



HAL
open science

Altérocine : une protéine antibiofilm secrétée par la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

Albane Jouault

► To cite this version:

Albane Jouault. Altérocine : une protéine antibiofilm secrétée par la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Bactériologie. Université de Bretagne Sud, 2019. Français. NNT : 2019LORIS588 . tel-03106379

HAL Id: tel-03106379

<https://theses.hal.science/tel-03106379>

Submitted on 11 Jan 2021

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE BRETAGNE SUD
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ÉCOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : « Microbiologie »

Par

Albane JOUAULT

**Altérocine : une protéine antibiofilm sécrétée par la bactérie marine
Pseudoalteromonas sp. 3J6**

Thèse présentée et soutenue à Lorient, le 18 décembre 2019
Unité de recherche : LBCM EA3884, Université de Bretagne Sud
Thèse N°543

Rapporteurs avant soutenance :

Maëlle MOLMERET Professeur des Universités,
Université de Toulon

Julien VERDON Maître de Conférences (HDR),
Université de Poitiers

Composition du Jury :

Examineurs :

Jocelyne CAILLON Maître de Conférences-Praticien Hospitalier
Université de Nantes

Virginie HERVÉ Maître de Conférences
Université de Tours

Vianney PICHEREAU Professeur des Universités
Université de Bretagne Occidentale

Directeur de thèse (50%) :

Alain DUFOUR Professeur des Universités
Université de Bretagne Sud

Entre ce que je pense, ce que je veux dire, ce que je crois dire, ce que je dis,
Ce que vous avez envie d'entendre, ce que vous croyez entendre, ce que vous entendez,
Ce que vous avez envie de comprendre, ce que vous comprenez...
Il y a dix possibilités qu'on ait des difficultés à communiquer.
Mais essayons quand même.

- Bernard Werber -

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier la Région Bretagne et l'Université de Bretagne Sud pour avoir financé ces travaux de recherche. Mes remerciements vont également aux personnes qui ont accepté de juger ce manuscrit : Maëlle MOLMERET, Julien VERDON, Virginie HERVE, Jocelyne CAILLON et Vianney PICHEREAU.

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse. Merci à Alain DUFOUR pour sa gentillesse, ses conseils avisés et son exigence. Merci à Alexis BAZIRE, pour sa patience lors des travaux de biologie moléculaire. Merci à Yannick FLEURY pour son accueil à Quimper et son second degré. Merci à eux pour leur patience, pédagogie, disponibilité et leur optimisme vis-à-vis de mon travail.

Merci à tous les membres du laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines pour leur sympathie : Alain, Alexis, Karine, Isabelle, Pierre, Gaël, Fabienne, Chrystèle, Émilie, Dalyal, Laure, Fabrice, Florence, Mathieu, Guillaume, Florian, Julie et Alexandra mais également aux membres de l'équipe vannetaise et quimpéroise. Je tiens d'ailleurs à remercier l'accueil que j'ai reçu lors de mes passages à Quimper. Héléna, Hélène et Alexandra, bonne chance pour la suite de votre thèse.

Un merci spécial à Émilie PORTIER pour son aide technique mais aussi pour ses qualités humaines.

J'adresse toute ma reconnaissance aux membres de mon bureau pour m'avoir supportée dans mes moments de doute et de folie. Merci à Guillaume GILLET pour les débats enflammés sur des sujets finalement sans grande importance. Merci à Mathieu SCALABRINI pour son bonjour matinal et son rire communicatif. Merci à Florian TRAON pour ses histoires qui pouvaient m'accaparer toute une matinée. Grâce à eux, j'ai passé trois années pleines d'émotions.

Je remercie les personnes qui ont facilité le déroulement de ma thèse au sein de l'université. Merci à Florence HABASQUE pour son aide en TP et sa sympathie. Merci également à Noluenn CHAUVIN et Axelle GUITTON du pôle doctorale qui ont fait preuve d'une extrême patience et gentillesse tout au long de ma thèse.

Je souhaite aussi remercier les personnes ayant contribué à ces travaux. Un merci particulier à François DELAVAT pour ses conseils et sa motivation communicative. Merci à Émilie HADJIEV, t'encadrer aura été un plaisir au vu de ton implication.

Je tiens à remercier les collègues du centre de recherche avec qui j'ai pu discuter et passer de bons moments. Un merci spécial à Tatiana THOMAS, présente depuis la licence et qui m'a toujours tenue informée de tous les potins durant les « pauses biomol ».

J'exprime toute ma gratitude aux personnes qui m'ont donné le goût de la recherche. Je tiens à remercier sincèrement une nouvelle fois Vianney PICHEREAU et Jocelyne CAILLON pour m'avoir accueillie en stage lors de ma scolarité et d'avoir accepté de me suivre tout au long de ma thèse. Merci également à Grâce ADA DA SYLVA, qui m'a encadrée durant mon stage de master 2 et m'a donné envie de ne jamais désespérer et toujours garder le sourire.

Je tiens également à remercier mes amis qui ont été présents durant ma thèse. Merci à Audrey, Gaëlle et Romane d'avoir pris le temps de m'écouter raconter mes histoires autour d'un verre ou d'un chocolat chaud. Merci également à Géraldine et Julia qui ont supporté les histoires de labo durant un bon nombre de soirées.

Bien entendu, un grand merci à ma famille et à Kristen qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont toujours soutenue. Je vous dois beaucoup. Merci également à Mozart, le chat le plus étrange du monde mais également le plus affectueux, un remède efficace après des journées difficiles. Je ne peux faire ces remerciements sans une pensée pour ma grand-mère qui va fêter ses 80 ans et je suis très heureuse de pouvoir lui dire que ces nombreuses années d'études aboutissent enfin.

Pour finir, je tiens à remercier le livreur qui remplissait le distributeur en Kinder Country, essentiel lors d'un coup de fatigue.

Sommaire

Avant-propos	1
Introduction bibliographique	2
1. Les biofilms bactériens	2
2. Problématique des biofilms	29
Objectifs de l'étude	45
Matériels et méthodes	46
1. Cultures bactériennes	46
2. Techniques de biologie moléculaire	48
3. Activité antibiofilm	55
4. Purification et détection.....	57
Chapitre I : Étude de l'altéroïcine	62
Introduction.....	62
1. Étude du gène <i>alt</i>	63
2. Étude de la protéine altéroïcine.....	69
Conclusion	76
Chapitre II : Activité antibiofilm de l'altéroïcine	79
Introduction.....	79
1. Démonstration de l'activité antibiofilm de l'altéroïcine	80
2. Recherche des mécanismes d'action de l'altéroïcine	103
Conclusion	105
Conclusion et perspectives	109
Références bibliographiques	114
Annexes	127

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Étapes du cycle de vie d'un biofilm d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	3
Figure 2 : Représentation schématique de l'adhésion bactérienne sur une surface et facteurs impliqués	4
Figure 3 : Les différentes structures du biofilm formé <i>P. aeruginosa</i>	8
Figure 4 : Structure de l'alginate	9
Figure 5 : Structure de Psl	11
Figure 6 : Dispersion active ou passive du biofilm	16
Figure 7 : Représentation schématique des 4 systèmes formant le QS chez <i>P. aeruginosa</i> et de leurs régulons	19
Figure 8 : Représentation schématique de la régulation du mode de vie par la concentration en c-di-GMP chez <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 9 : ARNnc impliqués dans la régulation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	24
Figure 10 : Régulation du mode de vie de par les systèmes HsbR/HsbA et GacS/GacA	27
Figure 11 : Facteurs influençant la tolérance et la résistance aux antibiotiques des bactéries en biofilm.....	29
Figure 12 : Schéma représentatif des différentes stratégies antibiofilm	33
Figure 13 : Structures secondaires des AMP.....	34
Figure 14 : Activité antibiofilm de SN _{3J6} sur les biofilms formés par <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 et <i>Vibrio</i> sp. D01	41
Figure 15 : Activité du SN _{3J6} sur les biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> MUC-N1 et MUC-N2.	42
Figure 16 : Correspondance entre la séquence de l'altérocine et les séquences peptidiques obtenus par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF après digestion du peptide observé sur gel par SDS-PAGE	44

Matériels et méthodes

Figure 17 : Principe de la 5' RACE-PCR	51
Figure 18 : Système de chambres à flux	56
Figure 19 : Programme double X	59

Chapitre I : Étude de l'altérocine

Figure 20 Environnement génomique du gène <i>alt</i>	63
Figure 21 : Région promotrice du gène <i>alt</i>	64
Figure 22 : Expression du gène <i>alt</i> en fonction de la croissance de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6	67
Figure 23 : Séquence de l'altérocine	69
Figure 24 : Séparation des protéines des différentes fractions obtenues par SPE (C18) à partir de SN _{3J6} par SDS-PAGE.....	72
Figure 25 : Séquences peptidiques utilisées pour produire les anticorps spécifiques de l'altérocine.....	73
Figure 26 : Détection de l'altérocine par Dot blot ..	74
Figure 27 : Détection de l'altérocine par Western blot dans SN _{3J6} et E _{3J6}	75

Chapitre II : Activité antibiofilm de l'altérocine

Figure 28 : Caractérisation du biofilm de la souche <i>P. aeruginosa</i> MUC-N1	80
Figure 29 : Observation du biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> MUC-N1.....	81
Figure 30 : Stratégie de mutagenèse utilisée pour déléter le gène <i>alt</i> de son génome	83
Figure 31 : Plasmides utilisés pour la mutagenèse du gène <i>alt</i>	84
Figure 32 : Vecteur PRSETC	87
Figure 33 : Plasmides construits pour la production hétérologue de l'altérocine par <i>E. coli</i> .	89
Figure 34 : Clonage du gène <i>alt</i> sans peptide leader dans le plasmide PRSETC	90
Figure 35 : Détection de l'altérocine chez <i>E. coli</i> BL21(DE3)pRSETCalt	91
Figure 36 : Effet de l'altérocine produite par <i>E. coli</i> BL21(DE3)pRSETCalt sur le biofilm formé en chambres à flux par <i>P. aeruginosa</i> MUC-N1	92

Figure 37 : Plasmide pOriT et pOriTalt	95
Figure 38 : Effet de l'altérocine surproduite par <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6(pOriTalt) sur le biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> MUC-N1	97
Figure 39 : Vérification de l'absence du gène <i>alt</i> dans le génome de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J3	98
Figure 40 : Détection de l'altérocine produite par <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J3(pOriTalt)	100
Figure 41 : Effet de l'altérocine produite par la <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J3(pOriTalt) sur le biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> MUC-N1	101
Figure 42 : Activité protéasique de l'altérocine observée sur gel SDS-PAGE	104
Figure 43 : Stratégie d'étude de l'altérocine dans le cadre d'un développement d'une molécule antibiofilm à visée thérapeutique.....	111

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Caractéristiques des biofilms formés par les différents groupes de bactéries sensibles au SN _{3J6}	43
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Matériels et méthodes

Tableau 2 : Souches et plasmides utilisés dans l'étude	46
Tableau 3 : Amorces utilisées lors de cette étude	49
Tableau 4 : Enzymes de restriction utilisées lors de cette étude	52

Chapitre I : Étude de l'altérocine

Tableau 5 : Facteurs sigma retrouvés dans le génome de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6	65
Tableau 6 : Protéines homologues de l'altérocine présentes dans la base de données NCBI.	70
Tableau 7: Protéines dont au moins un fragment peptidique a été retrouvé dans les extraits E _{3J6} après digestion à la trypsine	72

Liste des abréviations

aa : acide aminés

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNe : ADN extracellulaire

ADNc : ADN complémentaire

AMP : Peptide antimicrobien

ARN : Acide ribonucléique

ARNnc : ARN non codants

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine triphosphate

BET : Bromure d'éthidium

BSA : Albumine de sérum bovin

c-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique

cis-2-DA : *Cis*-2-décanoïque

Cup : Voie chaperonne uscher

DAP : Diaminopimélate

DCG : Diguanilate cyclase

DNase I : Désoxyribonucléase I

DO₅₉₀ : Densité optique de 590 nm

E_x : Extrait du SN se rapportant à la souche X

ECF : Fonction extra-cytoplasmique

EPS : Substance polymérique extracellulaire

FC : Chambres à flux

GFP : Protéine fluorescente verte (en anglais green fluorescent protein)

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

HSL : Homosérine lactone

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IQS : QS intégré

KLH : Hémocyanine de patelle

LB : Bouillon lysogène

LPS : Lipopolysaccharide

MALDI-TOF : Désorption-ionisation laser assistée par matrice – ionisation en fonction du temps de vol (en anglais matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight)

MCBL : Microscope confocal à balayage laser

MLB : LB modifié

NO : Oxyde nitrique

pb : paire de base

PDE : Phosphodiesterase

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PQS : Signal quinolone de *Pseudomonas*

QS : Quorum sensing

QQ : Quorum quenching

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RT-qPCR : PCR quantitative après transcription inverse (en anglais reverse transcription-quantitative PCR)

SN : Surnageant de culture

SN_x : SN se rapportant à la souche X

SDS-PAGE : Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium

SPE : Extraction en phase solide

T_m : Température de fusion (en anglais melting temperature)

VME : Vésicule de la membrane externe

VNSS : Solution Vääänen nine-salt

3D : Tridimensionnelle

5' RACE-PCR : Amplification rapide de l'extrémité 5' d'ADNc par PCR

Avant-propos

Les microorganismes ont tout d'abord été décrits comme planctoniques, cellules libres. Depuis les années 70, des communautés bactériennes fixées à un support ont été observées et le terme « biofilm » pour nommer ce nouveau mode de vie a été utilisé pour la première fois en 1978 (Costerton et *al.* 1978). Le biofilm est maintenant défini par Donlan et Costerton (2002) comme une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées à un substrat, à une interface ou entre elles, enveloppées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires produites par les bactéries elles-mêmes, et ces dernières présentent des phénotypes de croissance et d'expressions génétiques altérés.

Les biofilms procurent aux bactéries une résistance à leur environnement plus importante qu'en condition planctonique. Il pose donc des problèmes dans de nombreux domaines, dont le domaine médical. Alors que les infections aiguës causées par les bactéries planctoniques ont longtemps été contrôlées grâce aux antibiotiques et aux vaccins, les infections chroniques causées par les biofilms demeurent difficiles à traiter (Donlan et Costerton 2002).

Le mode de vie en biofilm génère donc un problème de santé publique qui nécessite de trouver une alternative aux traitements actuels. L'utilisation de molécules avec une activité antibiofilm couplée à un antibiotique pourrait être une stratégie intéressante (Pletzer et *al.* 2016 ; Bowler 2018).

Cette étude porte sur une molécule antibiofilm, l'altérocine, produite par la souche bactérienne marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et active contre des bactéries marines ainsi que plusieurs pathogènes humains (Dheilly et *al.* 2010).

Ce manuscrit s'articule en quatre parties. Une introduction bibliographique est exposée dans un premier temps. Elle se concentrera sur la formation du biofilm puis sur la problématique des biofilms en mettant en avant les nouvelles stratégies de lutte se focalisant sur le genre *Pseudoalteromonas*, auquel appartient la bactérie productrice de la molécule d'intérêt. La partie suivante décrira les techniques utilisées pour cette étude. Enfin, il y aura deux chapitres de résultats, le premier traitant de l'étude de l'altérocine et le second de l'activité antibiofilm de cette protéine.

Introduction bibliographique

1. Les biofilms bactériens	2
1.1 Cycle de vie et structures des biofilms	2
1.1.1 Adhésion	3
1.1.2 Maturation	6
1.1.2.1 Structure	6
1.1.2.2 Composants de la matrice	9
1.1.2.2.1 Exopolysaccharides	9
1.1.2.2.2 ADN extracellaire	12
1.1.2.2.3 Rhamnolipides	13
1.1.2.2.4 Protéines	13
1.1.2.2.5 Vésicules de la membrane externe	15
1.1.3 Dispersion	16
1.2 Régulation	17
1.2.1 Quorum sensing	18
1.2.2 Di-guanosine monophosphate cyclique	20
1.2.3 Petits ARN non codants	23
1.2.4 Autres	25
2. Problématique des biofilms	29
2.1 Tolérance et résistance des bactéries en biofilm	29
2.2 Stratégies antibiofilm	32
2.3 Focus sur les molécules antibiofilm produites par le genre <i>Pseudoalteromonas</i> ...	38
2.3.1 Activité antibactérienne et antibiofilm	38
2.3.2 Activité antibiofilm de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6	40

1. Les biofilms bactériens

1.1 Cycle de vie et structures des biofilms

La plupart des bactéries est capable de former des biofilms. Cependant, la structure du biofilm dépend de nombreux facteurs. *Pseudomonas aeruginosa* sera le principal modèle décrit dans cette étude bibliographique, étant l'un des modèles bactériens les plus étudiés et pour lequel de nombreuses données sont disponibles. C'est également un des pathogènes opportunistes à Gram négatif prédominant dans les biofilms liés à des infections associées à des soins médicaux (Dewasthale et *al.* 2018).

Le cycle d'un biofilm peut se décomposer en trois étapes clés que sont l'adhésion des bactéries, la maturation du biofilm et enfin sa dispersion (Mann et Wozniak 2012). Dans la bibliographie, la formation de biofilm de *P. aeruginosa* est souvent plus détaillée et représentée en cinq étapes (Sauer et *al.* 2002 ; Rasamiravaka et *al.* 2015) (figure 1).

Dans un premier temps, les cellules bactériennes se fixent à une surface de façon réversible (étape I). Cette adhésion est une phase où les bactéries peuvent encore se détacher facilement. Certaines cellules vont ensuite s'attacher de façon irréversible à la surface et résister aux tentatives de délogement physique (étape II). Après l'attachement irréversible, les cellules se multiplient et produisent des composants matriciels du biofilm permettant la formation de petits agrégats bactériens appelés microcolonies (étape III). Par la suite, les microcolonies vont continuer de croître en macrocolonies et former une communauté avec une structure tridimensionnelle (3D) (étape IV). Enfin, afin de coloniser de nouvelles surfaces, certaines cellules peuvent s'échapper du biofilm et le disperser (étape V). Des régulations génétiques sont mises en œuvre pour chaque étape de la formation d'un biofilm.

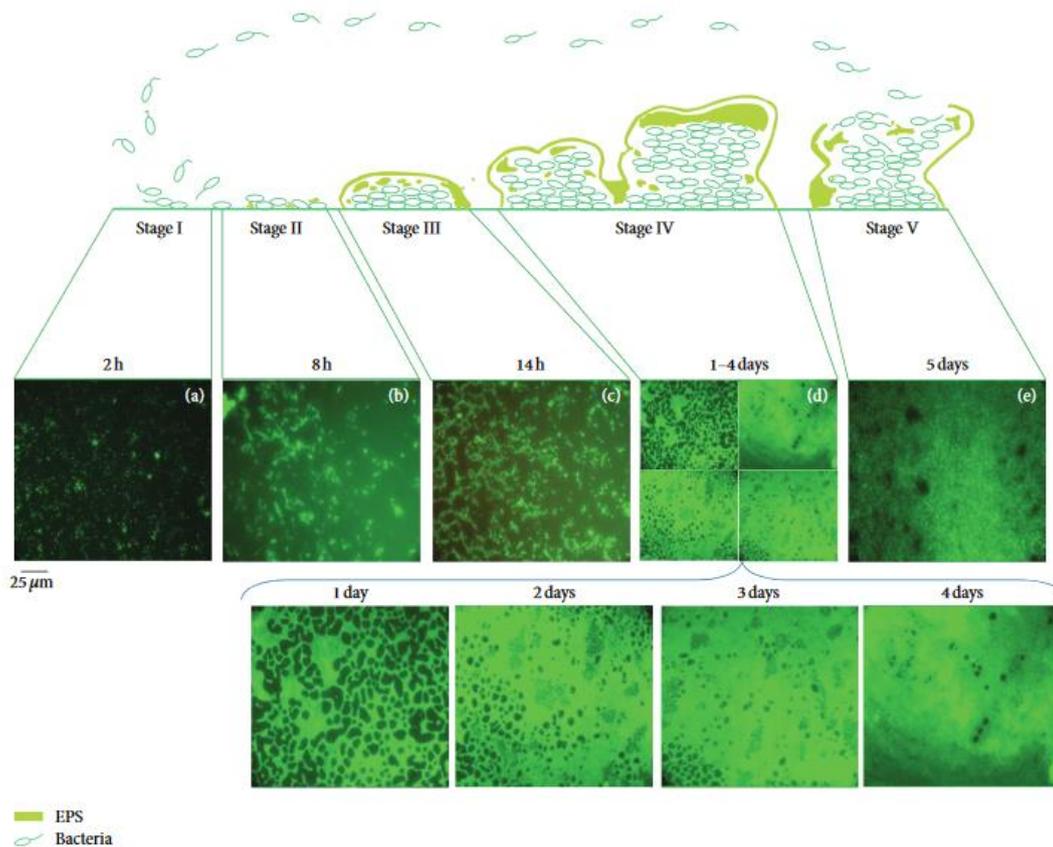


Figure 1 : Étapes du cycle de vie d'un biofilm de *P. aeruginosa*. Étape I : adhésion réversible. Étape II : adhésion irréversible. Étape III : formation de microcolonies. Étape IV : maturation du biofilm. Étape V : Dispersion du biofilm. (Rasamiravaka et al. 2015)

1.1.1 Adhésion

Le passage d'une communauté bactérienne planctonique à une communauté bactérienne sessile attachée à une surface nécessite tout d'abord que les bactéries rencontrent cette surface et s'y attachent (figure 2). Elles peuvent approcher la surface de façon passive (diffusion, gravitation ou propulsion par un flux) ou active (motilité bactérienne) (Donlan 2002). Puis des forces physico-chimiques attractives et répulsives vont s'exercer entre les bactéries et la surface et conditionner l'initiation de l'adhésion. L'adhésion bactérienne repose donc sur les interactions entre la surface de la cellule bactérienne et celle du support à coloniser, qui sont premièrement influencées par des liaisons chimiques faibles, non covalentes de type Van der Waals, électrostatiques ou de Lewis (Renner et Weibel 2011). La motilité bactérienne via les flagelles permet une prospection supplémentaire de la surface. Si

les conditions sont favorables à l'établissement d'une communauté, une adhésion physique sur le support, appelée adhésion irréversible, a lieu via plusieurs constituants de la surface cellulaire.

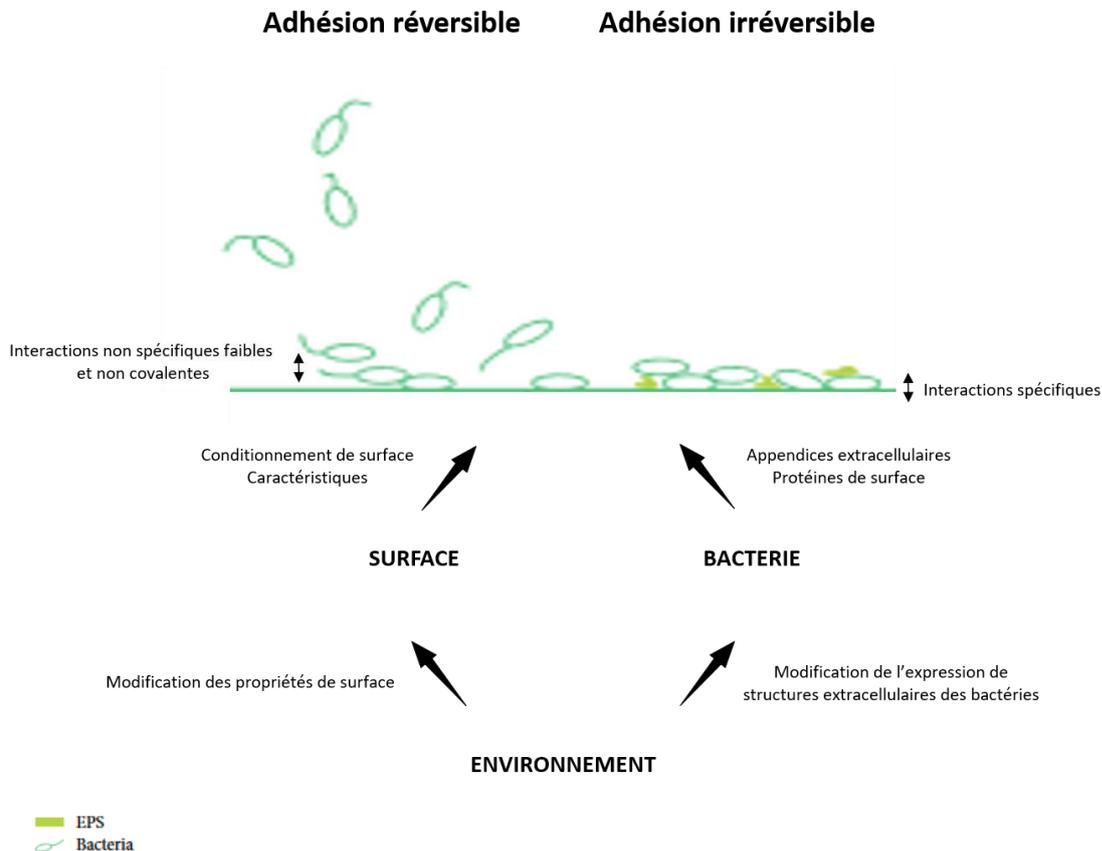


Figure 2 : Représentation schématique de l'adhésion bactérienne sur une surface et facteurs impliqués.

Le premier acteur impliqué dans l'adhésion est la bactérie elle-même. L'hydrophobie de la surface bactérienne ainsi que des protéines et appendices cellulaires sont impliqués dans l'adhésion.

Les caractéristiques de la surface bactérienne vont permettre de favoriser l'attraction des bactéries avec la surface. Des différences entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont observées (Prescott et *al.* 1995). Ainsi, les bactéries à Gram positif, dont l'enveloppe est constituée d'une membrane plasmique et d'une couche épaisse de peptidoglycane (paroi) séparée par l'espace périplasmique, possèdent des acides téichoïques qui confèrent à la paroi une charge négative. L'enveloppe des bactéries à Gram négatif, comme *P. aeruginosa*, est

composée d'une membrane plasmique, de l'espace périplasmique contenant une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe. Le feuillet externe de cette dernière est constitué de lipopolysaccharides (LPS) composés d'un lipide A, d'un noyau oligosaccharidique et de l'antigène O qui contribue à la charge négative de la surface (Williams et Fletcher 1996).

Le flagelle de *P. aeruginosa* a montré un rôle dans l'adhésion (O'Toole et Kolter 1998). Il facilite la rencontre entre les bactéries et la surface en permettant une motilité de type swimming dans un environnement aqueux et une motilité de type swarming sur des surfaces semi-solides. Cependant il a été montré que son rôle dans l'adhésion est variable selon la source de carbone. Klausen et al. (2003b) ont montré qu'en croissance dans un milieu minimal en citrate, le mutant ne possédant pas de flagelle adhérait autant à la surface que la souche sauvage. Le flagelle a également montré un rôle adhésif *in vivo*. La protéine FliD, formant la coiffe à l'extrémité du flagelle de *P. aeruginosa*, permet l'adhésion dans les voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose en se fixant aux mucines, protéines présentes dans le mucus pulmonaire (Arora et al. 1998).

Plusieurs études suggèrent que les pili de type IV, appendices extracellulaires présents sur le pôle bactérien, ne sont pas essentiels à l'adhésion (O'Toole et Kolter 1998; Klausen et al. 2003a). Bucior et al. (2012) ont cependant montré que les pili de type IV étaient capables de se fixer aux N-glycanes présents au domaine apical des cellules épithéliales de poumon.

D'autres protéines comme CrdA, les lectines LecA et LecB, les pili synthétisés par la voie chaperonne usher et la porine OprF jouent également un rôle dans l'adhésion. Elles sont développées dans le paragraphe 1.1.2.2.4 Protéines (p13).

Le deuxième acteur majeur entrant en jeu dans l'étape d'adhésion est la surface sur laquelle les bactéries s'attachent. Les caractéristiques de la surface ont montré leur importance dans le processus d'adhésion (Donlan 2002). Ainsi, une rugosité importante va faciliter l'adhésion en diminuant les contraintes de cisaillement. L'hydrophobie facilite l'adhésion à l'aide d'interactions hydrophobes avec les cellules permettant de contrer les forces répulsives. Il existe également un phénomène appelé conditionnement de surface qui va augmenter l'attrait de la surface. Il s'agit d'une adsorption sur la surface de molécules organiques et

inorganiques provenant du milieu, modifiant les caractéristiques de celle-ci et constituant un apport de nutriments pour les bactéries (Fletcher 1996).

Enfin, le milieu dans lequel évoluent les bactéries a également un impact sur l'adhésion (Donlan 2002). Des facteurs comme les phénomènes d'hydrodynamisme, le pH, la force ionique, le taux de nutriments ou la température vont influencer l'adhésion bactérienne en impactant les propriétés de surface et/ou l'expression de structures extracellulaires des bactéries participant à l'adhésion. Ainsi, Gaboriaud et *al.* (2006) ont mis en évidence qu'une augmentation du pH réduisait la capacité des bactéries à adhérer à des surfaces hydrophobes. Ils ont montré une évolution mécanique et structurelle de l'enveloppe bactérienne. Même si les mécanismes bactériens ne sont pas élucidés, ils émettent l'hypothèse que les bactéries ont des propriétés de surface différentes selon le pH, telles que la teneur en eau de l'enveloppe cellulaire.

1.1.2 Maturation

Les cellules adhérentes vont réguler positivement les gènes impliqués dans la production de la matrice, composée de substances polymériques extracellulaires (EPS), en moins de 12 min (Costerton et *al.* 2003) et se multiplier afin de commencer la formation du biofilm. Des microcolonies bactériennes apparaissent puis vont croître jusqu'à devenir des macrocolonies enfermées dans une matrice qui correspond au biofilm mature. Le biofilm mature acquiert alors sa structure 3D.

1.1.2.1 Structure

Les biofilms de *P. aeruginosa* peuvent acquérir des structures 3D différentes selon les souches et les conditions. Ainsi, Lee et *al.* (2005) et Deligianni et *al.* (2010) ont collecté, respectivement, 20 et 96 isolats provenant de patients atteints de mucoviscidose et ont observé une biomasse

et une morphologie extrêmement variables des biofilms produits par ces souches. Ces différences s'expliquent par des variations phénotypiques qui impactent négativement la biomasse du biofilm, comme par exemple la perte de motilité de certaines souches. La structure du biofilm peut aussi par exemple varier selon la source de carbone du milieu. Klausen et *al.* (2003a) ont montré que le biofilm de la souche PAO1 acquiert une structure hétérogène avec des motifs en forme de champignon en présence de glucose alors qu'il est homogène et plat en présence de citrate (figure 3-1). Deux modèles de formation sont alors proposés (figure 3-2) (Klausen, et *al.* 2003a ; Klausen, et *al.* 2003b).

Dans le modèle de biofilm hétérogène avec des motifs en forme de champignon, souvent observé dans les études sur le biofilm de *P. aeruginosa*, les bactéries attachées à la surface se différencient initialement en deux sous-populations, une non motile et une motile. La sous-population non motile forme des microcolonies par croissance clonale qui vont servir de tige aux structures multicellulaires en forme de champignon. La sous-population motile va coloniser la surface puis migrer sur les tiges via le twitching, un mécanisme de motilité reposant sur l'expansion/rétractation des pili de type IV (Skerker et Berg 2001), et former les coiffes des champignons (Klausen et *al.* 2003a). Cependant, Barken et *al.* (2008) suggèrent que la sous-population motile se déplacerait via le flagelle (swarming ou swimming) et le chimiotactisme. Les pili de type IV permettraient la fixation à l'acide désoxyribonucléique extracellulaire (ADNe) produit par la sous-population non motile. La formation du biofilm avec des motifs en forme de champignon exige ainsi une coopération entre différents acteurs du biofilm.

Dans le modèle de biofilm homogène plat, la formation initiale de microcolonies a également lieu par croissance clonale. Cependant, lorsque les microcolonies atteignent une taille critique, les bactéries se dispersent sur la surface via le twitching. Le passage de l'état sessile à l'état mobile serait induit par une ou plusieurs limitations en nutriments (Klausen et *al.* 2003b). Shrouf et *al.* (2006) proposent également l'intervention du swarming. Sous certaines conditions, les cellules seraient en perpétuel mouvement sur la surface conduisant à un biofilm homogène.

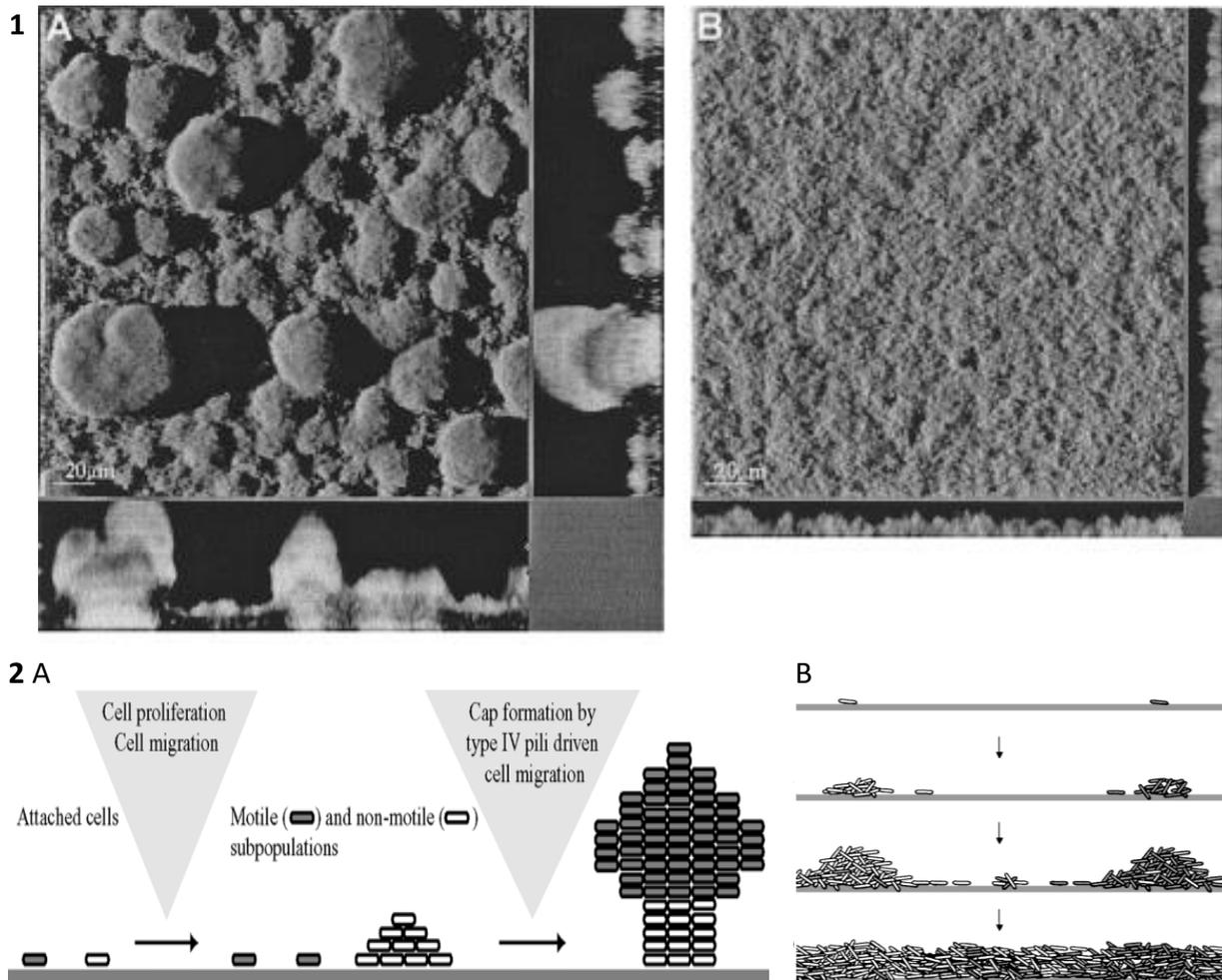


Figure 3 : Les différentes structures du biofilm formé par *P. aeruginosa*. 1 : Structure d'un biofilm de 5 jours de *P. aeruginosa* PAO1 en fonction de la source de carbone. A : glucose, B : citrate. (Klausen et al. 2003a) 2 : Modèle de formation des différentes structures. A : Formation d'un biofilm hétérogène avec une structure en forme de champignon (Klausen et al. 2003a), B : Formation d'un biofilm homogène plat (Klausen et al. 2003b).

La structure du biofilm de *P. aeruginosa* est influencée par différents facteurs. Dans l'étude menée par Klausen et al. (2003b), le biofilm plat est observé lorsque que le citrate est utilisé comme source de carbone. Il est possible que le citrate diminue la concentration en fer disponible pour les bactéries en le chélatant. Or il a été montré qu'une limitation en fer induisait la motilité (Harmsen et al. 2010).

La structure 3D comprend généralement des canaux non colonisés afin de permettre la diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le biofilm (Davey et al. 2003). Elle dépend également des composants présents dans la matrice.

1.1.2.2 Composants de la matrice

Le biofilm mature se compose de microorganismes englobés d'EPS formant la matrice. Cette dernière constitue jusqu'à 85 % du biofilm et se compose d'exopolysaccharides, de protéines, de lipides, ainsi que d'acides nucléiques (Donlan et Costerton 2002). Elle contribue à l'architecture du biofilm en lui fournissant une stabilité mécanique. Elle permet également de piéger les enzymes, l'ADNe, ainsi que les signaux biochimiques et de les garder à proximité des microorganismes afin de faciliter la communication intercellulaire et la métabolisation de biopolymères (Flemming et Wingender 2010). Elle est majoritairement produite lors de l'étape de maturation, mais son implication dans l'adhésion montre que cette production est très précoce (Costerton et *al.* 2003).

1.1.2.2.1 Exopolysaccharides

P. aeruginosa produit au moins trois types d'exopolysaccharides : l'alginate, Pel et Psl (Mann et Wozniak 2012).

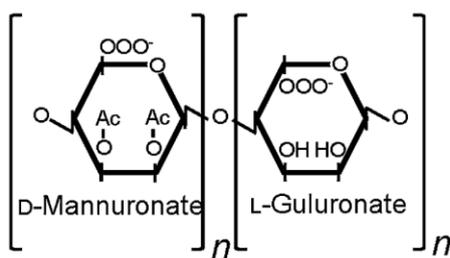


Figure 4 : Structure de l'alginate

L'alginate est un hétéropolymère linéaire d'acide-D-mannuronique et acide-L-guluronique reliés par des ponts β 1-4 (Mann et Wozniak 2012) (figure 4). Il est un composant important de la matrice en contribuant à la formation de microcolonies, à la stabilité mécanique ainsi qu'à la rétention d'eau et de nutriments (Rasamiravaka et *al.* 2015).

Wozniak et *al.* (2003) ont cependant montré que les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'alginate n'étaient pas exprimés durant la formation du biofilm des souches PAO1 et PA14, pourtant couramment utilisées dans l'étude des biofilms. L'alginate n'est donc pas essentiel à

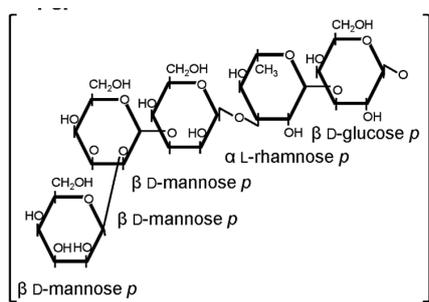
la formation du biofilm de *P. aeruginosa*, mais sa quantité augmente chez les souches devant survivre dans un environnement stressant (Wozniak et al. 2003 ; Bedi et al. 2018).

Une surproduction d'alginate conduit à l'apparition de souches dites mucoïdes, souvent retrouvées dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose (Lee et Yoon 2017 ; Mann et Wozniak 2012). Elle provient principalement d'une mutation du gène *mucA* facilitée par la présence des espèces réactives de l'oxygène, produites lors de l'inflammation chronique des poumons de ces patients (Mann et Wozniak 2012). Le gène *mucA* code un anti-facteur sigma qui séquestre AlgU, le facteur sigma (σ) responsable de la transcription des gènes nécessaires à la synthèse d'alginate (Chevalier et al. 2019). La mucoïdie affecte le développement du biofilm qui acquiert une architecture plus hétérogène avec de larges microcolonies séparées par des canaux d'eau et une résistance accrue à certains antibiotiques tels que la tobramycine ainsi qu'au système immunitaire conduisant à des infections chroniques (Hentzer et al. 2001 ; Ramsey et Wozniak 2005). La surproduction d'alginate semble protéger *P. aeruginosa* en captant les espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules phagocytaires, en réduisant la chimiotaxie des leucocytes polymorphonucléaires et en inhibant l'activation du complément (Lyczak et al. 2002).

Pel et Psl sont deux polysaccharides impliqués dans la structure du biofilm de *P. aeruginosa*. Colvin et al. (2012) suggèrent que Pel et Psl peuvent remplir une fonction redondante d'échafaudage structurel pour les biofilms matures afin de garder la capacité à former des biofilms en cas d'une éventuelle mutation dans un des deux opérons impliqués. Ainsi, ces auteurs ont montré que la souche PAO1, qui utilise principalement Psl, était capable d'augmenter la production de Pel lors d'une mutation de Psl. Jennings et al. (2015) ont également observé que Pel pouvait également être présent dans la périphérie du biofilm afin de compenser une absence de Psl. De plus, certaines souches sont déficientes de l'un ou l'autre, comme la souche PA14 qui ne produit que Pel et qui est pourtant capable de former un biofilm entouré d'exopolysaccharides (Jennings et al. 2015).

Pel est un polysaccharide dont la structure n'a pas encore été élucidée. Il est composé d'acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine (Jennings et *al.* 2015). L'opéron *pel* (*pelA-G*) code sept enzymes mais il semble que d'autres gènes interviennent dans la production de Pel. Celle-ci est régulée par le quorum sensing (QS) et la concentration en di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) via PelD et FleQ (cf. 1.2.1 Quorum sensing (p18) et 1.2.2 Di-guanosine monophosphate cyclique (p20)) (Lee et *al.* 2007 ; Baraquet et *al.* 2012).

Pel a été nommé ainsi car il contribue principalement au développement des biofilms formés à l'interface air-liquide sous la forme d'une pellicule (Limoli et *al.* 2015). Il est nécessaire pour la croissance du biofilm de PA14 en maintenant les interactions cellule-cellule, mais n'est pas essentiel pour le maintien de sa structure (Colvin et *al.* 2011). Jennings et *al.* (2015) ont montré que Pel était retrouvé sous deux formes, associé à la cellule et libre. Par sa charge positive, il est capable de se fixer à l'ADNe au niveau de la base du biofilm via des interactions ioniques.



Psl est composé de D-glucose, D-mannose et L-rhamnose (figure 5) (Ma et *al.* 2007). L'opéron *psl* rassemble 15 gènes (*pslA-O*) dont 11 (*pslACDEFGHIJKL*) sont essentiels à la production de Psl (Limoli et *al.* 2015). Les facteurs σ alternatifs, RpoS et AlgU régulent positivement l'expression de *psl* alors que RsmA régule la production de Psl en inhibant sa traduction (Irie et *al.* 2010 ; Bazire et *al.* 2010).

Figure 5 : Structure de Psl

Il est souvent retrouvé sous deux formes : associé à la cellule et, avec un poids moléculaire moins important, sous forme libre (Mann et Wozniak 2012).

Durant l'adhésion, Psl est ancré à la surface de la membrane externe dans un motif hélicoïdal qui favorise les interactions cellule-cellule et l'assemblage de la matrice en stabilisant les macromolécules lors des contacts entre hélices adjacentes (Ma et *al.* 2009). Il favorise ainsi l'adhésion des bactéries sur des surfaces abiotiques. Chez les souches non mucoïdes comme mucoïdes, Psl favorise également l'adhésion sur des surfaces biotiques telles que les cellules des voies respiratoires A549 (Byrd et *al.* 2010 ; Jones et Wozniak 2017).

Afin de favoriser la croissance et stabiliser le biofilm, Psl se fixe à des protéines de la matrice et au fer. Borlee *et al.* (2010) ont observé que la protéine CdrA se lie à Psl et Passos da Silva *et al.* (2019) ont montré que la lectine LecB se lie aux résidus de mannoses ramifiés situés sur la chaîne latérale de Psl. Cette interaction conduit à une rétention accrue des cellules et de Psl pendant la croissance du biofilm. LecB détermine aussi la localisation de Psl dans le biofilm. Selon Yu *et al.* (2016), Psl est capable de se lier au fer afin de favoriser la croissance du biofilm. Le fer est un important signal environnemental pour *P. aeruginosa*. Glick *et al.* (2010) ont ainsi montré que sous des conditions limitées en fer, la production de rhamnolipide était augmentée et induisait ainsi la mobilité de type twitching conduisant à une altération de la formation du biofilm. Lors de l'étape de dispersion, Psl s'accumule à la périphérie des microcolonies aboutissant à une cavité sans Psl (Ma *et al.* 2009).

1.1.2.2.2 ADN extracellulaire

L'ADNe est un composé abondant de la matrice de *P. aeruginosa* (Wilton *et al.* 2015). Lorsque le biofilm est formé *in vitro*, l'ADNe est d'origine bactérienne (Allesen-Holm *et al.* 2006). Il provient d'une libération régulée par le QS ou de la mort cellulaire engendrée par un prophage. La sécrétion de vésicules de la membrane externe (VME) pourrait également être impliquée. Au contraire, lorsque le biofilm est formé *in vivo*, l'ADNe de la matrice provient principalement de l'hôte (Wilton *et al.* 2015).

L'ADNe joue un rôle important dans toutes les étapes de la formation du biofilm, de l'adhésion à la dispersion. Dans un premier temps, il va aider l'adhésion bactérienne à une surface en modulant la charge et l'hydrophobie de la bactérie favorisant les interactions entre les bactéries et la surface abiotique. Il intervient également comme interconnecteur cellule-cellule durant la phase d'adhésion du biofilm. L'ADNe facilite ensuite l'expansion du biofilm via le twitching en maintenant un alignement correct des cellules (Gloag *et al.* 2013). De plus, il participe à la formation des structures en forme de champignon comme expliqué précédemment avec notamment sa liaison à Pel (cf. 1.1.2.2.1 Exopolysaccharides (p9)). En période de « famine », il peut servir de nutriments (Rasamiravaka *et al.* 2015). Enfin il va être

important pour former la cavité nécessaire à la dispersion du biofilm (cf. 1.1.3 Dispersion (p16)).

1.1.2.2.3 Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des biosurfactants composés d'un ou deux rhamnoses et d'un acide α -hydroxydécanoïque reliés par une liaison β -1,2-glycosidique (Abdel-Mawgoud et *al.* 2010).

Sous le contrôle du système Rhl du QS, plusieurs rôles sont attribués aux rhamnolipides tout au long de la formation du biofilm. Ils semblent renforcer l'adhésion bactérienne en induisant une libération de LPS qui améliore l'hydrophobie de la surface cellulaire et donc favorisent l'adhésion primaire des cellules planctoniques (Abdel-Mawgoud et *al.* 2010). Ils jouent ensuite un rôle important dans la formation et la structure du biofilm en favorisant le swarming. Ils permettent la lubrification de la surface autour de la bactérie afin de réduire la tension superficielle, ce qui est nécessaire au swarming (Abdel-Mawgoud et *al.* 2010). Comme expliqué précédemment, ils favorisent aussi un autre type de motilité sous des conditions limitantes en fer, le twitching, conduisant à un biofilm fin et plat (Glick et *al.* 2010). De plus, ils maintiennent les canaux non colonisés en affectant les interactions cellule-cellule et l'attachement bactérien à la surface (Davey et *al.* 2003). Ils semblent aussi intervenir dans la dispersion, mais leur implication varie en fonction des études (Kim et Lee 2016).

1.1.2.2.4 Protéines

Toutes les protéines secrétées ou à la surface des bactéries sont potentiellement retrouvées dans la matrice et contribuent à sa formation. Certaines d'entre elles ont été plus étudiées et participent davantage à la formation du biofilm, facilitant notamment l'adhésion des bactéries et la stabilité du biofilm.

Borlee et *al.* (2010) ont identifié chez *P. aeruginosa* un opéron plus exprimé en biofilm qu'en condition planctonique, *cdrAB*. Le gène *cdrA* code une proprotéine de 220 kDa qui est clivée

en une protéine de 150 kDa, CdrA. Le gène *cdrB* code quant à lui le transporteur de CdrA. De par sa liaison avec l'exopolysaccharide Psl, CdrA permet une meilleure stabilité du biofilm. De plus, cette interaction fortifie la matrice en prévenant la protéolyse de CdrA (Reichhardt et *al.* 2018).

Les lectines LecA et LecB qui possèdent une grande affinité pour, respectivement, les galactosides et les fucosides, apportent leur contribution à la structuration du biofilm et sa stabilité (Mann et Wozniak 2012). De plus, comme expliqué précédemment (cf. 1.1.2.2.1 Exopolysaccharides p(9)), LecB se lie au polysaccharide Psl afin de contribuer à la structure du biofilm (Passos da Silva et *al.* 2019).

En plus des pili de type IV, *P. aeruginosa* produit d'autres pili, CupA, CupB, CupC, CupD CupE et CupF, via la voie chaperonne usher (*cup*) (Giraud et de Bentzmann 2012). Pour l'assemblage de ces pili, une protéine dite chaperonne lie les sous-unités polypeptidiques de pilines qui sont sécrétées dans le périplasme, puis ce complexe chaperonne-piline est délivré à la protéine Usher, qui forme un pore dans la membrane externe. Cette protéine Usher permet aux sous-unités de pilines d'être libérées du complexe chaperonne-piline et assemblées en fibrilles en traversant la membrane externe (Vallet et *al.* 2004).

Le système CupA est requis pour l'attachement sur des surfaces abiotiques et pour les premières étapes de la formation de biofilm. Il est également impliqué dans l'établissement des pellicules dépendantes de Pel. Les systèmes CupB et CupC jouent un rôle dans la formation des microcolonies. CupE est impliqué dans la formation et la structuration du biofilm. CupD, en plus de son implication au sein du biofilm, semble quant à lui jouer un rôle dans la motilité bactérienne (Harmsen et *al.* 2010 ; Giraud et de Bentzmann 2012).

La porine Oprf, la plus abondante des protéines non-lipoprotéiques de la membrane externe de *P. aeruginosa*, contribue à l'adhésion aux cellules humaines (Chevalier et *al.* 2017). Ainsi, Azghani et *al.* (2002) ont montré une baisse de l'adhésion aux cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549) de 43 % avec un mutant *oprF* comparé à la souche sauvage. De plus, chez les biofilms observés dans des conditions hypoxiques telles que celles rencontrées dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose, l'expression du gène *oprF* y est plus élevée (Chevalier et *al.* 2017).

1.1.2.2.5 Vésicules de la membrane externe

Les vésicules de la membrane externe sont des vésicules sphériques (20 à 500 nm) délimitées par une membrane provenant de la membrane externe des bactéries. Elles sont formées par les bactéries à Gram négatif et contiennent divers composants comme des protéines, des acides nucléiques, des ions, des métabolites et des molécules de signalisation (Kulp et Kuehn 2010 ; Wang et *al.* 2015).

Selon Kulp et Kuehn (2010), les VME associées à la matrice du biofilm peuvent être séparées en deux populations en fonction de leur densité, les VME de haute densité et celles de basse densité. Les VME de haute densité sont légèrement plus grandes que les VSM planctoniques et sont associées à des fragments de *fimbriae* et de pili. Les VME de basse densité ont la même taille mais se composent de plus de LPS et de moins de protéines que les VSM planctoniques. La différence observée entre les VSM des biofilms et celles produites par les bactéries planctoniques pourrait s'expliquer par la biogénèse des VSM. D'après Turnbull et *al.* (2016), la formation des VSM en biofilm résulte de la lyse cellulaire et non d'un mécanisme induit par le signal quinolone de *Pseudomonas* (PQS) comme en condition planctonique. Cooke et *al.* (2019) ont cependant montré que, bien qu'une petite population de vésicules dans les biofilms puisse provenir d'une lyse cellulaire, le mécanisme induit par PQS est nécessaire pour générer la majorité des VSM produites en biofilm.

De nombreuses études ont défini le rôle des VSM produites par les bactéries planctoniques, mais la relation entre biofilm et VSM reste encore floue (Cooke et *al.* 2019 ; Wang et *al.* 2015). Diverses hypothèses ont cependant été émises. En prenant en compte les études mentionnant l'association de l'ADN et des VSM ainsi que la stimulation de la formation du biofilm par un ajout d'ADN exogène, les VSM pourraient jouer un rôle dans la signalisation de la production de biofilm via l'ADN associé à la surface. Elles pourraient aussi médier les interactions internes et externes au biofilm. De plus, les VSM pourraient se lier à des substances nocives pour le biofilm (Kulp et Kuehn 2010).

1.1.3 Dispersion

La dispersion est la dernière étape du cycle de vie du biofilm et permet la dissémination de bactéries qui peuvent ensuite coloniser de nouvelles surfaces. Elle peut être passive, par érosion et pelage, ou active (figure 6). Pour la forme passive, de petites portions de la biomasse en surface externe du biofilm vont être détachées, alors que pour la forme active des cellules jaillissent du centre du biofilm et s'en libèrent (Lee et Yoon 2017).

La dispersion active du biofilm peut notamment être engendrée par un environnement qui devient trop hostile ou lorsque les microcolonies atteignent une taille critique. Le taux de nutriments, d'oxygène, d'oxyde nitrique (NO), ainsi que certains produits chimiques sont connus comme signaux environnementaux induisant la dispersion du biofilm (Kim et Lee 2016).



Figure 6 : Dispersion active ou passive du biofilm.

Chez *P. aeruginosa*, la dispersion active du biofilm se caractérise par la formation d'une cavité absente de matrice au centre de microcolonies où des bactéries motiles peuvent être présentes (Kaplan 2010). L'étape de dispersion implique notamment une réduction du niveau

de biosynthèse et la dégradation des EPS, une autolyse d'une sous-population du biofilm et une augmentation de la biosynthèse des rhamnolipides (Kim et Lee 2016).

Ma et *al.* (2009) suggèrent que *P. aeruginosa* utilise deux mécanismes afin de former une cavité. Le premier mécanisme serait la réduction de la synthèse de Psl par les bactéries du centre de la microcolonie où va se former la cavité. Le second mécanisme serait l'autolyse d'une sous-population permettant de libérer les Psl liés à la surface bactérienne qui seraient ensuite dégradés par des enzymes et/ou piégés par un mécanisme de séquestration cationique avec l'ADNe. L'autolyse des cellules est importante pour la formation de la cavité. D'après Ma et *al.* (2009), elle est sous le contrôle des gènes *cidAB* et *IrgAB* qui codent les protéines Cid/Lrg. Ces protéines sont structurellement et fonctionnellement liées aux holines, codées par un bactériophage qui régulent la lyse des cellules hôtes lors de son cycle lytique (Kaplan 2010). D'après Webb et *al.* (2003), cette autolyse pourrait également être liée à un prophage, ADN de phage intégré dans le chromosome de la cellule hôte, libéré par les espèces réactives de l'oxygène. Ils ont montré la présence d'un bactériophage capable de lyser la souche parentale de *P. aeruginosa* durant la destruction du biofilm. Le bactériophage était étroitement lié au phage Pf1 et existait en tant que prophage dans le génome de *P. aeruginosa*.

Les rhamnolipides semblent également importants pour former la cavité nécessaire à la dispersion, bien que ces observations n'aient pas été faites dans toutes les études menées (Kim et Lee 2016).

1.2 Régulation

D'après la littérature, il ne semble pas exister une régulation unique, mais plutôt plusieurs voies de régulation qui vont dépendre de l'environnement (sources de carbone, surface, pH, *etc.*) et peuvent être interconnectées. Le QS, le messager secondaire c-di-GMP, de petits acides ribonucléiques non codants (ARNnc), ainsi que d'autres facteurs sont impliqués dans la régulation du biofilm.

1.2.1 Quorum sensing

Le QS est défini comme un système de communication intercellulaire dépendant de la densité de population (Mion et *al.* 2019). Il permet aux bactéries d'adapter leur comportement en fonction de la taille de la population. Quand les bactéries atteignent un certain seuil de densité cellulaire, elles n'agissent plus comme un organisme solitaire mais comme une équipe et mutualisent leurs efforts de survie en synchronisant entre elles la régulation de gènes impliqués principalement dans la virulence ou la formation du biofilm (Mion et *al.* 2019).

Le QS correspond à une production et une sécrétion ou diffusion de molécules signal dans le milieu extérieur qui vont être accumulées à forte densité de population et interagir avec des récepteurs pour réguler la transcription de certains gènes.

P. aeruginosa possède quatre systèmes de QS que sont Las, Rhl, PQS et un dernier récemment découvert, QS intégré (IQS) (figure 7) (Kievit 2009; Lee et Zhang 2015; Lee et *al.* 2013). Les systèmes Las et Rhl comprennent un régulateur transcriptionnel, respectivement LasR et RhlR, une molécule signal de la famille des homosérines lactones (HSL), respectivement la *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL) synthétisée par la synthase LasI et la *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C₄-HSL) synthétisée par RhlI. Le système PQS est basé sur la molécule signal 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone, qui active le régulateur transcriptionnel PqsR. Le dernier système découvert, IQS (QS intégré) est basé sur le 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde, une molécule signal appartenant à une nouvelle classe. Le récepteur d'IQS est inconnu à l'heure actuelle.

Ces systèmes sont étroitement liés et interagissent entre eux (figure 7) (Lee et Zhang 2015). Ainsi Las qui contrôle les trois autres systèmes apparait en haut de la hiérarchie, tandis que Rhl se trouve en bas puisqu'il est sous le contrôle de Las et PQS. IQS semble quant à lui capable d'activer le système PQS dans certaines conditions chez les mutants *lasI* ou *lasR*. Cependant différentes études montrent que le réseau du QS ne semble pas montrer de hiérarchie immuable, celle-ci dépendant des facteurs environnementaux.

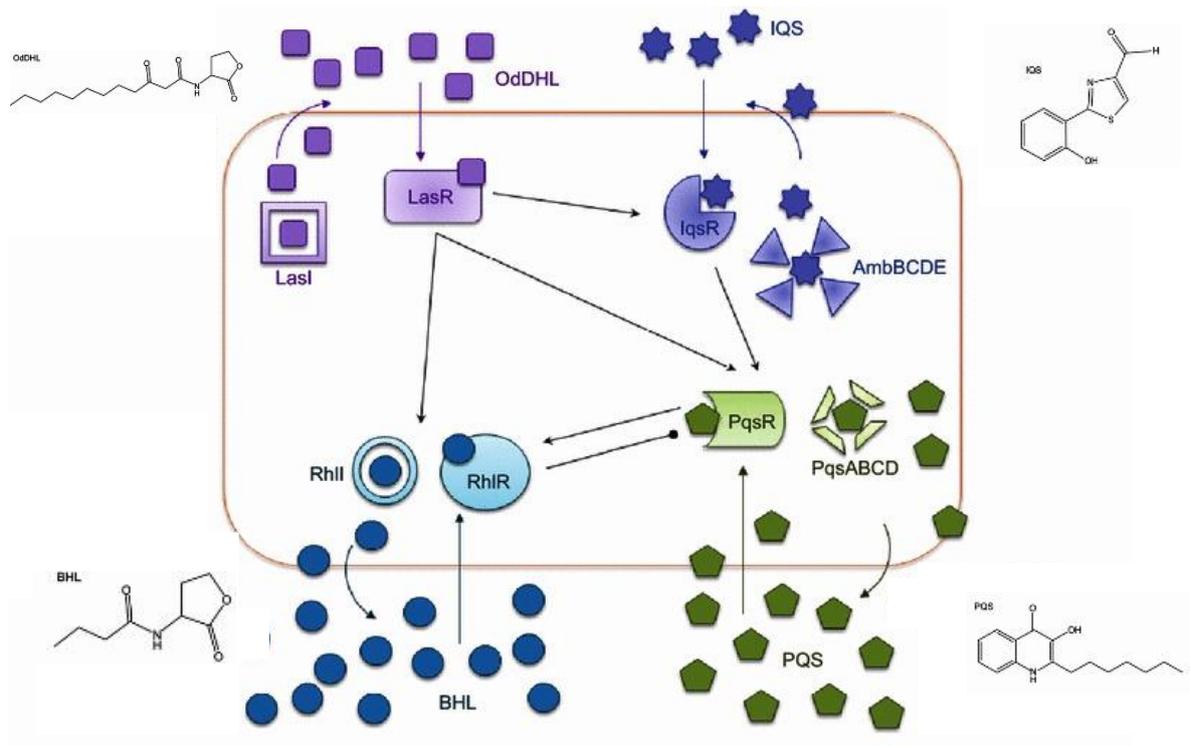


Figure 7 : Représentation schématique des 4 systèmes formant le QS chez *P. aeruginosa* et de leurs régulateurs. Le QS se compose de quatre systèmes : Las, Rhl, PQS et IQS. Pour plus d'informations, voir le texte. (Adapté de Lee et Zhang 2015)

D'après Alayande et *al.* (2018), le système Las serait impliqué dans l'initiation du biofilm, alors que le système Rhl jouerait un rôle dans la maturation du biofilm. En accord avec cette théorie, De Kievit et *al.* (2001) ont constaté que l'expression de *lasI* diminuait progressivement avec le temps alors que l'expression de *rhII* restait stable tout au long du développement du biofilm. De plus, au sein du biofilm, l'expression des gènes *lasI* et *rhII* était maximale dans les cellules situées au niveau de la surface et diminuait dans les couches supérieures du biofilm.

Le système Las et dans une moindre mesure le système Rhl sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse du polysaccharide Pel. Le système Rhl a également une importance dans la régulation du swarming/twitching et est essentiel à la production de rhamnolipides. Ainsi, le QS a notamment une importance dans la formation des structures 3D en forme de champignon (De Kievit 2009 ; Barken et *al.* 2008).

Le QS est également étroitement lié à la dispersion. Le système Las semble impliqué dans la dispersion du biofilm en régulant TpbA, qui entraînerait une déphosphorylation de TpbB ayant

pour conséquence son inactivation et la réduction de la concentration en c-di-GMP (Kim et Lee 2016). Le système Rhl va également agir sur la dispersion via son contrôle de la production des rhamnolipides (Kim et Lee 2016). Des études ont montré que le PQS induisait la mort cellulaire et la libération d'ADN dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Dong et al. 2008 ; Allesen-Holm et al. 2006). Allesen-Holm et al. (2006) proposent que l'ADNe provienne d'une lyse d'une sous-population bactérienne par un prophage induit par le PQS lors de la dispersion contrôlée (cf. 1.1.3 Dispersion (p16)). Cependant, ils rappellent que la libération d'ADNe peut provenir de VSM également sous le contrôle du PQS.

1.2.2 Di-guanosine monophosphate cyclique

La molécule de c-di-GMP est aujourd'hui reconnue comme un second messager bactérien universel (Römling et al. 2013). Elle est impliquée dans la régulation de nombreux mécanismes incluant le cycle cellulaire, la virulence, la motilité, ainsi que la formation et la dispersion du biofilm.

La molécule de c-di-GMP est synthétisée à l'aide des diguanylases cyclases (DGC) et dégradée avec des phosphodiesterases (PDE) (Römling et al. 2013) (figure 8). Les DGC et PDE sont composées d'au moins deux domaines communs : GGDEF-EAL. Les DGC avec leur domaine actif GGDEF permettent la synthèse du c-di-GMP en couplant deux molécules de GTP. Les PDE avec leur domaine EAL actif hydrolysent la molécule de c-di-GMP en 5'pGpG, qui est ensuite dégradée en 2pG par différentes enzymes.

Les facteurs environnementaux ou bactériens influent sur la concentration intracellulaire en c-di-GMP par l'intermédiaire de ces DGC et PDE, régulant ainsi de nombreux gènes via notamment des liaisons avec des effecteurs protéiques. Ces liaisons ont lieu grâce à des domaines présents chez les protéines qui peuvent être prédits comme le domaine PilZ, ou non prédits comme ceux des facteurs de transcription (Römling et al. 2013).

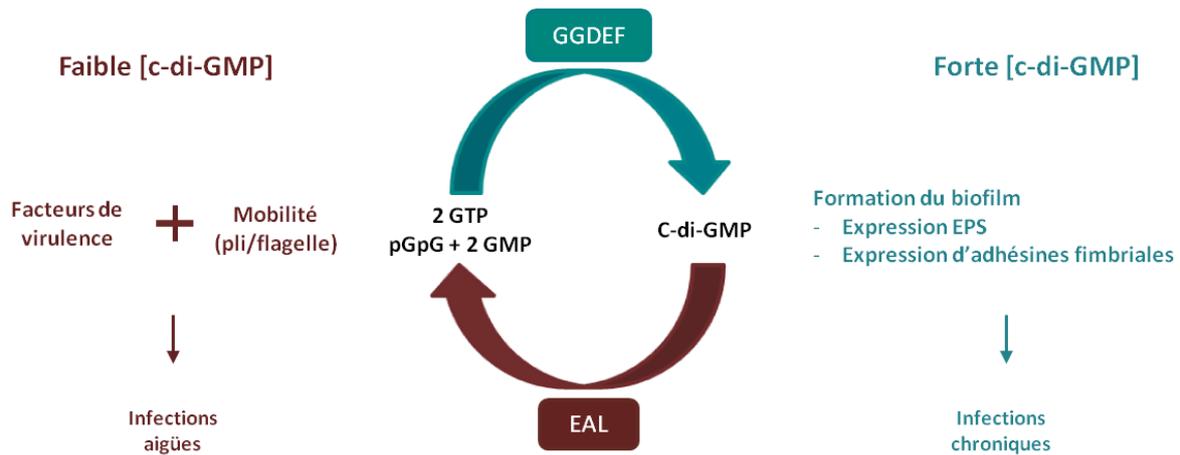


Figure 8 : Représentation schématisée de la régulation du mode de vie par la concentration en c-di-GMP chez *P. aeruginosa*. Une forte concentration intracellulaire de c-di-GMP, synthétisée par les DGC grâce à leur domaine GGDEF, va favoriser l'expression de gènes nécessaires à la formation du biofilm conduisant à des infections chroniques. Un faible taux intracellulaire de c-di-GMP, dégradé par les PDE grâce à leur domaine EAL, va favoriser l'expression de gènes nécessaires à la motilité et à la virulence de *P. aeruginosa* conduisant à des infections aiguës.

Afin de permettre l'adhésion irréversible, la concentration en c-di-GMP régule notamment le gène *sadB*, impliqué dans la fréquence à laquelle les cellules de *P. aeruginosa* adhèrent aux surfaces et s'en détachent. La protéine SadB contrôle la formation de biofilm et le swarming en contrôlant le taux d'inversions flagellaires et la production de Pel (Caiazza et al. 2007). Le niveau intracellulaire en c-di-GMP est contrôlé en amont par la DGC SadC (Kuchma et al. 2007 ; Merritt et al. 2007). La concentration en c-di-GMP contrôle également les systèmes Cup, excepté le système CupE. Le système CupA est régulé via les DCG YfiN, MorA et SiaD. Les systèmes CupB et CupC sont régulés par le système à trois composants Roc. Le système CupD est régulé par le système à deux composants PvrR (Römling et al. 2013).

Le développement du biofilm avec la production des composants de la matrice peut aussi être sous le contrôle de la concentration en c-di-GMP (Römling et al. 2013). Ainsi, la transcription des opérons *pel* et *psl* est régulée positivement via le système à deux composants WspL/WspA. Les signaux perçus par WspL peuvent provoquer une augmentation de la concentration en c-di-GMP, modifiant FleQ (Francis et al. 2017). Celui-ci réprime l'expression des gènes *pel* en absence de c-di-GMP et lorsqu'il se fixe au c-di-GMP, il change de conformation afin de devenir un activateur (Baraquet et al. 2012). La surproduction de Pel et

Psl par certaines souches dépendrait de la synthèse de c-di-GMP via la DCG TpbB. Chez *P. aeruginosa* PA14, la régulation post-traductionnelle de la synthèse de Pel implique les DGC RoeA, SadC ainsi que la PDE BifA. De plus, Psl élève la concentration en c-di-GMP via les DGC SiaD et SadD engendrant une boucle positive ainsi qu'une stimulation de l'expression des autres composants du biofilm (Römling et al. 2013).

Concernant l'alginate, un récepteur c-di-GMP de domaine PilZ nécessaire à la polymérisation et la production de l'alginate a été identifié, Alg44. La DGC MucR a également été identifiée comme un effecteur capable de contrôler la surproduction d'alginate chez certaines souches (Römling et al. 2013).

Afin de permettre la dispersion, la concentration en c-di-GMP diminue et favorise la motilité bactérienne et la perte d'adhérence en réduisant par exemple l'expression de l'opéron *pel* et des gènes codant des adhésines (Kim et Lee 2016). La concentration intracellulaire en c-di-GMP est alors contrôlée par plusieurs mécanismes. *P. aeruginosa* possède notamment le système BdlA, DipA, NicD, GcbA et RbdA (Kim et Lee 2016). Codée par le gène *bdlA* (biofilm dispersion locus), la protéine BdlA contient des domaines permettant de percevoir les conditions environnementales et d'y répondre (Morgan et al. 2006). Contrairement à la souche sauvage, aucune dispersion du biofilm n'a été observée chez le mutant *P. aeruginosa* $\Delta bdlA$ suite à l'ajout de différents agents comme le glutamate, le succinate, les sels d'argent ou le mercure, connus pour engendrer la dispersion du biofilm. De plus, le biofilm du mutant a montré une augmentation de la concentration en c-di-GMP. Morgan et al. (2006) émettent donc l'hypothèse que BdlA perçoit certains signaux environnementaux et engendre la dispersion du biofilm via une baisse de la concentration en c-di-GMP, conduisant à l'augmentation de la motilité et à la diminution de l'adhérence des bactéries. Cependant, BdlA ne possède pas de domaine typique permettant la modulation de la concentration en c-di-GMP, ce qui suggère une action indirecte de BdlA. Par la suite, deux phosphodiésterases, DipA et RbdA, permettant la baisse de concentration en c-di-GMP et interagissant avec BdlA, ont été identifiées (Roy et Sauer 2014). De plus, sous sa forme native, BdlA est inactive et nécessite des modifications post-traductionnelles. Deux facteurs entrent alors en jeu, NicD et GcbA. NicD est requis dans la dispersion du biofilm induite en réponse à des sources de

carbone incluant le glutamate, le succinate et le glucose alors que GcbA est impliqué dans la réponse aux nutriments, aux métaux lourds et à l'oxyde nitrique (Roy et Sauer 2014 ; Petrova et *al.* 2015). La phosphodiesterase NbdA réduit également la concentration en c-di-GMP en réponse à l'oxyde nitrique (Kim et Lee 2016).

La molécule de c-di-GMP, soumise à l'action de multiples régulateurs permettant l'intégration d'une variété de nombreux signaux extérieurs, joue donc un rôle central dans la régulation du biofilm.

1.2.3 Petits ARN non codants

De petits ARN non codants, de 50 à 400 nucléotides, ont montré leur capacité à induire des réponses rapides chez les bactéries. Ils peuvent jouer le rôle d'ARN anti-sens en s'appariant sur un ARN messenger (ARNm) cible ou bien interagir avec une protéine conduisant à sa séquestration (Pita et *al.* 2018). Chez *P. aeruginosa*, plusieurs ARNnc sont importants pour la régulation du biofilm (figure 9).

Les ARNnc RsmZ, RsmY et RsmW sont impliqués dans la répression de la protéine RsmA, qui est impliquée dans la régulation du biofilm. Cette protéine se lie aux motifs GGA dans l'extrémité 5' non codante des ARNm cibles. Cette fixation entraîne alors un défaut de traduction de ces ARNm, qui sont issus des gènes impliqués dans la production d'exopolysaccharides et dans le QS (Irie et *al.* 2010 ; Irie et *al.* 2018). Les ARNnc RsmZ et RsmY, dont les gènes sont sous le contrôle positif du système à deux composants GacA/GacS, ont une structure secondaire avec des motifs GGA qui permettent la séquestration de RsmA (Pita et *al.* 2018). Récemment, Bouillet et *al.* (2019) ont montré que l'expression de *rsmY* était dépendante du facteur sigma alternatif RpoS. L'ARNnc RsmW a également pour cible RsmA et est régulé en fonction des conditions nutritionnelles, du mode de vie en biofilm et de la température. Un site de fixation pour RpoH (σ^{32}), un facteur sigma de réponse au choc thermique, et un site de liaison reconnaissant les facteurs d'intégration de l'hôte qui répond à la température ont été identifiés. Le régulateur transcriptionnel RhlR du système Rhl (QS) agit comme répresseur sous des conditions de milieu minimum (Miller et *al.* 2016).

L'ARNnc ErsA, sous le contrôle du facteur sigma alternatif AlgU (σ^{22}) répondant aux stress de l'enveloppe, opère directement dans la régulation post-transcriptionnelle négative du gène *algC* qui code l'enzyme AlgC. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse de plusieurs exopolysaccharides de *P. aeruginosa* (Ferrara et al. 2015).

Récemment, l'importance du nouvel ARNnc SrbA a été montrée dans la formation du biofilm (Taylor et al. 2017). Une réduction de 66 % de la masse du biofilm a été observée avec le mutant *srbA*. Son mode d'action n'a pas encore été identifié.

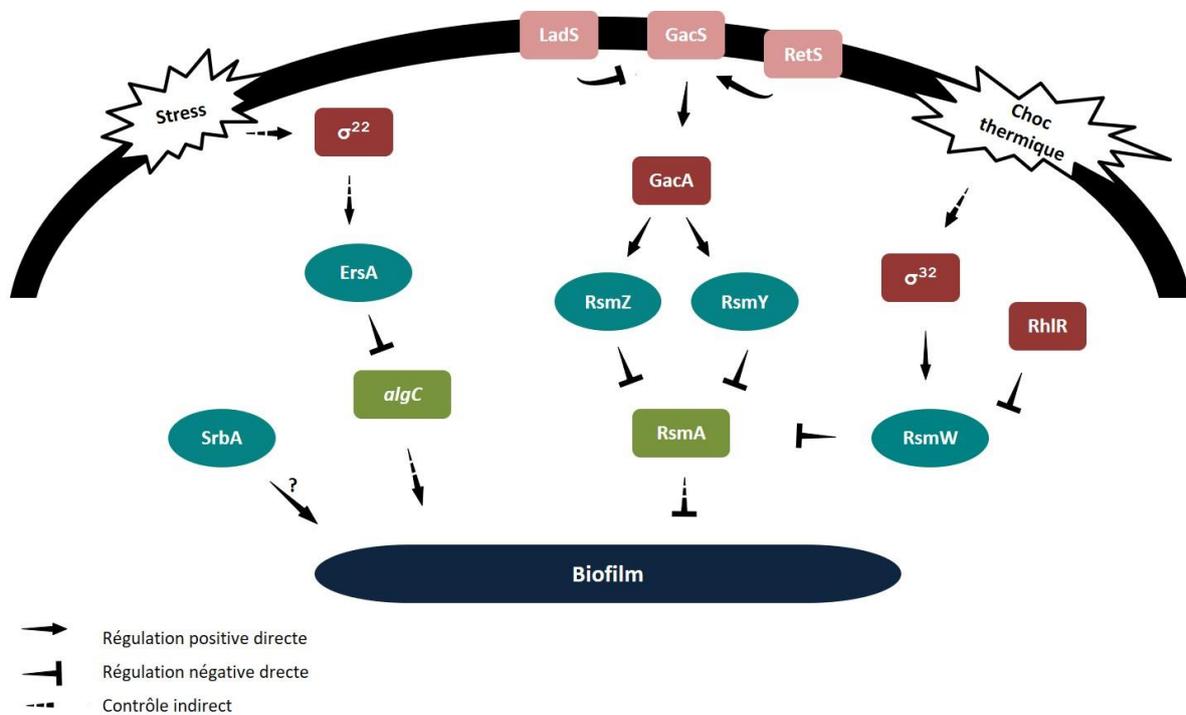


Figure 9 : ARNnc impliqués dans la régulation du biofilm de *P. aeruginosa*. Les ARNnc sont représentés dans les boîtes bleu clair. Les régulateurs directs sont représentés dans les boîtes rouge foncé et les régulateurs indirects dans les boîtes rouge clair. Les cibles sont représentées dans les boîtes vertes.

1.2.4 Autres

Parmi les autres systèmes régulant le biofilm figurent les systèmes à deux composants. Ils se composent généralement d'une protéine histidine kinase transmembranaire qui sert de senseur et qui, après réception d'un signal, s'autophosphoryle puis phosphoryle une protéine régulatrice intracellulaire qui va contrôler l'expression de gènes cibles (Zschiedrich et *al.* 2016).

Le système GacS/GacA agit comme un super régulateur du QS en contrôlant la synthèse des HSL et donc la production de facteurs de virulence contrôlée par les systèmes Las et Rhl. Il régule également la production de RsmZ et RsmY (figure 10) (Pita et *al.* 2018). Les histidines kinases RetS et LadS interagissent avec le système GacS/GacA en modulant la phosphorylation de GacS. RetS inhibe la phosphorylation de GacA alors que LadS la favorise (Rasamiravaka et *al.* 2015). Afin de contrôler la dispersion du biofilm par le QS, le système à deux composants BqsS-BqsR joue sur la production de C₄-HSL, du PQS et des rhamnolipides (Kim et Lee 2016).

Certains facteurs sigma alternatifs, sous-unités dissociables de l'ARN polymérase bactérienne, sont impliqués dans la régulation du biofilm. Les facteurs sigma sont responsables de la reconnaissance des promoteurs par l'ARN polymérase et jouent un rôle dans l'initiation de la transcription (Paget 2015 ; Kazmierczak et *al.* 2005). Ils se divisent en deux familles structurellement non liées, σ^{70} et σ^{54} . Les facteurs sigma appartenant à la famille σ^{70} reconnaissent des séquences promotrices consensus en -10 et -35 en amont du site d'initiation de la transcription et sont classifiés en quatre groupes liés à leur phylogénie et leur structure. Le premier groupe se compose des facteurs primaires (domestiques) qui assurent la transcription des gènes de ménage. Les groupes 2 à 4 se composent de facteurs sigma alternatifs qui contrôlent une grande variété de réponses adaptatives (phase stationnaire, choc thermique, *etc.*). Les activités et/ou abondances de ces facteurs sigma sont soumises à régulations. Parmi les facteurs sigma alternatifs, les facteurs sigma de fonction extracytoplasmique (ECF) constituent le groupe le plus abondant (Chevalier et *al.* 2019). Ils sont dans la plupart des cas séquestrés par des facteurs anti-sigma spécifiques répondant à

des stimuli à l'environnement. En cas de stress environnementaux ou de facteurs inducteurs spécifiques, des réseaux de signalisation entraînent la libération des facteurs sigma ECF qui deviennent ainsi actifs. La famille σ^{54} nécessite la présence d'un activateur protéique et de l'adénosine triphosphate (ATP) pour la formation d'un complexe ouvert ARN polymérase-ADN lors de l'initiation de la transcription. Ils reconnaissent des séquences promotrices en -12 et -24 en amont du site d'initiation de la transcription et leurs activateurs répondent à des signaux environnementaux.

Les systèmes Rhl et PQS sont dépendants de RpoN (σ^{54}) et sont donc régulés par les activateurs de transcription interagissant avec RpoN. Selon l'apport nutritionnel, ces derniers régulent positivement la transcription de *rhlI*, synthase du système Rhl, et modulent le fonctionnement de PqsR, régulateur du système PQS (Thompson et al. 2003 ; Cai et al. 2015). Bazire et al. (2010) ont montré que le facteur sigma AlgU ne régulait pas uniquement la production d'alginate, mais agit aussi de façon indirecte sur celle de Psl et des lectines LecA et LecB. Le facteur sigma RpoS, sous le contrôle d'HsbR et HsbA (décrit dans le paragraphe ci-dessous), favorise le mode de vie en biofilm puisqu'il active l'expression de *rsmY* qui entraîne la séquestration de la protéine RsmA (Bouillet et al. 2019).

Le système d'échange de partenaires HsbR/HsbA régule la formation de biofilm, plus particulièrement le passage d'un mode de vie à un autre (figure 10) (Bouillet et al. 2019). La protéine HsbR contient un domaine récepteur de la protéine HptB (Rec), un domaine phosphatase (PP2C) ainsi qu'un domaine kinase/anti-facteur sigma (K/AS). HsbA est un anti-anti-facteur sigma, c'est-à-dire un antagoniste de l'anti-facteur sigma. Si HsbR n'est pas phosphorylé, il phosphoryle HsbA via son domaine K/AS qui se fixe à la DGC HsbD. Il y a alors production de c-di-GMP qui induit la transcription du gène *rsmY*, et l'ARNnc RsmY séquestre la protéine RsmA, favorisant le mode de vie en biofilm. Si HsbR est phosphorylé, il déphosphoryle HsbA via son domaine PP2C. HsbA se fixe alors sur l'anti-facteur sigma FlgM qui libère le facteur sigma FliA conduisant à la production de flagelles et donc à la vie planctonique. De plus, comme expliqué dans le paragraphe ci-dessus, Bouillet et al. (2019) ont montré que le facteur sigma RpoS était sous le contrôle de HsbR/HsbA. Ils ont émis l'hypothèse que HsbR séquestre RpoS et le libère lorsque HsbA est phosphorylé.

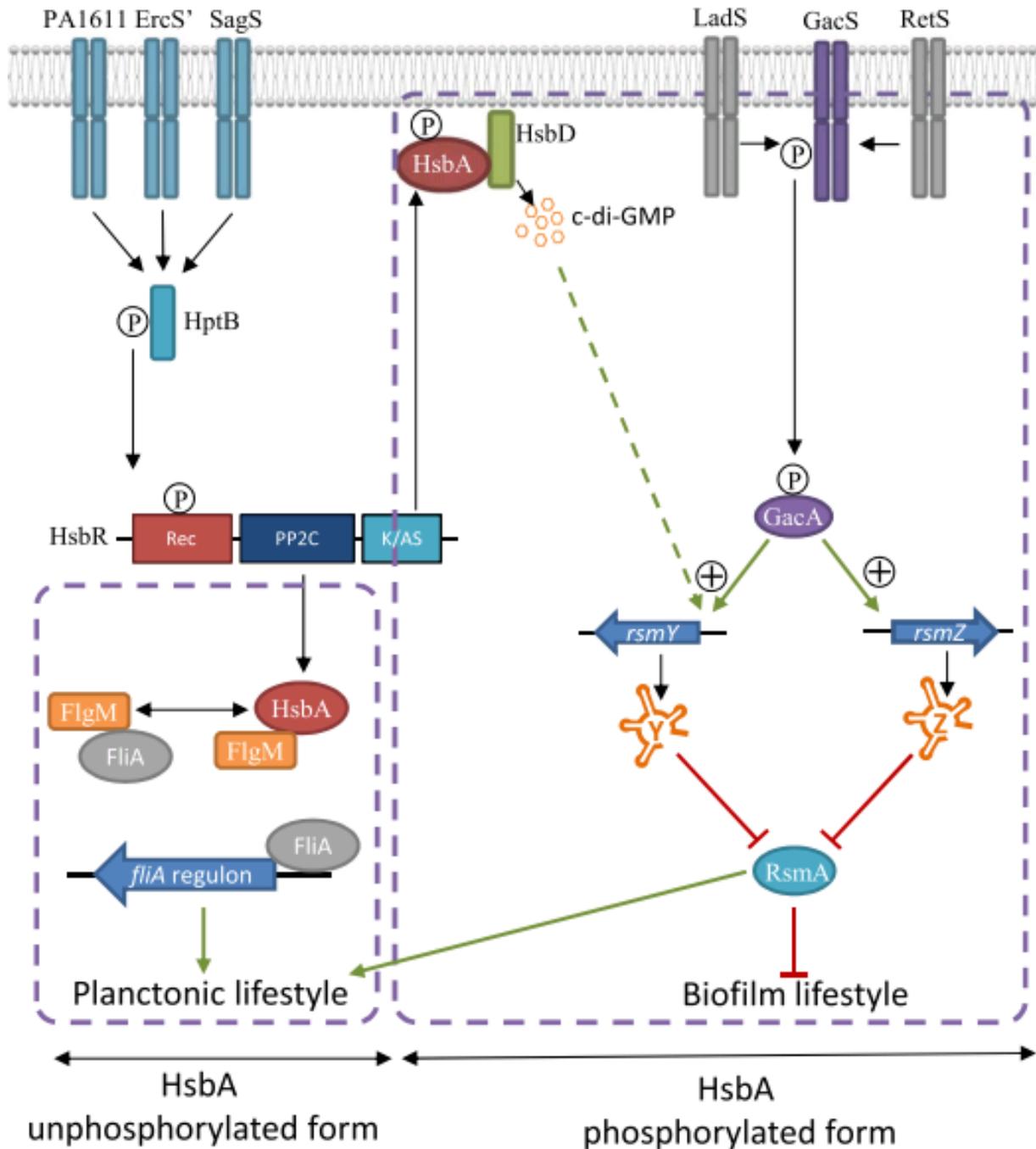


Figure 10 : Régulation du mode de vie par les systèmes HsbR/HsbA et GacS/GacA. La forme non phosphorylée de HsbR déclenche la phosphorylation de HsbA par son domaine kinase/facteur (A / KS). Une fois phosphorylé, HsbA se lie à la diguanylate cyclase de HsbD et déclenche la production de c-di-GMP qui induit *rsmY*. La production de RsmY induit la formation de biofilm par séquestration de RsmA. La forme phosphorylée de HsbR déclenche la déphosphorylation de HsbA par son domaine phosphatase (PP2C). Une fois déphosphorylée, HsbA lie le facteur anti- σ FlgM et déclenche la motilité de nage en libérant FliA. Lignes en pointillés : régulation indirecte probable. (Bouillet et *al.* 2019)

La réponse stringente, contrôlée par les enzymes RelA et SpoT qui synthétisent le messenger secondaire guanosine 5'-triphosphate-3'-diphosphate (ppGpp), est impliquée dans la formation de biofilm (Magnusson et *al.* 2005). Fuente-Núñez et *al.* (2014) ont montré que les mutations des gènes *relA* et *spoT*, bloquant la production de ppGpp, conduisaient à une réduction de la formation de biofilm. Xu et *al.* (2016) ont montré que les mutants *relA* et *spoT* réduisaient le niveau d'alginate et inhibaient le swarming ainsi que la formation de biofilm. Schafhauser et *al.* (2014) ont montré que ppGpp modulait le quorum sensing. Le double mutant *relA/spoT* présentait une concentration en PQS plus importante et une concentration en HSL réduite.

L'acide *cis*-2-décanoïque (*cis*-2-DA) a été identifié comme un autoinducteur de la dispersion. 666 gènes sont sous son contrôle, dont certains codant des protéines impliquées dans la motilité, l'attachement des cellules, la synthèse et sécrétion d'EPS (Marques et *al.* 2015). Cependant, le mécanisme complet de la transduction du signal n'est pas élucidé. Davies et Marques (2009) suggèrent que *P. aeruginosa* produit le *cis*-2-DA en continu durant le développement du biofilm et le sécrète. Cependant, lorsque les microcolonies atteignent une taille critique, la production de *cis*-2-DA entraîne une saturation de la sécrétion et donc une concentration nécessaire pour l'activation de la dispersion du biofilm.

Cette partie bibliographique révèle l'état des connaissances acquises sur le biofilm de *P. aeruginosa*. Ce mode de vie a été observé chez de nombreuses espèces bactériennes où des similarités, mais également de nombreuses différences ont été observées (Kostakioti et *al.* 2013 ; Hopley et *al.* 2015). La diversité dans la régulation, la composition et la structure du biofilm en fonction notamment des conditions environnementales, montre que ce mode de vie est complexe. Il est néanmoins le mode de vie majoritaire des bactéries. D'un point de vue général, toutes les études s'accordent à dire que les biofilms de pathogènes bactériens sont un réel problème pour la santé humaine, par la protection que ce mode de vie procure aux bactéries, notamment vis-à-vis des antibiotiques.

2. Problématique des biofilms

Les biofilms sont devenus un problème de santé publique. 80 % des infections humaines sont dues à des biofilms. Cela comprend tout d'abord les infections liées à la formation de biofilm au niveau des tissus épithéliaux, muqueuses et dents qui conduisent à des infections chroniques (urinaires, pulmonaires, caries, *etc.*). Le deuxième type d'infection est causé par la formation de biofilm sur des surfaces abiotiques telles que les sondes urinaires, les cathéters veineux, les tubes endotrachéaux (Roy et *al.* 2018). Un fait marquant concerne la résistance aux antibiotiques qui peut être jusqu'à 1000 fois supérieure pour les bactéries en biofilms comparée à celle des cellules planctoniques (Roy et *al.* 2018).

2.1 Tolérance et résistance des bactéries en biofilm

La tolérance et la résistance des bactéries aux antibiotiques en biofilm peuvent s'expliquer par de multiples facteurs (figure 11). La tolérance des biofilms aux antibiotiques fait appel à des déterminants physiques, physiologiques et génétiques. La résistance aux antibiotiques implique des mutations (Ciofu et Tolker-Nielsen 2019).

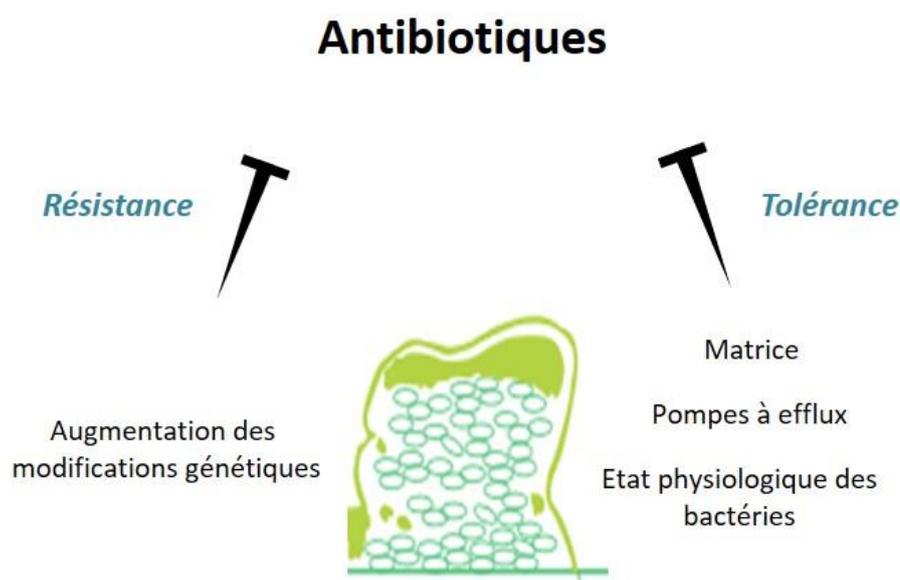


Figure 11 : Facteurs influençant la tolérance et la résistance aux antibiotiques des bactéries en biofilm.

Le premier facteur pouvant expliquer la tolérance aux antibiotiques est la présence de la matrice qui pourrait être considérée comme un frein à la diffusion des antibiotiques. Les antibiotiques chargés positivement, tels que les aminosides et les polypeptides qui se lient à des polymères matriciels de biofilm chargés négativement, ont une pénétration retardée à travers le biofilm (Olsen 2015). Sadovskaya et *al.* (2010) ont par exemple identifié des glucanes cycliques anioniques produits par *P. aeruginosa* capables de se lier à la kanamycine. Cependant, cette difficulté de pénétration de la matrice ne serait pas le facteur prédominant (Olsen 2015). Des études ont montré que les composants de la matrice, alginates, Psl, Pel et ADNe, possèdent également une importance dans la résistance aux antibiotiques de type aminoglycoside (Hentzer et *al.* 2001 ; Colvin et *al.* 2011 ; Billings et *al.* 2013 ; Ciofu et Tolker-Nielsen 2019). Le mécanisme responsable de la protection fournie par ces composants n'est pas encore totalement élucidé, mais ils pourraient à priori séquestrer les aminoglycosides qui sont chargés positivement. Wilton et *al.* (2015) ont montré que l'accumulation d'ADNe à l'intérieur des biofilms de *P. aeruginosa* et sur les sites d'infection pouvait acidifier l'environnement local et favoriser l'apparition du phénotype de résistance aux aminoglycosides. Pour ce faire, les bactéries induisent l'expression de l'opéron de résistance aux peptides antimicrobiens cationiques PA3552-PA3559 *via* les systèmes à deux composants PhoPQ et PmrAB.

Un autre phénomène pouvant expliquer l'augmentation de la résistance aux antibiotiques est l'état physiologique des microorganismes. En effet, le biofilm constitue un environnement hétérogène, ce qui implique que l'activité métabolique des bactéries l'est aussi. L'accès aux nutriments et à l'oxygène est restreint pour les bactéries présentes dans les couches internes du biofilm contrairement à celles présentes à la surface du biofilm. Werner et *al.* (2004) ont ainsi observé que la production de protéines, qui peut indiquer une croissance active, s'effectuait principalement chez les bactéries situées à l'interface biofilm/oxygène. L'activité métabolique des bactéries de la partie interne du biofilm va donc être plus faible conduisant à des cellules « dormantes » très résistantes aux antibiotiques appelées cellules persistantes (Lewis 2010). La plupart des antibiotiques ne peuvent agir que sur des bactéries avec une forte activité métabolique du fait de leur cible (réplication, transcription, traduction, synthèse de la

paroi cellulaire) (Olsen 2015). De plus, certaines populations actives métaboliquement peuvent développer une tolérance aux antibiotiques. Ainsi, Pamp et *al.* (2008) ont montré qu'une sous-population de cellules avec un métabolisme actif dans le biofilm de *P. aeruginosa* était capable de développer une tolérance à la colistine contrairement aux cellules avec un métabolisme ralenti. Cette adaptation est liée à une augmentation de l'expression des gènes *pmr* et *arn* conduisant notamment à la surexpression de la pompe à efflux MexAB-OprM.

D'autres pompes à efflux semblent d'ailleurs impliquées dans la résistance aux antibiotiques dans les biofilms (Alav et *al.* 2018). Les pompes à efflux sont capables d'exporter les antibiotiques hors de la cellule via un processus nécessitant de l'énergie dépendant du potentiel de membrane et de l'ATP. Elles peuvent être induites par différents stress qui sont souvent retrouvés dans les biofilms, comme un stress oxydatif pour la pompe MexXY-OprM (Ciofu et Tolker-Nielsen 2019). Zhang et Mah (2008) ont montré que les gènes codant le transporteur de type ABC PA1874-1877 chez *P. aeruginosa* sont plus fortement exprimés dans les cellules cultivées en biofilm et que les mutants dépourvus de ces gènes possèdent une sensibilité accrue à la tobramycine. Poudyal et Sauer (2018) ont par la suite montré que l'expression des gènes codant ce transporteur ainsi que ceux codant 6 autres transporteurs de type ABC était sous la régulation de l'activateur transcriptionnel BrlR. Ce régulateur, sous le contrôle du c-di-GMP, active aussi les pompes MexAB-OprM et MexEF-OprN. Une forte concentration en c-di-GMP, comme celle présente dans les biofilms, entraîne une augmentation de la production de BrlR et de l'expression des gènes codant les pompes MexAB-OprM et MexEF-OprN (Gupta et *al.* 2014).

D'après certaines études, une augmentation des modifications génétiques en biofilm pourrait conduire à l'acquisition de gènes de résistance par les bactéries (Yasir et *al.* 2018 ; Roy et *al.* 2018). Le stress oxydatif apporté par la croissance en biofilm semble entraîner une fréquence de mutation importante. Dans les cultures de biofilm de *P. aeruginosa*, il a ainsi été observé une fréquence de mutation plus de 100 fois supérieure à celle des cultures planctoniques. De plus, la proximité des cellules entre elles et la présence d'ADNe piégé dans la matrice semblent favoriser le transfert horizontal de gènes. Król et *al.* (2013) ont observé que la plupart des plasmides testés était transférée de façon plus fréquente en biofilm. Cependant, cette

hypothèse n'est pas vérifiée dans tous les cas. Ainsi, Seoane et *al.* (2011) ont montré que la conjugaison du plasmide pWW0 n'avait pas lieu chez les cellules sans activité métabolique de *Pseudomonas putida* et que le plasmide ne pouvait envahir les populations multicellulaires comme le biofilm dans sa globalité.

La vie en biofilm confère donc aux bactéries une tolérance et une résistance aux antibiotiques conduisant à une persistance lors d'infections. Elle impacte aussi l'activité d'autres agents antibactériens et le système immunitaire. Chez *P. aeruginosa*, la surproduction d'alginate semble protéger les bactéries en captant les espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules phagocytaires, en réduisant la chimiotaxie des leucocytes polymorphonucléaires et en inhibant l'activation du complément (Lyczak et *al.* 2002). Jones et Wozniak (2017) suggèrent que le polysaccharide Psl est également impliqué dans la résistance au système immunitaire, en protégeant *P. aeruginosa* de l'opsonisation et limitant ainsi la clairance bactérienne en présence de sérum. Jansen et *al.* (2017) ont montré que les rhamnolipides étaient capables de causer la nécrose des leucocytes polynucléaires neutrophiles. La recherche de stratégies antibiofilm est donc essentielle et fait l'objet de nombreux travaux.

2.2 Stratégies antibiofilm

A l'heure actuelle, aucun composé luttant spécifiquement contre les biofilms n'est commercialisé. Afin de traiter les biofilms, les antibiotiques peuvent être utilisés mais sont souvent inefficaces. Lorsqu'un biofilm s'est formé sur des dispositifs médicaux tels qu'un cathéter ou une sonde urinaire, l'équipement doit être retiré et remplacé par un nouveau, ce qui peut augmenter les chances d'une nouvelle infection (Roy et *al.* 2017). Différentes stratégies antibiofilm sont donc étudiées et deux approches sont classiquement rencontrées : la prévention et l'élimination du biofilm (figure 12). Quelques exemples sont cités ci-dessous.

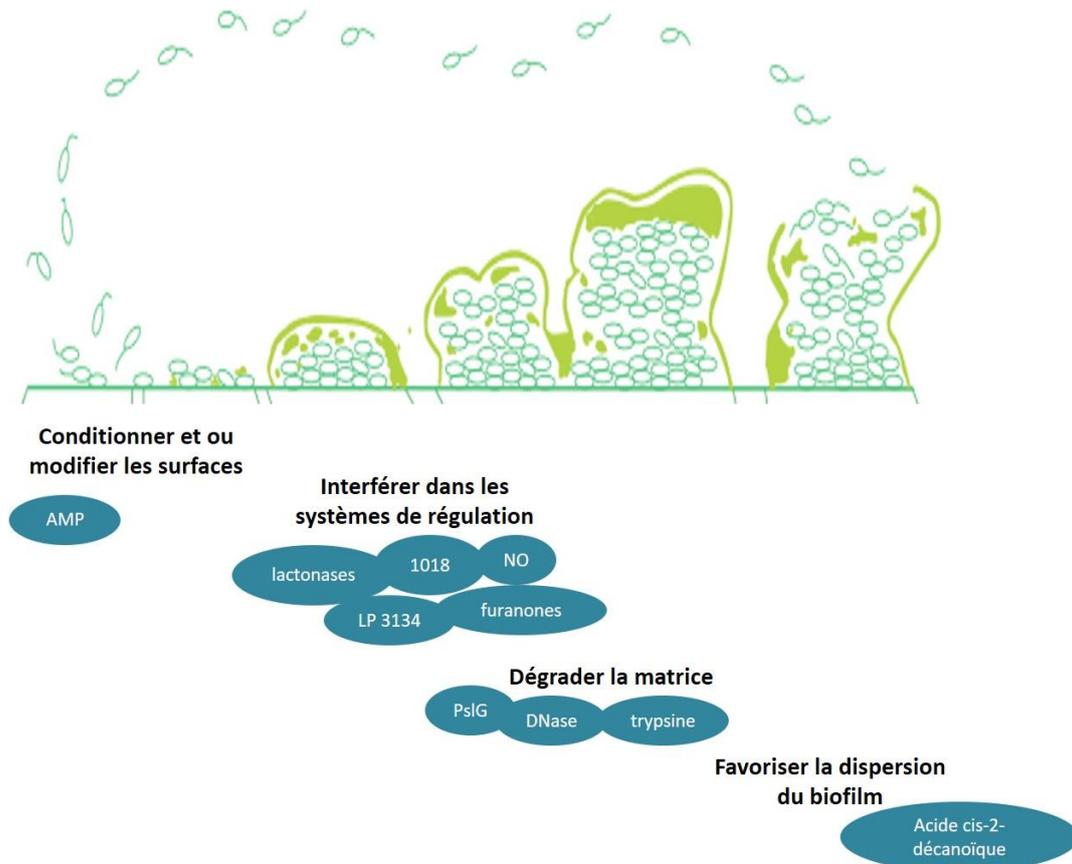


Figure 12 : Schéma représentatif des différentes stratégies antibiofilm. Quelques exemples de molécules à activité antibiofilm présentées dans la partie « stratégies antibiofilm » sont cités en dessous de la stratégie correspondante.

Pour prévenir la formation du biofilm, l'adhésion des bactéries à une surface est une cible de choix. La surface peut être modifiée afin de lui donner des propriétés physico-chimiques réduisant l'adhésion (Li et Lee 2017). La surface peut également être conditionnée avec des nanoparticules d'argent, des antioxydants ou des peptides antimicrobiens (AMP) réduisant la formation de biofilm (Li et Lee 2017 ; Glinel et *al.* 2012).

Les AMP sont des oligopeptides de 5 à 100 résidus d'acides aminés sécrétés par de nombreux organismes vivants pour se protéger des microorganismes envahisseurs (Glinel et *al.* 2012). Ils ont des structures très différentes mais possèdent des caractéristiques communes. Ils sont en majorité cationiques, c'était d'ailleurs un concept jusqu'en 1997 où des AMP anioniques ont été découverts, et amphiphiles. Ils sont généralement subdivisés en quatre groupes : les AMP α -hélicoïdaux, les AMP à feuillet β , les AMP étendus et les AMP mixtes (figure 13) (Mahlpuu et *al.* 2016).

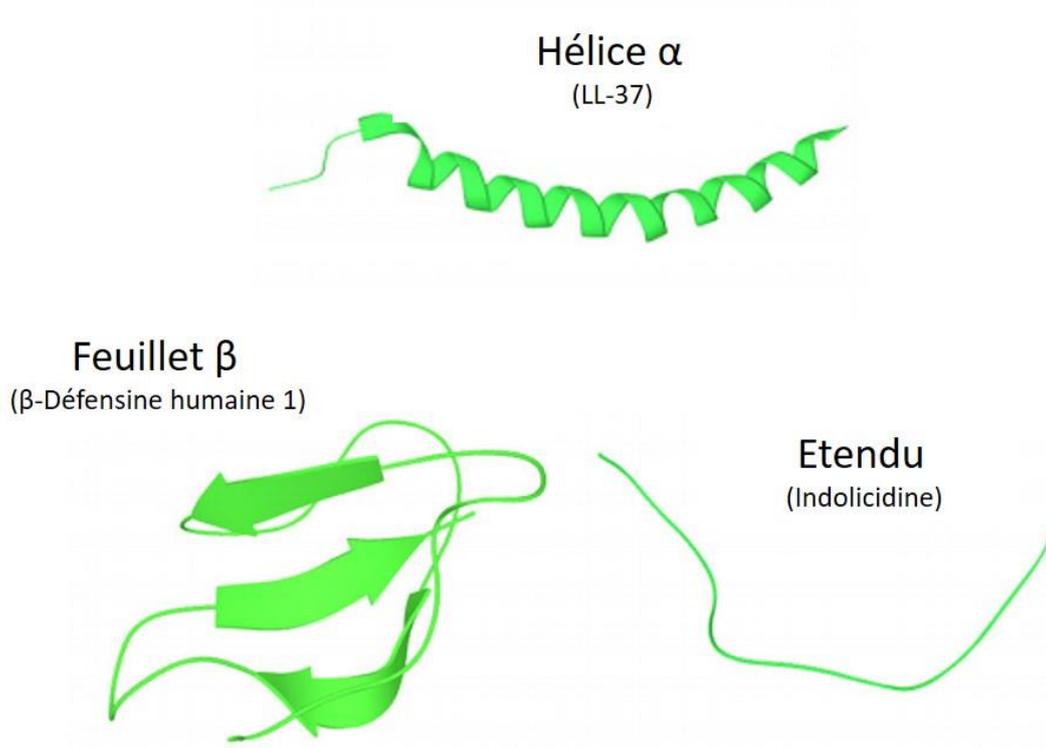


Figure 13 : Structures secondaires des AMP. LL-37 représente les peptides α -hélicoïdaux, la β -défensine humaine 1 représente les AMP à feuillets β , l'indolicidine représente les peptides étendus. Les structures proviennent de la base de données de protéines in Europe (PDB id codes 2k6o, 1kj5 et 1g89). (Mahlapuu et *al.* 2016)

Naturels ou synthétiques, les AMP sont principalement connus pour leur action antibactérienne en interférant avec la membrane plasmique via leur charge positive et leur caractère amphiphile, en inhibant la synthèse d'ADN, d'ARN ou de protéines (voir revues Bahar et Ren 2013 ; Mahlapuu et *al.* 2016 ; Yeaman et Yount 2003). Cependant certains sont également actifs contre le biofilm en prévenant la colonisation de surfaces, tuant les bactéries à l'intérieur du biofilm et modifiant la structure du biofilm (Yasir et *al.* 2018). Les AMP naturels souffrent cependant d'une faible biodisponibilité, d'une faible stabilité protéolytique et, pour certains, d'une toxicité. Des modifications ont donc été apportées afin de développer des analogues synthétiques possédant les propriétés des AMP sans en présenter les inconvénients (Glinel et *al.* 2012).

Cependant, la surface conditionnée présente le désavantage de pouvoir s'éroder rapidement et donc de redevenir disponible pour la formation de biofilm (Roy et *al.* 2018).

Afin d'éliminer un biofilm formé, cibler la régulation du biofilm peut être une solution. Beaucoup de recherches s'orientent vers la perturbation du QS, nommée quorum quenching (QQ). Des molécules avec différents modes d'action ont été identifiées. Les HSL peuvent être dégradées ou modifiées par des enzymes. Trois classes ont été identifiées, les lactonases (hydrolysant des lactones), les acylases (hydrolysant des acyles) et les oxydases/oxydoréductases (oxydoréduction) (Uroz et al. 2009). Des analogues structuraux des molécules du QS peuvent également permettre la dispersion du biofilm. Les furanones, produites par l'algue rouge *Delisea pulchra*, sont des analogues des HSL qui inhibent le QS en se liant sur les régulateurs du QS, au niveau de leur site de fixation des HSL. Elles semblent également pouvoir favoriser la dégradation des récepteurs de type LuxR ou diminuer la liaison entre l'ADN et LuxR (Zhang et Li 2016). Calfee et al. (2001) ont montré qu'un analogue de l'anthranilate, précurseur du PQS, réduisait la production du PQS et conduisait à la baisse de pathogénicité de *P. aeruginosa*.

Le QQ semble donc être une stratégie intéressante. Cependant, García-Contreras et al. (2013) mettent en garde sur la résistance au QQ que les bactéries peuvent acquérir, comme c'est le cas actuellement pour les antibiotiques. Ainsi, Maeda et al. (2012) ont montré que *P. aeruginosa* pouvait acquérir une résistance à la furanone bromée C-30 par mutation des gènes *mexR* et *nalC*, qui codent des répresseurs de l'opéron *mexAB-oprM*, conduisant à un efflux de la furanone plus important. De plus, le QQ ne permet pas la clairance bactérienne et peut engendrer une augmentation de la virulence des bactéries libérées du biofilm. Les molécules perturbant le QS sont donc souvent couplées à des antibiotiques afin d'éliminer totalement les pathogènes de leur milieu (Estrela et Abraham 2010).

Le QS n'est pas le seul mécanisme de régulation du biofilm. Ainsi, la concentration intracellulaire en c-di-GMP peut être modifiée et conduire à la dispersion du biofilm. Sambanthamoorthy et al. (2014) ont identifié quatre petites molécules par criblage *in silico*, LP 3134, LP3145, LP 4041 et LP 1062, capables d'inhiber les DGC en se fixant sur leur site catalytique, et ainsi de prévenir la formation du biofilm et de favoriser sa dispersion lorsqu'il est établi. La concentration en c-di-GMP peut également être diminuée de façon indirecte par certaines molécules, comme l'oxyde nitrique. Ainsi, l'ajout de générateurs de NO comme le

nitroprussiate de sodium engendre une baisse du c-di-GMP via BldA (cf. 1.2.2 Di-guanosine monophosphate cyclique (p20)) et la dispersion du biofilm (Barraud et *al.* 2006).

La réponse stringente via ppGpp est également une cible intéressante (Fuente-Núñez et *al.* 2014). Pletzer et *al.* (2017) ont montré que les peptides synthétiques 1018 et DJK-5 sont de bons candidats pour éradiquer les biofilms. Ces peptides se lient au ppGpp et entraînent sa dégradation. Les auteurs suggèrent qu'ils régulent négativement l'expression de la sous-unité ω de l'ARN polymérase et *spoT* conduisant à une baisse de production de ppGpp.

Une autre stratégie pour éliminer le biofilm est de dégrader les composants de la matrice. La matrice se compose de polysaccharides, d'ADNe et de protéines. Trois types d'enzymes ont donc été testés : les enzymes dégradant les polysaccharides, les nucléases et les protéases. Yu et *al.* (2015) ont étudié l'endoglycosidase PslG et montré qu'un traitement exogène prévenait la formation de biofilm et était capable de désassembler le biofilm de nombreuses espèces de *Pseudomonas* en hydrolysant Psl. La désorganisation de la matrice composée de Psl conduit à la dispersion des bactéries et à une meilleure activité des antibiotiques et des macrophages. Les alginates lyases ont aussi été étudiées pour favoriser la diffusion des aminoglycosides et pour le développement d'un traitement chez les patients atteints de mucoviscidose (Hatch et Schiller 1998 ; Islan et *al.* 2014). Plusieurs études ont montré que la désoxyribonucléase I (DNase I) était capable de dégrader l'ADNe présent dans la matrice, conduisant à l'inhibition de la formation du biofilm et à la perturbation de biofilms précoces formés par diverses espèces bactériennes. Afin de dégrader les protéines de la matrice, des protéases telles la protéinase K et la trypsine se sont également montrées efficaces (Li et Lee 2017).

Enfin, une dernière stratégie est d'induire la dispersion des cellules du biofilm. L'ajout de *cis*-2-DA, qui a été identifié comme un autoinducteur de la dispersion (cf. 1.2.4 Autres (p25)), engendre une dispersion du biofilm de plusieurs pathogènes dont *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Davies et Marques 2009). Les surfactants chimiques comme le tween 80 et biosurfactants comme les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* ont également une action antibiofilm de par leur propriété tensioactive (Li et Lee 2017).

La co-administration d'antibiotiques avec des molécules antibiofilm constitue une stratégie intéressante qui permettrait de diminuer les concentrations en antibiotiques utilisées actuellement. Il serait intéressant de développer ces molécules antibiofilm, comme les AMP par exemple, en tant qu'adjuvant pour les antibiotiques ainsi qu'en thérapie antibiofilm autonome (Pletzer et *al.* 2016). Cependant, les travaux menés actuellement sur la synergie molécules antibiofilm/antibiotiques se limitent souvent au stade planctonique, comme c'est le cas pour les AMP, et elle nécessite d'être développée sur son effet contre les biofilms (Grassi et *al.* 2017). Mansour et *al.* (2015) ont néanmoins montré que le peptide 1018 présentait une synergie avec des antibiotiques conventionnels pour prévenir la formation de biofilm et traiter le biofilm préformé.

Les stratégies antibiofilm sont donc diverses et peuvent avoir recours à des molécules synthétiques ou naturelles et de différentes natures : polysaccharidique, glyco-lipidique, lipidique ou bien peptidique (Rendueles et *al.* 2013 ; Rabin et *al.* 2015). Afin de trouver de nouvelles molécules naturelles, il faut explorer de nouveaux horizons. La biodiversité marine est encore peu connue et représente une source potentiellement importante de composés actifs naturels. En effet, les bactéries présentes dans les environnements marins sont soumises à des conditions extrêmes de température, de salinité ou à de faibles concentrations en nutriments et ont ainsi une capacité importante à produire des composés afin de survivre et proliférer (De Carvalho et Fernandes 2010). Les bactéries d'origine marine du genre *Pseudoalteromonas* sont connues pour posséder des activités biologiques de type antimicrobienne, antifouling ou encore algicide (Bowman 2007). Elles représentent des modèles d'études de choix pour la recherche de nouvelles molécules antibiofilm.

2.3 Focus sur les molécules antibiofilm produites par le genre *Pseudoalteromonas*

Le genre *Pseudoalteromonas* est un groupe de bactéries marines appartenant à l'ordre *Alteromonadales* et à la classe γ -*Proteobacteria*. À l'origine, de nombreuses espèces de *Pseudoalteromonas* étaient membres du genre *Alteromonas* avant que Gauthier et al. (1995) ne le réorganisent sur la base d'une analyse phylogénétique et proposent le nouveau genre *Pseudoalteromonas*. A l'heure actuelle, 57 espèces sont associées à ce genre (NCBI taxonomy Browser).

Les bactéries appartenant au genre *Pseudoalteromonas* sont des bacilles à Gram négatif motiles via des flagelles polaires et/ou latéraux et possédant un métabolisme chimiohétérotrophe strictement aérobie (Bowman 2007). La plupart des souches de *Pseudoalteromonas* a été isolée à partir d'animaux et d'algues et n'est pas considérée comme pathogène (Casillo et al. 2017 ; Offret et al. 2016). Ces souches sont même considérées comme un partenaire clé de l'holobionte, mutualisme ou commensalisme de l'hôte et de son microbiote, des invertébrés marins de par leur capacité à produire de nombreux métabolites (Offret et al. 2016).

2.3.1 Activité antibactérienne et antibiofilm

Depuis quelques années, des activités antibactériennes et algicides de certaines espèces de *Pseudoalteromonas* ont été mises en évidence. La production d'agarases, toxines, substances bactériolytiques et autres enzymes semble favoriser la compétition entre microorganismes et procurer une protection à la souche productrice pour une meilleure colonisation des surfaces (Holmström et Kjelleberg 1999). Plus récemment, Offret et al. (2016) ont recensé 69 métabolites antibactériens provenant de souches de *Pseudoalteromonas*, ce qui en fait un des genres bactériens marins possédant la plus grande chimio-diversité de composés antimicrobiens. Ces derniers se composent principalement d'alcaloïdes, mais également de

polycétides, métabolites secondaires synthétisés par les synthases polycétides, et de peptides. Ils se montrent actifs contre des bactéries à Gram négatif comme positif.

Certaines molécules antibactériennes présentent une activité antibiofilm à une concentration sub-inhibitrice.

Pseudoalteromonas tunicata D2 produit pendant sa phase stationnaire la protéine sécrétée AlpP pour « autolytic protein *Pseudoalteromonas* » (Desriac et al. 2018). Cette protéine de 190 kDa se compose de deux sous-unités de 60 et 80 kDa. Le gène *alpP* code la sous-unité de 80,9 kDa. Il semble que la deuxième sous-unité provienne de ce même gène mais que sa transcription subisse une terminaison précoce ou que la protéine soit clivée après la traduction. AlpP a un rôle important dans la maturation du biofilm et dans sa dispersion en jouant sur la viabilité des cellules des microcolonies via le peroxyde d'hydrogène généré par l'activité d'acide oxydase d'AlpP. Pour Mai-Prochnow et al. (2004 et 2006), AlpP permet la dispersion des cellules vivantes ayant une activité métabolique soutenue et des variations phénotypiques (croissance, motilité, formation de biofilm) assurant ainsi la survie et la colonisation de *P. tunicata* dans l'environnement.

Une autre souche, *Pseudoalteromonas* sp. IBRL PD4.8, possède une activité antibiofilm semblant provenir des propriétés tensioactives d'un acide gras polyinsaturé, l'acide 4,7,10,13-hexadécatétraénoïque. Son action a notamment été démontrée contre des biofilms de *V. alginolyticus* FB3 en formation ou déjà établis (Supardy et al. 2019).

La plupart des composés identifiés comme antibiofilm concerne en réalité des composés antimicrobiens. Les molécules à activité antibiofilm sans activité bactéricide ou bactériostatique sont peu décrites, cependant certaines ont été identifiées. Ainsi, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 sécrète un acide gras à longue chaîne qui perturbe le biofilm de *Staphylococcus epidermidis*. D'après les premiers résultats, il interférerait avec le système autoinducteur-2 (Casillo et al. 2017). Klein et al. (2011) discutent de l'activité antibiofilm de deux souches, *Pseudoalteromonas* sp. D41 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Ces deux souches sécrètent un composé protéique avec une activité antibiofilm sans activité

bactéricide, cependant l'exoproduit est différent. Une protéine de 100 kDa est responsable de l'activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. D41, alors que chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 elle semble provenir d'une protéine de faible poids moléculaire d'une dizaine de kDa. L'étude menée sur l'activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 est présentée dans le chapitre suivant.

2.3.2 Activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

Pseudoalteromonas sp. 3J6 a été isolée en 2000 dans le Golfe du Morbihan (France) sur une lame de verre immergée pendant 6 h à 1 m de profondeur (Grasland et al. 2003).

Lors d'une étude portant sur le comportement de bactéries marines en biofilm bi-espèces, il a été montré que la prolifération en biofilm des souches *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01 était inhibée en présence de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Cependant, aucun impact sur le développement des bactéries lors de co-cultures liquides n'avait été observé. *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a donc une activité spécifiquement antibiofilm (Dheilly et al. 2010).

Afin de mieux comprendre cette activité, le surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (SN_{3J6}), obtenu après une nuit de culture en VNSS à 20°C, a été mis en contact avec les bactéries présentant une sensibilité. Une diminution de la formation de biofilm a été observée lorsque SN_{3J6} était mis en contact avec les souches cibles au moment de l'adhésion ou lorsque que la lame de verre utilisée pour la formation de biofilm était préconditionnée pendant 2 h sans flux avec ce SN_{3J6} (figure 14) (Dheilly et al. 2010). *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sécrète donc au moins une molécule antibiofilm.

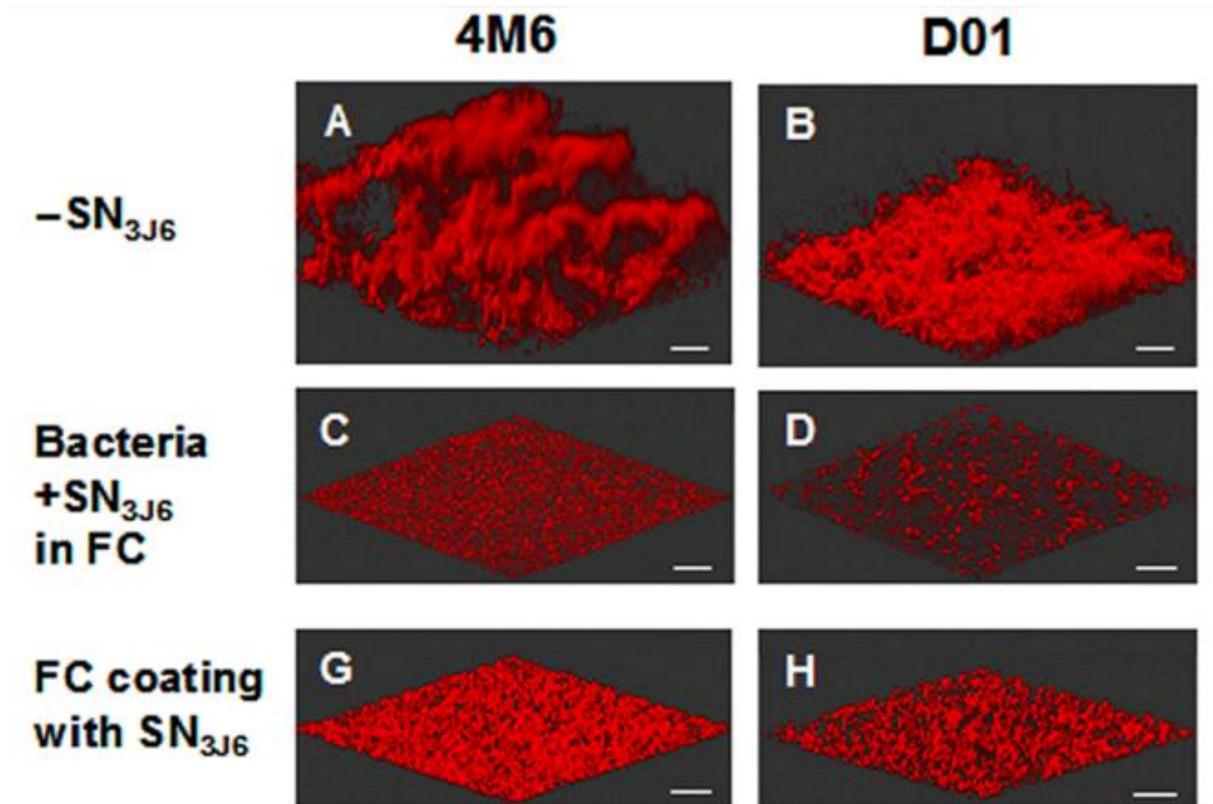


Figure 14 : Activité antibiofilm de SN_{3J6} sur les biofilms formés par *Paracoccus* sp. 4M6 et *Vibrio* sp. D01. (A à D) L'adhésion a été réalisée en absence (A et B), en présence (C et D) de SN_{3J6} ou avec une surface préalablement conditionnée par SN_{3J6} (G et H). Les biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 (droite) et *Vibrio* sp. D01 (gauche) ont ensuite été observés au microscope confocal à balayage laser après 48 h de croissance sous un flux de VNSS. Les bactéries ont été marquées avec du Syto61. Barres, 30 μ m. (Dheilly et al. 2010)

SN_{3J6} s'est montré actif contre 13 des 18 bactéries marines à Gram négatif testées (Klein et al. 2011). La majorité des souches non sensibles appartenait au genre *Pseudoalteromonas*, suggérant une résistance des souches productrices, bien que certaines souches appartenant à ce genre aient présenté une sensibilité. L'activité antibiofilm a également été testée sur des bactéries pathogènes pour l'homme, notamment des souches cliniques de *P. aeruginosa* isolées d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Dheilly et al. 2010 ; Simon 2015). Les biovolumes des biofilms des souches *P. aeruginosa* MUC-N1 et MUC-N2 diminuaient respectivement de 88 % et 96 % après 24 h d'incubation dans des chambres à flux (figure 15) (Simon 2015).

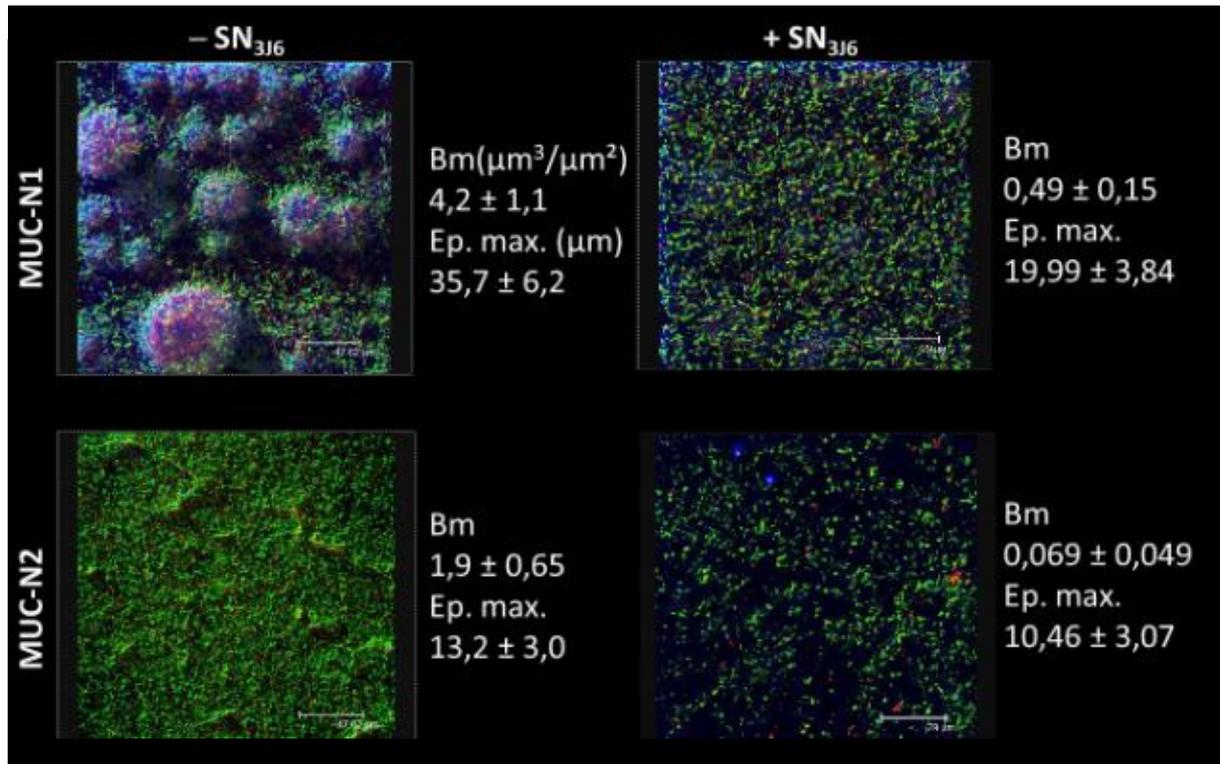


Figure 15 : Activité du SN_{3J6} sur les biofilms formés par *P. aeruginosa* MUC-N1 et MUC-N2. L'adhésion a été réalisée en présence (droite) ou en absence du SN_{3J6} (gauche). Les biofilms ont été observés au microscope confocal à balayage laser après 24 h de croissance en présence d'un flux de LB (2,5 ml/h). Les bactéries ont été marquées avec du Syto9, les β -polysaccharides avec le calcofluor white et les ADNe avec le DDAO. Bm : Biovolume en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$; Ep. max : Épaisseur maximale en μm (Simon 2015).

La culture de biofilms était réalisée sur lame de verre en chambres à flux (FC) de la façon suivante : une étape d'adhésion de 2 h sans flux était suivie par l'étape de développement du biofilm pendant 48 h sous un flux de milieu de culture (Dheilly et al. 2010). Pour éviter de consommer de trop grands volumes de SN_{3J6}, celui-ci était utilisé uniquement lors de l'étape d'adhésion des bactéries. L'activité antibiofilm de SN_{3J6} a aussi été observée en conditionnant la lame de verre par SN_{3J6} durant 2 h sans flux avant l'ajout des bactéries pour l'étape d'adhésion. Aucune inhibition suffisante de l'adhésion de différentes bactéries sensibles (à l'exception de *Vibrio tapetis* CECT4600 (Rodrigues et al. 2015)) n'avait été observée pour expliquer le défaut de la formation de biofilm (Klein 2011). De plus, l'ajout de SN_{3J6} était capable de perturber un biofilm préformé de *Vibrio tapetis* CECT4600. Des différences au niveau de l'action antibiofilm sur les souches cibles marines ont été observées et cinq classes de sensibilité au SN_{3J6} ont été définies (tableau 1) (Dheilly et al. 2010).

- Classe 1 : Incapacité à former un biofilm ; viabilité cellulaire extrêmement réduite après 48 h ;
 Classe 2 : Formation du biofilm fortement réduite ; diminution forte de la viabilité cellulaire ;
 Classe 3 : Formation du biofilm fortement ou modérément réduite ; viabilité cellulaire non affectée ;
 Classe 4 : Formation du biofilm non affectée ; viabilité cellulaire diminuée ;
 Classe 5 : Formation du biofilm non affectée ; viabilité cellulaire non affectée.

Tableau 1 : Caractéristiques des biofilms formés par les différents groupes de bactéries sensibles au SN_{3J6}.

Classe et souche	Épaisseur max (µm)*		Biovolume (µm ³ /µm ²)*		Cellules non viables (%)*	
	- SN _{3J6}	+ SN _{3J6}	- SN _{3J6}	+ SN _{3J6}	- SN _{3J6}	+ SN _{3J6}
1 <i>Algibacter</i> sp. 1M6	44,6	7,4	15,9	0,03	0,4	89
2 <i>Paracoccus</i> sp. 4M6	95,0	13,2	6,1	0,88	1,2	100
<i>Vibrio</i> sp. D01	45,2	16	14,2	0,68	13	78
<i>Colwellia</i> sp. 4J3	28,7	11,3	5,9	0,27	25	97
3 <i>Sulfitobacter</i> sp. 8J6	14,4	9,0	2,0	0,66	29	8,9
<i>Vibrio</i> sp. D66	122	46,8	15,2	1,9	3,7	2,5
4 <i>Alteromonas</i> sp. 1J3	14,5	16,9	3,2	2,9	8,5	80
5 <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J3	10,4	14,5	3,9	3,7	46	36
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. D41	11,8	10,2	2,1	1,9	0,6	12,2

* Les analyses COMSTAT ont été réalisées sur trois expériences indépendantes, et les écarts standards étaient inférieurs à 10 % dans chaque cas.

Pour envisager une potentielle utilisation thérapeutique du ou des composés antibiofilm du surnageant de culture (SN), la toxicité du SN_{3J6} a été étudiée sur plusieurs modèles. SN_{3J6} n'a pas induit de mortalité chez la souris et le nématode *Caenorhabditis elegans*. Aucune réponse inflammatoire dans les poumons des souris, ainsi qu'aucun effet cytotoxique sur les cellules pulmonaires humaines de la lignée cellulaire A549 n'ont été observés. De plus, il n'a pas augmenté la production des facteurs de virulence testés chez *P. aeruginosa* (pyocyanine, pyoverdine et cyanure d'hydrogène) (Simon 2015). Il semble donc que la molécule présente dans SN_{3J6} soit un bon candidat pour être utilisé comme composé antibiofilm.

Afin d'identifier la molécule active, des essais de purification ont été réalisés. Ils amènent à penser que la molécule active est de nature peptidique. En effet, après traitement à la protéinase K, SN_{3J6} ne présentait plus d'activité (Klein et *al.* 2011). Une purification sur colonne C18 par extraction en phase solide (SPE) a été réalisée. La fraction active, lors d'une élution avec 50 % d'acétonitrile, a été analysée par électrophorèse en condition dénaturante. Une protéine d'environ 13 kDa a été détectée. Après extraction et analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF (désorption-ionisation laser assistée par matrice – ionisation en fonction du temps de vol), des séquences peptidiques ont été obtenues. Le récent séquençage du génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a révélé une séquence codant une protéine contenant les séquences peptidiques identiques à celles déterminées par MALDI-TOF/TOF (figure 16). La protéine a été nommée altérocine et le gène *alt*.

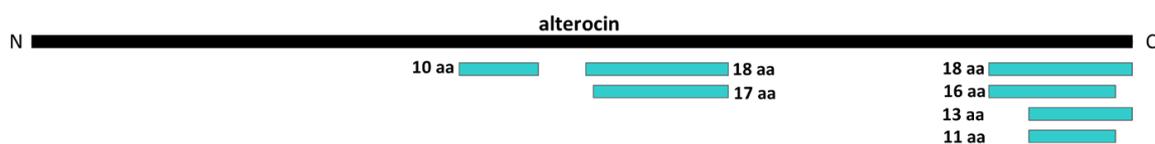


Figure 16 : Correspondance entre de l'altérocine (boite noire) et les séquences peptidiques obtenues par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF/TOF après digestion du peptide observé sur gel par SDS-PAGE (boites bleues).

Objectifs de l'étude

Le biofilm pose un problème de santé publique qui nécessite de trouver des stratégies de lutte. L'une d'entre elles serait de coupler une molécule antibiofilm à un antibiotique afin de désorganiser le biofilm dans un premier temps et ainsi de faciliter la clairance bactérienne par les antibiotiques dans un second temps. Il est donc nécessaire de trouver des molécules antibiofilm. Le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines a identifié la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sécrétant au moins une molécule avec une activité antibiofilm. Une molécule a potentiellement été identifiée : une protéine nommée altérocine.

Le premier objectif de ces travaux a été d'étudier l'altérocine en détail ainsi que de la purifier. Le gène *alt* codant l'altérocine a dans un premier temps été étudié par analyses bioinformatiques afin de mettre en évidence une éventuelle régulation. Son point d'initiation de la transcription a été recherché et son expression en fonction de la croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a été observée pour obtenir des informations supplémentaires. La protéine a par la suite été étudiée par analyses bioinformatiques afin d'étudier ses caractéristiques pour une purification et d'observer une éventuelle homologie de séquence avec d'autres protéines. Des analyses complémentaires par électrophorèse et Western blot ont été effectuées afin de détecter la présence de la protéine dans les surnageants de culture bactériens.

Le second objectif a été de démontrer que cette protéine est bien responsable de l'activité antibiofilm. Plusieurs stratégies (mutagénèse, production hétérologue et surproduction homologue) ont été employées. L'activité antibiofilm des surnageants de culture des souches modifiées a par la suite été testée sur la culture en chambres en flux du biofilm d'une souche clinique de *P. aeruginosa*.

Matériels et méthodes

1. Cultures bactériennes	46
1.1 Souches bactériennes.....	46
1.2 Milieux de culture et conditions de croissance	47
2. Techniques de biologie moléculaire	48
2.1 Extraction d'acides nucléiques.....	48
2.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	48
2.2.1 Amorces.....	48
2.2.2 PCR classique.....	49
2.2.3 PCR quantitative.....	50
2.2.4 5' RACE-PCR.....	51
2.3 Clonage.....	52
2.4 Transformation.....	53
2.4.1 Chimique	53
2.4.2 Électrique.....	53
2.4.3 Conjugaison	54
2.5 Séquençage	55
3. Activité antibiofilm	55
3.1 Préparation du surnageant de culture	55
3.2 Induction à l'IPTG	55
3.3 Formation et observation des biofilms	56
4. Purification et détection	57
4.1 Extraction en phase solide	57
4.2 SDS-PAGE	58
4.3 Détection par anticorps.....	59
4.3.1 Production d'anticorps.....	59
4.3.2 Dot blot et Western blot	60
4.4 Spectrométrie de masse	60

1. Cultures bactériennes

1.1 Souches bactériennes

Les souches et plasmides utilisés dans cette étude sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Souches et plasmides utilisés dans l'étude.

Souche	Caractéristiques	Référence
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>		
3J6	Souche sauvage productrice de l'altérocine	(Grasland et al. 2003)
3J6(pOriTalt)	3J6 + pOriT, Amp ^R	
3J6(pOriTalt)	3J6 + pOriTalt, Amp ^R	
3J3	Souche sauvage ne produisant pas l'altérocine	(Grasland et al. 2003)
3J3(pOriT)	3J3 + pOriT, Amp ^R	
3J3(pOriTalt)	3J3 + pOriTalt, Amp ^R	
<i>P. aeruginosa</i>		
MUC-N1	Souche clinique sensible au SN _{3J6}	(Simon 2015)
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)	F ⁻ , ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysS (CamR)	Invitrogen
BL21(DE3)pRSETC	BL21(DE3) + pRSETC, Amp ^R	
BL21(DE3)pRSETCalt	BL21(DE3) + pRSETCalt, Amp ^R	
Top10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galk rpsL (StrR) endA1 nupG λ.	Invitrogen
GEB883	WT <i>E. coli</i> K12 ΔdapA::erm pir RP4-2, ΔrecA, gyrA462, zei298 ::Tn10, Ery ^R , Tet ^R , Dap ⁻	(Rodrigues 2014)
Plasmide		
pOriT-4Em (=poriT)	Vecteur répliatif chez <i>E. coli</i> - <i>Pseudoalteromonas</i> , Amp ^R , Em ^R	(Yu et al. 2014)
pOriTalt	Gène <i>alt</i> et sa région promotrice clonée dans pOriT	
pRSETC	Vecteur répliatif chez <i>E. coli</i> , Amp ^R	Invitrogen
pRSETCalt	pRSETC portant le gène <i>alt</i> sous induction du promoteur T7	
pk18mobsacB-Ery pk18-alt-Gmlox	Vecteur suicide chez <i>Pseudoalteromonas</i> , Kan ^R , Ery ^R pk18mobsacB-Ery contenant les régions flanquantes du gène <i>alt</i> et la cassette gentamicine	(Wang et al. 2015)

La souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 correspond à la bactérie produisant le surnageant de culture (SN_{3J6}) dans lequel est présent la protéine étudiée, l'altérocine. Cette souche a été isolée à partir d'une lame de verre immergée pendant 6 h dans le Golfe du Morbihan (France) en juin 2000.

La souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 est une souche proche de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 mais qui ne produit pas l'altérocine dans son surnageant de culture. Le gène est absent lors d'une amplification par PCR. Cette souche a été isolée à partir d'une lame de verre immergée pendant 3 h dans le Golfe du Morbihan (France) en juin 2000.

L'activité antibiofilm des surnageants de culture est étudiée sur le biofilm formé par la souche clinique de *P. aeruginosa* MUC-N1. Elle fait partie d'un panel de souches de *P. aeruginosa* extraites d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Elle présente une sensibilité importante au SN_{3J6}.

Afin de surproduire l'altérocine, la souche *Escherichia coli* BL21(DE3) a été utilisée. Elle permet l'expression d'ARN polymérase T7 sous l'induction à l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

1.2 Milieux de culture et conditions de croissance

Les bactéries marines ont été cultivées en milieu Väätänen Nine-Salt (VNSS) à 20°C sous agitation (125 rpm). La composition du VNSS (g/L) est la suivante : peptone de soja (1) (BD Diagnostic), extrait de levure (0,5) (BD diagnostic), glucose (0,5) (Labogros), amidon (0,5) (Labogros), FeSO₄·7H₂O (0,01) (Sigma), Na₂HPO₄ (0,01) (Acros Organics), NaCl (17,6) (Labogros), Na₂SO₄ (1,47) (Acros Organics), NaHCO₃ (0,08) (Acros Organics), KCl (0,25) (Acros Organics), KBr (0,04) (Acros Organics), MgCl₂·6H₂O (1,87) (Acros Organics), CaCl₂·2H₂O (0,41) (Sigma), SrCl₂·6H₂O (0,01) (Sigma), H₃BO₃ (0,01) (Acros Organics).

Les souches de *P. aeruginosa* et *E. coli* ont été cultivées en bouillon lysogène (LB, Sigma) à 37°C sous agitation (125 rpm).

Pour la conjugaison, un milieu LB modifié (MLB) a été utilisé. Il se compose de 10 g/l de peptone (ThermoFischer), 5 g/l d'extrait de levure (ThermoFischer) et 15 g/l de sea salt (Sigma).

Dans le cas des milieux gélosés, l'agar (Fischer Scientific) a été ajouté à 15 g/l.

Pour la croissance des souches transformées, *Pseudoalteromonas* et *E. coli*, l'ampicilline (Sigma) a été ajoutée pour atteindre une concentration finale de 100 µg/ml. Pour la sélection des mutants, l'érythromycine et la gentamicine ont été ajoutés à respectivement une concentration finale de, 25 et 15 µg/ml. Pour la croissance de *E. coli* GEB883, le milieu a été supplémenté en diaminopimélate (DAP) à 0,3 mM.

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1 Extraction d'acides nucléiques

À partir d'une culture d'une nuit en milieu liquide, l'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit « PureLink Genomic DNA » (Invitrogen), l'ADN plasmidique à l'aide du kit « SmartPure Plasmid » (Eurogentec) et les ARN totaux à l'aide du kit MasterPure RNA Purification Kit (Epicentre).

Les concentrations obtenues ont ensuite été dosées au spectrophotomètres NanoDrop™ (Thermo Scientific™).

2.2 Réaction de polymérisation en chaîne

2.2.1 Amorces

Les amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 3. Pour les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) classiques, elles sont conçues à partir des séquences de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 de façon à éviter la formation de dimères entre-elles et le

repliement de l'oligonucléotide sur lui-même. Les températures de fusion (T_m) ont été calculées spécifiquement pour chaque amorce à l'aide de l'outil « NEB Tm Calculator ». Puis les amorces ont été synthétisées par Eurogentec. Pour la RT-qPCR, les amorces sont dessinées avec le logiciel Primer Express® (Thermofischer) et synthétisées par Eurogentec.

Tableau 3 : Amorces utilisées lors de cette étude

Nom	Amorces (5'-3')	Utilisation	T_m (°C)
Ralt FWalt	ATATAAGCTTACTGACACTTTATAGTTGC TTAGGATCCATATGGATACAACGCTTTAGC	Clonage du gène <i>alt</i> chez <i>E. coli</i> sans peptide leader	50
Ralt Fleadalt	ATATAAGCTTACTGACACTTTATAGTTGC TTAGGATCCATATGAAGACACTTACTTTTCG	Clonage du gène <i>alt</i> chez <i>E. coli</i>	50
F16S QPCR R16s QPCR	GACTGAGACACGGCCCAGAC GCAATATCCCCACTGCTGC	RT-qPCR	60
Falt QPCR Ralt QPCR	CTTTCAGCAAACAATGGCA GCCTTGTCGTCTCCACAT	RT-qPCR	60
Fpalt Rpalt	TATGTCGACTAAAAGTGAATAAAGTCG TATGTCGACTTACTGACACTTTATAGTTGC	Clonage du gène <i>alt</i> et de sa région promotrice chez <i>Pseudoalteromonas</i>	51
Alt1bam Alt2Xba	AAGGATCCAGCATAAGTGAACCGTGCA AATCTAGATATCTTTCTTTAGTTGAATGT	Amplification de la région flanquante 1 au gène <i>alt</i>	62
Alt3Xba AltNheI	AATCTAGAAATATTCAATTGTAACCCTATGC AAGCTAGCAGGCACAAGAACAGCGCC	Amplification de la région flanquante 2 au gène <i>alt</i>	63
GSP1 alt GSP2 alt Nested GSP alt	TTACTGACACTTTATAGTTGC CCATAATTGGTTATACCAATC CCCCACAAGTGATTGTACT	5' RACE-PCR	55

2.2.2 PCR classique

La PCR de routine est réalisée dans un volume réactionnel final de 50 μ l comprenant : du tampon standard OneTaq 1 X (New England Biolabs (NEB)), 2 mM de chaque dNTP (NEB), 50 ng d'ADN matrice et 1,25 unité de OneTaq polymérase® (NEB). La réaction s'effectue ensuite à l'aide d'un thermocycleur (Biorad). Pour l'amplification des fragments utilisés en clonage, nécessitant un faible taux d'erreur, les PCR se font avec 1 unité de Q5® High-Fidelity DNA polymérase (NEB) et son tampon de réaction Q5 1 X (NEB). La réaction s'effectue ensuite à l'aide d'un thermocycleur. Les étapes suivantes sont programmées : une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, 35 cycles (94°C pendant 1 min, T_m pendant une min puis 72°C pendant 2 min) et une dénaturation finale de 10 min à 72°C.

La séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose 0,8 % (Invitrogen) supplémenté en bromure d'éthidium (BET), en tampon TAE 1X (Tris HCL 40 mM, acétate de sodium 20 mM, EDTA 10 mM pH 7,9, Biosolve) pendant 30 min à 80 V. La révélation de l'ADN est réalisée par la fixation du BET sur l'ADN et observation sous ultraviolet. Le marqueur de taille moléculaire utilisé est le 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen) qui permet de déterminer la taille des fragments de 0,1 à 12 kb.

2.2.3 PCR quantitative

Afin d'étudier la régulation du gène *alt*, son niveau d'expression a été observé en fonction de la croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt). Des PCR quantitatives après transcription inverse (RT-qPCR) ont été effectuées sur les gènes 16S et *alt* des deux souches selon la méthode du $10^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak et Schmittgen (2001). Les niveaux d'expression de ces gènes chez *Pseudoalteromonas* à 3 h sont arbitrairement considérés comme égaux à 1. L'expression obtenue pour les gènes au temps 5, 10 et 24 h ont été comparés au temps 3 h. Si un rapport supérieur à 2 est observé entre l'expression de deux gènes, il est considéré en surexpression par rapport au temps 3 h. A l'inverse, un ratio inférieur à 0,5 indique que le gène en question est sous-exprimé.

À partir des ARN totaux, la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) a été effectuée à partir d'ARN à 50 ng/ μ l et du kit High capacity cDNA archive (Applied Biosystems) selon les instructions du fournisseur. L'ADNc néo synthétisé a été conservé à -20°C. Une gamme d'ADN a été réalisée de 0,125 à $1,25 \times 10^{-4}$ ng/ μ l pour les gènes testés et de $1,25 \times 10^{-3}$ à $1,25 \times 10^{-6}$ ng/ μ l pour l'analyse de l'expression des gènes standards (16S). Un mix d'amorces est préparé pour chaque couple d'amorces (4 μ M) à tester, dans de l'eau ultrapure. Le master mix PCR (Applied Biosystems) contient l'AmpliTaq Gold DNA polymérase, les dNTPs, le tampon et le fluorophore SYBR green nécessaire à la quantification.

Sur une plaque 96 puits (ABI PRISM, Applied Biosystems) trois répliques ont été effectués pour les quatre dilutions testées. 8 μ L d'ADNc, 2 μ L du mix d'amorces à 4 μ M et 10 μ L de Master mix ont été déposés dans chaque puits. La plaque recouverte d'un film plastique est insérée

dans le 7300 Real time PCR system (Applied Biosystems). Les étapes suivantes sont programmées : un cycle de 95°C pendant 10 min puis 40 cycles : 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant une min puis un cycle de 10 min à 72°C et enfin un cycle de dissociation permettant de vérifier la spécificité de l'amplification.

2.2.4 5' RACE-PCR

À partir des ARN totaux de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt), l'extrémité 5' de l'ARNm du gène *alt*, correspondant au +1 de transcription, a été identifiée avec le kit le 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) selon les indications du fournisseur (figure 17).

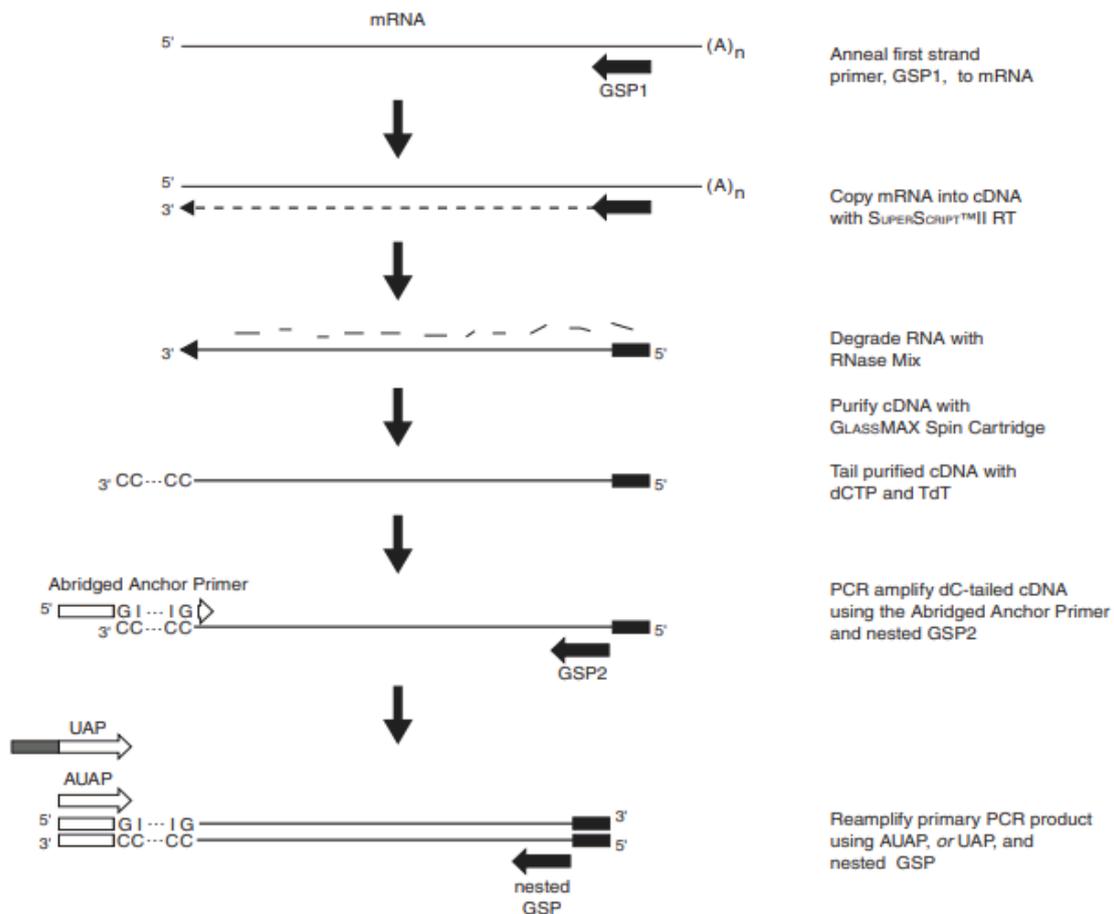


Figure 17 : Principe de la 5' RACE-PCR. L'ADNc du premier brin est synthétisé à partir des ARN totaux à l'aide d'une amorce spécifique du gène (GSP1) et la transcriptase inverse SuperScript™ II. Après la synthèse d'ADNc du premier brin, la matrice d'ARNm originale est éliminée par traitement avec le RNase Mix. Une queue polyC est ensuite ajoutée à l'extrémité 3' de l'ADNc en utilisant du TdT et dCTP. L'amplification PCR est ensuite réalisée accomplie avec une amorce spécifique au gène et une amorce d'ancrage contenant de la désoxyinosine. Apprêt d'Ancrage Abrégé (AAP), Universel Abrégé Amplification Primer (AUAP), Anchor Primer (AP) et Universal Amplification Primer (UAP).

Les amorces utilisées pour la synthèse d'ADNc et pour les deux réactions PCR sont présentées dans le tableau 2. Le produit de la PCR finale a été séquencé afin de définir le +1 de transcription.

2.3 Clonage

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR et plasmides extraits ont été purifiés, en vue du clonage, avec le kit SmartPur PCR (Eurogentec). Les fragments d'ADN ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction choisies (tableau 4) selon les conditions décrites par le fournisseur. Les plasmides ont également été digérés par les mêmes enzymes avec supplément de phosphate alcaline (1U) (Invitrogen) afin d'éviter qu'ils ne referment sur eux-mêmes. Les fragments d'ADN à cloner et plasmides digérés ont ensuite été purifiés par le kit SmartPur PCR (Eurogentec) puis une ligation avec le kit T4 DNA Ligation (Invitrogen) a été réalisée selon le protocole fourni par le fournisseur. Les produits de ligation ont été conservés à -20°C ou sur glace s'ils ont été transférés directement dans les cellules d'*E. coli* Top10.

Tableau 4 : Enzymes de restriction utilisées lors de cette étude

Amorces	Site de restriction	Utilisation
<i>Sall</i>	GTCGAC	Clonage dans pOriT
<i>Bam</i>HI	GGATCC	Clonage dans pRSETC et pk18mobsacB-Ery
<i>Hind</i>III	AAGCTT	Clonage dans pRSETC
<i>Xba</i>I	TCTAGA	Clonage dans pk18mobsacB-Ery

2.4 Transformation

2.4.1 Chimique

La transformation chimique a été utilisée afin d'introduire les plasmides pOriT et pOriTalt chez la souche donneuse *E. coli* GEB883 avant la conjugaison.

La transformation chimique a été réalisée à partir de bactéries compétentes préparées par la méthode au chlorure de calcium (Oishi et Cosloy 1972) et concentrées par centrifugations successives (10 min à 4000 g) à froid (4°C) dans une solution de CaCl₂ 50 mM stérile et froide. 100 µl de cellules compétentes (à environ 2 à 3.10¹⁰ cellules par ml) ont été transformées avec 10 à 50 ng de plasmides obtenus préalablement. Après 30 min d'incubation dans la glace, les cellules subissent un choc thermique à 42°C pendant 1 minute et sont replacées immédiatement dans la glace pendant 1 minute. Un volume de 1 ml de LB supplémenté en DAP 0,3 mM (nécessaire à la croissance pour GEB883) a été ajouté et les cellules ont été incubées 2 h à 37°C sous agitation. Un volume de 100 µl de produit de transformation a été étalé sur une gélose sélective, LB supplémenté en ampicilline, le reste a été centrifugé (10 min à 4000 g), repris dans 100 µl de milieu et également étalé sur gélose sélective, puis mis à incuber 24 h à 37°C. Une extraction de plasmides a été réalisée à partir d'une culture d'une nuit de colonies apparues afin de vérifier l'efficacité du clonage.

2.4.2 Électrique

La transformation électrique a été utilisée pour insérer les plasmides pRSETC et pRSETCalt chez des souches *E. coli* BL21(DE3). Elle a également été utilisée pour l'insertion des produits de ligation chez *E. coli* Top10. *E. coli* Top10 est souvent requise pour le clonage car elle possède une grande efficacité de transformation (1¹⁰ cfu/µg) et nécessite donc peu d'ADN.

La transformation électrique nécessite des cellules électrocompétentes. Les cellules *E. coli* Top10 utilisées lors de cette étude étaient déjà électrocompétentes. Les cellules BL21(DE3) ont été rendues compétentes par le protocole 26 du chapitre 1 de Molecular Cloning, par

centrifugations successives (10 min à 4000 g) à froid (4°C) dans une solution de glycérol 10 % stérile et froide. 10 ng de plasmides ont été ajoutés à froid à 50 µl de cellules compétentes (à environ 2 à 3.10¹⁰ cellules par ml) dans une cuve d'électroporation (Eurogentec) préalablement refroidie. Le choc électrique a été réalisé à 1,8 kV avec une constante de temps de 4 à 5 ms (Genepulser, Biorad). Un volume de 1 ml de milieu LB a été ajouté à l'ensemble et incubé pendant 2 h à 37°C sous agitation. Un volume de 100 µl de produit de transformation a été étalé sur gélose sélective (LB supplémenté en ampicilline 100 µg/ml). Le reste a été centrifugé (10 min à 4000 g), repris dans 100 µl de milieu et également étalé sur gélose sélective. Les transformants sont ensuite vérifiés par extraction de plasmides et digestion par restriction enzymatique. Les constructions moléculaires sont vérifiées par séquençage des plasmides.

2.4.3 Conjugaison

La conjugaison a été effectuée selon le protocole établi par Wang et *al.* (2015). La souche donneuse (*E. coli* GEB883) et la souche receveuse (*Pseudoalteromonas* sp. 3J6) ont été cultivées séparément à respectivement 37°C en milieu MLB et 20°C en milieu VNSS, jusqu'à une densité optique de 590 nm (DO₅₉₀) de 0,8-1. À ce stade, 2 ml de la souche donneuse et 1 ml de la souche receveuse ont été collectées par centrifugation (3 min à 4000 g). Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du MLB et resuspendues dans 100 µl de milieu MLB supplémenté en DAP à 0,3 mM. Les cellules donneuses et receveuses ont ensuite été mixées brièvement et déposées en goutte sur une gélose MLB supplémentée en DAP à 0,3 mM. Après incubation d'une nuit à 20°C, les cellules ont été collectées et resuspendues dans 2 ml de VNSS supplémenté avec 100 µg d'ampicilline mais sans DAP pour sélectionner les transconjugants (*Pseudoalteromonas* + plasmide). Ces derniers ont ensuite été vérifiés par extraction de plasmides et digestion par restriction enzymatique.

2.5 Séquençage

Le séquençage des produits clonés et des produits PCR a été réalisé par la société GATC. L'analyse des séquences a été effectuée en les comparant aux séquences de la base de données MaGe (www.genoscope.cns.fr) à l'aide du logiciel SerialCloner (©Franck Perez [SerialBasics]).

3. Activité antibiofilm

3.1 Préparation du surnageant de culture

À partir d'une pré-culture d'une nuit avec antibiotique pour les souches transformées, une culture en VNSS sans antibiotique de *Pseudoalteromonas* à une DO_{590} initiale après inoculation de 0,2 a été réalisée avec un ratio contenu/contenant de 1/5. Une centrifugation (8000 g, 10 min, 20°C) avant d'inoculer la culture a été réalisée afin de récupérer les cellules et d'éliminer les antibiotiques. Le même protocole a été suivi pour *E. coli* en LB.

Après 24 h d'incubation à 20°C pour *Pseudoalteromonas* et 37°C pour *E. coli*, sous agitation (125 rpm), le surnageant a été récupéré par centrifugation à 8000 g pendant 15 min. Il a été stérilisé avec des filtres 0,22 µm millipore express (Merck) et conservé à 4°C pour une utilisation allant jusqu'à 1 mois et à -80°C pour une utilisation plus longue.

3.2 Induction à l'IPTG

L'expression du gène *alt* chez la souche *E. coli* BL21(DE3) a été induit par l'ajout d'IPTG. À partir d'une pré-culture de la veille, 25 ml de milieu LB supplémenté en ampicilline (100 µg/ml) ont été inoculés à une DO_{590} de 0,1. La culture a été mise à incuber à 37°C sous agitation à 125 rpm. A une DO_{590} de 0,6, l'IPTG (Thermofischer) a été ajouté à une concentration finale de 1 mM. Un

volume de 1 ml d'échantillon a été collecté toutes les heures du temps 0 au temps 6 h ainsi qu'à 24 h. Les échantillons ont été conservés à -20°C .

Afin d'optimiser l'induction à l'IPTG, la température d'incubation à 20°C a été testée et un ajout d'antibiotique a été effectué lors de l'induction à l'IPTG. Une augmentation et une diminution de la concentration en IPTG ont également été testées à 0,1, 2 et 10 mM.

3.3 Formation et observation des biofilms

L'observation des biofilms en conditions dynamique a été réalisée dans des chambres à flux (FC) (DTU Systems Biology). Les FC se compose de trois canaux de plexiglas (poly[méthyl méthacrylate]) et sont fermées grâce à des lamelles de verre collées par application de colle silicone neutre (Clear Super Silicone Sealant, 3M).

Ces FC sont alimentées par du milieu de culture (LB) par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (Watson Marlow 205 U), permettant de définir un débit constant. Des pièges à bulles sont placés entre la pompe et les FC afin d'éviter toute détérioration des biofilms par une bulle d'air. En aval des FC, un flacon de récupération est présent. Des clamps sont placés en amont et en aval des FC afin de limiter l'effet de diffusion dans le système lors de l'arrêt du flux pendant les phases d'injection et d'adhésion des bactéries (figure 18).

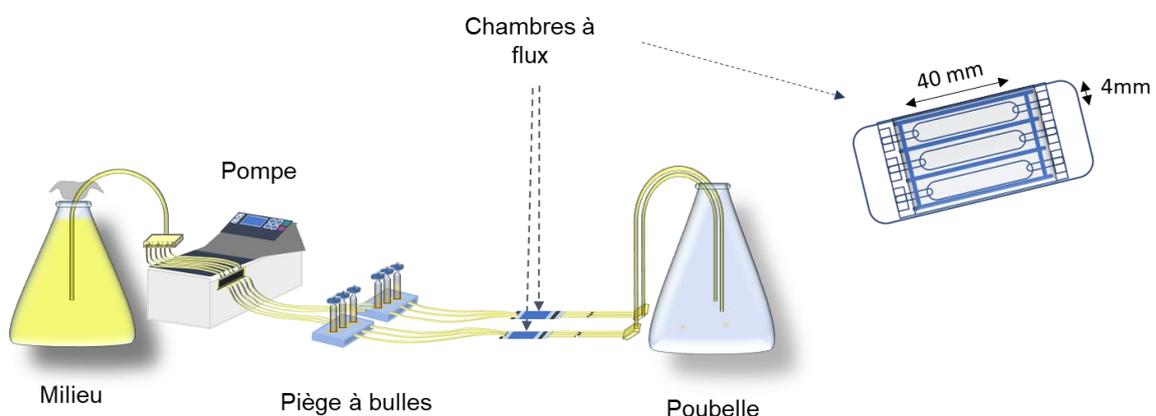


Figure 18 : Système de chambres à flux. (Schéma inspiré de Tolker-Nielsen et Sternberg 2014)

Dans un premier temps, le système a été stérilisé par l'eau de javel à 0,5 % pendant une durée minimale de 30 min. Le système a ensuite été rincé avec 300 ml d'eau stérile. Le système a été rempli de milieu de culture (LB) et, une fois le flux stoppé, 250 µl de solution bactérienne à une DO_{590} de 0,1 ont été injectés dans la FC via une seringue (1 ml). Les solutions bactériennes ont été réalisées avec de l'eau physiologique ou avec les surnageants de culture à tester.

Le flux a été stoppé deux heures à température ambiante afin de réaliser l'étape d'adhésion. Le flux a ensuite été relancé à 3 ml/h et les FC ont été placées à 37°C pendant 24 h.

Après incubation, le flux a été stoppé afin d'observer les biofilms. Pour cela les cellules bactériennes ont été marquées avec le fluorochrome Syto9 (Life Technologies) à une concentration de 5 µM. Après dix minutes de contact, un rinçage a été effectué en relançant le flux pendant 10min. Les observations ont ensuite été réalisées au microscope confocal à balayage laser (MCBL) (LSM 710, Zeiss) accompagné du logiciel Zen 2011. Trois prises de vue ont été prise par canal et chaque expérience a été répétée 3 fois. À l'aide des logiciels Matlab et COMSTAT, le biovolume et l'épaisseur moyenne ont été obtenus.

4. Purification et détection

4.1 Extraction en phase solide

L'extraction en phase solide a été réalisée sur cartouche C18 1 g (Upti-clean, Interchim). Cette chromatographie d'adsorption liquide-solide est constituée d'une phase stationnaire de silice apolaire greffée par une chaîne aliphatique à 18 carbones et d'une phase mobile hydrophile et polaire. Elle permet ainsi de séparer les composés en fonction de leur polarité, plus le composé est apolaire et plus il sera retenu par la phase stationnaire.

La colonne a été conditionnée avec 6 ml d'acétonitrile puis rincée avec 6 ml d'eau ultrapure. Le surnageant de culture a été passé sur la cartouche jusqu'à 100 ml. L'élution a été effectuée ensuite avec 3 ml d'acétonitrile à 0 %, 10 %, 50 % et 90 %. Les fractions récupérées ont été

évaporées dans un concentrateur (miVac quattro, Genevac), puis reprises dans de l'eau ultrapure afin d'obtenir un échantillon 1000 fois concentré.

4.2 SDS-PAGE

Pour observer les protéines présentes dans le cytoplasme, les bactéries ont été lysées en présence d'un tampon de charge (SDS 8 % w/v, β -mercapto-éthanol 5 % v/v, glycérol 40 % v/v, Tris-HCL pH 6,8 0,24 M et bleu de bromophénol 0,04 % w/v) à 100°C pendant 3-5 min.

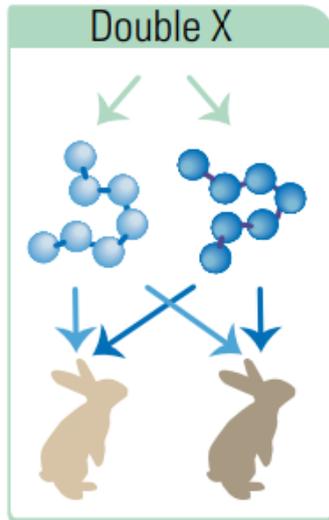
Pour observer les protéines présentes dans un surnageant de culture d'*E. coli*, elles ont été précipitées par l'ajout d'un volume d'acide trichloroacétique 20 % - acétone 80 % (v/v) afin d'éliminer les sels et les contaminants hydrosolubles. Les échantillons ont été incubés 45 min dans la glace puis centrifugés pendant 20 min à 13000 g afin de précipiter les protéines. Plusieurs lavages des culots ont été effectués avec du Tris-HCL (50 mM, pH 8,8) 30 % - acétone 70 % - bleu de bromophénol afin d'éliminer toutes traces de TCA. Les culots ont ensuite été séchés et resuspendus dans le tampon de charge.

Pour observer les protéines présentes dans les surnageants de culture et extrait de *Pseudoalteromonas*, elles ont été dénaturées en présence du tampon de charge (SDS 8 % w/v, β -mercapto-éthanol 5 % v/v, glycérol 40 % v/v, Tris-HCL pH 6,8 0,24 M et bleu de bromophénol 0,04 % w/v) à 100°C pendant 3-5 min.

Par la suite les échantillons ont été séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) (gel de séparation à 15 %, gel de concentration à 4 % ; 120 V ; tampon de migration SDS-Glycine 1 X). Le marqueur de taille choisi utilisé a été le Mark12 (Thermofischer). Après migration, le gel a été utilisé pour réaliser un Western blot ou a été coloré par bleue de Coomassie puis décoloré à l'aide d'une solution de décoloration (méthanol/acide acétique/eau : 30/7/63).

4.3 Détection par anticorps

4.3.1 Production d'anticorps



La production d'anticorps anti-altérocine a été effectuée par la société Eurogentec avec le programme Speedy double X (figure 19). Ce programme augmente les chances de succès en utilisant deux peptides correspondant à deux régions peptidiques de la protéine cible. Chaque hôte reçoit une combinaison des deux peptides. Le lapin a été choisi comme hôte car c'est le plus utilisé pour la production d'anticorps polyclonaux du fait de son entretien facile et son système immunitaire efficace. De plus, la quantité de sérum collectée est plus élevée que pour le rat et le cochon d'inde.

Figure 19 : Programme double X

De petites séquences peptidiques, P1 et P2 (CEERGHNQEISGSTIT et CGEDESAYGNFDWYNQ) ont tout d'abord été sélectionnées puis synthétisées avec une pureté supérieure à 70 %. Ils ont ensuite été conjugués à une protéine porteuse, l'hémocyanine de patelle (KLH), puis injectés chez les lapins aux jours 0, 7, 10 et 18. Des prélèvements de sérum ont alors été collectés aux jours 21 et 28. La production d'anticorps a été vérifiée avec le premier prélèvement de sérum à l'aide d'un test ELISA.

La purification des anticorps a été réalisée sur colonne d'affinité à partir du dernier prélèvement de sérum. Les peptides P1 et P2 ont été chacun fixé sur la matrice AF-Amino TOYO de la colonne. Un volume de 5 ml de sérum a alors été déposé sur la colonne et un lavage au PBS a été réalisé. Les anticorps fixés sur la colonne ont ensuite été élués avec 100 mM de Glycine à pH 2,5. Les anticorps ont été stockés à -20°C dans une solution de tampon PBS 1 X 50 % - glycérol 50 %.

4.3.2 Dot blot et Western blot

Pour le Dot blot, 1 à 4 μl d'échantillons ont été déposés sur membrane de cellulose (0,45 micron, Thermofischer) et séchés pendant 1 h. Pour le Western blot, après migration par SDS-PAGE (cf. 4.2 SDS-PAGE (p58)), les protéines du gel ont été transférées sur une feuille de nitrocellulose (Thermofischer) préalablement imbibée par du tampon de transfert (Tris base-Glycine- 20 % Méthanol, pH 8,4) par électrotransfert (BioRad) (100 V ; 1 h ; tampon de transfert Tris base-Glycine-Méthanol 1 X).

Une étape de blocage a été réalisée avec une solution de blocage (TBS (NaCl 0,15 M, Tris 0,1 M, pH8) + 5 % de poudre de lait demi-écrémé) pendant 30 min. L'hybridation avec l'anticorps primaire (anticorps anti-altérocine P1) a été effectuée en l'ajoutant à la solution de blocage à une dilution au 100^{ème} pendant 1 h. La membrane a ensuite été rincée au TBS puis l'anticorps secondaire (anti-rabbit IgG alcaline phosphatase conjugate, sigma) dilué au 5000^{ème} a été ajouté dans la solution de blocage. Après 30 min d'incubation, la membrane a été rincée au TBS et la révélation a été effectuée avec le nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt (NBT/BCIP) (Thermofischer).

4.4 Spectrométrie de masse

La bande à analyser à l'issue d'un SDS-PAGE (cf. 4.2 SDS-PAGE (p58)) a été découpée manuellement. Le morceau de gel ou l'extrait à analyser a été rincé deux fois avec de l'eau ultrapure et déshydraté en la conservant pendant quelques minutes dans de l'acétonitrile. Il a ensuite été séché sous vide (30 min) et réhydraté pendant une heure avec 2 μl de bicarbonate d'ammonium à 50 mM contenant 12,5 ng/ μl de trypsine (Gradencinggrade, Roche Diagnostics) avant d'être ajouté à 20 μl de bicarbonate d'ammonium et la protéolyse a été réalisée toute la nuit. Après centrifugation, le surnageant a été stocké et le culot (morceaux de gel) a été lavé successivement avec 20 μl de bicarbonate d'ammonium à 20 μM , 20 μl de bicarbonate d'ammonium à 20 μM /acétonitrile (1 : 1), deux fois avec 20 μl d'acide formique/acétonitrile à 5 % (1 : 1) et enfin 20 μl d'acétonitrile. Les échantillons ont été

centrifugés après chaque étape de lavage et tous les surnageants ont été recueillis, regroupés, séchés et remis en suspension dans 10 µl d'acide formique à 0,1 % (v / v) dans de l'eau ultrapure. Les solutions digérées ont été analysées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplées en ligne à un spectromètre de masse LTQ-XL Orbitrap (ThermoScientific) au laboratoire des sciences de l'environnement marin (LEMAR UMR 6539, Brest, France). Les peptides ont été séparés par HPLC (LC-20AB, Shimadzu) sur une colonne capillaire C18 en appliquant un gradient linéaire d'acétonitrile dans de l'acide formique à 0,1 %. Les peptides ont été détectés par élution directe de la colonne HPLC dans la source d'ions nanoélectroniques du spectromètre de masse LTQ-OrbiTrap XL (ThermoScientific). Après un balayage complet (m/z 400–2000) en MS acquis dans l'OrbiTrap avec une résolution de $r=60000$ à m/z 400, les peptides les plus intenses ont été séquentiellement isolés et fragmentés dans le piège à ions par dissociation induite par collision. L'énergie de collision normalisée était pré-réglée à 35 %. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Proteome Discover™ (ThermoScientific).

Chapitre I : Étude de l'altéroïcine

Introduction	62
1. Étude du gène <i>alt</i>	63
1.1 Environnement génomique du gène <i>alt</i>	63
1.2 Zone promotrice du gène <i>alt</i>	63
1.3 Expression du gène <i>alt</i> en fonction de sa phase de croissance	66
2. Étude de la protéine altéroïcine	69
2.1 Caractérisation <i>in silico</i> de l'altéroïcine	69
2.2 Purification et détection de l'altéroïcine	71
2.2.1 Détection par SDS-PAGE.....	71
2.2.2 Détection par des anticorps anti-altéroïcine	73
Conclusion	76

Introduction

Une des thématiques de recherche du Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines est la recherche de stratégies antibiofilm. Ces dernières années, les recherches se sont notamment axées sur l'activité antibiofilm de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Avant le début de ce travail, une protéine a été extraite du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, la purification partielle de la protéine a été réalisée sur une colonne C18 par SPE. L'activité antibiofilm la plus importante a été décelée dans la fraction éluée par 50 % d'acétonitrile. Une analyse sur gel SDS-PAGE de cette fraction a révélé une unique bande d'environ 13 kDa. Cette bande n'était pas présente dans la fraction 50 % d'un surnageant de culture inactif. Après excision et extraction de l'acrylamide, la protéine a été analysée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/TOF). Différentes séquences peptidiques ont été obtenues et, après séquençage du génome de *Pseudoalteromonas* 3J6, des analyses ont permis d'identifier un potentiel gène codant une protéine correspondant aux séquences peptidiques définies par spectrométrie de masse. La protéine et son gène ont été nommés respectivement altérocine et *alt*. Afin d'améliorer nos connaissances sur cette protéine, deux points ont été traités.

Le premier point consistait à étudier le gène codant l'altérocine, *alt*. Son environnement génétique ainsi que son expression ont été étudiés afin de mettre en évidence une éventuelle régulation. Quels facteurs sont impliqués dans la régulation du gène ? Quels paramètres pourraient influencer l'expression du gène ? En répondant à ces questions, nous pourrions obtenir une indication sur les conditions de production adéquates. Afin d'essayer d'y répondre, le point d'initiation de la transcription a été recherché pour identifier un promoteur et l'expression du gène a été observée en fonction du temps.

Le second point portait sur l'étude de la protéine. Pour cela, une étude *in silico* et des travaux de purification et de détection de la protéine à partir du surnageant de culture ont été menés.

1. Étude du gène *alt*

1.1 Environnement génomique du gène *alt*

Le gène *alt* se compose de 420 paires de bases (pb). Son environnement génomique est présenté sur la figure 20. Il se situe entre un gène codant une aspartate semialdéhyde déshydrogénase (id110063) et un gène codant une protéine de fonction inconnue (id110065). Un gène codant un récepteur dépendant de TonB est également situé à proximité (id110066). L'aspartate semialdéhyde déshydrogénase est une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides aminés appartenant à la famille de l'aspartate : la lysine, la thréonine, la méthionine et l'isoleucine (Viola 2001). Le récepteur dépendant de TonB est une protéine de la membrane externe permettant la perception et l'importation de sidérophores (chélateurs de fer), de la vitamine B12 et des sucres du milieu extracellulaire (Noinaj et *al.* 2010). Ces gènes ne semblent pas être impliqués dans la production de l'altérocine. De plus, l'orientation de *alt*, qui est opposée à ces trois autres gènes, nous indique qu'il ne fait pas partie d'un opéron.

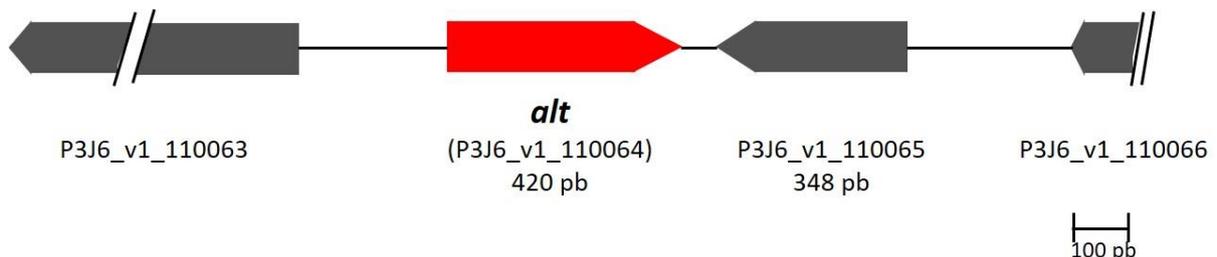


Figure 20 : Environnement génomique du gène *alt* (MaGe, MicroScope). Le gène *alt* est représenté en rouge et les gènes l'entourant en gris. Les flèches indiquent l'orientation respective des gènes.

1.2 Zone promotrice du gène *alt*

Concernant la zone promotrice du gène *alt* (figure 21), un promoteur reconnu par le facteur σ^{70} a d'abord été prédit avec le logiciel BPRM (Solovyev 2011) (figure 21, P-35 et P-10). Puis nous avons expérimentalement identifié la zone d'initiation de la transcription (+1) par 5' RACE-PCR (figure 21). L'addition d'une queue polyC à l'extrémité 3' des ADNc issus de l'ARNm *alt* nous a permis de situer le début de la transcription du gène *alt* au niveau d'une

reconnait des séquences consensus différentes de celles observées en -10 et -35 par rapport au +1 de transcription. Deux autres facteurs sigma ECF ainsi que quatre autres facteurs sigma inconnus codés par le génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 se fixent sur des séquences promotrices inconnues. La transcription du gène *alt* pourrait nécessiter un de ces facteurs sigma.

Tableau 5 : Facteurs sigma retrouvés dans le génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

Famille	Code (MAGE)	Séquences consensus	Référence
Primaire			
Sigma 70 (D)	P3J6 v1 121611	TTGACA-n ₁₆₋₁₈ -TATAAT	(Wösten 1998)
Phase stationnaire			
Sigma 38 (S)	P3J6 v1 121294	TTGACA-n ₁₇ -TATAAT	(Typas et Hengge 2006)
Choc thermique			
Sigma 32 (H)	P3J6 v1 121603	CTTGAA-n ₁₇ -CCCATnT	(Wösten 1998)
Flagelle			
Sigma 28 (F), LafS	P3J6 v1 90190		
Sigma 28 (F), FliA	P3J6 v1 121161	TAAAGwwy-n ₁₁₋₁₂ -tyCGAwrn	(Yu et al. 2006)
ECF			
Sigma 24 (E), AlgU	P3J6 v1 121267		
Sigma EFC	P3J6 v1 80012	GAACTT-n ₁₆₋₁₇ -TCCAA	(Bazire et al. 2010)
Sigma EFC	P3J6 v1 121439		
Famille 54			
Sigma 54 (N)	P3J6 v1 100265	TGGCAC-n ₅ -TTGCw	(Wösten 1998)
Autre			
Facteur sigma	P3J6 v1 110155		
Facteur sigma	P3J6 v1 120094		
Facteur sigma	P3J6 v1 20085		
Facteur sigma	P3J6 v1 90075		

w : A ou T ; r : A ou G ; y : T ou C

Il est également intéressant d'observer que des séquences répétées inversées (IR) (ATTTTTxCA-3 pb-TGxAAAAAAT et CTTT-4 pb-AAAG) sont présentes légèrement en amont des deux promoteurs potentiels. Elles pourraient être impliquées dans la régulation de l'initiation de la transcription, en constituant des sites de fixation de protéines activatrices ou répressives.

1.3 Expression du gène *alt* en fonction de sa phase de croissance

Le temps de culture afin d'obtenir un SN actif a été établi lors d'une précédente étude (Klein 2011). Les activités antibiofilm des SN avaient été testées à différents temps en fonction de la phase de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. La plus forte activité était observée avec le SN obtenu après 24 h de culture. L'altérocine serait donc produite en phase stationnaire et/ou accumulée dans le surnageant de culture au cours du temps.

Afin de mieux comprendre la régulation du gène *alt* et donc une partie de la régulation de la production de l'altérocine, l'activité transcriptionnelle du gène *alt* a été étudiée au cours de la phase de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 par RT-qPCR.

La courbe de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a été obtenue dans les mêmes conditions de culture que la préparation des SN (VNSS à 20°C sous agitation à 125 rpm) (figure 22). Nous n'avons pas observé de phase de latence mais directement une phase de croissance exponentielle, qui se termine environ 4 h après l'ensemencement. Puis vient la phase stationnaire, le SN actif est donc prélevé tardivement dans la phase stationnaire. La courbe de croissance est similaire à celle obtenue par Klein (2011). Cependant, le temps de doublement calculé est de 72 min contre 48 min dans l'étude menée par Klein. La différence pourrait s'expliquer par la température d'incubation qui était de 25°C dans l'étude de Klein et de 20°C dans cette étude. Pour des raisons logistiques, nous avons choisi de réaliser la production de SN à 20°C, température qui avait déjà été utilisée dans deux précédentes études et où une activité antibiofilm était également observée (Dheilly et al. 2010, Simon 2015).

Quatre prélèvements ont été effectués à différents temps, durant la phase exponentielle ($T = 3$ h), au début de la phase stationnaire ($T = 5$ h), durant la phase stationnaire ($T = 10$ h) et au temps 24 h qui correspond à l'heure de la récolte des SN actifs. La quantité d'ARNm transcrits à partir du gène *alt* a ensuite été estimée par RT-qPCR selon la méthode du $10^{-\Delta\Delta Ct}$ de Livak et Schmittgen (2001) en la normalisant par rapport à la quantité d'ARNr 16S, dont l'abondance reste constante.

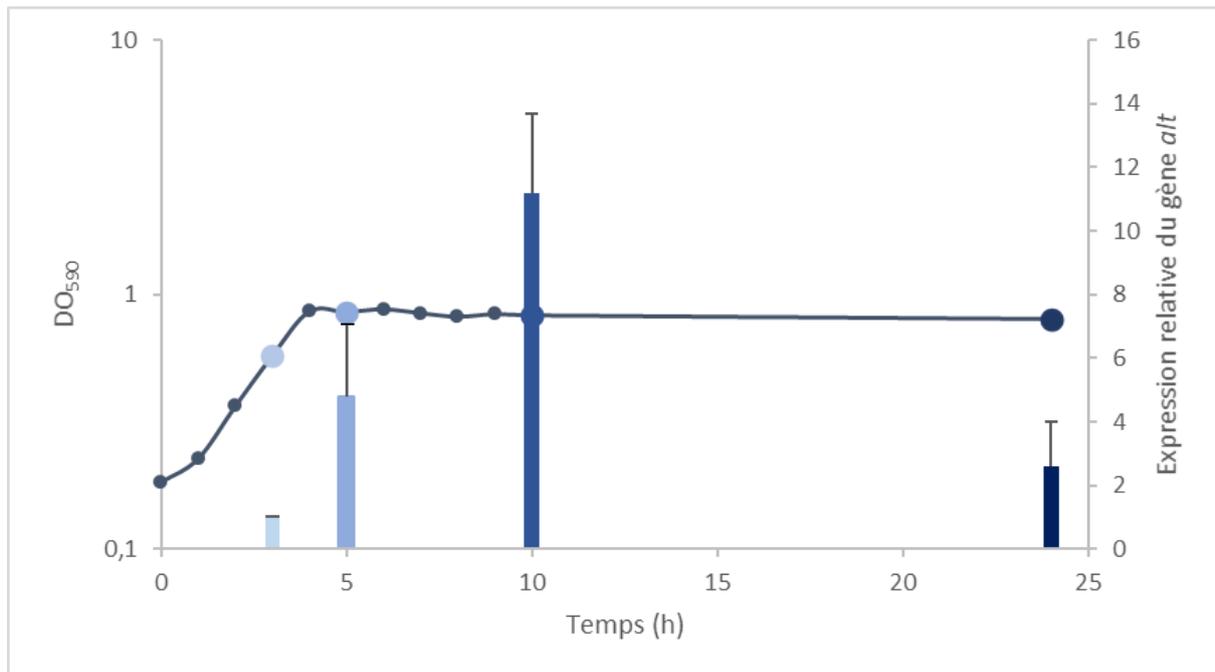


Figure 22 : Expression du gène *alt* en fonction de la croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Courbe de croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 en VNSS à 20°C sous une agitation de 125 rpm. DO₅₉₀ en fonction du temps (—●—). Expression relative du gène *alt* en fonction du temps. Le niveau d'expression est relatif à celui obtenu après 3 h de croissance.

Après 4 expériences indépendantes, les résultats ont été rapportés à ceux du premier temps de récolte des SN (3 h) (figure 22). Le niveau d'expression relatif est donc de 1 au temps 3 h. Le niveau d'expression du gène *alt* progressait au cours du temps avec des niveaux d'induction respectivement de 5, 11 et 2 aux temps 5, 10 et 24 h. Dans les conditions testées, l'expression du gène *alt* augmentait donc au début de la phase stationnaire (5 et 10 h) puis décroissait pour atteindre une expression à 24 h qui se rapproche de celle quantifiée durant la phase exponentielle. La transcription du gène semblait donc régulée pour atteindre un pic en phase stationnaire. Cela nécessiterait alors l'intervention de protéines régulatrices de type facteur sigma alternatif et/ou activateur ou répresseur de transcription. Ces résultats semblent donc

corroborer les hypothèses émises précédemment. En effet, la présence de séquences répétées inversées ainsi que l'identification d'un +1 de transcription qui pourrait résulter d'un promoteur reconnu par un facteur sigma alternatif suggèrent une régulation du gène. Une perspective intéressante serait de quantifier le niveau d'expression du gène *alt* en biofilm et en condition planctonique afin de regarder l'impact du mode de vie sur l'expression du gène *alt*. Comparer l'expression du gène *alt* en biofilm mixte et en biofilm mono-espèce pourrait également nous indiquer si la présence d'autres espèces bactériennes influence l'expression du gène *alt* et donc la production d'altérocine. Pour ce faire, il est possible d'extraire directement les ARN issus des cellules de biofilms cultivés en chambres à flux (Rodrigues et al. 2018).

De plus, ces résultats coïncident avec la cinétique d'activité antibiofilm obtenue lors de l'étude menée par Klein (2011). En effet, l'activité antibiofilm maximale a été obtenue à 24 h, ce qui peut correspondre à une accumulation de l'altérocine. Il aurait été intéressant d'ajouter des temps de prélèvement durant la phase stationnaire afin d'estimer si une forte expression de l'altérocine est conservée longtemps durant la phase stationnaire avant de baisser et d'atteindre l'expression observée à 24 h.

Une autre solution afin d'étudier l'expression du gène *alt* serait d'utiliser un rapporteur transcriptionnel en réalisant une fusion transcriptionnelle de la région promotrice du gène *alt* et, par exemple, de l'opéron *luxCDABE* codant la luciférase (Hakkila et al. 2002). Cette dernière est une enzyme catalysant la réaction de bioluminescence en oxydant la luciférine en oxyluciférine. Nous pourrions ainsi quantifier en fonction du temps et/ou des conditions de culture la bioluminescence qui est proportionnelle à la production de luciférase et donc à l'expression de l'opéron *luxCDABE* sous le contrôle du promoteur du gène *alt*. Cette technique nous permettrait également de définir quelles séquences dans la région promotrice sont essentielles à l'activité du ou des promoteurs. En effet, si une séquence est délétée et qu'elle est essentielle, il n'y aura pas de production de bioluminescence. La protéine verte fluorescente (GFP) peut également être utilisée comme rapporteur mais est moins sensible d'après Hakkila et al. (2002).

2. Étude de la protéine altérocine

2.1 Caractérisation *in silico* de l'altérocine

Le gène *alt* code une protéine de 139 acides aminés (aa) ayant un poids moléculaire de 15,7 kDa (figure 23). Un potentiel peptide signal a été identifié par le logiciel SignalP 5.0 Server (Almagro Armenteros, 2019) et une coupure du peptide signal aurait lieu après le vingtième aa, permettant la sécrétion de la protéine hors de la cellule. La protéine sécrétée correspondant à l'altérocine, serait donc une protéine composée de 119 aa avec un poids moléculaire de 13,6 kDa et un point isoélectrique (pI) de 4,82. Quatre cystéines présentes dans la partie C-terminale de la protéine pourraient conduire à la formation de ponts disulfures intramolécules ou intermolécules et à une structure tertiaire spécifique.

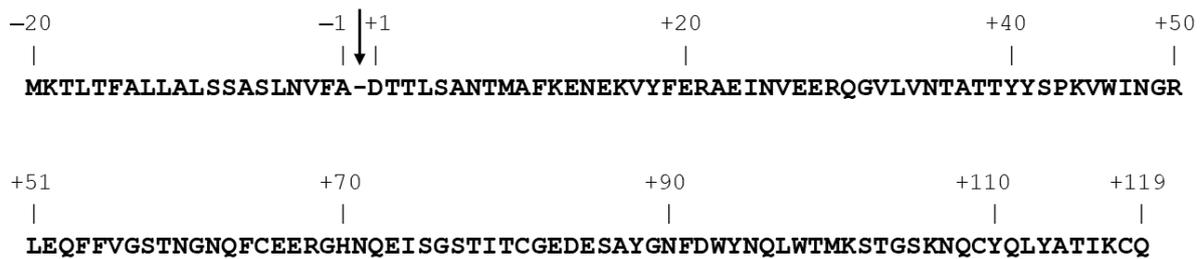


Figure 23 : Séquence de l'altérocine. Flèche : coupure prédite du peptide signal lors de la sécrétion.

Des recherches dans les banques de données ont été réalisées afin de définir des homologies de séquence avec des protéines connues (BLASTp, NCBI). Des homologies de séquence (pourcentage d'identité supérieur à 40 %) ont été trouvées avec des protéines de fonction inconnue (tableau 6). La plupart d'entre elles est retrouvée avec des protéines produites par le genre *Pseudoalteromonas*. Les autres ont été décelées avec des pourcentages d'identité relativement faibles chez les espèces *Paraglaciecola mesophila* (50 %), *Paraglaciecola chathamensis* (48,81 %), *Hahella chejuensis* (44,07 %) et *Hahella* sp. KA22 (41,91 %).

Tableau 6 : Protéines homologues de l'altérocine présentes dans la base de données NCBI. Pourcentage d'identité > 40 %.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. S1609]	289	289	100%	7e-99	100.00%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas undina]	287	287	100%	4e-98	99.28%
hypothetical protein PNIG_b0710 [Pseudoalteromonas nigrifaciens]	137	137	46%	1e-39	98.44%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. S558]	254	254	100%	5e-85	94.96%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas aliena]	251	251	100%	1e-83	93.53%
MULTISPECIES: hypothetical protein [Pseudoalteromonas]	253	253	100%	1e-84	85.61%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas espejiana]	251	251	100%	5e-84	84.89%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. 1_2015MBL_MicDiv]	250	250	100%	2e-83	84.17%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. S3785]	249	249	100%	3e-83	84.17%
hypothetical protein JF50_17665 [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	164	164	64%	4e-50	78.89%
hypothetical protein PNIG_b0711 [Pseudoalteromonas nigrifaciens]	106	106	46%	1e-27	78.46%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	182	182	76%	2e-56	72.90%
hypothetical protein TW76_13865 [Pseudoalteromonas ruthenica]	154	154	65%	6e-46	72.53%
MULTISPECIES: hypothetical protein [Pseudoalteromonas]	175	175	75%	7e-54	72.38%
hypothetical protein BFC16_04585 [Pseudoalteromonas sp. JW3]	160	160	69%	1e-48	71.88%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	174	174	76%	2e-53	70.09%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas ruthenica]	172	172	79%	1e-52	67.57%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	183	183	88%	5e-57	66.93%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas ruthenica]	172	172	79%	2e-52	66.67%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas ruthenica]	171	171	79%	2e-52	66.67%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. CO325X]	171	171	79%	4e-52	66.67%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	181	181	87%	3e-56	65.87%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas ruthenica]	167	167	79%	1e-50	65.77%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	174	174	84%	2e-53	63.33%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	173	173	84%	3e-53	63.33%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	184	184	100%	2e-57	63.31%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	182	182	96%	8e-57	61.94%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas citrea]	184	184	100%	2e-57	61.87%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	176	176	99%	5e-54	60.28%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	175	175	99%	6e-54	60.28%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas ruthenica]	175	175	100%	7e-54	58.99%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. SW0106-04]	174	174	100%	2e-53	58.99%
hypothetical protein N474_21465 [Pseudoalteromonas luteoviolacea CPMOR-2]	175	175	99%	7e-54	58.87%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas luteoviolacea]	175	175	99%	1e-53	58.87%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas byunsanensis]	167	167	100%	1e-50	58.57%
MULTISPECIES: hypothetical protein [Pseudoalteromonas]	171	171	100%	5e-52	57.45%
hypothetical protein ADS77_01770 [Pseudoalteromonas porphyrae]	127	127	71%	6e-35	55.45%
hypothetical protein [Paraglaciicola mesophila]	81.6	81.6	58%	3e-17	50.00%
hypothetical protein [Paraglaciicola chathamensis]	81.3	81.3	58%	4e-17	48.81%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. PLSV]	79.7	79.7	58%	2e-16	48.19%
MULTISPECIES: hypothetical protein [Pseudoalteromonas]	130	130	99%	3e-36	47.48%
MULTISPECIES: hypothetical protein [unclassified Pseudoalteromonas]	127	127	99%	1e-34	46.76%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas arabiensis]	126	126	99%	2e-34	46.04%
MULTISPECIES: hypothetical protein [Pseudoalteromonas]	120	120	99%	6e-32	45.32%
hypothetical protein [Pseudoalteromonas sp. RA15]	119	119	99%	2e-31	45.32%
hypothetical protein [Hahella chejuensis]	101	101	84%	7e-25	44.07%
hypothetical protein [Hahella sp. KA22]	103	103	97%	1e-25	41.91%

Des domaines conservés, pouvant nous orienter vers un mode d'action, et une structure 3D ont été recherchés mais aucune homologie n'a été trouvée (Blast NCBI, Expasy).

Cette absence de structure 3D et de domaines conservés connus confortait le fait que l'altérocine avait été désignée comme une protéine probable de fonction inconnue par les annotations automatiques et les comparaisons de séquences. L'altérocine est donc une protéine dont le mode d'action reste à définir.

2.2 Purification et détection de l'altérocine

Afin de mieux étudier l'altérocine, il est nécessaire de la détecter. Au début de ces travaux cette opération était difficile puisque la protéine n'avait été observée qu'une seule fois sur gel SDS-PAGE. Des méthodes de détection ont alors été étudiées.

2.2.1 Détection par SDS-PAGE

Aucune protéine dans le SN_{3J6} n'étant visible sur gel SDS-PAGE après coloration au bleu de Coomassie, il était nécessaire de mettre en place une étape de concentration. Pour ce faire, le surnageant d'une culture de 24 h a donc été déposé sur une cartouche C18 en SPE. Trois concentrations d'acétonitrile (10, 50 et 90 %) ont été utilisés pour assurer l'élution. Après concentration par évaporation d'un facteur 1000, les protéines des différents extraits ont été séparées par SDS-PAGE. Sur le gel, aucune bande n'était visible dans le SN brut. Cependant, après concentration, une bande correspondant à une masse d'environ 14 kDa était observée dans la fraction éluée par 50 % d'acétonitrile (figure 24). Elle pourrait correspondre à l'altérocine dont le poids moléculaire théorique est de 13,6 kDa après sécrétion. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à la fraction éluée par 50 % d'acétonitrile que nous avons nommée extrait E_{3J6}.

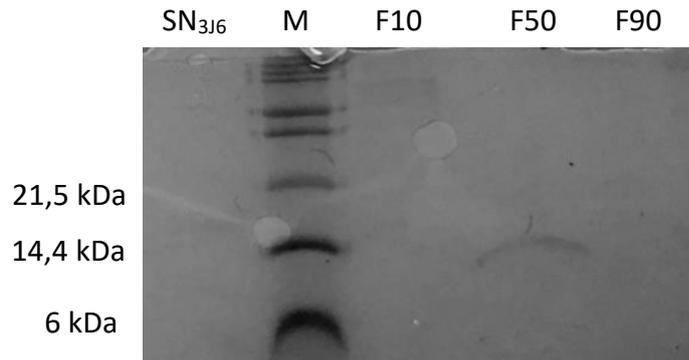


Figure 24 : Séparation des protéines des différentes fractions obtenues par SPE (C18) à partir de SN_{3J6} par SDS-PAGE. SN_{3J6}, Marqueur Mark12, Fractions éluées avec 10 %, 50 % et 90 % d'acétonitrile.

Afin de confirmer que la bande observée correspondait à l'altérocine, elle a été excisée du gel, digérée par de la trypsine puis analysée par spectrométrie de masse (HPLC-LTQ-Orbitrap). Peu de fragments tryptiques ont été détectés et ils n'ont pu être reliés à aucune protéine codée par le génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Devant ce résultat peu concluant, E_{3J6} a directement été digéré puis analysé par spectrométrie de masse, sans passer par l'étape SDS-PAGE. Plusieurs fragments ont alors été observés sur le spectre et plusieurs protéines ont pu être potentiellement identifiées (logiciel Proteome Discover™) (tableau 7). La seule protéine ayant un poids moléculaire d'environ 14 kDa était l'altérocine. Deux autres protéines de fonction inconnue ont été identifiées. Les autres protéines potentiellement retrouvées, dont la fonction est connue, ne semblent pas avoir de lien avec une activité antibiofilm.

Tableau 7: Protéines dont au moins un fragment peptidique a été retrouvé dans les extraits E_{3J6} après digestion à la trypsine.

Identité	Nombre d'aa	MW [kDa]	pI
Métalloprotéase (<i>empA</i>)	725	78	5,11
Protéine conservée de fonction inconnue	535	55,3	4,36
Altérocine, activité antibiofilm potentielle	139	15,7	5,01
Phosphatase alcaline	600	63	4,5
TolC (canal de transport)	452	49,1	5,29
DegQ (endoprotéase périplasmique)	450	47,5	5,36
Perméase, transport ABC	350	37,8	9,33
Protéine conservée et exportée de fonction inconnue	80	8,7	4,22
GlnA (glutamine synthétase)	468	51,8	5,08
SecY (sous-unité d'une translocase)	442	48,2	9,39

Ce résultat nous conforte dans l'idée que la bande possédant une masse d'environ 14 kDa observée dans la fraction 50 % correspond à l'altérocine. Cependant, il nous indique également que la protéine n'est que partiellement purifiée, et que plusieurs protéines sont présentes dans E_{3J6}, bien qu'une seule protéine soit visible sur gel SDS-PAGE. Il sera donc nécessaire de purifier totalement l'altérocine par la suite afin de pouvoir étudier sa structure par résonance magnétique nucléaire (RMN) par exemple et, à plus long terme, d'envisager son utilisation en thérapeutique.

2.2.2 Détection par des anticorps anti-altérocine

Afin de valider que la bande observée par SDS-PAGE dans E_{3J6} correspondait à l'altérocine, nous avons choisi d'utiliser des anticorps spécifiques. L'utilisation d'anticorps permet de cibler spécifiquement l'altérocine et apporte une meilleure sensibilité de détection comparé à la coloration au bleu de Coomassie.

Les anticorps ont été produits avec le programme « speedy » d'Eurogentec. Deux séquences peptidiques ont été dessinées à partir de la séquence de l'altérocine (figure 25). Elles se trouvent sur la partie la plus hydrophile de la protéine, partie susceptible d'être exposée en surface de la protéine en milieu aqueux. Puis, à partir de ces séquences, deux peptides ont été synthétisés, conjugués à la protéine porteuse KLH et injectés chez deux lapins afin de développer les anticorps. Des prélèvements de sérum ont été effectués à J21 et J28 et lors du dernier prélèvement, une purification des anticorps a été effectuée.

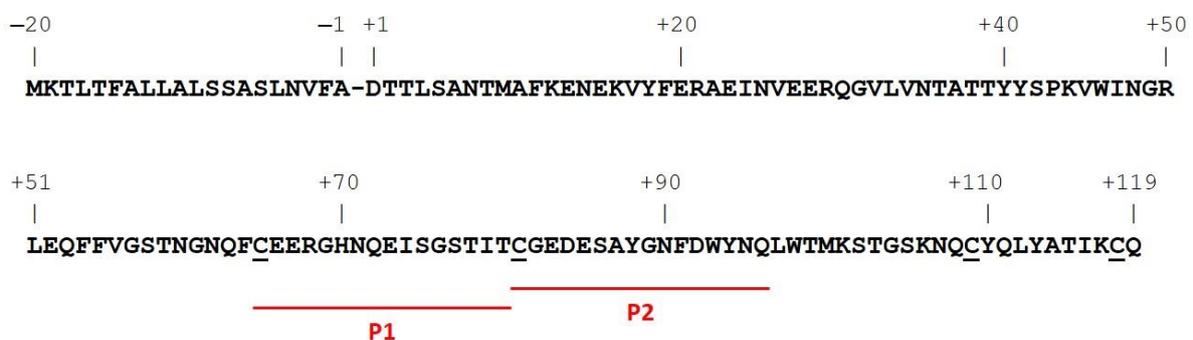


Figure 25 : Séquences peptidiques utilisées pour produire les anticorps spécifiques de l'altérocine. Les séquences P1 et P2 (rouges) ont été dessinées à partir de la séquence de l'altérocine.

Afin de s'assurer de l'efficacité des anticorps, un test liaison des anticorps sans dénaturation préalable (dot blot) a été effectué avec les peptides P1 et P2, utilisés lors du protocole d'immunisation. De l'eau ultrapure comme témoin négatif et E_{3J6} ont également été ajoutés au test. Lors de ce test, seule une liaison a été observée avec les anticorps issus du peptide P1 (figure 26). Il semble donc que le peptide P2 soit moins immunogène et ne permette pas une détection par dot blot. Seuls les anticorps issus du peptide P1 seront donc utilisés par la suite. Malheureusement, aucune liaison n'avait été détectée dans E_{3J6}, suggérant (i) une absence d'altérocine dans l'extrait, (ii) une quantité insuffisante pour être détectée ou (iii) que la séquence P1 reconnue par les anticorps soit masquée quand l'altérocine est sous sa forme native.

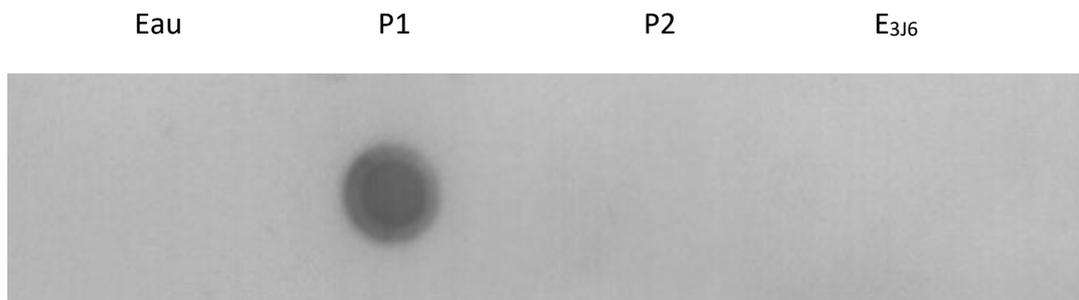


Figure 26 : Détection de l'altérocine par dot blot. Après avoir déposé 1 μ l d'eau, de P1 (30 μ g), de P2 (30 μ g) et 4 μ l de E_{3J6} sur une feuille de nitrocellulose, un ajout des anticorps anti-altérocine purifiés (anti-P1 + anti-P2) puis un ajout des anticorps anti-anticorps de lapin permettant la détection par la phosphatase alcaline ont été effectués.

L'altérocine a par la suite été recherchée par Western blot. Le Western blot, avant liaison des anticorps, comporte une étape SDS-PAGE qui permet de dénaturer les protéines sous leur forme linéaire et ainsi rendre accessible le site d'interaction avec les anticorps. L'altérocine a été recherchée dans SN_{3J6} et E_{3J6} (figure 27). Une seule bande de faible intensité a été observée dans SN_{3J6} et une seule bande de forte intensité à même hauteur a été observée dans E_{3J6}. La détection par Western blot permet donc une détection spécifique et sensible de l'altérocine.

En comparant avec un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, la bande observée en Western blot correspondait bien à celle de 14 kDa présente sur le SDS-PAGE (cf. 2.2.1 Détection par SDS-PAGE (p71)). La bande visualisée sur gel SDS-PAGE correspondait donc à l'altérocine.

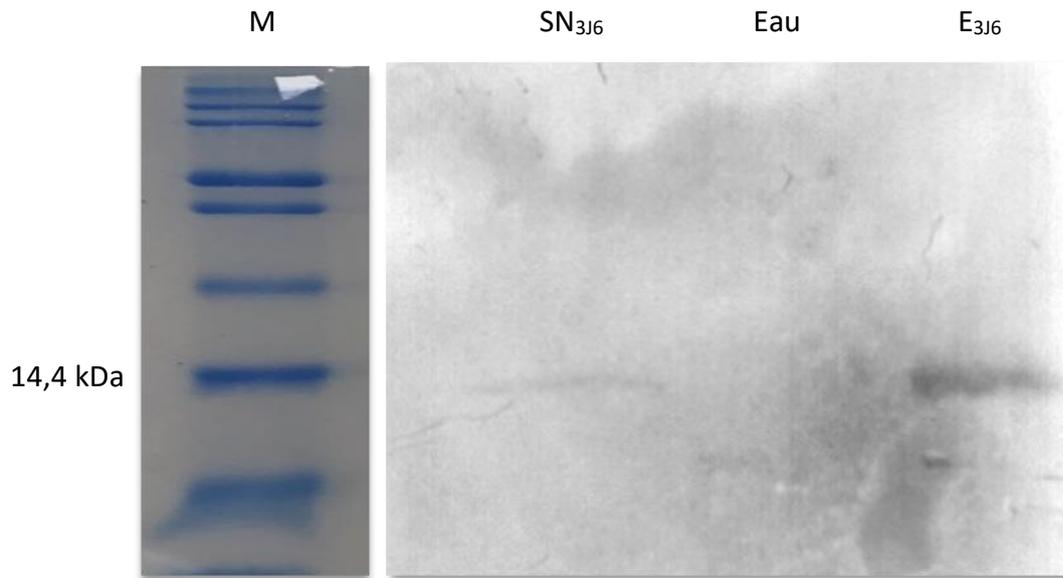


Figure 27 : Détection de l'altérocine par Western blot dans SN_{3J6} et E_{3J6}. M : marqueur Mark12.

Afin de savoir pourquoi l'altérocine n'était pas détectable par dot blot alors qu'elle l'était par Western blot, nous avons préalablement dénaturé la protéine avant de la déposer sur membrane (dot blot). Aucune liaison n'a été visualisée. Il semble donc que ce soit la quantité de E_{3J6} déposée en dot blot qui soit insuffisante pour visualiser l'altérocine et non pas un problème lié à la conformation de la protéine.

L'utilisation des anticorps pour la détection de l'altérocine par Western blot est donc une technique suffisamment sensible nous permettant de détecter l'altérocine dans un extrait concentré et dans un surnageant de culture de 24 h. Elle permet de détecter l'altérocine dans un faible volume de surnageant de culture. Nous avons donc envisagé de regarder la présence de l'altérocine à différents temps de croissance et de mettre les résultats en relation avec ceux des quantifications de l'ARNm du gène *alt* par RT-qPCR. Une manipulation préliminaire a été effectuée sans aboutir à un résultat de qualité suffisante pour réaliser une figure. Les résultats ne sont donc pas montrés ici et la manipulation mérite d'être réalisée à nouveau. Nous avons cependant noté que l'altérocine n'était détectée qu'après 24 h de culture, ce qui indique un pic d'accumulation de l'altérocine à ce temps.

Conclusion

D'après les résultats obtenus dans ce chapitre, l'altérocine semble être une protéine originale puisque qu'aucune homologie de séquence n'est retrouvée dans les bases de données.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'environnement du gène codant cette protéine, *alt*, afin de comprendre la régulation de son expression. Le gène *alt* n'est pas organisé en opéron et n'est donc pas co-transcrit avec d'autres gènes. La fonction des gènes avoisinants est d'ailleurs déjà connue et ne semble pas en lien avec une activité antibiofilm. Un premier promoteur potentiel reconnu par le facteur σ^{70} a été prédit par le logiciel BPROM (Solovyev 2011). Bien que les séquences -10 et -35 se situent trop loin du +1 de transcription identifiée par 5' RACE-PCR, il est envisageable que ce promoteur soit actif dans d'autres conditions que celles de notre étude. En prenant en compte le +1 de transcription, des séquences (TTAAC-17 pb-TACCAA) proches des séquences consensus reconnues par le facteur domestique σ^{70} (TTGACA-16 à 18 pb-TATAAT), celles-ci pourraient constituer un promoteur faible. Il est cependant possible que ces séquences identifiées ne soient pas fonctionnelles et que le promoteur du gène *alt* soit reconnu par un facteur sigma alternatif de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Dans les conditions de l'étude, l'expression de l'altérocine est régulée et est plus importante en phase stationnaire. Une régulation avec un sigma alternatif actif lors de la phase stationnaire pourrait donc être envisagée. Une régulation avec un activateur/répresseur peut également être possible puisque des séquences répétées inversées sont observées en amont des deux promoteurs potentiels. En prenant en compte l'expression du gène *alt* en fonction de la courbe de croissance, il serait intéressant de réaliser à nouveau une 5' RACE-PCR à 10 h, lorsque l'expression est la plus importante, afin de voir si un autre +1 de transcription est identifié. Il se peut que le gène *alt* possède plusieurs promoteurs et qu'ils ne soient pas actifs aux mêmes moments et dans les mêmes conditions.

Le gène *alt*, dans les conditions étudiées, est plus exprimé lors de la phase stationnaire. L'altérocine ne semble donc pas nécessaire à la croissance de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, mais doit avoir un rôle biologique pendant la phase stationnaire. La protéine pourrait procurer un avantage pour coloniser une niche. Bowman (2007) explique que *Pseudoalteromonas*

influence la formation de biofilm dans différentes niches écologiques, est impliqué dans les interactions de type prédateur au sein de la boucle microbienne et peut être adopté par la flore et la faune marines comme agent de défense. Ainsi, plusieurs espèces de *Pseudoalteromonas* présentent un intérêt particulier pour les algues car de nombreux composés produits par ces espèces permettent d'éviter que les hôtes ne soient submergés par d'autres colonisateurs. De plus, les espèces de *Pseudoalteromonas* sont très efficaces pour former des biofilms et coloniser leur niche écologique. Dans un environnement favorable à la formation de biofilm ou lors de la phase stationnaire, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pourrait produire l'altérocine afin de faciliter la colonisation d'un environnement en éliminant le biofilm des autres souches présentes et pérenniser sa propre colonisation en empêchant tout nouveau biofilm d'une autre souche bactérienne de se former.

Dans un second temps, la protéine a été étudiée. Ses caractéristiques ont été définies par des analyses bioinformatiques. Aucune homologie de séquence avec d'autres protéines de fonctions connues n'a été retrouvée dans les bases de données. Sa conformation tridimensionnelle n'est donc pas encore définie. L'altérocine pourrait former des ponts disulfures car elle possède 4 cystéines. D'après les prédictions informatiques, la protéine posséderait un peptide signal permettant sa sécrétion et aurait un poids moléculaire de 13,6 kDa. Afin de valider cette prédiction et connaître la structure tridimensionnelle de l'altérocine, il est essentiel de la purifier, ce qui nécessite de la détecter facilement.

Une purification partielle et concentration de l'altérocine avaient préalablement été effectuées sur cartouche C18 par SPE (Klein 2011, Simon 2015). Cependant la détection de la protéine a été optimisée. Pour cela, une concentration plus importante des surnageants de culture ainsi que l'obtention d'anticorps anti-altérocine ont permis une détection spécifique par Western blot.

Une purification par SPE avec des cartouches échangeuses d'anions et/ou par immunoprécipitation avec les anticorps produits dans cette étude est envisagée pour la suite (Kaboord et Perr 2008). Une synthèse a également été envisagée, cependant, ne connaissant pas précisément le site de coupure du peptide signal ainsi que les ponts disulfures possibles,

cette stratégie a été abandonnée. De plus, la longueur de la protéine engendre un coût de synthèse élevé. Cette stratégie pourrait être envisagée lorsque les domaines actifs et nécessaires à l'activité antibiofilm seront connus. Ainsi, si la protéine pouvait être tronquée tout en conservant son activité, seule une portion de la protéine serait à synthétiser, diminuant le coût de synthèse. Pour ce faire, la technique « alanine-scanning » pourrait être employée. Elle repose sur la substitution individuelle des acides aminés par l'alanine et permet d'identifier les résidus qui sont nécessaires à l'activité (Kortemme et *al.* 2004).

L'étude de la protéine aurait pu nous permettre de nous orienter vers un mode d'action. Cependant, l'absence d'homologie de séquence avec d'autres protéines de fonction connue dans les bases de données laisse entrevoir un mode d'action de l'altérocine original.

Chapitre II : Activité antibiofilm de l'altéroïcine

Introduction	79
1. Démonstration de l'activité antibiofilm de l'altéroïcine	80
1.1 Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> MUC-N1.....	80
1.2 Mutation du gène <i>alt</i>	81
1.3 Production hétérologue de l'altéroïcine chez <i>E. coli</i>	86
1.3.1 Construction des souches et production de l'altéroïcine chez <i>E. coli</i>	86
1.3.2 Activité antibiofilm de l'altéroïcine par production hétérologue chez <i>E. coli</i>	92
1.4 Surproduction et production par des souches du genre <i>Pseudoalteromonas</i>	94
1.4.1 Surproduction de l'altéroïcine chez <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6	94
1.4.1.1 Construction de la souche surproductrice d'altéroïcine <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6(pOriTalt)	94
1.4.1.2 Activité antibiofilm de la souche surproductrice d'altéroïcine <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J6(pOriTalt)	96
1.4.2 Production hétérologue de l'altéroïcine chez <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J3.....	98
1.4.2.1 Construction des souches et production de l'altéroïcine chez <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J3.....	98
1.4.2.2 Activité antibiofilm de l'altéroïcine par production hétérologue chez <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 3J3.....	100
2. Recherche des mécanismes d'action de l'altéroïcine	103
Conclusion	105

Introduction

Lors du premier chapitre, nous avons étudié l'altérocine et son gène *alt*. Le gène a été retrouvé dans plusieurs génomes du genre *Pseudoalteromonas* (Blast, NCBI) et code une protéine dont le rôle est encore inconnu (BLAST, NCBI). Aucune homologie de séquence n'a été retrouvée dans les bases de données entre l'altérocine et des protéines de fonction connue et il se peut donc qu'elle ait une activité antibiofilm comme le prédisent les études menées au LBCM (Simon, travaux non publiés).

Une stratégie souvent utilisée afin de démontrer le lien entre une protéine et un phénotype consiste à inactiver le gène la codant. Ainsi, la mutagénèse ne nécessite pas de posséder la protéine pure, comme c'est le cas dans notre étude, et elle permet de s'affranchir de biais comme l'intervention d'autres molécules présentes dans le surnageant de culture permettant l'activité antibiofilm. Cette première stratégie a donc été envisagée ainsi que deux autres stratégies : une production hétérologue ainsi qu'une surproduction homologue.

L'activité antibiofilm a été testée en système de chambres à flux permettant une étude du biofilm en condition dynamique. L'observation des biofilms au MCBL permet d'obtenir des images 3D du biofilm et, après traitement de ces images, de déterminer certaines caractéristiques du biofilm. La souche cible utilisée sera la souche *P. aeruginosa* MUC-N1, une souche clinique isolée d'expectorations d'un patient atteint de mucoviscidose. Elle avait en effet montré une forte sensibilité au SN_{3J6} (Simon, 2015).

1. Démonstration de l'activité antibiofilm de l'altérocine

1.1 Biofilm de *P. aeruginosa* MUC-N1

La souche *P. aeruginosa* MUC-N1 ainsi que d'autres souches cliniques de la même espèce ont été isolées lors d'une campagne de prélèvements de patients atteints de mucoviscidose. Les biofilms formés par certaines de ces souches ainsi que leur sensibilité au SN₃₁₆ ont été étudiés lors d'une étude menée par Simon (2015) (article en révision).

Le biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1, souche mucoïde donc surproductrice d'alginate, a été étudié en chambres à flux. Après 2 h d'adhésion en eau physiologique sans flux puis 24 h de culture sous un flux de LB (2,5 ml/h), le biofilm a été observé au MCBL. Il présentait une structure hétérogène avec des formes en champignon et possédait un biovolume de $4,20 \pm 1,1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ et une épaisseur moyenne de $10,9 \pm 4,9 \mu\text{m}$. Certains composants de la matrice ont été observés (figure 29). L'alginate (coloré en bleu sur figure 29A) était prédominant à travers tout le biofilm alors que Psl (coloré en rouge sur la figure 29A) se situait à la base du biofilm. L'ADNe était présent à travers tout le biofilm (coloré en rouge sur la figure 29B).

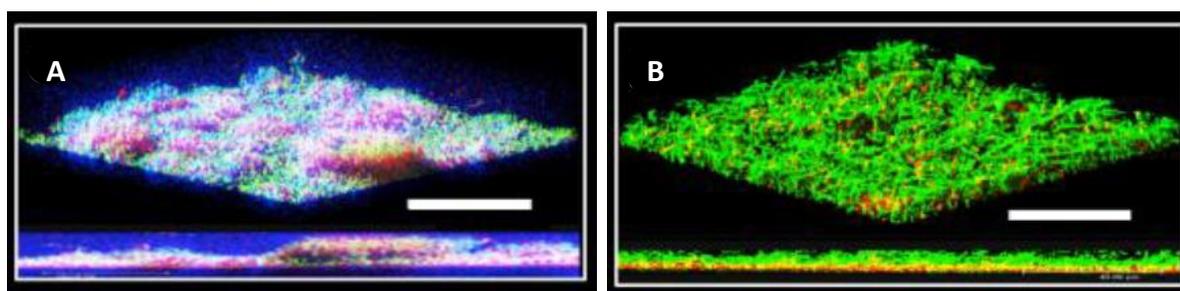


Figure 28 : Caractérisation du biofilm de la souche *P. aeruginosa* MUC-N1. Le biofilm a été observé au MCBL après 24 h de culture en chambres à flux sous un flux de LB (2,5 ml/h). Les bactéries ont été marquées au Syto9 (vert), les polysaccharides β (alginate) au calcofluor white (bleu) (A), l'ADNe avec le DDAO (rouge) (B) et Psl avec le TRITC (rouge) conjugué à la lectine HHA (A). L'échelle correspond à 67 μm . (Simon 2015)

Dans cette étude, le biofilm de *P. aeruginosa* MUC-N1 a été cultivé dans les mêmes conditions que celles utilisées par Simon (2015). Il ne présente pas les formes en champignon bien

définies observées dans l'étude précédente, mais est hétérogène (figure 29). Le biovolume est de $4,1 \pm 2,5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ et l'épaisseur moyenne est de $8,1 \pm 4,1 \mu\text{m}$. Le biovolume est similaire et l'épaisseur moyenne est légèrement inférieure aux valeurs trouvées dans l'étude précédente.

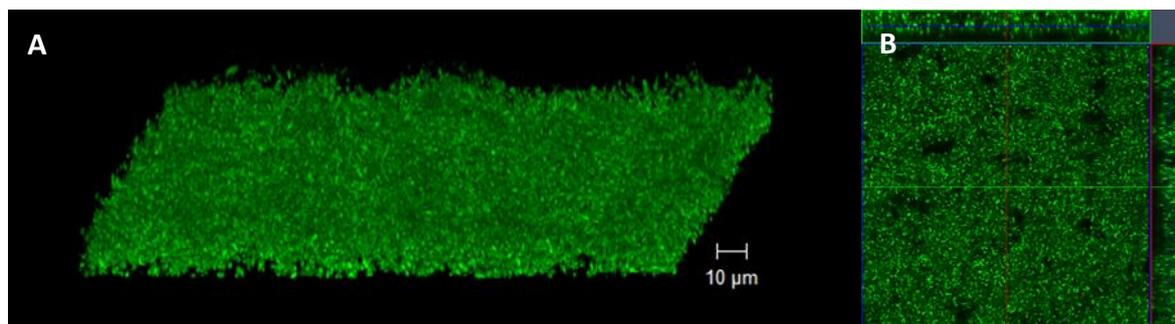


Figure 29 : Observation du biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1. Le biofilm a été observé au MCBL après 24 h de culture en chambres à flux sous un flux de LB (3 ml/h). Les bactéries ont été marquées au Syto9. A : vue 3D. B : vue 2D

Durant cette étude, nous avons parfois eu des difficultés à visualiser le biofilm car la formation d'un « voile » blanchâtre à l'intérieur des chambres à flux a limité la visibilité des biofilms conduisant parfois à une invalidation des manipulations. L'hypothèse de la contamination par un microorganisme avait été écartée. Est-ce que cela correspond à une production d'EPS importante ? Il semblerait que ce voile puisse provenir d'une réaction avec le sel. En diminuant la quantité de sel dans le milieu LB (10 à 5 g/l), ce voile disparaissait.

1.2 Mutation du gène *alt*

Une stratégie souvent utilisée afin d'observer le rôle d'une protéine est d'inactiver son gène. Les outils moléculaires disponibles pour la mutagenèse de bactéries marines dont celles du genre *Pseudoalteromonas* restent encore limités. Nous avons choisi de nous baser sur un protocole déjà établi (Wang et al. 2015). La stratégie de cette mutagenèse dirigée repose sur une double recombinaison homologe (figure 30). Nous avons cependant décidé d'ajouter une étape en insérant un gène de résistance à la gentamicine afin de faciliter la sélection des

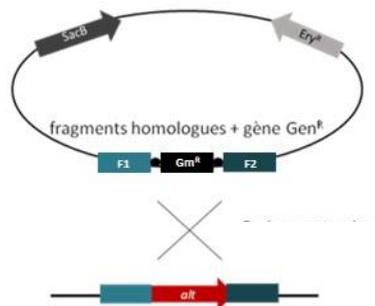
clones dans lesquels la deuxième recombinaison provoque la mutation. Le second événement de recombinaison homologue peut en effet entraîner soit un retour au phénotype normal, soit la mutation désirée (figure 30-3). La stratégie de Wang et *al.* (2015), n'incluant pas cette étape, entraînait la vérification de nombreuses colonies par PCR, alors que l'insertion d'une cassette de résistance permet au contraire de ne sélectionner que les clones dont le gène *alt* est délété lors de la mise en culture des transformants sur gélose sélective.

La première étape consistait en la construction d'un plasmide recombinant contenant les régions flanquantes du gène *alt* et une cassette de résistance à la gentamicine (Gm^R + régions *lox* issues du plasmide pUCGm-lox (PUBMED accession number AY906831)) insérée entre les deux régions flanquantes. Le plasmide recombinant est alors composé des régions flanquantes nécessaires à la recombinaison homologue au niveau du gène *alt*, d'un gène de résistance à un antibiotique, ici à l'érythromycine, afin de sélectionner les transformants de la première recombinaison, du gène *sacB* permettant d'éliminer les cellules n'ayant pas réalisé le second événement de recombinaison en présence de saccharose, et de la cassette de résistance à la gentamicine permettant de sélectionner les clones possédant la délétion du gène à l'issue de la seconde recombinaison (figure 30-1).

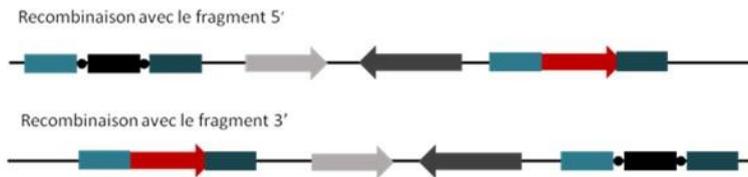
Par la suite, la transformation de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 par le plasmide recombinant est réalisée par conjugaison. Le premier événement de recombinaison permet l'intégration du plasmide recombinant dans le génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (figure 30-2). Le plasmide recombinant étant suicide chez *Pseudoalteromonas*, seules les bactéries l'intégrant dans leur génome seront résistantes à la gentamicine et à l'érythromycine. La deuxième recombinaison permet de déléter le gène *alt* du génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Afin de provoquer cet événement, du saccharose est ajouté au milieu de culture, et sera dégradé par une levansucrase. Cette dernière est codée par le gène *sacB* présent sur une portion du plasmide intégré au chromosome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Le produit de dégradation du saccharose par SacB est toxique pour la plupart des bactéries à Gram négatif. Seule une seconde recombinaison homologue entraînant l'excision du plasmide et par conséquent du gène *sacB* permettra une croissance bactérienne sur un milieu contenant du saccharose. Deux clones peuvent alors être obtenus, un de type sauvage et un de type muté (figure 30-3). L'ajout de la cassette gentamicine permet la sélection des clones étant déletés du gène *alt* puisque,

possédant la cassette, ils vont croître dans un milieu supplémenté en gentamicine contrairement au clone de type sauvage. Le gène codant la résistance à la gentamicine pourra par la suite être excisé grâce à une recombinase reconnaissant spécifiquement les sites *lox* (30-4). Ainsi, la différence entre la souche sauvage et le mutant sera uniquement due à la délétion du gène *alt*.

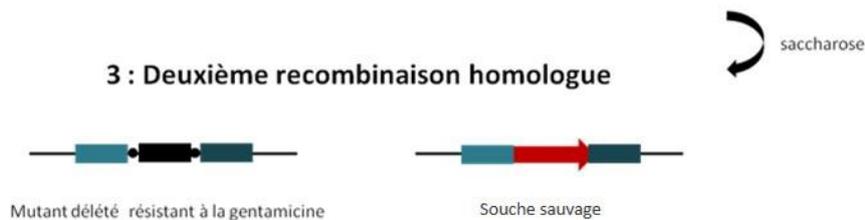
1 : Construction du plasmide suicide



2 : Première recombinaison homologue



3 : Deuxième recombinaison homologue



4 : Délétion de la résistance à la gentamicine



Figure 30 : Stratégie de mutagenèse utilisée pour déléter le gène *alt* de son génome. 1 : un plasmide suicide contenant le gène de résistance à la gentamicine (Gm^R) entre les régions flanquantes au gène *alt* (F1 et F2) a été construit. 2 : une première recombinaison homologue a lieu via les régions flanquantes et permet d'insérer le plasmide dans le chromosome. 3 : une deuxième recombinaison a lieu grâce au saccharose et permet la délétion du gène *alt* du chromosome. Les clones sont sélectionnés grâce à la résistance à la gentamicine. 4 : Délétion du gène de la résistance à la gentamicine à l'aide du système Cre/*lox*. (Inspirée de Wang et al. 2018)

Le plasmide recombinant permettant la double recombinaison a été construit à partir du vecteur suicide chez *Pseudoalteromonas* pK18mobsacB-Ery (figure 31). Il possède également des gènes nécessaires à notre stratégie de mutagenèse : un gène de résistance à l'érythromycine (Ery^R), les gènes permettant la conjugaison, ainsi que le gène *sacB*.

Des régions flanquantes au gène *alt* et une cassette de résistance à la gentamicine y ont été insérées de la manière suivante : les régions flanquantes du gène *alt* ont dans un premier temps été amplifiées par PCR à partir de l'ADN de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. La première région flanquante située du côté 5' de *alt* a été amplifiée à l'aide des amorces 5'-AAggatccAGCATAAGTGAAACCGTGCA-3' et 5'-AAtctagaTATCTTTTCCTTTAGTTGAATG-3' générant un fragment de 700 pb pouvant être digéré au niveau des extrémités 5' et 3' respectivement par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Xba*I (site de reconnaissance souligné). La seconde région flanquante située du côté 3' de *alt* a été amplifiée par les amorces 5'-AAtctagaAATATTCAATTGTAACCCTATGC-3' et 5'-AAgctagcAGGCACAAGAACAGCGCG-3' générant un fragment de 1041 pb pouvant être digéré au niveau des extrémités 5' et 3' respectivement par les enzymes *Xba*I et *Nhe*HI (site de reconnaissance souligné). Ces deux fragments ont été digérés par l'enzyme *Xba*I afin de les lier l'un à l'autre, puis le fragment de 1741 pb généré a été cloné dans le plasmide pK18mobsacB-Ery en *Bam*HI et *Nhe*HI pour donner le plasmide pk18-Ery-*alt*. La cassette gentamicine (Gm^R et les séquences *lox*) provenant de pUCGmlox a ensuite été clonée dans le plasmide pk18-Ery-*alt* au niveau du site de restriction de *Xba*I afin d'obtenir le plasmide pk18-*alt*-GMlox (figure 31).

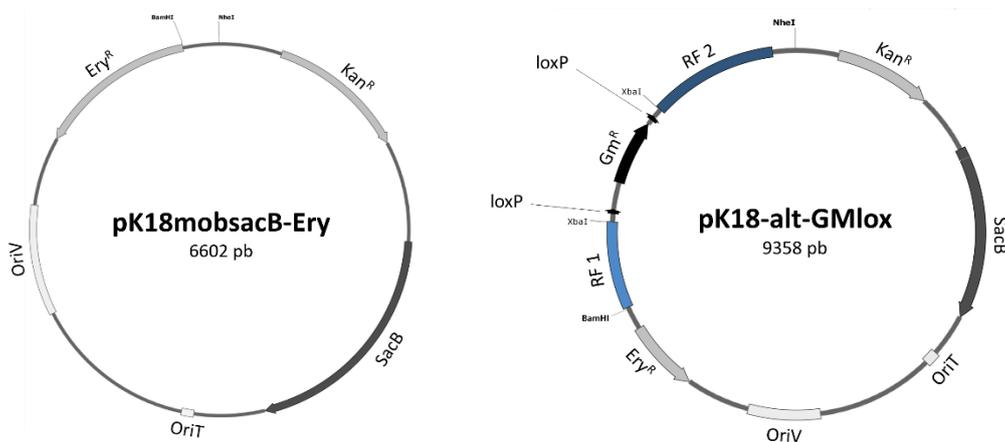


Figure 31 : Plasmides utilisés pour la mutagenèse du gène *alt*. Le plasmide pK18-*alt*-GMlox a été construit à partir du plasmide pK18mobsacB-Ery. Un gène de résistance à la gentamicine encadré par des séquences *lox* et des régions flanquantes au gène *alt* (RF1 et RF2) y ont été insérés.

Après sa construction, le plasmide pk18-alt-GMlox a été introduit dans la souche *E. coli* GEB883 dite donneuse, afin d'effectuer la conjugaison avec *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Les clones ayant subi la première recombinaison ont été sélectionnés sur gélose supplémentée en érythromycine. Malheureusement, aucun clone n'a été obtenu. Plusieurs causes sont possibles, l'événement de recombinaison pouvait être trop peu fréquent par rapport au nombre de transconjugants si par exemple la taille des fragments homologues n'était pas suffisante, si les deux souches, *E. coli* GEB883 contenant le plasmide pk18-alt-GMlox (donneur) et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (receveur) n'étaient pas en quantités suffisantes ou si leurs proportions n'étaient pas optimales. Nous avons donc tenté différentes proportions donneur/receveur (1 : 1 ; 1 : 2 ; 10 : 1) et travaillé avec des volumes de cultures allant de 1 ml à 10 ml, sans succès. Une conjugaison triparentale avec une souche helper afin de faciliter le transfert de plasmide a également été testée, mais n'a pas non plus permis d'obtenir des recombinants. Il se pourrait donc que la taille de la séquence d'ADN permettant la recombinaison homologue soit insuffisante et de nouveaux plasmides devront être réalisés. Une autre possibilité est que la conjugaison ne soit pas assez efficace. D'après Wang et al. (2015), la fréquence de transfert entre *E. coli* et *Pseudoalteromonas* oscillait entre $1,6 \cdot 10^{-3}$ et $1,1 \cdot 10^{-6}$ selon les souches. Un nouveau protocole permettant d'introduire de l'ADN exogène chez *Pseudoalteromonas* par électroporation a récemment été mis au point et pourrait être testé (Delavat et al. 2018).

Ne parvenant pas à muter le gène *alt* chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, nous nous sommes orientés vers une autre stratégie, la production hétérologue de l'altérocine chez une souche bactérienne ne présentant pas d'activité antibiofilm.

1.3 Production hétérologue de l'altérocine chez *E. coli*

Afin de permettre la production hétérologue de l'altérocine, nous avons opté pour la bactérie *E. coli*. Cette espèce est l'un des premiers organismes utilisés pour la production de protéines recombinantes et représente aujourd'hui l'un des organismes procaryotes les plus utilisés pour les manipulations génétiques, ainsi que pour la production industrielle de protéines thérapeutiques ou d'intérêt commercial (Baneyx et Mujacic 2004). *E. coli* offre plusieurs avantages dont une croissance rapide sur des sources de carbone à faible coût et une génétique bien connue permettant de faciliter le clonage et l'expression de gènes.

1.3.1 Construction des souches et production de l'altérocine chez *E. coli*

Afin de produire l'altérocine chez *E. coli*, nous avons choisi d'utiliser le plasmide pRSETC (figure 32). Ce vecteur d'expression est dérivé des plasmides pUC, lesquels sont conçus pour obtenir une expression importante chez *E. coli* des protéines issues des gènes clonés ainsi qu'une purification facilitée.

Les séquences d'ADN clonées dans le vecteur pRSETC sont fortement exprimées grâce à la présence du promoteur T7. Les fragments d'ADN sont insérés dans un site de clonage multiple (MCS) de façon à fusionner le gène à exprimer avec l'extrémité 5' d'un gène commençant par le codon d'initiation de la traduction ATG et codant une étiquette polyhistidine, l'épitope Xpress™, la séquence de reconnaissance du clivage par l'entérokinase (EK). Ce gène est précédé par un site de fixation des ribosomes (RBS). L'étiquette polyhistidine, grâce à son domaine de liaison au nickel, permet la purification des protéines recombinantes par chromatographie d'affinité sur nickel immobilisé sur résine et la détection avec des anticorps anti-HisG. L'épitope Xpress™ permet une détection avec des anticorps Xpress™. Le site de reconnaissance du clivage par l'entérokinase est situé entre l'étiquette polyhistidine et la protéine recombinante, il permet d'éliminer ultérieurement l'ensemble des acides aminés de ces différentes étiquettes qui ne fait pas partie de la protéine recombinante purifiée. Le MCS permet l'insertion du gène d'intérêt et facilite le clonage dans le cadre de lecture du gène codant les étiquettes.

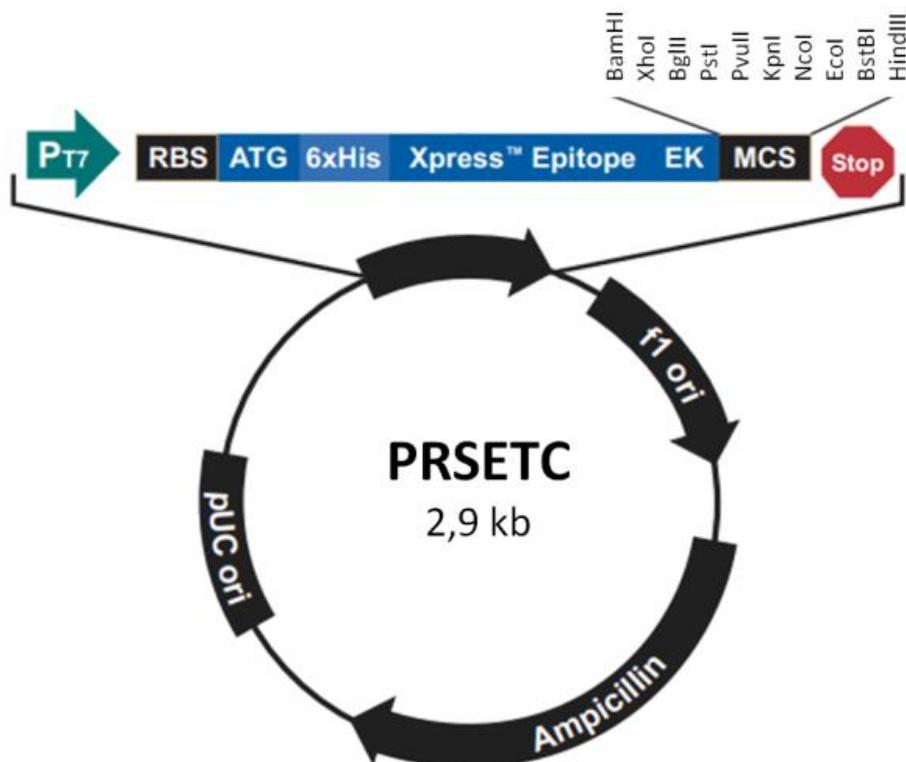


Figure 32 : Vecteur PRSETC. Il se compose d'une origine de réplication pUC permettant un fort nombre de copies par bactérie et une réplication chez *E. coli*, un gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase) pour la sélection des souches possédant le plasmide, une origine de réplication f1 et d'une séquence fusion sous le contrôle du promoteur P_{T7} . Cette séquence fusion se compose du RBS, d'un codon d'initiation de la traduction ATG, du gène codant pour une étiquette polyhistidine, d'un épitope Xpress™, d'un site de coupure à l'entérokinase. (pRSET A,B, and C, Invitrogen 2010)

L'expression de l'altérocine sera donc placée sous le contrôle de P_{T7} , promoteur fort du phage T7. Afin de commencer la transcription, l'ARN polymérase T7 doit se fixer à P_{T7} et doit donc être délivrée chez la souche possédant le plasmide afin de permettre la production de la protéine recombinante. Pour cela, deux stratégies sont envisageables, infecter les cellules avec le phage exprimant la polymérase ou utiliser une souche possédant le gène codant la polymérase dans son génome. Nous avons opté pour la seconde stratégie car nous possédions déjà la souche *E. coli* BL21(DE3), qui permet une expression du gène d'intérêt sous induction à l'IPTG.

La souche *E. coli* BL21(DE3) permet l'expression du gène d'intérêt en réponse à une induction par de l'IPTG car cette souche intègre dans son chromosome une partie du génome du bactériophage lambda lysogène DE3. Celui-ci contient le gène *lacI*, le gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur *lacUV5* et un petit fragment du gène *lacZ*. La protéine LacI codée par *lacI* inhibe la transcription du gène codant l'ARN polymérase T7 en

absence d'IPTG en se fixant sur une courte séquence d'ADN en aval de *placUV5*. En présence d'IPTG, LacI se lie à l'IPTG et devient incapable de se fixer à l'ADN. L'ARN polymérase transcrit alors le gène codant l'ARN polymérase T7. Cette construction est insérée dans le gène *int* de la souche *E. coli* BL21(DE3), ce qui inactive le gène *int* et permet de prévenir l'excision du prophage.

Les constructions moléculaires ont été réalisées à l'aide du plasmide pRSETC (figure 33). Deux stratégies ont été établies. Une première stratégie a été de cloner le gène *alt* entier dans le plasmide sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG afin de récupérer l'altérocine dans le surnageant de culture d'*E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt (figure 33), en considérant que les systèmes de sécrétion soient les mêmes chez *E. coli* et *Pseudoalteromonas*. Si le peptide signal hypothétique s'avère véridique, une purification avec l'étiquette polyhistidine ne sera pas possible car elle sera clivée avec le peptide signal. La deuxième a été de cloner le gène *alt* sans le peptide signal afin d'obtenir l'altérocine dans les cellules d'*E. coli* BL21(DE3)pRSETChaltwlh (figure 33).

Le gène *alt* a été amplifié à l'aide des amorces 5'- TTAGgatccATATGAAGACTTACTTTTCG -3' et 5'- ATATAagccttACTGACACTTTATAGTTGC-3' générant un fragment de 430 pb pouvant être digéré au niveau des extrémités 5' et 3' respectivement par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (site de reconnaissance souligné). Le gène *alt* sans sa partie 5' codant le peptide leader a été amplifié avec les amorces 5'- TTAGgatccATATGGATACAACGCTTTCAGC-3' et 5'- ATATAagccttACTGACACTTTATAGTTGC-3' générant un fragment de 410 pb pouvant être digéré au niveau des extrémités 5' et 3' respectivement par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III (site de reconnaissance souligné). Ces deux fragments ont été digérés par les enzymes *Bam*HI et *Hind*III et clonés dans les sites correspondants de pRSETC pour donner les plasmides pRSETCalt et pRSETaltwlh.

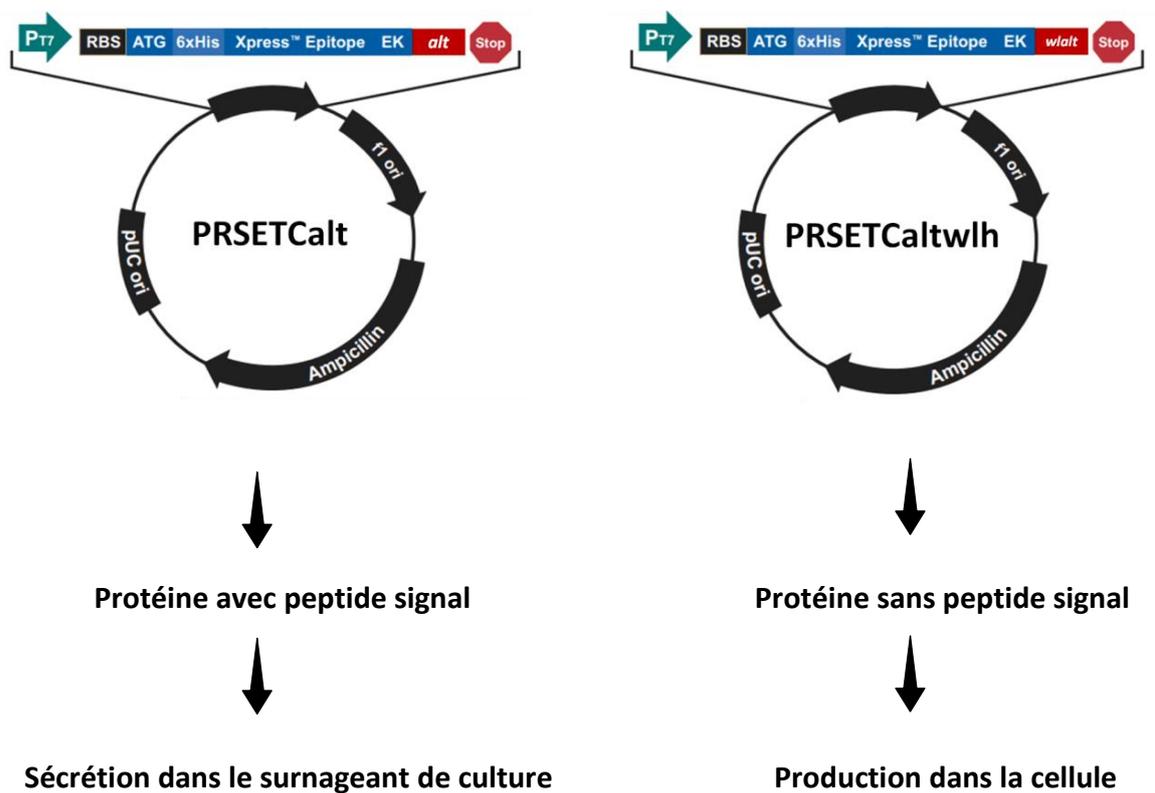


Figure 33 : Plasmides construits pour la production hétérologue de l'altérocine par *E. coli*. PRSETCalt contient le gène *alt*, l'altérocine sera sécrétée dans le milieu de culture. PRSETCaltwlh contient le gène *alt* sans le peptide signal hypothétique, l'altérocine sera présente dans le cytoplasme avec une étiquette polyhistidine permettant une purification rapide.

Dès l'étape de construction du plasmide, une difficulté est apparue et a stoppé la deuxième stratégie. La séquence du gène *alt* amplifiée par PCR qui devait s'insérer au niveau du site de restriction *Bam*HI, derrière le site de coupure à l'entérokinase, s'insérait malheureusement au niveau d'une séquence ressemblant fortement au site de restriction de l'enzyme *Bam*HI (figure 34). Ceci a décalé le cadre de lecture ne permettant pas une traduction correcte du gène et empêchant une production d'altérocine chez la souche *E. coli* BL21(DE3)pRSETCaltwlh (figure 34). L'autre construction moléculaire a en revanche été validée.

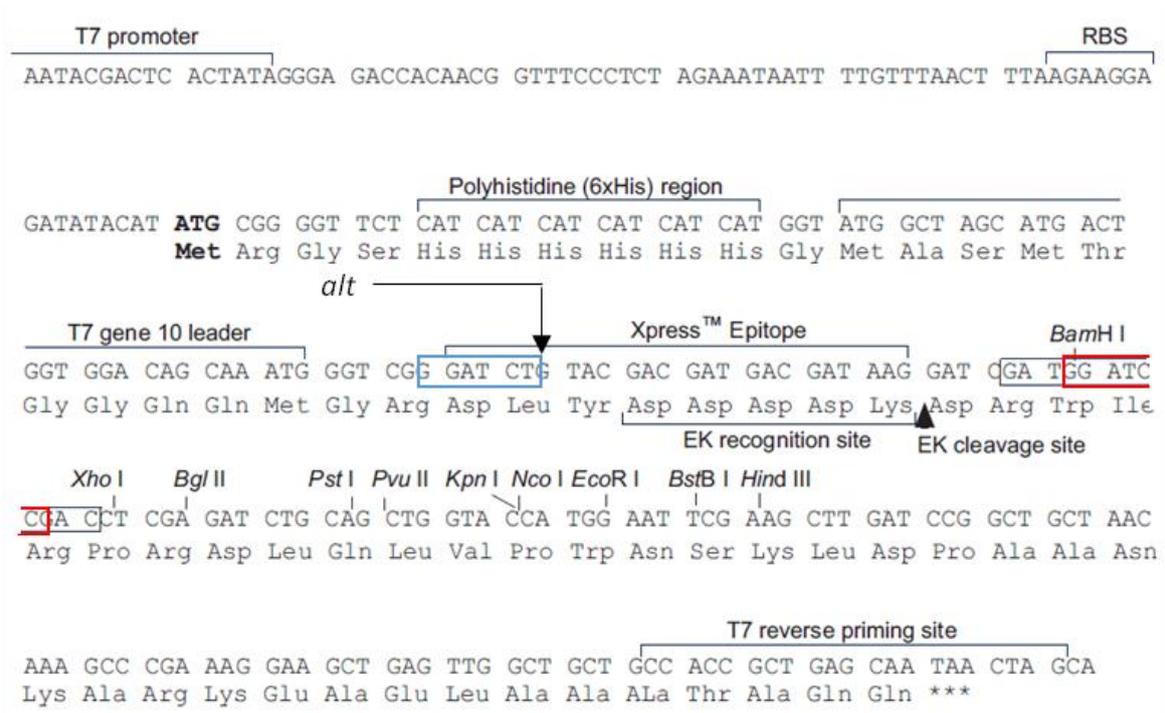


Figure 34 : Clonage du gène *alt* sans peptide leader dans le plasmide PRSETC. Site multiple de clonage du plasmide avec le site de restriction BamHI dans le cadre rouge et une séquence lui ressemblant fortement dans le cadre bleu.

Afin de s'assurer que la nouvelle souche construite produise l'altérocine, sa production a été recherchée par gel SDS-PAGE. Les protéines présentes dans les SN des souches *E. coli* BL21(DE3)pRSETC (témoin) et *E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt ont préalablement été précipitées afin de les concentrer. Aucune augmentation de la production n'a été observée dans les culots bactériens et dans les SN à la suite de l'ajout d'IPTG, semblant indiquer qu'aucune induction n'opérait. Cependant une bande aux alentours de 14 kDa a été observée dans le SN de la souche *E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt après 24 h de culture avec et sans ajout d'IPTG. Un Western blot a alors été réalisé afin de confirmer que la bande observée correspondait à l'altérocine. Aucune bande n'était observée dans l'extrait concentré du témoin négatif, $E_{BL21(DE3)pRSETC}$, alors qu'une bande apparaissait dans $E_{BL21(DE3)pRSETCalt}$ (figure 35). La souche BL21(DE3)pRSETCalt produit donc l'altérocine.

E_{BL21(DE3)pRSETC} E_{BL21(DE3)pRSETCalt}



Figure 35 : Détection de l'altérocine chez *E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt. Après concentration par un facteur 100, les extraits ont été analysés par Western blot.

Plusieurs paramètres expérimentaux ont été modifiés afin d'obtenir une induction à l'IPTG, sans succès. Afin de vérifier que l'IPTG utilisé n'était pas dégradé à la suite d'une mauvaise conservation ou autre, nous avons testé un témoin positif, une souche construite avant cette étude et possédant un gène sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG. Une induction a été observée et l'efficacité de l'IPTG a donc été validée. Un ajout d'ampicilline a également été effectué en même temps que l'ajout l'IPTG afin d'être certain qu'*E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt ne perde pas son plasmide. Il est parfois possible que lors d'une production de la protéine recombinante en quantité trop importante, des corps d'inclusion se forment (Betton et Chaffotte 2005; Baneyx et Mujacic 2004). Ces corps d'inclusion consistent en une agrégation de protéines recombinantes dénaturées, car en excès elles ne peuvent se replier correctement ou pas suffisamment rapidement. Pour éviter cela, la production en altérocine a été ralentie en diminuant la concentration en IPTG afin de réduire l'expression du gène *alt*, et en baissant la température d'incubation afin de ralentir la croissance bactérienne.

Aucune induction de l'expression du gène *alt* par l'IPTG n'a été observée chez la souche *E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt mais l'altérocine était cependant produite probablement en raison d'une fuite transcriptionnelle. L'objectif de cette production hétérologue étant de valider l'activité antibiofilm de l'altérocine, l'activité du surnageant de culture SN_{BL21(DE3)pRSETCalt} produit par *E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt, et du surnageant de culture SN_{BL21(DE3)pRSETC} produit par la souche témoin *E. coli* BL21(DE3)pRSETC, ont été comparés.

1.3.2 Activité antibiofilm de l'altérocine par production hétérologue chez *E. coli*

Après 24 h de culture à 37°C sous une agitation de 125 rpm, les surnageants de culture des deux souches, *E. coli* BL21(DE3)pRSETC et *E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt ont été récoltés. Les tests d'activité antibiofilm ont été réalisés sur le biofilm de la souche clinique *P. aeruginosa* MUC-N1 en chambres à flux. Après 2 h d'adhésion en l'absence de flux et en présence du SN_{BL21(DE3)pRSETCalt} ou SN_{BL21(DE3)pRSETC}, puis 24 h de développement sous un flux de milieu nutritif LB à 37°C, les biofilms ont été marqués au Syto9 et observés au MCBL.

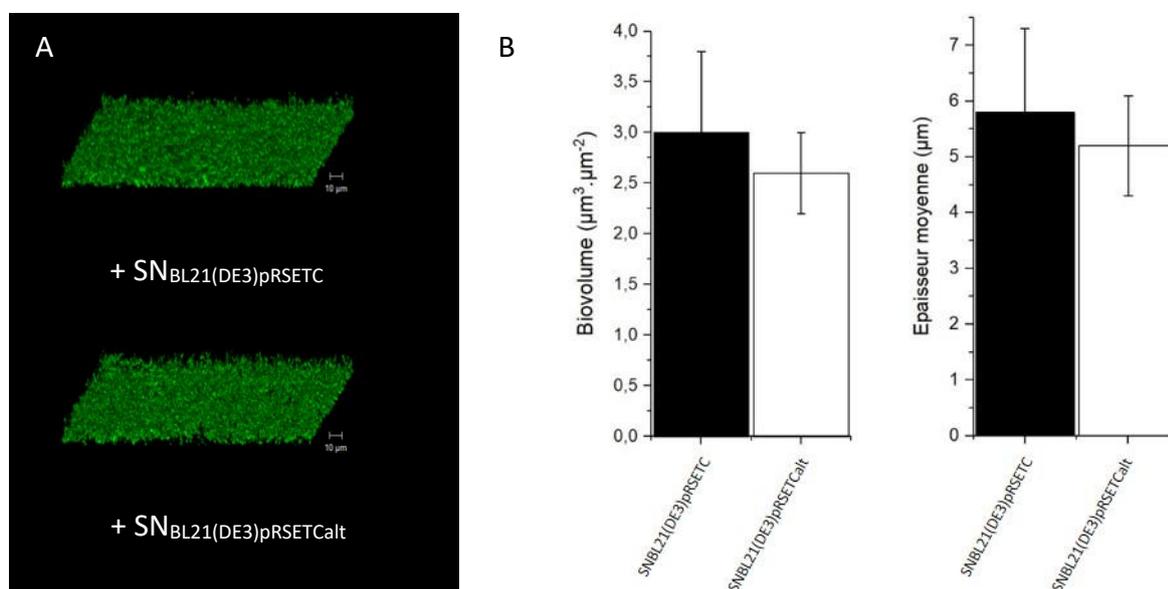


Figure 36 : Effet de l'altérocine produite par *E. coli* BL21(DE3)pRSETCalt sur le biofilm formé en chambres à flux par *P. aeruginosa* MUC-N1. L'adhésion a été réalisée en condition statique durant 2 h en présence des différents échantillons. Les biofilms ont ensuite été cultivés en LB, à 37°C avec un flux de 3 ml/h. A : Observation au MCBL après marquage au Syto9. B : Biovolume et épaisseur moyenne des biofilms après traitement par le logiciel COMSTAT/Matlab.

Visuellement, les biofilms formés en présence du témoin, SN_{BL21(DE3)pRSETC}, et du surnageant de culture de la souche productrice d'altérocine, SN_{BL21(DE3)pRSETCalt}, semblaient similaires, plutôt hétérogènes mais sans structures montantes de type champignon (figure 36A). Après traitement des images avec le logiciel COMSTAT (Heydron et *al.* 2000), le biovolume et l'épaisseur moyenne du biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1 ont été obtenus (figure 36B). Une très légère diminution du biovolume et de l'épaisseur moyenne est observée. Cependant,

cette diminution étant très faible et non statistiquement significative, nous pouvons considérer qu'aucune activité antibiofilm n'était présente dans le SN_{BL21(DE3)_{pRSETCalt}}.

Aucune activité antibiofilm significative n'a donc été décelée dans le SN_{BL21(DE3)_{pRSETCalt}} où la présence d'altérocine avait pourtant été observée. Nous avons alors émis plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce constat. La première était que le gène identifié comme codant l'altérocine n'était pas le bon et que la protéine est dépourvue d'activité antibiofilm. La deuxième était qu'*E. coli* BL21(DE3) ne possède pas les acteurs nécessaires à de possibles modifications post-traductionnelles participant à l'activité de l'altérocine. Il est en effet possible que l'altérocine nécessite une ou des modifications post-traductionnelles que *E. coli* BL21(DE3) ne soit pas en mesure de réaliser. Afin d'être actives, les protéines adoptent une structure 3D particulière avec des ponts disulfures par exemple. Le repliement est facilité par un ensemble d'acteurs (Betton et Chaffotte 2005). Chez *E. coli*, il n'est pas rare que les protéines soient mal repliées (Baneyx et Mujacic 2004). Il est possible que *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 possède un acteur nécessaire au repliement de l'altérocine que *E. coli* ne possède pas. Il se peut aussi que *E. coli* et *Pseudoalteromonas* possèdent des systèmes de sécrétion différents et que l'altérocine soit sécrétée chez *E. coli*, mais que la reconnaissance et la coupure du peptide signal soient différentes et engendrent l'inactivité de la protéine. Une dernière hypothèse était que, bien que le gène *alt* ne semble pas faire partie d'un opéron, l'altérocine nécessite d'autres molécules produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pour engendrer une activité antibiofilm. L'hypothèse que l'altérocine soit en quantité insuffisante pour exercer son activité a été écartée, puisque la protéine était visible sur gel SDS-PAGE après précipitation des protéines à partir de 10 ml de SN contrairement à *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 où l'activité est présente.

Afin de s'affranchir des éventuelles différences entre *E. coli* et *Pseudoalteromonas* pouvant jouer sur l'activité de l'altérocine, nous avons adopté une nouvelle stratégie, la surproduction de l'altérocine chez la souche naturellement productrice, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

1.4 Surproduction et production par des souches du genre *Pseudoalteromonas*

Comme expliqué précédemment, des modifications post-traductionnelles peuvent être nécessaires à l'activité d'une protéine. Il est donc parfois intéressant de procéder à une surproduction homologue, à savoir une surproduction par la bactérie productrice elle-même, celle-ci possédant déjà tous les acteurs entrant en jeu dans la production de la protéine.

1.4.1 Surproduction de l'altérocine chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

1.4.1.1 Construction de la souche surproductrice d'altérocine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt)

Comme nous l'avons évoqué précédemment, peu d'outils moléculaires sont disponibles chez les bactéries du genre *Pseudoalteromonas*. Nous ne possédons pas de vecteur de surexpression comportant des promoteurs inductibles et la transformation chez ces bactéries reste peu efficace. Comme pour de nombreuses bactéries marines, l'électroporation fonctionne difficilement, nous avons donc opté pour la conjugaison à l'aide d'une bactérie donneuse que nous avons elle-même transformée par un plasmide conjugatif portant le gène *alt* et sa propre région promotrice. Ainsi la bactérie surproduit la molécule d'intérêt grâce à une copie du gène sur le chromosome et l'addition de plusieurs copies plasmidiques.

La surproduction de l'altérocine par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a été réalisée à partir de constructions moléculaires issues du plasmide pOriT-4EM (nommé par la suite pOriT), qui est répliquatif chez *Pseudoalteromonas* (figure 37) (Yu *et al.* 2014). Ce plasmide peut se répliquer chez *Pseudoalteromonas* grâce au gène *repA*. Il possède une origine de l'initiation du transfert (OriT) ainsi que des gènes de résistance à l'ampicilline (Amp^R) et à l'érythromycine (Em^R) pour sélectionner les souches possédant le plasmide.

Tout d'abord, le gène *alt* et sa région promotrice potentielle ont été amplifiés par les amorces 5'-TATgtcgacCTAAACTAGTGAATAAAGTCG -3' et 5'-TATgtcgacTTACTGACACTTTATAGTTGC -3'

généralant un fragment de 600 pb pouvant être digéré au niveau des extrémités 5' et 3' par *Sall* (site de reconnaissance souligné). Ce fragment a été digéré par l'enzyme *Sall* et cloné dans le plasmide pOriT en *Sall* pour donner le plasmide pOriTalt. Le vecteur a par la suite été introduit par choc thermique dans la souche *E. coli* GEB883 afin de réaliser une conjugaison avec *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et d'obtenir la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt), souche surproductrice de l'altérocine. Le plasmide pOriT a été introduit chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 pour obtenir une souche témoin, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriT), évitant ainsi tout biais lié à l'introduction d'un plasmide.

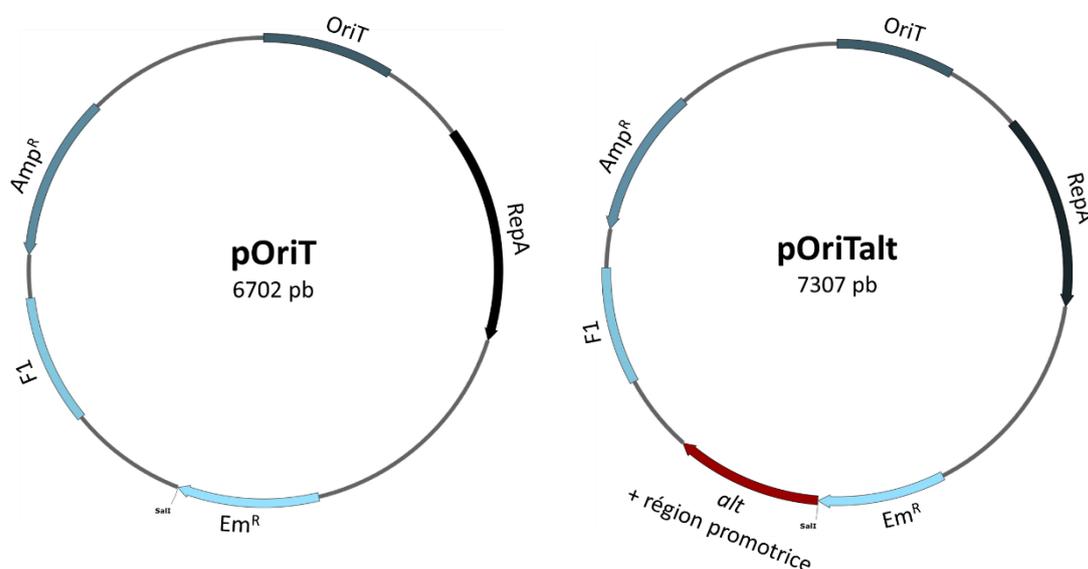


Figure 37 : Plasmide pOriT et pOriTalt. Le plasmide pOriTalt a été construit à partir du plasmide pOriT. Le gène *alt* et sa région promotrice y ont été insérés.

Pour tester l'activité antibiofilm, la culture des deux souches de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 modifiées est réalisée sans antibiotique afin d'éviter leur présence dans le surnageant de culture qui servira à l'expérience. La conservation du plasmide par les cellules a donc été vérifiée lors de la récupération du surnageant de culture. Après 24 h de culture, 86 % des cellules ont conservé le plasmide pOriT alors que seulement 38 % des cellules ont conservé le plasmide pOriTalt. Il semblerait donc que les bactéries se séparent plus facilement du plasmide possédant le gène *alt*. Cela pourrait s'expliquer par un coût énergétique important émis pour la production de l'altérocine qui ne présenterait pas un avantage vital dans les conditions testées. La cellule préférerait alors éliminer le plasmide. Une autre est que

l'altérocine soit toxique à trop forte concentration, la perte du plasmide par une partie de la population bactérienne limiterait la quantité d'altérocine produite.

L'objectif de cette surproduction étant de valider l'activité antibiofilm de l'altérocine, l'activité des surnageants de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt), SN_{3J6(pOriTalt)}, et de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (pOriT), SN_{3J6(pOriT)}, a été testée contre le biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1.

1.4.1.2 Activité antibiofilm de la souche surproductrice d'altérocine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt)

Après 24 h de culture à 37°C sous une agitation de 125 rpm, les surnageants de culture des deux nouvelles souches, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriT) et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt) ont été récoltés. Les tests d'activité antibiofilm ont été réalisés sur le biofilm de la souche clinique *P. aeruginosa* MUC-N1 en chambres à flux. Après 2 h d'adhésion en l'absence de flux et en présence du SN_{3J6(pOriT)} ou SN_{3J6(pOriTalt)} puis 24 h de développement sous un flux de milieu nutritif LB à 37°C, les biofilms ont été marqués au Syto9 puis observés au MCBL.

Visuellement, les biofilms formés en présence du témoin, SN_{3J6(pOriT)}, et du SN_{3J6(pOriTalt)} semblent similaires (figure 38A). Après traitement des images avec le logiciel COMSTAT (Heydron et al. 2000), le biovolume et l'épaisseur moyenne du biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1 ont été obtenus (figure 38B). Ces paramètres semblent réduits en présence de SN_{3J6(pOriTalt)}, nous observons une diminution moyenne de 25 % pour le biovolume et de 55 % pour l'épaisseur moyenne. Cependant cette tendance n'est pas significative compte tenu d'importants écarts-types. Nous ne pouvons donc affirmer qu'une surproduction d'altérocine par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 engendre une augmentation de l'activité antibiofilm et donc que le gène identifié codant l'altérocine soit responsable et/ou participe à l'activité antibiofilm du SN_{3J6} observée dans les précédentes études.

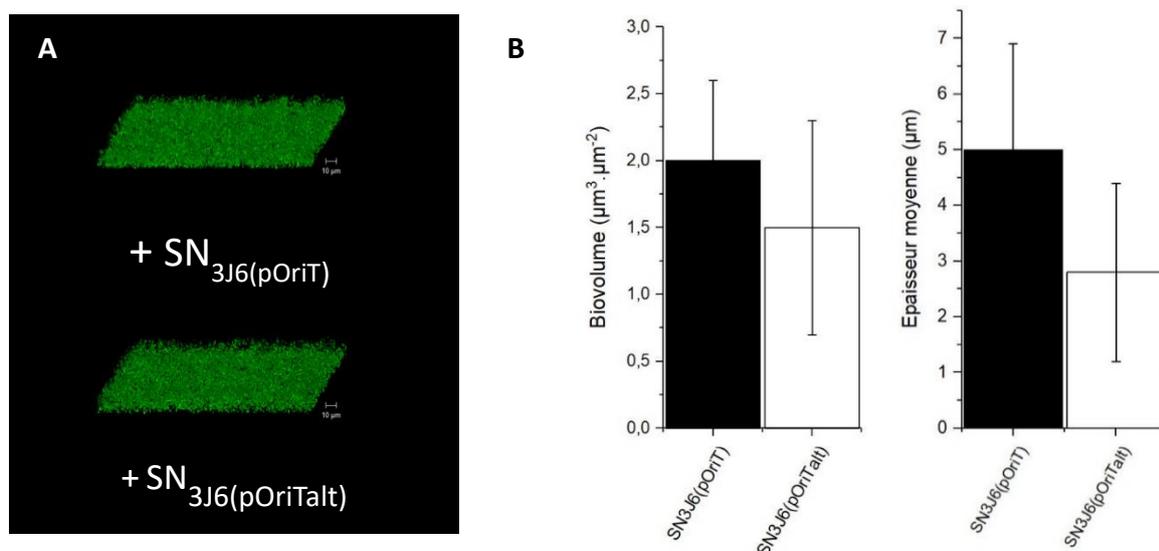


Figure 38 : Effet de l'altérocine surproduite par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt) sur le biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1. L'adhésion a été réalisée en condition statique durant 2 h en présence des différents échantillons. Les biofilms ont ensuite été cultivés en LB, à 37°C avec un flux de 3 ml/h. A : Observation au MCBL après marquage au Syto9. B : Biovolume et épaisseur moyenne des biofilms après traitement par le logiciel COMSTAT/Matlab.

Il est possible que la surproduction ne soit pas suffisamment efficace et que la faible différence de concentration en altérocine dans les deux surnageants soit limitante pour observer une augmentation de l'activité antibiofilm. Rappelons que seulement 38 % des cellules surproductrices conservent pOriTalt, plasmide contenant le gène *alt*, après 24 h de culture. Cela pourrait expliquer une faible différence de production de l'altérocine entre la souche témoin et la souche surproductrice. Un défaut de surproduction pourrait aussi par exemple provenir d'une saturation du système de sécrétion. Il se peut également que le promoteur naturel de l'altérocine soit un promoteur faible, une expression faible du gène *alt* entraînerait une production peu importante d'altérocine supplémentaire. Pour pallier à ce problème, le promoteur naturel pourrait être remplacé par un autre promoteur qui permettrait une plus forte activité (Zhang et al. 2017).

Pour éviter les problématiques rencontrées précédemment liées à *E. coli* et à la souche naturellement productrice, nous avons choisi de développer une dernière stratégie. L'altérocine a été produite chez une souche sans activité antibiofilm mais du même genre que la souche naturellement productrice, *Pseudoalteromonas* sp. 3J3.

1.4.2 Production hétérologue de l'altérocine chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3

1.4.2.1 Construction des souches et production de l'altérocine chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3

Les souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 ont été isolées dans le golfe du Morbihan (France) durant la même campagne de prélèvement (Grasland et al. 2003). La première a été isolée après 6 h d'immersion alors que la deuxième a été isolée après 3 h d'immersion. Lors de précédentes études, *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 ne présentait pas d'activité antibiofilm contre les souches marines sensibles à *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et n'était pas sensible au SN_{3J6} (données non publiées ; Dheilly et al. 2010). De plus, bien que son génome ne soit pas séquencé, *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 ne semble pas posséder de gène codant l'altérocine. En effet, aucune amplification du gène *alt* par PCR n'a pu être observée chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 alors qu'un fragment d'environ 400 pb, correspondant à la taille attendue pour le gène *alt*, avait été amplifié chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et chez la souche *Pseudoalteromonas* sp. hCg-6, possédant également le gène (figure 39). *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 était donc un bon candidat pour une production hétérologue de l'altérocine.

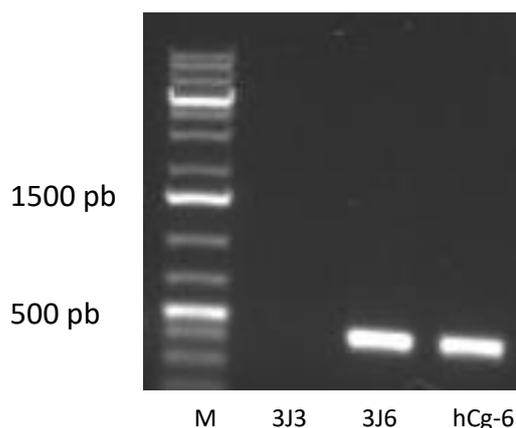


Figure 39 : Vérification de l'absence du gène *alt* dans le génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J3. Résultat du gel obtenu après amplification du gène *alt* par PCR à partir d'ADN extraits des souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 et *Pseudoalteromonas* sp. hCg-6.

Afin de permettre la production de l'altérocine par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3, nous avons utilisé le plasmide pOriTalt, préalablement construit au cours de cette étude pour surproduire l'altérocine chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (cf. 1.4.1.1 Construction de la souche surproductrice d'altérocine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriTalt) (p94)). Le plasmide a été introduit chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 par conjugaison via la souche donneuse *E. coli* GEB883. Le plasmide pOriT a également été introduit chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 afin de constituer une souche contrôle. Deux nouvelles souches ont donc été obtenues, la souche témoin négatif *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriT) et la souche productrice d'altérocine *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt).

Comme pour les souches modifiées de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, la conservation du plasmide chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 a été étudiée lors de la récupération du surnageant de culture puisque nous n'utilisons pas d'antibiotiques lors de la culture. Après 24 h de culture, 83 % des cellules avaient conservé le plasmide pOriT et 66 % des cellules avaient conservé le plasmide pOriTalt. Il semblerait donc que les bactéries se séparent un plus facilement du plasmide possédant le gène *alt* comme c'était le cas chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Cependant, le pourcentage de conservation du plasmide pOriTalt chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 (66 %) était supérieur à celui constaté chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (38 %). Il est possible que les souches de *Pseudoalteromonas* ne puissent tolérer une production trop importante d'altérocine.

Afin de s'assurer que les nouvelles souches construites produisent l'altérocine, sa production a été recherchée sur gel SDS-PAGE. Les protéines présentes dans SN_{3J3(pOriT)} et SN_{3J3(pOriTalt)} ont été partiellement purifiées et concentrées sur cartouche C18 par SPE afin d'obtenir les extraits E_{3J3(pOriT)} et E_{3J3(pOriTalt)}. Sur gel SDS-PAGE, une bande aux alentours de 14 kDa a été observée dans E_{3J3(pOriTalt)} (figure 40A). Une bande à même hauteur a également été observée dans E_{3J6}, témoin positif. Un Western blot a alors été réalisé afin de confirmer que la bande observée correspond à l'altérocine. Aucune bande n'est observée dans le témoin négatif E_{3J3(pOriT)}, alors qu'une bande a été observée dans E_{3J3(pOriTalt)} à même hauteur que dans E_{3J6} (figure 40B). La souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 (pOriTalt) produit donc l'altérocine.

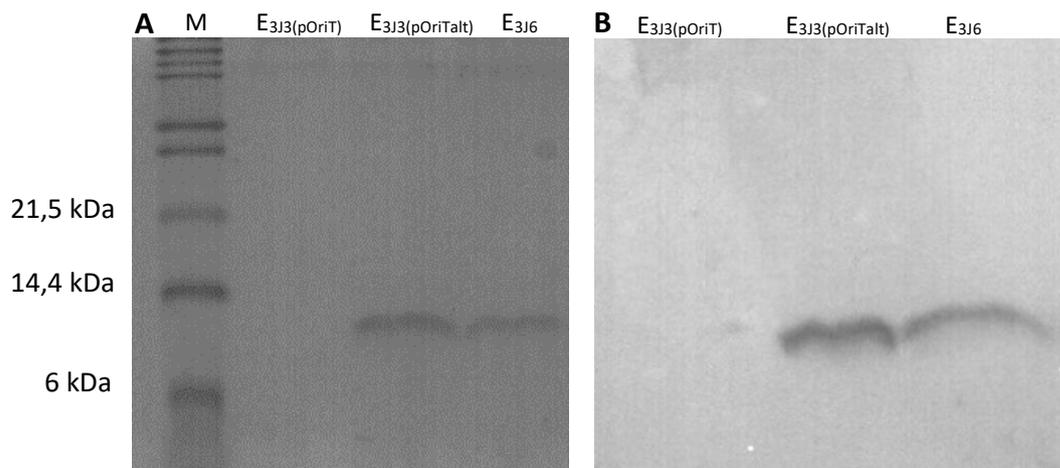


Figure 40 : Détection de l'altérocine produite par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt). Après concentration sur cartouche C18 par SPE, les extraits ont été analysés par SDS-PAGE (A) et Western blot (B). M : marqueur de taille Mark12.

L'objectif de cette production hétérologue étant de valider l'activité antibiofilm de l'altérocine, l'activité des surnageants de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 (pOriTalt), SN_{3J3(pOriTalt)}, et de *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 (pOriT), SN_{3J3(pOriT)}, a été testée contre le biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1.

1.4.2.2 Activité antibiofilm de l'altérocine par production hétérologue chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3

Après 24 h de culture à 37°C sous une agitation de 125 rpm, les SN des deux nouvelles souches, *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriT) et *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt) ont été récoltés. Les tests d'activité antibiofilm ont été réalisés sur le biofilm de la souche clinique *P. aeruginosa* MUC-N1 en chambres à flux. Après 2 h d'adhésion en l'absence de flux et en présence du SN_{3J3(pOriT)} ou SN_{3J3(pOriTalt)} puis 24 h de développement sous un flux de milieu nutritif LB à 37°C, les biofilms ont été marqués au Syto9 puis observés au MCBL.

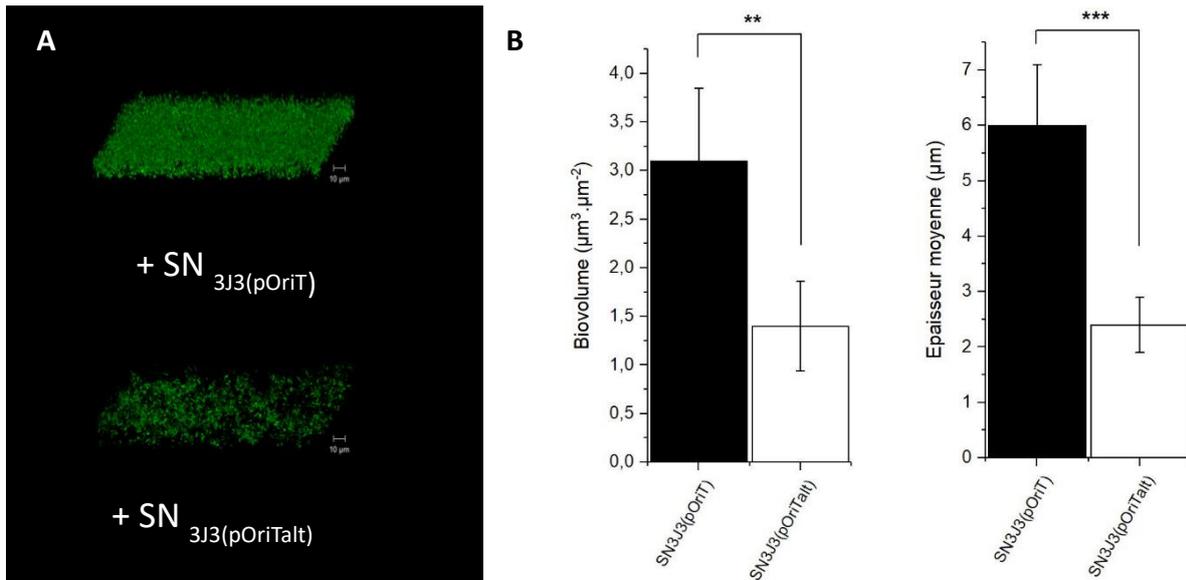


Figure 41 : Effet de l'altérocine produite par la *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt) sur le biofilm de *P. aeruginosa* MUC-N1. L'adhésion a été réalisée en condition statique durant 2 h en présence des différents échantillons. Les biofilms ont ensuite été cultivés en LB, à 37°C avec un flux de 3 ml/h. A : Observation au MCBL après marquage au Syto9. B : Biovolume et épaisseur moyenne des biofilms après traitement par le logiciel COMSTAT/Matlab. Test ANOVA, ** $p_{\text{value}} < 0,1$; *** $p_{\text{value}} < 0,001$.

L'observation au MCBL du biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1 en présence de SN_{3J3(pOriTalt)} semble indiquer qu'il soit moins volumineux que celui formé en présence du témoin, SN_{3J3(pOriT)} (figure 41A). Après traitement des images avec le logiciel COMSTAT (Heydron et al. 2000), les biovolumes et épaisseurs moyennes des biofilms formés par *P. aeruginosa* MUC-N1 ont été obtenus (figure 41B). Le biofilm témoin, avec une adhésion en présence du SN_{3J3(pOriT)}, montrait un biovolume de $3,1 \pm 0,75 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ et une épaisseur moyenne de $6 \pm 1,1 \mu\text{m}$. Le biofilm en contact de l'altérocine grâce à une adhésion en présence de SN_{3J3(pOriTalt)} avait un biovolume de $1,4 \pm 0,46 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ et une épaisseur moyenne de $2,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Nous observons donc une inhibition de la formation de biofilm de 55 % en présence de SN_{3J3(pOriTalt)}. La souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 a donc acquis la capacité d'inhiber le biofilm de *P. aeruginosa* MUC-N1, démontrant que l'activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 provient bien de l'altérocine.

L'activité antibiofilm de l'altérocine est validée. Cependant, il nous est arrivé d'observer que les SN_{3J3(pOriTalt)} étaient inactifs malgré la présence d'altérocine confirmée par Western blot. Afin de vérifier que le défaut d'activité provenait de la production des surnageants de culture et non de l'activité de l'altérocine, des SN de la souche possédant naturellement l'activité

antibiofilm, SN_{3J6}, ont été produits en parallèle et un défaut d'activité antibiofilm a été également observé. Aucun composant du milieu et aucun paramètre n'a été modifié entre un SN actif et un SN inactif. Il semble donc que lors de la production, il y ait au moins un paramètre que nous ne maîtrisons pas et qui joue sur l'activité antibiofilm. Visualisant l'altérocine même dans les SN inactifs, le défaut d'activité serait-il dû à une différence de conformation de la protéine ? Y a-t-il une autre molécule qui serait nécessaire à l'activité antibiofilm et qui ne serait pas toujours produite ? Cela pourrait expliquer l'absence d'activité antibiofilm du surnageant de culture d'*E. coli* où l'altérocine est produite.

Nous avons envisagé de tester les différents SN sur des souches marines sensibles au SN_{3J6} et de réaliser des biofilms bi-espèces avec ces souches marines et *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt) afin de voir si la présence de cette dernière inhibait la formation du biofilm des souches marines due à la production d'altérocine. C'est d'ailleurs grâce à des observations de biofilms bi-espèces que l'activité antibiofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 avait été mise en évidence par Dheilly et *al.* (2010). Une souche de *Vibrio* possédant le gène codant la GFP avait été construite afin de pouvoir différencier les deux souches au MCBL. Nous avons cependant rencontré des difficultés pour observer les biofilms en chambres à flux qui semblaient provenir de la concentration en sel (cf. 1.1 Biofilm de *P. aeruginosa* MUC-N1 (p80)). Cela posait un problème pour la plupart des observations des biofilms marins qui étaient cultivés en VNSS et qui n'ont donc pas pu être présentées dans ce manuscrit.

Maintenant que l'activité antibiofilm de l'altérocine est démontrée, nous avons cherché à identifier les cibles de l'altérocine, sachant qu'elles peuvent être multiples puisque de nombreux paramètres influent sur la formation du biofilm.

2. Recherche des mécanismes d'action de l'altérocine

Lors de la production et la purification partielle de l'altérocine chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt), différentes bandes dans le surnageant de culture témoin, SN_{3J3(pOriT)}, ont parfois été observées sur gel SDS-PAGE, alors qu'elles n'étaient pas présentes dans SN_{3J3(pOriTalt)} où seule l'altérocine apparaissait.

Il semble donc que plusieurs protéines soient présentes dans SN_{3J3(pOriT)} contrairement à SN_{3J3(pOriTalt)}. Il est également possible qu'elles soient présentes mais en quantité plus faible et non détectable par la coloration au bleu de Coomassie.

Mais alors pourquoi observons-nous la présence de protéines dans le surnageant de culture de la souche témoin, *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriT), alors que seule la présence de l'altérocine est visible dans le surnageant de culture de la souche productrice *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt) ? La première hypothèse est que la production et la sécrétion d'altérocine par la souche empêche/limite la production et/ou la sécrétion des autres protéines que nous avons observées dans SN_{3J3(pOriT)}, en saturant par exemple le système de sécrétion. La seconde hypothèse est que l'altérocine serait une protéase. Les protéines seraient produites et sécrétées par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt), mais elles seraient dégradées par la suite par l'altérocine. La matrice des biofilms peut être affectée par les protéases (Yu et al. 2015 ; Mitrofanova et al. 2017), ce qui expliquerait l'activité antibiofilm de l'altérocine. Bien que l'altérocine ne possède pas de domaine connu, une possible activité protéasique a été testée.

Une co-culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriT) et 3J3(pOriTalt) a été réalisée afin de voir si les protéines produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriT) étaient dégradées par l'altérocine produite par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriTalt). Le surnageant de culture de cette co-culture, SN_{3J3pOriT-pOriTalt}, a été concentré sur colonne C18 par SPE avant d'être déposé sur gel SDS-PAGE (figure 42). En parallèle, des SN_{3J3(pOriT)} et SN_{3J3(pOriTalt)} ont été produits comme témoins.

Une seconde stratégie a été de mettre en contact une protéine, l'albumine de sérum bovin (BSA) (figure 42) avec SN_{3J3(pOriTalt)} afin d'observer une éventuelle dégradation de la BSA. Un

témoin négatif avec SN_{3J3(pOriT)} a été réalisé afin de s'assurer que la souche témoin ne produit pas de protéases. Après 8 h d'incubation à 20°C, les échantillons ont été déposés sur gel SDS-PAGE (figure 42).

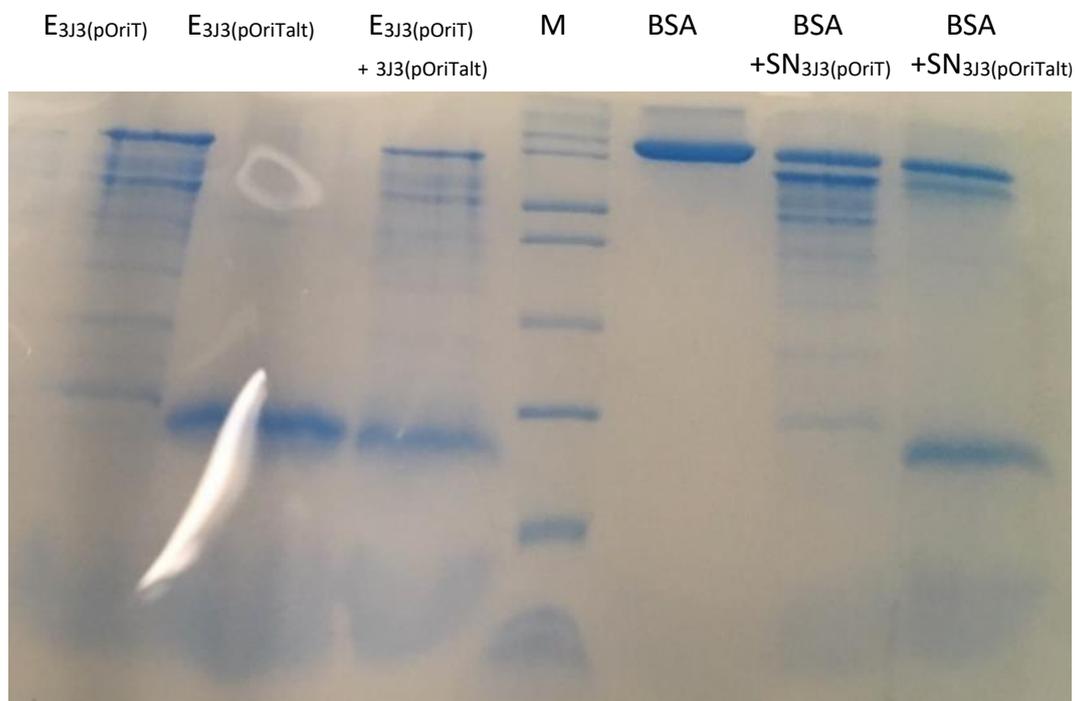


Figure 42 : Activité protéasique de l'altérocine observée sur gel SDS-PAGE. À droite du marqueur : Test de co-culture, observation des extraits concentrés après 24 h de culture. À gauche du marqueur : Test avec la BSA, observation après 8 h d'incubation.

Sur gel SDS-PAGE, plusieurs bandes étaient présentes dans E_{3J3(pOriT)+3J3(pOriTalt)}. Elles correspondent à la superposition des bandes présentes dans E_{3J3(pOriT)} et E_{3J3(pOriTalt)}. Les protéines produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriT) sont donc retrouvées dans le SN issu de la co-culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J3(pOriT) et 3J3(pOriTalt) et ne sont pas dégradées par l'altérocine.

La bande correspondant à la BSA semble plus épaisse dans le témoin BSA que dans les conditions où un ajout de SN a été effectué. Cependant, l'épaisseur de la bande correspondant à la BSA semble similaire lors de l'ajout de SN_{3J3(pOriT)} et SN_{3J3(pOriTalt)}. Il semble qu'il y ait une légère dégradation de la BSA mais qu'elle ne soit pas causée par l'altérocine.

Il semblerait donc que l'altérocine n'ait pas d'activité protéasique et que l'absence des protéines observées dans le SN_{3J3(pOriTalt)} soit liée à la surproduction et/ou la monopolisation des systèmes de transport de l'altérocine qui perturberait la production et/ou sécrétion des autres protéines produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3. N'étant pas le cœur de notre étude, nous n'avons pas eu le temps approfondir. Cependant, afin de vérifier que le système de sécrétion ne soit pas saturé par l'altérocine, nous pourrions regarder, après lyse cellulaire, si les protéines manquantes dans le sécrétome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 (pOriTalt) pourraient être restées piégées dans le cytoplasme des bactéries.

Conclusion

Dans ce chapitre, l'objectif était de valider la potentielle activité antibiofilm de l'altérocine. Ne possédant pas la protéine purifiée, nous avons opté pour des stratégies génétiques avec le gène *alt* codant l'altérocine. Dans un premier temps, une mutagénèse dirigée du gène *alt* par double recombinaison homologue inspiré d'un protocole établi par Wang et al. (2015) a été envisagée. Cependant, après construction du plasmide permettant la double recombinaison et insertion dans la souche donneuse, nous n'avons pas réussi à obtenir la première recombinaison chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. La mutagénèse du gène *alt* a donc été abandonnée dans cette étude au profit d'autres stratégies mais au vu des avancées dans ce domaine, il pourrait être intéressant de reprendre ces travaux.

La seconde stratégie choisie était la production hétérologue de l'altérocine chez une souche sans activité antibiofilm. Nous avons opté pour une souche bactérienne, *E. coli* BL21(DE3), capable de produire de façon importante l'altérocine sous induction par l'IPTG. Cependant, aucune induction de l'expression du gène *alt* n'a été observée et seule une faible quantité d'altérocine produite par fuite transcriptionnelle a été obtenue. L'activité antibiofilm a été testée et s'est révélée négative. Ce défaut d'activité signifiait-il que l'altérocine n'avait pas d'activité antibiofilm ou était-ce dû à une structure native de la protéine obtenue chez *E. coli* ? Il est également possible que l'activité de l'altérocine nécessite la présence d'autres protéines qui ne sont pas produites par *E. coli*.

Pour pallier ces possibles difficultés, nous avons décidé de surproduire l'altérocine chez la souche naturellement productrice, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, en introduisant un plasmide contenant le gène *alt* et sa potentielle région promotrice (pOriTalt). Une activité antibiofilm a été observée avec la souche surproductrice, mais elle n'était pas significativement différente de celle observée chez la souche non modifiée. La surproduction est-elle efficace et suffisante pour observer une différence d'activité ? Afin de répondre à cette question, nous avons opté pour une dernière stratégie : une production hétérologue de l'altérocine par *Pseudoalteromonas* sp. 3J3, une souche appartenant au genre de la souche naturellement productrice. Le plasmide pOriTalt a été introduit dans *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 et l'activité antibiofilm de son surnageant de culture SN_{3J3(pOriTalt)} a été testée. Le biofilm obtenu après une adhésion en présence de SN_{3J3(pOriTalt)} possédait un biovolume et une épaisseur moyenne significativement réduits comparés au biofilm témoin.

Il serait également intéressant de valider l'activité antibiofilm de l'altérocine par une seconde technique d'étude du biofilm *in vitro*. En effet, tester une autre surface que le verre ainsi que des paramètres différents pourrait apporter à l'étude des éléments supplémentaires. Par exemple, les matériaux utilisés dans le domaine médical comme les cathéters ou les sondes urinaires ne sont pas en verre. Des tests en microplaques avec une coloration des biofilms au cristal violet ont été envisagés mais la présence importante des EPS de *P. aeruginosa* engendrait des résultats peu reproductibles. Nous avons donc préféré ne pas nous attarder sur cette méthode.

Concernant le mode d'action de l'altérocine, il est difficile d'établir une hypothèse car son spectre d'action semble large et la protéine ne possède aucune homologie de séquence avec d'autres protéines de fonction connue et domaines conservés. Une activité protéasique de l'altérocine a été envisagée mais s'est relevée négative. Ce travail ainsi que les études préliminaires nous ont cependant permis d'avancer plusieurs hypothèses sur le mode d'action antibiofilm du SN_{3J6} et plus particulièrement sur l'altérocine qui est un composé responsable de cette activité. Comme une activité bactéricide en biofilm avait été observée contre deux

souches marines mais qu'elle n'était pas retrouvée en condition planctonique, il semblerait que l'altérocine soit active contre une cible accessible uniquement lorsque les bactéries vivent sous forme de biofilm.

L'hypothèse d'un phage lytique avec une cible spécifique du biofilm avait alors été émise puis rejetée car aucune particule « phage like » n'a pu être observée dans le surnageant de culture lors des observations au microscope électronique à balayage (Dheilly et *al.* 2010).

Une autre hypothèse avait été émise quant à la perte de viabilité des cellules. Le ou les composés induiraient la mort cellulaire, en provoquant ainsi leur « suicide » comme c'est le cas avec la protéine AlpP produite par *Pseudoalteromonas tunicata* D2 (Desriac et *al.* 2018). Cependant, d'après les différentes classes de sensibilité au SN_{3J6} (Tableau 1 : Caractéristiques des biofilms formés par les différents groupes de bactéries sensibles au SN_{3J6}. (p43)), la diminution du biofilm ne nécessite pas une perte de viabilité cellulaire pour la classe 3 et la perte de viabilité de la classe 4 n'entraîne pas forcément une diminution du biofilm. La perte de viabilité pourrait contribuer à l'activité antibiofilm mais ne semble pas nécessaire à l'activité antibiofilm (Dheilly et *al.* 2010).

L'altérocine pourrait alors être active contre les composants de la matrice. Nous pourrions alors faire face à une enzyme dégradant les polysaccharides, l'ADNe ou les protéines. Cependant la probabilité de cette hypothèse est faible puisqu'aucune homologie de séquence n'a été retrouvée entre la séquence de l'altérocine et les enzymes existantes. L'activité protéasique a d'ailleurs été testée et s'est montrée négative.

Une autre hypothèse serait que l'altérocine inhibe la régulation de la formation du biofilm via le QS, la concentration en c-di-GMP ou en ppGpp. En effet, elle n'a pas d'activité sur les bactéries planctoniques mais sur celles vivant en biofilm. Elle pourrait donc impacter la régulation du biofilm, empêcher sa formation et permettre sa dispersion en favorisant le mode de vie planctonique. Concernant le QS, il diffère selon les souches sensibles testées. En effet, *P. aeruginosa* utilise un système à base d'HSL, alors que *E. coli* utilise un système à base de l'autoinducteur-2 (Li et *al.* 2007). De plus, la perturbation du QS semble d'après la littérature liée à la dégradation des HSL via des enzymes avec des sites d'action connus ou des analogues aux HSL, et encore une fois, aucune homologie de séquence n'a été trouvée entre

ce type de molécules et l'altérocine. En prenant en compte ces deux constats, il est peu probable que l'altérocine perturbe le QS.

L'altérocine pourrait alors inhiber les concentrations intracellulaires en c-di-GMP ou ppGpp qui sont essentielles pour la formation et la régulation du biofilm chez de très nombreuses souches bactériennes. L'altérocine, ne possédant pas les domaines typiques qui permettent la modulation du c-di-GMP (GGDEF et EAL), il est possible qu'elle n'agisse pas directement sur la molécule de c-di-GMP, mais de façon indirecte en activant ou inhibant une autre molécule possédant les domaines de liaison au c-di-GMP et régulant ainsi sa concentration intracellulaire. Étant sécrétée, il est possible qu'elle se fixe à un récepteur entraînant, une baisse de la concentration en c-di-GMP. Afin de vérifier cela, un dosage du c-di-GMP (Barraud et *al.* 2009) et ppGpp (Fuente-Núñez et *al.* 2014) pourrait être envisagé chez les populations bactériennes en contact avec les SN_{3J3(pOriT)} et SN_{3J3(pOriTalt)} puis avec la protéine purifiée lorsqu'elle sera disponible.

Conclusion et perspectives

Compte tenu de leur résistance accrue vis-à-vis des antibiotiques, les biofilms sont devenus un problème majeur en santé publique, il est donc urgent de trouver de nouvelles stratégies de lutte. La prospection du domaine marin pourrait s'avérer être des plus prometteuses pour la recherche de nouvelles molécules spécifiquement antibiofilm, celles-ci pourraient être utilisées en bithérapie avec un antibiotique. L'approche serait séquentielle, avec une désorganisation du biofilm suivie d'une action des antibiotiques contre ce biofilm plus perméable.

La bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sécrète une ou plusieurs molécules à activité antibiofilm (Dheilly et al. 2010 ; Klein et al. 2011). Après plusieurs années d'études, un gène codant une protéine potentiellement responsable de l'activité antibiofilm du SN_{3J6} a été identifié. La protéine, nommée altérocine, est conservée principalement chez quelques membres du genre *Pseudoalteromonas*, pouvant expliquer que son rôle ne soit pas encore connu. En effet, l'attrait pour les bactéries marines est plutôt récent et les bactéries pathogènes de l'Homme, comme *P. aeruginosa* ou *E. coli*, sont beaucoup plus étudiées. L'altérocine a été étudiée par analyses bioinformatiques afin de relever d'éventuels domaines connus pouvant nous orienter sur la nature de sa fonction. Cependant, aucune homologie de séquence avec d'autres protéines de fonction connue n'a été observée. L'activité antibiofilm de la protéine a ensuite été validée. L'altérocine semble donc être une protéine originale.

Dans un premier temps, l'altérocine et le gène codant cette protéine, *alt*, ont été étudiés. Le gène *alt* n'est pas disposé en opéron et semble être l'objet d'une régulation pour l'instant non définie, elle pourrait toutefois provenir de la nécessité d'un facteur sigma alternatif ou d'un activateur/répresseur puisque des séquences répétées inversées ont été retrouvées en amont du gène. L'altérocine, qui possède un poids moléculaire théorique de 13,6 kDa après clivage du peptide signal hypothétique identifié par analyses bioinformatiques, ne présente aucune homologie de structure et de domaines conservés avec d'autres protéines. Sa purification totale n'a pas été effectuée pour le moment, mais une purification partielle avec concentration sur cartouche C18 par SPE ont permis de la détecter sur gel SDS-PAGE et par Western blot avec des anticorps anti-altérocine.

Dans un second temps, l'activité antibiofilm de l'altérocine devait être validée. Plusieurs stratégies ont été mises en place et c'est finalement grâce à une production hétérologue de l'altérocine par une souche du même genre mais non productrice naturellement de la protéine, *Pseudoalteromonas* sp. 3J3, que son activité antibiofilm a pu être validée. Lors d'une adhésion en présence du SN_{3J3(pOriTalt)} puis culture du biofilm, le biovolume et l'épaisseur moyenne étaient significativement réduits comparés à une adhésion en présence du SN_{3J3(pOriT)}. Une production hétérologue de l'altérocine chez *E. coli* a également été réalisée, cependant aucune activité antibiofilm n'avait été observée. L'activité de l'altérocine semble donc recourir à une conformation particulière de l'altérocine ou à la présence d'autres molécules qu'*E. coli* n'est pas en mesure de lui fournir.

L'élucidation du mode d'action de l'altérocine est complexe. Comme nous l'avons déjà évoqué, aucune homologie de séquence avec d'autres protéines de fonction connue n'est disponible, n'indiquant aucune piste. De plus, le spectre d'activité est large, sous-entendant que la cible doit être un mécanisme commun à de nombreuses bactéries. En conditionnant la protéine sur une surface ou en traitement lors de l'adhésion, SN_{3J6} réduisait la formation de biofilm des souches sensibles mais n'agissait pas de façon significative et suffisante sur l'étape d'adhésion pour expliquer cette baisse de biofilm, sauf exception pour la souche marine *Vibrio tapetis* CECT4600. De plus, des tests réalisés sur des biofilms matures ont montré qu'un traitement avec SN_{3J6} permettait une réduction du biofilm (Rodrigues et al. 2015, données non publiées). En prenant en compte la diversité de tous ces éléments, il est difficile de prédire le mode d'action de l'altérocine.

De plus, il est possible que, bien que le gène *alt* ne soit pas dans un opéron, l'altérocine nécessite la présence d'autres molécules afin d'être active. Il faut également garder en vue que toutes les observations décrites précédemment sur l'action antibiofilm du SN_{3J6} sont justement obtenues avec le surnageant de culture brut de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et un extrait partiellement purifié sur colonne C18 par SPE. Il est donc possible que d'autres molécules, sans lien avec l'altérocine soit capables d'engendrer une ou plusieurs des actions visualisées.

En conclusion, ces recherches ont permis de développer nos connaissances sur une protéine, l'altérocine. Bien que présente chez plusieurs espèces de *Pseudoalteromonas*, son rôle est encore inconnu dans les bases de données. Les caractéristiques de cette protéine ainsi que celles de son gène ont été étudiées afin de la purifier et essayer de comprendre son mode d'action. Malgré l'avancée de nos recherches, des travaux doivent encore être menés afin de parfaire la purification de l'altérocine, comprendre son mode d'action et la développer comme protéine antibiofilm en thérapie (figure 43).

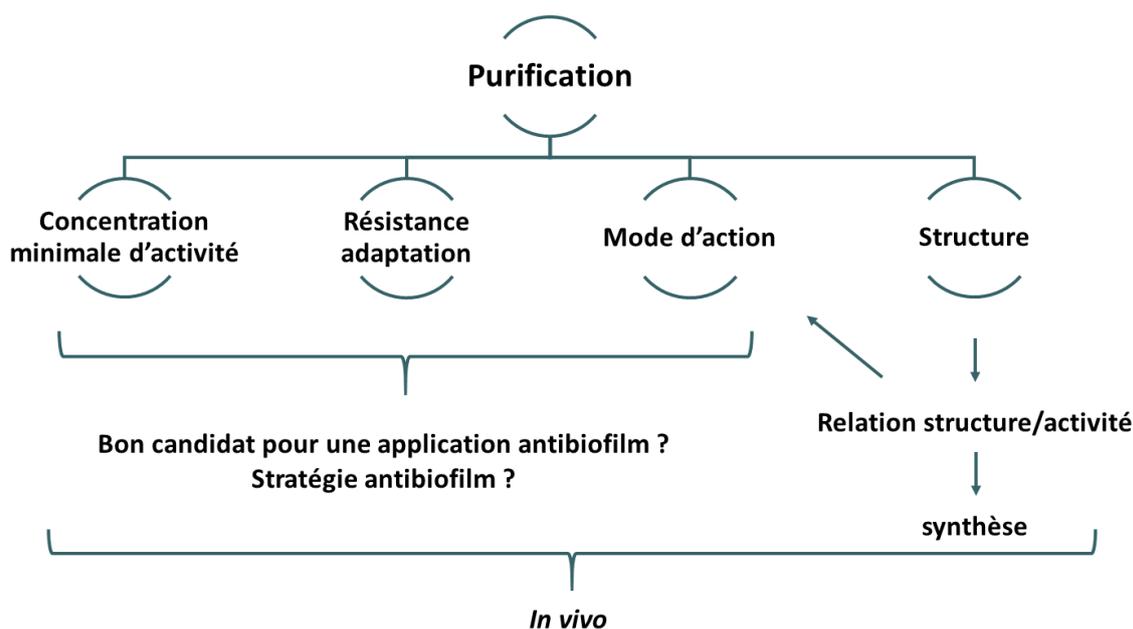


Figure 43 : Stratégie d'étude de l'altérocine dans le cadre d'un développement d'une molécule antibiofilm à visée thérapeutique.

Afin de faciliter l'étude de la protéine (structure, mode d'action), il est important de purifier totalement la protéine. Une purification par immunoprécipitation est envisagée pour la suite (Kaboord et Perr 2008). Après purification de l'altérocine, sa structure pourra être définie, par RMN ou cristallographie par exemple. En effet, d'après nos travaux, des hypothèses ont été émises sur la possible nécessité d'une structure 3D particulière afin d'être active.

Étudier le mode d'action est la perspective la plus attrayante puisqu'aucune homologie de séquence n'a été trouvée avec d'autres protéines de fonction connue. Son mode d'action semble donc original. Afin de l'étudier, nous pourrions dans un premier temps réaliser un

séquençage d'ARN à partir des biofilms de *P. aeruginosa* MUC-N1 mis en contact avec SN_{3J3(pOriT)} et SN_{3J3(pOriTalt)}. Ainsi, une différence dans l'expression de certains gènes nous indiquerait les cibles potentielles de l'altéroïcine.

Il est également important de ne pas perdre de vue l'objectif final de ce projet qui serait de proposer une bithérapie avec un antibiotique afin de lutter contre les infections liées aux biofilms. Les biofilms infectieux sont très différents des biofilms observés *in vitro*. En effet, les conditions environnementales sont très différentes de celles utilisées *in vitro* même si celles-ci essaient de s'en rapprocher le plus possible, et plusieurs facteurs ne peuvent malheureusement pas être pris en compte comme l'impact du système immunitaire. Ainsi, la structure et les composants du biofilm peuvent changer. Après toutes les étapes décrites réalisées *in vitro*, réaliser des tests *ex vitro* et *in vivo* sera nécessaire. Entre les modèles *in vitro* et *in vivo*, il existe des modèles *ex vivo* dans lesquels des tissus ou des organes sont extraits d'un organisme (typiquement porcin ou murin) et placés dans un environnement artificiel. Ils permettent des conditions expérimentales plus contrôlées que les modèles *in vivo* et peuvent être utiles pour évaluer différentes fenêtres temporelles pour un traitement efficace des infections par biofilm (Lebeaux et al. 2013). Guillon et al. (2018) ont ainsi étudié l'effet d'un polypeptide cationique sur des biofilms *ex vivo* présents dans des tubes endotrachéaux prélevés chez des patients sous ventilation mécanique. Des modèles d'étude du biofilm *in vivo* existent également (Lebeaux et al. 2013). Par exemple, Bayes et al. (2016) ont développé un modèle murin adapté de billes d'agar permettant d'observer les principales caractéristiques de la transition d'une infection transitoire à une infection chronique des voies respiratoires dont une morbidité et une mortalité aiguës limitées et une inflammation neutrophilique liées à l'infection. L'altéroïcine purifiée, ou dans un premier temps le SN_{3J6}, pourrait alors par exemple être administrée en mono ou co-inoculation avec un antibiotique sur ce modèle une fois l'infection chronique établit afin d'observer une meilleure clairance bactérienne qu'avec l'antibiotique utilisé en monothérapie. De plus, bien que SN_{3J6} ne semble pas présenter de toxicité envers les modèles testés, il sera nécessaire de tester l'altéroïcine qui pourrait présenter une toxicité à forte concentration.

Les tests *in vivo* sont cependant intéressants si plusieurs paramètres ont bien été définis auparavant. Quelle est la concentration minimale afin d'observer une activité antibiofilm ? Les souches sensibles à l'altéroïcine peuvent-elles développer une résistance/tolérance au fil du

temps comme c'est le cas avec les antibiotiques ou avec les molécules répertoriée dans la stratégie du Quorum Quenching (García-Contreras et *al.* 2013) ? Le spectre d'action de l'altérocine est-il suffisant pour être utilisé en thérapeutique (Gram positif/Gram négatif) ?

Autant de questions qui devront être résolues avant l'utilisation de l'altérocine en thérapie.

Références bibliographiques

- Abdel-Mawgoud, A. M., F. Lépine, et É. Déziel. 2010. « Rhamnolipids: Diversity of Structures, Microbial Origins and Roles ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (5): 1323-36. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2>.
- Alav, I., J. M. Sutton, et K. M. Rahman. 2018. « Role of Bacterial Efflux Pumps in Biofilm Formation ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (8): 2003-20. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>.
- Alayande, A.B., M. M. Aung, et I. S. Kim. 2018. « Correlation Between Quorum Sensing Signal Molecules and *Pseudomonas aeruginosa*'s Biofilm Development and Virulency ». *Current Microbiology* 75 (7): 787-93. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1449-5>.
- Allesen-Holm, M., K. Bundvig Barken, L. Yang, M. Klausen, J. S. Webb, S. Kjelleberg, S. Molin, M. Givskov, et T. Tolker-Nielsen. 2006. « A Characterization of DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa* Cultures and Biofilms ». *Molecular Microbiology* 59 (4): 1114-28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x>.
- Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory, et R. Ramphal. 1998. « The *Pseudomonas aeruginosa* Flagellar Cap Protein, FliD, Is Responsible for Mucin Adhesion ». *Infection and Immunity* 66 (3): 1000-1007.
- Azeredo, J., N. F. Azevedo, R. Briandet, N. Cerca, T. Coenye, A. Rita Costa, M. Desvaux, et al. 2017. « Critical Review on Biofilm Methods ». *Critical Reviews in Microbiology* 43 (3): 313-51. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>.
- Azghani, A. O., S. Idell, M. Bains, et R. E. W. Hancock. 2002. « *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Protein F Is an Adhesin in Bacterial Binding to Lung Epithelial Cells in Culture ». *Microbial Pathogenesis* 33 (3): 109-14.
- Bahar, A., et D. Ren. 2013. « Antimicrobial Peptides ». *Pharmaceuticals* 6 (12): 1543-75. <https://doi.org/10.3390/ph6121543>.
- Baneyx, F., et M. Mujacic. 2004. « Recombinant Protein Folding and Misfolding in *Escherichia Coli* ». *Nature Biotechnology* 22 (11): 1399-1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>.
- Baraquet, C., K. Murakami, M. R. Parsek, et C. S. Harwood. 2012. « The FleQ Protein from *Pseudomonas aeruginosa* Functions as Both a Repressor and an Activator to Control Gene Expression from the Pel Operon Promoter in Response to C-Di-GMP ». *Nucleic Acids Research* 40 (15): 7207-18. <https://doi.org/10.1093/nar/gks384>.
- Barken, K. B., S. J. Pamp, L. Yang, M. Gjermansen, J. J. Bertrand, M. Klausen, M. Givskov, C. B. Whitchurch, J. N. Engel, et T. Tolker-Nielsen. 2008. « Roles of Type IV Pili, Flagellum-Mediated Motility and Extracellular DNA in the Formation of Mature Multicellular Structures in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms ». *Environmental Microbiology* 10 (9): 2331-43. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x>.
- Barraud, N., D.J. Hassett, S-H. Hwang, S. A. Rice, S. Kjelleberg, et J. S. Webb. 2006. « Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 188 (21): 7344-53. <https://doi.org/10.1128/JB.00779-06>.
- Barraud, N., D. Schleheck, J. Klebensberger, J. S. Webb, D. J. Hassett, S. A. Rice, et S. Kjelleberg. 2009. « Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal ». *Journal of Bacteriology* 191 (23): 7333-42. <https://doi.org/10.1128/JB.00975-09>.
- Bayes, H. K., N. Ritchie, S. Irvine, et T. J. Evans. 2016. « A Murine Model of Early *Pseudomonas aeruginosa* Lung Disease with Transition to Chronic Infection ». *Scientific Reports* 6 (novembre). <https://doi.org/10.1038/srep35838>.

- Bazire, A., K. Shioya, E. Soum-Soutéra, E. Bouffartigues, C. Ryder, L. Guentas-Dombrowsky, G. Hémerly, et al. 2010. « The Sigma Factor AlgU Plays a Key Role in Formation of Robust Biofilms by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 192 (12): 3001-10. <https://doi.org/10.1128/JB.01633-09>.
- Bedi, B., N. M. Maurice, et R. T. Sadikot. 2018. « Microarchitecture of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: A Biological Perspective ». *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)* 2 (4): 227. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_98_18.
- Betton, J-M. et A. Chaffotte. 2005. « Repliement et Production de Protéines Recombinantes ». *médecine/sciences* 21 (6-7): 613-17. <https://doi.org/10.1051/medsci/2005216-7613>.
- Billings, N., M. Ramirez Millan, M. Caldara, R. Rusconi, Y. Tarasova, R. Stocker, et K. Ribbeck. 2013. « The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms ». *PLOS Pathogens* 9 (8): e1003526. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003526>.
- Borlee, B. R., A. D. Goldman, K. Murakami, R. Samudrala, D. J. Wozniak, et M. R. Parsek. 2010. « *Pseudomonas aeruginosa* Uses a Cyclic-Di-GMP-Regulated Adhesin to Reinforce the Biofilm Extracellular Matrix ». *Molecular Microbiology* 75 (4): 827-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x>.
- Bouillet, S., M. Ba, L. Houot, C. Iobbi-Nivol, et C. Bordi. 2019. « Connected Partner-Switches Control the Life Style of *Pseudomonas aeruginosa* through RpoS Regulation ». *Scientific Reports* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42653-5>.
- Bowler, P. G. 2018. « Antibiotic Resistance and Biofilm Tolerance: A Combined Threat in the Treatment of Chronic Infections ». *Journal of Wound Care* 27 (5): 273-77. <https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.5.273>.
- Bowman J. P. 2007. « Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas* ». *Marine Drugs* 5 (4): 220-41.
- Bucior, I., J. F. Pielage, et J. N. Engel. 2012. « *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium ». *PLoS Pathogens* 8 (4): e1002616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002616>.
- Byrd, M. S., B. Pang, M. Mishra, W. E. Swords, et D. J. Wozniak. 2010. « The *Pseudomonas aeruginosa* Exopolysaccharide Psl Facilitates Surface Adherence and NF-KappaB Activation in A549 Cells ». *MBio* 1 (3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00140-10>.
- Cai, Z., Y. Liu, Y. Chen, J. Kuok Hoong Yam, S. Chuen Chew, S. Lin Chua, K. Wang, M. Givskov, et L. Yang. 2015. « RpoN Regulates Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* via Modulating the PqsR Quorum Sensing Regulator ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (12): 28311-19. <https://doi.org/10.3390/ijms161226103>.
- Calfee, M. W., J. P. Coleman, et E. C. Pesci. 2001. « Interference with *Pseudomonas* Quinolone Signal Synthesis Inhibits Virulence Factor Expression by *Pseudomonas aeruginosa* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (20): 11633-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.201328498>.
- Carvalho, C., et P. Fernandes. 2010. « Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environment ». *Marine Drugs* 8 (3): 705-27. <https://doi.org/10.3390/md8030705>.
- Casillo, A., R. Papa, A. Ricciardelli, F. Sannino, M. Ziaco, M. Tilotta, L. Selan, et al. 2017. « Anti-Biofilm Activity of a Long-Chain Fatty Aldehyde from Antarctic *Pseudoalteromonas*

- haloplanktis* TAC125 against *Staphylococcus epidermidis* Biofilm ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (février). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00046>.
- Chevalier, S., E. Bouffartigues, A. Bazire, A. Tahrioui, R. Duchesne, D. Tortuel, O. Maillot, et al. 2019. « Extracytoplasmic Function Sigma Factors in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Gene expression in bacterial development, 1862 (7): 706-21. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.04.008>.
- Chevalier, S., E. Bouffartigues, J. Bodilis, O. Maillot, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilloley, Nicole Orange, Alain Dufour, et Pierre Cornelis. 2017. « Structure, Function and Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Porins ». *FEMS Microbiology Reviews* 41 (5): 698-722. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>.
- Ciofu, O., et T. Tolker-Nielsen. 2019. « Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics ». *Frontiers in Microbiology* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>.
- Colvin, K. M., V. D. Gordon, K. Murakami, B. R. Borlee, D. J. Wozniak, G. C. L. Wong, et M. R. Parsek. 2011. « The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role in the Biofilm Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* ». *PLOS Pathogens* 7 (1): e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>.
- Colvin, K. M., Y. Irie, C. S. Tart, R. Urbano, J. C. Whitney, C. Ryder, P. L. Howell, D. J. Wozniak, et M. R. Parsek. 2012. « The Pel and Psl Polysaccharides Provide *Pseudomonas aeruginosa* Structural Redundancy within the Biofilm Matrix ». *Environmental Microbiology* 14 (8): 1913-28. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>.
- Cooke, A. C., A. V. Nello, R. K. Ernst, et J. W. Schertzer. 2019. « Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Membrane Vesicles Supports Multiple Mechanisms of Biogenesis ». *PLoS ONE* 14 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212275>.
- Costerton, W., G. G. Geesey, et K. J. Cheng. 1978. « How Bacteria Stick ». *Scientific American* 238 (1): 86-95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>.
- Costerton, W., R. Veeh, M. Shirtliff, M. Pasmore, C. Post, et G. Ehrlich. 2003. « The Application of Biofilm Science to the Study and Control of Chronic Bacterial Infections ». *Journal of Clinical Investigation* 112 (10): 1466-77. <https://doi.org/10.1172/JCI200320365>.
- Davey, M. E., N. C. Caiazza, et G. A. O'Toole. 2003. « Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ». *Journal of Bacteriology* 185 (3): 1027-36. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.1027-1036.2003>.
- Davies, D. G., et C. N. H. Marques. 2009. « A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms ». *Journal of Bacteriology* 191 (5): 1393-1403. <https://doi.org/10.1128/JB.01214-08>.
- De Kievit, T. R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown, et B. H. Iglewski. 2001. « Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (4): 1865-73. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1865-1873.2001>.
- Delavat, F., A. Bidault, V. Pichereau, et C. Paillard. 2018. « Rapid and Efficient Protocol to Introduce Exogenous DNA in *Vibrio harveyi* and *Pseudoalteromonas* sp ». *Journal of Microbiological Methods* 154 (octobre). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.022>.
- Deligianni, E., S. Pattison, D. Berrar, N. G. Ternan, R. W. Haylock, J. E. Moore, S. J. Elborn et J. S.G. Dooley. 2010. « *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates of Similar RAPD

- Genotype Exhibit Diversity in Biofilm Forming Ability In Vitro ». *BMC Microbiology* 10 (1): 38. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-38>.
- Desriac, F., S. Rodrigues, I. Doghri, S. Sablé, I. Lanneluc, Y. Fleury, A. Bazire, et A. Dufour. 2018. « Antimicrobial and Antibiofilm Molecules Produced by Marine Bacteria ». In , 789-819. <https://doi.org/10.1002/9783527801718.ch25>.
- Dewasthale, S., I. Mani, et K. Vasdev. 2018. « Microbial Biofilm: Current Challenges in Health Care Industry ». *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* 5 (3). <https://doi.org/10.15406/jabb.2018.05.00132>.
- Dheilly, A., E. Soum-Soutera, G. L. Klein, A. Bazire, C. Compere, D. Haras, et A. Dufour. 2010. « Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* Sp. Strain 3J6 ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (11): 3452-61. <https://doi.org/10.1128/AEM.02632-09>.
- Dong, Y-H., X-F. Zhang, S-W. An, J-L. Xu, et L-H. Zhang. 2008. « A Novel Two-Component System BqsS-BqsR Modulates Quorum Sensing-Dependent Biofilm Decay in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Communicative & Integrative Biology* 1 (1): 88-96. <https://doi.org/10.4161/cib.1.1.6717>.
- Donlan R. M. 2002. « Biofilms: Microbial Life on Surfaces ». *Emerging Infectious Diseases* 8 (9): 881-90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.
- Donlan, R. M., et J. W. Costerton. 2002. « Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 167-93. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>.
- Estrela A. B., et W-R. Abraham. 2010. « Combining Biofilm-Controlling Compounds and Antibiotics as a Promising New Way to Control Biofilm Infections ». *Pharmaceuticals* 3 (5): 1374-93. <https://doi.org/10.3390/ph3051374>.
- Ferrara, S., S. Carloni, R. Fulco, M. Falcone, R. Macchi, et G. Bertoni. 2015. « Post-Transcriptional Regulation of the Virulence-Associated Enzyme AlgC by the $\sigma(22)$ - Dependent Small RNA ErsA of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Environmental Microbiology* 17 (1): 199-214. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12590>.
- Flemming, H-C., et J. Wingender. 2010. « The Biofilm Matrix ». *Nature Reviews. Microbiology* 8 (9): 623-33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
- Fletcher M. 1996. *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. John Wiley & Sons.
- Francis, V. I., E. C. Stevenson, et S. L. Porter. 2017. « Two-Component Systems Required for Virulence in *Pseudomonas aeruginosa* ». In *FEMS microbiology letters*. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx104>.
- Fuente-Núñez, C., F. Reffuveille, E. F. Haney, S. K. Straus, et R. E. W. Hancock. 2014. « Broad-Spectrum Anti-Biofilm Peptide That Targets a Cellular Stress Response ». *PLOS Pathogens* 10 (5): e1004152. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004152>.
- Gaboriaud, F., E. Dague, S. Baille, F. Jorand, J. Duval, et F. Thomas. 2006. « Multiscale Dynamics of the Cell Envelope of *Shewanella Putrefaciens* as a Response to PH Change. » *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 52 (2): 108-16. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.017>.
- García-Contreras, R., T. Maeda, et T. K. Wood. 2013. « Resistance to Quorum-Quenching Compounds ». *Applied and Environmental Microbiology* 79 (22): 6840-46. <https://doi.org/10.1128/AEM.02378-13>.
- Gauthier, G., M. Gauthier, et R. Christen. 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 ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 45 (4): 755-61. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-755>.
- Giraud, C. et S. de Bentzmann. 2012. « Inside the Complex Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Chaperone Usher Systems ». *Environmental Microbiology* 14 (8): 1805-16. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02673.x>.
- Glick, R., C. Gilmour, J. Tremblay, S. Satanower, O. Avidan, E. Déziel, E. P. Greenberg, K. Poole, et E. Banin. 2010. « Increase in Rhamnolipid Synthesis under Iron-Limiting Conditions Influences Surface Motility and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 192 (12): 2973-80. <https://doi.org/10.1128/JB.01601-09>.
- Glinel, R., P. Thebault, V. Humblot, C.M. Pradier, et T. Jouenne. 2012. « Antibacterial Surfaces Developed from Bio-Inspired Approaches ». *Acta Biomaterialia* 8 (5): 1670-84. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.011>.
- Gloag, E. S., L. Turnbull, A. Huang, P. Vallotton, H. Wang, L. M. Nolan, L. Mililli, et al. 2013. « Self-Organization of Bacterial Biofilms is Facilitated by Extracellular DNA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (28): 11541-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218898110>.
- Grasland, B., J. Mitalane, R. Briandet, E. Quemener, T. Meylheuc, I. Linossier, K. Vallee-Rehel, et D. Haras. 2003. « Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-Attached Marine Bacteria ». *Biofouling* 19 (5): 307-13. <https://doi.org/10.1080/0892701031000121041>.
- Grassi, L., G. Maisetta, S. Esin, et G. Batoni. 2017. « Combination Strategies to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms ». *Frontiers in Microbiology* 8 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02409>.
- Guillon, A., D. Fouquenot, E. Morello, C. Henry, S. Georgeault, M. Si-Tahar, et V. Hervé. 2018. « Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Present in Endotracheal Tubes by Poly-L-Lysine ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00564-18>.
- Gupta, K., J. Liao, O. E. Petrova, K. E. Cherny, et K. Sauer. 2014. « Elevated Levels of the Second Messenger c-di-GMP Contribute to Antimicrobial Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Molecular microbiology* 92 (3): 488-506. <https://doi.org/10.1111/mmi.12587>.
- Hakkila, K., M. Maksimow, M. Karp, et M. Virta. 2002. « Reporter Genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors ». *Analytical Biochemistry* 301 (2): 235-42. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5517>.
- Harmsen, M., L. Yang, S. J. Pamp, et T. Tolker-Nielsen. 2010. « An Update on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation, Tolerance, and Dispersal ». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 59 (3): 253-68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>.
- Hatch, R. A., N. L. Schiller. 1998. « Alginate Lyase Promotes Diffusion of Aminoglycosides through the Extracellular Polysaccharide of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (4): 974-77.
- Hentzer, M., G. M. Teitzel, G. J. Balzer, A. Heydorn, S. Molin, M. Givskov, et M. R. Parsek. 2001. « Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function ». *Journal of Bacteriology* 183 (18): 5395-5401. <https://doi.org/10.1128/jb.183.18.5395-5401.2001>.

- Hobley, L., C. Harkins, C. E. MacPhee, et N. R. Stanley-Wall. 2015. « Giving Structure to the Biofilm Matrix: an Overview of Individual Strategies and Emerging Common Themes ». *FEMS Microbiology Reviews* 39 (5): 649-69. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>.
- Holmström, C., et S. Kjelleberg. 1999. « Marine *Pseudoalteromonas* Species Are Associated with Higher Organisms and Produce Biologically Active Extracellular Agents ». *FEMS Microbiology Ecology* 30 (4): 285-93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00656.x>.
- Irie, Y., J. E. Geyer, et V. Shingler. 2018. « Hfq-Assisted RsmA Regulation Is Central to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm and Motility ». *BioRxiv*, octobre, 434555. <https://doi.org/10.1101/434555>.
- Irie, Y., M. Starkey, A. N. Edwards, D. J. Wozniak, T. Romeo, et M. R. Parsek. 2010. « *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Polysaccharide Psl Is Regulated Transcriptionally by RpoS and Post-Transcriptionally by RsmA ». *Molecular Microbiology* 78 (1): 158-72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x>.
- Islan, G. A., Y. N. Martinez, A. Illanes, et G. R. Castro. 2014. « Development of Novel Alginate Lyase Cross-Linked Aggregates for the Oral Treatment of Cystic Fibrosis ». *RSC Advances* 4 (23): 11758-65. <https://doi.org/10.1039/C3RA47850E>.
- Jennings, L., K. M. Storek, H. E. Ledvina, C. Coulon, L. S. Marmont, I. Sadovskaya, P. R. Secor, et al. 2015. « Pel Is a Cationic Exopolysaccharide That Cross-Links Extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (36): 11353-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>.
- Jones, C. J., et D. J. Wozniak. 2017. « Psl Produced by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Contributes to the Establishment of Biofilms and Immune Evasion ». *MBio* 8 (3): e00864-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00864-17>.
- Kaboord, Barbara, et Maria Perr. 2008. « Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation ». In *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*, édité par Anton Posch, 349-64. *Methods in Molecular Biology*TM. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_27.
- Kaplan, J.B. 2010. « Biofilm Dispersal ». *Journal of Dental Research* 89 (3): 205-18. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>.
- Kazmierczak, M. J., M. Wiedmann, et K. J. Boor. 2005. « Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (4): 527-43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.527-543.2005>.
- Kievit, T. R. 2009. « Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms ». *Environmental Microbiology* 11 (2): 279-88. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>.
- Kim, S-K, et J-H Lee. 2016. « Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Microbiology* 54 (2): 71-85. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5528-7>.
- Klausen, M., A. Aes-Jørgensen, S. Molin, et T. Tolker-Nielsen. 2003a. « Involvement of Bacterial Migration in the Development of Complex Multicellular Structures in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms ». *Molecular Microbiology* 50 (1): 61-68.
- Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aes-Jørgensen, S. Molin, et T. Tolker-Nielsen. 2003b. « Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Wild Type, Flagella and Type IV Pili Mutants ». *Molecular Microbiology* 48 (6): 1511-24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>.

- Klein, G., 2011. « Nouvelles Molécules Naturelles Inhibitrices du Développement de Biofilms de Bactéries Marines ». UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00089/19977/>.
- Klein, G., E. Soum-Soutéra, Z. Guede, A. Bazire, C. Compère, et A. Dufour. 2011. « The Anti-Biofilm Activity Secreted by a Marine Pseudoalteromonas Strain ». *Biofouling* 27 (8): 931-40. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.611878>.
- Kortemme, T., D. E. Kim, et D. Baker. 2004. « Computational Alanine Scanning of Protein-Protein Interfaces ». *Science Signaling* 2004 (219): pl2-pl2. <https://doi.org/10.1126/stke.2192004pl2>.
- Kostakioti, M., M. Hadjifrangiskou, et S. J. Hultgren. 2013. « Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>.
- Król, J. E., A. J. Wojtowicz, L. M. Rogers, H. Heuer, K. Smalla, S. M. Krone, et E. M. Top. 2013. « Invasion of *E. coli* Biofilms by Antibiotic Resistance Plasmids ». *Plasmid* 70 (1): 110-19. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.003>.
- Kulp, A., et M. J. Kuehn. 2010. « Biological Functions and Biogenesis of Secreted Bacterial Outer Membrane Vesicles ». *Annual review of microbiology* 64: 163-84. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>.
- Lebeaux, D., A. Chauhan, O. Rendueles, et C. Beloin. 2013. « From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections ». *Pathogens* 2 (2): 288-356. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>.
- Lee, B., J. A. J. Haagenzen, O. Ciofu, J. B. Andersen, N. Høiby, et S. Molin. 2005. « Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 5247-55. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5247-5255.2005>.
- Lee, J., J. Wu, Y. Deng, J. Wang, C. Wang, J. Wang, C. Chang, Y. Dong, P. Williams, et L.-H. Zhang. 2013. « A Cell-Cell Communication Signal Integrates Quorum Sensing and Stress Response ». *Nature Chemical Biology* 9 (5): 339-43. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>.
- Lee, J., et L.-H. Zhang. 2015. « The Hierarchy Quorum Sensing Network in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Protein & Cell* 6 (1): 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>.
- Lee, K., et S. S. Yoon. 2017. « *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (6): 1053-64. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>.
- Lee, V. T., J. M. Matewish, J. L. Kessler, M. Hyodo, Y. Hayakawa, et S. Lory. 2007. « A Cyclic-Di-GMP Receptor Required for Bacterial Exopolysaccharide Production ». *Molecular Microbiology* 65 (6): 1474-84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x>.
- Lewis, K., 2010. « Persister Cells ». *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 357-72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.
- Li, J., C. Attila, L. Wang, T. K. Wood, J. J. Valdes, et W. E. Bentley. 2007. « Quorum Sensing in *Escherichia Coli* Is Signaled by AI-2/LsrR: Effects on Small RNA and Biofilm Architecture ». *Journal of Bacteriology* 189 (16): 6011-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00014-07>.

- Li, X.-H., et J.-H. Lee. 2017. « Antibiofilm Agents: A New Perspective for Antimicrobial Strategy ». *Journal of Microbiology* 55 (10): 753-66. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7274-x>.
- Limoli, D. H., C. J. Jones, et D. J. Wozniak. 2015. « Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function ». *Microbiology Spectrum* 3 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>.
- Livak, KJ et TD Schmittgen. 2001. « Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) Method ». *Methods* 25 : 402-8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon, et G. B. Pier. 2002. « Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 194-222. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002>.
- Ma, L., M. Conover, H. Lu, M. R. Parsek, K. Bayles, et D. J. Wozniak. 2009. « Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix ». *PLoS Pathogens* 5 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>.
- Ma, L., H. Lu, A. Sprinkle, M. R. Parsek, et D. J. Wozniak. 2007. « *Pseudomonas aeruginosa* Psl Is a Galactose- and Mannose-Rich Exopolysaccharide ». *Journal of Bacteriology* 189 (22): 8353-56. <https://doi.org/10.1128/JB.00620-07>.
- Maeda, T., R. García-Contreras, M. Pu, L. Sheng, L. R. Garcia, M. Tomás, et T. K. Wood. 2012. « Quorum Quenching Quandary: Resistance to Antivirulence Compounds ». *The ISME Journal* 6 (3): 493-501. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.122>.
- Magnusson, L. U., A. Farewell, et T. Nyström. 2005. « PpGpp: A Global Regulator in *Escherichia coli* ». *Trends in Microbiology* 13 (5): 236-42. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.03.008>.
- Mahlapuu, M., J. Håkansson, L. Ringstad, et C. Björn. 2016. « Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
- Mai-Prochnow, A., J. S. Webb, B. C. Ferrari, et S. Kjelleberg. 2006. « Ecological Advantages of Autolysis during the Development and Dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* Biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8): 5414-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00546-06>.
- Mann, E. E., et D. J. Wozniak. 2012. « *Pseudomonas* Biofilm Matrix Composition and Niche Biology ». *FEMS microbiology reviews* 36 (4): 893-916. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x>.
- Mansour, S. C., C. de la Fuente-Núñez, et R. E. W. Hancock. 2015. « Peptide IDR-1018: Modulating the Immune System and Targeting Bacterial Biofilms to Treat Antibiotic-Resistant Bacterial Infections ». *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 21 (5): 323-29. <https://doi.org/10.1002/psc.2708>.
- Marques, C. N. H., D. G. Davies, et K. Sauer. 2015. « Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid ». *Pharmaceuticals* 8 (4): 816-35. <https://doi.org/10.3390/ph8040816>.
- Miller, C. L., M. Romero, S. L. Rajasekhar Karna, T. Chen, S. Heeb, et K. P. Leung. 2016. « RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* Small Non-Coding RsmA-Binding RNA Upregulated in Biofilm versus Planktonic Growth Conditions ». *BMC Microbiology* 16 (1): 155. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0771-y>.
- Mion, S., B. Rémy, L. Plener, É. Chabrière, et D. Daudé. 2019. « Quorum Sensing et Quorum Quenching : Comment Bloquer la Communication des Bactéries pour Inhiber leur

- Virulence ? » *médecine/sciences* 35 (1): 31-38.
<https://doi.org/10.1051/medsci/2018310>.
- Mitrofanova, O., A. Mardanova, V. Evtugyn, L. Bogomolnaya, et M. Sharipova. 2017. « Effects of Bacillus Serine Proteases on the Bacterial Biofilms ». *BioMed Research International* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8525912>.
- Morgan, R., S. Kohn, S.-H. Hwang, D. J. Hassett, et K. Sauer. 2006. « BdlA, a Chemotaxis Regulator Essential for Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 188 (21): 7335-43. <https://doi.org/10.1128/JB.00599-06>.
- Noinaj, N., M. Guillier, T. J. Barnard, et S. K. Buchanan. 2010. « TonB-dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function ». *Annual review of microbiology* 64 (octobre): 43-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>.
- Offret, C., F. Desriac, P. Le Chevalier, J. Mounier, C. Jégou, et Y. Fleury. 2016. « Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance ». *Marine Drugs* 14 (7). <https://doi.org/10.3390/md14070129>.
- Oishi, M., et S. D. Cosloy. 1972. « The Genetic and Biochemical Basis of the Transformability of *Escherichia Coli* K12 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 49 (6): 1568-72. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(72\)90520-7](https://doi.org/10.1016/0006-291x(72)90520-7).
- Olsen, I. 2015. « Biofilm-Specific Antibiotic Tolerance and Resistance ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 34 (5): 877-86. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>.
- O'Toole, G. A., et R. Kolter. 1998. « Flagellar and Twitching Motility Are Necessary for *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development ». *Molecular Microbiology* 30 (2): 295-304.
- Paget, M. S. 2015. « Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution ». *Biomolecules* 5 (3): 1245-65. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>.
- Pamp, S. J., M. Gjermansen, H. K. Johansen, et T. Tolker-Nielsen. 2008. « Tolerance to the Antimicrobial Peptide Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Is Linked to Metabolically Active Cells, and Depends on the Pmr and MexAB-OprM Genes ». *Molecular Microbiology* 68 (1): 223-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x>.
- Passos da Silva, D., M. L. Matwichuk, D. O. Townsend, C. Reichhardt, D. Lamba, D. J. Wozniak, et M. R. Parsek. 2019. « The *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecB Binds to the Exopolysaccharide Psl and Stabilizes the Biofilm Matrix ». *Nature Communications* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10201-4>.
- Patil A, M. R. 2014. « Role of Extracellular Proteases in Biofilm Disruption of Gram Positive Bacteria with Special Emphasis on *Staphylococcus Aureus* Biofilms ». *Enzyme Engineering* 04 (01). <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000126>.
- Petrova, O. E., K. E. Cherny, et K. Sauer. 2015. « The Diguanylate Cyclase GcbA Facilitates *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Dispersion by Activating BdlA ». *Journal of Bacteriology* 197 (1): 174-87. <https://doi.org/10.1128/JB.02244-14>.
- Pita, T., J. R. Feliciano, et J. H. Leitão. 2018. « Small Noncoding Regulatory RNAs from *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* Complex ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123759>.
- Pletzer, D., S. R. Coleman, et R. E. Hancock. 2016. « Anti-Biofilm Peptides as a New Weapon in Antimicrobial Warfare ». *Current Opinion in Microbiology* 33: 35-40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>.

- Poudyal, B., et K. Sauer. 2018. « The ABC of Biofilm Drug Tolerance: the MerR-Like Regulator BrIR Is an Activator of ABC Transport Systems, with PA1874-77 Contributing to the Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Tobramycin ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01981-17>.
- Prescott, L. M., J. P. Harley, et Donald A. Klein. 1995. *Microbiologie*. De Boeck université.
- Rabin, N., Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, et H. O. Sintim. 2015. « Agents That Inhibit Bacterial Biofilm Formation ». *Future Medicinal Chemistry* 7 (5): 647-71. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.7>.
- Ramsey, D. M., et D. J. Wozniak. 2005. « Understanding the Control of *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Synthesis and the Prospects for Management of Chronic Infections in Cystic Fibrosis ». *Molecular Microbiology* 56 (2): 309-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x>.
- Rasamiravaka, T., Q. Labtani, P. Duez, et M. El Jaziri. 2015a. « The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* : A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms ». *BioMed Research International* 2015: 1-17. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>.
- Rendueles, O., J. B. Kaplan, et J.-M. Ghigo. 2013. « Antibiofilm Polysaccharides ». *Environmental Microbiology* 15 (2): 334-46. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02810.x>.
- Renner, L. D., et D. B. Weibel. 2011. « Physicochemical Regulation of Biofilm Formation ». *MRS bulletin / Materials Research Society* 36 (5): 347-55. <https://doi.org/10.1557/mrs.2011.65>.
- Rodrigues, S. 2014. « Caractérisation et Contrôle du Biofilm de *Vibrio tapetis*, Pathogène de la Palourde Japonaise *Ruditapes philippinarum* ». *Thèse Université de Bretagne Sud*.
- Rodrigues, S., C. Paillard, A. Dufour, et A. Bazire. 2015. « Antibiofilm Activity of the Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 Against *Vibrio tapetis*, the Causative Agent of Brown Ring Disease ». *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 7 (1): 45-51. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9173-3>.
- Rodrigues, S., C. Paillard, S. Van Dillen, A. Tahrioui, J.-M. Berjeaud, A. Dufour, et A. Bazire. 2018. « Relation between Biofilm and Virulence in *Vibrio tapetis*: A Transcriptomic Study ». *Pathogens* 7 (4). <https://doi.org/10.3390/pathogens7040092>.
- Römling, U., M. Y. Galperin, et M. Gomelsky. 2013. « Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 77 (1): 1-52. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00043-12>.
- Roy, A. B., et K. Sauer. 2014. « Diguanylate Cyclase NicD Based Signaling Mechanism of Nutrient-Induced Dispersion by *Pseudomonas aeruginosa* ». *Molecular microbiology* 94 (4): 771-93. <https://doi.org/10.1111/mmi.12802>.
- Roy, R., M. Tiwari, G. Donelli, et V. Tiwari. 2017. « Strategies for Combating Bacterial Biofilms: A Focus on Anti-biofilm Agents and their Mechanisms of Action ». *Virulence* 9 (1): 522-54. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>.
- Sadovskaya, I., E. Vinogradov, J. Li, A. Hachani, K. Kowalska, et A. Filloux. 2010. « High-Level Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: The NdvB Gene Is Involved in the Production of Highly Glycerol-Phosphorylated Beta-(1->3)-Glucans, Which Bind Aminoglycosides ». *Glycobiology* 20 (7): 895-904. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq047>.
- Sambanthamoorthy, K., C. Luo, N. Pattabiraman, X. Feng, B. Koestler, C. M. Waters, et T. J. Palys. 2014. « Identification of Small Molecules Inhibiting Diguanylate Cyclases to

- Control Bacterial Biofilm Development ». *Biofouling* 30 (1): 17-28. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.832224>.
- Sauer, K., A. K. Camper, G. D. Ehrlich, J. W. Costerton, et D. G. Davies. 2002. « *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm ». *Journal of Bacteriology* 184 (4): 1140-54. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>.
- Schafhauser, J., F. Lepine, G. McKay, H. G. Ahlgren, M. Khakimova, et D. Nguyen. 2014. « The Stringent Response Modulates 4-Hydroxy-2-Alkylquinoline Biosynthesis and Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 196 (9): 1641-50. <https://doi.org/10.1128/JB.01086-13>.
- Seoane, J., T. Yankelevich, A. Dechesne, B. Merkey, C. Sternberg, et B. F. Smets. 2011. « An Individual-Based Approach to Explain Plasmid Invasion in Bacterial Populations ». *FEMS Microbiology Ecology* 75 (1): 17-27. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00994.x>.
- Shrout, J. D., D. L. Chopp, C. L. Just, M. Hentzer, M. Givskov, et M. R. Parsek. 2006. « The Impact of Quorum Sensing and Swarming Motility on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation Is Nutritionally Conditional ». *Molecular Microbiology* 62 (5): 1264-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05421.x>.
- Simon, M. 2015. « Lutte Contre Les Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans le Contexte de la Mucoviscidose ». Thèse Université de Bretagne Sud.
- Skerker, J. M., et H. C. Berg. 2001. « Direct Observation of Extension and Retraction of Type IV Pili ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (12): 6901-4. <https://doi.org/10.1073/pnas.121171698>.
- Supardy, N. A., D. Ibrahim, S. Radziah Mat Nor, et W. Norhana Md Noordin. 2019. « Bioactive Compounds of *Pseudoalteromonas* Sp. IBRL PD4.8 Inhibit Growth of Fouling Bacteria and Attenuate Biofilms of *Vibrio Alginolyticus* FB3 ». *Polish Journal of Microbiology* 68 (1): 21-33. <https://doi.org/10.21307/pjm-2019-003>.
- Taylor, P. K., A. T. M. Van Kessel, A. Colavita, R. E. W. Hancock, et T.-F. Mah. 2017. « A Novel Small RNA Is Important for Biofilm Formation and Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa* ». Édité par Roy Martin Roop. *PLOS ONE* 12 (8): e0182582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182582>.
- Thompson, L. S., J. S. Webb, S. A. Rice, et S. Kjelleberg. 2003. « The Alternative Sigma Factor RpoN Regulates the Quorum Sensing Gene RhII in *Pseudomonas aeruginosa* ». *FEMS Microbiology Letters*. 1 mars 2003. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00097-1).
- Tolker-Nielsen, T., et C. Sternberg. 2014. « Methods for Studying Biofilm Formation: Flow Cells and Confocal Laser Scanning Microscopy ». In *Pseudomonas Methods and Protocols*, édité par Alain Filloux et Juan-Luis Ramos, 615-29. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_47.
- Turnbull, L., M. Toyofuku, A. L. Hynen, M. Kurosawa, G. Pessi, N. K. Petty, S. R. Osvath, et *al.* 2016. « Explosive Cell Lysis as a Mechanism for the Biogenesis of Bacterial Membrane Vesicles and Biofilms ». *Nature Communications* 7 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms11220>.
- Typas, A., et R. Hengge. 2006. « Role of the Spacer between the -35 and -10 Regions in Sigma S Promoter Selectivity in *Escherichia coli* ». *Molecular Microbiology* 59 (3): 1037-51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04998.x>.

- Uroz, S., Y. Dessaux, et P. Oger. 2009. « Quorum Sensing and Quorum Quenching: The Yin and Yang of Bacterial Communication ». *ChemBioChem* 10 (2): 205-16. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800521>.
- Vallet, I., S. P. Diggle, R. E. Stacey, M. Cámara, I. Ventre, S. Lory, A. Lazdunski, P. Williams, et A. Filloux. 2004. « Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Fimbrial Cup Gene Clusters Are Controlled by the Transcriptional Regulator MvaT ». *Journal of Bacteriology* 186 (9): 2880-90. <https://doi.org/10.1128/jb.186.9.2880-2890.2004>.
- Viola, R. E. 2001. « The Central Enzymes of the Aspartate Family of Amino Acid Biosynthesis ». *Accounts of Chemical Research* 34 (5): 339-49. <https://doi.org/10.1021/ar000057q>.
- Wang, H., C. Wang, Y. Tang, B. Sun, J. Huang, et X. Song. 2018. « *Pseudoalteromonas* Probiotics as Potential Biocontrol Agents Improve the Survival of *Penaeus vannamei* Challenged with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* ». *Aquaculture* 494 (septembre): 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.020>.
- Wang, P., Z. Yu, B. Li, X. Cai, Z. Zeng, X. Chen, et X. Wang. 2015. « Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas* ». *Microbial Cell Factories* 14 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0194-8>.
- Wang, W., W. Chanda, et M. Zhong. 2015. « The Relationship between Biofilm and Outer Membrane Vesicles: A Novel Therapy Overview ». *FEMS Microbiology Letters* 362 (15). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv117>.
- Webb, J. S., L. S. Thompson, S. James, T. Charlton, T. Tolker-Nielsen, B. Koch, M. Givskov, et S. Kjelleberg. 2003. « Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development ». *Journal of Bacteriology* 185 (15): 4585-92. <https://doi.org/10.1128/jb.185.15.4585-4592.2003>.
- Werner, E., F. Roe, A. Bugnicourt, M. J. Franklin, A. Heydorn, S. Molin, B. Pitts, et P. S. Stewart. 2004. « Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 6188-96. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6188-6196.2004>.
- Williams, V., et M. Fletcher. 1996. « *Pseudomonas fluorescens* Adhesion and Transport through Porous Media are Affected by Lipopolysaccharide Composition. » *Applied and Environmental Microbiology* 62 (1): 100-104.
- Wilton, M., L. Charron-Mazenod, R. Moore, et S. Lewenza. 2015. « Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (1): 544-53. <https://doi.org/10.1128/AAC.01650-15>.
- Wösten, M. M. 1998. « Eubacterial Sigma-Factors ». *FEMS Microbiology Reviews* 22 (3): 127-50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00364.x>.
- Wozniak, D. J., T. J. O. Wyckoff, M. Starkey, R. Keyser, P. Azadi, G. A. O'Toole, et M. R. Parsek. 2003. « Alginate is not a Significant Component of the Extracellular Polysaccharide Matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (13): 7907-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1231792100>.
- Xu, X., H. Yu, D. Zhang, J. Xiong, J. Qiu, R. Xin, X. He, et al. 2016. « Role of ppGpp in *Pseudomonas aeruginosa* Acute Pulmonary Infection and Virulence Regulation | Elsevier Enhanced Reader ». *Microbiological research* 192: 84-95.
- Yasir, M., M. Willcox, et D. Dutta. 2018. « Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms ». *Materials* 11 (12): 2468. <https://doi.org/10.3390/ma11122468>.

- Yeaman, M. R., et N. Y. Yount. 2003. « Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance ». *Pharmacological Reviews* 55 (1): 27-55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>.
- Yu, H. H. Y., E. G. Di Russo, M. A. Rounds, et M. Tan. 2006. « Mutational Analysis of the Promoter Recognized by Chlamydia and Escherichia Coli Sigma(28) RNA Polymerase ». *Journal of Bacteriology* 188 (15): 5524-31. <https://doi.org/10.1128/JB.00480-06>.
- Yu, S., T. Su, H. Wu, S. Liu, D. Wang, T. Zhao, Z. Jin, et al. 2015. « PslG, a Self-Produced Glycosyl Hydrolase, Triggers Biofilm Disassembly by Disrupting Exopolysaccharide Matrix ». *Cell Research* 25 (12): 1352-67. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.129>.
- Yu, S., Q. Wei, T. Zhao, Y. Guo, et L. Z. Ma. 2016. « A Survival Strategy for *Pseudomonas aeruginosa* That Uses Exopolysaccharides To Sequester and Store Iron To Stimulate Psl-Dependent Biofilm Formation ». *Applied and Environmental Microbiology* 82 (21): 6403-13. <https://doi.org/10.1128/AEM.01307-16>.
- Yu, Z.-C., D.-Li Zhao, L.-Y. Ran, Z.-H. Mi, Z.-Y. Wu, X.-H. Pang, X.-Y. Zhang, et al. 2014. « Development of a Genetic System for the Deep-sea Psychrophilic Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 ». *Microbial cell factories* 13 (janvier): 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-13>.
- Zhang, K., L. Su, X. Duan, L. Liu, et J. Wu. 2017. « High-Level Extracellular Protein Production in *Bacillus Subtilis* Using an Optimized Dual-Promoter Expression System ». *Microbial Cell Factories* 16 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0649-1>.
- Zhang, L., et T.-F. Mah. 2008. « Involvement of a Novel Efflux System in Biofilm-Specific Resistance to Antibiotics ». *Journal of Bacteriology* 190 (13): 4447-52. <https://doi.org/10.1128/JB.01655-07>.
- Zhang, W., et C. Li. 2016. « Exploiting Quorum Sensing Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications ». *Frontiers in Microbiology* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01535>.
- Zschiedrich, C. P., V. Keidel, et H. Szurmant. 2016. « Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction ». *Journal of molecular biology* 428 (19): 3752-75. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.003>.

Annexes

Publications

Caractérisation des biofilms de souches de *Pseudomonas aeruginosa*

1-M. Simon, E. Pernet, **A. Jouault**, E. Portier, A.M. Boukerb, S. Pineau, J. Vieillard, E. Bouffartigues, C. Poc-Duclair, M.G.J. Feuilleley, O. Lesouhaitier, J. Caillon, S. Chevalier, A. Bazire, A. Dufour. *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains displaying various biofilm architectures. *Biofilm*, en révision.

2-A. M. Boukerb, M. Simon, E. Pernet, **A. Jouault**, E. Portier, E. Persyn, E. Bouffartigues, A. Bazire, S. Chevalier, M. G. J. Feuilleley, O. Lesouhaitier, J. Caillon, A. Dufour. 2020. Draft genome sequences of four *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains with various biofilm phenotypes. *Microbiology Resource Announcements*.

Démonstration de l'activité antibiofilm de l'altérocine

A. Jouault, A. Gobet, M. Simon, E. Portier, M. Perennou, E. Corre, F. Gaillard, E. Duchaud, D. Vallenet, E. Bouffartigues, O. Lesouhaitier, S. Chevalier, J. Caillon, G. Michel, Y. Fleury, A. Bazire, A. Dufour. Alterocin is an antibiofilm protein secreted by non-pigmented *Pseudoalteromonas* sp. strains. *Applied and Environmental Microbiology*. En préparation.

Communications orales

A. Jouault, A. Gobet, M. Simon, M. Perennou, F. Gaillard, E. Corre, E. Portier, Y. Fleury, G. Michel, A. Bazire, A. Dufour. 2018. The alterocin gene encodes an antibiofilm protein secreted by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Présentation orale par A. Jouault. **6th International Symposium on Antimicrobial Peptides (AMP)**, Poitiers, June 6-8, 2018.

A. Jouault, A. Gobet, M. Simon, M. Perennou, F. Gaillard, E. Corre, E. Portier, Y. Fleury, G. Michel, A. Bazire, A. Dufour. 2018. Alterocine : une protéine antibiofilm sécrétée par la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Présentation orale par A. Jouault. **5èmes Journées Annuelles du GDR 3625 "MultiFonction des Peptides AntiMicrobiens" (MuFoPAM)**, Paris, 11-12 Octobre 2018.

Communications écrites

A. Jouault, Y. Fleury, A. Bazire, A. Dufour. L'Altérocine, une biomolécule pour combattre les biofilms bactériens. Poster, **Ville Colloque de l'Association Francophone d'Écologie Microbienne (AFEM)**, Camaret, 17-20 Octobre 2017.

A. Jouault, Y. Fleury, A. Bazire, A. Dufour. 2019. L'Altérocine, une biomolécule pour combattre les biofilms bactériens. Poster. **Journées de l'école doctorale Sciences de la Mer et du Littoral (SML)**, La Turballe, 28/02 et 01/03 2019.

Ville Colloque de l'Association Francophone d'Écologie Microbienne (AFEM)

L'Altéroïcine, une biomolécule pour combattre les biofilms bactériens

JOUAULT A., FLEURY Y., BAZIRE A., DUFUR A.

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, Université de Bretagne-Sud et Université de Brest, IUEM, France



Introduction

Le **biofilm bactérien** correspond à une communauté bactérienne, adhérant à une surface ou à une interface et enveloppée d'une matrice hautement hydratée sécrétée par les bactéries elles-mêmes. Il pose de nombreux problèmes dans différents domaines.

Dans une précédente étude [1], les **exoproduits** de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 ont montré une **activité anti-biofilm**. Récemment, le génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a été séquencé et annoté. Nous avons identifié un gène codant pour un peptide sécrété, qui pourrait être responsable de l'activité anti-biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Nous avons nommé ce peptide **Altéroïcine**.

Afin de vérifier que l'Altéroïcine possède une activité anti-biofilm, ce peptide a été surproduit dans la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

Matériels et méthodes

Construction des souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriT) et 3J6(pOriTalt)

Le gène *alt* codant pour l'Altéroïcine ainsi que son promoteur ont été insérés dans le vecteur pOriT [2] pour obtenir le plasmide recombinant pOriTalt. Une souche témoin avec le plasmide pOriT a été construite.

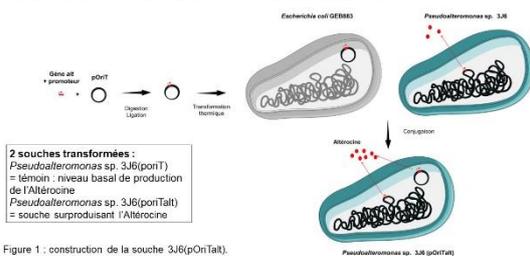


Figure 1 : construction de la souche 3J6(pOriTalt).

Activité anti-biofilm sur les biofilms formés par *Pseudomonas aeruginosa*

Les souches de *Pseudoalteromonas* ont été cultivées pendant 24h en milieu VNSS à 20°C et les surnageants de culture (SN) ont été récoltés puis conservés à 4°C. L'activité de ces SN a été testée sur la formation de biofilms par les souches *P. aeruginosa* PAO1 (souche de laboratoire) et MUC-N1 (souche clinique mucoïde). Les biofilms de PAO1 ont été cultivés en microplaques (PAO1) ou en chambres à flux (MUC-N1, Figure 2). Le traitement avec les SN a eu lieu pendant toute la formation des biofilms pour le test en microplaque. Pour le test en chambres à flux, il a eu lieu pendant l'étape d'adhésion.

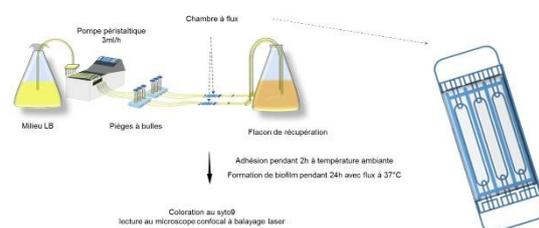


Figure 2 : Protocole du test d'activité en chambres à flux.

Conclusion

Ces résultats montrent que l'activité anti-biofilm du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 augmente lorsque cette souche contient plusieurs copies du gène *alt*, ce qui indique que l'Altéroïcine est responsable de l'activité anti-biofilm.

Résultats

> Effet des SN sur le biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1 en chambres à flux

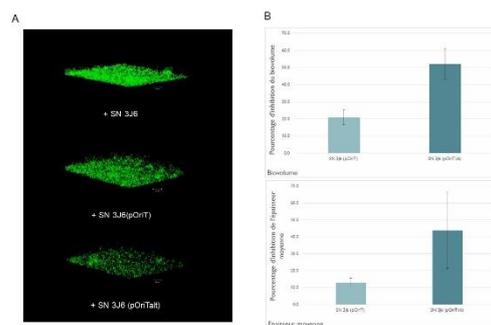


Figure 3: Activité des SN sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* MUC-N1. A) Biofilms observés au microscope confocal à balayage laser après marquage des bactéries au syto6. B) Pourcentages d'inhibition de la formation du biofilm lors de traitements avec SN 3J6(pOriT) et SN 3J6(pOriTalt). Ces valeurs résultent de l'analyse quantitative des biofilms (A) à l'aide du logiciel COMSTAT.

Les reconstitutions 3D (Figure 3A) indiquent que SN 3J6(pOriTalt) possède une activité anti-biofilm plus forte que SN 3J6(pOriT). L'analyse quantitative des biofilms (Figure 3B) montre des pourcentages d'inhibition de la biomasse et de l'épaisseur moyenne du biofilm plus élevés lors du traitement avec SN 3J6(pOriTalt).

> Effet des SN sur le biofilm formé par *P. aeruginosa* PAO1 en microplaques

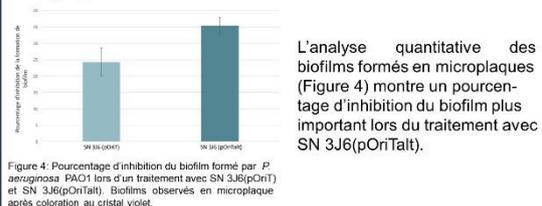


Figure 4: Pourcentage d'inhibition du biofilm formé par *P. aeruginosa* PAO1 lors d'un traitement avec SN 3J6(pOriT) et SN 3J6(pOriTalt). Biofilms observés en microplaque après coloration au cristal violet.

Remerciements : AJ bénéficie d'une allocation doctorale de la Région Bretagne et de l'Université de Bretagne-Sud. Ce projet bénéficie du soutien de l'Agence Nationale de la Recherche (programme IDEALS ANR-10-BTBR-04). Le LBCM est soutenu financièrement par la Région Bretagne et les fonds FEDER Européens.



[1] Dheilly A, Soum-Soutera E, Klein GL, Bazire A, Compere C, Haras D, Dufour A. 2010. Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Appl Environ Microbiol* 76:3452-3461.

[2] Wang P, Yu Z, Li B, Cai X, Zeng Z, Chen X, Wang X. 2015. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*. *Microb Cell Fact* 10:1186/11294-015-0194-8.

Pour plus d'informations :
albane.jouault@univ-ubs.fr



Journées de l'école doctorale Sciences de la Mer et du Littoral (SML)

L'Altéroïcine, une biomolécule pour combattre les biofilms bactériens

JOUAULT A., FLEURY Y., BAZIRE A., DUFOUR A.

Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, Université de Bretagne-Sud et Université de Brest, IJEM, France



Introduction

Le **biofilm bactérien** correspond à une communauté bactérienne, adhérant à une surface ou à une interface et enveloppée d'une matrice hautement hydratée sécrétée par les bactéries elles-mêmes. Sa formation est notamment régulée par le quorum sensing, système de communication des bactéries. Sa structure et sa composition varient en fonction de la souche mais également de son environnement. Avec ce mode de vie, les bactéries deviennent plus résistantes aux agents antibactériens. Les biofilms posent donc des problèmes dans de nombreux domaines.



Dans une précédente étude [1], les **exoproduits** de la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 ont montré une **activité anti-biofilm**. Récemment, le génome de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 a été séquencé et annoté. Nous avons identifié un gène codant pour une protéine sécrétée, qui pourrait être responsable de l'activité anti-biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Nous avons nommé cette protéine **Altéroïcine**.

Afin de vérifier que l'Altéroïcine possède une activité anti-biofilm, ce peptide a été surproduit dans la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

Matériels et méthodes

Construction des souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J6(pOriT) et 3J6(pOriTalt)

Le gène *alt* codant pour l'Altéroïcine ainsi que son promoteur ont été insérés dans le vecteur pOriT [2] pour obtenir le plasmide recombinant pOriTalt. Une souche témoin avec le plasmide pOriT a été construite.

Production de l'altéroïcine

Les souches de *Pseudoalteromonas* ont été cultivées pendant 24h en milieu VNSS à 20°C et les surnageants de culture (SN) ont été récoltés puis partiellement purifiés par extraction en phase solide sur colonne C18. La production d'altéroïcine a été observée par électrophorèse (SDS-PAGE).

Activité anti-biofilm sur les biofilms formés par *Pseudomonas aeruginosa*

L'activité de ces SN a été testée sur la formation de biofilms par la souche *P. aeruginosa* MUC-N1 (souche clinique mucocoele). Le traitement a eu lieu pendant l'étape d'adhésion.

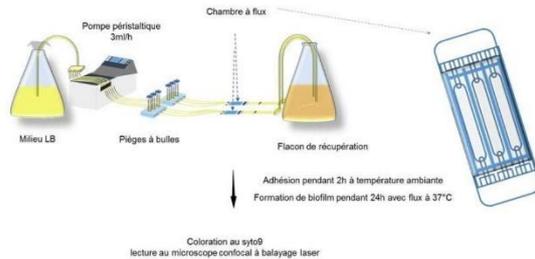


Figure 1 : Protocole du test d'activité en chambres à flux.

Résultats

> Surproduction de l'altéroïcine

L'analyse par SDS-PAGE (Figure 2) montre une abondance plus importante d'une protéine d'environ 13 kDa dans SN 3J6(pOriTalt). Ce poids moléculaire correspond à celui attendu pour l'altéroïcine.

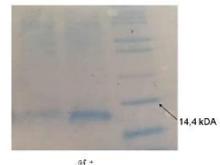
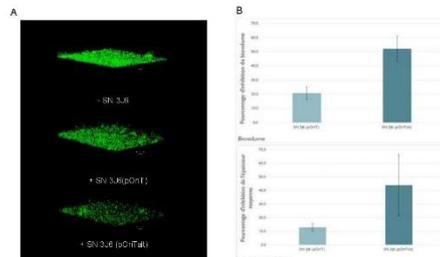


Figure 2: Surproduction de l'altéroïcine. Depot de SN 3J6(pOriT) en 1 et de SN 3J6(pOriTalt) en 2.

> Effet des SN sur le biofilm formé par *P. aeruginosa* MUC-N1 en chambres à fluxFigure 3: Activité des SN sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* MUC-N1. A : Biofilms observés au microscope confocal à balayage laser après marquage des bactéries au syto9. B : Pourcentages d'inhibition de formation du biofilm lors de traitements avec SN 3J6(pOriT) et SN 3J6(pOriTalt). Ces valeurs résultent de l'analyse quantitative des biofilms (A) à l'aide du logiciel COMSTAT.

Les reconstitutions 3D (Figure 3A) indiquent que SN 3J6(pOriTalt) possède une activité anti-biofilm plus forte que SN 3J6(pOriT). L'analyse quantitative des biofilms (Figure 3B) montre des pourcentages d'inhibition de la biomasse et de l'épaisseur moyenne du biofilm plus élevés lors du traitement avec SN 3J6(pOriTalt).

Conclusion et travaux en cours

Ces résultats montrent que l'activité anti-biofilm du surnageant de culture de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 augmente lorsque cette souche contient plusieurs copies du gène *alt*, ce qui indique que l'altéroïcine est responsable de l'activité anti-biofilm.

La transcription du gène *alt* est actuellement analysée afin d'optimiser la production de l'altéroïcine. Le mode d'action de l'altéroïcine est également étudié.

Remerciements : Au bénéfice d'une allocation octroyée de la Région Bretagne et de l'Université de Bretagne-Sud. Ce projet bénéficie du soutien de l'Agence Nationale de la Recherche (programme IDEALG ANR-13R13R-04). Le LBCM est soutenu financièrement par la Région Bretagne et les fonds FEDER Européens.



[1] Dhelly A, Soum-Soutera E, Klein GL, Bazire A, Compere C, Haras D, Dufour A. 2010. Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. Appl Environ Microbiol 76:3452-3461.

[2] Wang P, Yu Z, Li B, Cai X, Zeng Z, Chen X, Wang X. 2015. Development of an efficient conjugation-based genetic manipulation system for *Pseudoalteromonas*. Microb Cell Fact 10.1186/s12934-015-0194-8.

Pour plus d'informations :
albane.jouault@univ-ubs.fr



Titre : Altérocine : une protéine antibiofilm sécrétée par la bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6

Mots clés : Biofilm, Protéine antibiofilm, *Pseudoalteromonas*

Résumé : Le biofilm est un mode de vie qui confère aux bactéries une protection contre les agents antimicrobiens et pose un problème de santé publique qui nécessite de trouver une alternative aux traitements actuels. La bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et ses exoproduits (SN_{3J6}) montrent une activité antibiofilm contre des bactéries marines et terrestres. Une protéine, nommée altérocine, a été extraite du SN_{3J6}. Bien que présente chez plusieurs autres souches de *Pseudoalteromonas*, son rôle est encore inconnu dans les bases de données. Ce projet a été consacré à l'étude de l'altérocine. Les caractéristiques de cette protéine ainsi que celles de son gène, *alt*, ont dans un premier temps été étudiées. Le gène *alt* n'est pas organisé en opéron et plusieurs promoteurs potentiels ont été identifiés. Il est exprimé préférentiellement durant la phase stationnaire. Il code une protéine de 139 résidus incluant un peptide signal prédit, qui permettrait la sécrétion de l'altérocine mature (119 résidus). Aucune homologie de séquence n'a été observée entre l'altérocine et les protéines de fonction connue des bases de données. Afin de détecter plus facilement l'altérocine dans le surnageant de culture, des anticorps anti-altérocine ont été obtenus. Nous avons dans un second temps confirmé l'activité antibiofilm de l'altérocine par une production hétérologue chez une autre souche de *Pseudoalteromonas* et en comparant les biofilms obtenus en présence des surnageants de culture de cette souche et de sa souche mère. Nous avons montré que l'altérocine est un nouveau type de protéine antibiofilm dont la structure et le mode d'action restent à déterminer pour l'utiliser comme agent antibiofilm.

Title: Alterocin: an antibiofilm protein secreted by the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6.

Keywords: Biofilm, Antibiofilm protein, *Pseudoalteromonas*

Abstract: The biofilm lifestyle provides to bacteria a protection against antibacterial agents and leads to public health problems that require an alternative to current treatments. The marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 and its exoproducts (SN_{3J6}) display an antibiofilm activity against various bacteria from marine or terrestrial origin. A protein from SN_{3J6}, named alterocin, was partially purified. Although the protein is found in several other *Pseudoalteromonas* strains, its function remains unknown. In this work, we studied the alterocin. We investigated the protein and gene characteristics at first. The gene *alt*, coding alterocin, is not part of an operon and several potential promoters were identified. Its expression seems subject to regulation as it is mainly expressed in stationary phase. It encodes a 139-residue protein with a putative leader peptide, which would allow the secretion of mature alterocin as a 119-residue protein. No sequence homology has been found between alterocin and other proteins of known function in data bases. Anti-alterocin antibodies were produced for an easy detection method. In a second time, we confirmed the antibiofilm activity of alterocin by heterologous production in another *Pseudoalteromonas* strain and comparing biofilms obtained in the presence of culture supernatants of either this strain or the parental strain. In this work, we showed that the alterocin is a new type of antibiofilm protein whose structure and mechanism of action remain to be elucidated to use it as antibiofilm agent.