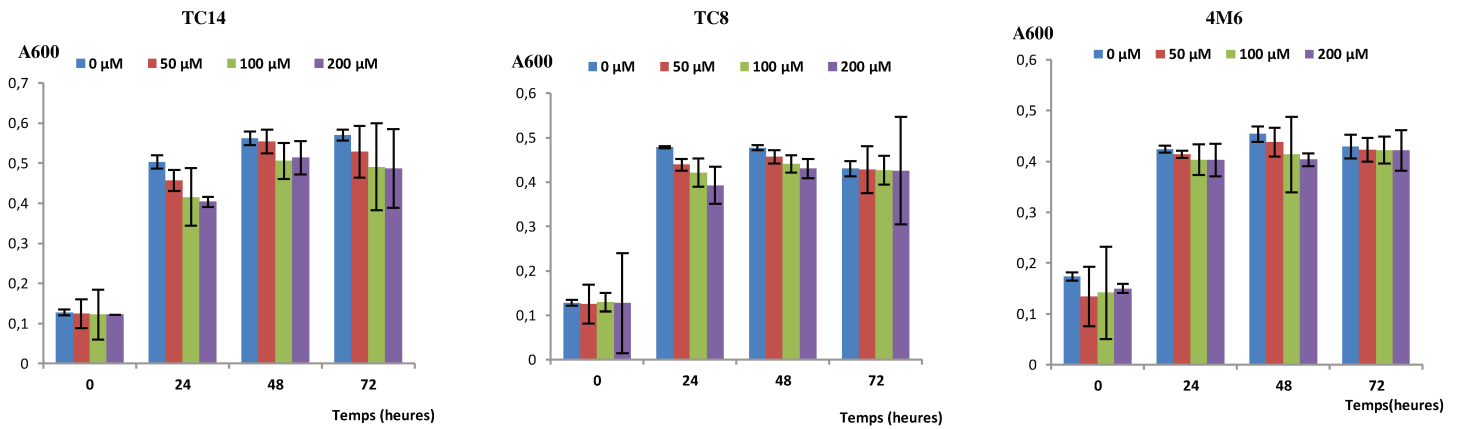
2-1 Effet des trois composés sur la croissance des bactéries

Chacun des trois composés (OB1, AS194 et AS162) a été testé sur la croissance des bactéries. Ceci afin de s'assurer d'une absence d'inhibition de la croissance de ces bactéries. Afin de rester conforme aux études précédemment réalisées par **Andjouh et Blache (2015)**, les composés ont été testés à des concentrations de 50, 100 et 200 μ M. Des cultures bactériennes ont été réalisées en présence de chacun des composés au différents temps qui sont 0, 24, 48 et 72h dans du VNSS. Le VNSS est un milieu de culture souvent utilisé pour la croissance des bactéries marines (**Brian-Jaisson et al., 2014**). Les résultats sont présentés dans la **figure 35** ci-dessous.

A- Effet d'OB1 sur la croissance des bactéries



B- Effet d'AS194 sur la croissance des bactéries



C- Effet d'AS162 sur la croissance des bactéries

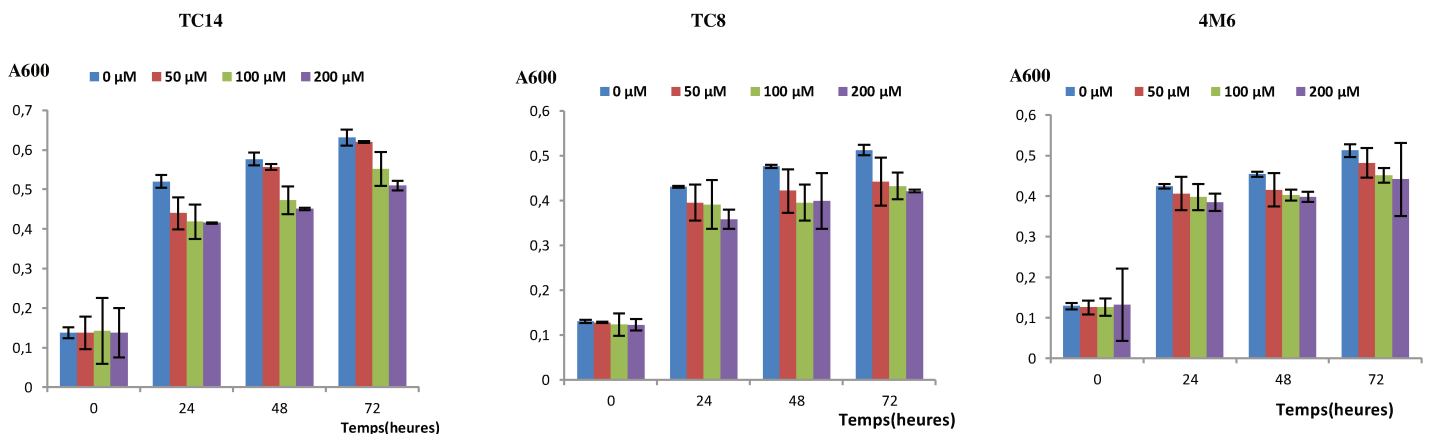


Figure 35 : Effet des trois analogues synthétiques sur la croissance chez *P. ulvae* TC14 et chez les deux autres bactéries. Les tests ont été réalisés trois fois en microplaques transparentes. Un test statistique a été fait à ($p < 0,05$) des témoins (culture à $0 \mu\text{M}$) et aucune différence significative n'a été trouvée.

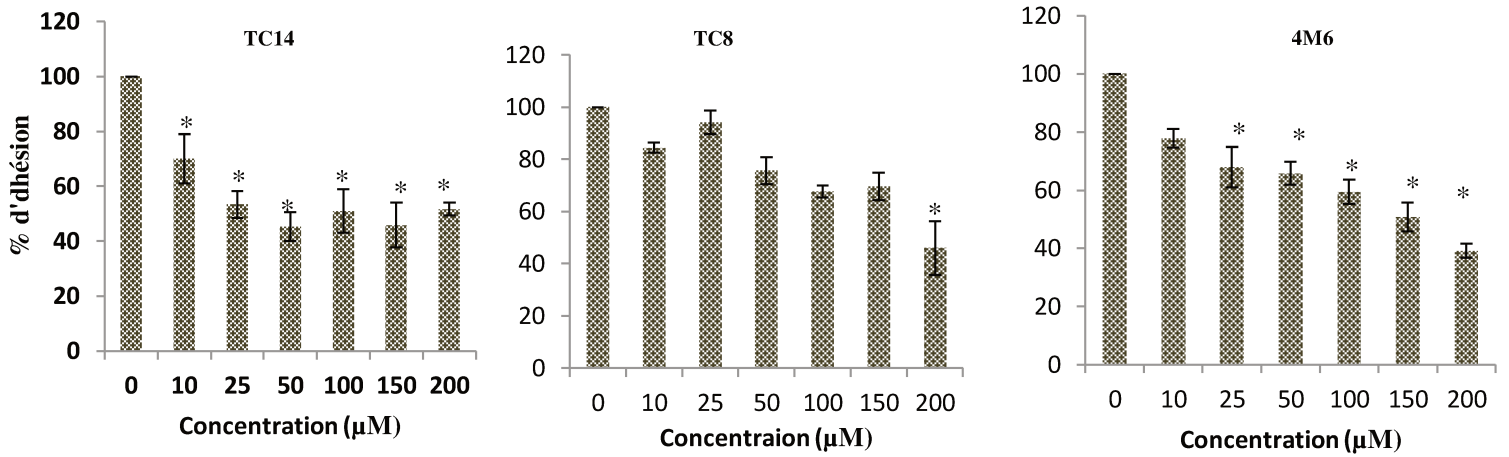
Aucun des composés ci-dessus testés n'agit significativement sur la croissance de *P. ulvae* TC14 et des deux autres bactéries. Ceci expliquerait l'absence d'effet bactéricide et/ou bactériostatique significatif sur les différentes souches. Ainsi, des tests d'adhésion et de biofilm ont pu être réalisés avec ces différents composés.

2-2 Evaluation de l'effet antifouling des trois composés

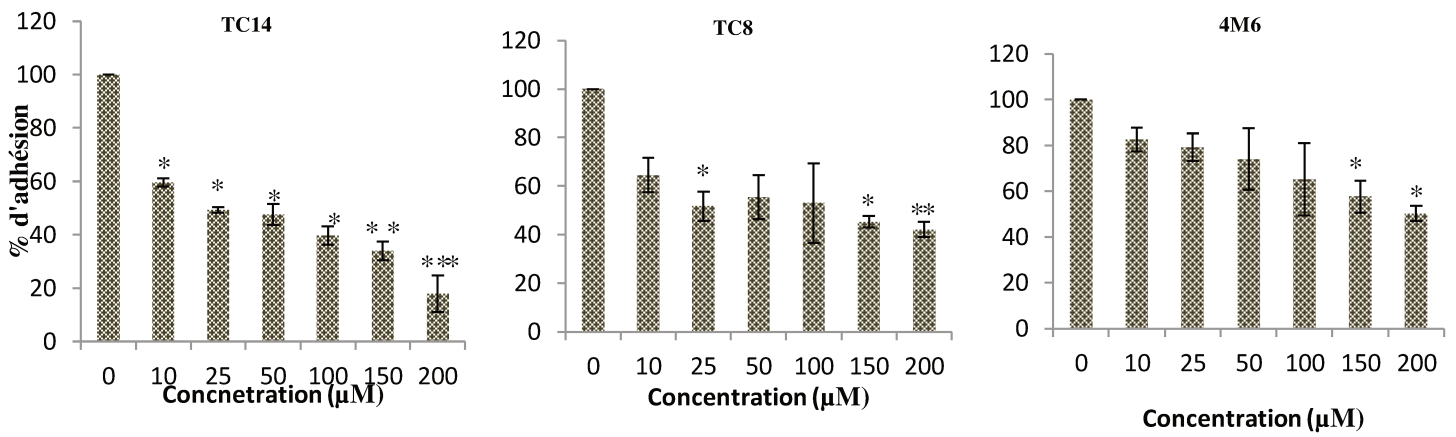
2-2.1 Effet sur l'adhésion des bactéries

Les trois composés (OB1, AS194 et AS162) ont été testés sur l'adhésion chez *P. ulvae* TC14 et chez les deux autres bactéries (*P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6). Une gamme de concentrations comprenant 0 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 et 200 μ M de chaque composé a été testée sur l'adhésion des différentes bactéries au bout de 24h en microplaques noires. Ces tests ont permis d'évaluer l'effet des composés sur l'adhésion des bactéries sur une surface en polystyrène. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 36** ci-dessous.

A- Effet d'OB1 sur l'adhésion des bactéries



B- Effet d'AS194 sur l'adhésion des bactéries



C- Effet d'AS162 sur l'adhésion des bactéries

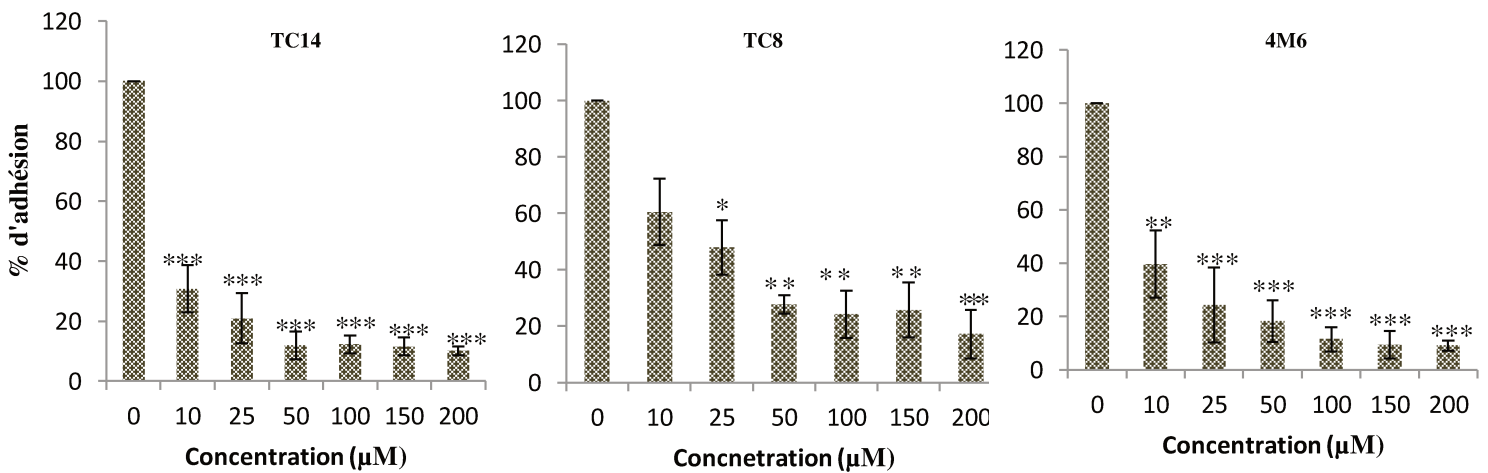


Figure 36 : Effet des analogues sur l'adhésion des bactéries. Les tests ont été réalisés trois fois en réplicats en microplaques noires. Les cellules ont été marquées au SYTO61

avant d'être portées au Tecan pour lecture (A680). Les essais marqués d'astérisques sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans composés, 0 μM).

L'adhésion, l'étape cruciale de la formation du biofilm chez les bactéries a été largement décrite dans le premier chapitre (bibliographie) de cette étude. En effet, cette étape nécessite l'intervention des structures d'adhésion qui varient selon le type de Gram des bactéries. Pour les bactéries à Gram-négatif, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix. Pour les bactéries à Gram-positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix (**Van Houdt et Michiels 2005**).

Il ressort de la **figure 36** que, les trois composés testés sur l'adhésion chez *P. ulvae* TC14 notamment montrent un effet inhibiteur à partir 10 μM (**Figure 36A, 36B et 36C**). Cette inhibition est plus marquée pour AS162 qui réduit de près de 70% dès 10 μM de concentration. Jusqu'à 200 μM , le taux d'adhésion est réduit de près de 90%. L'AS194 quant à lui, a un effet moyen sur l'adhésion chez TC14 mais celui-ci pourrait atteindre 85% d'inhibition à 200 μM . L'effet global de l'OB1 sur l'adhésion de *P. ulvae* TC14, bien que significatif, reste relativement faible.

Les souches *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6 sont connues pour avoir une très bonne capacité d'adhésion et de formation de biofilm. Ces deux souches marines (*P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6) semblent ne pas produire d'AHLs tout comme *P. ulvae* TC14 (**Aye et al., 2015**). Dans le but de vérifier la reproductibilité des résultats issus des tests d'inhibition d'adhésion et de biofilm chez *P. ulvae* TC14, il a paru nécessaire de considérer *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6 comme contrôles positifs. Il ressort des **figures 36A, 36B et 36C** que les différents composés inhibent également l'adhésion chez *P. lipolytica* TC8 et Chez *Paracoccus sp.* 4M6. Tout comme chez *P. ulvae* TC14, l'AS162 montre l'effet inhibiteur d'adhésion le plus prononcé

chez ces deux souches. L'OB1 et l'AS194 affiche un effet globalement moindre sur l'adhésion des bactéries.

Ces résultats ont permis d'évaluer l'effet inhibiteur des trois composés chez *P. ulvae* TC14 et deux autres souches servant de contrôles positifs. Par ailleurs, ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils ont permis de classer ces composés dans l'ordre croissant d'inhibition d'adhésion : OB1, AS194 et AS162. Pour confirmer cette classification, il a semblé nécessaire de comparer les différentes concentrations de ces composés susceptibles d'éliminer 50% de taux d'adhésion (CE_{50}) chez chaque bactérie.

2-2.2 Evaluation des CE_{50} des trois composés sur l'adhésion chez les différentes souches

La concentration effective permettant d'éliminer 50% de l'adhésion de chacune des souches (CE_{50}) a été calculée pour chacun des composés. Les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPadPrism 5. Ainsi ont été déterminées les CE_{50} d'inhibition d'adhésion de chacune des bactéries pour OB1, AS194 et AS162. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 18** ci-dessous.

Tableau 18 : CE_{50} (μ M) de l'inhibition d'adhésion des trois composés chez les différentes souches

Composés	CE_{50} (μ M) chez TC14	CE_{50} (μ M) chez TC8	CE_{50} (μ M) chez 4M6
OB1	75,4 \pm 5,4	216,9 \pm 6,8	114,7 \pm 3,8
AS194	38,3 \pm 4,8	75,5 \pm 4,1	174,5 \pm 7,6
AS162	4,3 \pm 1,1	23,2 \pm 2,5	8,0 \pm 0,9
Ampicilline (Andjouh et Blache, 2015)	9,3 \pm 1,0	17,9 \pm 1,0	144,1 \pm 0,6

Les résultats montrent que les trois composés tels que disposés dans le **tableau 18** (OB1-AS194-AS162) respectent un ordre croissant d'inhibition d'adhésion des souches. Cependant, il n'y a que chez *Paracoccus sp.* 4M6 où la CE_{50} d'OB1

a été faible par rapport à celle d'AS194. Dans tous les cas, la CE₅₀ de l'AS162 est resté considérablement faible. Les CE₅₀ d'AS162 avoisinent ceux de l'ampicilline chez *P. ulvae* TC14 et *P. lipolytica* TC8. Chez *Paracoccus sp.* 4M6, les valeurs de CE₅₀ d'OB1 et AS162 restent en dessous de celle de l'ampicilline. Ces résultats sont intéressants d'autant plus que l'effet inhibiteur d'adhésion d'AS162 semble être plus élevé que celui de l'ampicilline alors que cet analogue n'a pas révélé de toxicité significative contrairement à l'ampicilline chez les trois bactéries. Les deux autres analogues quant à eux, admettent une CE₅₀ proche de celle de l'ampicilline chez *Paracoccus sp.* 4M6. Ces résultats ont ainsi permis de distinguer le mécanisme de modulation d'un effet plus élevé de celui d'un effet relativement faible. Et ce, pour l'inhibition d'adhésion des bactéries.

2-2.3 Effet des composés sur la formation de biofilm chez les bactéries

Le test de biofilm au cristal violet a montré que OB1, AS194 et AS162 ont chacun un effet inhibiteur très intéressant sur le biofilm des bactéries. Les tests ont été réalisés à deux périodes (48h et 72h) afin d'évaluer non seulement l'effet de chaque composé sur le biofilm mais aussi la persistance de cet effet à long terme. L'AS162 a montré une fois de plus un effet très prononcé sur le biofilm des bactéries par rapport à l'AS194 et à l'OB1. En revanche, chacun des composés à un effet à 48h qui persiste à 72h.

2-2.3.1 Effet d'OB1 sur la formation de biofilm chez les bactéries

L'OB1 a été testé sur le biofilm chez *P. ulvae* TC14 et les autres bactéries en 48h et 72h. L'effet bien que significatif, a été faible par rapport à celui de AS194 et AS162 chez les trois bactéries. Chez *P. ulvae* TC14 (**figure 37A**), l'effet anti-biofilm d'OB1 est resté presque constant à 72h. Cependant, chez *P. lipolytica* TC8 (**figure 37B**) les résultats ont montré une chute de l'effet à 72h. Quant à *Paracoccus sp.* 4M6 (**figure 37C**), c'est plutôt à 72h que l'inhibition du biofilm a atteint un seuil de significativité et ce aux concentrations les plus élevées (150 µM et 200 µM). Les résultats sont présentés dans la **figure 37** ci-dessous.

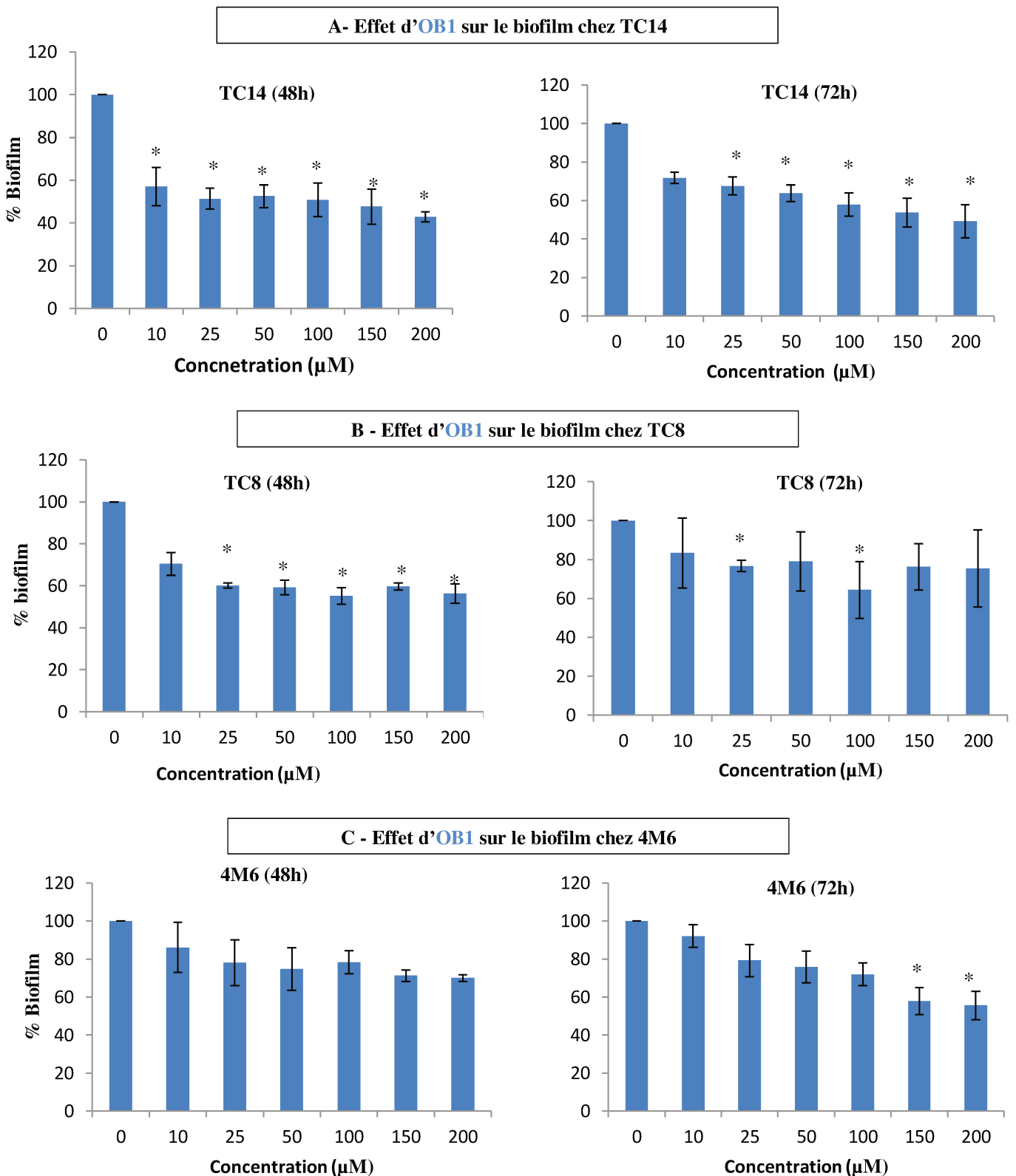
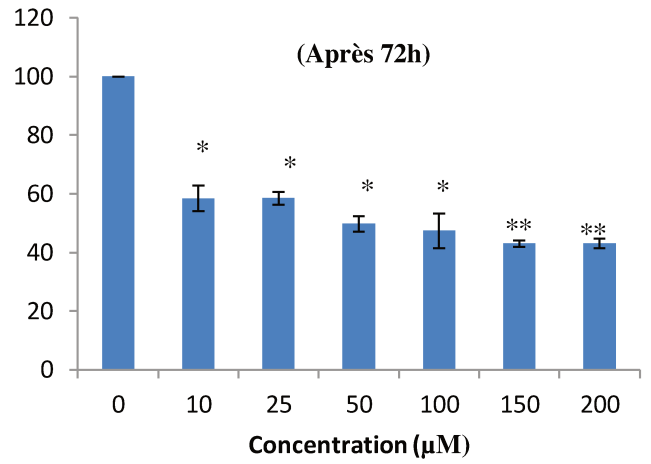
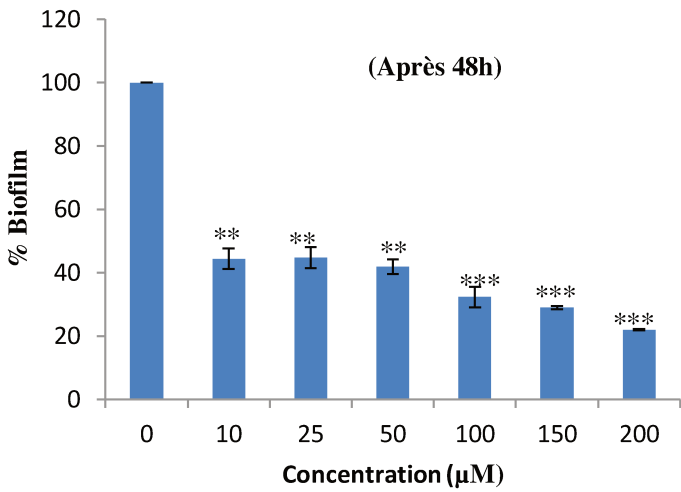


Figure 37 : Effet d'OB1 sur le biofilm chez les bactéries. Les tests ont été réalisés trois fois en réplicats en microplaques transparentes 96 puits. Les cellules ont été marquées au Crystal Violet (CV) avant d'être portées au Tecan pour lecture (A570). Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans OB1, 0 μM).

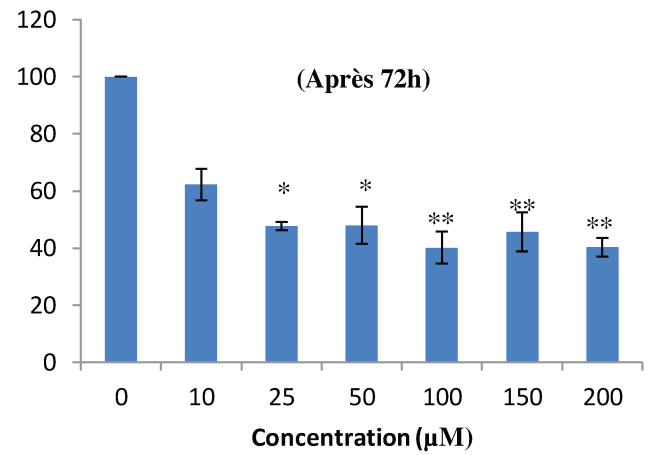
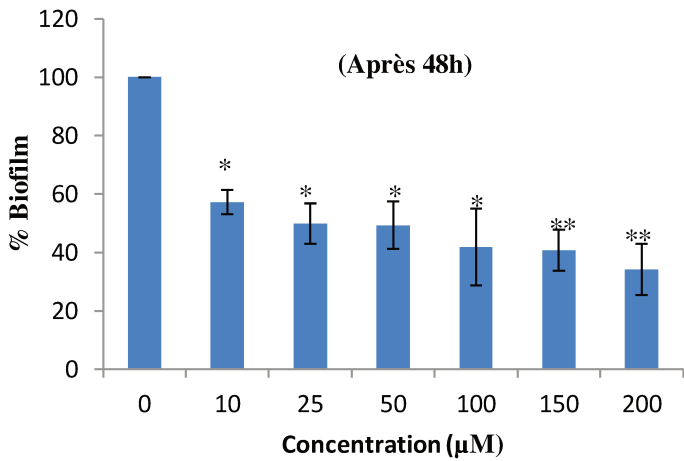
2-2.3.2 Effet d'AS194 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries

Le composé AS194 a été testé dans les mêmes conditions qu'OB1 sur la formation du biofilm chez *P. ulvae* TC14, *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6. Il ressort des résultats présentés dans la **figure 38** que ce composé a globalement montré un effet d'inhibition plus prononcé sur le biofilm des bactéries par rapport à celui d'OB1. Toutefois, il convient de noter une rechute de l'effet du composé à 72h. Cette chute est restée relativement faible chez *P. ulvae* TC14 (**figure 38A**) et chez *P. lipolytica* TC8 (**figure 38B**). Par contre chez 4M6 (**figure 38C**), l'effet d'inhibition du biofilm a connu une chute importante à 72h. En revanche, chez cette même bactérie, l'inhibition du biofilm à 48h a été très significative à des concentrations de 150 μ M et 200 μ M tout comme chez *P. ulvae* TC14. Tous ces résultats sont présentés dans la **figure 38** ci-dessous.

A- Effet d'AS194 sur le biofilm chez TC14



B- Effet d'AS194 sur le biofilm chez TC8



C- Effet d'AS194 sur le biofilm chez 4M6

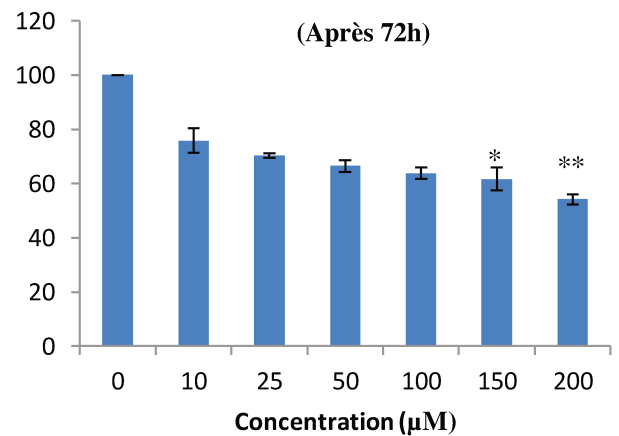
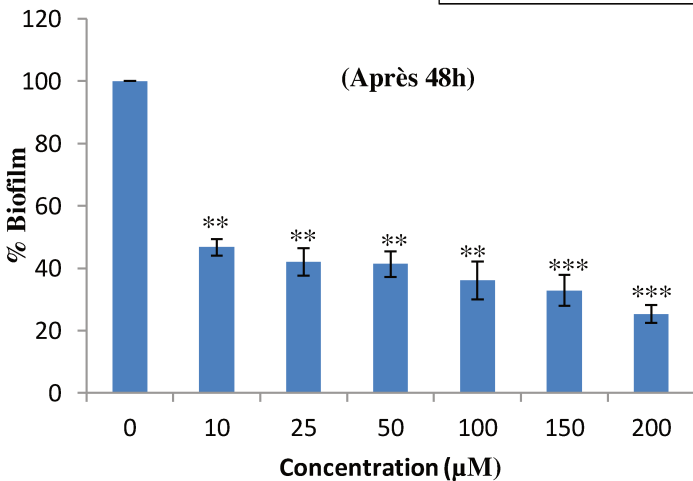


Figure 38 : Effet d'AS194 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries.

Les tests ont été réalisés trois fois en replicats en microplaques transparentes 96 puits. Les cellules ont été marquées au CV avant d'être portées au Tecan pour lecture (A560). Les essais

marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans composés, $0\mu\text{M}$).

2-2.3.3 Effet d'AS162 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries

Les résultats ont montré un effet significatif d'AS162 sur chacune des souches. En ce qui concerne TC14, le biofilm a été inhibé à plus de 99% par 150 et 200 μM d'AS162 tant à 48h qu'à 72h. L'effet d'AS162 est resté presque constante chez TC14 (**figure 39A**). Ceci pourrait être dû au fait que l'inhibition du biofilm étant très élevée à 48h, la régénération de cellules à 72h est restée faible du faite de la forte diminution de densité. Chez TC8, cette inhibition a été significative à partir de 50 μM . En revanche, l'effet d'inhibition du biofilm chez TC8 par AS162 a connu une légère chute à 72 h à des concentrations de 50 et 100 μM (**figure 39B**). Chez 4M6 (**figure 39C**), les résultats ont montré un effet rapide d'AS162. Celui-ci a connu une légère baisse à 72h à de faibles concentrations. Ces résultats sont présentés sur la **figure 39** ci-dessous.

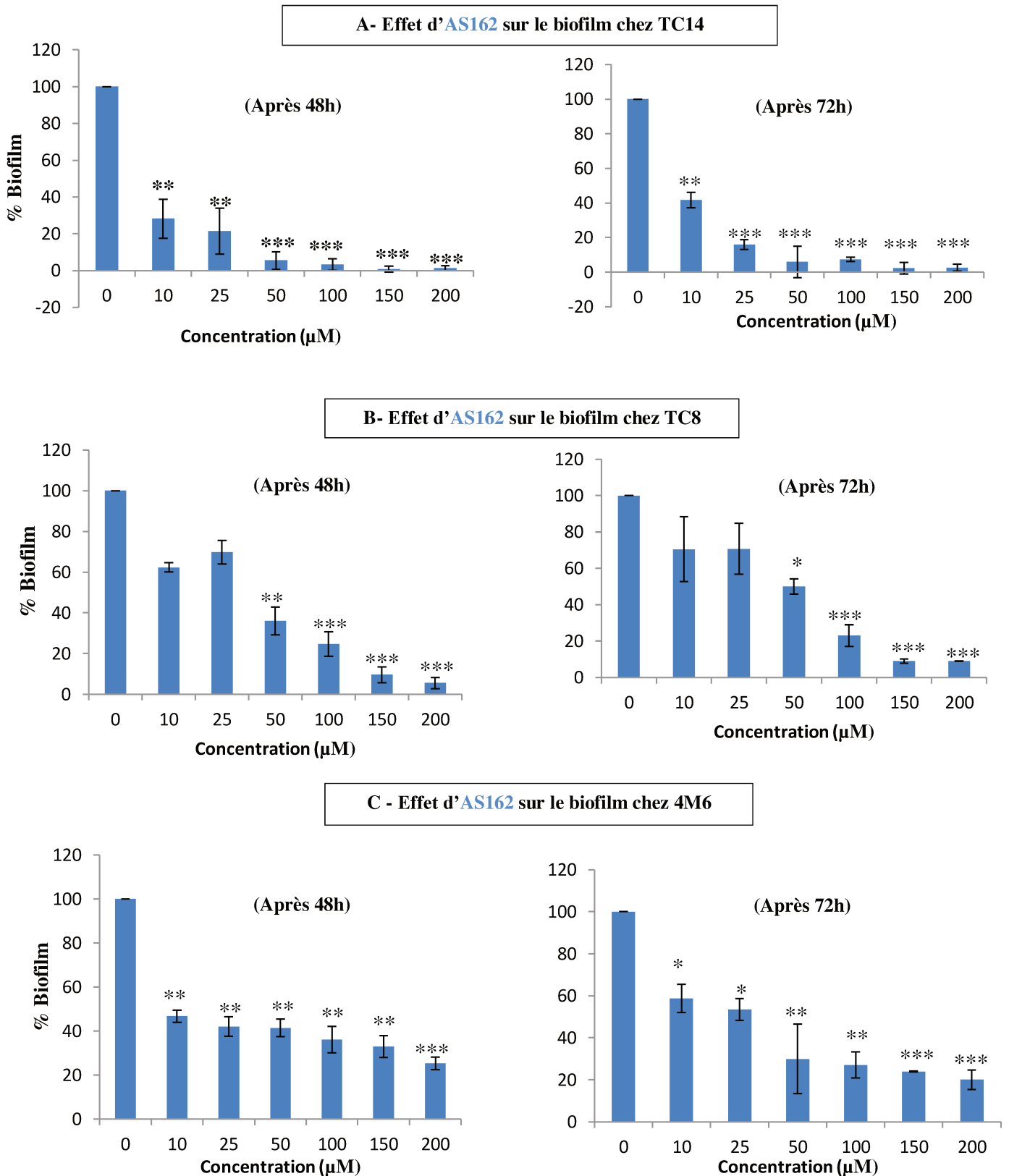


Figure 39 : Effet d'AS162 sur la formation de biofilm chez les trois bactéries.

Les tests ont été réalisés trois fois en réplicat en microplaques transparentes 96 puits. Les cellules ont été marquées au Crystal violet avant d'être portées au Tecan pour lecture (A560).

Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans composés, $0\mu\text{M}$).

2-2.3.4 Détermination des CE_{50} des trois composés sur le biofilm chez les différentes souches

Les CE_{50} des composés sur le biofilm des souches ont été calculées dans les mêmes conditions que celles de l'adhésion. Les différentes valeurs ont montré que l'AS162 a eu les CE_{50} les plus faibles. Ces résultats sont proches de ceux de l'adhésion dans lesquels il a été observé une variabilité de l'effet des composés avec l'AS162 ayant un effet très élevé. Ces données nous amèneront à mieux évaluer la modification par la modulation du QS chez *P. ulvae* TC14, d'un effet moins élevé par rapport à un effet très élevé tant sur l'adhésion que sur le biofilm. Les CE_{50} des composés sur la formation de biofilm chez les trois souches sont présentés dans le **tableau 19** ci-dessous.

Tableau 19 : CE_{50} (μM) des différents composés sur la formation de biofilm chez les souches

Composés	Temps(h)	CE_{50} (μM) chez TC14	CE_{50} (μM) chez TC8	CE_{50} (μM) chez 4M6
OB1	48	69,9±5,9	127,9±3,6	328,0±9,5
	72	125,6±11,1	333,7±5,8	209,5±7,8
AS194	48	24,8±3,9	48,8±5,1	26,9±4,6
	72	66,3±5,5	53,0±2,4	166,7±6,7
AS162	48	4,4±1,3	29,4±4,1	18,8±2,1
	72	6,0±1,5	36,6±2,9	25,9±2,4

3- Evaluation de l'effet des composés actifs sur le QS chez *P. ulvae* TC14

L'objectif de ce chapitre est d'identifier des molécules capables d'induire une réponse du QS chez *P. ulvae* TC14 tout en évaluant l'impact de cette réponse sur l'inhibition d'adhésion et de formation de biofilm par les trois composés (OB1, AS194 et AS162). Pour cela, un screening de composés actifs sur le QS chez *P. ulvae* TC14 a été réalisé. La sélection de ces modulateurs de QS chez *P. ulvae* TC14 s'est faite sur la base de leur effet sur la production de violacéine. En effet,

il a été démontré par **Aye et al., 2015** que la violacéine est un bon indicateur de QS chez *P. ulvae* TC14 et mieux, elle est visible et mesurable.

Ainsi, deux AHLs commerciaux, notamment la 3-oxo-C6 HSL et la 3-oxo-C8 HSL ont été d'office pris en compte parmi les molécules actives sur le QS chez *P. ulvae* TC14. En effet, les travaux d'**Aye et al., 2015** ont montré une inhibition de plus de 40% de la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14 par la 3-oxo-C6 HSL à 50 μ M. Quant à la 3-oxo-C8 HSL, elle a plutôt augmenté le taux de violacéine de plus de 50% à cette même concentration. Deux autres composés naturels et commerciaux connus pour être des modulateurs de QS ont fait objet d'analyse dans cette étude. Il s'agit du farnesol et de l'eugénol. Ces composés ont été également testés sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14.

3-1 Effet du farnesol sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14

Le farnesol est un dérivé d'alcool sesquiterpénique connu pour impacter le quorum sensing chez plusieurs bactéries. Il est généralement produit par *Candida albicans* (**Hornby et al., 2001**). Il est capable d'induire des modifications physiologiques chez plusieurs organismes eucaryotes et procaryotes tout en interférant avec leur système d'autoinduction (**Cao et al., 2005**).

Des tests ont été réalisés avec le farnesol sur les différents paramètres (croissance, adhésion, biofilm et production de violacéine) chez *P. ulvae* TC14 au cours de cette étude. Sans toutefois modifier significativement, ni la croissance, ni l'adhésion et le biofilm chez les trois souches, le farnesol a montré un effet activateur de la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14. L'effet du farnesol sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14 est présenté sur la **figure 40** ci-dessous.

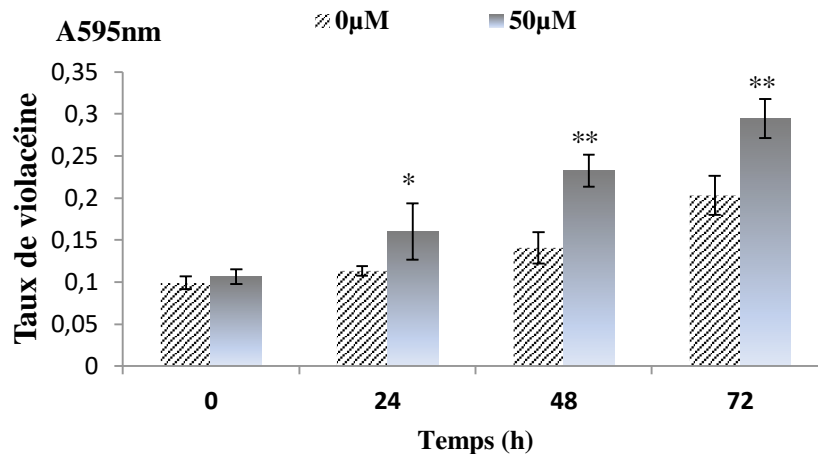


Figure 40 : Effet du farnesol sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14. Les tests ont été réalisés trois fois en réplicats en microplaques transparentes 96 puits. L'extraction de la violacéine s'est faite à l'aide d'éthanol 100%. La lecture a été faite à DO=595nm au TECAN. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans farnesol, 0µM).

Comme l'indique la **figure 40**, dès 24h, la production de violacéine a été augmentée de 18 % par l'ajout de 50 µM de farnesol. Cette augmentation s'est accentuée dans le temps (48h : 58% et 72h : 67%). Ces résultats montrent que le farnesol module la violacéine chez *P. ulvae* TC14.

3-2 Effet de l'eugénol sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14

L'eugénol est un dérivé phénolique connu pour avoir des propriétés inhibitrices sur le Quorum sensing chez des bactéries (**Zhou et al., 2013**). Ces propriétés anti-QS ont été mises en évidence chez *E. coli* et *P. aeruginosa* au cours des travaux de **Zhou et collaborateurs**.

Dans cette étude l'eugénol a été testé sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14. Il ressort des résultats que la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14 a diminué de 22% en 24h, de 58% en 48h et 57% en 72h. Ceci montre que l'eugénol module également l'expression de la violacéine. Ces résultats sont présentés sur la **figure 41** ci-dessous.

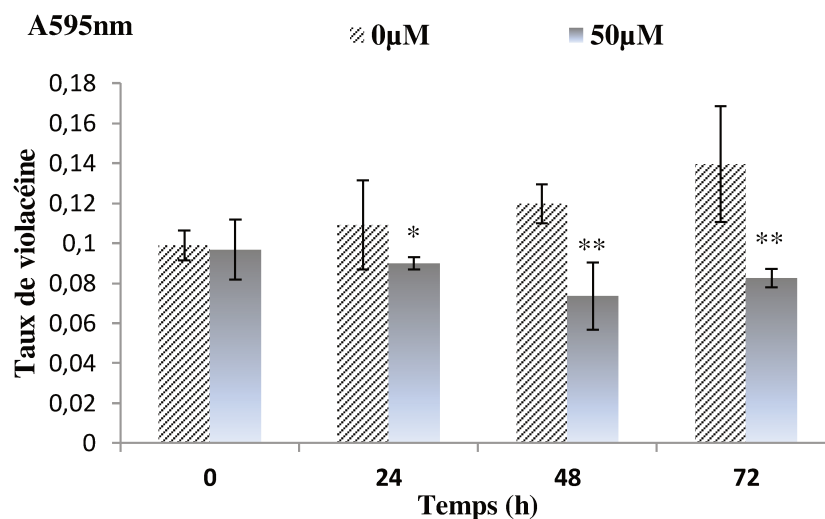


Figure 41 : Inhibition de la production de violacéine par l'eugénol chez *P. ulvae* TC14. Les tests ont été réalisés trois fois en replicats en microplaques transparentes 96 puits. L'extraction de la violacéine s'est faite à l'aide d'éthanol 100%. La lecture a été faite à DO=595 nm au TECAN. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans eugénol, 0μM).

4- Evaluation de l'impact de la modulation du QS sur l'effet antifouling des trois composés par approche combinatoire

Ces quatre molécules (3-oxo C6HSL, 3-oxo C8HSL, farnesol et eugenol) considérées dans cette étude comme étant des modulateurs de la violacéine ont été réparties en deux groupes. D'une part, la 3-oxo C6 HSL et l'eugénol ont été considérés comme des inhibiteurs de QS. D'autre part, la 3-oxo-C8 HSL et le farnesol ont été considérés comme étant des activateurs de QS.

Des tests de combinaison binaire ont été réalisés à partir des trois composés antifouling et des modulateurs de violacéine. Chaque modulateur de violacéine a été rajouté (à 50 μM) à la gamme de concentration précédemment testée de chacun des composés anti-fouling (OB1, AS194 ou AS162). Ces tests ont permis d'évaluer l'impact de la modulation de violacéine chez *P. ulvae* TC14 sur l'effet anti-adhésion ou anti-biofilm des trois composés. Ces tests ont été également réalisés sur les contrôles positifs que sont *P. lypolitica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6.

4-1 Evaluation de l'impact de l'inhibition du QS (QSI) sur l'effet antifouling des trois composés

4-1.1 Effet de la combinaison des QSI et des trois composés antifouling sur l'adhésion chez *P. ulvae* TC14

L'un des moyens de lutte contre le biofilm bactérien est l'inhibition du QS des bactéries. En effet, le QS est généralement impliqué dans le développement et l'entretien des biofilms (**Borchardt et al., 2001**). Il a semblé opportun dans cette étude de combiner un inhibiteur de QS à un composé antifouling. Ceci permettra d'évaluer l'impact de l'inhibition du QS sur l'effet anti-adhésif des composés chez *P. ulvae* TC14.

Cependant, les résultats ont montré d'une manière générale que l'adhésion a tendance à être restituée chez *P. ulvae* TC14. La réduction de l'effet anti-adhésif a été plus marquée chez AS162 (**figure 42c**). Chez OB1 (**figure 42a**) et AS194 (**figure 42b**), la restitution de l'adhésion chez *P. ulvae* TC14 est moins prononcée. Il convient de noter que la combinaison de ces deux types de molécules a réduit l'effet anti-adhésif chez les composés antifouling. Ainsi, l'inhibition du QS chez *P. ulvae* TC14 semble ne pas contribuer à l'augmentation de l'effet d'antidhésion chez les bactéries. Bien au contraire, elle en diminue l'effet. Les résultats des tests de combinaison sur l'adhésion des bactéries sont présentés dans la **figure 42** ci-dessous.

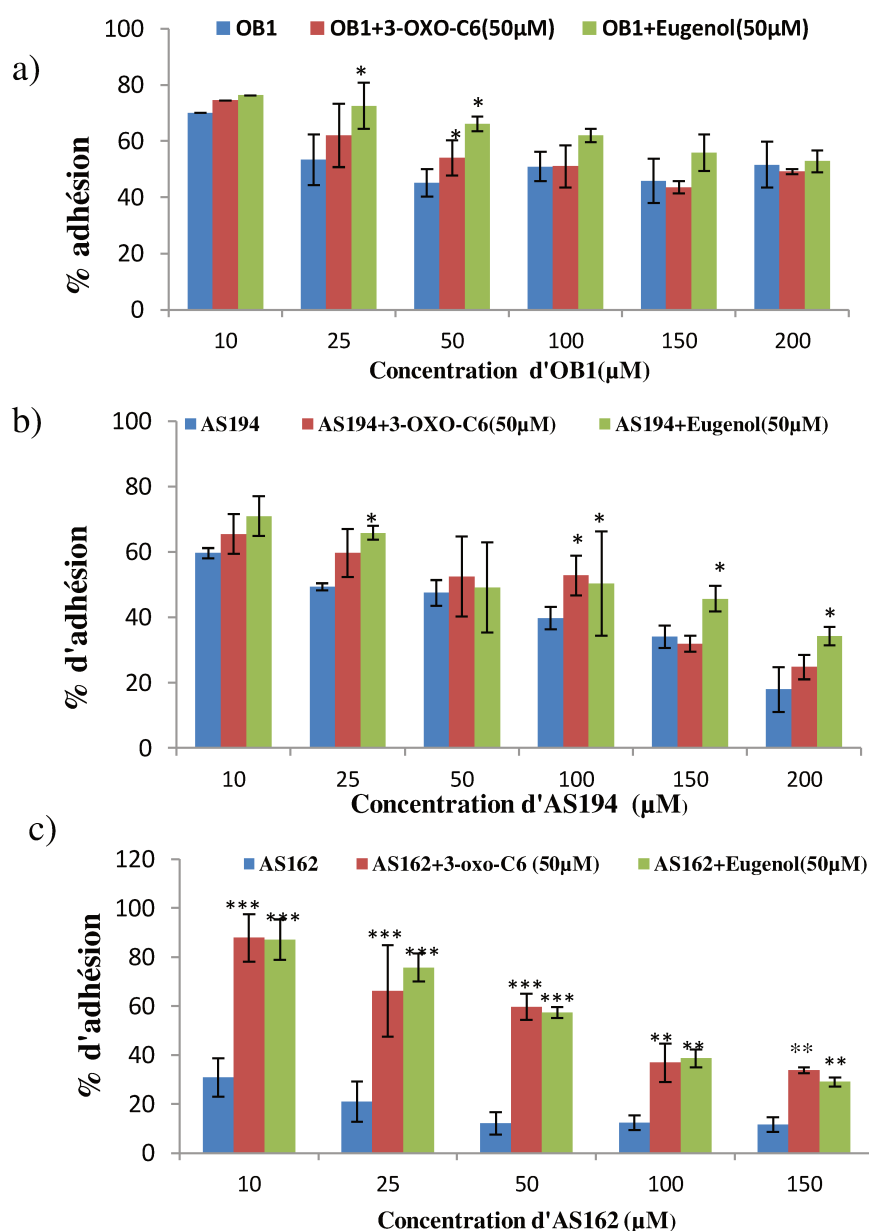


Figure 42 : Effet des combinaisons sur l'adhésion chez *P. ulvae* TC14. La gamme de concentration des composés antifouling utilisée dans les premiers tests a été maintenue. Une concentration de 50µM d'inhibiteurs de QS (3-oxo-c6HSL ou eugénol) ont été ajoutée à chaque concentration de composés antifouling. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie avec composés antifouling sans ajout de molécule anti-QS).

4-1.2 Effet des combinaisons sur l'adhésion chez *P. lypolitica* TC8 et *Paracoccus* sp. 4M6

La réduction de l'effet d'anti-adhésion étant plus marquée chez AS162, des tests de contrôle positif ont été réalisés avec AS162 combiné à 3-oxo-C6 HSL. Les résultats ont montré une forte restitution d'adhésion à des concentrations relativement faibles d'AS162 chez *P. lypolitica* TC8 (figure 43a). Chez

Paracoccus sp. 4M6 (**figure 43b**), l'adhésion est restituée jusqu'à 150 μM d'AS162. Les résultats sont présentés sur la **figure 43**.

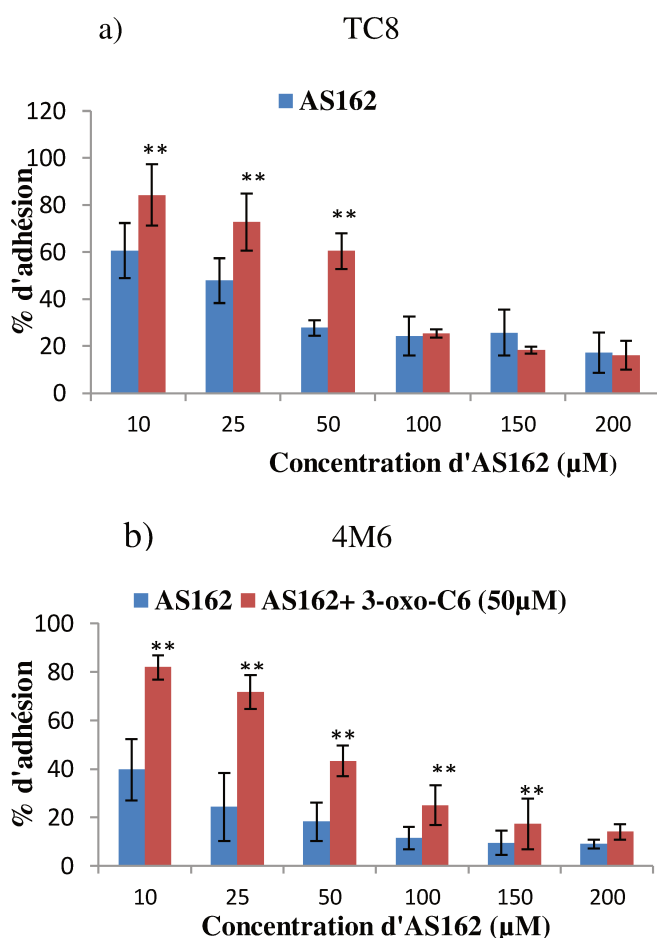


Figure 43 : Effet de combinaison d'AS162 et 3-oxo-C6 HSL sur l'adhésion chez *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie avec AS162 sans ajout de 3-oxo-C6HSL).

4-1.3 Mise en évidence de la restitution de l'adhésion chez les bactéries par la détermination des CE_{50} des différentes combinaisons

Les CE_{50} calculées ont montré une réduction de l'effet d'anti-adhésion des composés antifouling par les inhibiteurs QS. Cette réduction d'effet s'est avérée plus marquée sur AS162 (troisième bloc du tableau 20) chez chacune des souches. Toujours selon les CE_{50} déterminées, la réduction de l'effet d'anti-adhésion a été moins prononcée chez AS194 (deuxième bloc du tableau 20). Dans le premier

bloc du **tableau 20**, la combinaison avec l'OB1 a montré une restitution d'adhésion plus marquée chez *P. ulvae* TC14 que chez TC8 et 4M6.

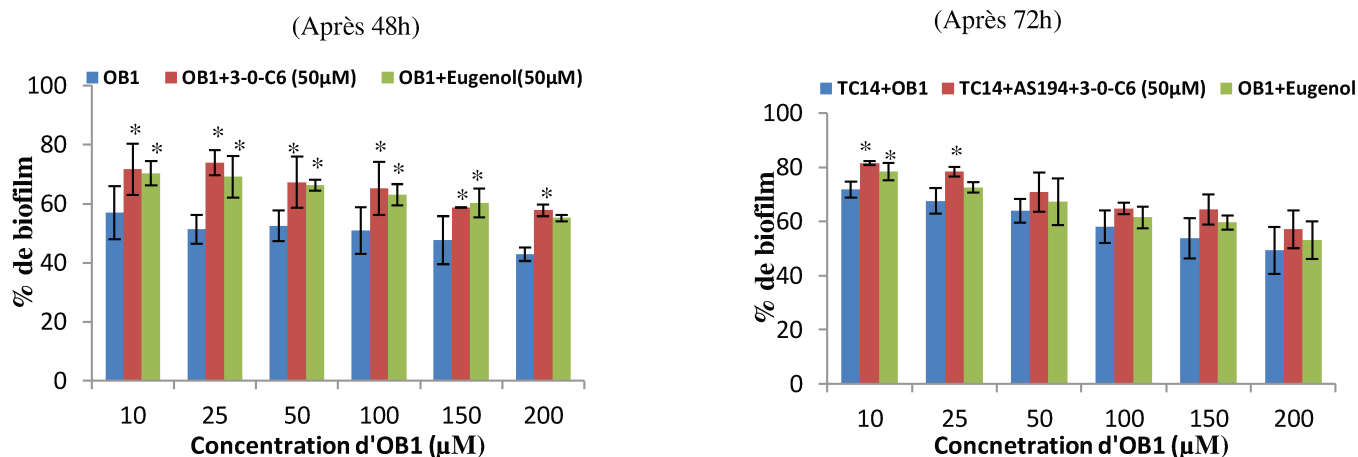
Tableau 20 : CE₅₀ (μM) des combinaisons sur l'adhésion des souches. Les valeurs marquées d'astérisque sont significativement différentes (P<0,05) du témoin (cultures de bactérie avec composé antifouling seul).

Composés	CE ₅₀ (μM) chez TC14	CE ₅₀ (μM) chez TC8	CE ₅₀ (μM) chez 4M6
OB1	75,4±5,4	216,9±6,7	114,7±3,7
OB1+3-oxo-C6	108,3±7,7**	248,2±7,4	145,6±4,1*
OB1+Eugenol	150,8±11,8***	231,8±8,8	144,1±9,9*
AS194	38,2±4,7	75,5±4,1	174,5±7,5
AS194+3-oxo-C6	55,4±3,1*	88,9±3,1	272,8±3,5**
AS194+Eugenol	74,3±2,8*	77,4±9,1	189,7±11,2
AS162	4,3±1,1	23,2±2,4	8,0±0,8
AS162+3-oxo-C6	64,1±5,7***	50,8±2,8***	41,1±1,8***
AS162+Eugenol	62,9±3,9***	48,7±5,9***	22,1±10,2***

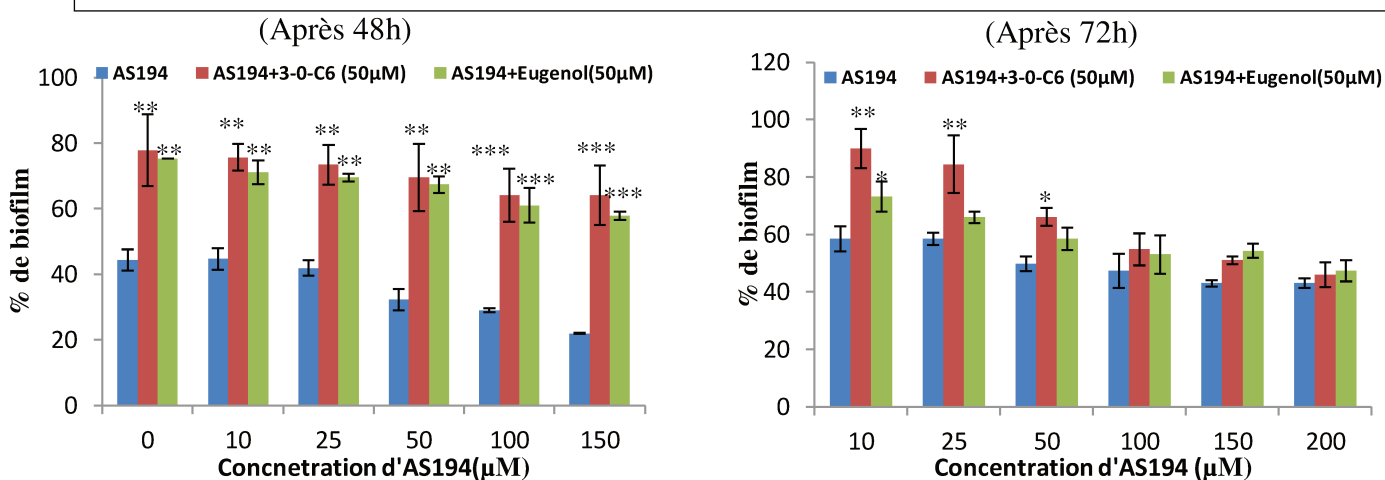
4-1.4 Effet de la combinaison des QSI et des trois composés antifouling sur la formation du biofilm chez TC14

Les combinaisons des analogues synthétiques et des inhibiteurs de QS ont été testées sur la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. Le constat a été que la présence des inhibiteurs de QS a provoqué la restitution du biofilm chez *P. ulvae* TC14. Cette restitution a été beaucoup plus accentuée après 48h. Cependant, à 72h la masse de biofilm restituée a tendance à baisser pour ce qui concerne OB1 et AS194. Pour ce qui concerne AS162, le biofilm est autant restitué à 48h qu'à 72h. Par ailleurs, plus l'effet du composé est élevé, plus la restitution est marquée. Ainsi, OB1 ayant l'effet le moins élevé, a un taux d'augmentation moyenne d'environ 25% en cas de combinaison. L'AS194 et l'AS162 ont des taux respectifs de 50% et de 80% après 48h. Les résultats des effets de combinaison des analogues synthétiques aux inhibiteurs de QS chez *P. ulvae* TC14 sont mentionnés sur la **figure 44** ci-dessous.

a) Effet de la combinaison d'OB1 aux inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez TC14



b) Effet de la combinaison d'AS194 aux inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez TC14



c) Effet de la combinaison d'AS162 aux inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez TC14

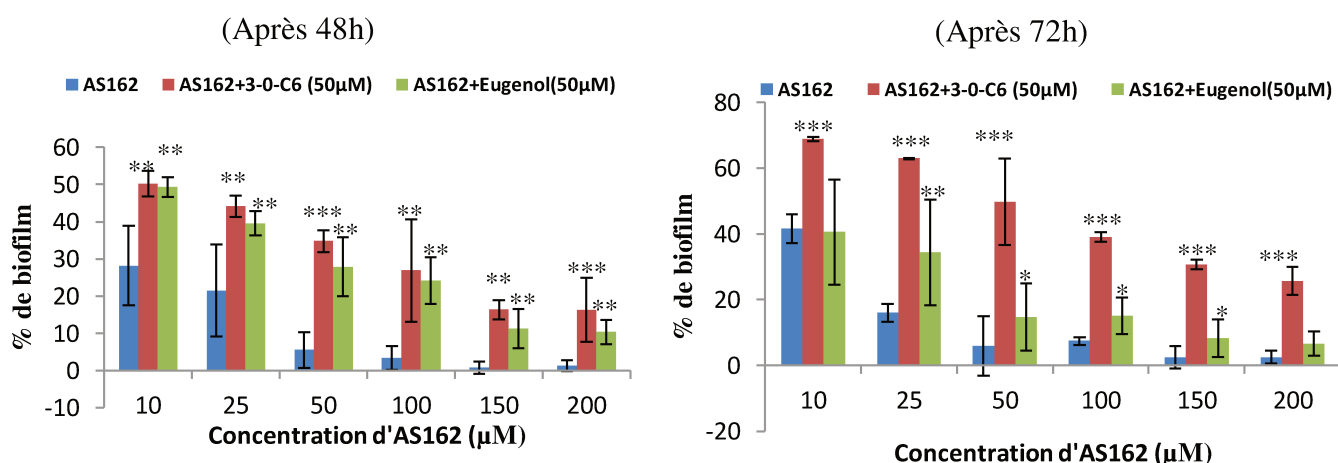
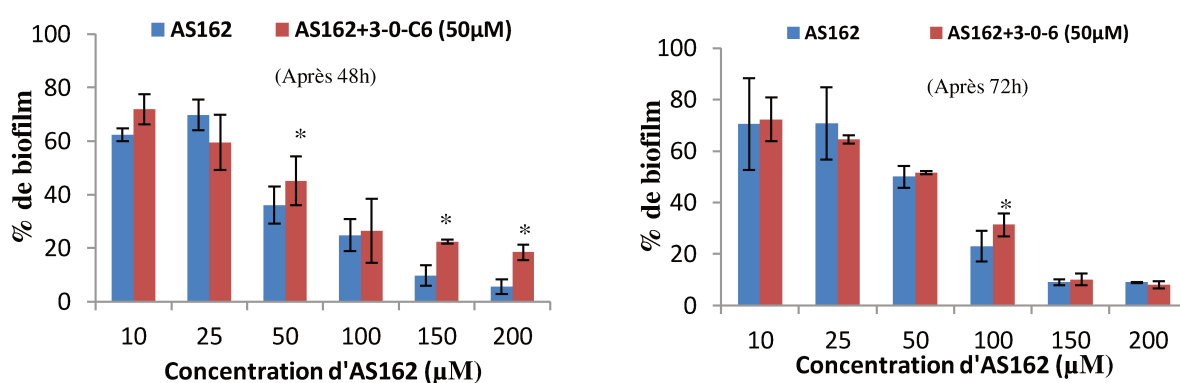


Figure 44 : Effet de Combinaison des analogues avec les inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie avec composés antifouling sans ajout d'inhibiteurs de QS).

4-1.5 Effet des combinaisons sur le biofilm chez *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus* sp. 4M6

L'essai a été repris avec AS162 et 3-oxo-C6 HSL sur les deux autres bactéries. Cette combinaison a semblé être la plus pertinente chez ces deux souches. Les résultats ont montré également un effet antagoniste des deux types de composés se révélant par la restitution de biofilm chez les différentes souches. Celle-ci serait due à la présence des inhibiteurs de QS. Il est à noter que l'augmentation du taux de biofilm en présence des molécules combinées a paru beaucoup plus importante après 48h qu'après 72h. Les résultats sont présentés dans la **figure 45** ci-dessous.

a) Effet de la combinaison d'AS162 aux inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez TC8



b) Effet de la combinaison d'AS162 aux inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez 4M6

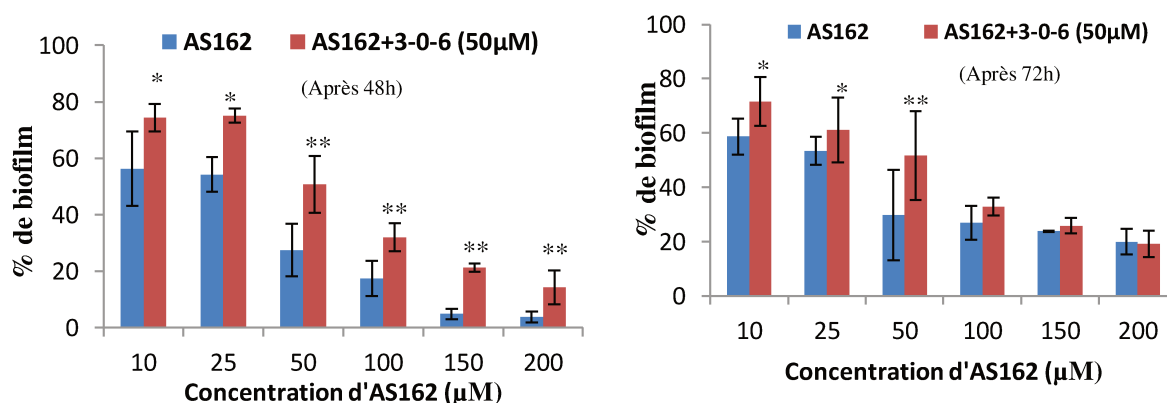


Figure 45 : Effet de combinaison des analogues et des inhibiteurs de QS sur la formation de biofilm chez TC8 et 4M6.

4-1.6 Détermination des CE₅₀ des combinaisons sur le biofilm chez *P. ulvae* TC14 et les deux autres souches.

Les CE₅₀ des combinaisons sur le biofilm ont été calculées et reportées dans le **tableau 21** ci-dessous. Les résultats ont montré une augmentation des CE₅₀ correspondant aux combinaisons. Cette augmentation des CE₅₀ très accentuée chez *P. ulvae* TC14, se reproduit également chez *P. lypolitica* TC8 et *Paracoccus* *sp.* 4M6 avec les combinaisons incluant la 3-oxo-C6 HSL.

Tableau 21 : CE₅₀ des combinaisons sur le biofilm des souches. Les valeurs marquées d'astérisque sont significativement différentes (P<0,05) du témoin (cultures de bactérie avec composé antifouling seul).

Composés	Temps(h)	CE ₅₀ (μM) chez TC14	CE ₅₀ (μM) chez TC8	CE ₅₀ (μM) chez 4M6
OB1		69,8±5,8	127,9±3,5	328,0±9,4
OB1+3-oxo-C6	48	173,8±11,4***	140,3±5,4*	357,2±3,4*
OB1+Eugenol		159,8±11,02***	133±11,8	333,1±16,3
OB1		125,6±11,0	333,7±5,7	209,5±7,8
OB1+3-oxo-C6	72	200,3±8,4**	319,8±7,4	231,1±4,0*
OB1+Eugenol		180,8±6,89*	340,2±14,1	211,4±7,1
AS194		24,7±3,8	48,7±5,0	26,9±4,5
AS194+3-oxo-C6	48	232,2±11,7***	72,3±2,5*	48,6±2,8**
AS194+Eugenol		186,7±7,2***	61,3±9,4*	31,1±7,9
AS194		66,3±5,4	53,0±2,4	166,7±6,7
AS194+3-oxo-C6	72	135,5±6,4***	69,36±3,1*	174,0±5,7
AS194+Eugenol		108,9±10,8**	55,4±8,8	171,22±8,9
AS162		4,42±1,2	29,37±4,0	18,8±2,1
AS162+3-oxo-C6	48	20,1±3,4***	37,1±2,7*	47,8±2,4***
AS162+Eugenol		15,4±3,9***	30,7±13,1*	42,3±10,2***
AS162		6,0±1,4	36,5±2,8	25,9±2,4
AS162+3-oxo-C6	72	50,9±4,7***	37,9±7,0	44,6±2,6**
AS162+Eugenol		9,4±7,8	35,4±12,1	33,7±9,4

4-2 Evaluation de l'impact de l'activation du QS sur l'effet antifouling des trois composés (OB1, AS194 et AS162) par approche combinatoire

4-2.1 Effet des combinaisons sur l'adhésion

4-2.1.1 Chez *P. ulvae* TC14

Tout comme les inhibiteurs de croissance, la 3-oxo-C8 HSL et le farnesol ont été combinés aux composés antifouling et testés sur l'adhésion chez TC14. Ces deux molécules ont été considérées au cours de cette étude comme étant des activateurs de QS du fait de leur effet inducteur sur la production de violacéine chez TC14. Il a été question de vérifier si ces deux types de molécules auraient un effet synergique sur l'adhésion de *P. ulvae* TC14 contrairement au cas précédent. Cependant les résultats ont révélé un effet antagoniste comme dans le cas des inhibiteurs de QS. Ces résultats sont présentés sur la **figure 46** ci-dessous.

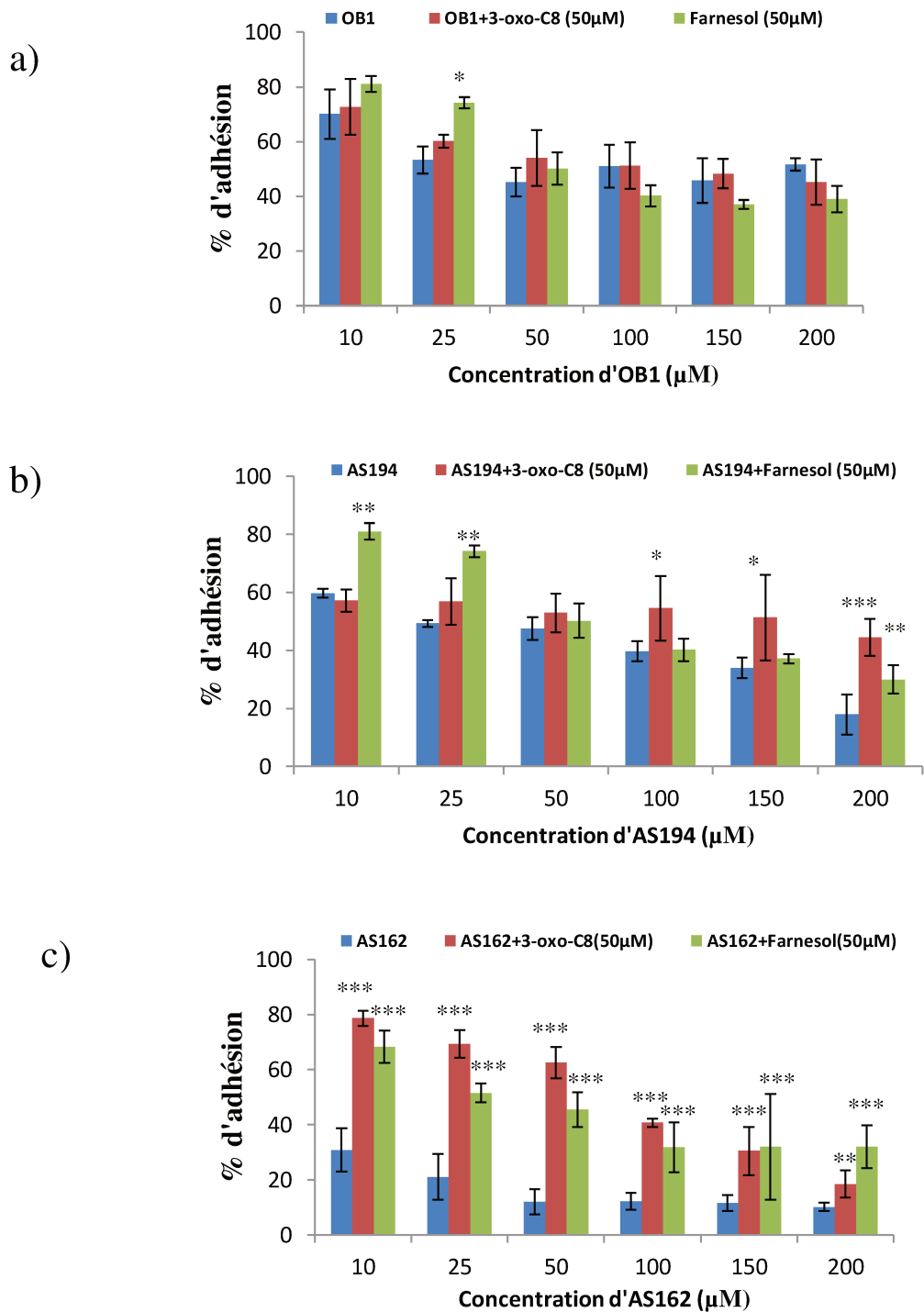
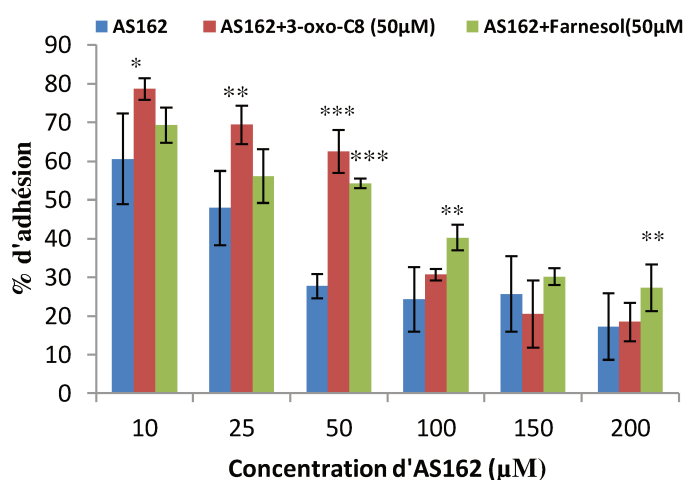


Figure 46 : Effet de la combinaison des analogues avec les activateurs de QS sur l'adhésion chez *P. ulvae* TC14. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie avec composés antifouling sans ajout d'activateurs de QS).

4-2.1.2 Chez *P. lypolitica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6

Les résultats de combinaison d'AS162 avec les activateurs de QS ont été les plus pertinents chez les deux bactéries. La reconstitution du biofilm en présence des molécules agissant sur le QS a été remarquée autant bien chez *P. lypolitica* TC8 (figure 47a) que chez *Paracoccus sp.* 4M6 (figure 47b).

a) TC8



b) 4M6

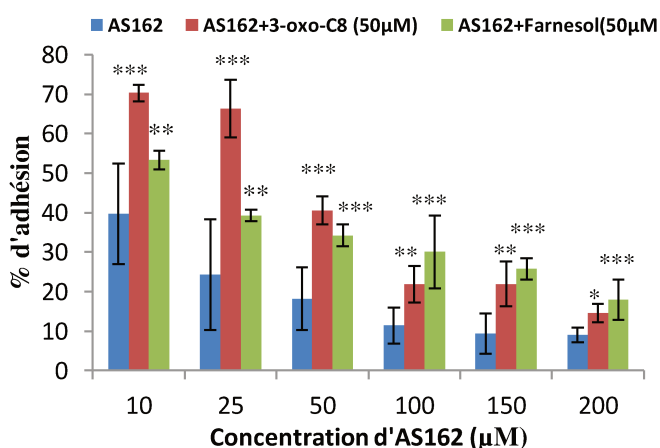


Figure 47 : Effet de la combinaison d'AS162 avec les activateurs de QS sur l'adhésion chez TC8 et 4M6. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie avec AS162 sans ajout d'activateurs de QS).

4-2.1.3 Détermination des CE₅₀ des combinaisons de composés antifouling et des activateurs de QS sur l'adhésion des souches

Les CE₅₀ des différentes combinaisons calculées chez *P. ulvae* TC14 (deuxième colonne du **tableau 22**) se trouve être significativement élevées par rapport à celles des composés seuls. Ceci montre la restitution de l'adhésion par la présence des activateurs de QS chez *P. ulvae* TC14. Aussi le contrôle effectué avec la combinaison d'AS162 et de 3-oxo-C8HSL chez les deux autres souches (les deux dernières colonnes du **tableau 22**) montre une augmentation des CE₅₀ correspondantes. Ces résultats ont été présentés dans le **tableau 22** ci-dessous.

Tableau 22 : CE₅₀ des combinaisons des trois composés et des activateurs de QS sur l'adhésion des souches. Les valeurs marquées d'astérisque sont significativement différentes (P<0,05) du témoin (cultures de bactérie avec composé antifouling seul). Les combinaisons ont été reprises chez *Paracoccus sp.* 4M6 et *P. lypolitica* TC8 qu'avec la 3-oxo-C8HSL et AS162. Les autres combinaisons ont donné lieu à une restitution d'adhésion moins élevée chez les deux autres bactéries.

Composés	CE ₅₀ (μM) chez TC14	CE ₅₀ (μM) chez TC8	CE ₅₀ (μM) chez 4M6
OB1	75,39±5,42	216,9±6,7	114,7±3,7
OB1+3-oxo-C8	108,1±8,0**	254,8±4,7*	149,5±2,4*
OB1+Farnesol	148,6±8,0***	222,9±11,3	125,4±9,1
AS194	38,2±4,7	75,5±4,1	174,5±7,5
AS194+3-oxo-C8	83,95± 4,17***	94,1±3,8**	266,7±3,8**
AS194+Farnesol	67,5±3,66871***	87,3±9,8*	201,8±4,2*
AS162	4,3±1,0	23,2±2,4	8,0±0,8
AS162+3-oxo-C8	62,9±8,7***	52,8±4,7***	35,21±2,44***
AS162+Farnesol	41,3±4,0***	44,8±12,5**	21,5±13,4***

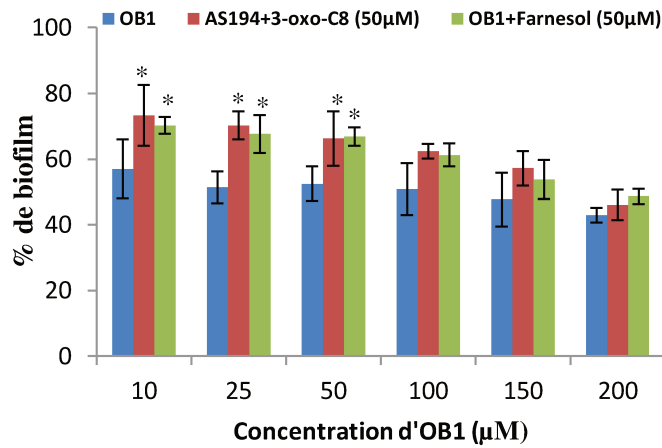
4-2.2 Effet des combinaisons des composés antifouling et les activateurs de QS sur la formation de biofilm des souches

Tout comme les inhibiteurs de croissance, la 3-oxo-C8 HSL et le farnesol ont été testés sur le biofilm chez *P. ulvae* TC14 et les deux autres bactéries. Les résultats ont montré que ces deux molécules considérées dans cette étude comme étant des activateurs de QS, inhibent également l'effet anti-biofilm des composés du Mapiem. Aussi, il est à noter que cette inhibition de l'effet anti-biofilm de ces composés a été plus marquée chez AS162 par rapport à AS194 et OB1. Cette variation de taux d'inhibition d'un composé à l'autre a été également notée dans le cas de la combinaison avec les inhibiteurs de QS. Les résultats des tests effectués à 48h ont semblé être les plus pertinents.

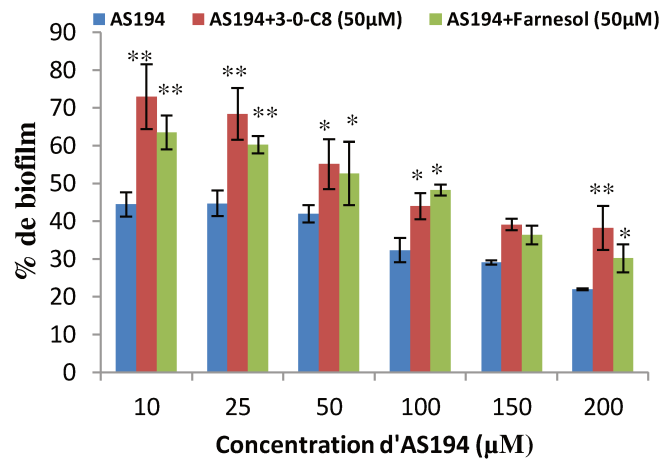
4-2.2.1 Effet des combinaisons sur la formation de biofilm après 48h chez *P. ulvae* TC14

L'effet des combinaisons a été évalué sur le biofilm chez *P. ulvae* TC14 après 48h. Il ressort des résultats que l'effet des différents composés antifouling a connu une baisse. Cette diminution d'effet se trouve être plus marquée pour le composé AS162 (**figure 48c**) qui au préalable a la plus forte inhibition sur le biofilm. Pour les autres composés notamment OB1 (**figure 48a**) et AS194 (**figure 48b**), la réduction de leur effet antifouling reste relativement faible. Les résultats sont présentés dans la **figure 48** ci-dessous.

a)



b)



c)

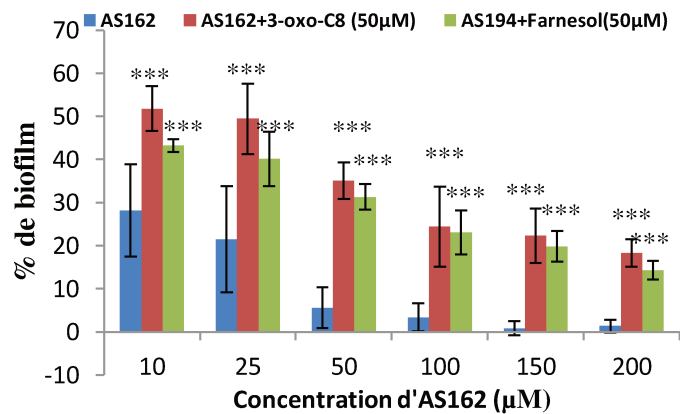
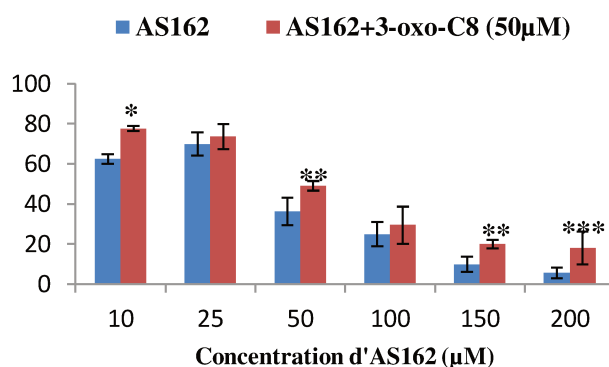


Figure 48 : Effet de la combinaison des analogues avec les activateurs de QS sur la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. Les essais marqués d'astérisque sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie + analogue sans ajout d'activateurs de QS).

4-2.2.2 Effet d'AS162 et la 3-oxo-C8 HSL sur la formation de biofilm chez *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus* sp. 4M6

Chez les deux bactéries, les combinaisons d'AS162, le composé antifouling ayant l'effet le plus élevé, aux activateurs de QS ont montré une réduction de l'effet anti-biofilm d'AS162 chez 4M6 (**figure 49b**). Chez *P. lipolytica* TC8 (**figure 49a**) la réduction de l'effet anti-biofilm est relativement faible mais reste élevé à de fortes concentrations d'AS162. Ceci marque la reproductivité des résultats obtenus sur *P. ulvae* TC14 pour ce composé. L'effet des combinaisons de l'AS162 et de 3-oxo-C8HSL sur la formation de biofilm chez les deux bactéries est évalué sur la **figure 49** ci-dessous.

a) TC8



b) 4M6

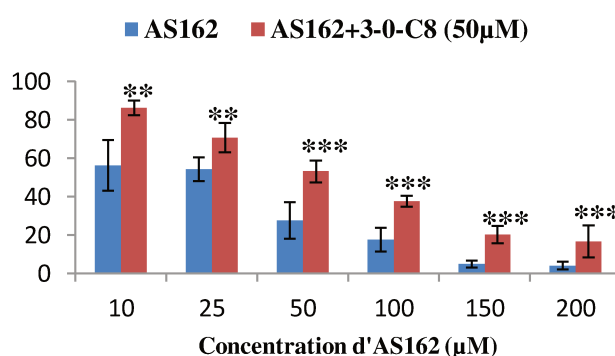


Figure 49 : Effet de la combinaison des analogues avec les activateurs de QS sur la formation de biofilm chez TC8 et 4M6

4-2.2.3 Détermination des CE₅₀ d'inhibition des combinaisons sur la formation de biofilm chez les souches

Les CE₅₀ des combinaisons ont été déterminées chez les différentes souches. Les valeurs des CE₅₀ vont dans le même sens que celles précédemment déterminées pour l'effet des combinaisons sur l'adhésion. Les résultats ont en effet montré une augmentation des CE₅₀ sous l'effet des différentes combinaisons tant chez *P. ulvae* TC14 que chez les deux autres souches. Les résultats sont présentés dans le **tableau 23** ci-dessous.

Tableau 23 : CE₅₀ des combinaisons sur le biofilm des souches après 48h. Les valeurs marquées d'astérisque sont significativement différentes (P<0,05) du témoin (cultures de bactérie avec composé antifouling seul).

Composés	CE ₅₀ (µM) chez TC14	CE ₅₀ (µM) chez TC8	CE ₅₀ (µM) chez 4M6
OB1	69,8±5,8	127,9±3,5	328,0±9,4
OB1+3-oxo-C8	138,7±9,8***	172,8±6,4**	349,4±6,8
OB1+farnesol	132,7±12,1***	152,1±10,5	321,4±9,3
AS194	24,7±3,8	48,7±5,0	26,9±4,5
AS194+3-oxo-C8	232,2±11,7***	73,1±5,8*	53,6±2,0***
AS194+Farnesol	59,89±7,23***	59,4±11,2	47,1±11,2**
AS162	4,4±1,2	29,37±4,0	18,8±2,1
AS162+3-oxo-C8	20,1±3,4***	46,73±1,7**	53,2±1,4***
AS162+Farnesol	15,6±3,8***	33,1±7,4	31,4±8,7***

5- Conclusion

Au regard de tout ce qui précède, la génération d'une réponse QS chez *P. ulvae* TC14 a tendance à favoriser la diminution de l'effet antifouling des composés chez cette bactérie. En effet les composés antifouling mis au point au laboratoire MAPIEM ont connu une réduction de leur effet antifouling lorsqu'ils ont été combinés aux modulateurs. Ces modulateurs de QS sont constitués d'une part par les inhibiteurs de QS (3-oxo-C6 HSL et eugénol) et d'autres par des activateurs de QS (3-oxo-C8 HSL et farnesol). Ces résultats se sont reproduits chez *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6 (dont le système QS n'a pas été étudié), qui sont des souches possédant une énorme capacité d'adhésion et de formation de biofilm (**Brian-Jaisson et al., 2014**).

Dans la première partie de nos résultats, il s'agit des inhibiteurs de QS générant une restitution de l'adhésion et du biofilm. Or chez les bactéries à Gram négatif, le QS est généralement l'une des fonctions clés de la formation de biofilm (**Donlan et Costerton, 2002**). Ainsi, dans les travaux réalisés par **Böcher et al., 2018**, les composés anti-QS tels que l'acide 3-hexylylquinoxaline-2 et le 3-hexylylquinoxaline-2 ont contribué fortement à l'inhibition de la formation de biofilm chez *Aeromonas caviae*. L'inhibition du QS est donc un moyen pour interrompre la formation de biofilm chez les bactéries à Gram négatif. Cela dit, l'association d'un inhibiteur de QS et d'un composé antifouling devrait réduire de manière synergique la formation du biofilm. D'ailleurs, au cours des travaux de **Kaur et al., 2016**, des dérivés d'urées criblés en tant qu'inhibiteurs QS, mis en association avec des composés naturels de type fluorure, ont réduit de manière synergique la formation de biofilm chez *Streptococcus mutans*, une bactérie gram positif. Ces résultats sont différents de ceux retrouvés dans cette étude même s'il s'agit de souches bactériennes différentes. Ainsi, l'inhibition du QS chez *P. ulvae* TC14 semble ne pas être un moyen favorable à la réduction du biofilm. L'hypothèse qui pourrait être émise dans ce sens est que la régulation du biofilm serait assurée par plusieurs facteurs y compris le système AHL. Ceci pourrait créer

un système de relais en cas d'inhibition de ce système QS. De sorte que le système peptidique décrit dans le **chapitre 3** de cette étude révélant la présence du gène *qseBC* chez *P. ulvae* TC14 par exemple assure le relais en cas d'inhibition du système QS basé sur les AHLs. Ce qui expliquerait la restitution du biofilm chez *P. ulvae* TC14.

Pour ce qui concerne les activateurs du QS (farnesol et 3-oxo-C6HSL), cette étude a montré qu'ils contribuent à la restitution de l'adhésion et du biofilm chez *P. ulvae* TC14 et les autres souches. Ces résultats sont contraires à ceux de **Dizovà et al., 2018** qui ont montré que le farnesol en association avec le fluconazole a réduit considérablement le biofilm chez *Candida albicans*. Cependant, le Farnesol avait été décrit dans ce cas de figure comme étant plutôt un inhibiteur QS et de surcroît les résultats concluants n'ont été obtenus qu'à forte concentration de celui-ci (200 μ M). Concernant l'étude ici menée sur *P. ulvae* TC14, le Farnesol et la 3-oxo-C8HSL ont été testés à une concentration relativement faible (50 μ M) et jugée optimale à l'activation du QS chez *P. ulvae* TC14. Néanmoins, une étude menée par **Nguyen et al., 2012** sur les molécules modulatrices de la formation de biofilm chez *L. monocytogenes* a donné des résultats similaires à ceux obtenus chez *P. ulvae* TC14 au cours de cette étude. En effet, ces auteurs ont révélé que l'association de l'acide palmitique (un activateur QS) et de la L-carnitine (un inhibiteur de biofilm) a montré un effet antagoniste sur la formation de biofilm chez *L. monocytogenes*. En dépit de la différence culturelle, physiologique et génotypique entre *P. ulvae* TC14 et *L. monocytogenes*, le phénomène observé chez les deux souches pourrait justifier un possible lien de dépendance entre l'activation du QS et la restitution du biofilm bactérien.

La modulation du QS favorise l'adhésion et la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14 et les autres souches bactériennes. En revanche, dans le but de potentialiser l'effet antifouling des trois composés synthétisés au laboratoire MAPIEM, il serait souhaitable de trouver d'autres cibles chez *P. ulvae* TC14 en

dehors du système QS. Ainsi, dans le prochain chapitre (**chapitre 5**) de cette étude, des stratégies d'amélioration de l'effet antibiofilm des analogues synthétiques ont été mises en place chez *P. ulvae* TC14. Ces stratégies ont visé la perméabilisation de la membrane bactérienne et l'inhibition des pompes d'efflux.

Chapitre V :

**Evaluation de deux voies de potentialisation de
l'effet antifouling des analogues synthétisés**

1- Introduction

Ce chapitre a pour but la mise au point des stratégies de renforcement de l'effet antifouling des trois analogues synthétiques précédemment décrits. Pour cela, il a semblé nécessaire d'avoir recourt à des molécules organiques ayant des cibles autres que le quorum sensing. Les molécules qui ont servi dans cette étude à potentialiser l'effet antifouling des composés AS162, AS194 et OB1 ont été décrites pour être des adjuvants dans les travaux d'**Aurelien Stutzmann, 2017**. Selon cet auteur, les adjuvants se présentent comme des composés ne possédant généralement pas d'activité antibactérienne intrinsèque. Cependant, ceux-ci permettent à un autre composé d'avoir une meilleure action sur sa cible.

Les adjuvants utilisés au cours de cette étude se subdivisent en deux groupes selon leurs spécificités d'action. Ainsi, une première classe d'adjuvant susceptible de perméabiliser la membrane bactérienne a été utilisée. Celle-ci est constituée de Polymyxin B nanopeptide hydrochloride (PMBN), Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) et Carbonyl cyanide mchlorophenylhydrazone (CCCP). Ces molécules ont donné des résultats concluants en association avec plusieurs antibiotiques (**Hancock et Wong, 1984**). En dehors de la barrière membranaire, l'un des modes de résistance bactérienne consiste en l'extrusion de substances nocives à la bactérie au travers des canaux situés sur la membrane. Ces canaux sont appelés pompes d'efflux (**Blanco et al., 2016**). Ainsi, la seconde classe d'adjuvant étudiée dans cette étude a pour rôle d'inhiber l'activité de ces pompes. Cette classe est constituée de six molécules de type coumarine. L'association de ces adjuvants aux analogues synthétiques (OB1, AS194 et AS162) a semblé nécessaire en vue d'obtenir une potentialisation de l'effet antiadhésif et anti-biofilm chez *P. ulvae* TC14. Les résultats ont effectivement montré que ces adjuvants contrairement aux modulateurs de QS testés dans le chapitre précédent, ont plutôt augmenté l'effet antifouling des composés.

2- Potentialisation de l'effet antifouling des analogues synthétiques par les perméabilisants membranaires

2-1 Fonctions et représentations schématiques des perméabilisants utilisés dans cette étude

La représentation schématique des trois molécules révèle des variations au plan structural, mais un rapprochement fonctionnel. Ainsi, le Polymyxin B nonapeptide hydrochloride (PMBN) (**Schéma 7**) est un peptide cyclique cationique dérivé par transformation enzymatique du peptide naturel polymyxine B. Celui-ci est capable d'augmenter la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques hydrophobes, probablement en se liant au lipopolysaccharide (LPS) bactérien (**Tsubery et al., 2000**). Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PABN) (**Schéma 8**) a parfois été classé parmi les inhibiteurs des pompes d'efflux chez des Gram négatifs. Cependant, dans cette étude il a été considéré comme un perméabilisant. En effet, les études menées par **Lamers et collaborateurs en 2013** ont montré que le PABN est capable de réduire considérablement la CMI de l'antibiotique β lactamine chez *P aeruginosa*. Enfin, le carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP) représenté dans le **Schéma 9** est une hydrazone liée à deux nitriles et à un noyau chlorobenzène. En association avec la réserpine celui-ci a montré une activité de perméabilisation membranaire chez *Acinetobacter baumannii* même s'il a également montré une activité inhibitrice sur les pompes d'efflux dans chez un grand nombre de bactéries à Gram négatif (**Shi et al., 2005**).

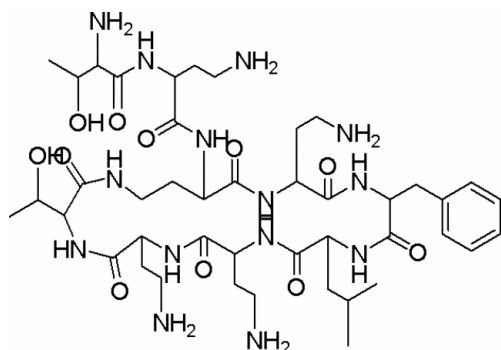
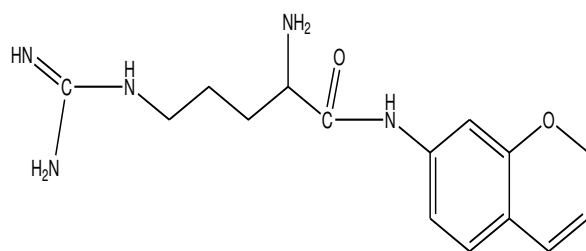
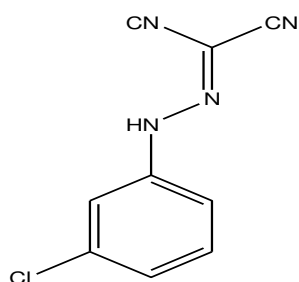


Schéma 7 : Polymyxin B nonapeptide hydrochloride (PMBN)



Shema 8: Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PABN)



Shema 9: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP)

2-2 Etude de la toxicité des perméabilisants membranaires seuls chez *P. ulvae* TC14 et les autres souches

La toxicité des trois adjuvants a été déterminée chez *P. ulvae* TC14 et les deux autres souches marines notamment *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6 en microplaques transparentes. La resazurine a été utilisée pour le marquage des cellules vivantes (bleu) et des cellules morte (rouge). Ces molécules n'ont pas montré d'effet toxique chez les différentes souches à 24h. Après 48h le PMBN et le PA β N ont plutôt montré des effets toxiques à partir de 20 μ M et CCCP à partir de 7 μ M. Ainsi, les concentrations de perméabilisants retenues pour les tests de combinaison avec les analogues synthétiques sont de 10 μ M pour PMBN et PA β N et de 5 μ M pour CCCP. Celles-ci n'ont pas montré de toxicité significative chez *P. ulvae* TC14 ni chez les autres bactéries après 48h. Ces résultats sont résumés dans la **figure 50** ci-dessous.

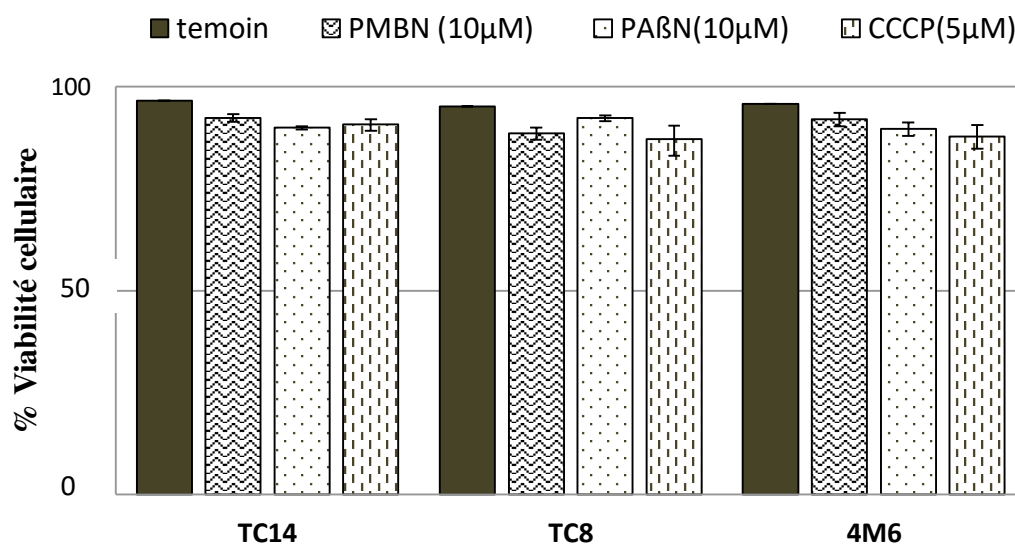


Figure 50 Evaluation de la toxicité des perméabilisants chez les trois souches après 48h. Trois essais ont été réalisés en microplaques transparentes 96 puits. 10% de Resazurine ont servi au marquage des cellules et la lecture a été faite au TECAN à 570 nm. Les résultats ont été ramenés en pourcentage. Les tests statistiques à $p < 0.05$ n'ont révélé aucune différence significative.

2-3 Potentialisation de l'effet antifouling des analogues synthétiques

Les permeabilisants, comme précédemment décrits ont permis dans plusieurs expériences de relever l'effet antibactérien des antibiotiques. Ceci est possible grâce à la perméabilisation de la membrane bactérienne permettant l'augmentation du taux de composés antibactériens à l'intérieur des cellules bactériennes. Dans cette étude, AS162, AS194 et OB1 ont été testés en association avec les perméabilisants. Les résultats ont effectivement montré un effet synergique sur l'adhésion et la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14 et les deux autres souches.

2-3.1 Effet de la combinaison des analogues et des perméabilisants sur l'adhésion des bactéries

Les différentes concentrations de perméabilisants précédemment testées et n'ayant pas d'effet toxique significatif sur les souches ont été retenues pour les tests de combinaison. Les résultats présentés sur la **figure 51** ci-dessous, ont montré que l'effet anti-adhésion des composés a augmenté de manière significative. Cette augmentation suit un ordre décroissant en partant d'OB1 (**figure 51ABC**), le composé ayant le plus faible effet individuel, à AS194 (**figure 51DEF**) et AS162 (**figure 51GHI**) qui ont les effets les plus élevés. Le renforcement de l'effet se trouve être plus élevé chez *P. ulvae* TC14 (**figure 51A**) que chez *P. lypolitica* TC8 (**figure 51B**) et *Paracoccus* sp. 4M6 (**figure 51C**). Pour ce qui concerne AS194 (**figure 51DEF**) il n'y a visiblement pas de différence entre les trois souches dans l'augmentation d'effet anti-adhésion. Pour AS162 ayant un effet antiadhésif individuel très marqué dès le départ sur *P. ulvae* TC14 (**figure 51G**), l'effet synergique n'est pas marqué avec les perméabilisants chez *P. ulvae* TC14 sauf avec le CCCP à 25 et 50 μ M. Chez *P. lypolitica* TC8 (**figure 51H**) et 4M6 (**figure 51I**) les effets synergiques sont plus visibles et cela semble être lié à l'effet antiadhésif d'AS162 seul qui se trouve être faible chez ces

deux bactéries par rapport à l'effet antiadhésif chez *P. ulvae* TC14. Ces résultats sont présentés sur la **figure 51** ci-dessous.

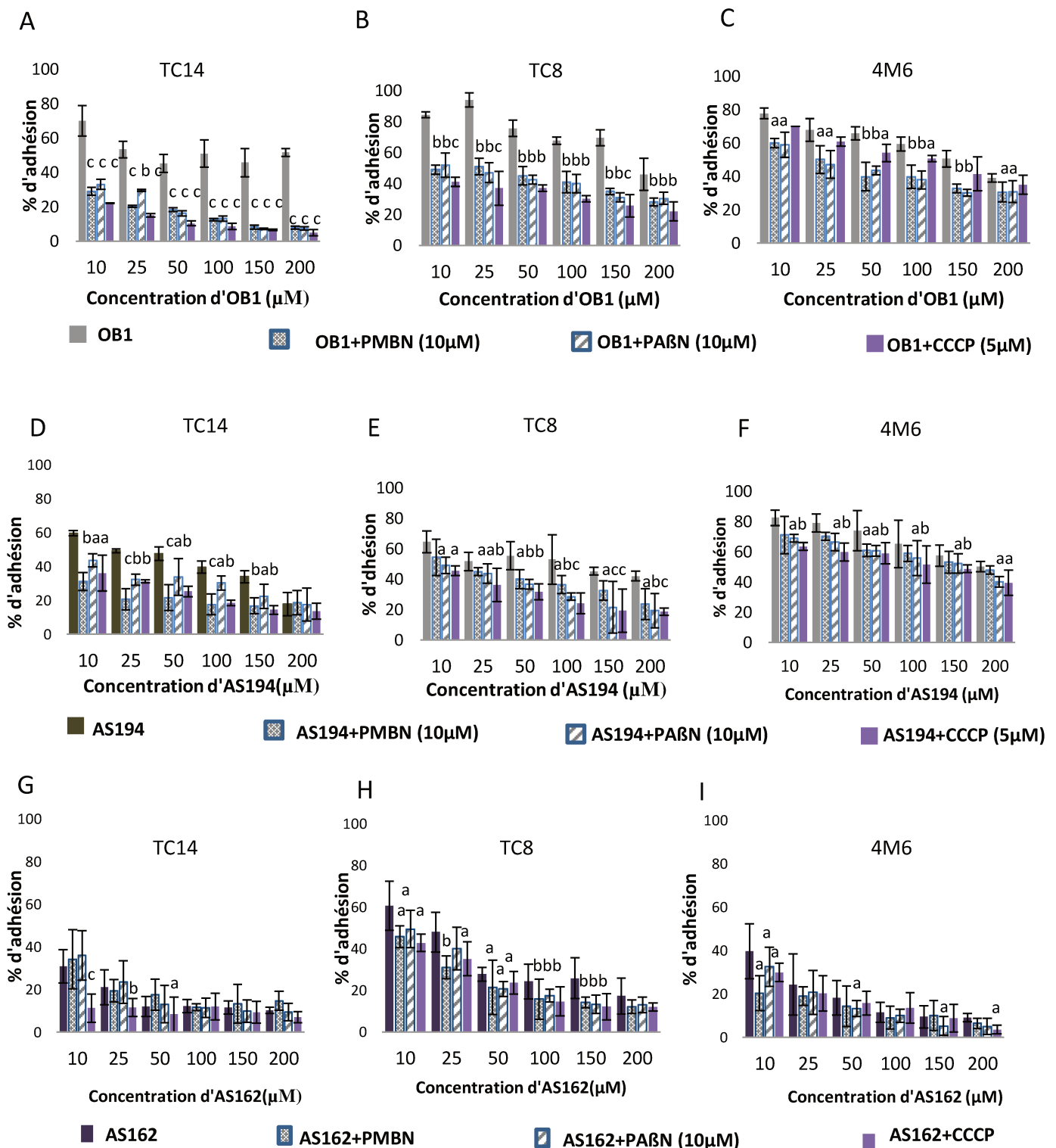


Figure 51 : Effet de la combinaison des analogues synthésés avec les perméabilisants sur l'adhésion chez TC14, TC8 et 4M6. Les essais ont été réalisés trois fois en réplicats en microplaques noires 96 puits. Les essais marqués de lettres sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans perméabilisants). Les nombres d'astérisque (*), (**) et (***) ont été respectivement désignés par les lettres a, b et c.

2-3.2 Mise en évidence de la potentialisation de l'effet d'anti-adhésion par la détermination des CE₅₀ de l'effet d'anti-adhésion des combinaisons et les pourcentages de réduction des CE₅₀.

L'effet synergique des composés et des perméabilisants s'est révélé tant avec les graphes de la **figure 51** que la diminution des CE₅₀ déterminée et mentionnée dans le **tableau 24** ci-dessous. Il ressort de ces résultats que l'effet des composés a été renforcé significativement par la présence des perméabilisants. Cette augmentation s'exprime par des taux de réduction des CE₅₀ qui sont variables d'un analogue à l'autre. Chez *P. ulvae* TC14 il est clair que OB1 a le taux de réduction le plus élevé (entre 90% et 95%). Par contre, AS162 a le taux le plus faible et de surcroît connaît plutôt une réduction d'effet en association avec PMBN (-54,6%) et PAβN (-60,2%) chez *P. ulvae* TC14. Chez les autres souches (TC8 et 4M6) le taux de réduction suit le même ordre de grandeur c'est-à-dire décroissant en partant d'OB1, AS194 à AS162. Cependant chez *Paracoccus sp.* 4M6, les valeurs restent sensiblement proches pour les combinaisons avec AS162 et AS194. Ces résultats ont été résumés dans le **tableau 24** ci-dessous.

Tableau 24 : Détermination des CE₅₀ des combinaisons sur l'adhésion des souches et leur taux de réduction. Le taux de réduction a été calculé par la formule : [100- (CE₅₀ combinaison/CE₅₀ composé naturel seul)] X 100]. Les valeurs affectées du signe (-) correspondent à une réduction de l'effet d'AS162.

Souches	Analogues +combinaisons avec les perméabilisants	CE ₅₀ (μM) sur l'adhésion des souches	Taux de Réduction de CE ₅₀ (%)
TC14	OB1	75,39±5,4	
	OB1+PMBN (10μM)	5,68±1,5 ^c	92,5
	OB1+PAβN (10μM)	7,32±0,9 ^c	90,3
	OB1+CCCP (5μM)	3,6±1,0 ^c	95,2
	AS194	38,27±4,7	
	AS194+PMBN (10μM)	7,077±1,5 ^c	81,5
	AS194+PAβN (10μM)	15,63±2,8 ^b	59,2
	AS194+CCCP (5μM)	9,94±1,8 ^a	74,0
	AS162	4,3±1,1	
	AS162+PMBN (10μM)	6,646±1,5 ^b	-54,6
	AS162+PAβN (10μM)	6,887±1,0 ^a	-60,2
	AS162+CCCP (5μM)	2,038±0,8 ^b	52,6
TC8	OB1	216,9±6,8	
	OB1+PMBN (10μM)	37,96±3,7 ^c	82,5
	OB1+PAβN (10μM)	34,32±4,1 ^c	84,2
	OB1+CCCP (5μM)	18,03±2,7 ^c	91,7
	AS194	75,54±4,1	
	AS194+PMBN (10μM)	30,28±3,1 ^a	59,9
	AS194+PAβN (10μM)	21,54±1,8 ^a	71,5
	AS194+CCCP (5μM)	15,77±2,9 ^a	79,1
	AS162	23,21±2,4	
	AS162+PMBN (10μM)	11,23±0,9 ^b	51,6
	AS162+PAβN (10μM)	13,85±0,9 ^a	40,3
	AS162+CCCP (5μM)	11,42±2,1 ^a	50,8
4M6	OB1	114,7±3,8	
	OB1+PMBN (10μM)	38,37±1,9 ^a	66,5
	OB1+PAβN (10μM)	36,59±3,3 ^a	68,1
	OB1+CCCP (5μM)	72,94±2,8	36,4
	AS194	174,5±7,6	
	AS194+PMBN (10μM)	122,7±4,9	29,7
	AS194+PAβN (10μM)	103,2±2,1 ^a	40,9
	AS194+CCCP (5μM)	84,49±7,9 ^b	51,6
	AS162	8,030±0,9	
	AS162+PMBN (10μM)	3,910±0,9 ^b	51,3
	AS162+PAβN (10μM)	5,752±1,9	28,4
	AS162+CCCP (5μM)	5,606±1,0	30,2

NB : a = (*) ; b = (**) ; c = (***)

2-3.3 Effet des combinaisons sur la formation de biofilm chez les trois souches

Les mêmes combinaisons testées ci-dessus ont été également appliquées sur la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14 et les autres souches pendant 48 heures. Les résultats (**figure 52**) ont montré une potentialisation de l'effet des analogues sur la formation de biofilm. Il est à noter que le taux d'augmentation de l'effet anti-biofilm des analogues semble être moins élevé par rapport au taux d'augmentation de l'effet d'anti-adhésion précédemment décrit sur la figure 52. Ainsi, les associations de PMBN et PA β N avec d'une part OB1 (**figure 52A, 52B et 52C**) et AS194 (**figure 52D, 52E et 52C**) d'autre part une faible augmentation de l'effet des ces deux analogues. Toutefois, chez *P. ulvae* TC14, les effets des combinaisons de CCCP avec l'OB1 (**figure 52A**) et avec l'AS194 (**figure 52D**) sont restés très marqués. Chez *Paracoccus sp.* 4M6 et *P. lipolytica* TC8, les effets des combinaisons contenant CCCP et OB1 ou AS194 sont restés approximativement égaux aux effets des combinaisons contenant les autres perméabilisants (PMBN et PA β N). Cependant, le mélange de AS162 aux perméabilisants (**figure 52E, 52F, 52G**) n'a montré de potentialisation chez *P. ulvae* TC14 qu'à 25 μ M d'AS162. Au-delà de 25 μ M, il n'y a pas de synergisme. De surcroit, pour des concentrations d'AS162 élevées (100 à 200 μ M) il y a plutôt la mise en place d'un effet antagoniste (**figure 52E**). Chez les autres souches également, *P. lipolytica* TC8 (**figure 52F**) et *Paracoccus sp.* 4M6 (**figure 52G**), il n'y a eu un effet potentialisateur qu'à faibles concentrations d'AS162 (10, 20 et 50 μ M). Ces résultats sont présentés sur la **figure 52** ci-dessous.

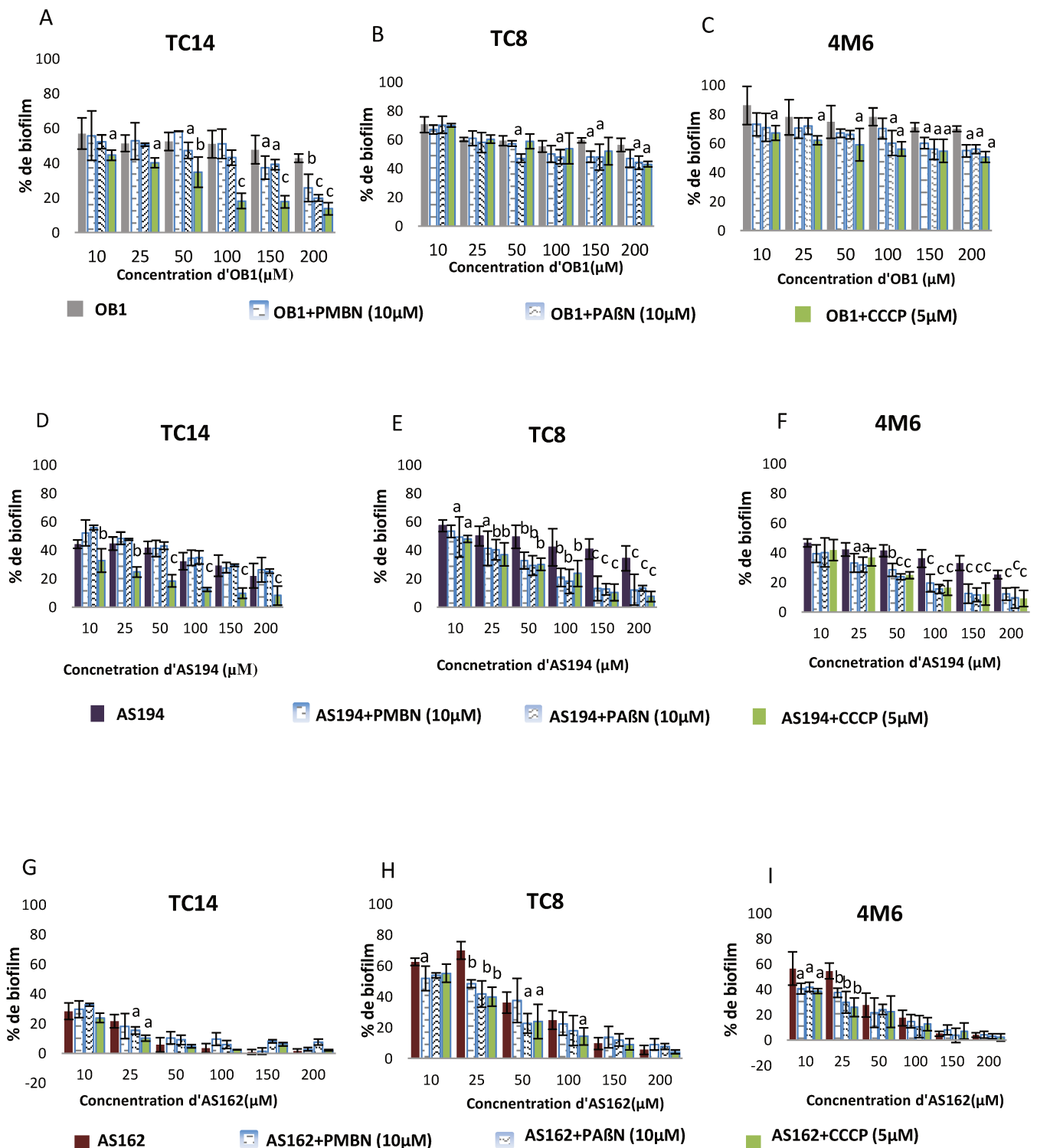


Figure 52 : Effet de la combinaison des analogues et des perméabilisants sur la formation de biofilm chez TC14, TC8 et 4M6. Les essais ont été réalisés trois fois en réplicats en microplaques transparentes 96 puits. Les essais marqués de lettres sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans perméabilisants). Les nombres d'astérisque (*), (**) et (***) ont été respectivement désignés par les lettres a, b et c.

2-3.4 Détermination des CE₅₀ des combinaisons d'analogues avec les perméabilisants sur la formation de biofilm chez les souches et le pourcentage de réduction de ces CE₅₀

Les CE₅₀ des combinaisons sur le biofilm après 48h ont montré que l'association des deux types de composés (analogues synthétiques et les perméabilisants) renforce l'effet anti-biofilm des composés naturels. Cependant, chez *P. ulvae* TC14 il a été observé un effet antagoniste qui se reflète par une augmentation des CE₅₀ des combinaisons comprenant l'AS194 d'une part et l'AS162 d'autre part avec PMBN et PAβN. Par contre, les combinaisons avec CCCP ont montré un effet synergique plus marqué chez *P. ulvae* TC14. Chez *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6, la réduction des CE₅₀ des analogues synthétiques lorsqu'ils ont été testés en combinaison avec les perméabilisants est restée marquée surtout avec AS194. Chez ces deux bactéries aucune combinaison n'a révélé une augmentation des CE₅₀. Ainsi les pourcentages de réduction des CE₅₀ calculés n'ont montré des cas d'augmentation que chez *P. ulvae* TC14 et ce avec la combinaison d'AS194 et AS162 avec PMBN et PAβN. Ces pourcentages d'augmentation de CE₅₀ sont restés néanmoins peu marqués. Ces résultats sont présentés dans le **tableau 25** ci-dessous.

Tableau 25 : Détermination des CE₅₀ des combinaisons sur la formation de biofilm des souches et leur taux de réduction. Les valeurs affectées du signe (-) correspondent plutôt à un effet antagoniste.

Souches	Composés et combinaisons	CE ₅₀ (µM) sur la formation de biofilm	Taux de Réduction de CE ₅₀ (%)
TC14	OB1	69,8±5,9	
	OB1+PMBN (10µM)	57,1±3,2	18,3
	OB1+PAβN (10µM)	40,2±3,0 ^a	42,4
	OB1+CCCP (5µM)	15,1±1,9 ^c	77,3
	AS194	24,8±3,9	
	AS194+PMBN (10µM)	30,1±2,8	-21,6
	AS194+PAβN (10µM)	32,5±4,0	-31,2
	AS194+CCCP (5µM)	6,8±0,8 ^c	72,5
	AS162	4,4±1,3	
	AS162+PMBN (10µM)	4,7±1,0	-7,2
	AS162+PAβN (10µM)	4,9±2,0	-11,8
	AS162+CCCP (5µM)	3,1±1,7	30,9
TC8	OB1	127,9±3,6	
	OB1+PMBN (10µM)	89,7±5,7	29,9
	OB1+PAβN (10µM)	73,1±4,1 ^a	42,3
	OB1+CCCP (5µM)	97,1±3,5	24,1
	AS194	48,8±5,0	
	AS194+PMBN (10µM)	17,7±3,9 ^c	63,7
	AS194+PAβN (10µM)	15,1±0,9 ^c	68,3
	AS194+CCCP (5µM)	14,5± 1,4 ^c	70,3
	AS162	29,4±4,0	
	AS162+PMBN (10µM)	20,6±2,4	29,9
	AS162+PAβN (10µM)	15,2±1,3 ^b	48,4
	AS162+CCCP (5µM)	14,5±2,1 ^b	50,7
4M6	OB1	328,0±9,5	
	OB1+PMBN (10µM)	178,3±2,7 ^b	45,6
	OB1+PAβN (10µM)	150,2±5,5 ^b	54,2
	OB1+CCCP (5µM)	113,2±6,9 ^c	65,5
	AS194	26,9±4,6	
	AS194+PMBN (10µM)	11,3±1,2 ^c	58,1
	AS194+PAβN (10µM)	10,2±0,8 ^c	62,1
	AS194+CCCP (5µM)	11,7±3,7 ^c	56,4
	AS162	18,8±2,1	
	AS162+PMBN (10µM)	10,5±2,0 ^a	44,2
	AS162+PAβN (10µM)	9,3±1,8 ^b	50,7
	AS162+CCCP (5µM)	8,0±1,8 ^b	56,7

3- Potentialisation de l'effet d'anti -adhésion des analogues par approche combinatoire avec les inhibiteurs des pompes d'efflux (EP)

L'un des moyens de défense des bactéries est l'exportation active des substances antimicrobiennes. Cette exportation se fait au moyen de complexes protéiques appelés pompe d'efflux (EP). Ces EP ont été largement décrites dans le **chapitre 1** de cette thèse. Ainsi, chez les souches étudiées dans ce travail de recherche (TC14, TC8 et 4M6) l'un des facteurs limitant la réduction de l'adhésion et du taux de biofilm par les analogues synthétiques, pourrait être ce mécanisme de défense. En clair, le rejet d'une proportion de composés par les cellules bactériennes au moyen des EP, pourrait limiter leur effet étant donné qu'il existe un effet-dose chez ces trois composés (OB1, AS194 et AS162). L'une des stratégies de renforcement de l'effet de ces composés naturels antifouling a été de les combiner aux molécules de type coumarine. Ces molécules sans toutefois montrer d'effet toxique, sont connues pour avoir un effet inhibiteur sur les EP d'un grand nombre de bactéries Gram négatifs. Pour cela elles ont été utilisées comme adjuvants de certains antibiotiques afin d'en augmenter l'activité antimicrobienne. En revanche, la combinaison des analogues synthétiques avec les coumarines a donné un effet synergique sur l'adhésion et la formation de biofilm chez les souches bactériennes.

3-1 Présentation et structures des coumarines testées dans cette étude

Les coumarines retenues pour cette étude sont au nombre de trois : VL15, VL18 et VL19. Les différentes structures sont présentées sur les **schémas 10, 11 et 12** ci-dessous.

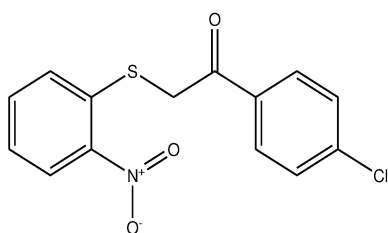


Schéma 10 : structure VL2

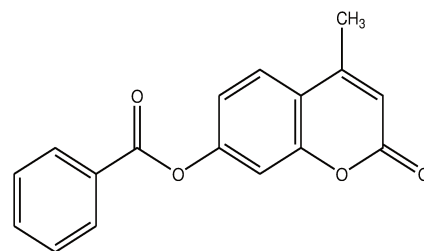


Schéma 11 : structure VL17

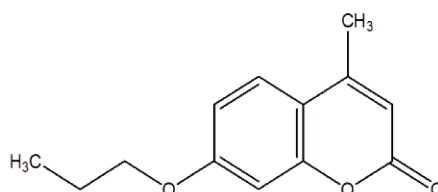


Schéma 12 : structure VL19

3-2 Evaluation de la toxicité des coumarines

Une concentration de 50 μM de chaque coumarine a été testée sur la viabilité des différentes souches pendant 48h (**Figure 53**). Les résultats n'ont montré aucune toxicité significative sur les différentes bactéries.

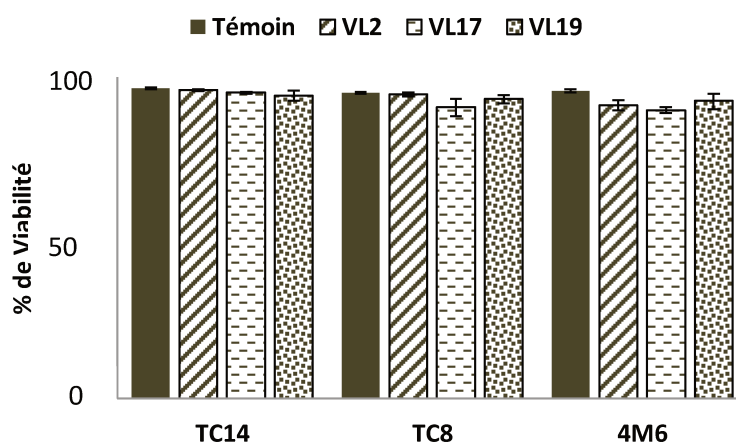


Figure 53 Evaluation de la toxicité des coumarines chez les trois souches après 48h. Trois essais ont été réalisés en microplaques transparentes 96 puits. 10% de Resazurine ont servi au marquage des cellules et la lecture a été faite au TECAN à 570 nm. Les résultats ont été ramenés en pourcentage. Les tests statistiques à $p < 0.05$ n'ont révélé aucune différence significative.

3-3 Potentialisation de l'effet d'anti-adhésion des analogues par leurs combinaisons avec les coumarines

Les coumarines auparavant testées seules n'ont pas montré d'effet significatif sur l'adhésion et la formation de biofilm tout comme les perméabilisants seuls (résultats non reportés dans cette étude). Cependant, des tests de combinaison des coumarines et des analogues ont été réalisés sur l'adhésion des souches. Ces tests ont montré que le renforcement de l'effet des analogues par les coumarines (considérées comme étant des inhibiteurs de pompes d'efflux) a été moins marqué par rapport au cas des perméabilisants.

Ainsi, l'effet synergique a été faiblement observé au niveau d'OB1 chez les trois souches (**figure 54ABC**) et de surcroît chez *Paracoccus sp.* 4M6 (**figure 54C**), il n'a été observé de différence significative. Par contre, au niveau d'AS194, l'effet synergique a été plus marqué chez *P. lypolitica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6. Chez *P. ulvae* TC14 (**figure 54D**), une augmentation d'effet d'AS194 par les coumarines n'a été observée que dans les cas de VL17 et de VL18. En ce qui concerne l'AS162 (**figure 54GHI**), le synergisme a été plus observé chez *P. lypolitica* TC8 (**figure 54H**). Chez *P. ulvae* TC14 et *Paracoccus sp.* 4M6 il n'a pu être noté que de faibles augmentations de l'effet de l'AS162. Ces résultats sont présentés dans la **figure 54** ci-dessous.

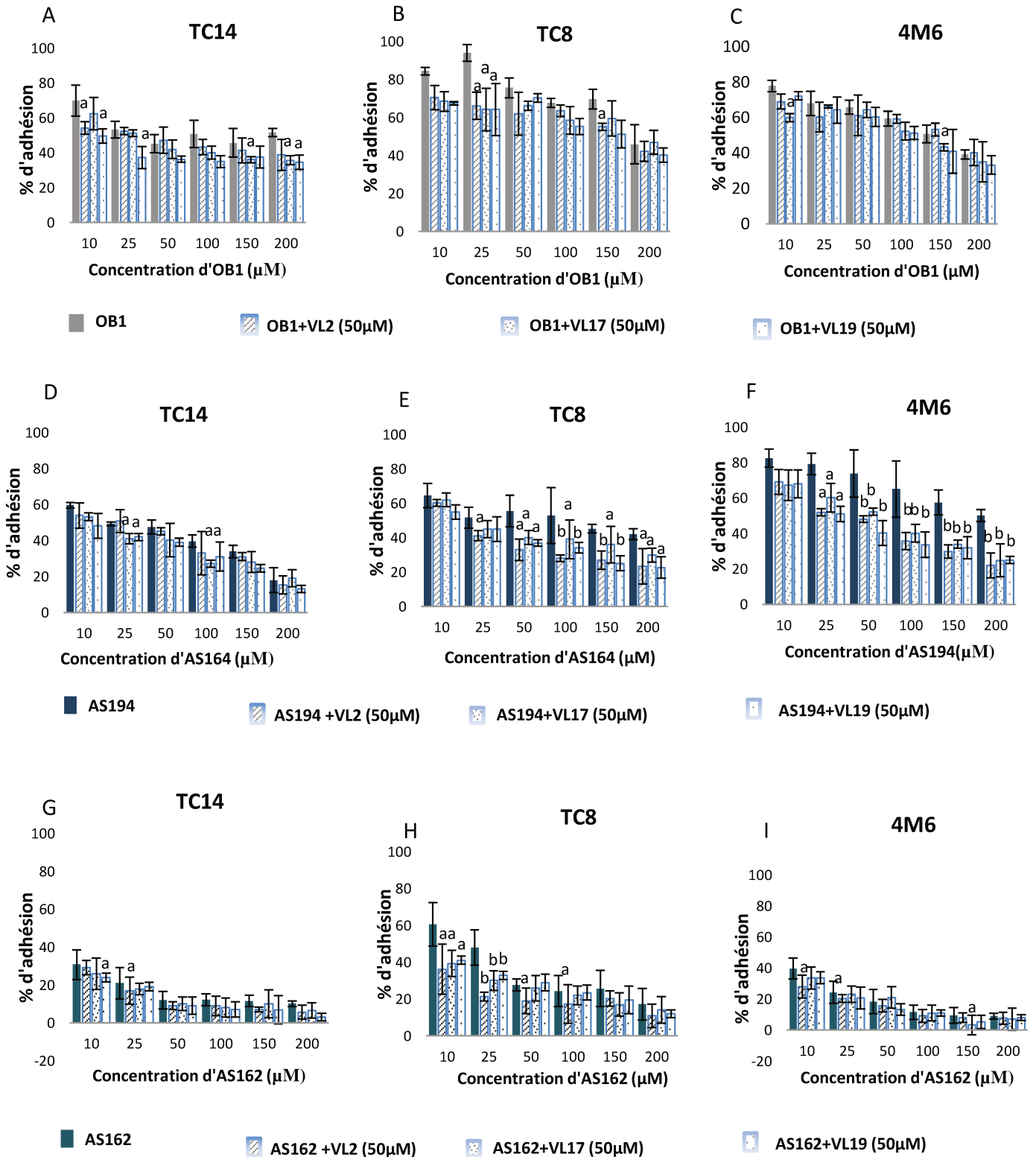


Figure 54 : Effet de la combinaison des analogues et des coumarines sur l'adhésion chez TC14, TC8 et 4M6. Les essais ont été réalisés trois fois en réplicats en microplaques noires 96 puits. Les essais marqués de lettres sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie sans coumarines).

3-4 Détermination de la CE₅₀ de l'effet d'anti-adhésion des combinaisons des trois analogues avec les coumarines et les taux de réduction des CE₅₀

Parallèlement à la faible augmentation de l'effet antadhésion des analogues par les coumarines, il a pu être observé de faible diminution des CE₅₀ des combinaisons par rapport à ceux des analogues seuls. Cependant, il n'a pas été observé de cas d'augmentation de CE₅₀ dans le cas de la combinaison avec les coumarines. Toutefois, il est à noter un ordre décroissant de diminution de CE₅₀ en partant d'OB1 (effet faible), AS194 (effet moyen) à AS162 (effet fort) chez *P. ulvae* TC14. Cet ordre n'est pas respecté chez les autres souches (TC8 et 4M6). Ainsi, la CE₅₀ d'OB1 seul connaît une réduction en combinaison qui tend de 31,7% à 65,3%. Quant à AS194 et AS162 les réductions tendent respectivement de 16,9% à 43,6% et de 11,6% à 30,2. De ces trois coumarines ici testées, VL2 semble produire un effet synergique plus important sur les trois composés naturels chez les différentes souches, sauf la combinaison OB1+VL2 (9% de réduction) dont l'effet reste moins marqué que celui d'OB1+VL17 (26,2% de réduction) et OB1+VL19 (30,4% de réduction). Ces résultats sont énumérés dans le **tableau 26** ci-dessous.

Tableau 26 : Détermination des CE₅₀ des combinaisons sur l'adhésion des souches et leur taux de réduction.

Souches	Composés naturels + combinaisons avec les perméabilisants	CE ₅₀ (μM) sur l'adhésion des souches	Taux de Réduction de CE ₅₀ (%)
TC14	OB1	75,4±5,4	
	OB1+VL2 (50μM)	26,2±1,9 ^c	65,3
	OB1+VL17 (50μM)	44,2±3,3 ^a	41,4
	OB1+VL19 (50μM)	51,5±9,6 ^a	31,7
	AS194	38,27±4,7	
	AS194+VL2 (50μM)	21,6±3,0 ^a	43,6
	AS194+VL17 (50μM)	23,7±3,1 ^a	38,1
	AS194+VL19 (50μM)	31,8±3,5	16,9
	AS162	4,3±1,1	
	AS162+VL2 (50μM)	3,0±1,5	30,2
	AS162+VL17 (50μM)	3,7±0,9	14,0
	AS162+VL19 (50μM)	3,8±1,0	11,6
TC8	OB1	216,9±6,8	
	OB1+VL2 (50μM)	109,5±2,9 ^b	49,5
	OB1+VL17 (50μM)	131,2±4,1 ^a	39,5
	OB1+VL19 (50μM)	122±6,5 ^a	43,8
	AS194	75,5±4,1	
	AS194+VL2 (50μM)	26,5±2,5 ^c	64,9
	AS194+VL17 (50μM)	36,8±2,5 ^b	51,3
	AS194+VL19 (50μM)	24,3±2,5 ^c	67,8
	AS162	23,2±2,4	
	AS162+VL2 (50μM)	7,8±1,9 ^c	66,4
	AS162+VL17 (50μM)	10,9±1,4 ^b	53,0
	AS162+VL19 (50μM)	12,7±3,9 ^a	45,2
4M6	OB1	114,7±3,8	
	OB1+VL2 (50μM)	104,4±1,9	9,0
	OB1+VL17 (50μM)	84,6±1,9 ^a	26,2
	OB1+VL19 (50μM)	79,8±2,9 ^a	30,4
	AS194	174,5±7,6	
	AS194+VL2 (50μM)	41,3±2,5 ^c	76,3
	AS194+VL17 (50μM)	52,2±3,9 ^c	70,1
	AS194+VL19 (50μM)	37,2±1,2 ^c	78,7
	AS162	8,0±0,9	
	AS162+VL2 (50μM)	5,2±0,8 ^a	35,0
	AS162+VL17 (50μM)	6,7±0,9	16,25
	AS162+VL19 (50μM)	6,0±2,1	25,0

3-5 Effet des combinaisons avec les coumarines sur la formation de biofilm chez les trois souches

Les résultats présentés sur la **figure 55** ci-dessous ont montré un effet synergique très marqué des combinaisons sur la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14 (**figure 55ADG**) et *P. lipolytica* TC8 (**figure 55BEH**). Chez *Paracoccus sp.* 4M6 (**figure 55CFI**) l'effet synergique des combinaisons est resté moins marqué sur la formation de biofilm même s'il y a un effet significatif avec OB1 à concentrations élevées (**figure 55C**). Par contre, la combinaison AS162 et coumarines (**figure 55I**) a relevé un effet synergique marqué à faible concentration de AS162 (10 et 25 μM). A partir de 50 μM d'AS162, il n'y a pas eu d'effet synergique sur la formation de biofilm chez 4M6. Et mieux l'effet d'AS162 a tendance à rechuter en présence de coumarine. Ceci s'est d'ailleurs reproduit tant chez *P. lipolytica* TC8 (**figure 55H**) que chez *P. ulvae* TC14 (**figure 55G**). Pour ce qui concerne OB1 et AS194, l'effet synergique des combinaisons a été plus marqué chez *P. ulvae* TC14. En plus, avec OB1 il est à noter la présence d'un effet dose chez *P. ulvae* TC14 (**figure 55A**) et chez TC8 (**figure 55B**). Cet effet dose est également visible chez *P. ulvae* TC14 avec AS194 aux concentrations allant de 10 à 50 μM , surtout en présence de VL19 (**figure 55D**) mais au-delà de cette gamme de concentration l'effet dose n'est pas réellement ressenti.

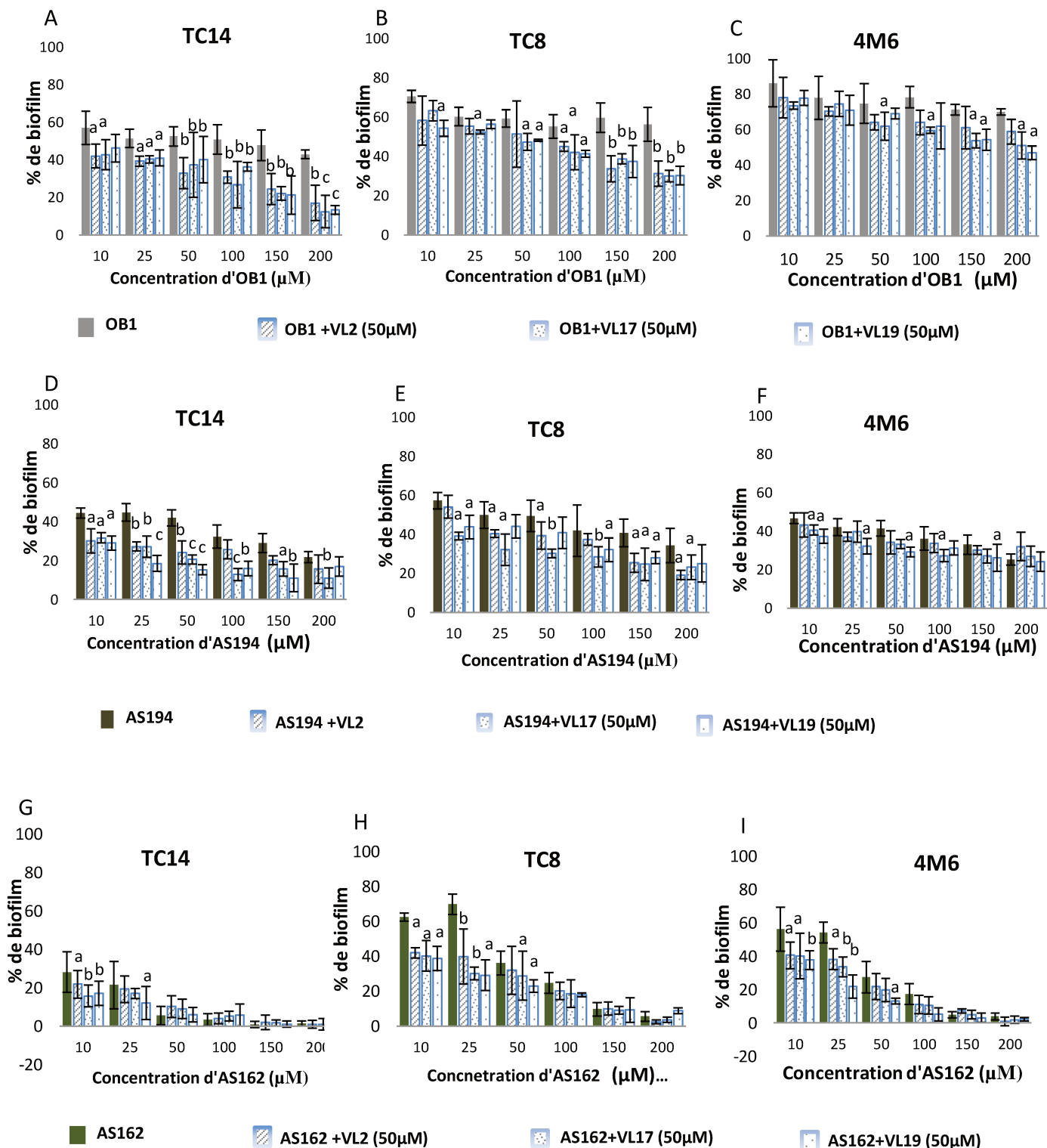


Figure 55 : Effet sur la formation de biofilm chez TC14, TC8 et 4M6. Les essais ont été réalisés trois fois en réplicats en microplaques transparentes 96 puits. Les essais marqués

de lettres sont significativement différents ($P < 0,05$) du témoin (cultures de bactérie avec analogue seul).

3-6 Calcul des CE_{50} les sur la formation de biofilm des souches

Au regard de la variation des CE_{50} , l'effet synergique des combinaisons a été très marqué tant avec OB1 qu'avec AS194 sur la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. Ainsi, ces deux composés ont révélé en combinaison une diminution significative de leur CE_{50} de départ chez *P. ulvae* TC14. Cette diminution de CE_{50} est marquée par des taux de réduction allant de 69,2% à 75,3% pour OB1 et de 65,4% à 77% pour AS194 (**tableau 27**). Les combinaisons avec AS162 ont révélé une réduction de CE_{50} relativement faible chez *P. ulvae* TC14. Pour ce qui concerne *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6, l'effet synergique s'est avéré très significatif à travers les CE_{50} d'OB1 qui ont connu une forte réduction chez les deux bactéries (au-delà de 54%). Cet effet synergique s'est ressenti sur AS162 chez *P. lipolytica* TC8 dont la réduction de CE_{50} s'est étendu à plus de 54% également en présence de chacune des coumarines. Chez *Paracoccus sp.* 4M6, les CE_{50} correspondant aux combinaisons comprenant AS194 ont révélé un synergisme moins marqué par rapport à celle contenant OB1 et AS162. Ces résultats sont résumés dans le **tableau 27** ci-dessous.

Tableau 27 : Détermination des CE₅₀ des combinaisons sur le biofilm des souches et leur taux de réduction.

Souches	Composés et combinaisons	CE ₅₀ (μM) sur la formation de biofilm	Taux de Réduction de CE ₅₀ (%)
TC14	OB1	69,85±5,9	
	OB1+VL2 (50μM)	21,5±3,1 ^c	69,2
	OB1+VL17 (50μM)	17,5±4,0 ^c	75,0
	OB1+VL19 (50μM)	17,3±3,5 ^c	75,3
	AS194	24,8±3,9	
	AS194+VL2 (50μM)	5,7±0,8 ^c	77,0
	AS194+VL17 (50μM)	7,5±1,9 ^c	69,8
	AS194+VL19 (50μM)	8,59±5,7 ^c	65,4
	AS162	4,4±1,3	
	AS162+VL2 (50μM)	2,4±1,1 ^b	45,5
	AS162+VL17 (50μM)	2,7±1,2 ^b	38,6
	AS162+VL19 (50μM)	3,6±0,8	18,2
TC8	OB1	127,9±3,6	
	OB1+VL2 (50μM)	47,1±2,9 ^c	63,2
	OB1+ VL17 (50μM)	48,5±2,7 ^c	62,1
	OB1+ VL19 (50μM)	50,9±3,1 ^c	60,2
	AS194	48,8±5,0	
	AS194+ VL2 (50μM)	24,0±2,9 ^b	50,6
	AS194+ VL17 (50μM)	13,8±2,5 ^c	71,7
	AS194+ VL19 (50μM)	25,4±2,4 ^b	48,0
	AS162	29,37±4,0	
	AS162+ VL2 (50μM)	9,4±2,1 ^c	68,0
	AS162+ VL17 (50μM)	10,4±1,0 ^c	64,6
	AS162+ VL19 (50μM)	13,4±1,5 ^c	54,4
4M6	OB1	328,0±9,5	
	OB1+ VL2 (50μM)	140,6±4,8 ^c	57,1
	OB1+ VL17 (50μM)	134,3±7,0 ^c	59,1
	OB1+ VL19 (50μM)	172,9±6,9 ^b	47,3
	AS194	26,91±4,6	
	AS194+ VL2 (50μM)	13,6±0,9 ^b	49,4
	AS194+ VL17 (50μM)	17,8±2,0 ^c	33,8
	AS194+ VL19 (50μM)	20,5±1,9 ^a	23,8
	AS162	18,8±2,1	
	AS162+ VL2 (50μM)	6,4±1,9 ^c	66,0
	AS162+ VL17 (10μM)	9,181±1,1998 ^b	51,01
	AS162+ VL19 (5μM)	10,34±1,77115 ^a	45,2

4- Conclusion

Ce chapitre a permis d'évaluer la potentialisation de l'effet antiadhésif et antibiofilm des analogues synthétiques par deux types d'adjuvants : les perméabilisants et les coumarines. Les résultats ont montré que la combinaison avec les adjuvants induisant une augmentation d'effet antifouling de ces analogues sans modifier leur niveau de toxicité. En effet, la perméabilisation membranaire constitue une méthode efficace de renforcement de l'effet de nombreux composés antimicrobiens tels les antibiotiques (Tsubery *et al.*, 2000). Une augmentation de la perméabilité membranaire chez *P. ulvae* TC14 et les autres souches renforce ainsi le taux d'analogues à l'intérieur des cellules bactériennes et donc augmente l'effet antiadhésif et/ou l'effet anti-biofilm chez les bactéries étudiées. Par ailleurs, l'un des mécanismes de défense reconnu chez les bactéries Gram négatif est l'extrusion de substances nocives telles que les métaux lourds, les toxines et autres agents antimicrobiens depuis le periplasme vers l'extérieur de la cellule (Muylaert et Mainil, 2012). Ainsi, l'inhibition de ces pompes d'efflux chez *P. ulvae* TC14, *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6 par les coumarines préalablement reconnus dans ce domaine, augmente l'effet antifouling des analogues.

Toutefois, selon différents paramètres liés tant à l'effet individuel des composés qu'aux éventuelles cibles visées par les adjuvants, il a été noté une large variation dans ce rapport de synergisme. Ainsi, les résultats ont montré que plus l'effet individuel des analogues est élevé, moins l'effet synergique de la combinaison est marqué. En effet, le taux moyen de réduction de la CE₅₀ d'anti-adhésion et d'antibiofilm en combinaison d'OB1 est plus élevé que celui d'AS194 et d'AS162. Lorsque l'analogue a un effet initial très élevé, son mélange avec un adjuvant n'induit pas d'effet synergique marqué car il y a une saturation. D'ailleurs quelques effets antagonistes ont été observés lors de la combinaison d'AS162 et AS194 chez *P. ulvae* TC14. Cet antagonisme pourrait être dû à une compétition entre les deux types de composés.

Par ailleurs, les combinaisons d'analogues et perméabilisants ont montré un effet anti-adhésion supérieur aux combinaisons avec les coumarines. En effet, l'action des perméabilisants consistant à inhiber la barrière de protection des bactéries, permet de rehausser la concentration intracellulaire de composés antifouling. En tenant compte de la propriété effet dose des composés il semble logique que l'effet antifouling soit plus marqué chez les bactéries comme l'indique les résultats. Pour ce qui concerne les coumarines, celles-ci n'empêchent que l'extrusion des composés déjà présents à l'intérieur de la cellule. La concentration intracellulaire de la molécule est dépendante du blocage de la pompe et non de la modification du flux entrant. Ainsi la perméabilisation de la membrane semble être plus intéressante pour ce qui concerne la potentialisation de l'effet des composés antifouling.

En conclusion, les perméabilisants et les coumarines testés dans cette étude se sont présentés comme des adjuvants intéressants pour le renforcement de l'effet antifouling des analogues synthétiques.

Conclusion générale et perspectives

1- Conclusion générale

La mise en place de stratégies antifouling respectueuses de l'environnement reste de nos jours un enjeu majeur dans le secteur marin. Pour cela, plusieurs méthodes de lutte antifouling ont été adoptées depuis quelques années. Celles-ci prennent principalement en compte deux types de paramètres notamment le support de développement bactérien et les paramètres intrinsèques liés aux microorganismes, leur permettant de s'organiser en biofilm. Ainsi, plusieurs stratégies liées à la modification du support bactérien consistent à la mise en place de revêtement antifouling offrant un environnement hostile au développement de biofilms. Pour ce qui concerne les paramètres intrinsèques liés aux microorganismes, l'une des méthodes les plus efficaces consiste à l'interférence avec le système de communication des bactéries appelé quorum sensing (QS).

Le QS repose sur des petites molécules diffusibles d'une bactérie à une autre. L'ensemble de ces molécules forment l'auto-induction. Chez les bactéries à Gram négatifs il s'agit dans la plupart des cas de N-acyl homosérine lactones (AHLs). Ces AHLs ont été mis en évidence au cours des travaux d'**Ayé et al., 2015** chez l'une des nombreuses souches marines isolées de la Rade de Toulon. Il s'agit de *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. La particularité de cette bactérie est sa capacité à former un biofilm et à produire un pigment pourpre appelé violacéine. Ainsi, la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14 a été décrite par **Ayé et al.**, comme un phénomène dépendant de l'incorporation d'AHLs exogènes par la bactérie et de la régulation de ceux-ci grâce à un récepteur spécifique LuxR. La vérification des hypothèses émises par ces auteurs sur l'absence de synthase LuxI et aussi l'absence du système AI-2 (LuxS/LuxP/LuxQ) a été l'un des objectifs spécifiques de cette étude. Ensuite, la mise en évidence de l'interférence du QS avec la formation de biofilm a permis d'expliquer le rôle de la régulation des AHLs par la bactérie dans l'adhésion et la formation de biofilm. Au-delà du lien entre le QS et la formation de biofilm, d'autres stratégies telles que la perméabilisation

membranaire et l'inhibition des pompes d'efflux ont été associées afin de faire de *P. ulvae* TC14 un outil de criblage des composés antifouling.

La première partie de cette étude a porté sur l'identification du système QS chez *P. ulvae* TC14. Ainsi le séquençage complet du génome a montré la présence de huit séquences *luxR*. Cependant, ces séquences ne possèdent pas les sites caractéristiques de liaison aux AHLs selon les analyses génomiques effectuées. Aussi, l'analyse par qRT-PCR a montré le niveau d'expression de séquences. Cependant aucune de ces séquences n'a pu être décrite comme étant un *luxR* candidat. L'absence de *luxI* constatée chez *P. ulvae* TC14 à l'issue de l'analyse génomique confirme l'hypothèse qui soutient que cette bactérie ne produirait pas d'AHLs mais utilise les AHLs exogènes afin de réguler le QS. Mieux, ces *luxR* ainsi identifiés chez *P. ulvae* TC14 ont été considérées dans cette étude comme étant des séquences solos. Ce type de récepteur a d'ailleurs été décrit dans plusieurs études, pour avoir des rôles divers dans la communication inter-espèces bactériennes et inter-domaines (**Subramoni et Venturi 2009**). En plus, l'absence des gènes spécifiques au système AI-2 notamment *luxS/luxPQ* renforce l'hypothèse soutenant que la régulation du QS repose principalement sur la réponse de *P. ulvae* TC14 aux AHLs exogènes. Par ailleurs, la régulation de la production de violacéine par les AHLs pourrait être confirmée par l'expression simultanée des gènes de violacéine et la plupart des séquences *luxR* autour de 10 heures. Aussi, d'autres gènes en dehors de *luxR*, participant à la formation du biofilm ont été identifiés chez *P. ulvae* TC14. Il s'agit entre autre des gènes *csgD*, *dgc*, *tda* et la double composante peptidique QSeBC. Etant donné que ces gènes sont reconnus dans la littérature comme facteurs directs ou indirects du développement de biofilm bactérien, ceux-ci pourraient constituer chez *P. ulvae* TC14 une voie alternative de communication aboutissant à la formation de biofilm. L'identification du système QS chez *P. ulvae* TC14 a donc permis d'avoir

une idée des différentes composantes de ce système et une visibilité plus claire sur son fonctionnement.

Dans la deuxième partie de cette étude, un rapport a été établi entre la modulation du système QS et la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. En effet, comme indiqué dans la partie précédente, *P. ulvae* TC14 est capable de reconnaître des AHLs exogènes afin de réguler le biofilm. Ainsi, deux AHLs commerciaux (3-oxo-C6 HSL et 3-oxo-C8 HSL) agissant inversement sur la production de violacéine chez *P. ulvae* TC14 ont été utilisés dans cette étude comme des modulateurs QS. La 3-oxo-C6 HSL a été reconnue comme étant un inhibiteur de QS et la 3-oxo-C8 HSL comme étant un activateur de QS. En plus des AHLs, deux autres composés ont été également testés sur la violacéine chez *P. ulvae* TC14. Il s'agit du Farnésol reconnu comme un activateur de QS et l'eugénol comme un inhibiteur du QS. Les activateurs du QS (farnésol et 3-oxo-C8 HSL) d'une part et les inhibiteurs de QS (Eugénol et 3-oxo-C6 HSL) d'autre part ont été testés en combinaison avec des composés antifouling. Les résultats ont montré un effet antagoniste des différentes combinaisons sur l'adhésion et la formation de biofilm. Ce qui laisse entrevoir la régénération de l'adhésion et du biofilm par l'inhibition ou l'activation du QS. Si la régénération de l'adhésion et du biofilm chez *P. ulvae* TC14 par l'activation du QS semble être logique, la répétition de cette régénération en présence d'inhibiteurs QS semble être plutôt étonnante. Cependant, ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que le système QS basé sur les AHLs ne soit pas le seul facteur de régulation de biofilm. D'autres systèmes basés sur les gènes décrits dans la première partie (*csgD*, *dgc*, *tda* ou *qseBC*) pourraient relayer la régulation de biofilm en cas d'inhibition du système AHLs chez *P. ulvae* TC14. Ces résultats se sont reproduits chez *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus* sp. 4M6 qui n'ont pas de système QS identifié, mais possèdent chacune une bonne capacité de formation de biofilm.

Afin de savoir si *P. ulvae* TC14 peut être utilisé comme un outil de criblage des composés antifouling d'autres stratégies de renforcement de l'effet antifouling des composés ont été tentées dans la dernière partie de cette étude. Ces stratégies ont visé d'autres cibles chez *P. ulvae* TC14. Ces cibles sont principalement des facteurs de protection et de résistance contre les composés nocifs pour la bactérie. Il s'agit notamment de la membrane bactérienne et des pompes d'efflux. En effet, la membrane des bactéries à Gram négatif est constituée d'une enveloppe externe et d'une partie interne. La partie interne est constituée de couches protéiques telles que des peptidoglycanes (PG), des lipopolysaccharides (LPS) et bien d'autres éléments. Sur cette membrane bactérienne sont fixés des complexes protéiques appelés pompes d'efflux. Ces pompes permettent à la bactérie d'exclure activement des substances nocives présentes en son sein. Des molécules reconnues pour avoir une activité inhibitrice sur la membrane bactérienne d'une part et sur les pompes d'efflux d'autre part ont été testées en combinaison avec les composés antifouling chez *P. ulvae* TC14. Les résultats ont montré un effet synergique entre les deux types de composés. Par contre, les trois perméabilisants membranaires testés offrent une meilleure activité. Ceci s'expliquerait par l'élévation du taux de composés antifouling à l'intérieur des cellules bactériennes. Ce qui permet de d'améliorer l'effet d'anti-adhésion et anti-biofilm des analogues synthétiques. Par ailleurs, l'inhibition des pompes d'efflux par les coumarines utilisées dans cette étude a semblé avoir moins d'effet synergique avec les analogues synthétiques. En effet, dans le cas de l'inhibition des pompes d'efflux le taux de composés naturels à l'intérieur de la cellule bactérienne devrait dépendre de la possibilité pour ces composés de traverser la membrane plasmique dès le départ. Ainsi, si ce taux s'avère faible du fait de l'imperméabilité de la membrane bactérienne, malgré l'inhibition des pompes d'efflux et l'empêchement de l'extrusion active des composés, l'effet restera moins élevé. Cependant, ces deux méthodes s'avèrent nécessaire au renforcement de l'effet antifouling de ces analogues synthétiques.

Au regard de ce qui précède, *P. ulvae* TC14 pourrait être utilisé comme un meilleur outil de criblage des composés antifouling car des données mises en place chez elle, ont été vérifiées chez d'autres espèces bactériennes notamment *P. lipolytica* TC8 et *Paracoccus sp.* 4M6. Néanmoins, d'autres recherches devraient être associées à cette étude afin de maîtriser davantage les paramètres liés à la régulation du QS et de la formation de biofilm chez cette bactérie. Ces recherches ont été énumérées sous forme de perspectives ci-dessous.

2- Perspectives

Dans le **chapitre III** de cette étude, il a été question de la recherche et l'identification des gènes impliqués dans la régulation du système QS. Les résultats ont montré que ce système est essentiellement assuré chez *P. ulvae* TC14 par des AHLs exogènes reconnus par des régulateurs LuxR. Par ailleurs, cette bactérie ne produirait pas de synthase LuxI d'où l'absence de production d'AHLs. Et l'absence de production d'AHLs chez *P. ulvae* TC14 avait été vérifiée par **Aye et al., 2015** par des techniques chromatographiques (HPLC). Ensuite, l'identification de séquences *luxR* dans cette étude a révélé la présence de 8 séquences présomptives qui ont été ensuite caractérisées par technique de q-PCR.

Cependant, la caractérisation des séquences *luxR* devrait être plus approfondie chez *P. ulvae* TC14. Ces séquences identifiées n'ayant pas de domaine de liaison aux AHLs devraient être analysées davantage afin de mieux définir leur rôle tant dans la régulation de violacéine que dans la formation de biofilm. En effet, des mutations pourraient être effectuées au niveau des séquences *luxR* afin d'évaluer la modulation de la production de violacéine et de la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. Ceci pourrait se faire à l'aide de vecteurs plasmidiques appropriés (**Trieu-Cuot P et al., 1991**). En outre, la caractérisation du QS devrait être plus poussée par une recherche approfondie de gènes QS chez *P. ulvae* TC14. Ainsi, plusieurs BLASTN et BLASTP pourraient être réalisés en plus de ceux effectués dans cette étude afin d'avoir une idée plus large du système QS de *P. ulvae* TC14.

Afin de confirmer l'absence du système AI-2 chez *P. ulvae* TC14, d'autres recherches pourraient intervenir. En effet l'AI-2 est produit en différentes étapes faisant intervenir en premier lieu la synthase LuxS et ensuite le Pfs. Ces enzymes spécifiques aux systèmes AI-2 n'ont pas de support génique retrouvés sur le génome de *P. ulvae* TC14 au cours de cette étude. Néanmoins, le rôle enzymatique de LuxS dans le cycle de méthyle activé (AMC) pourrait être vérifié chez *P. ulvae* TC14. En effet, le LuxS est capable de réduire *in vitro* la S-adénosylméthionine

(SAM) en S-adénosylhomocystéine (SAH) (**Pereira et al., 2013**). Cette action pourrait être vérifiée chez *P. ulvae* TC14.

Dans le **chapitre IV** de cette thèse, la modulation du QS par les inhibiteurs d'une part et les activateurs d'autre part a montré une restitution d'adhésion et de biofilm. Ce phénomène pourrait être expliqué par une interaction de la molécule (activatrice ou inhibitrice du QS) avec le régulateur LuxR présent chez *P. ulvae* TC14. Ainsi la mutation du gène *luxR* précédemment annoncée pourrait permettre de confirmer son rôle dans la restitution du biofilm. Par ailleurs, des criblages de composés anti-QS devraient se poursuivre chez *P. ulvae* TC14. Ceci aboutira à la découverte de composés anti-QS plus efficaces que la 3-oxo-C6 HSL et l'eugénol. Ces inhibiteurs QS pourraient être dirigés contre la régulation d' AHLs ou le système peptique régulé par le produit de *qseBC* retrouvé chez *P. ulvae* TC14. Enfin, une inhibition plus marquée du QS chez *P. ulvae* TC14 pourrait avoir un effet différent sur l'adhésion et la formation de biofilm de cette souche.

L'évaluation de l'effet des combinaisons entre les composés et les perméabilisants d'une part, puis les coumarines d'autre part, a donné un effet synergique sur l'adhésion et la formation de biofilm chez *P. ulvae* TC14. Cependant, ce renforcement d'effet pourrait être amélioré par d'autres méthodes. L'identification des pompes d'efflux chez *P. ulvae* TC14 par exemple amènera à mieux cribler des inhibiteurs plus efficaces afin de limiter l'extrusion des composés (**Kalia et al., 2012**). Cette identification pourrait se faire à l'aide des méthodes bio-informatiques permettant de détecter les gènes spécifiques des pompes RND, ABC et bien d'autres sur le génome de *P. ulvae* TC14. Par ailleurs, la pompe RND assure principalement l'extrusion des composés nocifs hors de la cellule bactérienne (**Tahmina et al., 2017**). Ainsi, la détection et la caractérisation du RND chez *P. ulvae* TC14 permettra de mieux cibler celui-ci par des inhibiteurs spécifiques afin d'interrompre son activité. En outre, plusieurs criblages de perméabilisants pourraient être réalisés chez *P. ulvae* TC14. Ainsi, les peptides

cationiques décrits par **Hancock en 1997**, l'acide clavulanique (**Totir et al.,2007**), le savirin (**Sully et al., 2014**) et bien d'autres composés pourraient être testés comme en tant que perméabilisants chez *P. ulvae* TC14.

Références bibliographiques

Abuzaid A., Hamouda A. et Amyes S. G. (2012) *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacDE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *J. Hosp. Infect* ; 81:87– 91.

Adam B., Baillie G. S. et Douglas L. J. (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 2002; **51**: 344-9.

Agnès R. et Jean-Marc G. (2006). Les biofilms bactériens. Communication présentée le 16 mars 2006. *Bull. Acad. Vét. France* — 2006 - Tome 159 - N°3

Alfaro J. F., Zhang T., Wynn D. P., Karschner E. L. et Zhou Z. S. (2004). Synthesis of LuxS inhibitors targeting bacterial cell-cell communication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004; 6: 3043-6.

Alhede M., Qvortrup K., Liebrechts R., Høiby N., Givskov M. et Bjarnsholt T. (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012; **65**: 335-42.

Allan-Wojtas P., Hildebrand P. D., Braun P. G., Smith-King H. L., Carbyn S. et Renderos W. E. (2010). Low temperature and anhydrous electron microscopy techniques to observe the infection process of the bacterial pathogen *Xanthomonas fragariae* on strawberry leaves. *J. Microsc.* 2010 ; **239**: 249-58.

Allermann K. et Schneider I. (2001) Enzymes for Antifouling Strategies

Allison C., Lai H. C., Gygi D. et Hughes C. (1993). Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemoattractant for swarming cells. *Mol. Microbiol.* 8, 53–60.

Allison D. G., (2003). The Biofilm matrix. *Biofouling.* 19, 139-150.

Alzieu C. L., Sanjuan J., Deltreil J. P. et Borel M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Mar. Poll. Bulletin* 17(11): 494-498.

Alzieu C., (1996). Biological effects of tributyltin on marine organisms. Dans "Tributyltin: case study of an environmental contaminant". de Mora S.J. Ed. *Cambridge University Press, Cambridge.* 167-211.

Amaya S., Pereira J. A., Borkosky S. A., Valdez J. C., Bardón A. et Arena M. E. (2012). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by sesquiterpene lactones. *Phytomedicine* **19** (13): 1173-1177.

Andjouh S. et Blache Y. (2015) Click-based synthesis of bromotyrosine alkaloid analogs as potential anti-biofilm leads for SAR studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25(24), 25-24.

Andjouh S. et Blache Y. (2019) Parallel synthesis of a bis-triazoles library as psammaphin A analogue: A new wave of antibiofilm compounds? *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25(24), 25-24. 29(4), 614-618

Ando M., Kamei R., Komagoe K., Inoue T., Yamada K. et Katsu T. (2012) In situ potentiometric method to evaluate bacterial outer membrane-permeabilizing ability of drugs: example using antiprotozoal diamidines. *J. Microbiol. Meth.* 91:497–500.

Antizar-Ladislao B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT) contaminated marine environment. A review *environment international*, 34(2), pp. 292-308.

Anwar H., Dasgupta M. K., Costerton J. W., (1990). Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother* **34**, 2043–2046.

Asuri P., Karajanagi S. S., Kane R. S. et Dordick J. S. (2007). Polymer–nanotube–enzyme composites as active antifouling films. *Small* 3 (1), 50–53.

Aye M., Bonnin-Jusserand M., Brian-Jaisson F., Ortalo-Magné A., Culioli G., Koffi N. R., Rabah N., Blache Y. et Molmeret M. (2015) Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology* 161(10):2039-51.

Baier R. E. (2006). Surface behaviour of biomaterials: The theta surface for biocompatibility. *J. Mater Sci: Mater Med* (2006) 17:1057–1062.

Balaban N., Stoodley P., Fux C. A., Wilson S., Costerton J. W. et Dell’Acqua G. (2005). Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin. Orthopaedics Related Res.* 2005; 437, 48-54.

Balamurugan S., Ista L. K., Yan J., López G. P, Fick J., Himmelhaus M. et Grunze M. (2005). *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127 (42), pp 14548–14549

Balibar C. J. et Walsh C. T. (2006). In Vitro Biosynthesis of Violacein from L-Tryptophan by the Enzymes VioA-E from *Chromobacterium Violaceum*. *Biochemistry* 2006, 45, 15444-15457.

Ball, A. S., Chaparian, R. R., and van Kessel, J. C. (2017). Quorum sensing gene regulation by LuxR/HapR master regulators in vibrios. *J. Bacteriol.* 199 e00105–e00117.

Ballard T. E., Richards J. J., Wolfe A. L. et Melander C. (2008). Synthesis and antibiofilm activity of a second-generation reverse-amide oroidin library: a structure-activity relationship study. *European Journal Chemistry – A.* 2008, **14**, 10745-10761.

Ballard T. E.; Richards J. J.; Aquino A.; Reed C. S. et Melander C. (2009). Antibiofilm activity of a diverse oroidin library generated through reductive acylation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, **74**, 1755-1758.

Bandeira B. (2013) Ecologie des communautés zooplanctoniques au sein de deux écosystèmes littoraux méditerranéens : traitement des séries temporelles. Thèse à l'université du sud Toulon-var Mer et Sciences ED 548 Laboratoire (PROTEE)-Equipe Ecologie et Biologie des Milieux Aquatiques (EBMA).

Barbosa I., Garcia S., Barbier C.V., Caruelle J. P., Martelly I. et Papy G. D. (2003). Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology* 2003; **13**: 647-53.

Barton A. C., Collyer S. D., Davis F., Gornall D. D., Law K. A., Lawrence E.C.D., Mills D.W., Myler S., Pritchard J. A., Thompson M. et Higson S. P. J. (2004). Sonochemically fabricated microelectrode arrays for biosensors offering widespread applicability: part I. *Biosens. Bioelectron.* 20, 328–337.

Bbosa G. S., Mwebaza N., Odda J., Kyegombe D. B. et Ntale M. (2014). Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health* 6, 410–425.

Beech I. B., Smith J. R., Steele A. A., Penegar I et Campbell S. A. (2002). The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloid. Surface B.* 2002; **23**: 231-47.

Bellon-Fontaine, M. N, Rault, J., van Oss, C. J., (2008). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 7, 47-53.

Beloin C., Valle J., Latour L. P., Faure P., Kzreminski M., Balestrino D., Haagensen J. A. J., Molin S., Prensier G, Arbeille B. et Jean-Marc G. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene *Mol. Microbiol.* 2004 Feb;51(3):659-74.

Bernbom N., Ng Y. Y., Kjelleberg S., Harder T. et Gram L. (2011). Marine bacteria from Danish Coastal waters show antifouling activity against the marine fouling bacterium *Pseudoalteromonas sp.* strain S91 and zoospores of the green alga *Ulva australis* independent of bacteriocidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(24): 8557-8567.

Bhat U. R., Carlson R. W., Busch M. et Mayer H. (1991). Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxy-octacosanoic acid in lipopolysaccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:213–217.

Biot F. V., Lopez M. M., Poyot T., Neulat-Ripoll F., Lignon S., Caclard A., Thibault F. M., Peinnequin A., Pages J. M. et Valade E. (2013) Interplay between three RND efflux pumps in doxycycline-selected strains of *Burkholderia thailandensis*. *PLoS ONE*;8:e84068.

Biot F.V., Valade E., Garnotel E., Chevalier J., Villard C., Thibault F. M., Vidal D.R. et Pages J. M. (2011) Involvement of the efflux pumps in chloramphenicol selected strains of *Burkholderia thailandensis*: proteomic and mechanistic evidence. *PLoS ONE*;6:e16892.

Bjarnsholt T., Jensen P. O., Burmolle M., Hentzer M., Haagensen J. A., Hougen H. P., Calum H., Madsen K. G., Moser C., Molin S., Hoiby N. et Givskov M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent. *Microbiology* 151, 373–383.

Blihoghe D., Manzo E., Villela A., Cutignano A., Picariello G., Faimali M. et Fontana A. (2011). Evaluation of the antifouling properties of 3-alkylpyridine compounds, *Biofouling*, 27, pp. 99–109.

Blanco P., Rosell R., Medina S., Moysi S., Dorado C., Custodio M., García Y., Suárez P., Calbet J., Badillo G. (2016). Effects of velocity loss during resistance training on athletic performance, strength gains and muscle adaptations, *Scand J. Med. Sci Sports*, 27(7):724-735.

Blöcher R., Ramírez A. R., Escarpulli G. C., Quesada E. C. et Arellano A. R. (2018) Design, Synthesis, and Evaluation of Alkyl-Quinoxalin-2(1H)-One Derivatives as Anti-Quorum Sensing Molecules, Inhibiting Biofilm Formation in *Aeromonas caviae* Sch3. *Molecules* 2018, 23(12), 3075.

Blosser R. S. et Gray K. M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for *N*-acyl homoserine lactone autoinducers. *J. Microbiol. Meth.* **40**(1): 47-55.

Bolla J. M, Alibert-Franco S, Handzlik J., Chevalier J., Mahamoud A, Boyer G, Kieć-Kononowicz K. et Pagès J. M. (2011). Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett.* 2011 Jun 6;585(11):1682-90.

Bolshakova A. V., Kiselyova O. I., Filonov A., Frolova O. Y., Lyubchenko Y. L. et Yaminsky I. V. (2001) Comparative studies of bacteria with an atomic forces microscopy operatin in different modes. *Ultramicroscopy* 2001; **86**: 121-8.

Bonaventura G. D., Piccolomini R., Paludi D., D’Orio V., Vergara A., Conter M. et Ianieri A. (1999). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Appl. Environ. Microbiol.* ISSN 1364-5072.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (1), 1–14.

Borchardt S. A., Allain E. J., Michels J. J., Stearns G.W., Kelly R. F. et McCoy W. F. (2001). Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3174–3179.

Borges-Walmsley M. I, McKeegan K. S. et Walmsley A. R. (2003) Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* 2003 ;376 :313–38.

Bosgiraud, C. (2003). Microbiologie générale et santé. *In : Bosgiraud, C. (Eds.)*. France, Paris, Edition ESKA. 540p.

Boss R., Baumgartner A., Kroos S., Blattner M., Fretz R., Moor D., (2018). Detection of viable *Legionella pneumophila* in tapwater by a qPCR and RT-PCR-based method. *Appl. Environ. Microbiol.* ISSN 1364-5072.

Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. (1999). LIVE/DEAD BacLight: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Meth.* 1999 ; 37 : 77-86.

Boutaleb, N., (2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de Doctorat, Chimie, Université de Bretagne-Sud, 174 p.

Bouza E., Alvarado N. et Alcalá L (2005). A prospective, randomized, and comparative study of 3 different methods for the diagnosis of intravascular catheter colonization. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40:1096-100.

Boxall A. B. A., Comber S. D., Conrad A. U., Howcroft J. et Zaman N. (2000). Inputs monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK estuaries. *Mar. Poll. Bulletin.* 40, 898-905.

Bozal N., Tudela E., RossellÓ-Mora R., Lalucat J. et Guinea J. (1997). *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov. Isolated from an antarctic coastal environment. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(2): 345-351.

Brackman G., Celen S. et Hillaert U. (2011b). Structure-activity relationship of cinnamaldehyde analogs as inhibitors of AI-2 based quorum sensing and their effect on virulence of *Vibrio spp.* *PloS One* 2011; 6: e16084.

Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H. J. et Coenye T. (2011a). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2011; 55(6): 2655-61.

Brian-Jaisson F., Ortalo-Magné A., Guentas-Dombrowsky L., Armougom F., Blache Y. et Molmeret M. (2014). Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microbiol. Ecology*, 1-17.

Briers Y., Walmagh M. et Lavigne R. (2011) Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 110:778–785.

Brombacher E., Dorel C., Zehnder A. J. B et Landini P. (2003) The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* (2003), 149, 2847–2857.

Buzder-Lantos P., Bockstael K., Anné J. et Herdewijn P. (2009). Substrate based peptide aldehyde inhibits bacterial type I signal peptidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009; 19: 2880-3.

Byers J. T., Lucas C., Salmond G. P. et Welch M. (2002). Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum sensing signaling molecule. *J. Bacteriol.* 184, 1163–1171.

Camps M., Briand J.-F., Guentas-Dombrowsky L., Culioli G., Bazire A. et Blache Y. (2011). Antifouling activity of commercial biocides vs natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Mar. Poll. Bulletin* 62(5): 1032-1040.

Cao Y. Y., Cao Y. B., Xu Z., Ying K., Li Y., Xie Y., Zhu Z. Y., Chen W. S., Jiang Y. Y. (2005) cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. *Antimicrob. Agents Chemother* 49(2) : 584–89.

Carlier A., Uroz S., Smadja B., Fray R., Latour X., Dessaux Y. et Faure D. (2003). The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an *attM*-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-acyl homoserine lactonase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4989–4993.

Carola H., Suhelen E., Ashley F., Sophie M. C. et Stajcan K. (2002) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas sp.* *FEMS Microbiol. Ecology* **41** (2002) 47-58.

Carson R. T., Damon M., Johnson L. T. et Gonzalez J. A. (2009). Conceptual issues in designing a policy to phase out metal-based antifouling paints on recreational boats in San Diego bay. *J. environmental management* 90, 2460-2468.

Champ M. A. (2001). The status of the treaty ban TBT in marine antifouling marine antifouling paints and alternatives. Published in the Proceedings of the 24th UJNR (US/Japan) Marine Facilities Panel Meeting in Hawaii.

Champ M. A. (2003) Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Mar. Poll. Bulletin* 46: 935-940.

Chapman M. R., Robinson L. S., Pinkner J. S., Roth R., Heuser J., Hammar M., Normark S. et Hultgren S. J. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851–855.

Characklis W. G. (1981) Bioengineering report: Fouling biofilm development: A process analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 1923-1960.

Characklis, W.G., Mcfeters, G.A., Marshall., K.C. (1989). Physiological ecology in biofilm systems. In: United States, New York, *John Wiley & Sons*, p. 265-340.

Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M. et Bernardi T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **68**(3): 605-612.

Chernin L. S., Winson M. K., Thompson J. M., Haran S., Bycroft B. W., Chet I., Williams P. et Stewart G. S. (1998). Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum* : Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. *Journal of Bacteriology*, 1998, p. 4435–4441.

Choi, S. H., et Greenberg, E. P. (1992). Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J. Bacteriol.* 174, 4064–4069.

Christensen G. D., Simpson W. A. et Younger J. J. (1985). Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 1985 ; **2** : 996- 1006.

- Cirioni O., Mocchegiani F. et Cacciatore I.** (2013). Quorum sensing inhibitor FS3-coated vascular graft enhances daptomycin efficacy in a rat model of staphylococcal infection. *Peptides* 2013; 40: 77- 81.
- Claverys J. P., Prudhomme M. et Martin B.** (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in Gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 2006, 60, 451–475.
- Clutterbuck A.L., Woods E. J., Knottenbelt D. C., Clegg P. D., Cochrane C. A. et Percival S. L.** (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121 (2007) 1–17.
- Coester S. E. et Cloete T. E.** (2005). Biofouling and biocorrosion in industrial water system. *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 213e232.
- Cohen S. P., McMurry L. M. et Levy S. B.** (1988). A locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:5416-5422.
- Costerton J. W.** (1999). The role of bacterial exopolysaccharides in nature and disease. *Journal of industrial microbiology et biotechnology* (1999) 22, 5551-563/ society for industrial microbiology 13675435/99/12.
- Costerton J. W., Cheng K. J., Geesey G. G., Ladd T. I., Nickel J. C., Dasgupta M. et Marrie T. J.** (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464.
- Costerton J. W., Stewart P. S. et Greenberg E. P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Costerton J. W., Veeh R, Shirliff M, Pasmore M, Post C. et Ehrlich G** (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Inves.* 2003, 112:1466-1477.

Costerton, J. W., Geesey, G. G. et Cheng, G. K. (1978). How bacteria stick, *Scientific American*. 238, 86-95.

Courvalin, P. (2008). Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. *J. Intern. Med.* 264, 4–16.

CRWQCB (California Regional Water Quality Control Board), (2005). Technical report: Total Maximum daily load for dissolved copper in shelter Island Yacht basin, San Diego bay. www.waterboards.ca.gov.

Dafforn K. A., Lewis J. A. et Johnston E. L. (2011). Antifouling strategies: history and regulation, ecological impacts and mitigation. *Mar. Poll. Bulletin* 62(3) 453-465.

Davey M. E., Caiazza N. C., O’Toole G. A. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 185(3):1027–1036.

Davey M. E., O’Toole G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64, 847–867.

Davies D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122.

Davies D. G., Chakrabarty A. M. et Geesy G. G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 :1181-1186.

Davies D. G., Parsek M. R., Pearson J. P., Iglewski B.H., Costerton J. W. et Greenberg E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.

De La Fuente-Nunez C., Korolik V., Bains M., Nguyen U., Breidenstein E. B. M., Horsman S., Lewenza S., Burrows L. et Hancock R. E. W. (2012) Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob. Agents Chemother*; 56:2696–2704.

De La Fuente-Nunez C., Reffuveille F., Fernandez L. et Hancock R. E. W. (2013) Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr. Opinion Microbiol.* 16:580–589.

De La Fuente-Nunez C., Reffuveille F., Haney E. F., Strauss S. K. et Hancock R. E. W. (2014) Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* 10: e1004152.

Decho, A. W.; Frey, R. L.; Ferry, J. L. (2011). Chemical Challenges to Bacterial AHL Signaling in the Environment. *Chemical Reviews* 2011, 111 (1), 86–99.

Defoirdt T., Boon N., Bossier P. et Verstraete W. (2004). Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* 240, 69–88.

Demoss R. D. et Evans N. R. (1959). Physiological aspects of violacein biosynthesis in nonproliferating cells. *J. Bacteriol.* **78**: 583-588.

DeMoss R. D. et Evans N. R. (1960). Incorporation of c14-labeled substrates into violacein. *J. Bacteriol.* 1960, 79, 729 – 733.

Dessaux Y., Elmerich C. et Faure D. (2004). La violacéine : une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chromobacterium violaceum*. *La Revue de Médecine Interne* **25**(9) : 659-662.

Dižová S., Černáková L. et Bujdáková H. (2018). The impact of farnesol in combination with fluconazole on *Candida albicans* biofilm: regulation of ERG20, ERG9, and ERG11 genes *Folia Microbiologica* May 2018, (63), 3, pp 363–371.

Dobretsov S. et Qian P.Y. (2004). The role of epibiotic bacteria from the surface of soft coral *Dendronephthya sp.* in the inhibition of larval settlement, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 299 (35), p. 50.

Dobretsov S., Teplitski M. et Paul V. (2009). Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. vol 25, 2009 P 413-427.

Dolmetsch R. E., Xu K. et Lewis R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* vol. **392**, p933–936 (30 April 1998).

Dong Y. H. et Zhang L. H. (2005). Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol.* 43, 101–109.

Dong Y. H., Gusti A. R., Zhang Q., Xu J. L. et Zhang L. H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1754–1759.

Donlan R. M. et Costerton J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15, 167–169.

Drenkard, E., (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5, 1213–1219.

Dufrene Y. F. (2001). Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 2001; **32**: 153-65.

Dunne, W. M. (2002) Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), 155–166.

Dunny G. M. et Leonard B. A. (1997). Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* **1997**, *51*, 527–564.

Egan S., Holmström C. et Kjelleberg S. (2001). *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**(4): 1499-1504.

Egan S., Thomas T., Holmström C. et Kjelleberg S. (2000). Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine algae *Ulva lactuca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2**, 343–347.

Ekblad T., Bergström G., Ederth T., Conlan S. L., Mutton R., Clare Anthony S., Wang S., Liu Y., Zhao Q., D’Souza F., Donnelly G. T., Willemsen P. R. et Pettitt M. E., (2008). Poly (ethylene glycol)-Containing Hydrogel Surfaces for Antifouling Applications in Marine and Freshwater Environments. *Biomacromolecules*, 2008, *9* (10), pp 2775–2783.

Ekblad T., Bergström G., Ederth T., Conlan S. L., Mutton R., Clare Anthony S., Wang S., Liu Y., Zhao Q., D’Souza F., . Donnelly G. T., Willemsen P. R., Pettitt M. E., Callow M. E., Callow J. A. et Liedberg B. Engebrecht, J., et Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 4154–4158.

Erwin P.M., Olson J.B., Thacker R.W., (2011). Phylogenetic diversity, host-specificity and community profiling of sponge-associated bacteria in the Northern Gulf of Mexico, *PLOS ONE*, **6**, p. e26806.

Evans, L. V., Clarkson, N. (1993). Antifouling Strategies in the Marine Environment. *J. Appl. Bacteriol.* **1993**, *74* (S22), 119S–124S.

- Favre-Bonté S., Köhler T. et Van Delden C.** (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother* 2003; 52(4): 598-604.
- Felsenstein J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Feng, L., Rutherford, S. T., Papenfort, K., Bagert, J. D., van Kessel, J. C. et Tirrell, D. A.** (2015). A qrr noncoding RNA deploys four different regulatory mechanisms to optimize quorum-sensing dynamics. *Cell*. 160, 228–240.
- Flemming, H.-C. et Wingender, J.** (2010). The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology* 2010 Sep;8(9):623-33.
- Fluman N.** (2012). Dissection of Mechanistic Principles of a Secondary Multidrug Efflux Protein *Mol. Cell* 47, 777–787.
- Foster P. I.** (1977). Copper exclusion as mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature* 269, 322-323.
- Fournier B. et Hooper D. C.** (2000) A new two-component system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2000, 182:3955-3964.
- Fuqua C. et Greenberg E. P.** (2002). Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002, 3, 685–695.
- Fusetani N.** (2004). Biofouling and antifouling. *Nat Prod Rep* (2004) 21, 94. PMID: 15039837.
- Fusetani N.** (2011). Antifouling marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 2011 Feb;28(2):400-10.
- Fux C. A., Costerton J. W., Stewart P. S. et Stoodley P.** (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 34-40.

Gao M, Song H, Zheng H, Ren Y, Li S et Liu X. (2016) Culture of low density *E. coli* cells in alginate-chitosan microcapsules facilitates stress resistance by up-regulating *luxS/AI-2* system. *Carbohydr. Polym.* 2016; 141:160-5.

Gauthier G., Gauthier M. et Christen R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 755–761.

Geske G. D., Wezeman R. J., Siegel A. P. et Blackwell H. E. (2005) Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Journal of the American Chemical Society* 127: 12762-12763.

Gibbons R. U. et Van Houte J. (1975). Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 29, pp 19-44.

Gill E. E., Franco O. L. et Hancock R. E. (2015) Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem. Biol. Drug. Des.* 2015 Jan; 85(1):56-78.

Glinel K., Jonas A. M., Jouenne T., Leprince J., Galas L. et Huck W. T. S. (2008) Antibacterial and Antifouling Polymer Brushes Incorporating Antimicrobial Peptide. *Bioconjugate Chem.* 2009, 20, 71–77.

Goller C. C. et Romeo T. (2008). Environmental Influences on Biofilm Development. *Bacterial Biofilms* pp 37-66]. Part of the Current Topics in *Microbiology and Immunology* book series (CT MICROBIOLOGY, volume 322)

Götz F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 2002 ; **43**: 1367-78.

Goupil D. W., DePalma V. A. et Baier R. E. (1973). Presented at the Marine Industries: Problems & Opportunities, Washington, D.C., 1973 (unpublished).

Grasland B., Mitalane J., Briandet R., Quemener E., Meylheuc T., Linossier I., Vallee-Rehel K. et Haras D. (2003). Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling* **19**(5) : 307-313.

Guilbaud M., De Coppet P., Bourion F., Rachman C., Prévost H. et Dousset X. (2005). Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by realtime PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; **71**: 2190-4.

H C (Health Canada), (1994). Regulatory directive dir94-03; registration of antifouling coatings, Health Canada Ottawa.

Hamade R. K.; Tuzuki-gun Y. N. et Kawasaki O. Y. (1998). Glucoside derivatives for enzyme modification, lipid-coated enzymes, method of producing such enzymes and antifouling paint composition. *United States Patent.* N° 5 770 188.

Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A. et Normark, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**, 661–670.

Han X. et Lu C. (2009). Biological activity and identification of a peptide inhibitor of LuxS from *Streptococcus* serotype 2. *FEMS Microbiol. Letters* 2009; **294**: 16-23.

Hancock R. E. W. (1985) The *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability barrier and how to overcome it. *Antibiot. Chemother*; **36**:95–102.

Hancock R. E. W. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet*; Vol **349**:418–422. February 8, 1997.

Hancock R. E. W. et Wong P. G. W. (1984) Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* ; 26:48–52.

Hanzelka B. L. et Greenberg E. P. (1996) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 5291-4.

Harrison R. G. (1914). The reaction of embryonic cells to solid structures. Osborn Zoological Laboratory, Yale University. *J. Exp. Zool.*, vol. 17, no. 4.

Harvey P. J., Candeias L., King P. J., Palmer J. M. et Wever R. (1995). Lignin peroxidase catalysis: reaction with veratryl alcohol and a polymeric dye, *Poly R. Biochem. SOC. Trans.* 23,340s.

Hattori T., Adachi K. et Shizuri Y. (1998). New ceramide from marine sponge *Haliclona koremella* and related compounds as antifouling substances against macroalgae, *J. Nat. Prod.*, **61** (1998), pp. 823–826.

Hentschel U., Fieseler L., Wehrli A., Gernert C., Steinert M., Hacker J. et Horn M. (2003) Microbial diversity of marinesponges, W.E.G. Müller (Ed.), *Sponges (Porifera)*, Springer, Berlin Heidelberg, *New York*, pp. 59–88.

Hentzer M., Riedel K., Rasmussen T. B., Heydorn A., Andersen J. B., Parsek M. R., Rice S. A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S. et Givskov M. (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology.* 2002 Jan;148(Pt 1):87-102.

Hentzer M., Wu H., Andersen J. B., Riedel K., Rasmussen T. B., Bagge N., Kumar N., Schembri M. A., Song Z., Kristoffersen P., Manfield M., Costerton J. W., Molin S., Eberl L., Steinberg P., Kjelleberg S., Hoiby N. et

Givskov M. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22, 3803–3815.

Hertiani T., Edrada-Ebel R., Ortlepp S., van Soest R. W. M., de Voogd N. J., Wray V., Hentschel U. et Proksch P. (2010). From anti-fouling to biofilm inhibition: new cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian Agelas sponges, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, pp. 1297–1311.

Hitchcock A. P., Obst M., Wang J., Lu Y. S. et Tylizszczak T. (2012). Advances in the detection of As in environmental samples using low energy X-ray fluorescence in a scanning transmission X-ray microscope: arsenic immobilization by an Fe(II)-Oxidizing freshwater bacteria. *Environ Sci Technol.* 2012 ; **46** : 2821-9.

Hoffmann N., Lee B. et Hentzer M. (2007). Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr (-/-) mice. *Antimicrob. Agents Chemother* 2007; 51(10): 3677-87.

Hoiby, N., Krogh, Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., Kharazmi, A., (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* 3, 23–35.

Honraet K., Goetghebeur E. et Nelis H. J. (2005). Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J. Microbiol. Meth.* 2005; **63**: 287-95.

Hornby J. M., Jensen E.C., Lisec A. D., Tasto J. J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K. W. (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 2982–92.

Huigens R. W.; Richards J. J.; Parise G.; Ballard T. E.; Zeng W., Deora R. et Melander C (2007). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with Bromoageliferin analogues. *Journal of the American Chemical Society* 2007, 129, 6966-6967.

Huijs F. et Klijnsstra J. (2006). Antifouling coating comprising a polymer with functional groups bonded to an enzyme. *European Patent EP* (1), 661,955.

Ince D., Zhang X., Silver L.C. et Hooper D.C. (2002) Dual targeting of DNA gyrase and topoisomerase IV: target interactions of garenoxacin (BMS-284756, T- 3811ME), a new desfluoroquinolone. *J. Antimicrob. Agents Chemother*; 46:3370–3380.

Jeon B. et Zhang Q. (2009) Sensitization of *Campylobacter jejuni* to fluoroquinolone and macrolide antibiotics by antisense inhibition of the Cme-ABC multidrug efflux transporter. *J. Antimicrob. Chemother* ;63 :946–948.

Jeon S. I., Lee J. H., Andrade J. D. et. De Gennes P. G (1991). Protein-Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 142, No. 1, March I, 1991.

Jeyasekaran G., Karunasagar I. et Karunasagar I. (2000). Effects of sanitizers on *Listeria* biofilm on contact surfaces. *Asian Fisheries Science*, 13, pp. 209-213.

Jin Y., Zhang T., Samaranayake Y. H., Fang H. H., Yip H. K., Samaranayake L. P. (2005). The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2005; **159**: 353-60.

Johansen C., Falholr P. et Gram L. (1997) Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3724–3728.

Johansen K. L., Chertow G. M., Alexander V. N., Mulligan K., Carey S., Schoenfeld P. Y. A. et. Kent-Braun J. A. (2000). Physical activity levels in

patients on hemodialysis and healthy sedentary controls. *Kidney International*, Vol. **57** (2000), 2564–2570.

Kalia N. P., Mahajan P., Mehra R., Nargotra A., Sharma J. P., Koul S. et Khan I. A. (2012) Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*; 67:2401–2408.

Kaplan H. B. et Greenberg E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163(3), 1210-1214.

Karcz J., Bernas T., Nowak A., Talik E. et Woznica A. (2012). Application of lyophilization to prepare the nitrifying bacterial biofilm for imaging with scanning electron microscopy. *Scanning.* 2012; **34**: 26- 36.

Katsikogianni, M. et Missirlis, Y. F. (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-materials interactions. *European Cells and Materials*: 2004, 8. 37-57.

Kavanaugh J. S., Thoendel M. et Horswill A. R. (2007). A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mole Microbiol.* 2007; 65: 780-98.

KEMI (2006). Chemical substances in antifouling paints. Swedish chemicals agency, syndbyberg, KEMI report 2/06. Sweden.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evolution* 16:111-120.

- Kiran M. D., Adikesavan N. V. et Cirioni O.** (2008) Discovery of a quorum sensing inhibitor of drug-resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mole Pharmacol.* 2008; **73**, 1578- 86.
- Kirov S. M.** (2007) Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 153(Pt 10):3264–3274.
- Kirov S. M., Webb J. S. et Kjelleberg S** (2005) Clinical significance of seeding dispersal in biofilms. *Microbiology* 151(Pt 11):3452– 3453 discussion 3453.
- Kojima S. et Nikaido H.** (2013). Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E2629–E2634.
- Kolenbrander P. E.** (2000). Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, **54**, 413–437.
- Kristensen J. B., Meyer R. L., Laursen B. Sg, Shipovskov S., Besenbacher F. et Poulsen C. H** (2008) Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement. *Biotechnology Advances* 26: 471-481.
- Kubaneck J., Whalen K. E., Engel S., Kelly S. R., Henkel T. P., Fenical W. et Pawlik J. R.** (2002). Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. *Oecologia.* 2002 Mar;131(1):125-136.
- Kumar A. et Schweizer H. P.** (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57:1486–1513.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K.** (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.

Kumari, A., Pasini, P., Deo, S. K., Flomenhoft, D., Shashidhar, H., and Daunert, S. (2006). Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal. Chem.* 78, 7603–7609.

Lamers R. P., Cavallari J. F. et Burrows L. L. (2013). The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *Journal.pone.0060666*. Epub 2013 Mar 27.

Langumier M., Sabot R., Sablé S., Jeannin M., Dheilley A., Lanneluc I. et Refait P. (2010). Corrosion marine des aciers : rôle des interactions rouille verte sulfatée/bactéries sulfato-réductrices. *Matériaux et Techniques*, 98 :1, pp 81-90.

Larsericsdotter, H., Oscarsson et S., Buijs, J. (2005). Structure, stability and orientation of BSA adsorbed to silica. *J. Colloid Interf. Sci.*: 2005, 289. 26-35.

Larzabal M., Mercado E.C., Vilte D.A., Salazar-Gonzalez H., Cataldi A. et Navarro-Garcia F. (2010) Designed coiled-coil peptides inhibit the type three secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE*;5: e9046.

Larzabal M., Zotta E., Ibarra C., Rabinovitz B. C., Vilte D. A., Mercado E.C. et Cataldi A. (2013) Effect of coiled-coil peptides on the function of the type III secretion system-dependent activity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and *Citrobacter rodentium*. *Int. J. Med. Microbiol.* 303:9–15.

Lee J. E., Singh V. et Evans G. B. (2005). Structural rationale for the affinity of pico- and femtomolar transition state analogues of *Escherichia coli* 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase. *J. Biological. Chem.* 2005; 280: 18274-82.

Lee J. H., Kim Y. S., Choi T. J., Lee W. J. et Kim Y. T. (2004). *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004), 54, 1699–1702.

Lee J., Maeda T., Hong S. H. et Wood T. K. (2009). Reconfiguring the Quorum-Sensing Regulator SdiA of *Escherichia coli* to Control Biofilm Formation via Indole and N-Acylhomoserine Lactones. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 75:1703–1716.

Lee S. J., Park S. Y., Lee J. J., Yum D. Y., Koo B. T. et Lee J. K. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3919–3924.

Lejars M., Margailan A. et Bressy C. (2012) Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings. *Chem. Rev.*, 2012, 112 (8), pp 4347–4390.

Leroy C., Delbarre L.C., Ghillebaert F., Compere C. et Combes D. (2008). **Lewis J. A.** (1998). Marine biofouling and its prevention on underwater surfaces. *Materials forum* 22, 41-61.

Li X. Z. et Nikaido H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64:159–204.

Li X., Yan Z. et Xu J. (2003). Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 149(2): 353-362.

Li Y.-H. et Tian X. (2012). Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* 12(3): 2519-2538.

Limna M. V. P., Raveendran T. V. et Parameswaran P. S. (2009) Antifouling activity exhibited by secondary metabolites of the marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick), *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63, pp. 67–72.

Linares D., Bottzeck O., Pereira O., Praud-Tabariès A. et Blache Y. (2011). Designing 2- aminoimidazole alkaloids analogs with anti-biofilm activities:

structure–activities relationships of polysubstituted triazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**(22): 6751-6755.

Linton K. J. (2007). Structure and Function of ABC Transporters. MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College Hammersmith Hospital Campus, *Physiology* 22:122-130, 2007.

Liu J., Fu K., Wu C., Qin K., Li F. et Zhou L. (2018). In-Group” Communication in Marine *Vibrio* : A Review of N-Acyl Homoserine Lactones-Driven Quorum Sensing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018 May 7; 8:139.

Liu N., Xu, Y., Hossain S., Huang N., Coursolle D., Gralnick J. A., et Boon E. M. (2012) Nitric oxide regulation of cyclic di-GMP synthesis and hydrolysis in *Shewanella woodyi*. *Biochemistry (Mosc)* 51: 2087-2099.

Longshaw A. I., Adanitsch F., Gutierrez J. A., Evans G. B., Tyler P. C. et Schramm V. L. (2010). Design and synthesis of potent “sulfur-free” transition state analogue inhibitors of 5-methylthioadenosine nucleosidase and 5-methylthioadenosine phosphorylase. *J. Med. Chem.* 2010; 53: 6730-46.

Lopez E. L., Contrini M. M., Glatstein E., Gonzalez A. S., Sontoro R., Allende D. et Ezcurra G. (2010) Safety and pharmacokinetics of urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody, against Shiga-like toxin 2 in healthy adults and in pediatric patients infected with shiga-like toxin producing *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 54:239–243.

Ma R, Qiu S, Jiang Q, Sun H, Xue T et Cai G. (2017) AI-2 quorumsensing negatively regulates rbf expression and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017;307(4-5):257-67.

Machado F. C., Cesar D. E., Assis A.V., Diniz C. G. et Ribeiro R. A. (2012). Detection and enumeration of periodontopathogenic bacteria in subgingival biofilm of pregnant women. *Braz Oral Res.* 2012; **26**: 443-9.

Macleán L. C. W., Tyliaszczak T. et Gilbert P. (2008). A high-resolution chemical and structural study of framboidal pyrite formed within a lowtemperature bacterial biofilm. *Geobiology* 2008; **6**: 471-80.

Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306–310.

Maki D. G., Weise C. E. et Sarafin H. W. (1977) A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N. Engl. J. Med.* 1977; **296**: 1305-9.

Manyak M. J., Gladkova N. D., Makari J. H., Schwartz A. M., Zagaynova E. V., Zolfaghari L., Zara J. M., Iksanov R. et Feldchtein F. I. (2005). Evaluation of superficial bladder transitional-cell carcinoma by optical coherence tomography. *Journal of Endourology* ; Vol. **19**, No. 5. Published Online:30 Jun 2005 <https://doi.org/10.1089/end.2005.19.570>.

Marion K., Pasmore M., Freney J., Delawari E., Renaud F., Costerton J. W. et Traeger J. (2005). *Blood Purificat.*, 23: 339.

Mariscal A., Lopez-Gigosos R. M., Carnero V. M., Fernandez-Crehuet J. (2009). Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; **82**: 773-83.

Max T., Anatol E., Matthew R. G., Mengsheng G., Jayne B. R., Wolfgang D. B. (2003). Chemical identification of N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. *Arch. Microbiol.* (2003) 180: 494–497.

McClellan K. H, Winson M. K, Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P (1997)

Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711.

McClellan K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart G. S. et Williams P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143, 3703–3711 (1997).

McLean R. J. C., Pierson III L. S. et Fuqua C. (2004). A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J. Microbiol. Meth.* 58(3): 351-360.

Miller M. B. et Bassler B. L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001, 55, 165–199.

Milton, D. L. (2006). Quorum sensing in *Vibrios*: complexity for diversification. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 61–71.

Minchin D. et Gollasch S. (2003). Fouling and Ships' Hulls: How Changing Circumstances and Spawning Events May Result in the Spread of Exotic Species. *Biofouling*. Volume 19, 2003. P111-122.

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

Morici L. A. (2007) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR represses the Rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner. *J. Bacteriol.* 189(21):7752–7764

Moss J. A., Nocker A., Lepo J. E. et Snyder R. A. (2006). Stability and change in estuarine biofilm bacterial community diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 : 5679–5688.

Muylaert A. et Mainil J. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité » *Ann. Médecine Vét.* 156, 109–123.

Nealson K. H., Platt T. et Hastings J. W. (1970). Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *Journal of bacteriology*, October 1970, p. 313-322.

Neves P. (2005). Interaction between quinolones antibiotics and bacterial outer membrane porin OmpF. *Biophys. Chem.* 113, 123–128.

Newby L. K., LaPointe N. M. A., Chen A. Y., Kramer J. M., Hammill B. G., DeLong E. R., Muhlbaier L. H. et Califf R. M. (2006). Long-Term Adherence to Evidence-Based Secondary Prevention Therapies in Coronary Artery Disease. *Circulation* Vol. 113, No. 2, pp 203–212.

Nicholas G. M., Eckman L. L., Ray S., Hughes R. O., Pfefferkorn J. A., Barluenga S., Nicolaou K. C. et Bewley C. A. (2002). Bromotyrosine-derived natural and synthetic products as inhibitors of mycothiol-S-conjugate amidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:2487–2490.

Nichols J. A. (1988). Antifouling paints: use on boats in San Diego bay and a way to minimize adverse impacts. *J. Environmental Management* 12(2): 243-247.

Nikaido H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656.

Nikaido, H. et Pagès, J.-M. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 340–363.

Novick R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* (2003) 48(6), 1429–1449.

Nowaczyk A., Carlotti F., Thibault-Botha D., et Pagano M. (2011). Distribution of epipelagic metazooplankton across the Mediterranean Sea during the summer BOUM cruise. *Biogeosciences*, 8, 2159–2177.

Nunez M. E., Martin M. O., Duong L. K., Ly E. et Spain E. M. (2003). Investigations into the life cycle of the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J at an interface by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 2003; **84**: 3379-88.

O'Connor, G., Knecht, L. D., Salgado, N., Strobel, S., Pasini, P., and Daunert, S. (2015). Whole-cell biosensors as tools for the detection of quorum-sensing molecules: uses in diagnostics and the investigation of the quorum-sensing mechanism. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 3, 181–200. doi: 10.1007/10_2015_337.

O'Toole, G.; Kaplan, H. B. et Kolter, R. (2000). Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54 (1), 49–79.

Olsen A., Jonsson A. et Normark S. (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* 338, 652–655.

Omae I., (2003) “Organotin Antifouling Paints and their alternatives”, *Applied organometallic chemistry*, 2003, 17, 81-105.

OMI (Organisation Maritime Internationale), (2001). Convention internationale sur le système antisalissure nuisible sur les navires. Adoption : 5 octobre 2001 ; entrée en vigueur : 17 septembre 2008.

Ortlepp S., Sjögren M., Dahlström M., Weber H., Ebel R., Edrada R., Thoms C. et Proksch, P. (2007). Antifouling activity of bromotyrosine-derived sponge metabolites and synthetic analogues, *Mar. Biotechnol.*, 9 (2007), pp. 776–785.

Ostuni E., Chapman R. G., Holmlin R. E., Takayama S. et Whitesides G. M. (2001). A Survey of Structure-Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein. *Langmuir* 2001, 17, 5605-5620.

Overhage J., Campisano A., Bains M., Torfs E.C.W., Rehm B.H.A., Hancock R.E.W. (2008) Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect. Immun.* 76 :4176–4182.

Pagès J.-M., James C. E. et Winterhalter M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 893–903.

Pantanella F., Berluti F., Passariello C. Sarli C., Morea C. et Schippa S (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J. Appl. Microbiol.* 102: 992-999.

Pantanella F., Berlutti F et. Passeri D. (2011). Quantitative evaluation of bacteria adherent and in biofilm on single-wall carbon nanotube-coated surfaces. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2011 ; 291513.

Pantanella F., Valenti P., Natalizi T. et Passeri D. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann. Ig.* 2013 ; 25 : 31-42.

Papaleo M.C., Fondi M., Maida I., Perrin E., LoGiudice A., Michaud L., Mangano S., Bartolucci G., Romoli R. et Fani R. (2012). Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against *Burkholderia cepacia* complex bacteria, *Biotechnol. Adv.*, 30 (2012), pp. 272–293.

Park S. Y., Lee S. J., Oh T. K., Oh J. W., Koo B. T., Yum D. Y. et Lee J. K. (2003). AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter sp.*, and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology* 149, 1541–1550.

Parsek M. R. et Fuqua C: (2003): Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 2004, 186:4427-4440.

Parsek M. R., Val D. L., Hanzelka B. L., Cronan J. E. J. et Greenberg E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 1999 ; 96 : 4360-5.

Pätzold R., Keuntje M. et Anders-von A. (2006). A new approach to non-destructive analysis of biofilms by confocal Raman microscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; **386**: 286-92.

Paul V. J., Littler M., Littler D. S. et Fenical W. (1987) Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (*Caulerpaceae: Chlorophyta*). Isolation of new bioactive sesquiterpenoids. *J. Chem. Ecol.* 13:1171–1185.

Paulasova P. et Pellestor F. (2004) The peptide nucleic acids (PNAs): a new generation of probes for genetic and cytogenetic analyses. *Ann. Genet.* **47**: 349–358.

Paulsen I. T., Brown M. H. et Skurray R. A. (1996). Proton-dependant multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 1996;60:575–608.

Pearson, J. P., Van Delden, C., and Iglewski, B. H. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181, 1203–1210.

Peeters E., Nelis H. J. et Coenye T. (2008). Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *J. Hosp. Infect.* 2008; **70**: 361-8.

Pereira C. S., Thompson J. A et Xavier K. B., (2013) AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 2013; 37:156–181.

- Pettitt M. E., Henry S. L., Callow M. E., Callow J. A. et Clare A.**(2004) Activity of commercial enzymes on settlement and adhesion of cypris larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, spores of the green algae *Ulva linza*, and the diatom. S. 2004. *Biofouling*, 20: 299.
- Piciooreanu, C.; Van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J.;** (2001) others. Two-Dimensional Model of Biofilm Detachment Caused by Internal Stress from Liquid Flow. *Biotechnology & Bioengineering*, 72 (2), 205–218.
- Pick N., Rawat M., Arad D., Lan J., Fan J. et Kende A. S.** (2006). In vitro properties of antimicrobial bromotyrosine alkaloids. Av-Gay, Y. *J. Med. Microbiol.* 2006, **55**, 407-415.
- Piddock L. J. V.** (2006). Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 382–402.
- Piola R. F., Dafforn K. A. et Johnston E. L.** (2009) The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* 25: 633-644.
- Poole K.** (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10:12–26.
- Preston B. L. et Shackelford J.** (2002). Multiple Stressor Effects on Benthic Biodiversity of Chesapeake Bay: Implications for Ecological Risk Assessment. *Ecotoxicology* April 2002, Volume 11, Issue 2, pp 85–99.
- Prigent-Combaret C., Prensier G., Le Thi T. T., Vidal O., Lejeune P. et Dorel C.** (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* 2, 450–464.

Punithavathy P. M., Nalina K. et Menon T. (2012). Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilms against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian. J. Pathol. Microbiol.* 2012; **55**: 72-4.

Putman M., Van -Veen H. W. et Konings W. N. (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64: 672–93.

Qiu Y., Deng Z. W., Xu M., Li Q. et Lin W. H. (2008). New A-nor steroids and their antifouling activity from the Chinese marine sponge *Acanthella cavernosa*, *Steroids*, 73, pp. 1500–1504.

Raetz C. R. H. (2007). Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 295–329.

Rascio V. J. (2000) Antifouling Coatings: Where Do We Go from Here. *Corrosion Reviews* 2000, 18 (2–3).

Rasmussen T. B. et Givskov M. (2006). Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* **152**, 895–904.

Rasmussen T. B., Bjarnsholt T., Skindersoe M. E., Hentzer M., Kristoffersen P., Kote M., Nielsen J., Eberl L. et Givskov M. (2005a). Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* **187**, 1799–1814.

Reed R. H. et Moffat I. (1983). Copper toxicity and copper tolerance in *Enteromorpha compressa* (L) Grev. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 69, 85-103.

Reffuveille F., de la Fuente-Nunez C., Mansour S. et Hancock R. E. W. (2014) A broad-spectrum anti-biofilm peptide enhances action against bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother*; **58**:5363–5371.

Ren D., Bedzyk L. A., Thomas S. M., Ye R. W. et Wood T. K. (2004). Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2004) **64**: 515–524.

Richards J. J., Reyes S.; Stowe S. D.; Tucker A. T.; Ballard T. E.; Mathies L. D.; Cavanagh J. et Melander C. (2009). Amide Isosteres of Oroidin: Assessment of Antibiofilm Activity and *C. elegans* Toxicity. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 4582-4585.

Ridgway H. F., Kelly A., Justice C. et Olson B. H. (1983). Microbial fouling of reverse-osmosis membranes used in advanced wastewater treatment technology: chemical, bacteriological, and ultrastructural analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; **45**: 1066-84.

Rothberg J. M, Hinz W, Rearick T. M, Schultz J, Mileski W. et Davey M (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 2011;475(7356):348–52.

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Salta M., Wharton J. A., Blache Y., Stokes K. R. et Briand J. F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces : structure and dynamics. *Environmental Microbiology* (2013) 15(11), 2879–2893.

Sanchez C., Brana A. F., Mendez C et Salas J. A. (2006). Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis, *Chem. Bio. Chem.* 7 (2006) 1231–1240.

Sandberg M. E., Schellmann D. et Brunhofer G. (2009). Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J. Microbiol. Meth.* 2009; **78**: 104-6.

Sandoval-Motta S. et Aldana M. (2016). Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *WIREs Syst. Biol. Med.* 8, 253–267.

- Satheesh S., Soniamby A.R., Sunjaiy-Shankar C.V. et Punitha S.M.** (2012). Antifouling activities of marine bacteria associated with sponge (*Sigmadocia sp.*), *Ocean J. Univ. China*, 11 (2012), pp. 354–360.
- Sauer K., Camper A. K., Ehrlich G. D., Costerton J. W. et Davies D. G.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 2002; **184**: 1140-54.
- Sauer, K.; Cullen, M. C.; Rickard, A. H.; Zeef, L. A. H.; Davies, D. G. et Gilbert, P.** (2004). Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J. Bacteriol.* 186 (21), 7312–7326.
- Savage P. B.** (2001) Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of gram-negative bacteria. *Ann. Med.* 33:167–171.
- Schaefer A. L., Hanzelka B. L., Eberhard A. et Greenberg E. P.** (1996). Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J. Bacteriol.* 178, 2897–2901.
- Schauder S. et Bassler B. L.** (2001) The languages of bacteria. *Genes Dev.* 15: 1468–1480.
- Schauder S., Shokat K., Surette M. G. et Bassler B. L.** (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol. Microbiol.* 41: 463–476.
- Schembri M. A., Kristian K. et Klemm P.** (2003). Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* (2003) 48(1), 253–267.
- Scheuerman T. R., Camper A. K. et Martin A. H.** (1998). Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. *Journal of Colloid and Interface Science* Volume **208**, Issue 1, 1 December 1998, Pages 23-33.

Schirmer T., et Jenal U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 724-735.

Schmidt E. J., Boswell J. S., Walsh J. P., Schellenberg M. M., Winter T. W., Li C., Allman G. W. et Savage P. B. (2001) Activities of cholic acid-derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*; 47:671–674.

Schuldiner S. (2012). Undecided membrane proteins insert in random topologies. Up, down and sideways: it does not really matter. Department of Biological Chemistry, Alexander Silberman Institute of Life Sciences, Hebrew University of Jerusalem, 91904 Jerusalem, Israel. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 215–219.

Scott M. G., Yan H. et Hancock R. E. W. (1999) Biological properties of structurally related α -helical cationic antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 67:2005–2009.

Shen G., Rajan R., Zhu J., Bell C. E. et Pei D. (2006). Design and synthesis of substrate and intermediate analogue inhibitors of S-ribosylhomocysteinase. *J. Med. Chem.* 2006; 49: 3003-11.

Sheridan G. E., Masters C. I., Shallcross J. A. et MacKey B. M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998 ; **64** : 1313-8.

Shi W. F. ; Jiang J. P. ; Xu Ning L. U. ; Huang Z. M. et Wang Y. Y. (2005). Inhibitory effects of reserpine and carbonyl cyanide m-chloro-phenylhydrazone on fluoroquinolone resistance of *Acinetobacter baumannii* (2005) *In Chinese Medical Journal* 118(4). p.340-343.

Shiekh F. A., Khullar M. et Singh S. K. (2006). Lithogenesis: induction of renal calcifications by nanobacteria. *Urol. Res.* 2006 ; **34** : 53-7.

Shultz S. R., Bao F., Omana V., Chiu C., Brown A. et Cain D. P. (2011). Injury in the Rat Causes Cumulative Long-Term Behavioral Impairments, Neuroinflammation, and Cortical Loss in an Animal Model of Repeated Concussion. *Journal of Neurotrauma* Vol. **29**, No. 2.

Sipkema D., Franssen M. C., Osinga R., Tramper J. et Wijffels R. H. (2005) Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology* 2005, 7, 142-162.

Skogman M. E., Vuorela P. M. et Fallarero A. (2012). Combining biofilm matrix measurements with biomass and viability assays in susceptibility assessments of antimicrobials against *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Antibiot.* (Tokyo) 2012; **65**: 453-9.

Skovhus T. L., Holmström C., Kjelleberg S. et Dahllöf I. (2007). Molecular investigation of the distribution, abundance and diversity of the genus *Pseudoalteromonas* in marine samples. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61(2): 348-361.

Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kováč J, Mučaji P. (2016). Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules.* 21(12): 1717.

Song Y., Talaty N., Datsenko K., Wanner B. L. et Cooks R. G. (2009). *In vivo* recognition of *Bacillus subtilis* by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). *Analyst.* 2009; **134**: 838-41.

Sperandio V., Torres A. G., Jarvis B., Nataro J. P., et Kaper J. B. (2003). Bacteria host-communication: the language of hormones. *PNAS* July 22, 2003 100, 8957-8956.

Speranza, G., Gottardi, G., Pederzoli, C., Lunelli, L., Canteri, R., Pasquardini, L., Carli, E., Lui, A., Maniglio, D., Brugnara, M., Anderle, M. (2004). Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials*: 2004, 25. 2029-2037.

Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. et Svabic V. M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.* 2000; **40**: 175-9.

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

Stutzmann A. (2017) Synthèse de derives de la phenothiazine et étude de leur role d'inhibiteurs de la resistance aux antibiotiques chez les *Burkholderiaceae*. Thèse soutenue le 12/2017. Université d'Aix-Marseille.

Subramoni S. et Venturi V. (2009) LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology* (2009), 155, 1377–1385.

Suhelen E., Carola H. et Staffan K. (2001). *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2001), 51, 1499–1504.

Sully E. K., Malachowa N., Elmore B. O., Alexander S. M., Femling J. K., Gray B. M., DeLeo F. R., Otto M., Cheung A. L., Edwards B. S., Sklar L. A., Horswill A. R., Hall P. R. et Gresham H. D. (2014) Selective chemical inhibition of agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PLoS Pathog* ;10 : e1004174.

Sun J., Daniel R., Wagner-Döbler I. et Zeng A. P. (2004). Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BioMed Central. (BMC) Evolutionary Biology* 2004, 4:36.

Surette M. G. et Bassler B. L. (1999). Regulation of autoinducer production in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* (1999) 31(2), 585–595.

- Taga M. E., Semmelhack J. L et Bassler B. L.** (2001). The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 2001, 42:777-793.
- Tahmina R., Benjamin Y. et Declan A. D.** (2017). Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. *Eur. Biophys. J.* (2017) 46 :647–653.
- Tamayo R., Pratt J.T. et Camilli A.** (2007). Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 131-148.
- Tawakoli P. N., Al-Ahmad A., Hoth-Hannig W., Hannig M. et Hannig C.** (2012). Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin. Oral. Investig.* 2012; **21**.
- Teitzel G. M. et Parsek M. R.** (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2313–2320.
- Thomas B. R. et Michael G.** (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs Center for Biomedical Microbiology, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. *International Journal of Medical Microbiology* 296 (2006) 149–161.
- Thomas K.** (2009). The use of broad spectrum organics biocides in marine antifouling paints. In: Hellio, C., Yebra D., (Eds), Advances in marine antifouling coatings and technologies woodheds published limited, *Cambridge*, pp. 522-553.
- Thurnheer T., Gmür R. et Guggenheim B.** (2004). Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J. Microbiol. Meth.* 2004; **56**: 37-47.
- Tomlin B. et Wang Y.** (2005) On the Value of Mix Flexibility and Dual Sourcing in Unreliable Newsvendor. *Networks MANUFACTURING & SERVICE*

OPERATIONS MANAGEMEN. Vol. 7, No. 1, winter 2005, pp. 37–57 issn1523-4614 eissn1526-5498 05 0701 0037.

Toté K., Vanden B. D., Maes L. et Cos P. (2008). A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* 2008; **46**: 249-54.

Totir M. A., Helfand M. S., Carey M. P., Sheri A., Buynak J. D., Bonomo R. A. et Cary P. R. (2007) Sulbactam forms only minimal amounts of irreversible acrylate enzyme with SHV-1 β -lactamase. *Biochemistry*; 46:8980–8987.

Trepos R.; Cervin G.; Hellio C.; Pavia H.; Stensen W.; Stensvåg K.; Svendsen J.-S.; Haug T. et Svenson J. (2014) Antifouling Compounds from the Sub-Arctic Ascidian *Synoicum pulmonaria*: Synoxazolidinones A and C, Pulmonarins A and B, and Synthetic Analogues. *Journal of Natural Products* 2014, 77, 2105-2113.

Trieu-Cuot P., Carlier C., Poyart-Salmeron C. et Courvalin P. (1991) Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a *lacZ A* gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to gram-positive bacteria. *Gene* 102: 99–104.

Tsubery H., Ofek I., Cohen S. et Fridkin M (2000). Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: implications to sensitization of gram-negative bacteria. *J. Med. Chem.* 2000 Aug 10;43(16):3085-92.

Tsukamoto S., Kato H., Hirota H. et Fusetani N. (1996). Pseudoceratidine: a new antifouling spermidine derivative from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron Lett.* 37: 1439-1440.

Ullah N. et Arafah K. M. (2009). The first total synthesis of aplysamine 6, an inhibitor of isoprenylcysteine carboxy methyltransferase. *Tetrahedron Letters* 2009, 50, 158-160.

Urakawa H., Yamada K., Komagoe K., Ando S., Oku H., Katsu T. et Matsuo I. (2010) Structure-activity relationships of bacterial outer-membrane permeabilizers based on polymyxin B heptapeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20:1771–1775.**

Urbanczyk H., Ast J. C, Higgins M. J, Carson J. et Dunlap P. V. (2007). Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2823-2829.

Uroz S., D'Angelo-Picard C., Carlier A., Elasri M., Sicot C., Petit A., Oger P., Faure D. et Dessaux Y. (2003). Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing regulated functions of plant-pathogenic bacteria. *Microbiology* 149, 1981–1989.

Usher K.M., Fromont J., Sutton D.C. et Toze S. (2004). The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in sponges from Australia and the Mediterranean, *Microbiol. Ecol.*, 48 (2004), pp. 167–177.

Vaara M. (1991) Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev.* 56:395–411.

Van der W. E., Characklis W. G. et Smith D. B. (1989). Biofilms and bacterial drinking water quality. *Water Res.* 23:1313–1322.

Van H. R. et Michiels C. W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156:5-6, pp 626-633.

Van Oss, C. J., Chaudhury, M. K., Good, R. J. (1988) Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev.* 1988, 88. 927-941.

- Vasundhara K., Khan I. et Prasad S.** (2012). Antimicrobial screening of marine bacterium G54 (*Bacillus sp.*) associated with the sponge *Mycale mannarensis*, *J. Pure Appl. Microbiol.*, **6** (2012), pp. 1991–1996.
- Vesterlund S., Paltta J., Karp M. et Ouweland A. C.** (2005). Measurement of bacterial adhesion—*in vitro* evaluation of different methods. *J. Microbiol. Meth.* **60**(2): 225-233.
- Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M. et Lejeune P.** (1998). 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. *J. Bacteriol.* **180**, 2442–2449.
- Vincent C.** (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries Efflux. *Pathologie Biologie* **52** (2004) 607–616.
- Voulvoulis N., Scrimshaw M. D. et Lester J. N.** (1999). Alternative antifouling biocides. *Appl. Organomet. Chem.* **13**, 135-143.
- Wahl, M.** (1989) Marine Epibiosis. I. Fouling and Antifouling: Some Basic Aspects. *Marine Ecology Progress Series* **1989**, **58**, 175–189.
- Wallace P. K., Arey B. et Mahaffee W. F.** (2011). Subsurface examination of a foliar biofilm using scanning electron- and focused-ion-beam microscopy. *Micron* **2011**; **42**: 579-85.
- Walters M., Sircili M. P. et Sperandio V.** (2006). AI-3 Synthesis Is Not Dependent on *luxS* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Aug. 2006, p. 5668–5681 Vol. **188**, No. **16**.
- Wang X, Li X et Ling J.** (2017). *Streptococcus gordonii* LuxS/autoinducer-2 quorum-sensing system modulates the dual-species biofilm formation with *Streptococcus mutans*. *J. Basic Microbiol.* **2017**; **57**(7):605-16.

Wang Y., Ikawa A., Okaue S., Taniguchi S., Osaka I., Yoshimoto A., Kishida Y., Ryuichi A. et Enomoto K. (2008). Quorum Sensing Signaling Molecules Involved in the Production of Violacein by *Pseudoalteromonas*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* ISSN: 0916-8451 (Print) 1347-6947.

Wanner O. et Bauchrowitz M. (2006). Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News*, 60 : f, pp 4-7.

Warwick S., Wilks M. et Hennessy E. (2004). Use of quantitative 16S ribosomal DNA detection for diagnosis of central vascular catheter-associated bacterial infection. *J. Clin. Microbiol.* 2004; **42**: 1402-8.

Waters C. M., Bassler B. L. (2005) Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria *Annu Rev Cell Dev Biol, Annu Rev: Palo Alto*, 21 (2005), pp. 319-346.

WHOI (Woods Hole Oceanographic Institution), (1952). Marine fouling and its prevention. United States Naval Institute, *Annapolis*, MD, 388pp. (Contribution no.580).

Widmer A. F. et Frei R. (2003). Diagnosis of central-venous catheter-related infection: comparison of the rool-plate and sonication technique in 100 catheters. 43rd annual interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy: Chicago, USA 2003: 14-17.

Wieczorek M. (2010). Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chem. Biol.* 17, 970–980 (2010).

Williams P. et Cámara M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; 12(2):182-91.

Williams, P. (2007). Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* 153(Pt 12), 3923–3938.

Wright A. D., McCluskey A., Robertson M. J., MacGregor K. A., Gordon C. P. et Guenther J. (2011). Anti-malarial, antialgal, anti-tubercular, anti-bacterial, anti-photosynthetic, and anti-fouling activity of diterpene and diterpene isonitriles from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*, *Org. Biomol. Chem.*, 9 (2011), pp. 400–407.

Wu Z., Shao C. et Wang C. (2012). Review on the secondary metabolites from *Phyllospongia sponges* and their bioactivities, *Chin. J. New. Drugs*, 21 (2012), pp. 52–58.

Wu, M. et Hancock, R. E. (1999). Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactericin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 274, 29–35 (1999).

Xu F., Byun T., Dussen H.-J. et Duke K. R. (2003). Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase. *J. Biotechnol.*, 101: 89.

Xu X. W., Wu Y.H., Wang C. S., Gao X. H., Wang X. G. et Wu M. (2010). *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2010), 60, 2176–2181.

Xu Y., Li N., Jiao W., Wang R., Peng Y., Qi S., Song S. et Chen W. (2012). Antifouling and cytotoxic constituents from the South China Sea sponge *Acanthella cavernosa*, *Tetrahedron*, 68 (2012), pp. 2876–2883.

Yada S., Wang Y., Zou Y., Nagasaki K., Hosokawa K., Osaka I., Arakawa R. et Enomoto K. (2008). Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Marine Biotechnology* 10(2) : 128-132.

Yang Y., Li W., Hou B. et Zhang C. (2018). Quorum sensing LuxS/autoinducer-2 inhibits *Enterococcus faecalis* biofilm formation ability *J. Appl. Oral. Sci.*1/8 2018;26: e20170566.

Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H., Williams, P., (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **70**, 5635–5646.

Yebra D. M., Kiil S. et Dam-Johansen K. (2004). Antifouling- technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**(2): 75-104.

Young D. R., Alexander G. V. et Mcdemott-Ehrlich D. (1979). Vessel related contamination of southern California harbours by copper and other metals. *J. Mar. pollution Bull.* 10, 50-56.

Yu D, Zhao L, Xue T, Sun B. (2012) *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in an *icaR*-dependent manner. *BMC Microbiol.* 2012; 12:288.

Yuanqing C. et Tong Z., (2012). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; **404**: 1465-75.

Yung H. L. et Xiaolin T. (2012) Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors* 2012, 12, 2519-2538.

Zgurskaya H I. (2002). Molecular analysis of efflux pump-based antibiotic resistance. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002; 292:95–105.

Zhang M., Jiao X. D., Hu Y. H. et Sun L. (2009). Attenuation of *Edwardsiella tarda* virulence by small peptides that interfere with LuxS/autoinducer type 2 quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75: 3882-90.

Zhao G., Wan W. et Mansouri S. (2003). Chemical synthesis of S-ribosyl-L-homocysteine and activity assay as a LuxS substrate. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003; 13: 3897-900.

Zhou L., Zheng H., Tang Y., Yu W. et Gong Q. (2013). Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnol. Lett.* (2013) 35:631–637.

Zhu J., Beaber J. W., More M. I., Fuqua C., Eberhard A. et Winans S. C. (1998). Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 180, 5398–5405.

Etude du Quorum sensing des bactéries organisées en biofilm en vue de la mise en place de biocide non toxique

Le biofouling est un phénomène invasif qui engendre des problèmes économiques et écologiques importants. Dans ce mode de vie privilégié, les micro-organismes communiquent grâce à un système de communication intra- et inter-espèces, voire inter-genre, appelé quorum sensing (QS). Le QS est basé sur les petites molécules diffusibles telles que les N-acyl homosérine lactones (AHL), et est donc impliqué dans de nombreux processus physiologiques, notamment la production de facteurs de virulence, l'émission de bioluminescence et la production de pigments. Dans une étude antérieure, le QS a été mis en évidence chez une bactérie marine dénommée *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 isolée de la rade de Toulon. *P. ulvae* TC14 étant non seulement capable de produire un biofilm important et de la violacéine mais régulerait ces deux paramètres (biofilm et violacéine) par la détection d'AHLs exogènes car elle n'en produirait pas. Cette étude a consisté dans un premier temps à poursuivre la caractérisation du système QS chez *P. ulvae* TC14 par une étude moléculaire. Tout en vérifiant l'absence de synthèse d'AHL (LuxI) et des gènes potentiels de l'auto-induction de type 2 (AI-2) chez *P. ulvae* TC14, la présence de huit séquences régulatrices *luxR* a pu être détectée et une évaluation de l'expression de ces séquences a été faite par technique RT q-PCR. Dans le but de déterminer l'impact de la modulation du QS sur l'adhésion et la formation du biofilm chez *P. ulvae* TC14 des molécules régulatrices du QS ont été testées en combinaison avec trois analogues synthétiques à effet antifouling. La restauration de l'adhésion et de la formation du biofilm par les molécules combinées a montré que la modulation du QS chez *P. ulvae* TC14 ne semble pas être la voie privilégiée pour l'inhibition du biofilm. Cependant l'évaluation d'autres cibles telles que la membrane bactérienne et les pompes d'efflux à travers des perméabilisants membranaires et les inhibiteurs de pompes d'efflux a montré un effet synergique sur l'adhésion et la formation du biofilm. Ainsi, la perméabilisation membranaire et l'inhibition des pompes d'efflux semblent être des meilleures voies de potentialisation de l'effet antifouling des analogues synthétiques.

Mot clés : Quorum sensing ; N-acyl homosérine lactone ; violacéine, modulation, biofilm, potentialisation

Quorum sensing study of bacteria organized in biofilm for the establishment of non-toxic biocide

Biofouling is an invasive phenomenon that generates significant economic and ecological problems. In this privileged way of life, micro-organisms communicate through an intra- and inter-species communication system, or even inter-genera, called quorum sensing (QS). QS is based on small diffusible molecules such as N-acyl homoserine lactones (AHL), and is therefore involved in many physiological processes, including the production of virulence factors, bioluminescence emission and pigment production. In an earlier study, QS was found in a marine bacterium called *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 isolated from the harbor of Toulon. *P. ulvae* TC14 is not only capable of producing a large biofilm and violacein but would regulate these two parameters (biofilm and violacein) by the detection of exogenous AHLs because it would not produce it. This study initially consisted in continuing the characterization of the QS system in *P. ulvae* TC14 by a molecular study. While verifying the absence of AHL synthase (LuxI) and potential genes for autoinduction type 2 (AI-2) in *P. ulvae* TC14, the presence of eight *luxR* regulatory sequences could be detected and an evaluation of the expression of these sequences was made by RT q-PCR technique. In order to determine the impact of QS modulation on biofilm adhesion and biofilm formation in *P. ulvae* TC14, QS regulatory molecules were tested in combination with three synthetic analogs with antifouling effect. The restoration of biofilm adhesion and formation by the combined molecules has shown that QS modulation in *P. ulvae* TC14 does not seem to be the preferred route for biofilm inhibition. However, evaluation of other targets such as bacterial membrane and efflux pumps through membrane permeabilizers and efflux pump inhibitors has shown a synergistic effect on adhesion and biofilm formation. Thus, membrane permeabilization and the inhibition of efflux pumps seem to be better ways of potentiating the antifouling effect of synthetic analogues.

Key words: Quorum sensing; N-acyl homoserine lactone; violacein, modulation, biofilm, potentialization