



HAL
open science

Diversité des interactions microbiennes au sein de l'environnement marin : De biofilms multi-spécifiques à multi-organismes

Richard Guillonueau

► **To cite this version:**

Richard Guillonueau. Diversité des interactions microbiennes au sein de l'environnement marin : De biofilms multi-spécifiques à multi-organismes. Biologie moléculaire. Université de Toulon, 2018. Français. NNT : 2018TOUL0009 . tel-03721987

HAL Id: tel-03721987

<https://theses.hal.science/tel-03721987>

Submitted on 13 Jul 2022

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

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

ÉCOLE DOCTORALE n° 548 « Mer et Sciences »
Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par :

Richard GUILLONNEAU

soutenue le : **2 mai 2018**

pour obtenir le grade de **Docteur en aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**
Spécialité : **Microbiologie**

Diversité des interactions microbiennes au sein de l'environnement marin : de biofilms multi-spécifiques à multi-organismes

THÈSE dirigée par :	Pr MOLMERET Maëlle Dr BARAQUET Claudine	Directrice de thèse Co-encadrante de thèse
----------------------------	----------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------

JURY :

M. BRIANDET Romain	Directeur de Recherche, INRA	Rapporteur
M. BERJEAUD Jean-Marc	Professeur des universités Université de Poitiers	Rapporteur
Mme KAY Elizabeth	Chargé de recherches, CNRS	Examinatrice
Mme MOLMERET Maëlle	Professeur des universités Université de Toulon	Directrice de thèse
Mme BARAQUET Claudine	Maître de conférences Université de Toulon	Co-encadrante de thèse

Remerciements

Avant toute chose, je remercie les directeurs successifs du laboratoire MAPIEM, le Pr André Margaillan ainsi que le Pr Jean-François Chaillan, pour leur accueil et m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire. Je remercie également la région PACA ainsi que le Pôle Mer Méditerranée pour l'attribution de cette bourse de thèse.

Je tiens ensuite à remercier ma directrice de thèse Maëlle Molmeret ainsi que ma co-encadrante Claudine Baraquet pour leur implication, leurs conseils ainsi que leur confiance durant toute la durée de cette thèse. Merci Maëlle pour ton aide, les corrections en tout genre dont mes CVs, ... les faux entretiens d'embauche et merci de m'avoir aidé afin d'obtenir ce futur poste. Merci aussi pour les petits cadeaux : les paquets de M&M's, de cacahuète... même si ils ont été plus rare sur la fin ;-). Merci Claudine pour ton aide, tes conseils, de m'avoir fait faire un grand nombre de pause cigarette même si il paraît que tu as arrêté de fumer. C'est toujours sympa d'échanger avec de toi sur des sujets pas toujours scientifiques !

Je remercie les membres du jury, Mme Elizabeth Kay, M. Jen-Marc Berjeaud et M. Romain Briandet pour avoir accepté de corriger ce travail. J'espère qu'il vous intéressera autant qu'il m'a intéressé durant ces trois années.

Je souhaite également remercier mes encadrants de stage de M2, Fabienne Legrand, Hélène Hegaret et Philippe Soudant, pour avoir appuyé ma candidature pour cette thèse et pour ce futur post doc ainsi que pour leurs nouvelles régulières et leurs conseils toujours aujourd'hui.

Je veux également remercier chaleureusement toute l'équipe du LBCM de Lorient, pour leur accueil à l'UBS. Merci d'avoir répondu à mes questions et d'avoir pris le temps de m'expliquer comment ça fonctionnait chez vous, en particulier à Typhanie

et Sterenn. Un merci particulier à Alexis bazire pour ta sympathie et d'avoir pris de ton temps pour me faire découvrir la microscopie confocale et le système de flowcell.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe d'enseignement du département Bio, en particulier à Natacha Jean pour ces petites réunions pour préparer les TPs de BA. Et un grand merci à Sylvie Faure pour sa sympathie et m'avoir laissé utiliser les appareils du département et m'avoir dépanné lorsqu'il y avait des petits problèmes avec les commandes.

Merci aux stagiaires que j'ai encadré Nastasia Freyria et Fahima Hamouche, pour leur sympathie et leur enthousiasme. Encore désolé pour les heures que vous avez fait afin d'être présente à la phase post exponentielle de ces petites bactéries.

Je ne dois pas oublier Anne Delarue, Brigitte Gedoux, Raphaëlle Barry, Ahmad Fahs, Bruno Viguiet et Marlène Lejars qui ont « presque » toujours répondu favorablement à mes demandes de commande, d'ordre de mission ou à toutes mes questions.

Un merci particulier à Aurore Puymège qui m'a appris un grand nombre de chose quand je suis arrivé au labo et avec qui j'ai partagé les galères des transformations/conjugaisons et des « ça a pas marché. » Merci pour les soirées au labo à repiquer ces bactéries et pour ton espoir dans le fait qu'on allait y arriver et bien sur pour les jeux de piste pour trouver le « super portoir. »

Un grand merci à tous les membres du Labo, une thèse c'est trois ans mais c'est toujours mieux d'être avec des gens sympathiques et dans un environnement agréable. Les pauses du midi me manqueront sûrement. Merci à tous, en particulier aux « jeunes » dont certains sont partis : Thomas, Benoit, Lina, Vitalys, Alain, Marlène, Lucile, Damien, Roberto, Raphaëlle, Bruno, Clément, Elisa, Marine, Mélanie, Sofyane ...

Je remercie également les gars de PROTEE pour un certain nombre de soirée : Cyril, Ayoub, Seb, Nico, Youssef

Merci à mes potes d'océano : Florent, Pierre et Charlie. Rien de tels que nos conversations Whatsapp et vos conneries pour que je me mette à rigoler tout seul au bureau. Les weekends Ski, Barcelone, ou les soirées à Nantes me remotivent pour 6 mois à chaque fois.

Bien sur, merci aux gens qui ont partagé mon bureau, en particulier Manar, Emmanuel et Mahmoud. Mahmoud avec qui j'aurai partagé toute la durée de ma thèse, Manar pour ta gentillesse et Emmanuel les 1^{er} avril resteront mythiques. Et bien sur merci aux filles du grand bureau Ahlem, Cynthia, Mireille et Aurore.

Et un énorme merci à ma petite bande, Clément pour les soirées, les vacances, les bagarres et encore les soirées... juste merci d'être là et t'as intérêt de venir me voir, j'en dis pas plus ici, je n'ai pas assez bu ;-) Laurie merci d'avoir été là à 6h00 du matin, enfin presque, pour les pauses café, de m'avoir fait découvrir tes goûts culinaires particuliers et comment on suçait une fraise ! Wiwi, ton innocence, tes achats compulsifs avec les promotions me feront toujours marrer et tu pourras te vanter de m'avoir fait lever tôt ! Aurélie, je me rappellerai toujours de tes retours de plage en vélo avec Thomas après les soirées, merci de m'avoir écouté durant toutes ces pauses café. Et Laure ..., je te laisse c'est trois petits points pour imaginer tout ce que j'aurais pu dire ou pas. Et tu pourras même changer d'avis à chaque relecture.

A tous les gens que j'aurais croisé durant cette thèse, vous m'avez fait vivre 3 voire 4 belles années de ma vie et je vous souhaite à tous une bonne route.

Merci à Marine et Marjorie, ça fait maintenant 20 ans qu'on se connaît et à chaque fois que je rentre là-haut, c'est presque comme si rien n'avez changé depuis nos 8 ans.

Enfin mes derniers remerciements vont à ma famille, Merci papa et maman d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir laissé faire mes choix, quelquefois sûrement surprenant et de m'avoir soutenu dans tous ce que j'ai entrepris. Juste merci d'être là.

Production scientifique

Publication :

R. Guillonnet, C. Baraquet and M. Molmeret. « Different intracellular trafficking of marine bacteria within protozoan cells: from expelled vesicles to an intranucleolar niche » – 2018

R. Guillonnet, A. Bazire, C. Baraquet and M. Molmeret. « Bacterial Symbiosis and incompatibility during multi-species marine biofilm » – 2018

R. Guillonnet, C. Baraquet and M. Molmeret. « Amoeba against mono and multi species biofilms: predation promotes filamentous bacteria shaping » – 2018

Communications orales :

R. Guillonnet, C. Baraquet and M. Molmeret. « How do marine bacteria interact with the amoeba *Acanthamoeba castellanii*? » - FEMS – Juillet 2017

R. Guillonnet, C. Baraquet and M. Molmeret. « Que mangeront les amibes pour Noël? » - Séminaire MAPIEM – December 2016

Communications par affiche :

R. Guillonnet, C. Baraquet, A. Bazire and M. Molmeret. « Spatial organization of multi-species marine bacteria in biofilm » - FEMS – July 2017

R. Guillonnet, C. Baraquet and M. Molmeret. « How do marine bacteria interact with the amoeba *Acanthamoeba castellanii*? » - FEMS – July 2017

R. Guillonnet, A. Bazire, C. Baraquet and M. Molmeret. « Investigation of different marine bacterial strains behaviors in biofilm. » - ICMCF 2016 (International Congress on Marine Corrosion and Fouling) – June 2016

Autres activités scientifiques:

Premier prix de l'Université de Toulon - Ma Thèse en 180 secondes – « Journée scientifique de l'université de Toulon » – Avril 2017

Participation à l'organisation d'un congrès international - 18th ICMCF (International Congress on Marine Corrosion and Fouling) – Juin 2016

Fête de la science – Organisation d'un atelier en microbiologie marine – 2014, 2015 et 2016

Table des matières

Chapitre I : Etude bibliographique

<i>Introduction bibliographique</i>	<i>1</i>
<i>I- Biofilm et biofouling en environnement marin</i>	<i>3</i>
1- Biofouling, Problématiques et Impacts	3
2-Formation du biofilm	6
2.1 Conditionnement de la surface	7
2.2 L'adhésion microbienne	8
2.2.1 L'adhésion réversible : « Docking »	8
2.2.2 L'adhésion irréversible : « Locking »	10
2.3. Formation du biofilm et maturation	11
2.4. La dispersion	12
3. Rôle de la matrice extracellulaire	13
3.1 Les composants de la matrice	13
3.1.1 L'eau	14
3.1.2 Les exopolysaccharides	15
3.1.3 Les protéines extracellulaires	18
Les enzymes	18
Les protéines de structure	20
3.1.4 L'ADN extracellulaire (ADNe)	22
3.1.5 Les lipides et tensioactifs	25
3.2. Rôle et fonction de la matrice extracellulaire	26
4. Formation de sous-populations en biofilm	28
5. Les biofilms multi-spécifiques, entre compétition et avantage, un voisinage pas toujours amical	31
5.1 Un voisinage amical	33
5.1.1. La communication cellulaire dans un biofilm multi-spécifique	33
5.1.2. La coopération bactérienne pour le biofilm : adhésion, matrice et métabolisme	35
5.1.3 Le biofilm, une forteresse contre les défenses de l'hôte, les agents antimicrobiens et la prédation	36
5.1.4 Une distribution spatiale en fonction de leur relation	38
5.1.5. Modification de l'expression génique et transfert horizontal de gènes	40
5.2. Des problèmes de voisinage qui peuvent rendre service à l'homme	41
5.2.1. Compétition et antagonismes au sein du biofilm	42
5.2.2. Sécrétion de molécule de type anti biofilm	43

5.3. Stratification métabolique du biofilm _____	46
<i>II- Les protistes amiboïdes : agent secret de l'environnement marin, impacts écologiques, économiques et environnementaux</i> _____	48
1. Spectre : phylogénie et diversité _____	48
2. Au service secret de l'environnement : Cycles biogéochimiques _____	50
3. Bons baisers de la mer : Qualité de l'eau et paléoclimatologie _____	51
4. Dangereusement votre : Pathogénie des amibes marines _____	52
5. Permis de tuer : Prédation _____	54
6. Meurt un autre jour : Echappement à la prédation et sélection de pathogènes ____	57
7. L'espion qui m'aimait : Interactions symbiotiques _____	60
8. Opération biofilm : Protistes amiboïdes versus biofilm _____	63
<i>III- Objectifs du travail de thèse</i> _____	68
1. Etude de la formation de biofilms multi-spécifiques _____	69
2. Etudes des interactions amibes / bactéries _____	69
3. Etudes des interactions entre amibes et un biofilm préformé _____	70

Chapitre II : Etude de la formation de biofilms multi-spécifiques par différentes bactéries marines

<i>Etude de la formation de biofilms multi-spécifiques par différentes bactéries marines</i> ____	72
<i>Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components</i> _____	80
Abstract _____	80
Introduction _____	80
Matériel and methods _____	82
Bacterial strains and culture media: _____	82
Bacterial labelling: _____	82
Single species biofilm formation in static and dynamic conditions: _____	83
Matrix components staining: _____	84
Crystal Violet assay: _____	84

Multispecies biofilm formation: _____	84
Data extraction from images and statistics: _____	85
Results _____	86
Biofilm formation in static and dynamic conditions _____	86
Bacteria appear to be specialized in the secretion of few exopolymeric compounds _____	89
Most of the bacteria exert an inhibitory effect on their partners when they are in presence of each other _____	91
The bispecific biofilm of TC4 and TC10 unravels the production of a newly secreted compounds in the matrix compared to when grown in their monospecific biofilm _____	95
The inhibitory effect of TC11 does not affect the beneficial interactions between TC10 and TC4 _____	96
TC5 outfits its competitors in a four species biofilm _____	98
Discussion _____	100
References _____	103
Supplementary Figures _____	107

Chapitre III : Etude des interactions entre différentes bactéries marines et l'amibe *A. castellanii*

<i>Etude des interactions entre différentes bactéries marines et l'amibe A. castellanii</i> _____	110
<i>Different intracellular trafficking of marine bacteria within amoeba cells: from expelled vesicles to the first description of an intranucleolar niche</i> _____	114
Summary _____	114
Introduction _____	114
Results _____	116
<i>A. castellanii</i> phagocytizes the marine bacteria TC5, TC10 and TC11. _____	116
All the marine bacteria are phagocytized in different proportion and persist over 48h within <i>A. castellanii</i> _____	117
TC4 is located within the nucleolar compartment _____	118
TC5, TC10 and TC11 are localized in the cell cytoplasm and TC11 appears to be expelled outside the protozoan host at 24h _____	121
The bacterial strains follow different intracellular paths within <i>A. castellanii</i> _____	122
Discussion _____	124
Experimental procedures _____	128
Bacterial and protozoan strains: _____	128
Bacterial labelling: _____	129

Bacterial and amoeba numeration in NSS: _____	129
Bacterial survival during <i>A. castellanii</i> co-incubation: _____	129
Cytotoxicity assay against <i>A. castellanii</i> : _____	130
Bacterial localization within <i>A. castellanii</i> using CLSM: _____	130
Colocalization studies with cellular organelles: _____	131
Bacterial localization within <i>A. castellanii</i> using Transmission electron microscopy (TEM): _____	132
Statistics: _____	132
References _____	133
Supplementary figures _____	137

Chapitre IV : Etude des interactions entre l'amibe *A. castellanii* et les biofilms monospécifiques et multispécifiques des différentes bactéries marines

<i>Etude des interactions entre l'amibe <i>A. castellanii</i> et les biofilms monospécifiques et multispécifiques des différentes bactéries marines</i> _____	140
<i>Amoeba against bacterial biofilms: chemical cues promote biofilm detachment and filamentous shapes.</i> _____	144
Abstract _____	144
Introduction _____	145
Materials and Methods _____	146
Bacterial and protozoan strains: _____	146
Biofilm development: _____	147
Amoeba against bacterial biofilm: _____	147
Evaluation of the presence of planktonic bacteria. _____	148
Data extraction from images and statistics: _____	148
Results _____	149
Biofilm formation in NSS _____	149
Biofilm fate and bacterial localization during the interaction with <i>A. castellanii</i> _____	150
Secretion of amoeba chemical cues inducing biofilm detachment _____	152
Detachment by chemical cues was transferred to other strains in multi-species biofilm _____	154
Discussion _____	156
References _____	159

Chapitre V : Discussions générales et perspectives

<i>Discussions générales et perspectives</i>	164
<i>Développement de biofilms multi-spécifiques</i>	167
<i>Interactions amibes/bactéries</i>	170
<i>Interactions amibes/biofilms</i>	173
<i>Conclusion générale</i>	176

Annexes

<i>Annexes :</i>	178
<i>Fiche technique n° 1 : Culture et conservation des souches bactériennes et d'amibes</i>	180
<i>Fiche technique n° 2 : Evaluation du biofilm par le marquage au cristal violet</i>	184
<i>Fiche technique n° 3 : Transformation plasmidique</i>	188
<i>Fiche technique n° 4 : Conjugaison bactérienne</i>	192
<i>Fiche technique n° 5 : Conception d'anticorps anti bactérie pour l'immunomarquage</i>	198
<i>Fiche technique n° 6 : Marquages des bactéries et des composants de la matrice</i>	212
<i>Fiche technique n° 7 : Marquages des bactéries adhérees en conditions dynamiques</i>	218
<i>Fiche technique n° 8 : Préparation des échantillons amibes/bactéries pour microscopie électronique à transmission</i>	224
<i>Fiche technique n° 9 : Dénombrement des bactéries en interaction avec les amibes</i>	232
<i>Fiche technique n°10 : Traitement des images de fluorescence de biofilms par des méthodes algorithmiques</i>	238

Références Bibliographiques

<i>Références Bibliographiques</i>	248
------------------------------------	-----

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la formation du biofouling sur une surface immergée.	3
Figure 2 : Exemples de projets ou de technologies d'énergies marines renouvelables.	5
Figure 3 : Etapes de formation d'un biofilm sur surfaces immergées.	7
Figure 5 : La première phase de l'adhésion bactérienne consiste en l'attraction initiale des cellules vers la surface par les effets des forces physiques.	9
Figure 6 : Pili type IV, fimbriae et Flagelle de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A), <i>Geobacter sulfurreducens</i> (B) et <i>Listeria monocytogenes</i> (C).	10
Figure 7 : Structure de type « mushroom » sur un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> en flowcell, après 4 jours de formation en milieu minimum contenant du glucose.	11
Figure 8 : Représentation humoristique de la construction d'une matrice de biofilm par des bactéries.	13
Figure 9 : Représentation schématique des flux d'eau et donc du « système circulatoire primitif » présent au sein des biofilms.	15
Figure 10 : Biofilm in vitro et exopolysaccharides sécrétés par une souche uropathogène d' <i>Escherichia coli</i> dans une chambre implantable.	16
Figure 11 : Vésicules de membrane externe avant et après purification visualisées et collectées dans différents milieux et conditions.	21
Figure 12 : Réseau filamenteux d'ADNe de la souche F8 après 4 jours de croissance sur filtre isopore en milieu FBM, barre d'échelle 50 µm.	23
Figure 13 : Image représentative d'une structure en champignons de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (vert) réalisé en flowcell après 3 jours d'incubation en milieu minimum supplémenté en glucose, avec secretion de l'exopolysaccharide Pel qui lie l'ADNe au pied du champignon.	24
Figure 14 : Sous population de NTHI (Non typable Haemophilus influenzae) rejetant de l'ADNe à partir d'un seul pôle cellulaire le long de l'axe de la cellule.	26
Figure 15 : Hétérogénéité chimique dans un biofilm mono-spécifique.	31
Figure 16 : Variation physiologique au sein du biofilm. Les petits points noirs représentent la diffusion des antibiotiques au sein du biofilm.	30
Figure 17 : Développement de biofilm et visualisation des cellules mortes de <i>P. tunicata</i> .	31
Figure 18 : Modèle de redéveloppement et de réinfection d'un biofilm suite à la présence de cellules persistantes.	32
Figure 19 : Processus individuel et social se produisant au sein des communautés biofilms.	32
Figure 20 : Observation d'un biofilm bispécifique entre <i>S. oralis</i> (vert) et <i>A. naeslundii</i> (rouge) après 22h à 37°C en flowcells.	34
Figure 21 : Coopération métabolique au sein d'un biofilm mixte d' <i>Acinetobacter</i> C6 (bleu) et <i>P. putida</i> R1 (rouge).	36
Figure 22 : Localisation spatiale et structure d'un biofilm multi-spécifique comprenant <i>Klebsiella pneumoniae</i> KP-1 (rouge), <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (jaune) et Pf-5 <i>Pseudomonas protegens</i> (cyan) en flowcell avec un milieu minimum M9.	38

Figure 23 : Distribution spatiale au sein d'un biofilm multi-spécifique.	39
Figure 24 : Biofilm caractéristique et phénotype des colonies issues des variants ancestraux ou dérivés rugueux de <i>P. putida</i> .	41
Figure 25 : Hétérogénéité physiologique au sein d'un biofilm multi-spécifique.	47
Figure 26 : Arbre phylogénétique représentant la dispersion des protistes amiboïdes au sein des eucaryotes et plus spécifiquement au sein des taxons Rhizaria et Amoebozoa.	48
Figure 27 : Aperçu de la diversité microbienne eucaryotique en milieu profond au niveau des super-goupes taxonomiques.	49
Figure 28 : Les modèles biogéochimiques et écologiques mondiaux reposent sur la compréhension de la biologie des organismes et des interactions qui se produisent dans les réseaux trophiques microbiens marins (selon Worden et al., 2015).	50
Figure 29 : Squelettes de radiolaire, foraminifères et spores d'éponges fossilisés issus de l'océan Indien occidental profond - Moyen Eocène (45 millions d'années).	52
Figure 30 : Distribution spécifique et géographique des cas d'AGD autour du monde.	53
Figure 31 : Phagocytose d'une bactérie par une amibe.	55
Figure 32 : Différentes voies potentielles empruntées par les bactéries contre la prédation par les protozoaires observés en environnement marin.	57
Figure 33 : Schéma résumant l'interaction entre <i>V. cholerae</i> et <i>A. castellanii</i> .	59
Figure 34 : Modes de transmission de <i>Candidatus Nucleicultrix amoebiphila</i> .	62
Figure 35 : Interpretation artistique du Dr Sean D. Taverna des quatres froces induisant la formation de biofilm.	64
Figure 36 : Exemple d'organisation cellulaire de deux amibes nues différentes.	65
Figure 37 : Percentage of recovery regarding static biofilm formation on glass surface in ASW of the four marine bacteria.	87
Figure 38 : Biofilm formation in dynamic conditions of the four marine bacterial strains in ASW.	88
Figure 39 : Exopolymeric matrix secreted by marine bacterial strains in static and single species conditions.	90
Figure 40 : Antibiofilm activity of the TC5 supernatant measured by Crystal Violet on the marine bacteria.	91
Figure 41 : Biovolumes and spatial patternings of bacteria in bispecific biofilms after 24h or 48h of incubation in ASW.	93
Figure 42 : Exopolymeric matrix secreted in the bispecific biofilm of TC4 and TC10 after 48h of incubation in ASW.	96
Figure 43 : Biovolumes and spatial patternings of bacteria in three-species biofilms after 24h or 48h of incubation in ASW.	98
Figure 44 : Biovolumes and spatial patternings of bacteria in four-species biofilms after 24h or 48h of incubation in ASW.	99
Figure 45 : (Supplementary Figure) Flow chart of the processing of the epifluorescence pictures to calculate the percentage of bacterial coverage on the surfaces.	107
Figure 46 : (Supplementary Figure) Exopolymeric matrix components secreted by the marine bacterial strains in ASW after 48h of static biofilm formation.	109
Figure 47 : The marine bacteria are phagocytized and persists within <i>A. castellanii</i> over 48h.	118

Figure 48: Bacteria are found in distinct locations within <i>A. castellanii</i> .	120
Figure 49: TC4 is located within the nucleolus.	121
Figure 50: TEM photographs show the morphological characteristics of the bacteria and their phagosomes within <i>A. castellanii</i> .	122
Figure 51: The four marine bacteria follow a specific intracellular trafficking within <i>A. castellanii</i> .	123
Figure 52: (Supplementary Figure) The NSS medium does not trigger major variations of cell numbers over 96h.	137
Figure 53: (Supplementary figure) None of the 4 marine strains are cytotoxic towards <i>A. castellanii</i> .	138
Figure 54: (Supplementary Figure) The TC5, TC10, TC11 intracellular concentrations decrease during <i>A. castellanii</i> infection.	138
Figure 55: (Supplementary Figure) TC10 display different sizes and shapes in presence of amoeba.	139
Figure 56: Kinetic of the biofilm formation of <i>Persicivirga mediteranea</i> TC4, <i>Polaribacter</i> sp. TC5, <i>Shewanella</i> sp. TC10 and <i>Shewanella</i> sp. TC11 on microplates measured with Crystal Violet after different incubation times (15h, 24h, 48h and 72h) in NSS.	150
Figure 57: Biofilm formation of <i>Persicivirga mediterranea</i> TC4 (I) and <i>Shewanella</i> sp. TC10 (II), <i>Polaribacter</i> sp. TC5 (III) and <i>Shewanella</i> sp. TC11 (IV) in presence of <i>A. castellanii</i> and of the amoeba supernatant.	152
Figure 58: Multispecies biofilm formation including <i>Persicivirga mediterranea</i> TC4, <i>Shewanella</i> sp. TC10 and <i>Shewanella</i> sp. TC11 in presence of <i>A. castellanii</i> and <i>A. castellanii</i> supernatant.	155
Figure 59: Concentrations of extracellular planktonic bacteria collected from the biofilms of <i>Persicivirga mediterranea</i> TC4, <i>Polaribacter</i> sp. TC5, <i>Shewanella</i> sp. TC10, <i>Shewanella</i> sp. TC11 and of the TC4, TC10 and TC11 multispecific biofilm in presence of the amoeba and the amoeba supernatant.	156
Figure 60 : Représentation de l'extraction du cristal violet (A) et des résultats d'absorbance obtenus sur un biofilm de <i>Pseudomonas</i> sp. B4 déficient en polyP (B) en conditions réprimé (glucose 1%) et induit (arabinose 0,5%) dans différents milieux.	186
Figure 61 : Formation de biofilm en condition dynamique à 3mL/h (flow cells) de <i>Shewanella</i> sp. TC10 et <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 contenant le plasmide pX5 - GFP en eau de mer artificielle après 3h et 24H d'incubation.	197
Figure 62 : Biofilm multi-spécifique comprenant les souches <i>Persicivirga mediterranea</i> TC4 (bleu), <i>Shewanella</i> sp. TC10 contenant le plasmide pX5 - GFP (vert), <i>Shewanella</i> sp. TC11 (rouge) après 24h d'incubation en condition statique à 20 °C avec un inoculum de départ de $DO_{600nm}=0,1$.	211
Figure 63 : Images représentative de la formation de biofilm par <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 en flow cell avec un flux de 3 mL/h en eau de mer artificielle après 3h et 48h d'incubation.	223
Figure 64 : <i>Acanthamoeba castellanii</i> observée en microscopie électronique à transmission.	229
Figure 65 : Photographie de la croissance des CFUs de la souche <i>Shewanella</i> sp. TC11 sur boîtes VNSS.	236
Figure 67 : Diagramme de flux représentant le calcul du pourcentage de recouvrement des images 2D issues de la microscopie à épifluorescence.	239
Figure 68 : Image représentative de la formation de biofilm par <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB400 après 48h en eau de mer artificielle marquée au DAPI (A), de l'extraction de la matrice bleue issue de l'image native (B) et des pixels calculés au-dessus du seuil par méthode algorithmique en blanc (C).	244

Figure 69 : Image représentative de la formation de biofilm par *Shewanella* sp. TC11 après 24h en NSS marqué au Syto 61. _____ 245

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste non exhaustive de quelques lectines utilisées pour marquer des dérivés Exopolysaccharydiques de biofilm. _____	17
Tableau 2 : Enzymes retrouvées dans des biofilms en environnements naturels et artificiels. _____	19
Tableau 3 : Liste non exhaustive de marqueurs utilisés pour mettre en évidence l'ADN extracellulaire au sein de biofilm bactérien. _____	22
Tableau 4 : Les principaux rôles et fonctions des substances polymériques extracellulaires dans les biofilms microbiens. _____	27
Tableau 5 : Molécules d'inhibition du biofilm produites par d'autres bactéries. _____	43
Tableau 6 : Présentation des souches bactériennes utilisées dans cette étude et caractéristiques de celles-ci. _	68
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes de transformation appliquées à des souches de bactéries marines afin de leur ajouter un gène exprimant une protéine fluorescente (cf : Fiche technique °3) _____	75
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes de conjugaison appliquées à des souches de bactéries marines afin de leur ajouter un gène exprimant une protéine fluorescente (cf : Fiche technique °4) _____	76

Liste des abreviations

ADN : Acide desoxyribonucléique

ADNe : Acide desoxyribonucléique extérieure

AGD : Maladie des branchies amoébozoïque (Amoebic gill disease)

AHL : Acylhomosérines lactones

ASW : Eau de mer artificielle (Artificial seawater)

CFU : Unité formant des colonies (Colony forming units)

CLSM : Microscope confocal à balayage laser (Confocal Laser scanning microscopy)

CV : Vacuole contractile (Contractile vacuole)

HGT : Transfert horizontal de gènes (Horizontal gene transfer)

EPS ou SPE : Substance polymérique extracellulaire (Extracellular polymeric substance)

MMETSP : Marine microbial eukaryotes transcriptome sequencing projects

MOI : Multiplicité d'infection (Multiplicity of infection)

QS : Quorum sensing

SDS : dodécylsulfate de sodium (Sodium dodecyl sulfate)

SRB : Bactérie sulfato-réductrice (Sulfate-reducing bacteria)

TC : Collection de Toulon (Toulon Collection)

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

I- Biofilm et biofouling en environnement marin

1- Biofouling, Problématiques et Impacts

Toutes structures ou surfaces immergées dans un milieu aqueux ou en atmosphère humide peuvent être soumises au développement du biofouling, cet amas de micro et macroorganismes tels que les balanes, algues etc, que l'on appelle communément biosalissures (figure 1). Dès le début de la construction navale, il n'est pas étonnant que les bateaux aient été les premiers à subir les effets néfastes de cette colonisation indésirable aboutissant à la détérioration du bois constituant les coques de bateaux.

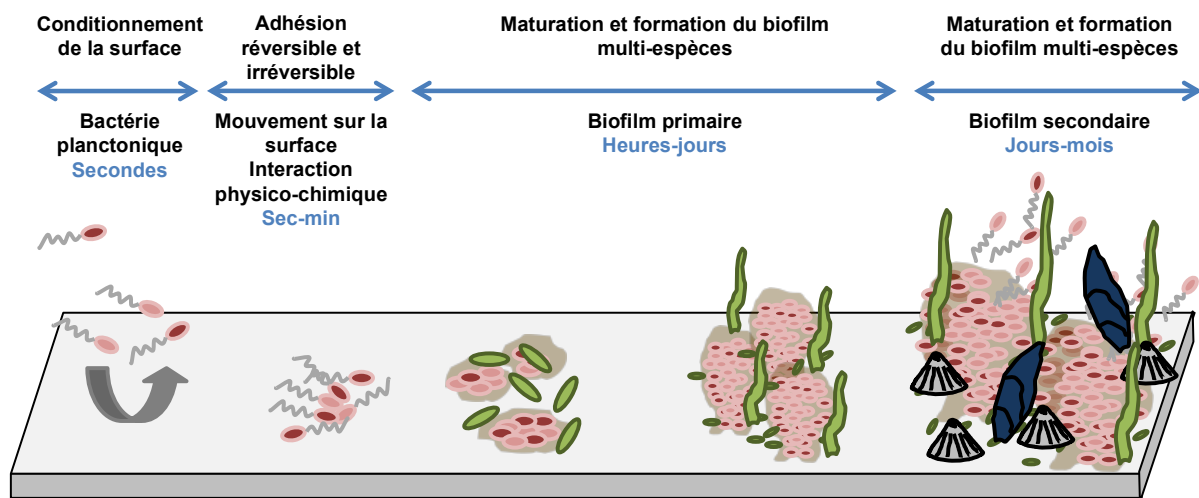


Figure 1 : Schéma de la formation du biofouling sur une surface immergée (inspiré par Haras 2005; Monroe 2007; Wahl 1989)

Dès l'antiquité, des stratégies ont été développées pour lutter contre ces phénomènes : doublage des coques par une deuxième coque en bois, plomb ou cuivre ; il s'agit des premières techniques antifouling. Au cours du temps, l'efficacité des stratégies et des produits antifouling s'est améliorée, cependant leurs toxicités se sont accrues. Dans les années 60, les revêtements à base de Tributylétain (TBT) se sont imposés, de par leur efficacité et ont progressivement recouvert l'ensemble des bateaux. En 1970, une première étude a permis l'observation du phénomène d'« imposex » observé chez un escargot de l'Atlantique (Blaber, 1970). L'imposex correspond au développement de caractéristiques mâles (organes génitaux) chez un organisme de type femelle. C'est en 1981 que Smith a mis en relation directe l'utilisation de TBT et le phénomène d'imposex (Smith, 1981). Les études mettant en relation les effets néfastes du TBT se sont multipliées par la suite, cependant il a fallu attendre 2008 pour aboutir à une interdiction totale du TBT sur les coques des navires. Parallèlement, des revêtements contenant des sels de cuivre et ou de zinc ont été utilisés afin de remplacer le TBT. Leurs effets sur les organismes marins

n'étant pourtant pas anodins. Il a été ainsi mesuré que les concentrations létales pour divers types d'organismes (bactéries, algues, crustacés) pouvaient être mesurées dans des zones à forte densité de navire (Ytreberg *et al.*, 2010). Depuis les années 90, d'autres molécules ont été développées par les industriels, comme l'irgarol 1051, le seanine 211, le diurion... Cependant aucune ne présente une totale innocuité pour l'environnement marin. De nombreuses études démontrent et ont déjà démontré un effet écotoxique de ces produits (Konstantinou et Albanis, 2004).

En 2001, l'OMI (Organisation Maritime Internationale) a préparé une « convention internationale sur le contrôle des antifouling toxiques sur les navires. » Cette convention qui a été ratifiée autorise chacun des pays membres à « interdire et / ou limiter l'utilisation de systèmes antisalissures nuisibles sur les navires battant leur pavillon, ainsi que sur les navires non autorisés à battre leur pavillon, mais qui circulent sous leur autorité ainsi que tous les navires qui entrent dans un port, un chantier naval ou un terminal au large d'une des parties. » De plus, la directive européenne cadre sur l'eau de 2015 impose aujourd'hui un plan de gestion afin d'arriver au « bon état » des masses d'eau. Les zones de carénage des bateaux sont la plupart du temps très loin d'être classées en bon état, du fait du relargage et de l'application des revêtements antifouling et biocides. Aujourd'hui pour les industriels et les professionnels des transits commerciaux par voie marine, il est nécessaire de trouver de nouvelles stratégies dites « eco-friendly, » devant les futures interdictions que les pays ou l'union européenne seront dans l'obligation d'adopter en ce qui concerne les revêtements antifouling afin d'arriver au « bon état » des masses d'eau.

De plus, les revêtements actuellement sur le marché n'ont qu'une efficacité limitée en matière de temps ou d'efficience. Ils reposent aujourd'hui sur deux technologies : les FRCs (Free Release Coatings) et les SPCs (Self Polishing Coatings) (Lejars *et al.*, 2012). Les SPCs ont la particularité de relarguer de façon contrôlée des molécules comme des biocides dans l'environnement. Ils sont donc efficaces mais restent toxique de nos jours pour l'environnement. Les FRCs ont eux la particularité d'avoir une faible énergie de surface et sont donc particulièrement efficaces sur le macrofouling lorsque les bâtiments sont en mouvement mais restent inefficaces sur le microfouling. Aujourd'hui des revêtements hybrides couplant à la fois le principe des FRCs et des SPCs sont en développement (Azemar *et al.*, 2015). Les chercheurs sont toujours à la recherche de solutions pour remplacer l'utilisation des sels de cuivre ou de zinc toujours en application aujourd'hui dans les SPCs. Cependant il n'existe toujours pas

actuellement de produit à la fois respectueux de l'environnement et efficace pouvant répondre à la demande à la fois des industriels et des utilisateurs d'infrastructure marine.

Aujourd'hui, les problématiques de réchauffement climatique ainsi que d'invasion d'espèces autour de la planète rendent nécessaire le développement de technologies antifouling viables et peu coûteuses. Le domaine marin subi une pression accrue et son utilisation ne fait qu'augmenter. Le développement des technologies naturelles d'énergies marines renouvelables (vent en mer, houle et vague, courants de marée, gradient de température entre surface et profondeur...) impose également de nouveaux défis aux technologies antifouling (figure 2).



Figure 2 : Exemples de projets ou de technologies d'énergies marines renouvelables. A Projet d'éolien offshore « Winflo » à Brest, B Centrale marémotrice de l'estuaire de la Rance, C Dispositif d'énergie houlomotrice « oyster 1 » tester par Aquamarine Power dès 2009, D Projet de centrale à énergie thermique des mers.

Afin de développer de nouveaux biocides à large spectre et non toxiques, il est nécessaire d'avoir une compréhension précise et détaillée de la formation du biofilm. La formation du biofilm microbien étant considérée comme une étape préalable à la colonisation par les macroorganismes et donc du biofouling, de par l'abondance et la diversité des microorganismes qui composent cette communauté dans l'environnement marin, cibler le biofilm marin est une approche qui pourrait permettre de limiter l'adhésion et la colonisation par d'autres organismes marins. De plus, le biofilm qui est généralement la couche la plus difficile à éliminer de ces surfaces comme par exemple sur les FRCs, pourtant très efficaces contre le macrofouling sur des navires en déplacement (ce qui représente la majorité de la flotte commerciale). Un microfilm essentiellement composé de bactéries et de diatomées reste visible à la surface de ces revêtements, induisant une réduction de traînée hydrodynamique non négligeable. Par conséquent, certaines des nombreuses questions sur le biofilm en milieu marin qui peuvent se poser sont les suivantes : Quels mécanismes moléculaires et cellulaires sont mis en jeu par les bactéries pour adhérer à une surface ? Dans un environnement ouvert tel que celui de l'environnement marin, peut-on cibler des mécanismes appartenant à un large spectre

d'organismes sans utiliser de molécules ou de cocktails de molécules toxiques ? Quel est le rôle de la coopération entre bactéries et de la sécrétion de la matrice dans la formation du biofilm ou dans la résistance aux biocides ? Quel est le rôle des interactions entre organismes dans la résistance des biofilms ? La grande difficulté ici contrairement à d'autres secteurs d'activité tel que celui de la santé est que l'objectif est non pas d'éradiquer un type d'organisme mais plutôt d'empêcher ou de limiter l'adhésion d'une grande variété d'organismes sur les surfaces immergées tout en restant respectueux de l'environnement. L'enjeu est de taille lorsque l'on est confronté à un environnement totalement ouvert, comprenant des paramètres extérieurs bien différents de ceux auxquels les chercheurs ont été confrontés pendant des décennies et qui restent peu connus jusqu'à présent. La réponse à ces questions pourrait permettre de mieux comprendre comment ces biofilms complexes se forment dans ces conditions et de développer des cocktails de biocides large spectre, non toxiques, visant les mécanismes ciblés et propres à la formation du biofilm pour des solutions antifouling efficaces et plus écologiques dans le respect des normes environnementales qui devraient être mises en application dans les prochaines années.

2-Formation du biofilm

La formation du biofilm a été de nombreuses fois décrite dans la littérature (Haras, 2005; Monroe, 2007). Cependant le passage d'un mode de vie planctonique libre à un mode de vie sessile est complexe et aujourd'hui la communauté est en accord avec le fait que la durée des étapes, la forme prise par le biofilm ou encore le type de matrice sécrétée est fortement variable en fonction des souches présentes ou utilisées. Dans le modèle théorique (figure 3), la formation du biofilm est divisée en quatre étapes majeures présentes chez la plupart des bactéries : le conditionnement de la surface, l'adhésion (réversible ; irréversible), la formation du biofilm et sa maturation et pour finir le détachement du biofilm.

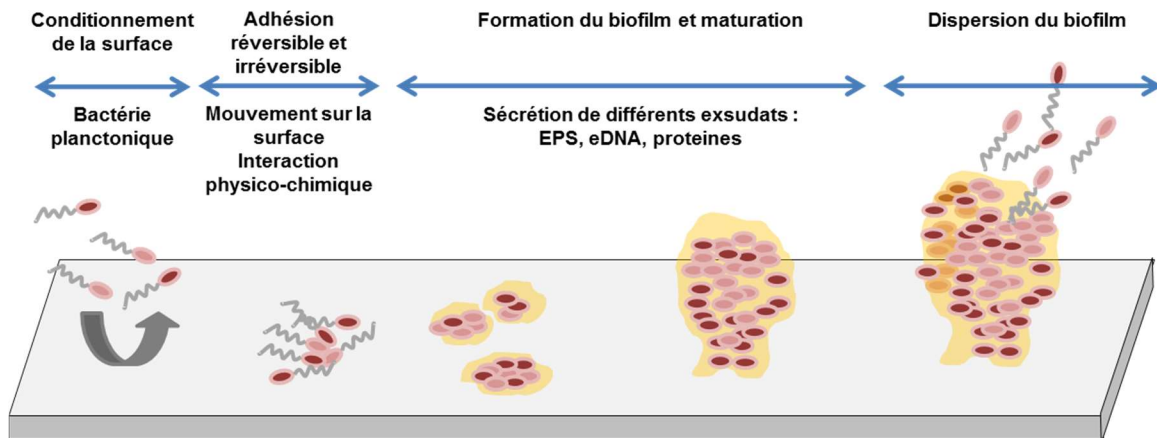


Figure 3 : Etapes de formation d'un biofilm sur surfaces immergées inspiré par : (Haras, 2005; Monroe, 2007)

2.1 Conditionnement de la surface

Le conditionnement de la surface est la première étape de la formation du biofilm. A partir du moment où une surface est immergée, une adsorption spontanée de composés du milieu se met en place (molécules organiques et ions) (figure 4). Ces composés vont modifier les propriétés physico-chimiques de la surface externe du matériau en modifiant la charge et l'énergie libre de surface. Ce conditionnement peut créer des microniches et être favorable à l'adhésion des organismes et aux interactions spécifiques mais il peut également être défavorable (La Barre et Haras, 2007). Loeb et Neihof (Loeb et Neihof, 1975) se sont intéressés à la formation du film conditionnant en environnement marin avec différents échantillons naturels mais également avec de l'ASW (Artificial Sea Water). Ainsi, ils démontrent qu'en milieu marin le film est majoritairement de nature organique et qu'il confère une charge modérément négative à la plupart des surfaces. De plus, une part non négligeable dans la participation à ce film est de nature humique. L'absorption de matière organique constitue donc une étape précoce de l'encrassement des surfaces en milieu marin. La formation de ce film conditionnant serait de l'ordre de la minute (Wahl, 1989).

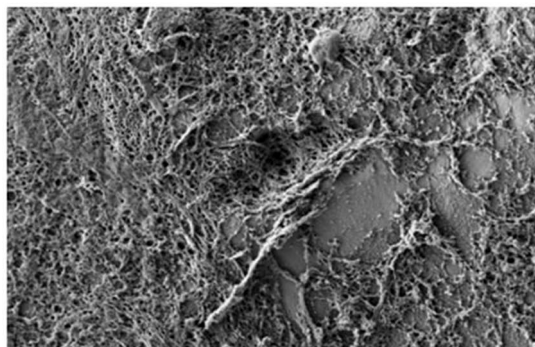


Figure 4 : Film conditionnant formé sur un neurostimulateur observé par microscopie électronique à balayage (Courtesy, G. James, Center for Biofilm Engineering, Montana State University).

2.2 L'adhésion microbienne

2.2.1 L'adhésion réversible : « Docking »

Afin d'initier une adhésion, la première étape est l'approche des bactéries à une surface. Les bactéries peuvent s'approcher du substrat via des mécanismes passifs ou actifs.

Parmi les phénomènes passifs, la sédimentation due à la gravité, la convection, les mouvements Brownien ainsi que la diffusion jouent probablement un rôle prépondérant. La sédimentation due à la gravité correspond aux forces de gravité qui vont s'appliquer sur la masse bactérienne et l'attirer vers la Terre en l'absence d'autres forces, celle-ci va se déposer sur la surface la plus proche de la Terre. Les mouvements de convection sont l'ensemble des déplacements internes générés dans un fluide ou gaz dus aux différences de température ou de densité en divers points. Dans le cas d'une bactérie dans un fluide, les mouvements Brownien sont dus aux chocs des bactéries avec des petites molécules présentes dans leur environnement immédiat. Pour finir, la diffusion correspond aux déplacements de particules (bactéries) d'une zone de forte densité vers une zone de plus faible densité.

Dans les environnements relativement stagnants avec peu de courant, la convection a un rôle mineur et c'est la diffusion ainsi que la sédimentation qui sont déterminantes pour l'adhésion. Dans les environnements plus agités tels qu'au niveau des coques de bateau, les rivières ou les zones à forte courantologie la convection a le rôle primordiale (Busscher et van der Mei, 2006). Une fois que les bactéries sont à proximité immédiate de la surface (généralement $< 5\text{nm}$), l'adhésion va dépendre du ratio entre les forces d'attraction et de répulsion. Ces forces incluent les interactions électrostatiques et hydrophobes, les entraves stérique, les forces de van der Waals, la température et l'hydrodynamisme (figure 5) (Dunne, 2002; Armentano *et al.*, 2014). Donc les forces passives mises en jeu lors de l'adhésion sont fortement dépendantes de l'environnement (courants) ainsi que des propriétés du film conditionnant.

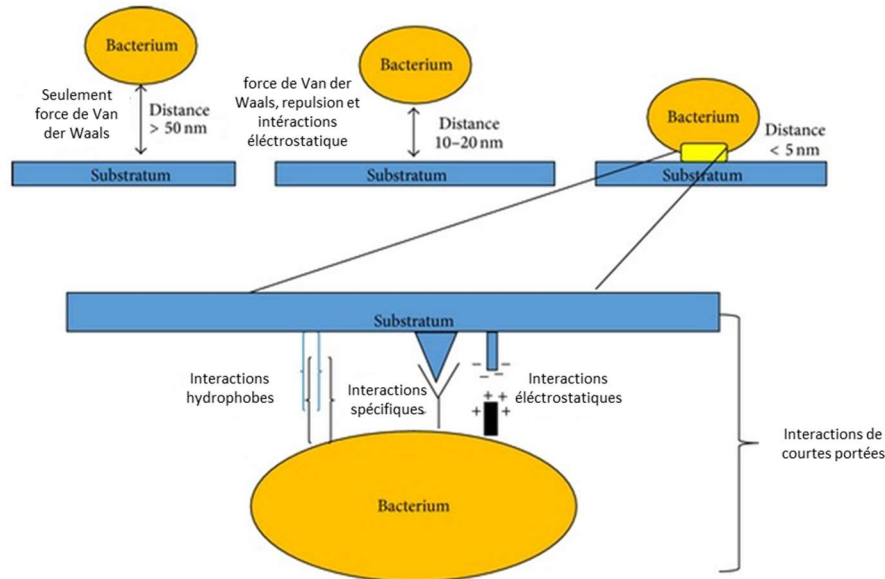


Figure 5 : La première phase de l'adhésion bactérienne consiste en l'attraction initiale des cellules vers la surface par les effets des forces physiques. Les interactions physiques sont en outre classées en tant qu'interactions à longue distance (non spécifiques, distances > 50 nm entre les cellules et les surfaces) et interactions de courtes portées (distances < 5 nm, impliquant les liaisons hydrogènes, les interactions ioniques et dipolaires et les interactions hydrophobes) (selon, Amenatano *et al.*, 2014)

Certaines bactéries possèdent également des appendices locomoteurs, leurs permettant de se mouvoir et donc de se diriger vers la surface, il s'agit de mécanismes actifs (figure 6). Ainsi les flagelles vont permettent aux bactéries de se diriger vers la surface. *Pseudomonas aeruginosa* utilise ses flagelles afin de nager le long de la surface et de trouver le meilleur endroit où adhérer et coloniser (O'Toole et Kolter, 1998). Les cellules adhèrent alors à la surface par l'intermédiaire de pili de type IV et des fimbriae (Vallet *et al.*, 2001). Ces pili de type IV et leurs rôles dans l'adhésion à des surfaces sont largement décrits à la fois chez le phylum des archées et des bactéries (Pohlschroder et Esquivel, 2015). Une fois adhérentes à la surface, les bactéries continuent de se mouvoir sur la surface par un phénomène de « twitching » (Mattick, 2002). D'autres mécanismes de déplacement se mettent également en place chez certaines bactéries comme le « swarming » et le « gliding. » Le « swarming » se définit comme un mouvement multicellulaire rapide de bactérie sur la surface opéré par l'intermédiaire des flagelles en rotation tandis que le gliding qui est également un mouvement des bactéries sur la surface est opéré uniquement par les adhésions entre l'axe long du corps bactérien et la surface (Kearns, 2010). Des mécanismes de chimiotactisme vont également entrer en jeu afin que les bactéries se déplacent vers des substances nutritives contenues dans le film conditionnant (Banks et Bryers, 1992). Si la présence de pili de type IV semble être un avantage pour l'adhésion et la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* et *V. cholerae*, le phénomène de

twitching n'est pas indispensable à l'adhésion, *Vibrio cholerae* une fois adhérent ne se déplace pas sur la surface (Watnick et Kolter, 2000). La phase d'adhésion même active est également très dépendante des conditions du milieu et des souches en présence. *P. aeruginosa* est capable de coloniser une surface dans la plupart des milieux (O'Toole et Kolter, 1998), tandis que *V. cholerae* ne formera pas de biofilm en milieu minimum (Watnick et Kolter, 1999).

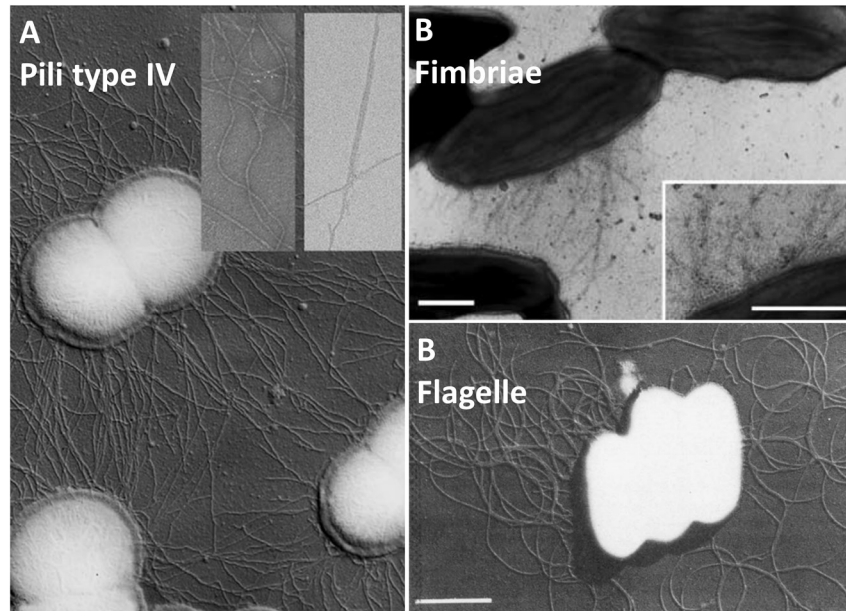


Figure 6 : Pili type IV, fimbriae et Flagelle de *Neisseria gonorrhoeae*(A), *Geobacter sulfurreducens* (B) et *Listeria monocytogenes* (C) observé par microscopie électronique à transmission en contraste négatif (Peel *et al.*, 1988; Reguera *et al.*, 2005; Craig *et al.*, 2006) .

2.2.2 L'adhésion irréversible : « Locking »

La seconde étape de l'adhésion qui consiste en un verrouillage des bactéries sur la surface met en jeu des liaisons moléculaires entre des adhésines (des protéines adhésives) et la surface (Dunne, 2002). Aux liaisons de type Van der Waals, électrostatiques et hydrophobes toujours présentes, des interactions de type acido-basique de Lewis permettent la formation de liaisons hydrogènes (Palmer *et al.*, 2007). Un grand nombre de mécanismes actifs initiés par la bactérie durant cette étape viennent consolider le processus d'adhésion. La production de substances exopolymériques en fait partie. Par exemple, les exopolysaccharides peuvent se complexer avec la surface et/ou aux corps bactérien grâce à des ligands spécifiques à leurs récepteurs qui sont bien souvent localisés au niveau des pili, fimbriae et fibrillae (Dunne, 2002). De même, il a été démontré que *P. aeruginosa* a besoin d'ADN extracellulaire pour adhérer à la surface (Whitchurch *et al.*, 2002). Différents appendices bactériens extracellulaires peuvent être utilisés lors de l'adhésion irréversible. Les bactéries à gram négatif utilisent les pili, les curli comprenant des adhésines spécifiques. Ces bactéries peuvent aussi utiliser la capsule du

glycocalix, tout comme les bactéries à gram positif qui peuvent en plus utiliser les acides teichoïques et/ou les acides mycoliques (Van Houdt et Michiels, 2010).

Il a été démontré que la production d'adhésine peut être régulée en fonction de l'environnement. Ainsi *V. cholerae* utilise un pilus co-régulé par une toxine pour s'attacher et coloniser l'épithélium intestinal tandis qu'il utilise une hémagglutinine sensible au mannose pour s'ancrer aux surfaces abiotiques en environnement aquatique (Watnick *et al.*, 1999).

2.3. Formation du biofilm et maturation

Selon le modèle classique de développement du biofilm (figure 2) retrouvé dans un grand nombre de publication, les bactéries se multiplient afin de former des microcolonies qui recouvrent une partie ou la totalité de la surface. Selon ce même modèle, la multiplication peut induire la formation de structures tridimensionnelles telles que celles de type « champignon » décrites chez certaines bactéries (figure 7) (Crusz *et al.*, 2012). Des canaux de circulation de nutriments et d'eau ainsi que d'évacuation des déchets se créent dans le biofilm. Durant la formation du biofilm, les bactéries continuent à sécréter de la matrice, un mélange de substances comprenant des exopolysaccharides, des protéines, de l'ADN extracellulaires ou encore des lipides et d'autres bio-polymères (Flemming et Wingender, 2010). Le volume occupé par la matrice pourrait représenter 75 à 95 % du volume du biofilm (Ghigo, 2001; Kuchma *et al.*, 2005).

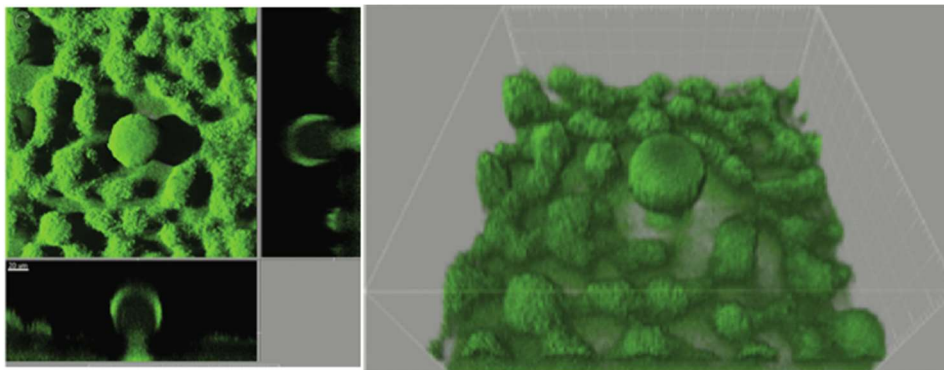


Figure 7 : Structure de type « mushroom » sur un biofilm de *P. aeruginosa* en flowcell, après 4 jours de formation en milieu minimum contenant du glucose (Crusz *et al.*, 2012).

Cependant, le biofilm est une structure hétérogène dépendant de nombreux facteurs liés les uns aux autres (Stewart et Franklin, 2008). Le modèle largement relayé par la littérature correspond en fait au schéma de développement de certaines souches, en particulier la souche modèle *P. aeruginosa*, dans certains milieux. Aujourd'hui, la variété de formes que peut prendre un biofilm est largement documenté et de nombreux autres modèles ont été mis en évidence (Hall-

Stoodley *et al.*, 2004). De plus, il est connu que le biofilm est un environnement riche facilitant la survie bactérienne en milieu naturel. Cependant, lors des premières phases d'adhésion du biofilm sur une surface propre (coques de bateau avec un nouveau revêtement antifouling, instruments chirurgicaux stérilisés) la quantité de nutriment présente est peu différente par rapport au milieu environnant si ce n'est l'apport issu du film conditionnant, issu lui-même du milieu extérieur qui pourrait modifier l'état physiologique de la bactérie. Lors de l'étude du biofilm, il est donc préférable que la mise en place d'un biofilm sur une surface « propre » s'effectue dans un milieu similaire au milieu environnant dans lequel sont trouvés naturellement les bactéries, qu'il soit riche ou pauvre. Le recouvrement de la surface dépendra à la fois des capacités de la bactérie comme de ses propriétés de surfaces mais dépendra également des propriétés du matériau sur laquelle elle va former son biofilm ou encore du milieu environnant (Ghigo, 2001; Kuchma *et al.*, 2005).

2.4. La dispersion

Selon le modèle le plus décrit, lorsque le développement du biofilm est entravé par le manque d'espace ou de nutriments, la phase de dispersion se met en place. Elle peut s'effectuer passivement via l'action du flux ou des forces de cisaillement mais également par des mécanismes actifs misent en jeu par les bactéries. Le biofilm préexistant peut persister très longtemps mais une partie des bactéries repasse à l'état planctonique afin de coloniser de nouvelles surfaces. La dispersion favorise donc la recolonisation d'une nouvelle niche plus favorable à la survie et au développement des bactéries.

Les conditions environnementales telles que la variation de la concentration en nutriments, la modification du pH ou la limitation en oxygène sont essentielles lors de cette étape (Gjermansen *et al.*, 2005). Sauer *et al.* suggèrent par exemple que l'augmentation du pH accentue le phénomène de dispersion par induction de la perte des pili et la production de flagelles chez *P. aeruginosa*, l'aidant à repasser à l'état planctonique (Sauer *et al.*, 2004). Certaines bactéries sont également capables de dégrader la matrice afin de s'en libérer. C'est le cas de *P. aeruginosa* qui va produire de l'alginate lyase qui dégrade l'alginate (Kostakioti *et al.*, 2013) ou encore de *Aggratibacter actinomycetemcomitans* qui synthétise la dispersine B qui hydrolyse les exopolymères du biofilm (Kaplan *et al.*, 2003). Chez *Escherichia coli*, la protéine CsrA réprime la synthèse de PGA (adhésine polysaccharidique), ce qui aide à la dispersion (Wang *et al.*, 2005). De même, le c-di-GMP serait également impliqué dans la dispersion des biofilms, son taux intracellulaire pourrait induire des cascades enzymatiques à l'origine de la dispersion du biofilm (Ha et O'Toole, 2015).

3. Rôle de la matrice extracellulaire

Durant leur mode de vie en biofilm, les bactéries sont enchâssées avec différents types de biopolymères dans une matrice. La matrice peut être considérée comme la maison des cellules du biofilm au sein de laquelle elles s'organisent et se développent (figure 8) (Watncik et Kolter, 2000 ; Flemming, 2011; Kährström, 2012).

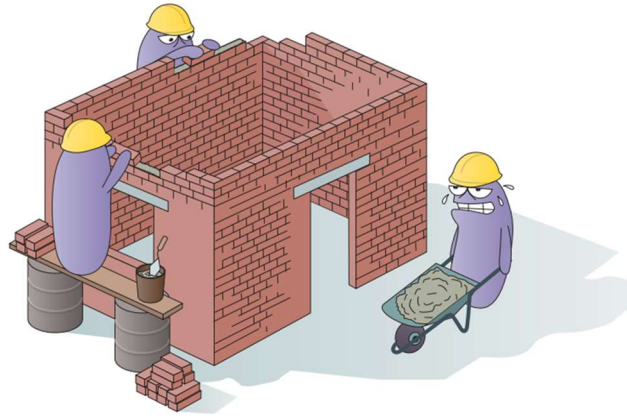


Figure 8 : Représentation humoristique de la construction d'une matrice de biofilm par des bactéries (selon, Kährström, 2012)

Pendant longtemps, la matrice était définie comme ne contenant majoritairement que des exopolysaccharides (EPS). Aujourd'hui, de nombreuses recherches ont démontré que le biofilm contient différents types de molécules. Le terme EPS ou SPE est aujourd'hui utilisé comme abréviation de « substances polymériques extracellulaires » (nous utiliserons cette définition pour cet acronyme tout au long du manuscrit). Le biofilm se compose d'eau, de cellule, d'exopolysaccharides, de protéines, d'ADN extracellulaire, ainsi que de lipides ou surfactants. Dans la plupart des cas, les microorganismes représentent moins de 10 % de la masse sèche du biofilm, tandis que les SPEs peuvent dépasser les 90 % (Flemming et Wingender, 2010). La régulation (adhésion, développement, dispersion) ou l'initiation des fonctions de l'écosystème biofilm (interactions intra et inter spécifiques, transfert de nutriment, lutte contre la dessiccation ou la prédation ...) sont très fortement régulées par les propriétés de la matrice (Sutherland, 2001).

3.1 Les composants de la matrice

Il est difficile de donner une composition claire des composants de la matrice du fait qu'une grande variété d'organismes produit des SPEs de nature diverse et de plus, en fonction des conditions du milieu le type de SPE peut différer. Cependant, l'eau est le composant majoritaire dans un biofilm vivant ou naturel dit « humide » et elle peut représenter entre 50 et plus de 97

% du volume selon les auteurs (Siegert, 1999; Sutherland, 2001). Les SPEs vont représenter entre 60 % et 98% de la masse sèche, soit après avoir déshydraté le biofilm (Siegert, 1999; Flemming et Wingender, 2010). Parmi ceux-ci, les exopolysaccharides et les protéines sont considérés comme les plus importants, représentant respectivement entre 40 % et 95 % et entre 1 et 60 % de la masse sèche (Flemming et Wingender, 2010). Ensuite, en moindre quantité, l'ADN extracellulaire ainsi que les lipides sont retrouvés dans la matrice, représentant respectivement entre 1 et 10 % et entre 1 et 40 % (Flemming et Wingender, 2010). Chaque souche ne produit qu'un nombre limité de SPE par rapport à la diversité de ce qui peut être produit ; par conséquent, en fonction des souches en présence dans les biofilms multi-organismes, des variations dans la composition de la matrice sont observées (Branda *et al.*, 2005).

3.1.1 L'eau

L'eau qui peut représenter plus de 97 % du biofilm inclut celle trouvée à l'intérieur des cellules. Dans la matrice, elle agit comme solvant, déterminant la viscosité de la matrice en fonction de la quantité de solutés qu'elle contient (Sutherland, 2001). La matrice extracellulaire fournit un environnement hautement hydraté protégeant les microorganismes à la fois du manque d'eau et de la dessiccation, les SPEs étant bien souvent hygroscopiques, et donc capables de stocker l'eau (Or *et al.*, 2007). De plus, les bactéries enchâssées dans leur matrice sont séparées par des canaux ouverts servant aux flux d'eau et constituant un système circulatoire primitif pour la distribution de nutriments et l'élimination des déchets (Costerton et Stewart, 2001; Davies, 2003). La liaison et la mobilité de l'eau dans la matrice font partie intégrante des processus de diffusion qui se produisent dans le biofilm. L'eau est donc un élément essentiel de la structure fine du biofilm (Sutherland, 2001).

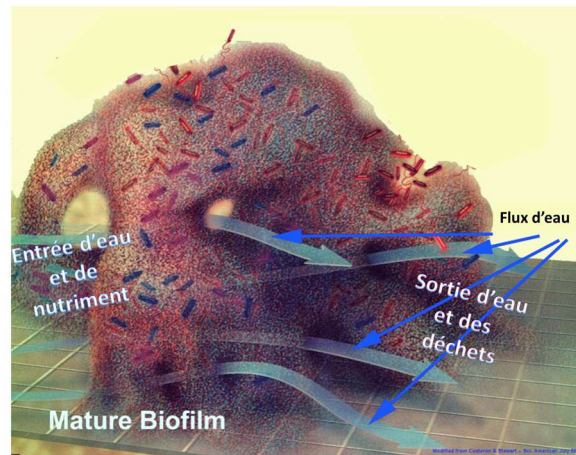


Figure 9 : Représentation schématique des flux d'eau et donc du « système circulatoire primitif » présent au sein des biofilms (modifié selon Costerton, Stewart, 2001)

3.1.2 Les exopolysaccharides

Les polysaccharides représentent la fraction majeure en masse sèche de la matrice selon de nombreux auteurs (Sutherland, 2001; Branda *et al.*, 2005). Il s'agit, la plupart du temps de longues molécules, linéaires ou ramifiées avec une masse moléculaire comprise entre $0,5 \cdot 10^6$ daltons et $2 \cdot 10^6$ daltons (Flemming et Wingender, 2010). Deux types d'exopolysaccharides sont distingués, ceux regroupés sous le terme « glycocalix » qui forment une capsule polymérique autour de la bactérie (généralement de nature polysaccharidique). Ils sont présents à proximité immédiate des cellules et ils leur servent généralement à adhérer à la surface. Les exopolysaccharides qui sont dispersés, eux représentent plus des constituants de la matrice (Hori et Matsumoto, 2010). Différents exopolysaccharides ont été visualisés par microscopie électronique comme de fins filaments attachés à la surface de la cellule et formant des réseaux complexes (figure 10).

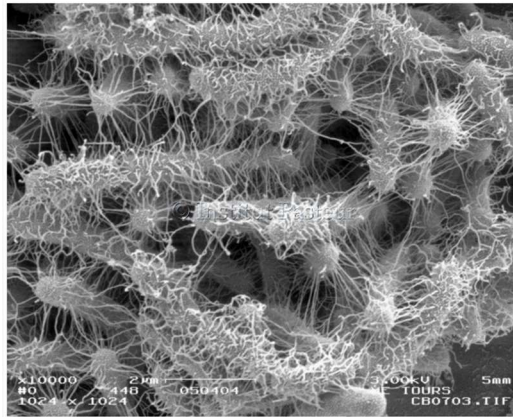


Figure 10 : Biofilm *in vitro* et exopolysaccharides sécrétés par une souche uropathogène d'*Escherichia coli* dans une chambre implantable (boîtier implanté en sous cutané, relié à un catheter implanté dans une veine, qui permet l'administration répété de traitement en intraveineux) (© Institut Pasteur/Ashwini Chauhan, Christophe Beloin, Jean-Marc Ghigo - Unité Génétique des Biofilms - Brigitte Arbeille et Claude Lebos LBCME, Faculté de Médecine de Tours).

Les techniques de microscopie combinées avec des marquages par anticorps ou par lectines de résidus carbohydrates ou encore les analyses biochimiques ont démontré l'ubiquité des matrices polysaccharidiques non seulement dans l'environnement naturel marin, d'eau douce ou de sol mais également dans les systèmes de distribution d'eau ou encore associé à certaines infections chroniques chez l'homme ainsi que dans des cultures pures expérimentales (Flemming et Wingender, 2010). Aujourd'hui, l'un des outils les plus utilisés pour l'étude structure/fonction non destructive *in situ* des composants des SPEs en biofilm est la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) combinée avec des sondes fluorescentes (Neu et Lawrence, 1999). En utilisant des lectines associées à des fluorochromes, les exopolysaccharides sont visualisés en fonction de leurs contenus en sucres spécifiques. De telles approches permettent d'avoir une idée de la composition et de l'arrangement complexe des SPEs dans un biofilm naturel (Flemming et Wingender, 2010). Aujourd'hui, de nouvelles techniques d'imagerie chimique couplant la spectroscopie Raman, STXM, et nanoSIMS sont utilisées pour examiner des SPEs dans des biofilms. Cependant pour ce type d'analyse l'échantillon de biofilm doit être restreint en terme de taille et d'épaisseur, de montage (bien souvent sur surface d'aluminium), d'hydratation et de profondeur d'analyse (Neu et Lawrence, 1999; Zhang *et al.*, 2010; Eichorst *et al.*, 2015). Par CLSM, il reste difficile d'avoir une représentation totale des glycoconjugués présents dans la matrice du fait du manque de spécificité de chaque lectine et du nombre limité de lectine utilisable en même temps (Neu *et al.*, 2001). Depuis quelques années, l'étude des composés de la matrice par l'utilisation de lectine a augmentée (Neu et Lawrence, 1997, 1999). Les lectines sont des protéines ou glycoprotéines d'origine végétale, animale ou microbienne qui se lie à certains hydrates de carbones possédant des caractéristiques spécifiques (Kennedy

et al., 1995). Ils en existent un grand nombre, plus ou moins spécifique de certaines liaisons entre les dérivés osidiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Liste non exhaustive de quelques lectines utilisées pour marquer des dérivés Exopolysaccharydiques de biofilm

Lectines	Abréviation	Spécificité	Biofilms testés	Références
Concanavalin A	ConA	α -Man, α -Glc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Strathmann <i>et al.</i> , 2002)
Wheat germ agglutinin	WGA	(β -GlcNAc) ₂ , NeuNAc	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Strathmann <i>et al.</i> , 2002)
Calcofluor	-	β -D-glucopyranose	comunauté naturelle	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
Soybean agglutinin	SBA	Gal, N-acetylgalactosamine	<i>Staphylococcus carnosus</i>	(Domenech <i>et al.</i> , 2013)
<i>Ricinus communis</i> agglutinin I	RCA I	Gal, N-acetylgalactosamine	<i>Shewanella epidermis</i>	(Kawaguchi <i>et Decho</i> , 2000)
<i>Hippeastrum hybrid</i> agglutinin	HHA	α -Man	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Ma <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aleuria aurantia</i>	AAL	dérivés Fuc et Gal	comunauté naturelle	(Staudt <i>et al.</i> , 2004)
Peannut agglutinin	PNA	Antigene T	Cyanobacteria	(Zippel <i>et Neu</i> , 2011)
Snowdrop Lectin	GNA	α 1-3 et α 1-6 Man	<i>Archea</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)

Afin de définir plus précisément la composition fine des exopolysaccharides de la matrice, l'utilisation de techniques biochimiques d'identification moléculaire reste les outils les plus adéquats. Depuis quelques années, les exopolysaccharides issus d'un nombre croissant d'espèces bactériennes et d'environnements ont été isolés et caractérisés (Götz, 2002; Haras, 2005; Nichols *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2010). Ainsi, plusieurs exopolysaccharides appartenant aux homopolysaccharides ont été identifiés. Cela inclut les glucanes et les fructanes produits par les *Streptococci* dans les biofilms oraux et la cellulose formée par *Gluconacetobacter xylinus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium* spp. ainsi que différentes espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae*.

La plupart des exopolysaccharides identifiés appartiennent aux hétéropolysaccharides qui consistent en un mélange de résidus sucrés neutres ou chargés. Ils peuvent contenir des substituants organiques ou inorganiques qui peuvent grandement affecter leurs propriétés physiques et biologiques. En raisons de la présence d'acides uroniques, de nombreux exopolysaccharides connus comme l'alginate et le xanthane, sont polycationiques (Flemming

et Wingender, 2010). Des exopolysaccharides polyanioniques sont également retrouvés tels que la β -1,6-N-acetylglucosamine avec une partie des résidus désacétylés. Ces adhésines intracellulaires ont été découverts chez différents pathogènes comme *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Götz, 2002).

Les oses les plus couramment retrouvés dans la composition des exopolysaccharides de bactéries marines sont le D-Arabinose, le D-Ribose et le D-Xylose pour les pentoses ; le D-Glucose, le D-Galactose, le D-Mannose, le D-Allose, le L-Rhamnose ainsi que le L- Fucose pour les hexoses (Haras, 2005; Poli *et al.*, 2010). Dans la composition des exopolysaccharides des bactéries marines, des sucres aminés sont également retrouvés comme le D-glucosamine, le D-galacturonique ou encore différents acides (acétique, succinique, pyruvique...) (Nichols *et al.*, 2005). Les exopolysaccharides produits varient en fonction du rôle qu'ils peuvent avoir et donc de l'environnement dans lequel ils sont trouvés (Poli *et al.*, 2010).

Les exopolysaccharides bactériens sont très divers même entre souches d'une même espèce. Les souches de *Streptococcus thermophilus* produisent des hétéropolysaccharides avec une composition en monomère, un ratio ou une masse moléculaire différente (Vaningelgem *et al.*, 2004). De plus, *P. aeruginosa*, une des souches modèles les mieux étudiées dans la formation du biofilm, produit au moins trois exopolysaccharides distincts qui contribuent au développement et à l'architecture du biofilm (alginate, Pel et Psl) (Ryder *et al.*, 2007). Chez beaucoup de bactéries, les exopolysaccharides sont indispensables à la formation du biofilm et les mutants qui ne peuvent pas synthétiser d'exopolysaccharides sont sévèrement compromis ou incapable de former un biofilm mature (Flemming et Wingender, 2010).

3.1.3 Les protéines extracellulaires

Tandis que les composés polysaccharidiques de la matrice ont été bien étudiés, le contenu en protéine reste largement inconnu alors que celui-ci peut représenter une quantité considérable dépassant parfois le contenu en exopolysaccharides (Toyofuku *et al.*, 2012). Cela a été reporté dans les biofilms (Jahn et Nielsen, 1998). Ces protéines font essentiellement partie de deux catégories : les enzymes et les protéines de structure (Flemming et Wingender, 2010).

Les enzymes

Différentes enzymes extracellulaires ont été détectées dans les biofilms, et beaucoup sont impliquées dans la dégradation des biopolymères (Tableau 2). Les substrats de ces enzymes extracellulaires incluent les polymères solubles dans l'eau (comme les polysaccharides, les protéines ou les acides nucléiques), les composés insolubles (tels que la cellulose, la chitine et

les lipides) ou encore les particules organiques qui sont piégées par le biofilm (Wingender *et al.*, 1999). La présence d'enzymes qui dégradent les SPEs fait de la matrice un système digestif externe qui décompose les biopolymères en produits de faible masse moléculaire qui peuvent ensuite être utilisés comme source de carbone et d'énergie.

Tableau 2 : Enzymes retrouvées dans des biofilms en environnements naturels et artificiels (Flemming et Wingender, 2010)

Enzymes	Types de biofilms
Enzymes dégradant les protéines	
Protéase	Rivières et boues activées
Peptidase	Eaux de consommation, Rivières, Eaux usées, Egouts, agrégats marins et boues activées
Enzymes dégradant les oligosaccharides ou polysaccharides	
Endocellulase	Rivières
Chitinase	Rivières et sédiments estuariens
α -glucosidase	Rivières, Egouts, Flux de sédiments, Sédiments de lacs, Eaux usées, Aggrégats marins et Boues activées
β -glucosidase	Rivières, Filtres à lits bactériens, Egouts, Flux de sédiments, Sédiments de lacs, Aggrégats marins et Boues activées
β -xylosidase	Rivières et Sédiments de lacs
N-acetyl- β -D-glucosaminidase	Rivières, Aggrégats marins et Boues activées
Chitobiosidase	Aggrégats marins
β -glucuronidase	Boues activées
Enzymes dégradant les lipides	
Lipase	Aggrégats marins et Boues activées
Esterase	Rivières, Sédiments de lacs, Eaux de consommation, Egouts, Flux de sédiments, et Boues activées
Phosphomonoestérases	
Phosphatase	Rivières, Egouts, biofilms en flux, Aggrégats marins et Boues activées
Oxydoréductases	
Phénol oxydase	Rivières
Peroxudase	Rivières
Activité redox extracellulaire	Boues activées

Certaines enzymes peuvent être impliquées dans la dégradation de SPEs structurales qui vont favoriser la phase de dispersion des bactéries. Pour finir, d'autres enzymes seront des facteurs de virulence durant les processus d'infection (Flemming et Wingender, 2010). Les enzymes extracellulaires peuvent être retenues de façon efficace au sein de la matrice du biofilm par leurs interactions avec les polysaccharides (Wingender *et al.*, 1999). Par exemple, l'association entre la lipase LipA et l'alginate produit par *P. aeruginosa* est basée sur de faibles forces de

liaison (Mayer *et al.*, 1999). Cet arrangement conserve l'activité enzymatique proche de la cellule et maintient les faibles distances de diffusion des produits enzymatiques, optimisant ainsi leur absorption par les bactéries. En outre, les interactions entre les enzymes et les exopolysaccharides structuraux améliorent la thermostabilité des enzymes et leur résistance à la protéolyse (Skillman *et al.*, 1998).

Les protéines de structure

Les protéines non enzymatiques de la matrice, tels que les protéines de liaison aux dérivés hydrates de carbone extracellulaires ou associées à la surface cellulaire (appelé « lectines »), sont impliquées dans la formation et la stabilisation du réseau polysaccharidique de la matrice et constitue un lien entre la surface bactérienne et les SPEs extracellulaires (Flemming et Wingender, 2010). Parmi celles-là, on retrouve les protéines de liaisons aux glucanes du pathogène dentaire *Streptococcus mutans* (Lynch *et al.*, 2007), la lectine spécifique du galactose (LecA) et du fucose (LecB) chez *P. aeruginosa*. Elles sont toutes impliquées dans la formation du biofilm (Tielker *et al.*, 2005; Diggle *et al.*, 2006).

Le second groupe de protéines de structure est celui associé aux protéines de surface de la bactérie. Il s'agit de protéines de haut poids moléculaire qui favorisent la formation de biofilm chez différentes espèces, comme par exemple la protéine Bap (biofilm-associated protein) qui a été identifiée la première fois chez *Staphylococcus aureus* (Lasa et Penadés, 2006). Ce groupe comprend également les protéines de membrane associées aux systèmes de sécrétion comme les transporteurs de type ABC (ATP Binding Cassette). Leur absence chez *Pseudomonas fluorescens* entraînent un handicap pour l'adhésion et une incapacité à former un biofilm mature (Hinsa *et al.*, 2003). Egalement, le système de sécrétion de type VI présent chez de nombreuses bactéries qui est impliqué dans les interactions à la fois avec les eucaryotes et les procaryotes joue un rôle particulier dans la formation du biofilm. Ainsi, les souches de *Burkholderia thailandensis* mutées pour le gène T6SS-1 sont rapidement déplacées par *Pseudomonas putida* lors de la mise en place d'un biofilm mixte, tandis que la souche sauvage non muté persiste avec *P. putida* (Schwarz *et al.*, 2010).

Pour finir, les appendices extracellulaires tels que les pili, fimbriae et flagelles peuvent également être considérés comme des éléments structuraux de par leurs interactions avec les composants des SPEs (Flemming et Wingender, 2010). Ils possèdent également des protéines de structure associées à leur membrane. Par exemple, les pili de type IV de *P. aeruginosa* lient l'ADN (van Schaik *et al.*, 2005) et vont donc possiblement agir comme structure de réticulation.

Chez *Salmonella typhimurium* et *E. coli*, la coproduction de cellulose par *E. coli* et de fins fimbriae agrégatifs par *S. typhimurium* donne pour résultat la formation d'une matrice extracellulaire hydrophobe et rigide, tandis que lorsque les souches sont inoculées séparément, la formation d'un seul de ces composés donne une matrice fragile (Zogaj *et al.*, 2001). De même, chez *Haemophilus influenzae*, la protéine pilA associée au pili de type IV est nécessaire à la formation de biofilm à la fois dans les tests *in vitro* et *in vivo* (Jurcisek *et al.*, 2007). Chez *Vibrio cholerae*, les mutants dépourvus de la protéine FlaA associée au flagelle sont 70 fois moins capable de coloniser l'épithélium intestinal que la souche sauvage (Watnick *et al.*, 2001).

Des analyses protéomiques chez *P. aeruginosa* PAO1 ont mis en évidence que les protéines associées à la matrice étaient dérivées des protéines sécrétées ou issues de cellules lysées et pour une grande partie issues de vésicules de membranes externes bactériennes (figure 11) (Toyofuku *et al.*, 2012). Ces vésicules permettent aux bactéries généralement gram négatif de communiquer avec d'autres formes vivantes par trafic de molécules de signalisation cellulaire bactérienne qui peuvent inclure de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des endotoxines ou encore des facteurs de virulence. Cette communication se met en place dans un grand nombre d'environnement y compris dans les océans (Biller *et al.*, 2014). Aujourd'hui, si quelques études se sont attachées à caractériser le contenu protéique de certains biofilms, quasiment aucune donnée n'est disponible quant à leur structure ou organisation au sein de la matrice du biofilm.

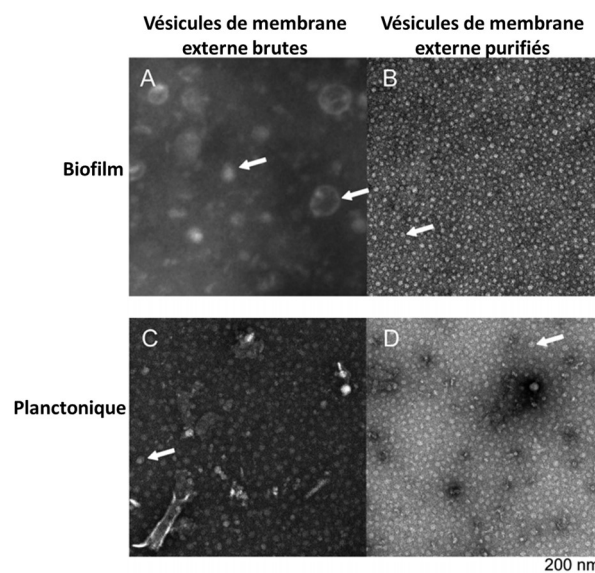


Figure 11 : Vésicules de membrane externe avant et après purification visualisées et collectées dans différents milieux et conditions (planctoniques et en biofilm) (selon Toyofuku *et al.*, 2012)

3.1.4 L'ADN extracellulaire (ADNe)

Des biofilms d'origines variées ont été décrits comme contenant de l'ADN extracellulaire et en particulier dans les biofilms d'eaux usées. Le taux d'ADN produit peut varier même entre espèces étroitement apparentées. Ainsi, chez deux espèces appartenant au même genre, l'ADNe est un composant structurel majeur de la matrice de *Staphylococcus aureus*, alors qu'il ne s'agit que d'un composant mineur des biofilms formés par *Staphylococcus epidermidis* (Flemming et Wingender, 2010).

L'ADNe a été initialement décrit comme un matériel résiduel issu de la lyse cellulaire. Cependant, il est devenu clair qu'il s'agit en fait d'une partie intégrante des composants de la matrice (Wingender *et al.*, 1999) et de la vie en biofilm (Molin et Tolker-Nielsen, 2003). Aujourd'hui, différents marqueurs fluorescents ont été utilisés pour localiser et observer la forme de cet ADNe (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste non exhaustive de marqueurs utilisés pour mettre en évidence l'ADN extracellulaire au sein de biofilm bactérien

Marqueurs	Utilisée avec	Références
DDAO	<i>Shewanella oneidensis</i>	(Gödeke <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Okshevsky et Meyer, 2014)
Propidium Iodide	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Guilbaud <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Myxococcus Xanthus</i>	(Hu <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Ma <i>et al.</i> , 2009)
TOTO	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Mann <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Gloag <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Okshevsky et Meyer, 2014)
PicoGreen	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	(Hall-Stoodley <i>et al.</i> , 2008)

La localisation de l'ADNe varie largement en fonction des souches présentes dans le biofilm. Ainsi, dans le biofilm de *P. aeruginosa*, l'ADNe forme une structure en forme de grille (Allesen-Holm *et al.*, 2006), tandis que dans un isolat de bactérie aquatique (une gammaproteobacteria appelée souche F8), l'ADNe forme un réseau filamenteux (Böckelmann *et al.*, 2006) (figure 12).



Figure 12 : Réseau filamenteux d'ADNe de la souche F8 après 4 jours de croissance sur filtre isopore en milieu FBM, barre d'échelle 50 μm , (selon Böckelmann *et al.*, 2006)

De même, des concentrations particulièrement élevées d'ADNe ont été retrouvées de façon transitoire dans les parties externes du pied des structures en forme de champignons de *P. aeruginosa*, constituant ainsi une bordure entre les sous-populations formant le pied et le chapeau du champignon (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Dans le modèle de formation du biofilm de *P. aeruginosa*, les premières microcolonies s'établissent avec une sous-population de bactéries non mobiles. Ces bactéries formant le pied du champignon produisent de l'ADNe, qui serait retenu dans le pied par l'intermédiaire de l'exopolysaccharide *Pel*. L'ADNe permettrait aux bactéries migrantes de former le chapeau. Les bactéries migrantes se déplacent par l'intermédiaire des pili de type IV, et sont connus pour se lier à l'ADN. Selon les auteurs, il a été suggéré que l'ADN dans le pied pourrait provoquer l'accumulation de bactéries migrantes (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Jennings *et al.*, 2015). Après de nombreuses années de recherche, deux hypothèses quant à l'export d'ADNe chez les bactéries semblent se confirmer. La première a mis en évidence, l'utilisation de petites vésicules issues de la membrane externe (Muto et Goto, 1986; Kadurugamuwa et Beveridge, 1995; Sumei *et al.*, 2014; Grande *et al.*, 2015) tandis que l'autre implique la lyse de la cellule bactérienne.

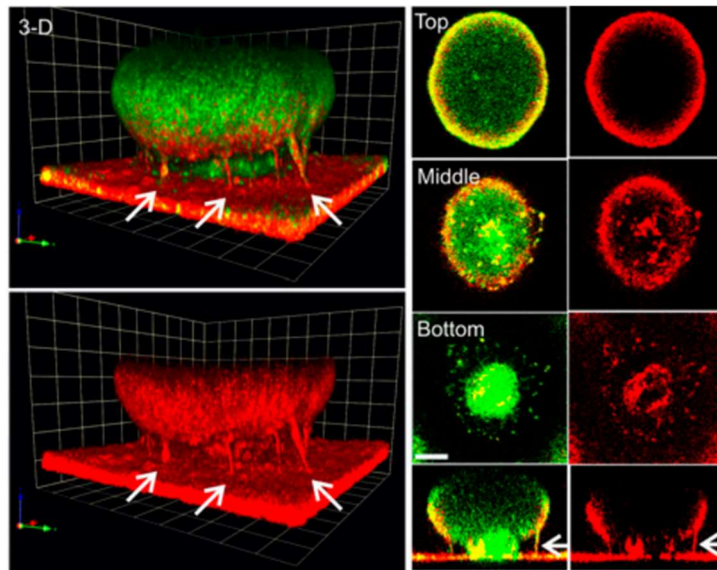


Figure 13 : Image représentative d'une structure en champignons de *Pseudomonas aeruginosa* (vert) réalisé en flowcell après 3 jours d'incubation en milieu minimum supplémenté en glucose, avec secretion de l'exopolysaccharide *Pel* qui lie l'ADNe au pied du champignon (selon Jennings et al., 2015).

Certaines études, grâce aux analyses de séquençage de l'ADNe, ont mis en évidence une certaine similarité avec l'ADN génomique des cellules chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida*, laissant penser que l'ADNe était issu de la lyse cellulaire. Cependant, celui-ci présente une conformation différente. L'ADNe est majoritairement sous forme linéaire ou circulaire. De plus certaines fonctions cataboliques de l'ADNe semblent avoir été amplifiées de façon disproportionnée par rapport à l'ADN génomique, ce qui indiquerait que celui-ci n'est pas issu de la lyse cellulaire (Steinberger et Holden, 2005).

Des études suggèrent également que l'ADNe provient de sous-populations de bactéries. Chez *S. epidermis*, l'ADNe est généré à travers un phénomène de lyse d'une sous population de bactéries. Ce phénomène est lié à la présence d'une autolysine bifonctionnelle (AtlE) (Steinberger et Holden, 2005). Certaines souches comme la souche F8 des *gammaproteobacteria* possèdent un ADNe similaire à l'ADN génomique mais présentant des différences distinctes (Böckelmann et al., 2006). Il a été par exemple démontré que les mécanismes de lyses cellulaires fratricides apparaissent comme étant une hypothèse non valide pour les biofilms jeunes d'*Enterococcus faecalis*, qui présentent de l'ADNe dans leur matrice. Il semblerait que la sécrétion d'ADN s'effectue à partir de cellules métaboliquement actives (Barnes et al., 2012). Aujourd'hui, la sécrétion de vésicules issues de la membrane externe des bactéries contenant de l'ADN est à nouveau mis en avant et semble avoir été démontré chez d'autres bactéries comme *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans* ou *Lactobacillus reuteri* (Sumei et al., 2014; Grande et al., 2015, 2017).

Depuis quelques années, les vésicules de membrane qui dérivent de la membrane externe des bactéries gram négative sont plus fréquemment retrouvées dans les biofilms, dont celui de *P. aeruginosa* (Schooling et Beveridge, 2006). Jusqu'ici, elles ont été plus souvent étudiées dans leur rôle de facteur de pathogénie bactérienne (Schwechheimer et Kuehn, 2015). Leur production serait importante en condition de biofilm et elles contiendraient à la fois des protéines et des molécules insolubles (Kulp et Kuehn, 2010).

Très récemment, un mécanisme actif de sécrétion de l'ADNe associé aux protéines DNABII, permettant la stabilisation de celui-ci, a été mis en évidence chez *Haemophilus influenzae* (Jurcisek *et al.*, 2017a). L'ADNe associé au DNABII transiterait du cytoplasme bactérien au périplasme par un pore complexe de la membrane interne (TraC et TraG). Ce système présenterait une homologie avec le système de sécrétion type IV (Jurcisek *et al.*, 2017b) (Figure 14).

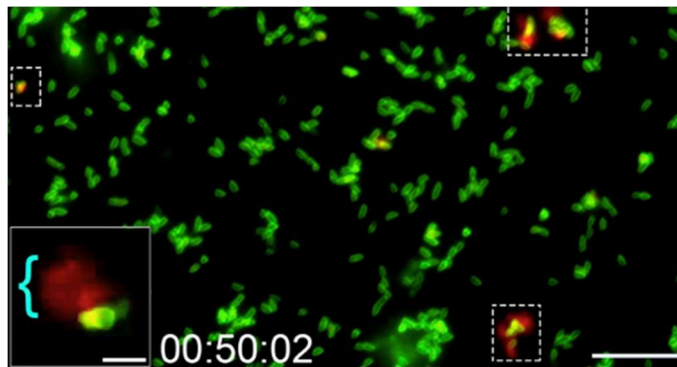


Figure 14 : Sous population de NTHI (Non typable *Haemophilus influenzae*) rejetant de l'ADNe à partir d'un seul pôle cellulaire le long de l'axe de la cellule. Image représentative des bactéries (vert) prise durant un time-lapse cultivées en milieu contenant de l'Ethidium homodimere-2 (rouge, eDNA), barre d'échelle = 10 μm et grossissement = 2 μm

3.1.5 Les lipides et tensioactifs

Les exopolysaccharides, les protéines et l'ADNe sont des molécules hydrophiles fortement hydratées mais certains autres SPEs présentent des propriétés hydrophobes (Flemming et Wingender, 2010) comme les polysaccharides liés aux groupements acetyl ou méthyl de *Rhodococcus* sp. (Neu *et al.*, 1992). Cependant, la majeure partie des SPEs possédant une nature hydrophobe est attribuée aux lipides et biosurfactants. Ces structures lipidiques peuvent avoir des propriétés tensio-actives comme c'est le cas pour *Serratia marcescens* (Matsuyama et Nakagawa, 1996). Elles peuvent être impliquées dans l'adhérence tels que les lipopolysaccharides de *Thiobacillus ferrooxidans* (Sand et Gehrke, 2006). D'autres SPEs tensioactifs comme les surfactines, viscosines ou les émulsanes ont la capacité de disperser les

substances hydrophobes et donc d'améliorer leur biodisponibilité (Flemming et Wingender, 2010).

Les biosurfactants peuvent également avoir des propriétés antibactériennes et antifongiques. Certains peuvent augmenter la croissance bactérienne sur des surfaces hydrophobes ou intervenir dans les phases d'adhésion bactérienne et de dispersion (Ron et Rosenberg, 2001). De façon intéressante, les rhamnolipides qui peuvent agir comme des biosurfactants ont été trouvés dans les SPEs de *P. aeruginosa* (Davey *et al.*, 2003), et ils agiraient sur la formation initiale des microcolonies en facilitant la migration des bactéries associées à la surface et la formation des structures en champignons caractéristiques des biofilms de *P. aeruginosa* (Davey *et al.*, 2003).

Certains fluorochromes associés à la microscopie confocale permettent d'observer la distribution des lipides dans les biofilms (Lawrence *et al.*, 2003; Canette *et al.*, 2015). Cependant, contrairement aux autres types de SPEs, ceux-ci restent largement inexplorés. Une nouvelle technique couplant la microscopie à fluorescence super résolution et la spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) en milieu liquide, permettrait à la fois, de localiser et d'identifier les molécules sur un biofilm *in situ* (Ding *et al.*, 2016).

3.2. Rôle et fonction de la matrice extracellulaire

La matrice correspond au matériel extracellulaire principalement produit par les organismes eux-mêmes, au sein desquels ils sont intégrées. Ils consistent en un agglomérat de différents types de biopolymères connus sous le nom de substances polymériques extracellulaires (SPEs) qui constituent la charpente de l'architecture tridimensionnelle du biofilm et qui est responsable de l'adhérence aux surfaces et de la cohésion du biofilm. La formation d'un biofilm permet un mode de vie entièrement différent de l'état planctonique. Bien que les interactions précises et moléculaires des différents SPEs de la matrice n'aient pas été définies, ainsi que leurs contributions à l'intégrité de la matrice, plusieurs fonctions des SPEs ont été déterminées (Tableau 4). Ces fonctions démontrent une large gamme d'avantage pour le mode de vie du biofilm.

Tableau 4 : Les principaux rôles et fonctions des substances polymériques extracellulaires dans les biofilms microbiens (Flemming et Wingender, 2010).

Fonction	Rôle au sein du biofilm	SPEs impliquées
Adhésion	Permettre l'étape initiale de colonisation de surfaces biotiques ou abiotiques par des cellules planctoniques et l'attachement à long terme de l'ensemble du biofilm à la surface	Polysaccharides, protéines, ADNe et molécules amphiphiles
Agrégation des cellules bactériennes	Permettre le pontage des cellules bactériennes entre elles, une immobilisation temporaire de la population, le développement à forte densité de la population et la reconnaissance cellulaire	Polysaccharides, protéines et ADNe
Cohésion du biofilm	Former un réseau de polymères hydratés assurant la stabilité mécanique du biofilm (souvent en conjonction avec les cations multivalents), déterminer l'architecture du biofilm et permettre la communication intercellulaire	Polysaccharides neutres et chargés, protéines (amyloïdes et lectines) et ADNe
Rétention d'eau	Maintenir un microenvironnement fortement hydraté autour des organismes du biofilm permettant une meilleure résistance à la dessiccation	Polysaccharides hydrophiles et potentiellement des protéines
Barrière de protection	Conférer une résistance aux mécanismes de défense spécifique et non spécifique de défense d'un hôte durant une infection, une tolérance à différents agents antimicrobiens, une protection contre les effets nocifs de l'oxygène ou encore une protection contre le broutage des protozoaires	Polysaccharides et protéines
Absorption de composés organiques	Permettre l'accumulation de nutriments issus de l'environnement et l'absorption de xenobiotiques	Polysaccharides hydrophobes ou chargés et protéines
Absorption d'ions inorganiques	Favoriser la formation de gels polysaccharidique, l'échange d'ion, la formation minérale et l'accumulation d'ions métaux toxiques (contribue à la détoxification environnemental)	Polysaccharides chargés et protéines incluant les substituants inorganiques tels que les phosphates et sulfates
Activités enzymatiques	Permettre la digestion de macromolécules exogènes pour l'acquisition de nutriments et la dégradation des SPEs structuraux permettant le relargage du biofilm	Protéines
Source de nutriments	Fournir une source de composés contenant du carbone, de l'azote et du phosphore utilisables par la communauté du biofilm	Potentiellement tous les SPEs
Echange d'information génétique	Faciliter le transfert horizontal de gènes	ADN
Export des composants cellulaires	Relargager du matériel cellulaire comme résultat d'un turnover métabolique	Vésicules membranaires contenant acides nucléiques, enzymes, lipopolysaccharides et phospholipides
Accepteur et donneur d'électrons	Permettre les activités redox dans la matrice	ADNe
Puits pour l'énergie en excès	Stocker le surplus de carbone sous des rapports déséquilibrés carbone / azote	Polysaccharides

Fonction	Rôle au sein du biofilm	SPEs impliquées
Fixation des enzymes	Fixer les enzymes résultant de l'accumulation, rétenir et stabiliser les enzymes suite à leurs interactions avec les polysaccharides	Polysaccharides et enzymes

4. Formation de sous-populations en biofilm

Au sein d'un biofilm mature, les phénomènes de diffusion/consommation ne seront pas les mêmes aux différents points d'un biofilm. Ainsi, dans un biofilm mature les couches supérieures seront à la fois alimentées en oxygène et en nutriments, tandis que dans les couches inférieures, l'oxygène diminuera rapidement suivi par les nutriments jusqu'à une zone où ni oxygène ni nutriments ne seront présents (figure 15) (Stewart et Franklin, 2008).

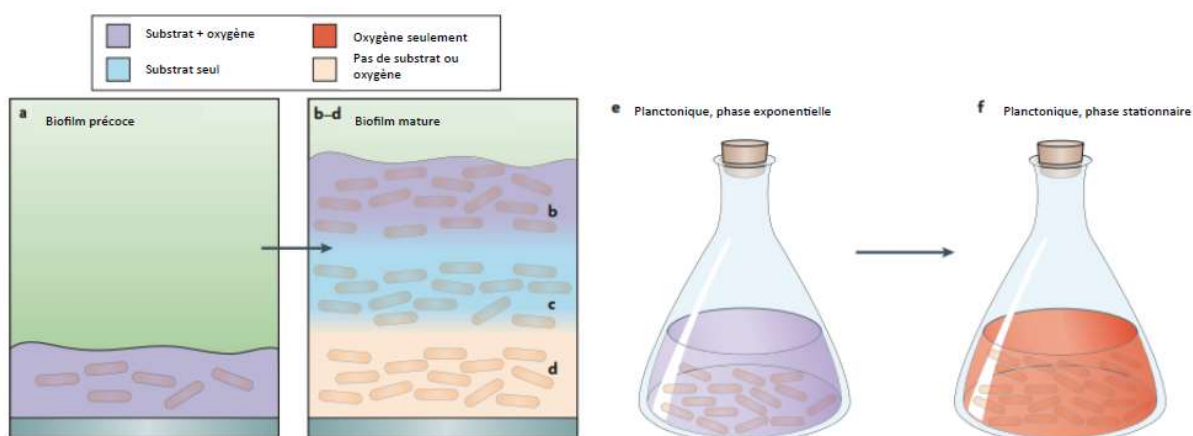


Figure 15 : Hétérogénéité chimique dans un biofilm mono-spécifique. Biofilm fin dans les phases précoces de formation du biofilm (a) saturé à la fois en nutriments et oxygène. Dans les biofilms matures, l'environnement peut contenir à la fois oxygène et nutriments (b), nutriments mais pas d'oxygène (c) et ni nutriments ni oxygène (d). Dans les cultures planctoniques en phase exponentielle, les nutriments et l'oxygène sont présents (e) tandis qu'en phase stationnaire agitée, le milieu contient uniquement de l'oxygène (f) (selon Stewart, Franklin, 2008).

Cette variation de concentration en nutriments ou oxygène au sein du biofilm s'applique également aux antibiotiques ou toxines utilisés contre le biofilm (Anderson et O'Toole, 2008). Il est donc raisonnable d'anticiper que l'hétérogénéité chimique présente au sein d'un biofilm est également accompagnée d'une hétérogénéité physiologique, même au sein d'un biofilm mono-spécifique (Stewart et Franklin, 2008). Ainsi, les régions à l'intérieur d'un biofilm développé présentent une activité et une croissance bactérienne ralenties ou arrêtées du fait de la limitation en substrat ou oxygène (Figure 16). De plus, l'accumulation de déchets acides peut aboutir à une diminution du pH et affecter l'état physiologique des cellules. De même, une expression génique différentielle apparaît dans ces biofilms mono-spécifiques (Stewart et Franklin, 2008).

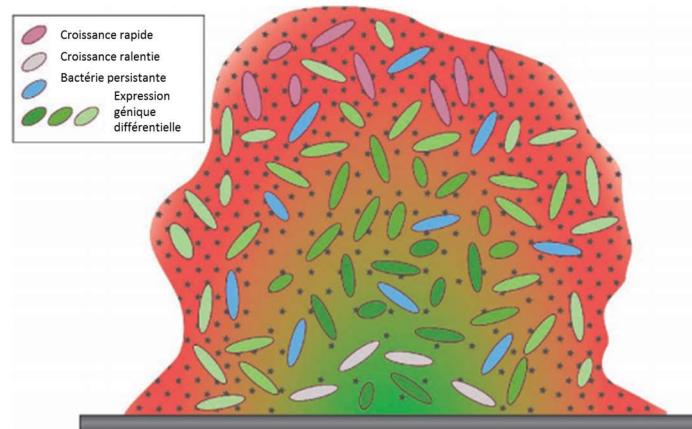


Figure 16 : Variation physiologique au sein du biofilm. Les petits points noirs représentent la diffusion des antibiotiques au sein du biofilm. La diffusion d'oxygène et de nutriments ainsi que l'évolution du pH est représentée par le gradient de couleur du rouge (forte concentration en oxygène et nutriments), au vert (faible concentration en nutriment et oxygène et pH acide).

Parmi ces expressions géniques différentielles certaines d'entre elles peuvent aboutir à la mortalité d'une sous-population. Il a été suggéré que la lyse de certaines sous-populations de bactéries pourrait être bénéfique à la croissance du biofilm (par libération de nutriments et d'ADN) et permettre à la sous-population survivante une dispersion et une différenciation continue (Mai-Prochnow *et al.*, 2004). Chez la bactérie marine *Pseudoalteromonas tunicata*, une protéine autotoxique (AlpP) induit la mortalité des bactéries à l'intérieur des microcolonies formées pendant l'établissement du biofilm (figure 17).

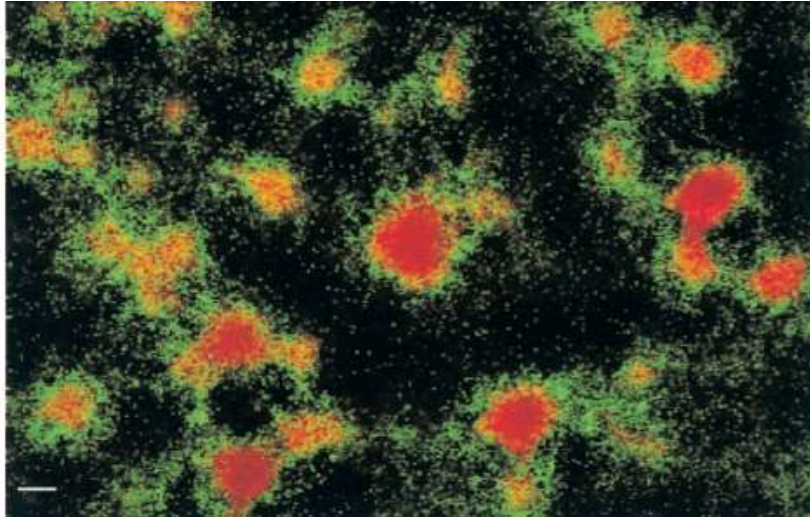


Figure 17 : Développement de biofilm et visualisation des cellules mortes de *P. tunicata*. Le biofilm a été marqué avec du BacLight Live/dead bacterial viability kit. L'Iodure de propidium (rouge) marque les cellules dont la membrane a été compromise et cellules mortes tandis que le syto 9 (vert) marque la totalité des cellules. Biofilm après 48h d'inoculation. Barre d'échelle = 50 μm (Mai-Prochnow *et al.* 2004)

Comme vu précédemment avec les biofilms de *P. aeruginosa* et les sous populations du pied et du chapeau (3.1.4 L'ADN extracellulaire (ADNe)). Les deux populations qui sont soit inertes ou mobiles et produisent ou non de l'ADNe (Allesen-Holm *et al.*, 2006) présentent également une susceptibilité différente à la présence d'antibiotiques et de toxines. De façon intéressante, il a été remarqué que les cellules du chapeau présentaient une tolérance vis à vis de la colistine et du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) tandis que les cellules du pied y étaient sensibles (Haagensen *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, même si les biofilms semblent plus résistants aux antibiotiques, la plupart des cellules de biofilm sont fortement sensibles à des agents bactéricides tels que les antibiotiques fluoroquinolones ou les métaux oxyanions. Cependant une petite population de cellule reste en vie, indépendamment de la concentration en antibiotiques (Lewis, 2008). Lors d'infection, ces cellules dites « persistantes » sont sensibles aux facteurs d'immunité en planctonique, cependant en mode de vie en biofilm, la matrice les protège des facteurs d'immunité et après une diminution de la concentration en antibiotiques, les cellules persistantes peuvent recoloniser le biofilm et produire de nouvelles cellules planctoniques (figure 18) (Lewis, 2008; Conlon, 2014).

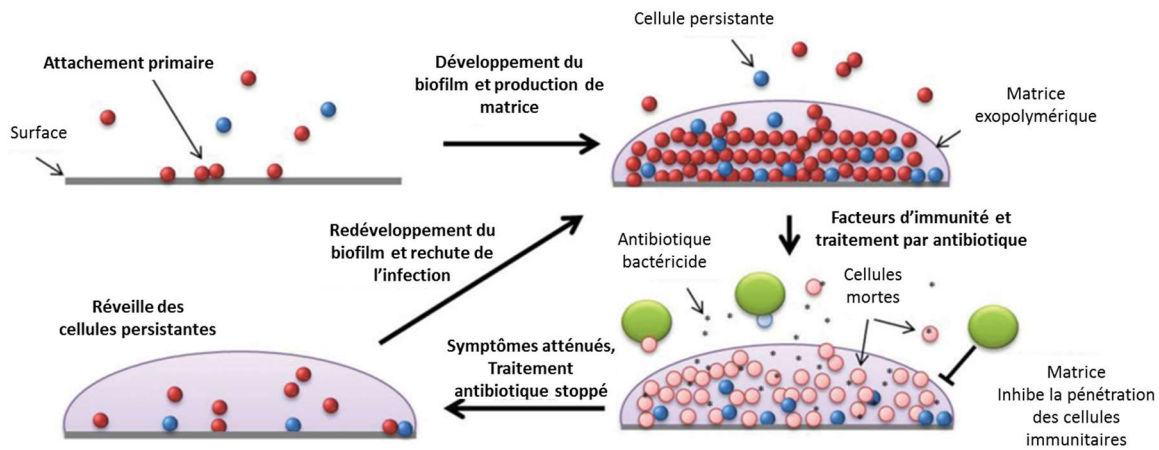


Figure 18 : Modèle de redéveloppement et de réinfection d'un biofilm suite à la présence de cellules persistantes (Conlon, 2014).

5. Les biofilms multi-spécifiques, entre compétition et avantage, un voisinage pas toujours amical

La plupart des biofilms étudiés encore actuellement, sont examinés en culture mono-spécifique alors que dans l'environnement les communautés de biofilms sont représentées par une variété de microorganismes en un même lieu. Les études sur les dynamiques de composition des premières étapes d'établissement d'un biofilm en milieu marin montrent une diversité impressionnante au sein des communautés microbiennes, même ces approches sont encore un challenge, puisque les différents sites d'études sont associés à différentes conditions environnementales (concentration en nutriment, température, hydrodynamique et chimie de l'eau) qui peuvent varier au cours du temps (saisons...). Ceci influence profondément l'écophysologie des bactéries planctoniques et en biofilm (Salta *et al.*, 2013). Ainsi chaque biofilm naturel étudié présente des caractéristiques uniques. Cependant, il est indéniable que les nouvelles techniques de séquençage haut débit permettront à plus long terme d'avoir une idée très précise de la grande diversité des espèces présentes dans un endroit particulier et à un moment donné. En revanche, les écosystèmes environnementaux étant en réalité faits de nombreux microhabitats dynamiques, les études d'interactions inter-espèces à l'échelle des microhabitats sont les points manquants entre les nombreuses études mono et bispécifiques et les études à une échelle beaucoup plus large focalisée sur la diversité globale d'une communauté. En effet, cette échelle manquante apporte des informations sur les microhabitats, l'organisation spatiale ainsi que sur les interactions entre espèces bactériennes ou microbiennes (Røder *et al.*, 2016). Les communautés microbiennes interagissent préférentiellement, et à

minima en tant que groupes métaboliquement interdépendants à l'échelle du microhabitat (Zelezniak *et al.*, 2015; Røder *et al.*, 2016). Les bactéries colonisent des microhabitats compatibles avec leurs besoins physiologiques et métaboliques, ce qui dépend des bactéries voisines, influençant ainsi la structure spatiale de la communauté (Stubbenieck *et al.*, 2016). Par conséquent, étudier les changements dans la composition d'une communauté avec le temps et ce qui est produit par les populations peut apporter des informations capitales sur la capacité de chaque individu à survivre dans ce microhabitat. Or très peu d'information, excepté celles sur les cavités orales humaines ou les études multi-espèces sont les plus abondantes, sont disponibles sur les microhabitats dans l'environnement naturel, en particulier dans l'environnement marin.

Les interactions interspécifiques sont très variées et peuvent impliquer des mécanismes tels que celui du « quorum sensing », de la coopération métabolique ou de la compétition. Ces interactions peuvent avoir des effets antagonistes, tels que la compétition pour la disponibilité en nutriments, l'inhibition de la croissance... ou synergétique comme une meilleure résistance aux toxines ou aux prédateurs ou de l'utilisation des métabolites produits par les voisins (figure 19). Ces interactions bénéfiques ou néfastes dans les biofilms mixtes peuvent avoir de nombreuses conséquences à la fois dans les secteurs environnementaux, industriels ou cliniques (Elias et Banin, 2012; Rendueles et Ghigo, 2012).

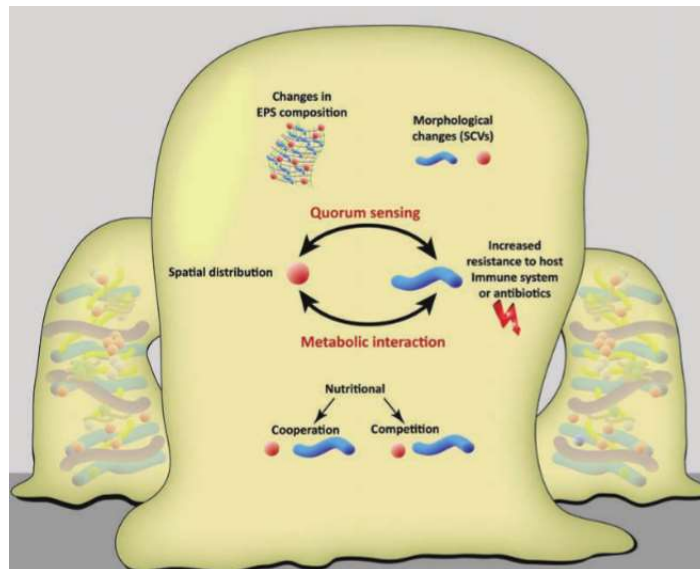


Figure 19 : Processus individuel et social se produisant au sein des communautés biofilms (selon Elias et Banin, 2012).

5.1 Un voisinage amical

Les biofilms sont des groupes différenciés de microorganismes sessiles arrangés en structures agrégées appelées microcolonies présentant des propriétés communautaires distinctes (Elias et Banin, 2012). Dans les biofilms multi-spécifiques, les processus qui gouvernent leurs développements, leurs formes et leurs natures sont intimement liés aux mécanismes de communication cellulaire, aux modifications de la composition en SPEs, à leurs résistances aux agents antimicrobiens, à leurs capacités d'exploitation des nutriments ou encore à leurs distributions spatiales. Chacun de ces mécanismes peut être largement influencé par les interactions inter souches ou espèces au sein d'un même biofilm. Sachant que les biofilms mixtes sont ubiquitaires et trouvés à la fois dans les environnements naturels, industriels et cliniques, il peut être présumé que les interactions synergétiques prédominent sur les interactions antagonistes en particulier les synergies qui facilitent une coexistence plus robuste et plus pérenne (Periasamy et Kolenbrander, 2010). Dans un premier temps, une brève description des mécanismes bénéfiques à l'établissement ou à la persistance des biofilms est mise en lumière.

5.1.1. La communication cellulaire dans un biofilm multi-spécifique

La communication entre bactéries voisines via le quorum sensing est un comportement social qui augmente les interactions au sein des communautés mono- ou multi-spécifiques (Elias et Banin, 2012). Le quorum sensing requiert la production et le relargage de petits signaux chimiques appelés autoinducteurs qui vont augmenter en concentration en fonction de la densité cellulaire mais dont la sécrétion dépend également des conditions physiologiques (Ng et Bassler, 2009). Il permet aux bactéries d'exprimer spécifiquement certains gènes de façon coordonnée. Le quorum sensing est connu comme jouant un rôle important dans le développement des biofilms (Hammer et Bassler, 2003; Sakuragi et Kolter, 2007). Par exemple, le système AI-2 est requis pour le développement de biofilm et de la plaque dentaire. Les bactéries *Porphyromonas gingivalis* et *Streptococcus gordonii* ne sont pas capables de former de biofilm si les deux bactéries ne possèdent pas le gène *luxS* requis pour la synthèse du signal AI-2, tandis que si une des souches dans un biofilm bi-spécifique est capable de produire ce signal, les deux peuvent former un biofilm (McNab *et al.*, 2003). Similairement, les biofilms mixtes d'*Actinomyces naeslundii* et de *Streptococcus oralis* dépendent également de la production d'AI-2 par *S. oralis* qui en produit à un niveau plus élevé qu'*A. naeslundii*. L'effet synergétique est mesuré par une augmentation du biovolume du biofilm lorsqu'un biofilm mixte comprenant les deux acteurs est mis en place par rapport aux biofilms mono-spécifiques.

Ces résultats indiquent que lors de la co-aggrégation, il existe une augmentation locale de la concentration en AI-2 qui déclenche le mutualisme et facilite la formation de biofilm (Rickard *et al.*, 2006) (figure 20).

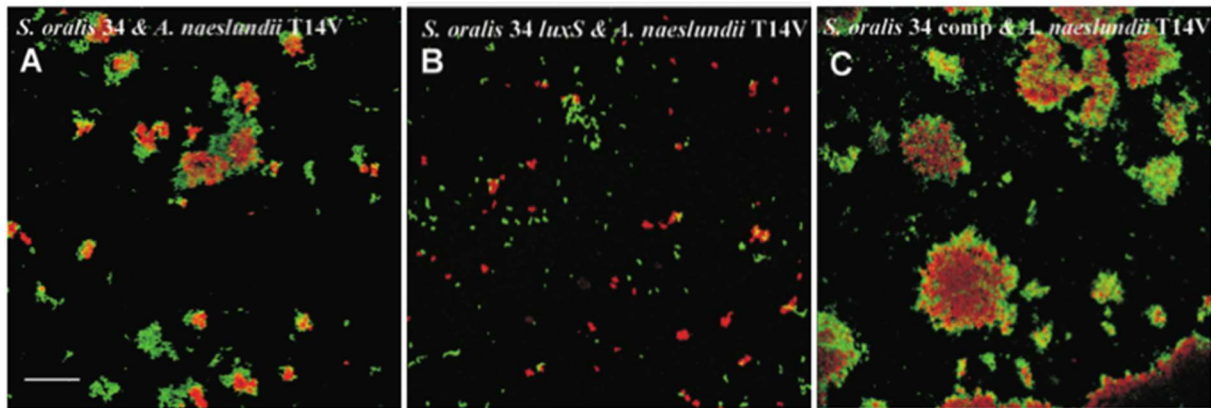


Figure 20 : Observation d'un biofilm bispécifique entre *S. oralis* (vert) et *A. naeslundii* (rouge) après 22h à 37°C en flowcells, A- Souches sauvages, B- *A. naeslundii* sauvage et *S. oralis* déplété du gène *luxS* ($\Delta luxS$), C- *A. naeslundii* sauvage et *S. oralis* $\Delta luxS$ complétée (selon, Rickard *et al.*, 2006).

Des interactions entre organismes ont également été décrites via le système AI-2. Par exemple, le champignon *Candida albicans* qui se trouve à proximité de la bactérie *S. gordonii* dans la cavité orale, peut former un biofilm présentant un biovolume plus important lorsque les deux acteurs sont en présence par rapport à leurs biofilms mono-spécifiques respectifs. Donc, il apparaît que le système AI-2 est également important pour le développement de ce champignon (Bamford *et al.*, 2009).

Le système de quorum sensing basé sur les N-acylhomoserine lactones (AHL) est un système qui implique un large panel de molécules de communication, qui peuvent être détectées par des bactéries différentes. Quelques exemples ont mis en lumière son rôle dans l'élaboration de biofilms multi-spécifiques. Les deux pathogènes *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia* peuvent former un biofilm multi-spécifique et chacun emploie le système AHL pour contrôler sa virulence et sa formation de biofilm (Van Delden et Iglewski, 1998; Huber *et al.*, 2001). Ainsi, *B. cepacia* est capable de reconnaître différents AHLs produit par *P. aeruginosa*. De plus, lorsque ces AHLs sont produites, les deux souches vivent en association dans des microcolonies mixtes, ce qui n'est pas le cas lorsque celles-ci ne sont pas produites (Riedel *et al.*, 2001). De même, An *et al* arrivent aux mêmes conclusions dans un biofilm de *P. aeruginosa* associé à *Agrobacterium tumefaciens* (An *et al.*, 2006). Enfin, la communication via des AHLs entre organismes différents a été également observée puisque certaines AHLs sont capables de promouvoir l'établissement des spores de l'algue *Ulva*, à la fois suite à leur contact avec des

bactéries sauvages produisant des AHLs mais également, avec des molécules synthétiques (Joint *et al.*, 2007).

Des résultats similaires ont été observés avec les systèmes de type quorum sensing impliquant des « peptides autoinducteurs » ou des « molécules d'acide gras » (Elias et Banin, 2012).

De façons générales, il est important de noter que les phénotypes associés aux biofilms mixtes peuvent être le résultat de la communication entre deux espèces ou le reflet d'effets secondaires d'une communication intraspécifique (Elias et Banin, 2012).

5.1.2. La coopération bactérienne pour le biofilm : adhésion, matrice et métabolisme

Lors de l'établissement de biofilms mixtes, chacun des partenaires jouent un rôle distinct qui permet l'établissement d'un biofilm. Par exemple, *Streptococcus mutans* sert de colonisateur primaire de la surface des dents, puis s'associe avec des *Actinomyces* sp. afin de promouvoir ensemble la croissance en biofilm de *Lactobacillus* (Filoche *et al.*, 2004). *S. gordonii* est, quant à lui, également considéré comme un colonisateur primaire promouvant les conditions nécessaires à l'établissement de *P. gingivalis*. Cette co-colonisation n'est donc pas un processus passif. *S. gordonii* exprime différents gènes nécessaires à l'établissement de *P. gingivalis* comme ceux impliqués dans la biosynthèse des SPEs, dans l'intégrité de la paroi cellulaire, dans l'adhésion et dans les signaux cellulaires intra ou inter spécifiques. Les gènes impliqués dans la synthèse de SPEs chez *S. gordonii* fonctionnent comme des récepteurs pour les adhésines de surface exprimés par *P. gingivalis*, facilitant ainsi la co-agrégation (Kuboniwa *et al.*, 2006).

De même, comme vu précédemment, avec *Salmonella typhimurium* et *E. coli*, la coproduction de cellulose par *E. coli* et de fimbriae agrégatifs par *S. typhimurium* donne pour résultat la formation d'une matrice extracellulaire hydrophobe et rigide, tandis que lorsque les souches sont séparées, la formation d'un seul de ces composés donne une matrice fragile (Zogaj *et al.*, 2001). Ainsi, la coopération entre ces deux bactéries induit la formation d'un biofilm plus robuste de par la rigidité de sa matrice.

Les coopérations métaboliques au sein du biofilm représentent également un avantage. Certains sous-produits issus du métabolisme de nutriments d'une espèce peuvent être utilisés par une autre espèce. Ce phénomène est nommé commensalisme métabolique (Elias et Banin, 2012). *Pseudomonas putida* et *Acinetobacter* peuvent utiliser toutes les deux l'alcool benzylique comme unique source de carbone et d'énergie. Ceci devrait normalement aboutir à une

compétition entre ces espèces pour l'accès à ce nutriment. Or, lorsqu'elles sont présentes en biofilm mixte, *Acinetobacter* produit du benzoate, à partir de l'alcool benzylique, qui est à son tour métabolisé par *P. putida*. Il s'agit donc d'une coopération. De plus, cette coopération induit une structuration spécifique du biofilm, puisque *Acinetobacter* réside dans les couches supérieures du biofilm afin d'avoir un accès facilité à l'alcool benzylique, tandis que *P. putida* se trouve dans les couches inférieures, lui permettant de bénéficier du benzoate secrété par *Acinetobacter* (Christensen *et al.*, 2002) (figure 21). Les capacités métaboliques de chacun des acteurs en présence peuvent induire d'autres organisations du biofilm qui seront vues dans le paragraphe « stratification métabolique des biofilms. »

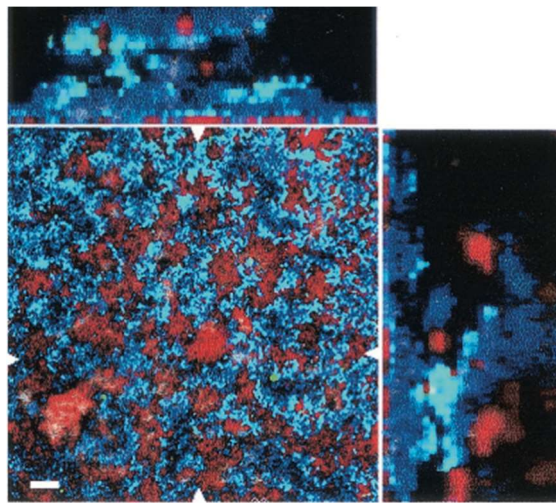


Figure 21 : Coopération métabolique au sein d'un biofilm mixte d'*Acinetobacter* C6 (bleu) et *P. putida* R1 (rouge), après 6 jours de croissance avec comme seule source de carbone de l'alcool benzoïque (Christensen *et al.*, 2002).

5.1.3 Le biofilm, une forteresse contre les défenses de l'hôte, les agents antimicrobiens et la prédation

Dans les biofilms multi-spécifiques, l'habilité de la communauté à coopérer peut l'aider à survivre à différents fléaux comme les défenses immunitaires d'un hôte lors d'une infection, les agents antimicrobiens ou la prédation par un grand nombre de brouteurs.

Les biofilms multi-spécifiques par rapport aux mono-spécifiques sont connus comme étant moins sensibles aux agents antimicrobiens ou aux procédés de désinfection. Un des mécanismes augmentant la résistance aux antibiotiques est le changement de la composition en SPEs de la matrice. Bien que certains SPEs soient communs à la plupart des biofilms, la composition de la matrice varie largement en fonction des espèces bactériennes et des conditions environnementales (Flemming et Wingender, 2010). Ainsi, il a été mis en évidence que lors

d'un biofilm multi-organismes entre le champignon *C. albicans* et *Staphylococcus epidermis*, deux espèces pathogènes qui sont capables de former un biofilm mixte, *S. epidermis* produit des exopolymères qui contribuent à la formation du biofilm, mais également à la résistance contre les antibiotiques. *S. epidermis* produit également ces composés lors d'un biofilm mono-spécifique. Cependant, lors de l'association avec *C. albicans*, celui-ci est protégé également par la matrice de *S. epidermis* contre les composés antifongiques (Adam *et al.*, 2002). De même, Lee et coauteurs (Lee *et al.*, 2014) ont étudié un consortium de biofilms multi-spécifiques comprenant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas protegens* et *P. aeruginosa*. Les biofilms mono-spécifiques de ces espèces ont différents niveaux de résistance à la fois à la tobramycine et au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Lors de leur association commune en biofilm, elles ne sont pas affectées par l'ajout de ces agents antimicrobiens, même si certaines sont présentes en très faibles proportions (figure 22). Donc, l'effet protecteur d'une souche peut se transmettre à l'ensemble de la communauté. Il s'agit d'une protection croisée issue du partage des protections individuelles. *P. aeruginosa* peut métaboliser le SDS et *K. pneumoniae* sequestre le SDS dans sa matrice réduisant son effet sur les cellules du biofilm ce qui facilite l'action de *P. aeruginosa*. Par conséquent, une protection contre le SDS se met en place pour *P. protegens*. De même pour la tobramycine, *P. protegens* partage sa protection avec les deux autres espèces. Dans un cocktail de quatre souches marines, le biofilm multi-spécifique présente une biomasse 167% plus importante que les biofilms mono-spécifiques. De plus, le biofilm multi-spécifique résiste mieux à la tétracycline et au peroxyde d'hydrogène ainsi qu'à la colonisation par *Pseudoalteromonas tunicata* que leurs équivalents mono-spécifiques (Burmølle *et al.*, 2006).

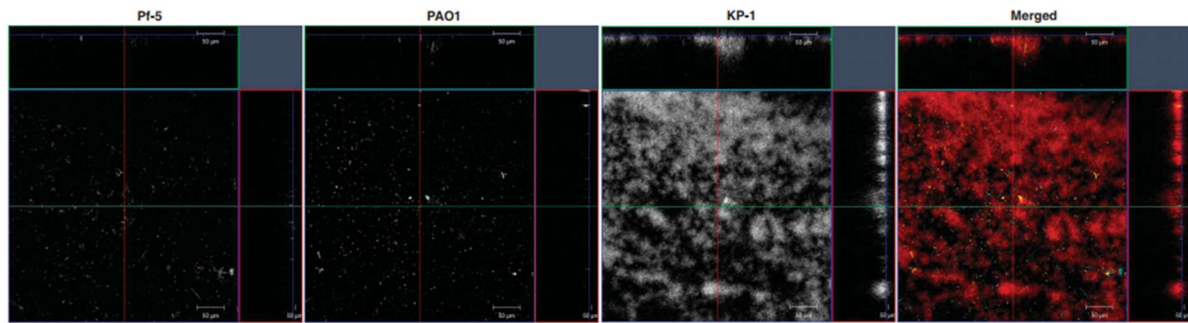


Figure 22 : Localisation spatiale et structure d'un biofilm multi-spécifique comprenant *Klebsiella pneumoniae* KP-1 (rouge), *P. aeruginosa* PAO1 (jaune) et Pf-5 *Pseudomonas protegens* (cyan) en flowcell avec un milieu minimum M9 (selon Lee *et al.*, 2014).

Le mode de vie en biofilm est également considéré comme étant un mécanisme adaptatif de défense contre les prédateurs en particulier les brouteurs (Matz et Kjelleberg, 2005). Ainsi, *Vibrio fischeri* aurait une aptitude anti-prédateur en mode de vie « biofilm » par la sécrétion potentiel de facteur(s) anti protozoaire(s) (Chavez-Dozal *et al.*, 2013). De même, *P. aeruginosa* et *V. cholerae* sont également capables de résister aux prédateurs par sécrétion respective d'alginate comme exopolysaccharides et d'un facteur anti-protozoaire (Matz *et al.*, 2005). Aujourd'hui, il n'y a que peu de données sur les biofilms multi-spécifiques contre le broutage, mais de même que pour la résistance aux agents antimicrobiens, il peut être supposé que ces souches soient capables de partager leurs résistances avec d'autres au sein d'un biofilm multi-spécifique.

Finalement, le biofilm peut également être un mécanisme de défense contre la réponse immunitaire innée de l'hôte lors d'infections. Chez les patients atteints de fibrose kystique au niveau des poumons qui sont alors souvent colonisés par plusieurs espèces bactériennes, deux des pathogènes les plus fréquemment trouvés *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* interagissent de façon synergique. Ainsi, *P. aeruginosa* sécrète un exoproduit qui améliore la résistance aux aminoglycosides et qui déclenche l'apparition de variants chez *S. aureus*. Ces variants présentent une susceptibilité réduite à d'autres agents antimicrobiens (Samuelsen *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009).

5.1.4 Une distribution spatiale en fonction de leur relation

Les biofilms multi-spécifiques peuvent présenter une organisation spatiale particulière. Trois modèles d'organisation du biofilm ont été établis (Elias et Banin, 2012). Le premier correspond à la formation de microcolonies mono-spécifiques ou chaque espèce forme une microcolonie côte à côte sans se mélanger. C'est le cas par exemple entre les biofilms mixtes de *Burkholderia* sp. et *Pseudomonas* sp., qui se développent en flowcell. La formation de ces microcolonies

séparées est le résultat d'une interaction non commensale entre ces espèces. Cette interaction est dépendante des ressources nutritionnelles disponibles (Nielsen *et al.*, 2000). Le second et le troisième modèles correspondent aux co-agrégations. Les cellules des deux espèces vont former des structures où les deux espèces bactériennes sont présentes. Dans le deuxième modèle, une co-agrégation des bactéries de différentes espèces s'effectue aboutissant à un mélange réel des deux espèces. Dans le troisième modèle, la co-agrégation s'effectue sous la forme d'une structure en couches de bactéries l'une sur l'autre, ce qui ne correspond pas à un mélange réel entre les deux espèces. Le deuxième modèle est par exemple observé avec les biofilms d'*Actinomyces naeslundii* et de *Streptococcus oralis* qui auront une interaction de type mutualisme grâce au système de quorum sensing de type AI-2 (Rickard *et al.*, 2006) (Figure 23). Le troisième modèle correspondant au développement de biofilm en couches est décrit dans le système synergétique entre *Actinobacter* qui occupe la couche supérieure et *Pseudomonas putida* qui occupe la couche inférieure dans un système de type flowcell. Cette organisation leur permettrait une interaction métabolique ou compétitive (Christensen *et al.*, 2002; An *et al.*, 2006).

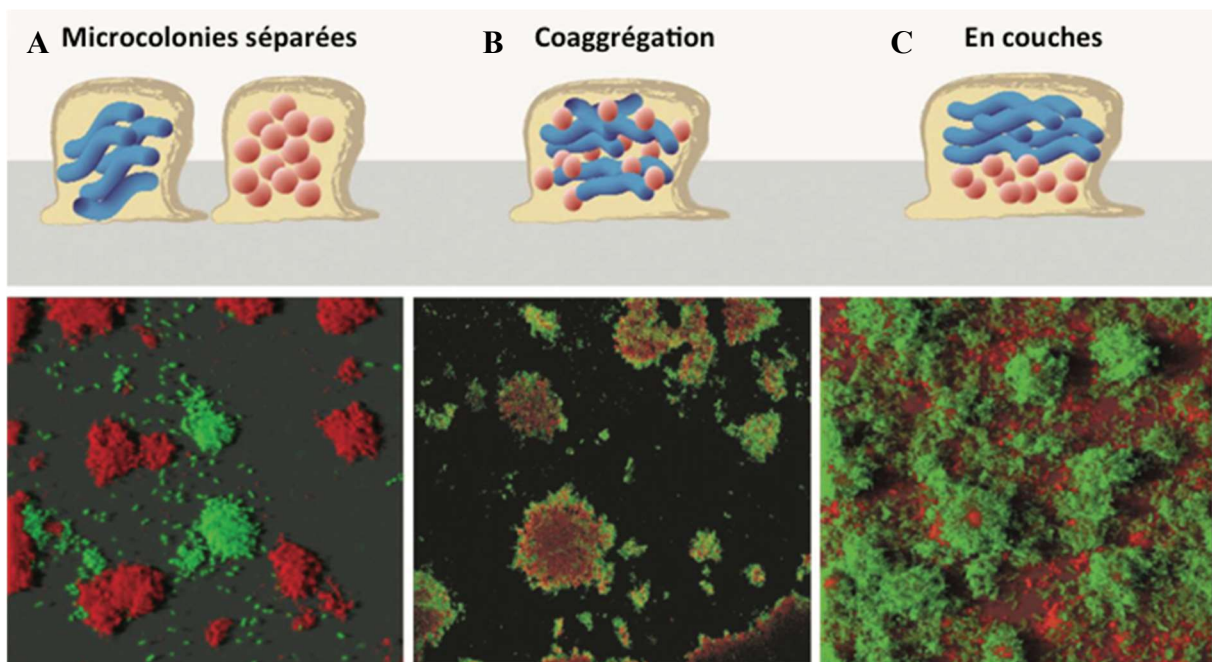


Figure 23 : Distribution spatiale au sein d'un biofilm multi-spécifique. Différentes voies d'organisation : A- Microcolonies mono-spécifiques séparées, B- Coaggrégation au sein d'une même microcolonie, C- Biofilm organisé en couches (selon Elias et Banin, 2012)

5.1.5. Modification de l'expression génique et transfert horizontal de gènes

L'étude du changement de l'expression génique lors de l'établissement d'un biofilm multi-spécifique peut fournir une meilleure compréhension des interactions entre les espèces. Ces modifications peuvent être le reflet d'interactions synergiques ou antagonistes. Différentes études ont mesuré ces modifications de l'expression de gènes lors de la formation de biofilms multi-spécifiques. Ainsi lors d'un biofilm mixte, *Veillonella parvula* induit des changements dans la physiologie de *Streptococcus mutans*, ce qui aboutit à une augmentation de sa résistance aux agents antimicrobiens. L'expression de différents gènes est également altérée incluant ceux impliqués dans le métabolisme des purines et des acides aminés, dans la synthèse de protéines ou encore dans le métabolisme des polysaccharides intracellulaires (Luppens *et al.*, 2008). De même, en présence de *Streptococcus aureus*, *P. aeruginosa* a augmenté significativement sa production d'exotoxine A. Il est suggéré que *S. aureus* crée des poches appauvries en fer à l'intérieur du biofilm ce qui induirait une surexpression d'exotoxine A par *P. aeruginosa* (Goldsworthy, 2008). De nombreux autres modèles d'interaction ont mis en évidence cette modification de l'expression génique au sein d'un biofilm multi-spécifique. Dans certains cas, les interactions dans des biofilms mixtes peuvent aboutir à la formation de variants issus d'une espèce. Lors de l'établissement d'un biofilm entre une souche de *Pseudomonas putida* incapable d'utiliser l'alcool benzylique et *Acinetobacter* sp., dans un milieu avec comme seule source de carbone l'alcool benzylique, il a été observé un contact étroit entre les deux souches. De plus, après plusieurs jours, un variant de *P. putida* apparaît se présentant sous forme de colonie rugueuse (figure 24). Ce phénotype apparaît comme héritable et exprime des gènes spécifiques. Celui-ci forme un biofilm plus aisément avec *Acinetobacter*. L'évolution de ce variant de *P. putida* est clairement une réponse adaptative à l'environnement physique, la croissance en mode vie « biofilm » est plus spécifiquement liée à la présence d'*Acinetobacter* (Hansen *et al.*, 2007).

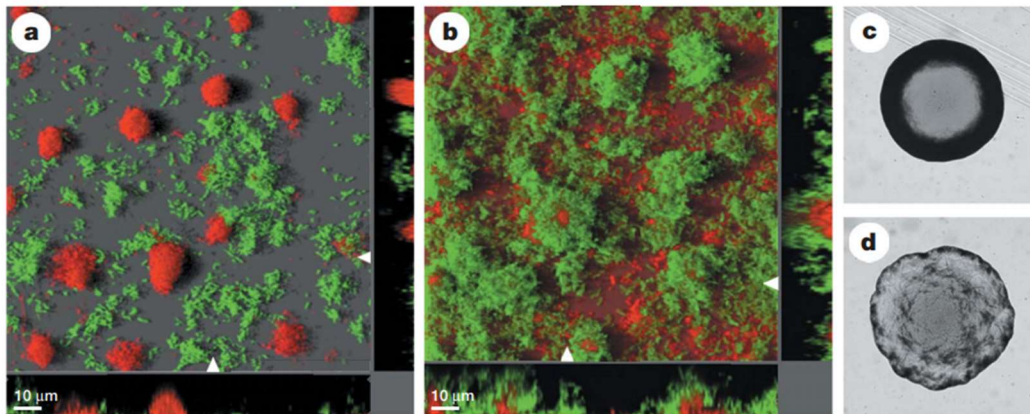


Figure 24 : Biofilm caractéristique et phénotype des colonies issues des variants ancestraux ou dérivés rugueux de *P. putida*. Les biofilms ont été réalisés en flowcell pendant 24 h avec 500 mM d'alcool benzylique comme seule source de carbone. a, b, Les images ont été obtenues de biofilms mixtes contenant *Acinetobacter* sp. C6 (rouge) et *P. putida* ancestral (vert) (a) et *Acinetobacter* sp. C6 (rouge) et une variante rugueuse de *P. putida* (vert) (b). c, morphologie de la colonie lisse de l'ancestrale *P. putida*. d, morphologie de la colonie rugueuse d'un génotype dérivé de biofilm.

Parallèlement, les systèmes de transferts horizontaux de gènes (HGT) jouent un rôle prépondérant au sein des biofilms du fait de la proximité des individus qui le compose. Le système de transfert horizontal le plus étudié dans le cadre des résistances aux antibiotiques, biocides et métaux sont les systèmes de conjugaison y compris au sein de biofilms multi-spécifiques (Christensen *et al.*, 1998). Ils amènent à de nouvelles combinaisons génétiques potentielles comprenant différentes cassettes de gènes de résistances (Burmølle *et al.*, 2008). L'écosystème du biofilm tend à promouvoir et induire ces échanges. Par exemple, des souches bactériennes incapables de recevoir un plasmide en culture simple, peuvent devenir receveuses en présence d'un donneur uniquement lorsqu'elles font partie d'une communauté composée de quinze espèces (Cruz-Perera *et al.*, 2013). Il a également été mis en évidence que la compétence de *Vibrio cholerae* peut être induite par d'autres espèces de *Vibrio* spp. dans un biofilm multi-spécifique, ce qui peut augmenter le taux de HGT dans les biofilms multi-spécifiques (Antonova et Hammer, 2011). Enfin, au sein du biofilm, une forte quantité d'ADNe peut être une source importante d'information génétique utilisable par les souches bactériennes (Burmølle *et al.*, 2014).

Donc, les interactions au sein de biofilms multi-spécifiques peuvent avoir de multiples effets bénéfiques pour la communauté mais également des effets antagonistes (Elias et Banin, 2012).

5.2. Des problèmes de voisinage qui peuvent rendre service à l'homme

Dans les écosystèmes de type biofilm, de nombreuses interactions se mettent en place. Avant d'accéder à un environnement stable, les bactéries mettent en place des stratégies compétitives pour se développer en biofilm dans une nouvelle niche. Un grand nombre d'investigations ont

été menées pour identifier des composés antagonistes non toxiques produits par les micro-organismes ciblant les différentes étapes de la formation du biofilm. La compréhension de ces mécanismes d'interaction négative et l'identification des composés antagonistes produits peuvent bien souvent avoir un intérêt industriel, notamment dans des secteurs d'activité où le biofilm induit des conséquences néfastes.

5.2.1. Compétition et antagonismes au sein du biofilm

Au sein du biofilm, des relations de type compétition ou antagonisme peuvent se mettre en place. Ces relations peuvent fortement limiter les capacités de certaines populations à former un biofilm. Par exemple, lors des expériences avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Agrobacterium tumefaciens*, *P. aeruginosa* utilise le swimming et le swarming pour rapidement coloniser la surface, empêchant l'adhésion d'*A. tumefaciens* (An *et al.*, 2006). La compétition peut également être d'ordre chimique. La production de biosurfactants par une espèce peut être par exemple délétère pour un autre. Notamment, lorsque *Bacillus subtilis* secrète de la surfactine nécessaire à son déplacement en swarming à la surface, elle inhibe en même temps la formation de biofilm d'*Escherichia coli*, de *Proteus mirabilis* ou encore de *Salmonella enterica* (Mireles *et al.*, 2001). De même, lors de la formation d'un biofilm bi-spécifique entre *Streptococcus gordonii* et *Streptococcus mutans* dans des microplaques de polystyrène, les capacités de formation de biofilm de *S. mutans* sont fortement compromises. En effet, *S. gordonii* secrète une protéase qui va dégrader un peptide de stimulation de la compétence de *S. mutans* et interfère avec ses capacités à former du biofilm (Wang *et al.*, 2011).

Une espèce peut également interférer avec le quorum sensing d'une autre espèce afin d'affecter la formation de biofilm en diminuant par exemple la concentration des molécules signal, typiquement les acylhomoserines lactones (AHLs). Pour ce faire, elle utilise des enzymes de dégradation telles que les AHL lactonases, les AHL acylases ou les AHL oxydoreductases (Dong *et al.*, 2002; Dong et Zhang, 2005; Czajkowski et Jafra, 2009; Elias et Banin, 2012). Des molécules signal telles que celles du QS peuvent induire une modification de l'expression d'un certain nombre de gènes d'une espèce voisine en compétition.

De la même manière que pour les interactions synergiques, une sous-expression des gènes de formation du biofilm peut être induite par une population voisine. Par exemple, il a été décrit que la transcription des gènes des curli, ou du chimiotactisme est sévèrement diminuée chez *E. coli* enterohémorragique en présence de *Lactobacillus acidophilus*. Ces gènes étant normalement impliqués dans l'établissement d'un biofilm. Cette modification de l'expression

génique a été décrite comme une conséquence du relargage d'exopolysaccharyles par *L. acidophilus* (Kim *et al.*, 2009).

Parfois, grâce à ces outils, les bactéries peuvent arriver à remplacer une population déjà installée en biofilm. La bactérie marine *Pseudoalteromonas tunicata* produit par exemple des protéines antibactériennes à large spectre de type AlpP qui peuvent permettre d'éliminer une population installée pour prendre sa place (Rao *et al.*, 2005). Ces mauvaises relations de voisinage ne sont pas uniquement rencontrées chez les bactéries et ont été décrites dans le cas où l'une des populations porte des gènes de résistance, ce qui la rend naturellement plus robuste qu'une autre aux conditions adverses de l'environnement. Lors d'une expérience impliquant un mélange de trois espèces bactériennes et de trois espèces de champignons, ces derniers ont été plus sensibles aux traitements de désinfection en présence des bactéries tandis que les bactéries ont été plus résistantes aux biocides en présence des champignons. Celles-ci ont donc pu plus facilement survivre dans cet environnement (Elvers *et al.*, 2002).

5.2.2. Sécrétion de molécule de type anti biofilm

Aujourd'hui, un grand nombre de composés naturels produits par des microorganismes qui peuvent s'attaquer aux différentes phases de la formation du biofilm, de l'adhésion à la dispersion ont été identifiés (tableau 5). Cependant, même si leurs rôles écologiques sont suspectés dans les biofilms multi-spécifiques, la plupart ont été testés en composé pure sur des biofilms mono-spécifiques, donc dans des conditions différentes et incompatibles avec une application industrielle.

Tableau 5 : Molécules d'inhibition du biofilm produites par d'autres bactéries. Les différentes couleurs du tableau indiquent les différentes étapes de formation du biofilm susceptibles d'être impactées, modifié d'après (Rendueles et Ghigo, 2012).

Souche sensible	Produit par	Molécules	Phase touchée	Mécanisme d'action	Base moléculaire	Références
Large spectre	<i>Escherichia coli</i> UPEC	capsules groupe II	Adhésion réversible	Altération des interactions cellule/surface et cellule/cellule	région kps	(Valle <i>et al.</i> , 2006)
Large spectre	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	SPEs	Adhésion réversible	Sous régulation des curli et chimiotactisme	-	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Differentes bactéries marines	-	Adhésion réversible	Réduction de l'hydrophobicité cellule/surface	-	(Nithyanand <i>et al.</i> , 2010)

Souche sensible	Produit par	Molécules	Phase touchée	Mécanisme d'action	Base moléculaire	Références
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacillus horikoshii</i>	-	Adhésion réversible	Inhibition du QS	-	(Thenmozhi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Vibrio</i> spp.	<i>Streptomyces albus</i>	-	Adhésion réversible	Réduction de l'indice d'hydrophobicité et production de SPEs	-	(You <i>et al.</i> , 2007)
Large spectre	<i>Bacillus pumilus</i> S6-15	acide 4-phenylbutanoic	Adhésion réversible	-	-	(Nithya <i>et al.</i> , 2011)
<i>Escherichia coli</i> CFT073	<i>Bacillus subtilis</i>	Biosurfactant	Adhésion réversible	Indépendant du QS	-	(Rivardo <i>et al.</i> , 2009)
Large spectre	<i>Bacillus licheniformis</i>	α -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)glycerol-phosphate	Adhésion réversible	-	-	(Sayem <i>et al.</i> , 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	Biosurfactant	Adhésion réversible	Inhibition du QS	-	(Rivardo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus gordonii</i> et <i>Streptococcus salivarius</i>	Challisine	Adhésion réversible	CSP inactivation	sgc	(Tamura <i>et al.</i> , 2009)
Gram positif et levures	<i>Streptococcus thermophilus</i> A	Biosurfactant	Adhésion réversible	Réduction de l'hydrophobicité cellule/surface	-	(Rodrigues <i>et al.</i> , 2006)
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus</i>	Surfactine	Adhésion réversible	-	-	(Velraeds <i>et al.</i> , 1996)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Petite molécule diffusible	Adhésion réversible	-	-	(Mowat <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	<i>Bacillus</i> spp. SS4	Non enzymatique	Adhésion réversible	Inhibition du QS	-	(Musthafa <i>et al.</i> , 2011)
Gram positif	<i>Escherichia coli</i> Ec300 et <i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	Polysaccharide riche en mannose	Adhésion réversible	Altération des interactions cellule/surface	région galF-his	(Rendueles <i>et al.</i> , 2011)
Large spectre	<i>Kingella kingae</i>	galactane PAM	Adhésion réversible	-	pamABCDE	(Bendaoud <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	Protéine	Adhésion réversible	-	-	(Kumada <i>et al.</i> , 2009)

Souche sensible	Produit par	Molécules	Phase touchée	Mécanisme d'action	Base moléculaire	Références
<i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactine	Adhésion réversible	Altération des interactions cellule/surface	locus sfp	(Mireles <i>et al.</i> , 2001)
Large spectre	<i>Streptococcus phocae</i> P180	Biosurfactant	Adhésion réversible	-	-	(Kanmani <i>et al.</i> , 2011)
Différentes bactéries marines	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	-	-	-	-	(Klein <i>et al.</i> , 2011)
<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polysaccharide Psl et Pel	Adhésion réversible et détachement	-	opérons psl et pel	(Qin <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone	Adhésion réversible et détachement	Surrégulation de la motilité swarming	pqsABCDE	(Fernández-Piñar <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus purnilus</i> TiO1	<i>Serratia marcescens</i>	Glycolipide	Adhésion réversible et détachement	Altération des propriétés de surface	-	(Dusane <i>et al.</i> , 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Protéase serine Esp	Adhésion réversible et détachement	-	esp	(Iwase <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactéries marines	-	Adhésion réversible et détachement	Inhibition du QS et réduction de l'hydrophobicité cellule/surface	-	(Nithya <i>et al.</i> , 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Biosurfactant	Adhésion réversible, développement du biofilm et détachement	-	-	(Walencka <i>et al.</i> , 2008)
Gram négative	Large spectre	Lactonase	Adhésion irréversible	Inhibition du QS	-	(Schipper <i>et al.</i> , 2009)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	Deaminase arginine	Adhésion irréversible	Sous régulation des fimbriae	-	(Christopher <i>et al.</i> , 2010)
Large spectre	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Quinolones	Maturation	Altération de la motilité	-	(Reen <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	Exo-β-D-fructosidase	Maturation	Digestion du sucrose	fruA	(Ogawa <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Maturation	Sous régulation de la promotion et sur régulation de l'inhibition du biofilm	-	(Holcombe <i>et al.</i> , 2010)

Souche sensible	Produit par	Molécules	Phase touchée	Mécanisme d'action	Base moléculaire	Références
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>	Deiminase arginine	Maturation	Sous régulation des fimbriae	arcA	(Wu et Xie, 2010)
Large spectre	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nuclease	Maturation	Dégradation des acides nucléiques	Nuc1	(Tang <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Alginate lyase	Maturation et détachement	Dégradation de l'alginate	-	(Alkawash <i>et al.</i> , 2006)
Large spectre	<i>Bacillus licheniformis</i>	DNase	Maturation et détachement	Activité nucléase et dégradation de l'ADN	NucB	(Nijland <i>et al.</i> , 2010)
Large spectre	<i>Bacillus subtilis</i>	Acide D-amino	Détachement	Détachement des fibres amyloïdes de la paroi cellulaire	Racemases	(Kolodkin-Gal <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Rhamnolipides	Détachement	-	rdlAB	(Xu et Liu, 2011)
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	-	-	-	-	(Söderling <i>et al.</i> , 2011)
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>LBacillus subtilis</i>	Surfactine	Détachement	-	-	(Loiseau <i>et al.</i> , 2015)

5.3. Stratification métabolique du biofilm

A partir du moment où le biofilm prend une certaine épaisseur ou qu'il est assez mature, un gradient de substrats et de produits métaboliques se met en place. L'oxygène par exemple est le facteur le mieux étudié (Stewart et Franklin, 2008). Les profils de concentration en oxygène peuvent se mesurer de façon routinière (Stewart et Franklin, 2008). Ce gradient d'oxygène induit une stratification du biofilm qui peut être décomposé en trois zones, les zones aérobie, anaérobie facultative et anaérobie stricte. La zone oxiqne représente entre 10 à quelques centaines de microns d'épaisseur en fonction des souches et de la matrice produite (Stewart et Franklin, 2008). Au contraire de l'oxygène ou des nutriments, les produits métaboliques sont caractérisés par une forte concentration à l'intérieur du biofilm et une plus faible à l'extérieur. Il est raisonnable de penser que l'hétérogénéité chimique présente dans les biofilms est accompagnée d'une hétérogénéité physiologique (Xu *et al.*, 1998).

Des expériences ont été réalisées avec des populations mixtes, dans des eaux contenant naturellement de l'oxygène, du sulfate et du carbone. Dans les biofilms formés, se développent des bactéries hétérotrophes aérobies, des bactéries sulfato-réductrices (SRB) et des bactéries

oxydant les sulfites. L'hypothèse est la suivante : la couche supérieure du biofilm contient les hétérotrophes aérobies qui consomment l'oxygène, et dans les couches anoxiques sont retrouvées les SRBs qui produisent le sulfite d'hydrogène à partir du sulfate, puis les bactéries qui recyclent le sulfite en sulfate (Stewart et Franklin, 2008) (Figure 25). La juxtaposition de ces groupes de microorganismes doit faciliter les interactions de type commensaliste et mutualiste. Or, dans différentes études, il a été observé que les bactéries ne se développaient pas forcément en couches fines. En effet, les différentes espèces peuvent être entremêlées ou présentes dans des poches clonales dispersées à travers le biofilm. Par exemple, les SRBs sont trouvées non seulement dans les profondeurs anaérobies du biofilm mais également dans les zones d'oxydation des sulfites et dans la couche aérobie (Ramsing *et al.*, 1993; Schramm *et al.*, 1996; Okabe, Itoh, *et al.*, 1999; Okabe, Satoh, *et al.*, 1999). Des expériences similaires ont mis en évidence les mêmes résultats avec d'autres groupes de microorganismes.

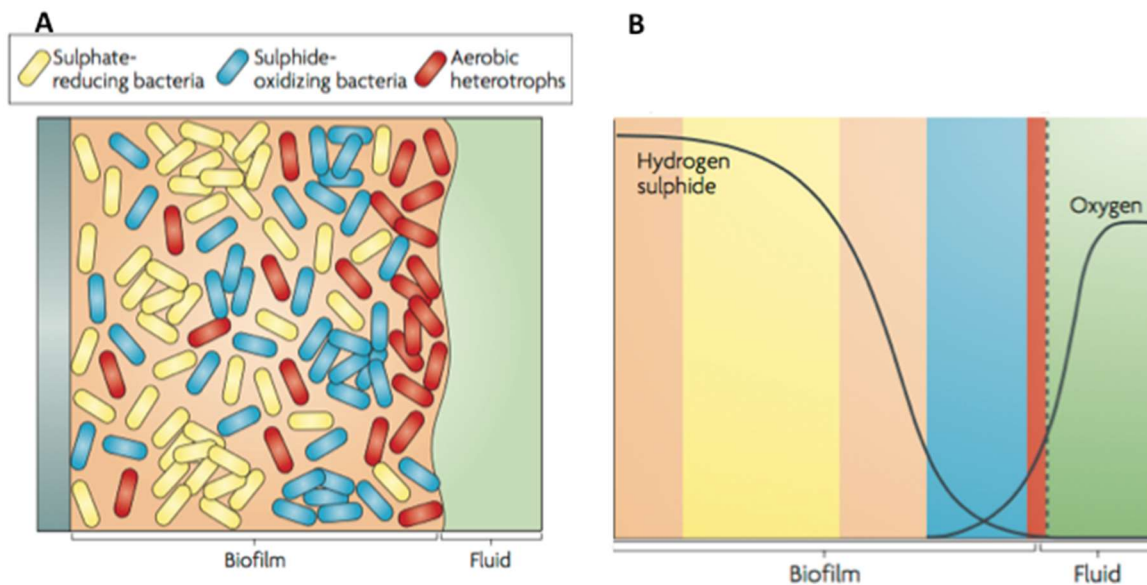


Figure 25 : Hétérogénéité physiologique au sein d'un biofilm multi-spécifique. Trois groupes de microorganismes sont distribués au sein du biofilm. A-Schéma des microenvironnements au sein de ces biofilms. B- Zones théoriques de disponibilité en oxygène (rouge), d'oxydation des sulfites (bleue) et de réduction des sulfates (jaune), les courbes noires décrivent le profil de concentration de l'oxygène et du sulfite d'hydrogène (Stewart et Franklin, 2008).

En théorie, l'organisation en strates devrait être similaire à celle des sédiments : de la surface vers les profondeurs, les bactéries métabolisant l'oxygène sont suivies par celles métabolisant l'azote, puis le soufre et enfin le méthane. Même si l'organisation est plus ou moins respectée dans les biofilms matures, celle-ci n'est pas toujours observée.

II- Les protistes amiboïdes : agent secret de l'environnement marin, impacts écologiques, économiques et environnementaux

1. Spectre : phylogénie et diversité

Les amibes et protistes amiboïdes forment un groupe large et diversifié d'eucaryotes caractérisés généralement par différents types de pseudopodes. Ils représentent une part importante de la diversité eucaryotique. En 2007, il y avait plus de 15 000 espèces décrites (Adl *et al.*, 2007). Auparavant, ils étaient regroupés dans un macrotaxon nommé Sarcodina mais les études phylogénétiques moléculaires ont induit le démantèlement de ce groupe et ont placé la majorité des individus dans deux nouveaux groupes, les Amoebozoa et les Rhizaria, ainsi que quelques espèces dans le groupe des Heterolobozoa appartenant aux Excavata et, d'autres ont été dispatchés de façon indéfini parmi les super groupes des S.A.R. et des Opisthokontes (figure 26) (Pawlowski et Burki, 2009). Parmi le groupe des Rhizaria, les Foraminifères et les Radiolaires sont trouvés (Adl *et al.*, 2005). Ils peuvent être englobés dans les protistes amiboïdes puisqu'ils possèdent des pseudopodes et la plupart d'entre eux se nourrissent par phagocytose.

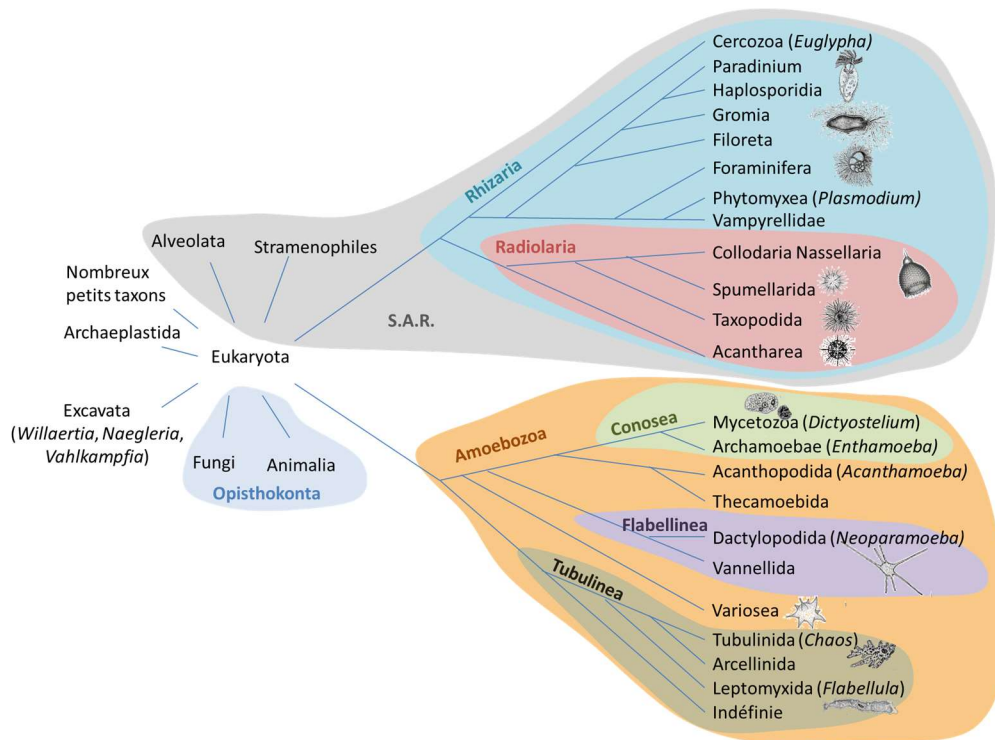


Figure 26 : Arbre phylogénétique représentant la dispersion des protistes amiboïdes au sein des eucaryotes et plus spécifiquement au sein des taxons Rhizaria et Amoebozoa, modifié d'après (Pawlowski et Burki, 2009)

Les récents programmes de recherche et larges campagnes océanographiques (Tara Oceans, Malaspina expeditions et Marine Microbial Eukaryotes Transcriptome Sequencing Projects – MMETSP) ont permis de séquencer une large distribution d'organismes de l'environnement marin. Ces résultats ont mis en évidence l'importance des protistes amiboïdes dans ces environnements. La campagne Tara Oceans a mis en évidence que la plupart de la biodiversité planctonique eucaryote au sein des groupes de protistes hétérotrophes pouvait généralement être considérée comme étant des brouteurs de bactéries. Il s'agit du second groupe le plus abondant après les organismes prokaryotes. Parmi eux, dans la zone photique, les Rhizaria représentent une classe importante et diversifiée dans toutes les gammes de taille du plancton et, à moindre degré, les Amoebozoa sont répandus dans le pico et nano plancton (de Vargas *et al.*, 2015). Les expéditions Malaspina, qui ont exploré la zone bathypélagique de l'océan, ont démontré que les Rhizaria étaient dominant et représentaient 35 % des pyrotags, tandis que les Amoebozoa représentaient 5 % des pyrotags (figure 27) (Pernice *et al.*, 2016).

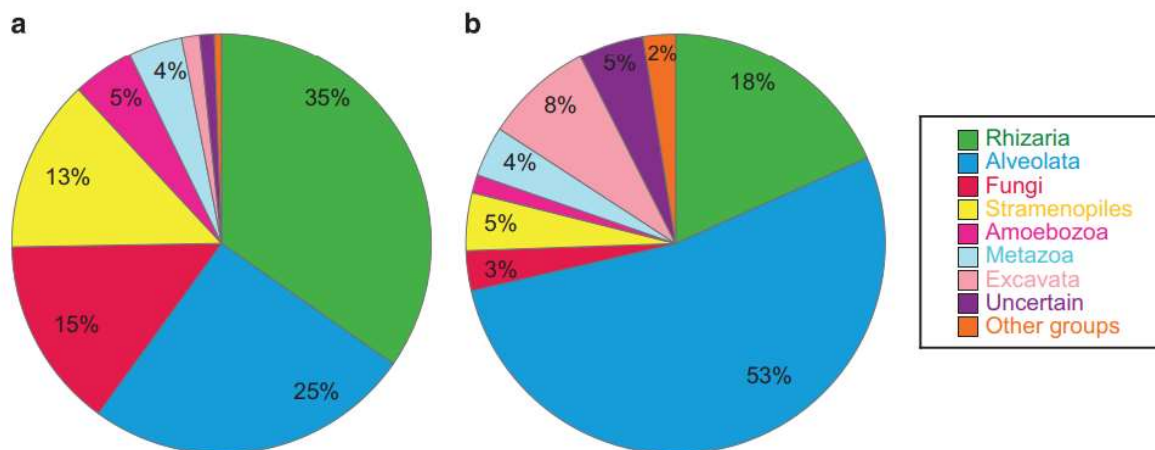


Figure 27 : Aperçu de la diversité microbienne eucaryotique en milieu profond au niveau des super-groupes taxonomiques. (a) Nombre de pyrotags par supergroupe, moyenne de l'abondance relative de chaque échantillon. (b) Nombre d'OTUs clustérisé à 97% de similarité par super-groupe (Pernice *et al.*, 2016).

Aujourd'hui pour les sédiments, il n'y a pas de grandes campagnes océanographiques qui aient exploré la diversité micro-eucaryotique en milieu marin. Dans de multiples études, différents auteurs ont mis en évidence l'abondance des Rhizaria, parmi eux les taxons des Acantharea et Vampyrellidae et les Polycystines qui sont réparties au sein des Radiolaria. Pour les Amoebozoa, les Tubulinea semblent dominer (Park *et al.*, 2008; Massana *et al.*, 2015; Forster *et al.*, 2016). Les énumérations microscopiques des protistes dans les sédiments marins ont permis de mettre en évidence la dominance des amibes en terme de biomasse dans différentes stations littorales (Lei *et al.*, 2014). Les différences qui ont été observées entre les énumérations et les techniques de séquençages peuvent être expliquées par le manque d'information

génétique et génomique concernant les protistes amiboïdes encore aujourd'hui (Piganeau *et al.*, 2011; Burki et Keeling, 2014; Keeling *et al.*, 2014). Par exemple, la famille des Vampyrellides, qui a été décrite il y a 150 ans, était considérée comme un petit groupe de Rhizaria occupant seulement les environnements non marins. Avec un séquençage environnemental massif, des centaines de milliers de séquences ont permis de mettre en évidence qu'ils représentent une proportion significative de la diversité eucaryotique dans les habitats marins (Berney *et al.*, 2013; Burki et Keeling, 2014). Par conséquent, la diversité des protistes amiboïdes pourrait encore être sous-estimée, en particulier en milieu marin alors que quelques-uns de leurs impacts écologiques, économiques et environnementaux ont déjà été décrits.

2. Au service secret de l'environnement : Cycles biogéochimiques

Aujourd'hui les protistes hétérotrophes représentent le second groupe en termes d'abondance dans l'océan ouvert après les procaryotes. Parmi eux, spécialement les Rhizaria représentent respectivement 33 % et 35 % du zooplancton dans les zones photiques et bathypélagiques (Biard *et al.*, 2016; Pernice *et al.*, 2016). Avec ces nouvelles données d'abondance, il est nécessaire de repenser entièrement les cycles marins du carbone et plus généralement l'ensemble des cycles biogéochimiques dans l'environnement marin (figure 28) (Worden *et al.*, 2015).

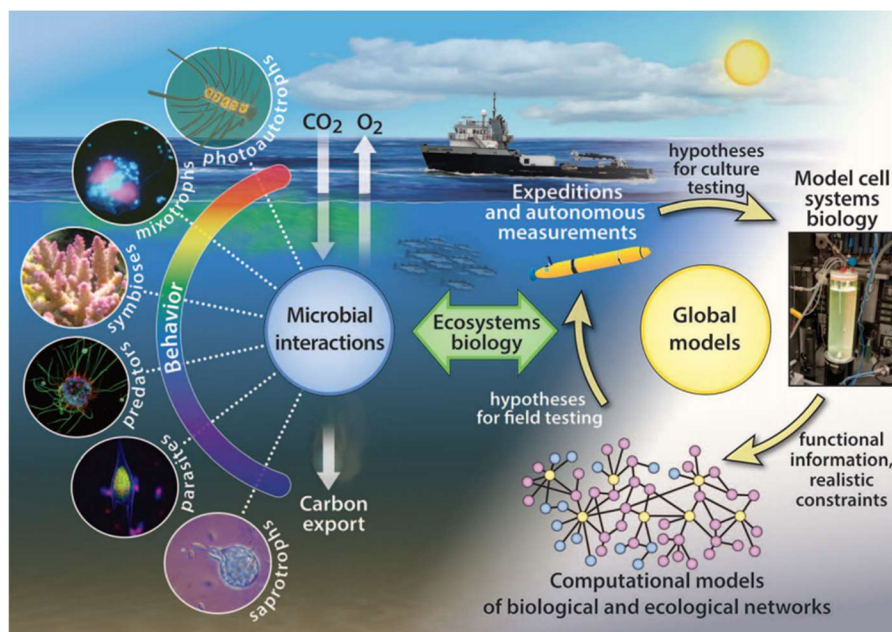


Figure 28 : Les modèles biogéochimiques et écologiques mondiaux reposent sur la compréhension de la biologie des organismes et des interactions qui se produisent dans les réseaux trophiques microbiens marins (selon Worden *et al.*, 2015).

Biard et collaborateurs ont estimé que les Rhizaria sur les premiers 200 m de la colonne d'eau de l'océan mondial représentaient un stock de 89.10^9 g de carbone, équivalent à 5,2 % du réservoir total de carbone biotique de l'océan (Biard *et al.*, 2016). Cette quantité est équivalente au contenu en carbone de tous les autres mesozooplancton (plancton compris entre 0,2 et 20 mm) et représente un important puits de carbone.

En mer de Chine, les Rhizaria représentent plus de la moitié du total de l'ADN détecté des eukaryotes microbiens. Les Rhizaria et Amoebozoa représentent respectivement 17,1 % et 10,5 % de la population eucaryotique microbienne active. Cette population active de Rhizaria augmente avec la profondeur tandis qu'elle reste stable pour les Amoebozoa (Xu *et al.*, 2017). Celles-ci pourraient également participer à la production primaire de carbone et à son export tout comme celle de la population des zones photiques. Jusqu'à aujourd'hui, les mesures de l'activité de re-minéralisation microbienne dans l'océan mésopélagique sombre (« dark ») restent supérieures aux entrées de carbone estimées.

De même, les foraminifères partagent avec les procaryotes la caractéristique singulière de pouvoir fixer l'azote de l'environnement (en nitrate) et de le faire retourner à l'atmosphère sous forme gazeuse (N_2) (Burki et Keeling, 2014). Par conséquent, ils peuvent également participer au cycle biogéochimique de l'azote dans l'environnement marin.

Une partie des protistes amiboïdes possèdent une thèque ou un squelette minéral formé d'opale (SiO_2), de célestine ($SrSO_4$) ou de calcite ($CaCO_3$) (Nikolaev *et al.*, 2005; Caron, 2016). Ces théques contiennent différents éléments comme le carbone, le calcium, la silice et le strontium. Avec la mort de ces organismes, leur sédimentation dans l'océan profond représente un piège pour ces squelettes minéraux et par conséquent pour le CO_2 atmosphérique. Il s'agit donc d'un agent fondamental de protection contre le réchauffement climatique.

3. Bons baisers de la mer : Qualité de l'eau et paléoclimatologie

Les foraminifères benthiques et amibes possédant une thèque sont des bio-indicateurs communs utilisés pour évaluer la qualité présente ou passée des écosystèmes marins (Pawlowski *et al.*, 2016). Les foraminifères sont considérés comme de meilleurs bio-indicateurs de la qualité de l'écosystème ou de la pollution comparé à la macrofaune et ils permettent d'utiliser de plus faible quantité de sédiments (Mojtahid *et al.*, 2008; Denoyelle *et al.*, 2010). Les foraminifères sont utilisés pour surveiller différents types de pollution : organiques, pétroles, piscicultures, métaux lourds (Bergin *et al.*, 2006; Mojtahid *et al.*, 2008; Denoyelle *et al.*, 2010; Vidović *et al.*, 2014). La composition et la structure des protozoaires hétérotrophiques dans

l'environnement marin permet d'enregistrer l'impact de la pollution et l'influence des activités humaines sur la qualité biologique de l'environnement marin (Pawlowski *et al.*, 2016). Les Amoebozoa sont également connus pour être plus abondants près de fermes piscicoles (Crosbie *et al.*, 2005) et utilisés comme bioindicateurs des changements climatiques passés, grâce à leur squelette minéral qui se conserve dans les sédiments (figure 29)(Bobrov *et al.*, 2004). Payne a listé sept raisons pour lesquelles les protistes sont de bon bio-indicateurs. Ils sont sensibles aux variations de l'environnement. Ils ont donc une importance fonctionnelle et une distribution généralisée avec une petite taille et une forte abondance. Ils ont un court temps de réponse, ils restent facile à analyser et ont un potentiel de préservation dans les sédiments (Payne, 2013).

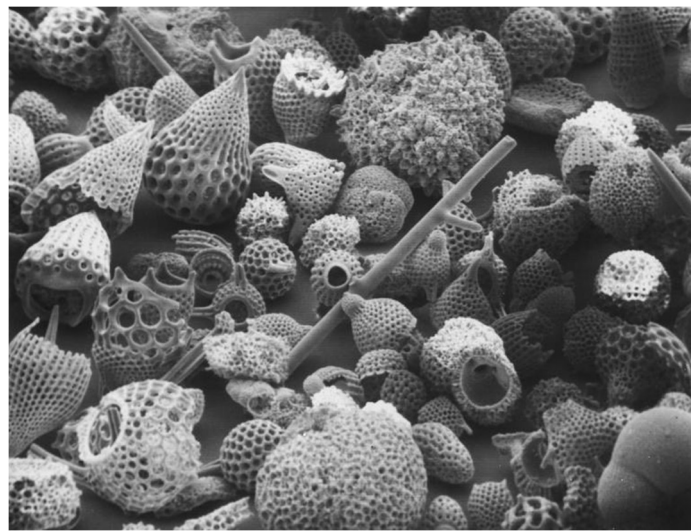


Figure 29 : Squelettes de radiolaire, foraminifères et spores d'éponges fossilisés issus de l'océan Indien occidental profond - Moyen Eocène (45 millions d'années). Photographiés à l'aide d'un microscope électronique à balayage avec un grossissement de 200X. Image réalisée par le Scripps Institution of Oceanography.

Les analyses des protistes amiboïdes représentent une carte postale issue d'un environnement spécifique à un temps donné. De plus, ils peuvent être utilisés pour examiner des environnements extrêmes tels que les canyons marins profonds (Guardiola *et al.*, 2015). L'utilisation des protistes comme bio-indicateurs reste ralentie par la difficulté de leur identification. Aujourd'hui, l'observation microscopique est encore l'approche principalement utilisée pour distinguer ces protistes (Pawlowski *et al.*, 2016). Avec une augmentation générale de l'effort de séquençage des protozoaires, l'utilisation du metabarcoding devrait permettre l'accès à la diversité des protistes dans un environnement et d'effectuer son bio-monitoring.

4. Dangereusement votre : Pathogénie des amibes marines

Les Amoebozoa sont connues pour être plus abondants près des fermes piscicoles (Crosbie *et al.*, 2005). Bien que les protozoaires hétérotrophiques sont une source important de nourriture

directement ou indirectement pour tous les poissons et fermes piscicoles à travers le monde, une partie de ces organismes sont pathogènes et peuvent avoir un impact important sur la survie des organismes marins, en particulier les organismes d'intérêt industriel, allant jusqu'à annihiler la viabilité économique des projets industriels. La première maladie des branchies amoébozoïque (Amoebozoic Gill Disease, AGD) a été reportée dans le sud-est de la Tasmanie en 1986 et elle a affecté à la fois la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et le saumon *Salmo salar* (Young *et al.*, 2008). Rapidement, les cas d'AGDs se sont transmis aux autres fermes autour du monde et ont affecté une large variété d'espèces de poissons (figure 30) (Johnson-Mackinnon *et al.*, 2016; Oldham *et al.*, 2016)

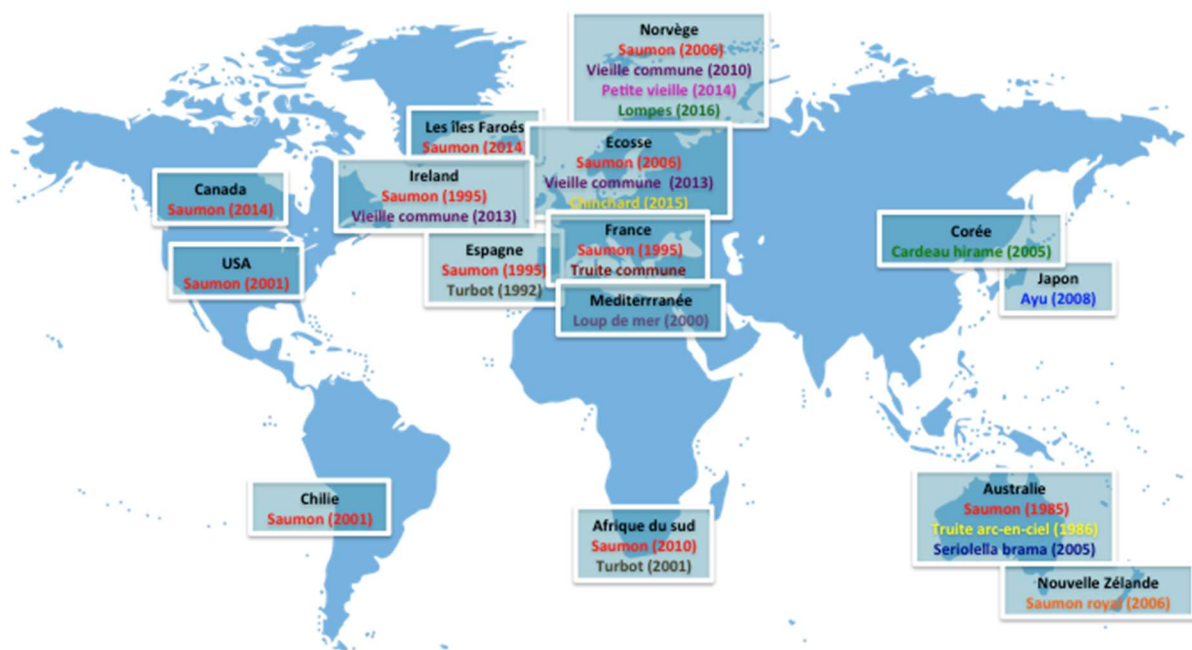


Figure 30 : Distribution spécifique et géographique des cas d'AGD autour du monde (modifié à partir de Johnson-Mackinnon, Oldham et Nowak 2016; Oldham, Rodger et Nowak 2016)

Par la suite, l'Afrique du sud et l'Espagne ont arrêté la production de saumon issue des fermes piscicoles ainsi que celle du Turbot pour l'Afrique du sud (Johnson-Mackinnon *et al.*, 2016). En 2015, 6,7 à 60 % de mortalité a été observée sur différentes espèces de poissons issues de fermes sur la côte sud-coréenne (Kim *et al.*, 2017). En Tasmanie, les AGDs représentent 14% du coût de production totale pour les fermes de saumon. Il s'agit d'une charge économique substantielle en termes de main d'œuvre et d'infrastructure (Adams et Nowak, 2001). L'Amoébozoa *Neoparamoeba perurans* a été identifiée comme le principal responsable des AGDs chez le saumon (Young *et al.*, 2008). Bermingham et Mulcahy ont suggéré que d'autres amibes pouvaient être impliquées dans les AGDs durant les cas épidémiques et ils ont isolé d'autres genres qui seraient potentiellement associés à cette maladie comme *Platyamoeba*,

Mayorella, *Vexillifera*, *Flabellula* and *Nolandella* (Bermingham et Mulcahy, 2007). Les traitements contre les AGDs restent coûteux, difficiles à mettre en place et posent des problèmes écologiques. Différents traitements à base d'antibiotiques ont été utilisés avec succès comme l'oxytétracycline et le chloramphénicol. Aujourd'hui, l'utilisation du chloramphénicol n'est plus autorisée lorsqu'il est associé à des produits destinés à l'alimentation (Paperna, 1977; Goodwin *et al.*, 2005). De plus, le relargage de grandes quantités d'antibiotiques dans l'environnement pose un réel problème écologique. Un autre traitement contre les AGDs qui reste le plus utilisé actuellement repose sur un bain d'eau douce avec ou sans ajout de Lévamisol, un nématodicide, mais sa mise en place reste difficile, puisque chaque poisson doit être traité dans un bain d'eau douce durant plusieurs heures avant de retourner dans sa cage (Clark et Nowak, 1999). Durant les AGDs, dans les fermes d'eau de mer contenant des saumons atlantiques en Norvège, le ratio de mortalité sans traitement peut aller jusqu'à 82 % (Steinum *et al.*, 2008). Les maladies amobozoaires ne touchent pas uniquement l'industrie du poisson mais d'autres denrées alimentaires d'origine marine sont infectées par les protistes amiboïdes.

En 1979, la première description de maladie amobozaire chez l'huitre est reportée par Chun (Chun, 1979). Ce parasite nommé *Marteiliodes chungmuensis* appartient au groupe des Rhizaria. C'est un des pathogènes majeurs de l'huitre creuse originaire du Pacifique *Crassostrea gigas*, le bivalve le plus cultivé dans le monde (4 millions de tonnes métriques par an (FAO, 2000)). Celui-ci infecte le compartiment ovarien, dans lequel il est capable de croître. Récemment, de nouveaux protistes amiboïdes appartenant aux Amoebozoa ont été découverts dans les huitres issues du Brésil. Ces amibes parasites (ordre : Dactylopodida) infectent les ovaires et oocytes de l'huitre de la même façon que *M. chungmuensis*. Aujourd'hui, l'infection à *Marteiliodes* a également été mise à jours chez la palourde, mais il n'y a pas de symptôme pathologique remarquable (Yanin *et al.*, 2013). De même, les infections à *Paramoeba* sont apparues chez des populations d'oursins induisant des mortalités massives (Scheibling et Hennigar, 1997). Cependant, il ne faut pas omettre qu'une partie de ces infections pourrait être due à l'association de protistes amiboïdes avec des bactéries possédant un caractère pathogène.

5. Permis de tuer : Prédation

Aujourd'hui, il est établi que la lyse par les virus et la prédation par les protistes hétérotrophes sont les deux processus principaux impliqués dans la consommation de la biomasse microbienne, ce qui équivaut approximativement à la production bactérienne (Pernthaler, 2005). Les nouvelles études sur l'abondance des protistes amiboïdes suggèrent un rôle important de ceux-ci dans le contrôle de la population procaryotique dans les écosystèmes

marins. Les protistes amiboïdes peuvent être définis comme des tueurs professionnels de populations procaryotiques, parce qu'ils survivent et se développent en les consommant (figure 31).

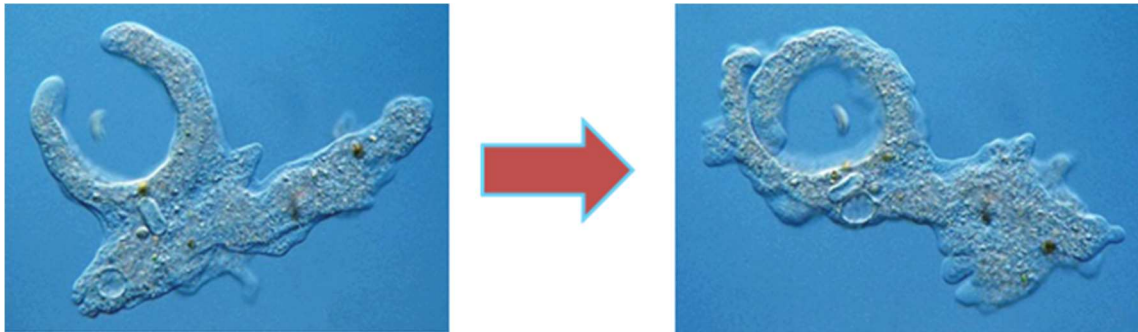


Figure 31 : Phagocytose d'une bactérie par une amibe

Aujourd'hui, les impacts généraux des protistes amiboïdes sur la population procaryotique sont peu compris. Cependant quelques récentes études ont examiné le broutage général des hétérotrophes dans différents écosystèmes. En mer Méditerranée, la consommation des bactéries par le microzooplancton, dans les couches mésopélagiques et bathypélagiques, est le modèle majeur de transfert de carbone organique, directement ou indirectement au travers du nanoplancton (Zoccarato *et al.*, 2016). Dans les mêmes profondeurs, en Antartique et Atlantique, le broutage par les protistes soustrait entre $3,79 \text{ \%} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ et $31,14 \text{ \%} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ du stock de procaryotes (Rocke *et al.*, 2015). En mer Méditerranée, un environnement oligotrophique, le broutage par les protistes phagotrophiques élimine $31,3 \text{ \%} \cdot \text{j}^{-1}$ du stock de procaryotes à 40 m dans la zone euphotique tandis qu'en zone bathypélagique, le broutage détruit entre $0,49$ et $9,77 \text{ \%} \cdot \text{j}^{-1}$ et à 3540 m, où une chémocline existe, la consommation par les protistes fait diminuer de $19,9 \text{ \%} \cdot \text{j}^{-1}$ l'abondance procaryotique (Pachiadaki *et al.*, 2014). Pour finir, dans les zones estuariennes, le broutage par le microzooplancton induit la consommation de 70 % de la production procaryotique et 83 % de la production phytoplanctonique (Ortell et Ortmann, 2014).

Ces études dans différentes mers, océans et profondeurs suggèrent un impact significatif du broutage par les protistes hétérotrophiques sur la population procaryotique. Avec l'inévitable réchauffement climatique, une prédiction a mis en évidence qu'un réchauffement de 1°C de l'océan aurait pour résultat à l'échelle globale une augmentation de la biomasse du procario-plancton jusqu'à 29 % (Morán *et al.*, 2017). De plus, il a été établi qu'une augmentation de température induirait une diminution de la lyse virale, qui est connue pour être dominante en période hivernale, et une augmentation du broutage par les protozoaires, aujourd'hui dominant

en période estivale (Sarmiento *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2015). Cette augmentation serait directement corrélée avec l'augmentation de la population procaryotique et pourrait être dû à l'augmentation du taux de rencontre entre brouteurs et proies (Sarmiento *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2015). Par conséquent, le rôle des protistes hétérotrophes dans le contrôle de la population procaryotique va augmenter avec le temps et le réchauffement climatique. Aujourd'hui, il n'y a aucune étude qui différencie l'impact de chaque population et spécialement des protistes amiboïdes dans la prédation globale des communautés microbiennes, mais il peut être supposé, du fait de leur importante abondance dans le milieu marin, que le rôle des Rhizaria et Amoebozoa dans ce phénomène est large. Quelques auteurs ont tout de même analysés le broutage de certaines souches ou espèces contre les bactéries en condition planctonique ou de biofilm. Ainsi, *Minorisa minuta*, un flagellé hétérotrophe appartenant aux Rhizaria, qui a une distribution planctonique mondiale, peut représenter jusqu'à 5 % de la communauté des protistes hétérotrophes dans les eaux côtières, et son taux de broutage s'élève à 7 bactéries.flagellé⁻¹.h⁻¹ sur les bactéries planctoniques naturelles (del Campo *et al.*, 2013). Dans les écosystèmes biofilms de mangrove, les flagellés hétérotrophes et amibes sont les deux groupes les plus importants de protozoaires avec respectivement 2,7.10⁻³ g⁻¹ de biofilm sec et 7,7.10⁻³ g⁻¹ tandis que les bactéries représentent 6,9.10⁻⁹ g⁻¹ de poids sec. Il est évalué que les amibes sont capables d'éliminer 0,3 % du stock de bactéries par jour et les flagellés hétérotrophes, 2,5 % (Maybruck et Rogerson, 2004). Dans un autre type de biofilm marin, les agrégats de neige marine, le taux d'ingestion par les flagellés est évalué à 15 flagellé⁻¹.h⁻¹ (Kjørboe *et al.*, 2003). La formation des biofilms bactériens est connue comme un mécanisme de protection contre le broutage par les protistes amiboïdes (Matz et Kjelleberg, 2005) mais les résultats ou les opinions sur ce sujet nécessiterait une clarification par des investigations plus poussées. En effet dans la plupart des études ou le biofilm offre une meilleure résistance contre le broutage, la formation de biofilm est corrélée avec la sécrétion de molécules antiprotozoaire liées ou non au quorum sensing (Matz, Webb, *et al.*, 2008; Chavez-Dozal *et al.*, 2013). Dans les milieux d'eaux douces ou marins, *A. castellanii* appartenant aux Amoebozoa a clairement la capacité de brouter des biofilms mixtes, normalement connus comme étant plus résistants aux conditions environnementales drastiques (Huws *et al.*, 2005). Cependant, les protistes amiboïdes comme d'autres protistes ont des préférences en termes de nourriture. Une partie de ces microorganismes est plus habiles pour brouter sur des surfaces tandis qu'une autre partie est plus adaptée pour l'ingurgitation de bactéries en suspension. Les biofilms restent naturellement une source importante de nourriture pour une partie des amibes. Il est probable comme le suggère Cram et collaborateurs (Cram *et al.*, 2016) que certaines bactéries des

biofilms qui étaient confrontées naturellement au broutage, aient développé des mécanismes d'échappement à la prédation. Ces mécanismes restent peu étudiés dans le contexte marin. En réalité, seuls les mécanismes d'échappement des pathogènes pour l'homme sont aujourd'hui bien étudiés.

6. Meurt un autre jour : Echappement à la prédation et sélection de pathogènes

La prédation par les protozoaires a un effet significatif dans le contrôle de la population bactérienne en environnement marin. Cependant, toutes les bactéries ne sont pas une bonne source de nourriture. Par exemple, les protistes amiboïdes peuvent agir comme un cheval de Troie pour les bactéries et pour la sélection de pathogènes dans l'environnement (Barker et Brown, 1994). Les protistes amiboïdes peuvent également établir des relations à plus longs termes comme les symbioses, où chacun des partenaires est favorisé (Barker et Brown, 1994). Différentes bactéries sont capables de résister à l'invagination ou à la digestion. Matz et Kjelleberg ont divisé ces mécanismes d'échappement selon s'ils s'effectuent avant ou après l'ingestion par les protozoaires (figure 32) (Matz et Kjelleberg, 2005).

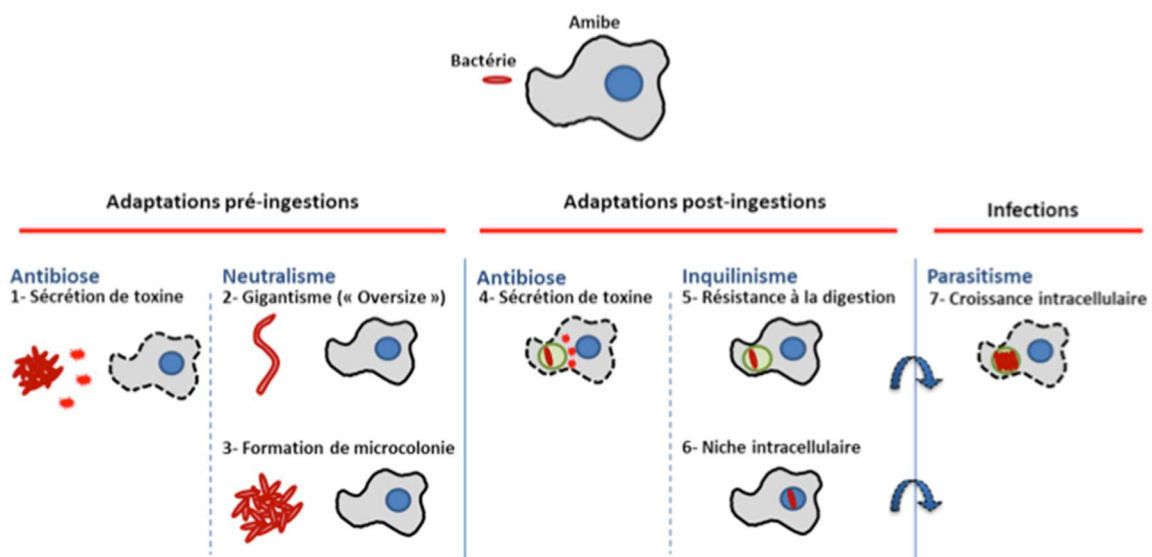


Figure 32 : Différentes voies potentielles empruntées par les bactéries contre la prédation par les protozoaires observés en environnement marin

Beaucoup d'entre elles sont décrites dans les environnements marins même si les mécanismes ne sont pas encore clairement identifiés. Parmi les mécanismes précédant l'ingestion, la filamentation a été décrite comme pouvant représenter un avantage de survie pour les bactéries contre les prédateurs protistes dans beaucoup d'environnements (Justice *et al.*, 2008). Certains auteurs ont indiqué que les bactéries filamenteuses seraient rares en environnement marin (Pernthaler, 2005). Cependant, dans les communautés oligotrophiques naturelles de biofilms

méditerranéens, le ratio de bactéries filamenteuses est important en particulier durant les contaminations métalliques (Coclet, com. Pers.). Dans les fermes polynésiennes de crevettes, le broutage induit la formation de filaments chez *Ancalomicrobium* et leur développement (Bianchi, 1989). L'hypothèse serait que l'échappement à la phagocytose s'effectuerait grâce à la capacité à filamenter des bactéries entraînant une exclusion de taille. Un autre mécanisme d'adaptation précédant l'ingestion est la formation de microcolonies (Matz et Kjelleberg, 2005). Dans ces microcolonies, tout comme dans le biofilm, la communication bactérienne via « quorum sensing » peut s'effectuer le plus efficacement possible du fait de la concentration augmentée des molécules signal. De ce fait, les mécanismes de défense tels que le relargage coordonné de toxine peut permettre l'échappement à la prédation. La violacéine décrite comme un pigment violet produit par de nombreuses bactéries marines qui est souvent décrit comme étant sous le contrôle du Quorum sensing peut permettre aux bactéries de se défendre contre leurs principaux prédateurs. Cette toxine induit notamment un programme de mort cellulaire chez différents protozoaires dont *A. castellanii* (Matz, Webb, *et al.*, 2008). Les bactéries peuvent également utiliser la production de toxines après invagination. Par conséquent, en plus des mécanismes pré-ingestion, certaines bactéries ont développé des mécanismes intracellulaires pour échapper à la digestion et l'élimination au sein de leurs hôtes.

Suite à l'invagination de la bactérie dans l'amibe, les bactéries sont en général localisées dans un phagosome, qui fusionne ensuite avec des lysosomes. L'acidification du phago-lysosome est suivie par la digestion de son contenu. Ces étapes peuvent commencer très rapidement après l'entrée de la bactérie au sein des phagocytes professionnels que représentent ces protozoaires amibiens (Cosson et Soldati, 2008). Certaines bactéries capables d'échapper à la digestion peuvent utiliser deux types de stratégies une fois qu'elles sont à l'intérieur : stopper le processus de digestion en inhibant la fusion avec les lysosomes, ou trouver une niche protectrice à l'intérieur de la cellule. Durant les infections entre *Vibrio cholerae* et *A. castellanii*, en eau de mer artificiel, le pathogène entre dans le trophozoite par phagocytose et une grande partie de la population est digérée. Cependant tandis qu'une petite partie va résister au mécanisme de digestion et va ressortir intact par un mécanisme d'exocytose, une autre partie va résister au mécanisme de digestion et entrer dans les vacuoles contractiles (CVs) (figure 33) (Van der Henst *et al.*, 2016). Par conséquent, *V. cholerae* utilise deux mécanismes pour échapper à la prédation.

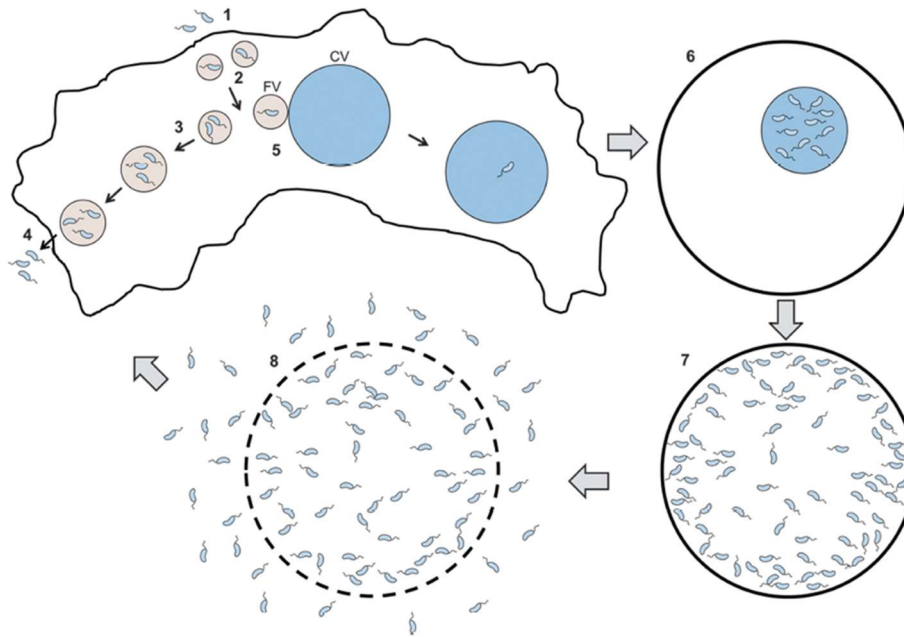


Figure 33 : Schéma résumant l'interaction entre *V. cholerae* et *A. castellanii*. Lors de la phagocytose des cellules libres de *V. cholerae* (1) par les trophozoïtes amibiens, les bactéries sont contenues dans des vacuoles endosomiales (2). La fusion des vacuoles endosomiales conduit à la génération de grandes vacuoles (3). *A. castellanii* relargue fréquemment la teneur en petites et grandes vacuoles, libérant ainsi des bactéries vivantes dans l'environnement (4). Parfois, les vacuoles endosomiales peuvent aussi fusionner avec les vacuoles contractiles (CVs) (5), ce qui permet aux bactéries d'établir une niche de réplcation. Lorsque les amibes contenant de tels CVs colonisés subissent un enkystement, les vacuoles digestives sont vidées mais *V. cholerae* reste dans la CV du kyste (6). *V. cholerae* prolifère dans cet environnement protecteur, conduisant finalement à une lyse de la CV dans le cytosol du kyste (7). Enfin, un affaiblissement de la paroi cellulaire du kyste se produit (8), conduisant à la libération de *V. cholerae* proliférante dans l'environnement (selon Van der Henst *et al.*, 2016).

Après l'entrée des bactéries, certaines d'entre elles sont capables de résister au processus d'acidification et d'être relarguées dans l'environnement marin. Il existe plusieurs voies de relargages des bactéries dans l'environnement. Ces vacuoles contenant les bactéries peuvent devenir des pelotes (ou vésicules) fécales, qui peuvent être sécrétées. Ces mécanismes sont décrits dans de nombreux environnements (Denoncourt *et al.*, 2014). Les vésicules peuvent avoir différentes formes en ayant par exemple une ou plusieurs membranes qui leur octroie une meilleure résistance aux conditions drastiques qu'elles peuvent rencontrer dans l'environnement (Berk *et al.*, 2008; Denoncourt *et al.*, 2014). De plus un trophozoïte peut générer de multiples vésicules et donc participer à la propagation des bactéries (notamment celles qui sont capables de réplcation intra-vésiculaire) dans l'environnement. Dans le cas de *V. cholerae* ayant envahi les CVs, celui-ci établit une niche de réplcation que l'amibe va maintenir tout au long de son processus d'enkystement. Une fois *A. castellanii* sous forme de kyste, *V. cholerae* va s'échapper dans le cytosol du kyste. La CV et le cytosol du kyste offre une niche protectrice pour la croissance du pathogène jusqu'à la lyse du kyste et le relargage des *V. cholerae* dans l'environnement (Van der Henst *et al.*, 2016).

Dans le cas des kystes, une nouvelle paroi se forme à partir du trophozoïte contenant la bactérie qui a préalablement commencé à se répliquer. Les parois des kystes ainsi que des pelotes fécales sont extrêmement résistantes aux conditions difficiles de l'environnement (dessiccation...) et à la désinfection (biocides, antibiotiques...), protégeant d'autant plus les bactéries (Berk *et al.*, 2008; Denoncourt *et al.*, 2014; Van der Henst *et al.*, 2016).

Les compartiments intracellulaires pouvant représenter une protection vis-à-vis de la digestion pour les bactéries varient. Il a par exemple été décrit une croissance des bactéries à l'intérieur du compartiment nucléaire de différents organismes (Schulz et Horn, 2015). Ces mécanismes d'échappement peuvent représenter un cheval de Troie pour des bactéries pathogènes pour l'homme ou d'autres organismes de l'environnement. La souche *Vibrio tsamaniensis* LGP32, impliquée dans des événements mortels massifs chez l'huître creuse *Crasostreas gigas*, résiste à la phagocytose de l'amibe et induit des altérations cellulaires qui sont conservées entre les protistes amiboïdes et les hémocytes d'huître (Poirier *et al.*, Unpublished). Similairement, durant les AGD, une co-occurrence de *N. pemaquidensis* avec certaines souches bactériennes a permis de soutenir l'hypothèse que les bactéries pourraient être des pathogènes opportunistes potentiels associés à ces maladies (Bowman et Nowak, 2004). Par conséquent, similairement au modèle bien décrit d'interaction entre amibes et *Legionella pneumophila*, qui s'est élargi depuis quelques années à différentes bactéries (Rowbotham, 1980; Molmeret *et al.*, 2005), l'environnement est donc le lieu de stratégies bactériennes d'échappement et donc de risques sanitaires et écologiques.

7. L'espion qui m'aimait : Interactions symbiotiques

Les mécanismes d'échappement à la digestion peuvent également aboutir à des relations à plus long terme, dites symbiotiques. Le terme symbiose a été défini par de Bary en 1879 comme la capacité de deux organismes à vivre ensemble (de Bary, 1879). Aujourd'hui la définition admise par la majorité des biologistes est une association entre différentes espèces à partir duquel l'ensemble des participants en retire un bénéfice. Il s'agit donc d'une relation mutualiste persistante (Douglas, 2010). Quelques-uns de ces organismes ingérés acquièrent la capacité de vivre et de se reproduire intracellulairement. Schulz et collaborateurs ont reporté deux nouvelles amibes nues sténohalines issues d'échantillons marins (une Vanenellidae et une appartenant à un nouveau taxon non identifié au sein des Amoebozoa) (Schulz *et al.*, 2015). Elles possèdent deux symbiotes avec différentes niches intracellulaires. Le symbiote affilié au genre *Nucleophilum* est localisé près du compartiment nucléaire dans l'espace périplasmique. Les bactéries capables d'envahir le compartiment nucléaire peuvent bénéficier

d'un environnement riche en nutriments, d'une protection contre la digestion ainsi que contre les mécanismes de défense cytoplasmique de l'hôte et d'un chemin direct de transmission horizontale des gènes entre bactéries et protistes amiboïdes durant la réplication de l'hôte (Schulz et Horn, 2015). L'autre symbionte *Occultobacter* peut se répliquer à l'intérieur de vacuoles dérivées de l'hôte ou occasionnellement être trouvé comme cellule solitaire à l'intérieur du cytoplasme (Schulz *et al.*, 2015).

Boîte 1 : Les bactéries intranucléolaires

En 1944, Harold Kirby a été le premier à décrire des microorganismes vivants au sein des noyaux du protozoaire zooflagellé *Trichonympha* qui vivait lui-même en temps que symbionte dans le tube digestif des termites (Kirby, 1944). Récemment, ces symbiontes ont été identifiés en tant que nouveaux genres et espèces nommés *Candidatus Nucleococcus trichonymphae* et *Candidatus Nucleococcus kirbyi* (Sato *et al.*, 2014). Des parasites intranucléaires ont également été identifiés chez des moules issues d'environnements profonds (Zielinski *et al.*, 2009) et quelques bactéries pathogènes comme *Burkholderia pseudomallei* (Vadivelu *et al.*, 2017) ou des bactéries intracellulaires obligatoires appartenants au genre *Rickettsia* (Burgdorfer *et al.*, 1968; Burgdorfer et Brinton, 1970; Urakami *et al.*, 1982) ont été décrites dans le nucléoplasme de cellules murines ou humaines.

De même, des bactéries appartenant au phylum des *Proteobacteria* ont été isolées durant des recherches sur les micro-organismes en milieu naturel résistants aux amibes. Ainsi deux souches nommées *Candidatus Berkiella aquae* et *Candidatus Berkiella cookevillensis* ont été isolées à partir d'amibes issues de biofilm. Ces deux souches infectent *Acanthamoeba polyphaga* et sont localisées dans le noyau (Mehari *et al.*, 2016). Aujourd'hui, très peu d'études ont été réalisées suite à la difficulté de récupérer ces bactéries bien souvent non cultivables. Cependant, quelques études d'infections ont permis de mettre en évidence la réinfection des compartiments nucléaires par ces bactéries chez *Hartmannella* sp. et *A. castellanii* (Schulz *et al.*, 2014) ou chez quelques *Paramecium* (Bella *et al.*, 2016).

Les bactéries de types *Holospora* sp. sont également capables d'infecter les noyaux de protozoaires appartenant aux *Paramecium* sp. de façon spécifique. Les paramécies ont la particularité de posséder deux noyaux ayant des caractéristiques différentes (le macronucléus et le micronucléus). Tandis que certaines souches ont infecté spécifiquement le micronucléus de ces organismes, d'autres ont infecté le macronucléus (Rautian et Wackerow-Kouzova, 2013). Ces interactions symbiotiques entre les paramécies et ces bactéries semblent potentiellement

influencées par la souche de l'hôte ainsi que celle de la bactérie mais également par la phase de croissance de l'hôte (Bella *et al.*, 2016). De plus, il a été mis en évidence que la plupart des souches d'*Holospira* sp. présentent un génome réduit qui les empêche de se répliquer en dehors de l'hôte (Fujishima et Kodama, 2012), ce qui pourrait indiquer une longue co-évolution qui a induit la perte de gènes par les *Holospira* sp.

Les études portant sur les mécanismes d'infection du compartiment nucléaire sont très rares. Dans le cas de *B. pseudomallei*, des bactéries majoritairement cytoplasmiques, quelques cellules dormantes sont trouvées dans les noyaux de cellules épithéliales humaines et murines. Après échappement à la digestion et multiplication à l'intérieur du cytoplasme, *B. pseudomallei* induit la formation d'une queue de comète d'actine qui permettrait l'entrée dans le compartiment nucléaire (Vadivelu *et al.*, 2017). Avec *Candidatus Nucleicultrix amoebiphila* retrouvé chez *Hartmannella* sp., les bactéries gagneraient le cytoplasme à partir d'endosomes ayant fusionné avec des lysosomes, afin de gagner le noyau au sein duquel ces bactéries sont capables de se multiplier (figure 34) (Schulz *et al.*, 2014).

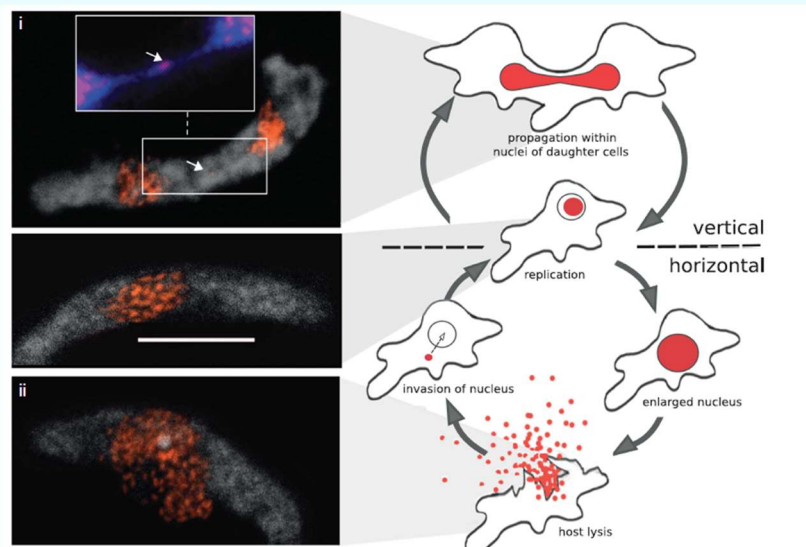


Figure 34 : Modes de transmission de *Candidatus Nucleicultrix amoebiphila*. Les événements clés pendant la transmission de *Nucleicultrix* dans *Hartmannella* sp. sont visualisés par FISH dans le panneau de gauche. Les bactéries et les amibes ont été marquées avec des sondes CBR125 (orange) et EUK516 (gris), respectivement. Un trophozoïte de *Hartmannella* est montré (i) dans lequel la distribution de *Nucleicultrix* entre les deux cellules filles peut être observée. Notez la cellule bactérienne unique (flèches) dans le noyau d'amibe en cours de ségrégation. La lyse des cellules hôtes (ii) survient rarement chez *Hartmannella* sp. ; barre, 10 mm. Le modèle du cycle de vie et de transmission de *Nucleicultrix* chez les amibes est schématisé dans le panneau de droite (Schulz *et al.*, 2014).

La localisation intranucléaire pourrait représenter la meilleure niche de protection pour l'établissement d'une symbiose ou d'un parasitisme au sein d'une cellule hôte, les bactéries étant protégées des processus cytoplasmiques tel que la digestion (Schulz et Horn, 2015). De plus,

les bactéries pourraient exploiter les ressources du noyaux et les différents processus qui s'y établissent, pour leur survie (Bierne et Cossart, 2012).

Les amibes possédant un squelette sont connu pour abriter des symbiontes d'algues vertes, qui fournissent des sous-produits de photosynthèse pour la nourriture et l'énergie de l'hôte et changent donc le modèle trophique de leur hôte en le faisant devenir mixotrophe (Grube *et al.*, 2016). Parmi les foraminifères, les symbiontes algales les plus connus sont les dinoflagellés (Anderson et Be, 1976; Gast et Caron, 2001). Similairement aux foraminifères, les symbiontes des radiolaires incluent des dinoflagellés mais également des cellules brunes pigmentées, probablement des prymnesiida et prasinomonades. Ces symbiontes algaux sont distribués périphériquement dans le réseau de pseudopodes ou d'axopodes cytoplasmiques durant la journée et plus proches des capsules centrales quand la nuit approche (Anderson, 2014). Récemment, des cyanobactéries appartenant aux *Synechococcus* ont été identifiées comme endosymbiontes des foraminifères planctoniques (Bird *et al.*, 2017), tandis que d'autres avaient auparavant été identifiées chez les foraminifères benthiques (Yuasa *et al.*, 2012). Par l'utilisation des technologies de séquençage au sein des Rhizaria sur l'expression de gènes spécifiques impliqués dans les processus symbiotiques, les domaines de la lectine de type c ont été trouvés dans des espèces connues comme ayant des symbiontes photosynthétiques et non dans celles n'en possédant pas (Balzano *et al.*, 2015). Le développement de ces techniques et les connaissances des gènes impliqués dans les processus symbiotiques pourraient permettre de sonder à grande échelle la distribution des symbiontes au sein des Rhizaria et des Amoebozoa dans les environnements terrestres et marins. Les études sur les relations entre organismes endosymbiotiques et protistes amiboïdes pourraient aider à une meilleure compréhension de l'évolution et du transfert de gènes au sein des différents organismes.

8. Opération biofilm : Protistes amiboïdes versus biofilm

Le mode de vie en biofilm est considéré comme étant un mécanisme adaptatif de défense contre les prédateurs, en particulier contre les brouteurs (Matz et Kjelleberg, 2005). La défense est même considérée comme étant une des quatre forces qui induit la formation de biofilm (figure 35). Il est connu pour offrir une résistance à la phagocytose et les phagocytes qui s'y attaquent font en général plus de mal aux tissus environnants qu'au biofilm lui-même (Jefferson, 2004).

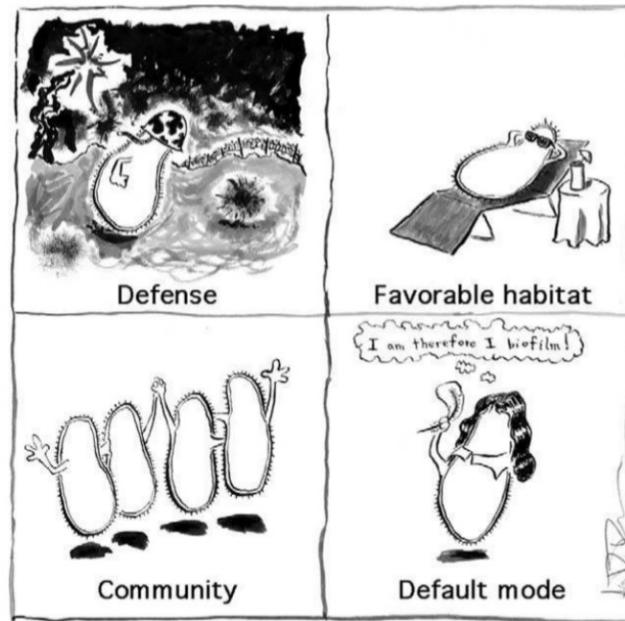


Figure 35 : Interpretation artistique du Dr Sean D. Taverna des quatre forces induisant la formation de biofilm, selon (Jefferson, 2004)

La consommation des bactéries en biofilm par des brouteurs a été tout de même évaluée dans différentes études. Ainsi, sur six espèces d'amibes marines nues benthiques appartenant au *Gymnamoebae*, il a été évalué que celles-ci pouvaient ingérer entre 0,2 et 194,7 bactérie.h⁻¹ correspondant à une biomasse comprise entre 0,16 et 155,8 μm^3 sur des biofilms de *Planococcus citreus* (Butler et Rogerson, 1997). Ces taux de consommation ont été évalués à 4 températures (5°C, 10°C, 15°C et 20°C) et les données mettent en évidence une augmentation du taux de consommation des bactéries par micromètre cube d'amibe avec la température (de 0,042 bactérie.h⁻¹. μm^{-3} à 5°C à 0,131 bactérie.h⁻¹. μm^{-3} à 20°C). Cela serait dû au fait que les cellules sont plus larges à faibles températures (Butler et Rogerson, 1997). De même, des résultats similaires ont été obtenus avec des amibes marines benthiques peu communes isolées en Mer de Clyde (Royaume Uni), sur des biofilms de *P. citreus*, montrant que les amibes les plus petites en terme de volume (57,3 μm^3) consomment 10 bactérie.h⁻¹ tandis que les plus volumineuses (61021 μm^3) consomment 1465 bactérie.h⁻¹ (Rogerson *et al.*, 1996). Ainsi les auteurs en déduisent que bien qu'il soit peu probable que la population d'amibes réticulées joue un rôle majeur dans l'élimination des bactéries des sédiments marins, les taux de consommation observés suggèrent que les protozoaires amiboïdes, en général, peuvent être des brouteurs importants dans cet habitat.

Lors de la consommation de biofilm de *Vibrio natriegens*, l'amibe nue *Vanella septentrionalis* sépare ses temps de broutage du biofilm de sa multiplication propre. Ainsi, celle-ci qui est

capable de consommer 60% des bactéries disponibles entre le 5^{ème} et le 15^{ème} jours d'incubation, consomme des bactéries tant qu'elles seront disponibles ou tant qu'il n'est plus possible d'en ingurgiter davantage, avant d'entrer en division. Par conséquent, elle croît relativement rapidement en biomasse ou biovolume mais peu en terme quantitatif dans une culture avec un approvisionnement limité en nourriture (Zubkov et Sleight, 1999). De plus, le mécanisme de broutage par *Vanella* sur les bactéries adhérees est admirablement adapté à cet effet. L'amibe s'accroche à la surface, avance lentement et utilise ses lobopodes d'abord pour détacher les bactéries attachées à la surface, puis elle passe dessous à l'aide de sa cape hyaline (figure 36) (excroissance très fine de la cellule), et enfin elle ingère sa proie dans la partie postérieure granulée de la cellule (Zubkov et Sleight, 1999). Ainsi, certains protistes amiboïdes sont plus efficaces dans le broutage sur cellules adhérees tandis que d'autres le seront plus sur les cellules planctoniques.

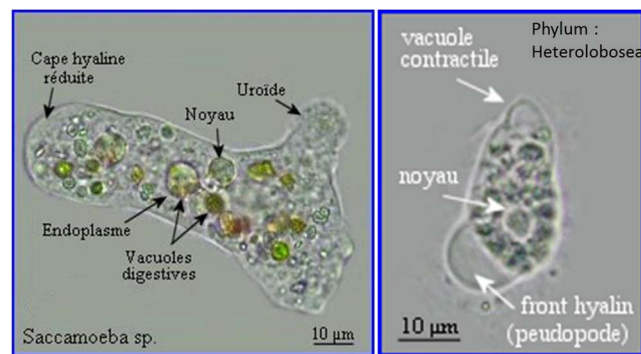


Figure 36 : Exemple d'organisation cellulaire de deux amibes nues différentes

Certains protistes amiboïdes comme les foraminifères benthiques sont également capables de récolter les bactéries sur des surfaces importantes. Ainsi, *Allogromia* sp. et *Allogromia laticollaris*, deux espèces de foraminifère sont capables de supprimer respectivement 50 % et 80% de la surface d'un biofilm mixte issu d'isolat naturel tandis que les foraminifères calcaires et agglutinés n'ont pas présenté de comportement de prédation envers ces biofilms (Bernhard et Browser, 1992). De plus, ces foraminifères ont utilisé une stratégie de prédation similaire aux *Vanella*. A l'aide de leurs reticulopodes, ils peuvent exercer une tension sur le biofilm afin d'en décrocher des morceaux à partir du substrat, ensuite les parcelles de biofilms sont transportées extracellulairement le long de ces pseudopodes jusqu'à la région apertural où ils s'accumulent et sont ensuite potentiellement phagocytés (Bernhard et Browser, 1992).

Dans le milieu marin, quelques autres données sont disponibles sur la prédation des flagellés et amibes envers certains types de biofilm particulier. Ainsi, le taux d'ingestion est évalué à 15 flagellé⁻¹.h⁻¹ dans les agrégats de neige marine (Kjørboe *et al.*, 2003). Dans les écosystèmes

« biofilm » de type mangrove, les flagellés hétérotrophes et les amibes sont les deux groupes les plus présents et il a été évalué que les amibes peuvent retirer 0,3% du stock de bactéries par jours et les flagellés hétérotrophes 2,5% (Maybruck et Rogerson, 2004).

Parallèlement au broutage, l'association étroite des protistes amiboïdes et des bactéries en biofilm ainsi que leur longue histoire co-évolutive a donné lieu à une série de mécanisme d'adaptation bactérienne assurant la survie et la coexistence au sein des biofilms (Matz et Kjelleberg, 2005). Par exemple, certaines bactéries marines sont capables de produire des composés antiprotozoaires comme la violacéine, qui est principalement produite en mode de vie « biofilm » par l'intermédiaire du quorum sensing. Cette toxine présente une action antiprotozoaire à large spectre contre des flagellés, des ciliés mais également contre des amibes comme *Acanthamoeba castellanii* et *A. polyphaga* (Matz, Webb, *et al.*, 2008). De même, certaines souches de *Vibrio fischeri* isolées dans l'environnement marin, contrairement à celles isolées dans leurs hôtes symbiotiques (deux genres de calamar : *Eupryma* et *Sepiola*) présentent une activité antiprotozoaire contre des flagellés et des ciliés. Cette activité semble plus importante sur les biofilms plus tardifs. Celle-ci qui pourrait provenir de la synthèse de composés lytiques potentiellement par l'intermédiaire du quorum sensing, pourrait induire l'inactivation du prédateur (Chavez-Dozal *et al.*, 2013). Les souches de *Vibrio cholerae* qui forment un biofilm sur une surface de chitine et utilisent cette dernière comme seule source de carbone, sont capables de produire des facteurs antiprotozoaires contre des flagellés. Ces facteurs sont plus efficaces et semblent être produit en plus grande quantité chez les *V. cholerae* ayant un système de quorum sensing fonctionnelle (Matz *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2015).

Dans les milieux d'eau douce, les biofilms de *Serratia marcescens* tardifs différenciés présentent un système distinct de résistance contre le broutage par *A. polyphaga* qui reste sous le contrôle du quorum sensing. Ce biofilm tardif forme des structures filamenteuses ou chaînes de cellules, qui sont dépendantes de la présence d'un système de quorum sensing fonctionnel. Quand *A. polyphaga* est introduit à l'intérieur de ces biofilms, celle-ci ne colonise que peu le biofilm de *S. marcescens* contrairement aux mutants du quorum sensing qui ne sont pas capables de former ces structures (Queck *et al.*, 2006). Les auteurs émettent l'hypothèse que la différence de broutage serait soit due à une diminution d'accès aux substrats pour les amibes du fait de la présence de ces structures, soit à une exclusion de taille de ces bactéries par les amibes. Aujourd'hui, il n'y a pas de données sur les biofilms multi-spécifiques contre le broutage, mais de même que pour la résistance aux agents antimicrobiens, il peut être supposé

qu'un consortium de souches soit capable de partager leurs résistances vis-vis des amibes avec d'autres au sein d'un biofilm multi-spécifique.

III- Objectifs du travail de thèse

La première étape de ce travail de thèse a été de choisir un panel de souches à étudier. Ce panel a été choisi au sein de la collection de Toulon. Il s'agit de souches isolées sur différentes surfaces dans la rade de Toulon et caractérisées selon leurs capacités d'adhésion et de formation de biofilm (Camps *et al.*, 2011; Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Parmi les souches isolées, certaines appartiennent au groupe des γ -*Proteobacteria*, tels que *Shewanella* et *Pseudoalteromonas*, groupes décrits comme correspondant aux colonisateurs primaires de biofilms en environnement marin, d'autres font partie des souches moins souvent décrites dans ces écosystèmes telles que *Polaribacter* sp. et *Persicivirga mediterranea* (Dang et Lovell, 2000, 2002; Webster *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Huggett *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 2010). Durant ce travail nous avons donc choisi de travailler avec des souches représentant à la fois les taxons fréquemment retrouvés dans les biofilms ainsi que celles plus exotiques présentant des phénotypes particuliers et différents des *Pseudoalteromonas* ou *Shewanella* (Brian-Jaisson *et al.*, 2014) (tableau 6).

Tableau 6 : Présentation des souches bactériennes utilisées dans cette étude et caractéristiques de celles-ci ; adapté de (Brian-Jaisson *et al.*, 2014)

Souche	désignation putative	Classe	Gram	Motilité			Adhésion au solvant < 40%		Formation de biofilm (BFRT)
				Swimming	Swarming	Twitching	Polaire	Apolaire	
TC4	<i>Persicivirga mediterranea</i>	<i>Flavobacteria</i>	negatif				+		24h
TC5	<i>Polaribacter</i> sp.	<i>Flavobacteria</i>	negatif				+	+	
TC8	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	negatif	+	+		+		24h
TC9	<i>Shewanella</i> sp.	γ - <i>Proteobacteria</i>	negatif		+		+		24h
TC10	<i>Shewanella</i> sp.	γ - <i>Proteobacteria</i>	negatif	+		+	+		48h
TC11	<i>Shewanella</i> sp.	γ - <i>Proteobacteria</i>	negatif	+	+	+	+		24h
TC14	<i>Pseudoalteromonas ulvae</i>	γ - <i>Proteobacteria</i>	negatif	+		+	+		24h

Sur la base de ces différences phénotypiques qui ont été confirmées par la suite (El-Kirat-Chatel *et al.*, 2017; Favre *et al.*, 2017), nous avons donc entrepris de mettre au point des biofilms multi-spécifiques voire multi-organismes en nous demandant si certaines de ces souches pourraient tirer avantage par rapport aux autres des interactions en biofilm mixte ou si elles arriveraient chacune à trouver le moyen de coexister au sein du biofilm.

1. Etude de la formation de biofilms multi-spécifiques

La première étape a été de caractériser plus précisément les différents modèles de formation de biofilm de ces souches afin de choisir quatre souches qui serviraient à établir un biofilm multi-spécifique. Ces caractérisations ont été réalisées en grande partie par l'utilisation de la microscopie à balayage laser confocal (CLSM). Il s'agit d'un appareil qui est arrivé au laboratoire MAPIEM au cours de ma thèse. J'ai donc été le premier à me familiariser avec cet appareil et donc à le maîtriser. Puis, afin de me familiariser avec la technique des Flowcell et de la mettre en place au laboratoire, je suis partie au LBCM à Lorient, ce qui m'a également permis de parfaire mon apprentissage du CLSM notamment en terme de détermination des visualisations 3D et du calcul des biovolumes, me permettant ainsi d'étudier la formation de biofilm en condition dynamique. Afin de réaliser les modèles de biofilm multi-spécifique, les différentes souches bactériennes ont dû être marquées avec différents fluorochromes. Un grand nombre de protocoles de transformation et de conjugaison ont été testés sur le panel de souche choisi avec une post-doctorante Aurore Puymège afin de leur ajouter un gène exprimant une protéine fluorescente. Seule une souche a pu être transformée par le plasmide pX5-GFP. Il a donc été choisi d'utiliser l'immunomarquage afin d'obtenir des anticorps spécifiques des autres souches bactériennes dans l'objectif de réaliser les multimarquages de biofilm mixte.

L'objectif était de comprendre à la fois comment ces biofilms se forment, les modèles de biofilms multi-spécifiques étant peu nombreux dans la littérature d'autant plus dans un contexte marin. La compréhension des interactions microbiennes et la constitution d'un micro-habitat plus complexe et plus représentatif de l'environnement naturel était un objectif très passionnant en soi mais ces modèles multi-espèces pourraient également être utilisés par la suite pour évaluer l'efficacité des nouveaux revêtements et/ou molécules anti-biofilms ou anti-fouling conçus par les chimistes polyméristes et organiciens du laboratoire, préalablement aux tests *in situ*.

2. Etudes des interactions amibes / bactéries

Les protozoaires tels que les amibes sont des membres importants des communautés microbiennes dans tous les environnements terrestres, d'eaux douces et marins. La prédation par les protozoaires est considérée comme une des causes principales de mortalité bactérienne dans l'environnement (Sherr et Sherr, 2002). De plus, l'étroite association des bactéries et des protozoaires dans les biofilms et leur longue histoire co-évolutive a donné lieu à des adaptations

assurant la survie bactérienne et leur coexistence au sein de ces environnements (Matz, Moreno, *et al.*, 2008).

L'objectif de cette partie a été d'évaluer si les amibes digéreraient la plupart des bactéries marines isolées de la rade de Toulon ou si amibes et bactéries pouvaient interagir de manière différente. Pour ce faire, après avoir essayé de trouver des amibes axéniques issues de l'environnement marin ou tenté de cultiver et d'axéniser des amibes pour lesquelles un tapis bactérien était nécessaire à leur croissance, nous avons fait le choix de prendre un modèle ubiquitaire connu, étudié avec un large panel de bactéries de l'environnement, dont l'environnement marin (Matz, Webb, *et al.*, 2008; Van der Henst *et al.*, 2016) et dont le génome est séquencé. Il s'agit d'*Acanthamoeba castellanii*, une amibe qui a été isolée de différentes sources incluant le sol, les eaux douces et les échantillons marins (Sawyer, 1980; Page, 1983; Fernandez *et al.*, 1989; Rogerson et Laybourn-Parry, 1992). Après avoir commencé la culture de ces organismes au sein du laboratoire, différents milieux ont été testés afin de trouver le milieu le plus apte pour réaliser les interactions entre les souches bactériennes marines et l'amibe dans des conditions les plus proches possibles du milieu marin. Ensuite, l'interaction entre chaque souche et cette amibe a été principalement étudiée par CLSM ainsi que par microscopie électronique à transmission (MET).

3. Etudes des interactions entre amibes et un biofilm préformé

La dernière étape de ce travail de thèse a été de caractériser les interactions entre l'amibe modèle choisie et les différents modèles de biofilm réalisés et caractérisés préalablement. L'objectif était dans un premier temps de compléxifier nos modèles de biofilm en passant de biofilms multi-spécifiques à multi-organismes, mais également d'essayer de comprendre le rôle des amibes dans les écosystèmes de type biofilm. Il s'agissait aussi de déterminer si les bactéries ayant préalablement formé un biofilm, adoptaient un comportement en lien avec celui observé lors des interactions amibe-bactéries marines.

Chapitre II : Etude de la formation de biofilms multi- spécifiques par différentes bactéries marines

La première étape de ce travail de thèse a été de choisir parmi la collection de Toulon un panel de souches présentant des caractéristiques différentes. Les bactéries issues de la collection de Toulon ont été isolées à partir de biofilms immergés en mer Méditerranée. Elles ont été caractérisées en fonction de leurs capacités à se mouvoir ainsi que sur leurs habilités à adhérer et à former du biofilm (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Camps *et al.*, 2011). Parmi celles-ci, quatre souches bactériennes ont finalement été choisies appartenant à des grands groupes retrouvés dans les biofilms. Ainsi la caractérisation fine des biofilms de *Persicivirga mediterranea* TC4, une nouvelle espèce précédemment identifiée par le laboratoire et de *Polaribacter* sp. TC5 a été réalisée. Ces deux espèces sont non motiles et appartiennent à la classe des Flavobacteria du groupe des Bacteroidetes (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Deux autres souches motiles appartenant au γ -Proteobacteria ont également été sélectionnées pour cette étude, appartenant aux *Shewanella* sp. TC10 et TC11. Ces quatre souches présentent des caractéristiques phénotypiques singulières (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Camps *et al.*, 2011 ; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2017 ; Favre *et al.*, 2017).

Avant cette sélection de souches qui ont servi dans tous le travail de thèse et afin d'étudier à l'échelle cellulaire les interactions que pouvaient avoir ces souches dans un biofilm multi-spécifique, un des premiers objectifs a été d'étudier la possibilité de marquer certaines des souches de la collection avec un marqueur fluorescent. Pour ce faire, des techniques de transformation et de conjugaison ont été réalisées sur un groupe de 7 à 8 souches afin d'ajouter dans ces différentes souches un plasmide contenant un gène exprimant une protéine fluorescente. Les différentes techniques de transformation bactérienne réalisée en partie par moi-même et par Aurore Puymège n'ont pas permis d'obtenir de transformants (Tableau 7 et fiche technique n°3). Par la suite et dans le même objectif, différentes techniques de conjugaison ont été réalisées (Tableau 8 et fiche technique n°4).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes de transformation appliquées à des souches de bactéries marines afin de leur ajouter un gène exprimant une protéine fluorescente (cf : Fiche technique °3)

Variations des méthodes et paramètres utilisés lors de la transformation bactérienne		Combinaisons de conditions testées		
Souches et plasmides utilisés		n°1	n°2	n°3
Souches bactériennes receveuses :	TC5, TC8, TC9, TC10, TC11, TC14 et NCIMB400	TC5, TC9, TC10, TC11, TC14 et NCIMB400	TC8 et TC9	TC5, TC10 et TC11
Plasmides :	pX5 (Rapp, 2012) pBC-L-GFP-pPmip (Matthysse et al., 1996) pXDC50-pLac-redFP (Franco, Shohdy, et Shuman, 2012)	pBC-L-GFP-Pmip pXDC50-pLac-redFP	pX5 pBC-L-GFP-Pmip	pX5 pBC-L-GFP-Pmip
Techniques de préparation de cellules compétentes				
Choc chimique :	CaCl ₂ = [100 µM]	X	X	X
	CaCl ₂ = [200 µM]		X	
	Chlorure de rubidium = [100 µM]			X
Choc physique :	Electroporation			X
Transformation bactérienne				
Phase de croissance des bactéries :	Exponentielle, post-exponentielle et stationnaire	X	X	X
Préchoc thermique :	aucun		X	X
	9 min à 42°C	X	X	X
Choc thermique :	aucun		X	X
	1 min à 42°C		X	
	1 min à 30°C, 35°C, 40°C ou 42°C	X		X
Milieu de croissance de la bactérie receveuse :	VNSS	X	X	X
	VNSS dont la concentration en NSS est dilué au 3/4, 1/2 et 1/4		X	
Temps de régénération avec plasmide :	3 ou 4h	X	X	X
	24h	X		X

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différentes méthodes de conjugaison appliquées à des souches de bactéries marines afin de leur ajouter un gène exprimant une protéine fluorescente (cf : Fiche technique °4)

Variations des méthodes et paramètres utilisés lors de la conjugaison bactérienne		Combinaisons de conditions testées	
Souches et plasmides utilisés		n°1	n°2
Souches bactériennes receveuses :	TC5, TC8, TC9, TC10, TC11 et NCIMB400	TC8 et TC9	TC5, TC10, TC11 et NCIMB400
Souches bactériennes donneuses :	<i>Escherichia coli</i> WM3064	<i>E. coli</i> WM3064	<i>E. coli</i> WM3064
Plasmides :	pX5 (conjugaison bipartenaire)	pX5	pX5
	pCJS10 (donor, conjugaison tripartenaire)	pCJS10 (donor)	pCJS10 (donor)
	pRK600 (helper, conjugaison tripartenaire)	pRK600 (helper)	pRK600 (helper)
Conjugaison			
Croissance de la donneuse	sans antibiotique		X
ratio donneuse/receveuse	1:1	X	
	1:1, 1:2 et 1:3		X
Solution de lavage	MgSO ₄ = [10 mM]	X	X
	50% NSS + 50% MgSO ₄ = [10 mM]	X	
Type de conjugaison	bipartenaire	X	X
	tripartenaire	X	X
Phase de croissance	post exponentielle	X	
	exponentielle, post exponentielle et stationnaire		X
Type interaction	milieu solide VNSS et LB	X	X
	Sur filtre VNSS et LB	X	X
	milieu liquide VNSS et LB	X	
Temps d'incubation	1 nuit	X	X
	48h	X	X
Température d'incubation	30°C	X	
	20°C, 30°C et 37°C		X

La conjugaison a permis d'obtenir des transformants pour les souches *Shewanella frigidimarina* NCIMB400, une souche de référence dont le génome a été séquencé et qui est génétiquement manipulable (Dobbin *et al.*, 1999 ; Maier Tamara M., Myers Judith M., et Myers Charles R., 2003) (mais qui ne fait pas partie de la collection d'isolats de Toulon), et *Shewanella* sp. TC10. Ces souches bactériennes ont été transformées à l'aide du plasmide pX5 contenant un gène d'expression de la GFP (protéine fluorescente verte) et de la souche bactérienne donneuse *E. coli* DH5 α . Les bactéries donneuses et receveuses ont été mélangées à un ratio 1 :1 à partir de leur phase post exponentielle de croissance et un lavage au MgSO₄ a été réalisé durant la conjugaison bipartenaire. L'interaction a été faite sur milieu solide VNSS durant 1 nuit à 20°C. Pour la souche TC10, la bactérie donneuse a réalisé sa croissance sans antibiotique, du fait d'une sensibilité de TC10 au Chloramphénicol.

Puisque seulement 2 souches bactériennes, dont une ne faisant pas partie de la collection de Toulon, avaient été transformées, nous avons effectué une deuxième sélection de souches à étudier sur la base de leurs différences phénotypiques. Parmi les souches ayant montré une faible capacité à former un biofilm (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2017), *Persicivirga mediterranea* TC4 a été sélectionnée car elle représentait une nouvelle espèce précédemment identifiée par le laboratoire, et TC5 car elle faisait partie des bactéries les plus hydrophobes de la collection. Parmi les bactéries capables de former un biofilm plus important, les 2 souches du genre *Shewanella* ont été choisies. En effet, TC10 est la seule souche transformée par le pX5-GFP et TC11 présentait un des biofilms les plus importants avec celui de *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 (cette dernière a été éliminée pour donner suite aux résultats préliminaires peu probants obtenus avec les amibes, obtenus lors d'un stage de Master 2 que j'ai supervisé techniquement). Afin d'obtenir des marqueurs fluorescents pour les trois bactéries sélectionnées mais non marquées, utilisées dans cette étude, il a été choisi d'organiser la production et d'utiliser des anticorps permettant de reconnaître spécifiquement *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5 et *Shewanella* sp. TC11. Des essais préliminaires de marquage par FISH avaient été effectués précédemment au laboratoire qui s'étaient avérés difficiles à mettre au point sur ces souches et surtout très coûteux. Ce travail préliminaire a donc permis de réaliser par la suite des expériences d'interactions bactériennes au sein de biofilm. Ces travaux font l'objet d'une publication qui est en cours de soumission.

Jusqu'à présent, peu de modèle de biofilms multispécifiques ont été réalisés et publiés alors que les interactions entre bactéries jouent probablement un rôle considérable dans l'établissement et le devenir des biofilms (Røder, Sørensen, et Burmølle, 2016). De plus, aucun modèle de

biofilm multi-spécifique aujourd'hui n'a été réalisé avec des bactéries marines qui pourraient en outre partager la même niche écologique. La seule étude réalisée sur des biofilms multispécifiques constitués de bactéries marines visait plus à sélectionner des bactéries avec certains phénotypes (synergie) au sein de ces biofilms plutôt qu'à étudier leurs interactions cellulaires par microscopie (Burmølle *et al.*, 2006).

Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components

Guillonneau Richard¹, Baraquet Claudine¹, Bazire Alexis² and Molmeret Maëlle¹

¹Laboratoire MAPIEM, EA4323, Université de Toulon, La Garde, France

²Université de Bretagne-Sud, EA 3884, LBCM, IUEM Lorient, France

Abstract

Microbial communities composition is largely shaped by interspecies competition or cooperation in most environments. Environmental ecosystems are made of various dynamic microhabitats where microbial communities interact with each other establishing metabolically interdependent relationships. Very limited information is available on multispecies biofilms and their microhabitats. The objective of this study is to understand how marine bacteria isolated from biofilms in the Mediterranean Sea interact and compete with each other when cultivated in multispecies biofilms. Four strains (*Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribater* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and TC11) with different phenotypical traits and abilities to form a biofilm have been selected from a previous study. Here, we show that these strains displayed a different capacity to form a biofilm in static versus dynamic conditions where one strain, TC11, was highly susceptible to the flux. These bacteria appeared to be specialized in the secretion of one or two exopolymers. Only TC5 seemed to secrete inhibitory molecule(s) in its supernatant, with a significant effect on TC10. Most of the strains negatively impacted each other, except one couple, TC4 and TC10, which presented a synergetic effect in two and three species biofilms. Interestingly, this two strains produced a newly secreted compound when grown in bispecific versus monospecific biofilms. In a four-species biofilm, TC5 which secreted an antibiofilm compound(s) and induced the strongest inhibition on its partners in bispecific biofilms, outfitted the other bacteria. Therefore, understanding how bacteria responds to interspecific interactions or competition should help comprehending the dynamics of bacterial populations in their ecological niches.

Keywords: Marine bacteria, multispecies biofilm, competition, synergy, matrix components

Introduction

Interspecies interactions appear to have a preponderant role in natural ecosystems. Indeed, the composition of microbial communities, which populate most environments, is largely shaped

by interspecies competition or cooperation. Environmental ecosystems are made of various dynamic microscale microhabitats, where microbial communities preferably interact “as metabolically interdependent groups” (Zelezniak et al., 2015; Roder et al., 2016)). Bacteria colonize microhabitats compatible with their physiologic and metabolic needs, which depend on their neighboring bacteria and this will influence the spatial structure of the community (Stubbendieck et al., 2016). According to Roder *et al.*, microscale bacterial interspecies interactions studies are the “missing bridge” between mono and dual species studies and the large-scale investigations focusing on the overall diversity of a community. Microscale interactions studies have the advantage of bringing information on microhabitat and spatial organization as well as bacterial interspecies interactions. Interspecies interactions may also result in different microbial functions and abilities (reviewed in (Roder et al., 2016)). Very limited information except for the human oral cavities, where multispecies studies are the most abundant, are available on microhabitats related to the natural environment (Filoche et al., 2004a; Filoche et al., 2004b; Kuboniwa et al., 2006). Studying changes in the community composition over time or what is produced by the population can provide information on the ability of each individuals to establish themselves and survive in their microhabitat.

As most biofilm communities are composed of multiple different bacteria living in close proximity, embedded in extracellular polymeric substances such as polysaccharides, proteins, nucleic acids, lipids, studying multispecies or multi-organisms biofilms, appears therefore a relevant challenge to take up with the goal to understand how the different populations interact with each others at the microscale level. Numerous obstacles exist in studying mixed biofilms such as labelling the different populations, in particular when they are not amenable for genetic manipulations, or identifying what is produced and by who, interpreting why one strain is better fit than another. Most four or more species biofilm studies have very recently emerged in the last 3 or 4 years but remain overall quite rare (Lee et al., 2014; Ren et al., 2015; Sherry et al., 2016; Bloch et al., 2017; Hansen et al., 2017; Liu et al., 2017). Many studies have used different variants of the same strains or mathematical models and flow systems (Momeni et al., 2013b; Momeni et al., 2013a; Lee et al., 2014; van Gestel et al., 2014; Liu et al., 2017). The latter for instance adds flux as an additional external factor on the interactions, which can be appropriate in certain studies but can restrict quickly space and therefore community structure spatial organization (Lee et al., 2014; van Gestel et al., 2014) (Liu et al., 2017). Multiple species approaches with 4 or more strains, with a focus on only one or two of the partners, have also been performed, which can bring interesting information on the targeted strains (Bloch et al.,

2017; Hansen et al., 2017). Only few four or more species biofilm studies following the fate of the different bacterial species in interaction, quantitatively (Burmolle et al., 2006; Ren et al., 2015) and on their spatial organization (Lee et al., 2014; Liu et al., 2017) are available. To our knowledge, only one dealt with marine bacterial isolates (Burmolle et al., 2006).

Our study focuses on the comprehension of the interaction within multispecies biofilms of 4 bacterial strains that has been isolated from immersed biofilms recovered from the Toulon bay (France). The selection of these strains for this study has been performed on their different phenotypic traits and ability to form a biofilm *in vitro* (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014; El-Kirat-Chatel et al., 2017; Favre et al., 2017). The objective of this work is to understand how marine bacteria isolated from biofilms in the Mediterranean Sea interact and compete with each other when cultivated together. We investigated whether the outcome of mono or two-species biofilms between these four marine strains cultivated in artificial sea water could give some information on the behaviors they would have in three or four species biofilms. We hypothesized that even if some strains have been described as good or poor biofilm producers in monospecies biofilms, the outcome in a multispecies biofilm, which is not easily predicable, would give valuable information on their ability to colonize and survive in their microhabitats.

Materiel and methods

Bacterial strains and culture media:

Four marine bacterial strains were used in this study : *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11. The strains have been isolated from various surfaces immersed in the bay of Toulon and displayed different phenotypical traits regarding motility, hydrophobicity, adhesion, biofilm formation (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014). All bacterial strains have been grown in VNSS (Mårdén et al., 1985) at 20°C, 120 rpm. The TC10 strain, which harboured the pX5 plasmid encoding GFP (kindly constructed by Dr. Aurore Puymège), was cultured in VNSS supplemented with 6 µg/mL of Chloramphenicol.

Bacterial labelling:

TC10 pX5-GFP was obtained by conjugation using *E. coli* WM3064 as a donor strain. Briefly, post-exponential phase culture of WM3064 transformed with pX5-GFP by Cacl₂ chemical choc was mated with post-exponential phase *Shewanella* sp. TC10 in a 1:1 ratio on VNSS plates containing 100 µg/ml of DAP (2,6-Diaminopimelic acid) (Sigma-aldrich, Saint Louis,

Missouri, USA) overnight at 20°C. *Shewanella* sp. TC10 transconjugants were selected on VNSS DAP free agar plates containing 6 µg/mL chloramphenicol.

Because transformation and conjugation assays of the bacterial strains only resulted in the creation of TC10 pX5-GFP despite numerous different conditions tested on the strains, 3 polyclonal antibodies directed against the 3 other strains, TC4, TC5 and TC11 were ordered (ACRIS Antibodies GmbH, Herford, Germany) for labelling purposes. Strains were grown to post exponential phases and washed in PBS 1X by centrifugation at 3700 g for 10 min. The pellets were suspended in formalin 0,1 % PBS 1X at 4°C during 10 h and washed thrice with PBS 1X prior to obtaining a final concentration of approximately 10⁸ cells/ml before sending them. The antigens were emulsified with an equal volume of Complete Freund's Adjuvant and injected into three to four subcutaneous sites for the primary immunization. Subsequent immunizations were performed depending on hosts. TC4, TC5 and TC11 polyclonal antibodies were respectively designed into chicken, goat and rabbit hosts.

Single species biofilm formation in static and dynamic conditions:

For the biofilm formed in static conditions, post exponential grown bacteria were suspended in ASW (Artificial Sea Water at 36 g/L, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and inoculated at OD_{600nm} 0.1 and 0.3 into 24 well plates (Corning Incorporated Costar®, New York, USA) containing a sterilized glass coverslip into each well. At each time point (3h, 24h, and 48h), bacteria were fixed using formalin 3,7% during 15 min and permeabilized using Triton™ X-100 (0,05%) during 15 min. The bacteria staining was performed with DAPI at 5 µg/mL (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and the coverslips were mounted with a drop of Prolong™ Diamond Antifade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) before observation using epifluorescence microscopy (Zeiss Axiovert 40 CFL, Göttingen, Germany).

Bacterial biofilms were also developed in dynamic conditions on glass slides in ASW in three-channel flow cells (channel dimensions 1 by 4 by 40 mm, Technical university of Denmark Systems Biology, Denmark) as previously performed (Pamp et al., 2009; Bazire et al., 2010). Flow cells were inoculated with bacteria in post-exponential growth phase suspended in ASW at OD_{600nm} 0.3. Adhesion of bacteria occurred at 20°C for 3h without medium flow. A wash to remove non-attached bacteria was applied by a flow of ASW at 3 mL.h⁻¹ during 15 min. The biofilm evolution was monitored with a constant ASW flow of 3 mL.h⁻¹ from this stage. At each time point (T0h, T24h and T48h), the biofilms were stained with 5 µM of Syto 61 Red during

20 min and observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM, Zeiss LSM 510 and Zeiss LSM 710, Göttingen, Germany).

Matrix components staining:

For the matrix staining, a static biofilm of 48h were performed. Each biofilm was stained with DAPI at 5 µg/mL (Sigma-aldrich, Darmstadt, Germany) and one of the following matrix dyes. Exopolysaccharides were stained with (i) a Concanavalin A (ConA) tetramethylrhodamine conjugate (Thermo Fisher Scientific, Wathman, USA) at 20 µg/mL to label Mannose/Glucose residues, (ii) the Wheat Germ Agglutinin (WGA) associated with the Alexa Fluor™ 555 conjugate (Thermo Fisher Scientific, Wathman, USA) at 100 µg/mL to label sialic acids and N-acetyl-glucosamine and (iii) the Peanut Agglutinin (PNA) lectin from *Arachis hypogaea* peanut associated with the Alexa Fluor™ 568 conjugate (Thermo Fisher Scientific, Wathman, USA) at 50 µg/mL to label mostly glycoproteins which include the Gal-β(1-3)-GalNAc carbohydrate. The proteins were stained with the FilmTracer™ Sypro™ Ruby biofilm matrix stain (Thermo Fisher Scientific, Wathman, USA) according to the manufacturer's indications and the eDNAs were stained with TOTO™-3 iodide (Thermo Fisher Scientific, Wathman, USA) at 2 µM. After 30 min of incubation of each probes, each coverslip was washed off 3 times. Finally, the coverslips were mounted with a drop of Prolong™ Diamond Antifade before observation with CLSM.

Crystal Violet assay:

Bacterial biofilms were developed into 96-well microtiter plates with 100 µL of bacteria in post-exponential growth phase in VNSS per well and 100 µL of bacterial supernatant of another strain collected in VNSS at the beginning of the stationary growth phase. The final OD_{600nm} was 0.4 into each well. After 48h of growth in static conditions and a temperature of 20°C, samples were washed thrice with NaCl (36 g.L⁻¹) and dried during 30 min at 50°C. Biofilms were stained during 15 min with 200 µL of Crystal Violet at 0.01% (w/v) and rinsed thrice with NaCl (36 g.L⁻¹) and dried for 10 min. The quantification of biofilm was evaluated by releasing the stain from the biofilm with absolute ethanol for 10 min at 20°C, at 120 rpm and measuring the absorbance of the Crystal Violet solution at 595 nm.

Multispecies biofilm formation:

For the bi-species biofilm, bacteria in post-exponential growth phase were suspended in ASW and inoculated in 24 well plates (Corning Incorporated Costar®, New York, USA), containing

a sterilized glass coverslip into each well, to a OD_{600nm} of 0.15 per strain. Similarly, for the biofilms involving 3 or 4 bacteria, the OD_{600nm} was of 0.1 per strain to make the overall OD_{600nm} between 0.3 and 0.4 in the bi-tri and four species biofilms. Controls included single species biofilm formed in the same concentrations and conditions than the multispecies biofilm. Biofilm formation was monitored after 24h and 48h and at each time point, cells were fixed using Formalin 3.7% during 15min. For the immunostaining, samples were blocked with BSA 3% (Acros organics, Geel, Belgium) in PBS 1X overnight at 4°C. The primary antibodies were added during 1h in BSA 3% at 1/300 for Chicken-anti-TC4, 1/100 for Goat-anti-TC5 and 1/300 for Rabbit-anti-TC11. After a second blocking step of 2h at room temperature, secondary antibodies were added in BSA 3% to a concentration of 1/2000 for Goat anti-Chicken IgY (H+L) conjugated to FITC (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA) for 1h, to a concentration of 1/500 for Goat anti-Chicken IgY (H+L) conjugated to Alexa Fluor 405 (Abcam, Cambridge, United kingdom) for 1h, to a concentration of 1/1000 for Donkey anti-Goat IgG (H+L) coupled to Alexa Fluor 633 (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA) for 1h, to a concentration of 45 μ L/mL for Donkey anti-Rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 during 30 min and to a concentration of 1/200 for Mouse anti-rabbit IgG coupled to CruzFluor™ 488. Finally, the coverslips were mounted with a drop of ProLong™ Diamond Antifade before observation using CLSM.

Data extraction from images and statistics:

At least three replicates and five pictures per replicate were performed and used for data extraction. The pictures have been acquired by epifluorescence microscopy or by CLSM. The percentages of recovery of epifluorescence microscopy were determined using an algorithmic method with Rstudio 0.98.1025 (Rstudio, Boston, Massachusetts, USA), where the brightness pixel was determined by threshold's definition of small area of picture around the pixel and against the background. Each picture has been divided in 36 pieces, that permitted empirically to render negligible the distortion of objective and the threshold was defined as two multiplied by percentile 5th of pixel values on a small area in which the pixel was measured (**Supplementary figure 1**). The biovolume, the average thickness and the evaluation of the maximum coverage in the CLSM pictures was determined with the COMSTAT software developed in MATLAB R2015a (Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) as previously performed (Heydorn et al., 2000).

To test for statistically significant differences ($P < 0.05$) between two conditions a T-test was performed and between different time points, a two-way analysis of variance including the Bonferroni post-test were performed using SPSS 13.0 (IBM, Armonk, New York, USA).

Results

Biofilm formation in static and dynamic conditions

Before studying multispecies biofilm formation, we performed a preliminary experiment in monospecies conditions with the four strains isolated from the same area of the Mediterranean coast (Toulon bay) in order to evaluate their biofilm formation ability in the conditions selected for the multispecies biofilms. First, these strains were selected on the basis of their phenotypical differences established in a previous study (Brian-Jaisson et al., 2014). Of particular interest, in rich media and microplates, *Persicivirga mediterranea* TC4 and *Polaribacter* Sp. TC5 appeared to form a smaller biofilm, while the strains belonging to the *Shewanella* genus, TC10 et TC11 seemed to build a thicker biofilm (Brian-Jaisson et al., 2014). Second, the artificial seawater (ASW) medium was selected as it is a nutrient poor solution close to the marine environment composition and that poor or low nutrients media are supposed to force the strains to be in metabolic or competitive interactions, a situation encountered by strains that are colonizing niches in the natural marine environment. These strains were thus inoculated onto glass surfaces and their biofilm formation was evaluated in static conditions in ASW using a epifluorescence microscope.

We noticed first that in this low nutrient saline solution, all the strains were able to form a biofilm over 48h with different surface coverages (figure 37). *Persicivirga mediterranea* TC4 appears to have a better surface coverage than at least *Shewanella* sp. TC10 at both OD_{600nm} and all time points and in a lesser extent than *Shewanella* sp. TC11 at the OD_{600nm} of 0.1 and the OD_{600nm} of 0.3 at 3h only. The *Polaribacter* sp. TC5 biofilm formation was only significantly different from the one of *Persicivirga mediterranea* TC4 at the OD_{600nm} of 0.3 at 3h. The concentration of the initial inoculum seemed to have an effect on the TC11 biofilm formation, since it is the only strain with an improved surface coverage at the OD_{600nm} of 0.3 compared to 0.1. For the other strains, the profiles at each time points appeared similar at both OD_{600nm}. Therefore, TC4 displayed the best ability in covering the surface at all time points and OD, while TC10 showed the lowest capacity to cover the surface. This is different from the results obtained in the previous study, which shows that external factors such as media and surfaces can significantly influence the strains abilities to form a biofilm.

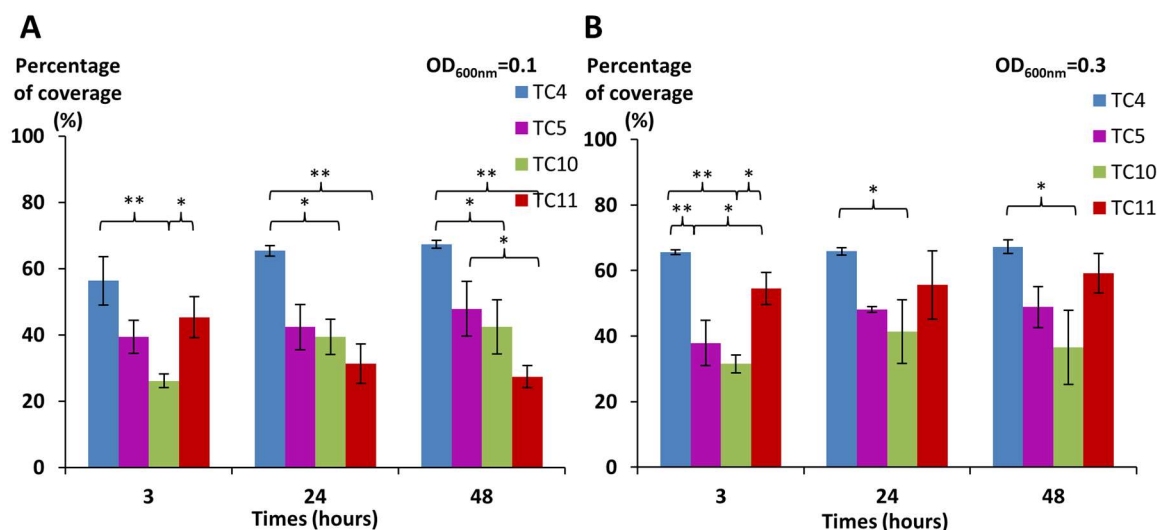


Figure 37: Percentage of recovery regarding static biofilm formation on glass surface in ASW of the four marine bacteria: *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11 were inoculated at an OD_{600nm} of 0.1 (A), 0.3 (B). After various times of incubation (3h, 24h and 48h), the bacteria were stained with DAPI, and the epifluorescence pictures were analyzed by algorithmic method to define the percentage of coverage.

In order to study if these strains would behave similarly in dynamic conditions, the same experiment was performed using a flow system set at 3 ml/h and images were analyzed at 0h, 24h and 48h. To obtain the sufficient coverage of the surface in dynamic conditions, the OD_{600nm} of 0.3 was chosen. The results show that the biofilm of the four marine bacteria presented different patterns over the time than the ones observed when in static conditions which could be at least for *Shewanella* sp. TC11 attributed to the flux (figure 38A). *Shewanella* sp. TC11 detached itself very rapidly from the surface with the instauration of the flux, as TC11 had less than 5% of surface coverage at 3h. The other strains managed to adhere in more important proportion with the flux, covering the surface at around 40%. While in static conditions, TC4 displayed a surface coverage above 60% at 3h (figure 37), it was only around 40% in dynamic conditions (figure 38A). The difference between the surface coverages in static versus dynamic conditions at 3h was less important for *Polaribacter* sp. TC5 and *Shewanella* sp. TC10. This suggests that TC4 was also impacted by the flux at least at the first time point. The surface coverage of TC4, TC5 and TC10 increased slowly over the 48h in contrast with the monospecific biofilm. The biovolumes were significantly more important for TC10, in particular at 48h, compared to the other strains (figure 38B). This could be attributed to the observation of bigger patches of filamentous bacteria, in sharp contrast with the thinner regular homogeneous repartition of TC4 and TC5 on the surface (figure 38C and data not shown). Indeed, TC5 and TC4 appeared to form a biofilm that covered well the surface (at least similar to TC10) but without the presence of 3D structures (figure 38C). Because TC11 was not able

to form a real biofilm in dynamic conditions, we decided for the interactions studies in multispecies biofilms, to perform these experiments in static conditions at an OD_{600nm} of about 0.1 per strain in order to avoid a high overall inoculum and the influence of additional external factors such as the flux that complexify interpretation in regards with biofilm inhibition versus detachment.

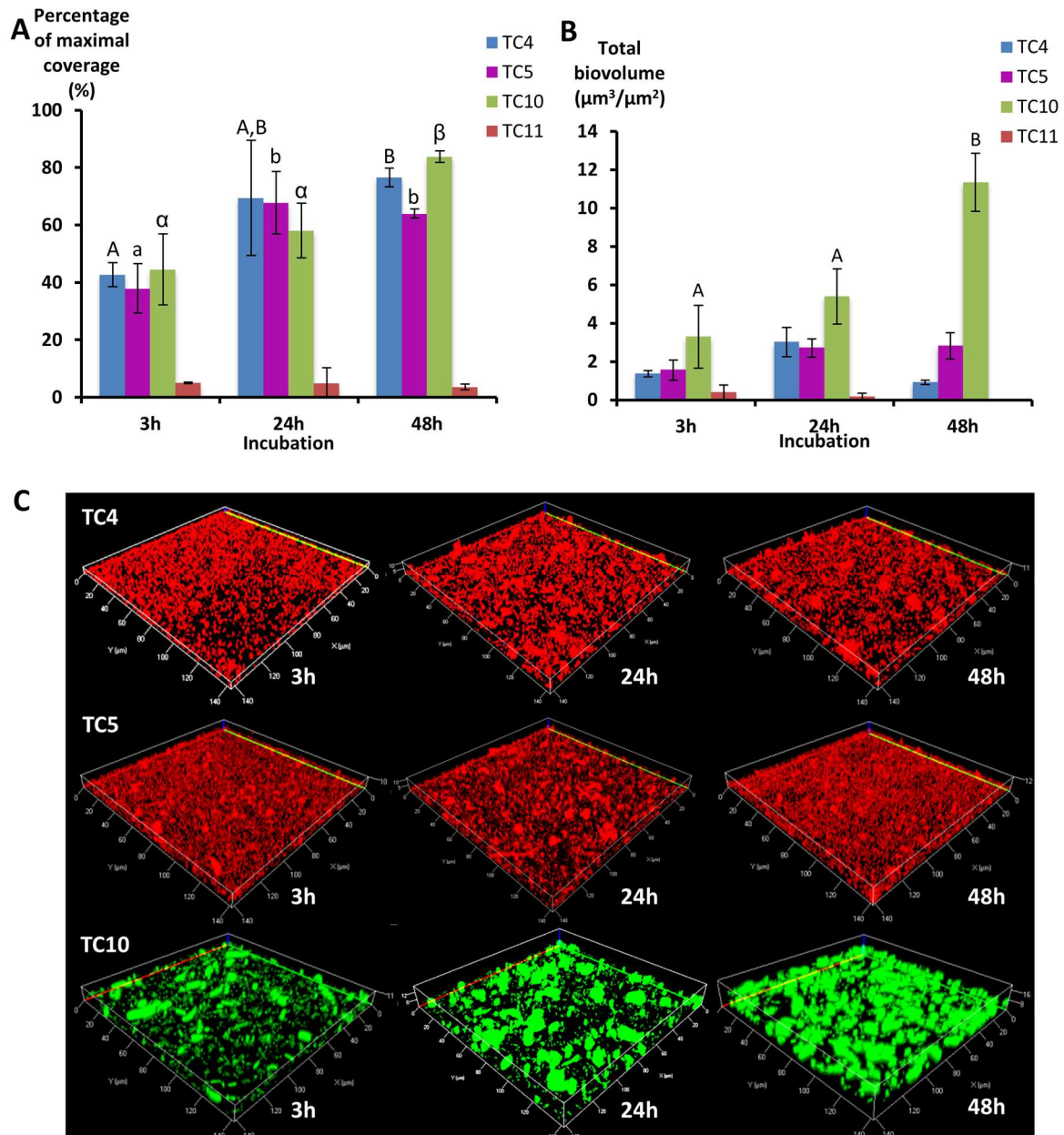


Figure 38: Biofilm formation in dynamic conditions of the four marine bacterial strains in ASW. The formation of biofilm were monitored using a flux of 3mL/h with *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11. After various times of incubation (T0h, T24h and T48h), the bacteria were stained with Syto 61 or directly imaged for TC10, which harboured the pX5 plasmid encoding GFP. (A) The percentages of coverage of the most occupied slice were defined over the times by COMSTAT algorithm. (B) The biovolumes were defined at the same time points by COMSTAT algorithm. (C) Representative pictures of the biofilm formed after 3h and 48h of incubation. Values are the mean of three replicates, errors bars represent standard deviation and significant differences between incubation times (p -value<0.05) are indicated by stars

Bacteria appear to be specialized in the secretion of few expolymeric compounds

Before performing multispecies biofilms, and in order to better understand the different characteristics of biofilm formation of these strains, we used fluorescent markers to label major compounds of the extracellular matrix : the proteins (SYPRO® ruby biofilm matrix staining), the eDNA (a cell-impermeant nuclear acid stain TOTO®-3) (Okshevsky and Meyer) and different exopolysaccharides thanks to lectins (Neu and Lawrence, 1999) described as follows: Concanavalin A (ConA) binds specifically to the monosaccharides of α -D-glucose and α -D-mannose but is also able to target polysaccharides containing derivatives such as dextran, glycogen, mannan, amylopectin (Goldstein et al., 1965) and sphingans (Johnsen et al., 2000), or with certain polysaccharides containing a derivative of specific sugars such as alginate (Strathmann et al., 2002). Wheat germ agglutinin (WGA) binds to N-acetyl-glucosamine or sialic acids family contained in the peptidoglycan of the cell walls and the lipopolysaccharides (Strathmann et al., 2002). Peanut Agglutinin (PNA) binds preferentially to the β -galactose residues when they are spaced by a glucose from the EPS backbone. It is generally used to label glycoproteins (Angeloni et al., 2005). Total bacteria were labelled with DAPI staining.

First, we observed that each strain presented a specific pattern of production of the studied matrix compounds. While *P. mediterranea* TC4 produced mainly eDNA in its matrix, *Polaribacter* sp. TC5 produced also exopolysaccharides composed of glucose or mannose residues (figure 39A). For these 2 strains, eDNA was the major secreted compounds. The 2 *Shewanella* strains TC10 and TC11 produced mainly proteins in their matrix but TC10 secreted also sialic acid residues or N-acetyl-glucosamine. Overall, among the extracellular matrix compounds tested, most of the compounds secreted by these bacteria were eDNA or proteins. Interestingly, when observing CLSM images, TC4 appeared to secrete eDNA at one pole of the cell, more specifically on the top of the bacteria if we look at the Z section, similar to TC5 (figure 39B and C). TC5 produced also polysaccharides that are composed of glucose and mannose, which appeared as thin filaments and are distributed on the surface without being all the time directly associated with the bacterial body (figure 39C). This suggests that these polysaccharides seemed to be entirely secreted outside of the cell, without remaining attached to it. Similarly, for TC10, exopolysaccharides were composed of sialic acids residues or N-acetyl-glucosamine, which appeared bigger than and separated from TC10 (figure 39D). The production of proteins for TC10 and TC11 appeared to be smaller compounds, less homogeneous in size with the presence of lumps (figure 39D and E). In the bacteria tested, none of them secreted compounds tagged by PNA.

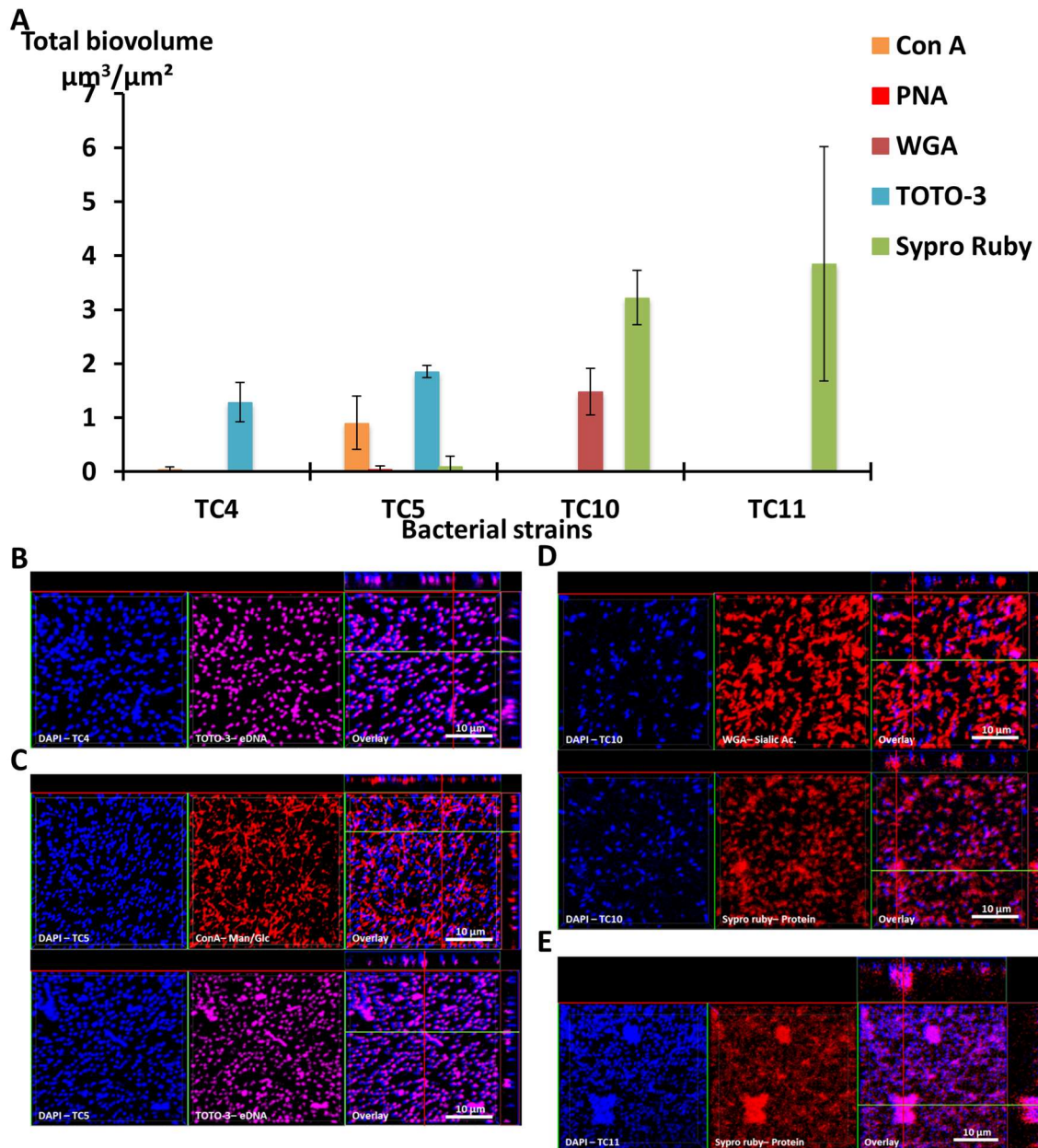


Figure 39: Exopolymeric matrix secreted by marine bacterial strains in static and single species conditions. Exopolymeric substances secreted in the biofilm of each of the 4 strains were evaluated in ASW after 48h. Different fluorescent markers were used : Concanavaline A for exopolysaccharides of glucose and/or mannose, WGA lectins for exopolysaccharides of sialic acids, PNA lectins for exopolysaccharides containing glycoproteins, TOTO3 for eDNA and Sypro Ruby for proteins. (A) The biovolumes of each matrix compound were evaluated by COMSTAT algorithmic method. Representative pictures of the positive secretion of matrix compounds are presented for *Persicivirga mediterranea* TC4 (B), *Polaribacter* sp. TC5 (C), *Shewanella* sp. TC10 (D) and *Shewanella* sp. TC11 (E). Values are the mean of three replicates, errors bars represent standard deviation.

Taken together, these results show that bacteria secrete a variety of compounds in their matrix. Among the extracellular matrix compounds tested, some bacteria secreted only one of the compounds, such as TC4 with eDNA or TC11 with proteins. Thus, bacteria were specialized in the secretion of one or two types of exopolymeric compounds in their matrix.

Most of the bacteria exert an inhibitory effect on their partners when they are in presence of each other

In order to study how these strains behave when they are in presence of each other, we first, examined if some bacterial strains secreted antibiofilm molecules by testing their supernatants against each other's biofilms using the Crystal Violet assay. As all the strains can form a biofilm in ASW but cannot grow planktonically in this medium, these experiments were performed using the VNSS marine medium.

Most strain supernatants had no efficiency in limiting biofilm formation of the other strains, except for the supernatant of TC5 (figure 40 and data not shown). When harvested in the early stationary phase, TC5 supernatants limited biofilm formation of TC10. None of the supernatant induced a pH modification of the medium (data not shown). These results showed a potential anti-biofilm effect of TC5 supernatant on one of the strains tested.

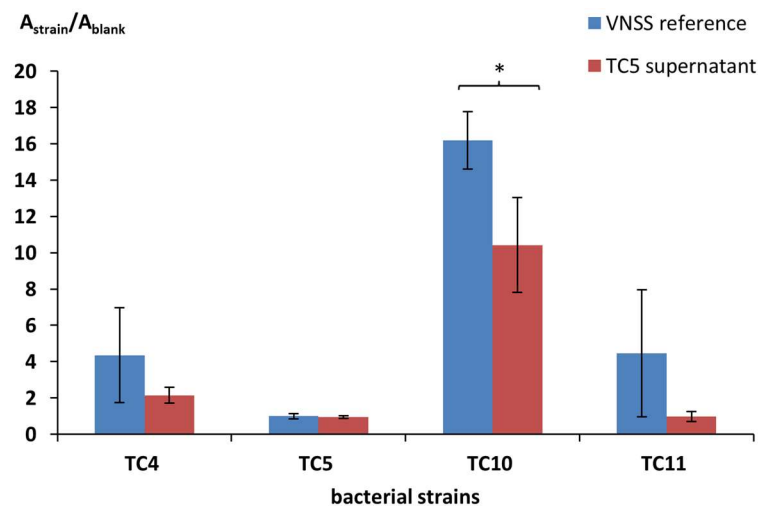


Figure 40: Antibiofilm activity of the TC5 supernatant measured by Crystal Violet on the marine bacteria. The biofilm formation of *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11 was monitored in VNSS with or without the addition of TC5 supernatant harvested in stationary growth phase after 48h in static conditions. Values are the mean of three replicates, error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant difference to the VNSS reference (p: *<0.05 and **<0.01).

In order to better understand the antagonist or synergetic interactions that could link the bacteria within their biofilms and to verify if TC5 could exert a similar anti biofilm effect against one of its potential competitors in an actual biofilm, bispecific biofilms were performed and studied after 24 and 48h using CLSM. As controls and for biovolume calculations purposes,

monospecific biofilms were performed in the same conditions than the ones used for bispecific biofilms.

When the bispecific biofilm of TC4 and TC5 was studied, we noticed that the biovolume of TC4 did not vary significantly when TC5 was present at 24h and 48h. However, a significant decrease of the biovolume of TC5 was observed when in combination with TC4 (figure 41.II.A) compared to the TC5 monospecific biofilm at both 24h and 48h (figure 41.I.B and 41.II.A). While the TC5 monospecific biofilm biovolume demonstrated a slight increase between 24h and 48h, no significant evolution in the biofilm inhibition was observed during the same period in presence of TC4. Therefore, TC5 was affected by the presence of TC4 in the bispecific biofilm. This was not observed with the supernatants experiments (data not shown), which could suggest that TC4 needs to be in presence of TC5 to trigger the TC5 biofilm inhibition.

For the bispecific biofilm of TC4 and T10, the TC4 biofilm formation increased significantly between 24h and 48h, in contrast with the monospecific biofilm biovolumes (figure 41.II.B). At 24h, the biofilm of TC4 in the bispecific biofilm displayed higher biovolumes compared to the TC4 monoculture, and this increase was even more important à 48h. The biofilm morphology of TC4 consisting of small patches of bacteria in the monospecific biofilm evolved in the bispecific biofilm toward bigger patches at 24h and 48h. For TC10, no differences between the biovolumes were observed at 24h in the monospecific versus bispecific biofilms. At 48h, a significant decrease of the TC10 biofilm biovolume was observed compared to in the monospecific biofilm. However, the TC10 biofilm biovolume in the bispecific biofilm augmented between 24h and 48h (figure 41.I.C and 41.II.B). This suggests that while inhibited in the bispecific compared to the monospecific biofilms, the TC10 biofilm was still able to grow over time. Thus, TC10 appeared to be inhibited in the presence of TC4 at 48h only, but this inhibition did not prevent TC10 from growing between 24h and 48h. In contrast, TC4 appeared to be stimulated by the presence of TC10 at both time points.

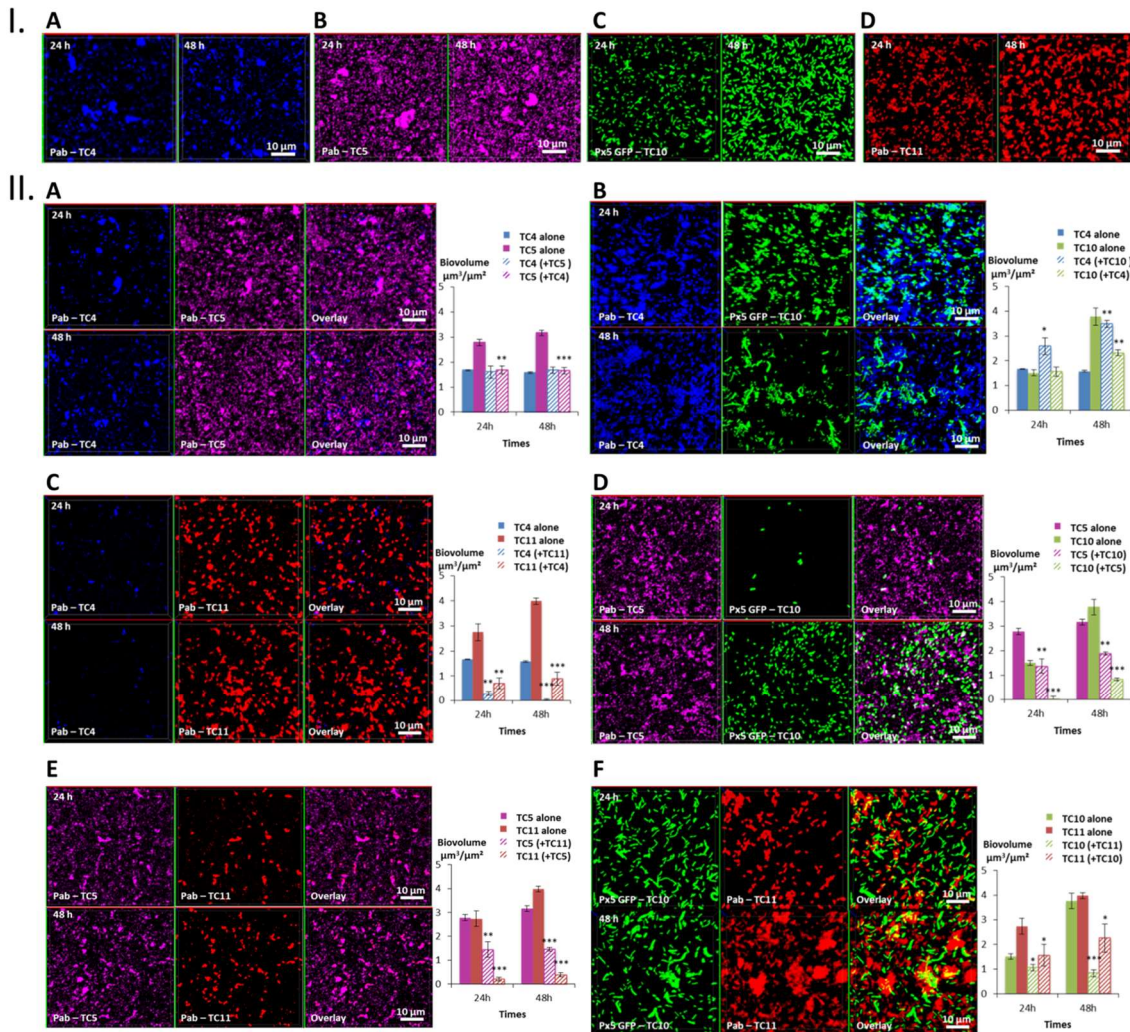


Figure 41: Biovolumes and spatial patternings of bacteria in bispecific biofilms after 24h or 48h of incubation in ASW. (A) Images of the single-species biofilms with *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11. (B-F) Spatial patterning and biovolumes of each strain in bispecific biofilms compared to when incubated alone. Values are the mean of three replicates, error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant difference to the strain incubated alone (p: *<0.05, **<0.01 and ***<0.001).

When TC4 and TC11 were cultivated together (figure 41.I.A, 41.I.D and 41..II.C), both strains were submitted to a significant reduction of biovolume at 24h and 48h. However, the biofilm biovolume decreased significantly between 24h and 48h for TC4, but it stagnated for TC11 (the difference being not significant). Therefore, TC11 and TC4 were both detrimental to each other. TC4 influenced negatively both *Shewanella* TC10 and TC11. In this case, the fall in the biofilm biovolume triggered by TC4 was more important (Δ -3.1) on TC11 at 48h than on TC10 (Δ -1.45). However, TC4 can benefit from the presence of TC10, while it did not benefit of the decrease of TC11, which was most probably responsible for the negative impact on TC4.

TC5 and TC10 appeared also to affect each other in the bispecific biofilm since the biovolumes of both strains decreased significantly at 24h and 48h compared to their monospecific biofilm

(figure 41.I.C and 41.II.D). The fall in the biofilm biovolume was more important on TC10 (Δ -2,95) at 48h suggesting that TC5 exerted a stronger inhibition on the TC10 biofilm. However, in the bispecific biofilm, both biofilms grew significantly between 24h and 48h. Therefore, the biovolumes of TC10 and TC5 increased significantly over time, but stayed largely impacted by the presence of both strains (figure 41.I.B and 41.II.D).

Similarly, in the bispecific biofilm of TC5 and TC11, both strains had a negative impact on each other at both time points compared to when they were both cultivated alone at 24h and 48h. The fall in the biofilm biovolume was more important for TC11 (Δ -3.6) than for TC5 (Δ -1.7) at 48h. For both strains, the biofilm biovolume stayed at the same level between 24h and 48h, suggesting that each strain biofilm was able to maintain itself until at least 48h. In presence of TC5, only very few TC11 were on the surface (figure 41.I.B, 41.I.D and 41.II.E). This confirms that TC5 exert a strong effect on both *Shewanella* strains TC10 and TC11, while TC5 is less impacted overall.

At last, when the two *Shewanella* sp. were present in the same biofilm, they also inhibited each other biofilm at both time points compared to when they were grown as monospecific biofilms at 24h and 48h. Bigger patches could be observed in particular for TC11 as well as bigger filamentous structures for TC10 compared to when they were grown alone (figure 41.I. C, 41.I.D and 41.II.F). The TC10 biofilm was less affected at 24h than the one of TC11 by the presence of each other. After 48h, the difference between TC10 alone and TC10 mixed with TC11 had worsened compared to the 24h time point with a decrease of Δ -2.94, while the fall for TC11 was only of Δ -1.73 at the same time point. These observations suggest that TC11 induces the biggest inhibitory effect among the two strains.

Taken together, these results show that *Percisivirga mediterranea* TC4 is the only bacteria which appeared to benefit from a partner, TC10, and to not be impacted by the presence of TC5. Overall, TC4 appears to cope better with the presence of the other bacteria since only TC11 has a negative impact on this strain. In contrast, TC4 has a negative impact on TC5, TC10 and TC11. *Polaribacter* sp. TC5 is impacted by the presence of all the other strains and appears to inhibit the biofilm of TC10 and TC11 but not the one of TC4. *Shewanella* sp. TC10 is impacted by all the strains. While it reduces the biofilm biovolumes of TC11 and TC5, it appears to help TC4 forming more biofilm. It is interesting to note that the shape of TC10 varies according to the situation, appearing bigger and/or filamentous with TC4 and TC11 than when cultivated with TC5 or alone. At last, *Shewanella* sp. TC11 is impacted by all the other partners but

appears to induce a negative effect on them too. Overall the fact that only the supernatant of TC5 seems to have an inhibitory effect on TC10 suggest that this inhibition may be due to the secretion of molecule(s) in the supernatant. Whether TC5 is able to secrete these component(s) in ASW and in presence of other bacteria is not known. It is interesting to note that TC5 induces two of the biggest diminution of biofilm biovolumes on TC10 (Δ -2.94) and on TC11 (Δ -3.6), while TC4 induces only one important diminution over TC11 biofilm (Δ -3.1) and TC11 induces another one over TC10 biofilm (Δ -2.94). Therefore, even though, TC5 negatively impacts only two strains TC10 and TC11, both effects are among the strongest.

The bispecific biofilm of TC4 and TC10 unravels the production of a newly secreted compounds in the matrix compared to when grown in their monospecific biofilm

In order to better understand if the increase of the biofilm formation of *Percisivirga mediterranea* TC4 (and in a lesser extent of *Shewanella* sp. TC10) could be due to a modification of the matrix composition, different compounds of the matrix were tagged with fluorescent markers after 48h of biofilm formation and analyzed using CLSM (figure 42). The results showed that when the two strains were together, sialic acids residues or N-acetyl-glucosamine (detected by WGA) were detected (figure 42.I) as well as proteins (labelled by SyproRuby) similar to when TC10 was alone (figure 42.II and figure 39). The production of eDNA was also observed similar to when TC4 was alone (figure 42.III). No production of glycoprotein or β -galactose residues were detected by PNA as it was also the case when both strains were grown alone (figure 42.IV). Surprisingly the association of the two bacteria triggered the production of exopolysaccharides made of mannose and glucose (detected by ConA), while these exopolysaccharides were not observed in the monospecific biofilm (figure 42.V and 45 SF). Therefore, it is possible that the association between TC10 and TC4 leads to the production of a newly secreted compound in the matrix that may be responsible for the TC4 increased biofilm as it has been previously shown with other bacteria (Zogaj et al., 2001).

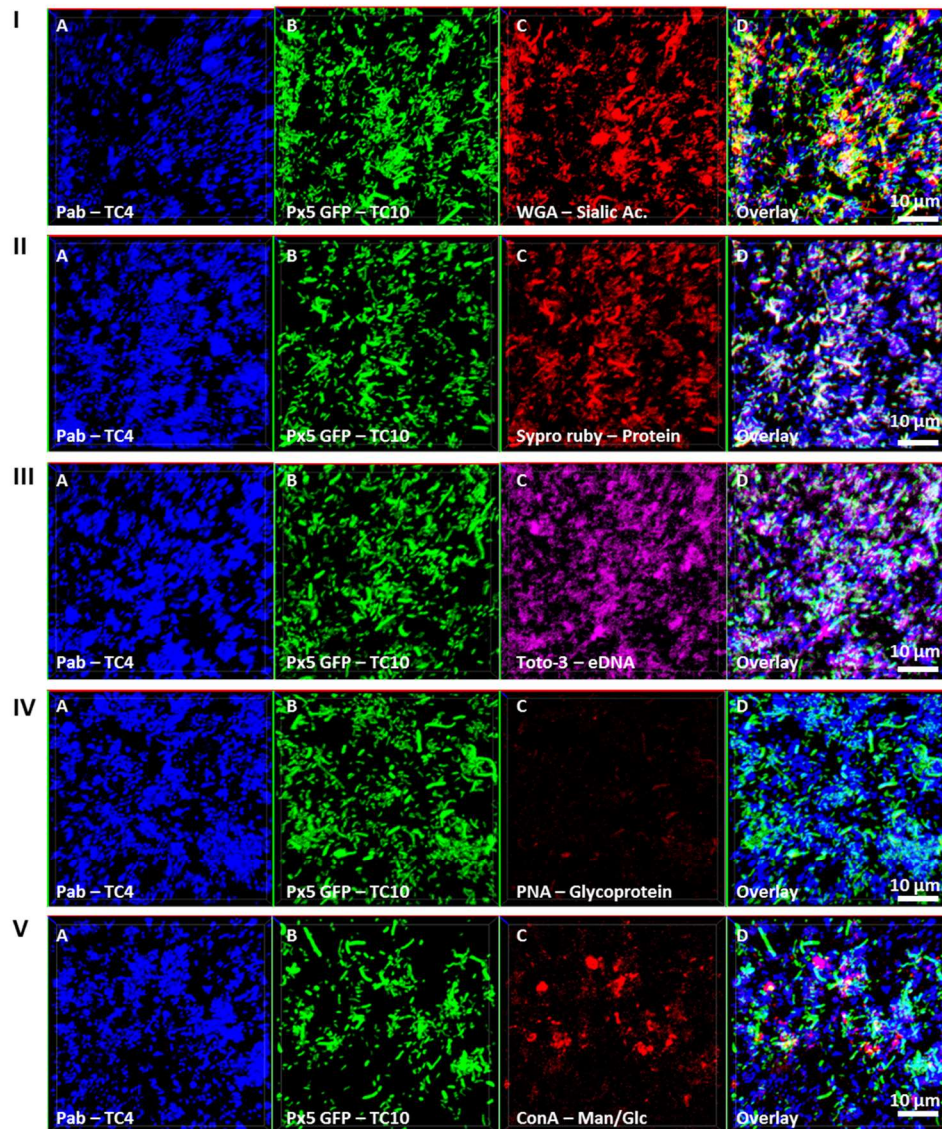


Figure 42: Exopolymeric matrix secreted in the bispecific biofilm of TC4 and TC10 after 48h of incubation in ASW. The exopolymeric substances were tagged by various fluorochromes (exopolysaccharides of sialic acids by WGA lectins (I), proteins by Sypro Ruby (II), eDNA by TOTO3 (III), exopolysaccharides containing glycoproteins by PNA lectins (IV) and exopolysaccharides of glucose and/or mannose by Concanavaline A (V)).

The inhibitory effect of TC11 does not affect the beneficial interactions between TC10 and TC4

In order to know if the synergetic effect detected in the *P. mediterranea* TC4 and *Shewanella* sp. TC10 bispecific biofilm could take place in a three-species biofilm and could be inhibited by *Shewanella* sp. TC11, TC11 was added to this biofilm as it is the only strain able to impact both TC4 and TC10. Similar to the bispecific biofilms, TC4, TC10, and TC11 were inoculated in the same proportion on to glass coverslips and the biofilms were studied at 24 and 48h using CLSM.

In the three-species biofilm comprising TC4, TC10 and TC11, TC4 still presented a significant increase of the biofilm biovolume at 24h and at 48h (figure 43.D). Thus, the presence of TC11, which was the only strain able to negatively impact the TC4 biofilm in the bispecific biofilm, did not induce a diminution of the TC4 biovolumes in presence of the 3 strains. While the TC4 ability to adhere on the surface strongly decreased at 24h in the TC4 and TC11 bispecific biofilms (figure 41.C), here the biovolume of TC4 at 24h was more important than in the TC4 monospecific biofilm. This could suggest a synergetic effect of TC10 stimulating and protecting TC4 against TC11. In the three-specific biofilm, the biovolume of TC10 increased slightly between 24h and 48h, while the one of TC11 diminished significantly. The morphology of TC10 at 24h, which presented the same distinctive big and/or filamentous shapes than in the bispecific biofilm with TC11, changed toward smaller bacteria at 48h similarly to when cultivated alone (figures 43.E and 41.I.B). This is probably due to the reduction of the presence of TC11, similar to the results observed in the bispecific biofilms, where TC11 seemed to trigger filamentation of TC10 (figure 41.II.D and F). Since TC11 was impacted by all the bacteria in the bi-species biofilms, the TC11 biofilm decreased sharply in the tripartite biofilm, probably under the effect of both TC10 and more importantly TC4 (**figure 43.B**). Therefore, in this situation, it is TC11 that suffered the most of the presence of the two other partners, even though TC11 was able to negatively impact TC10 and in a lesser extent TC4 in the bispecific biofilms.

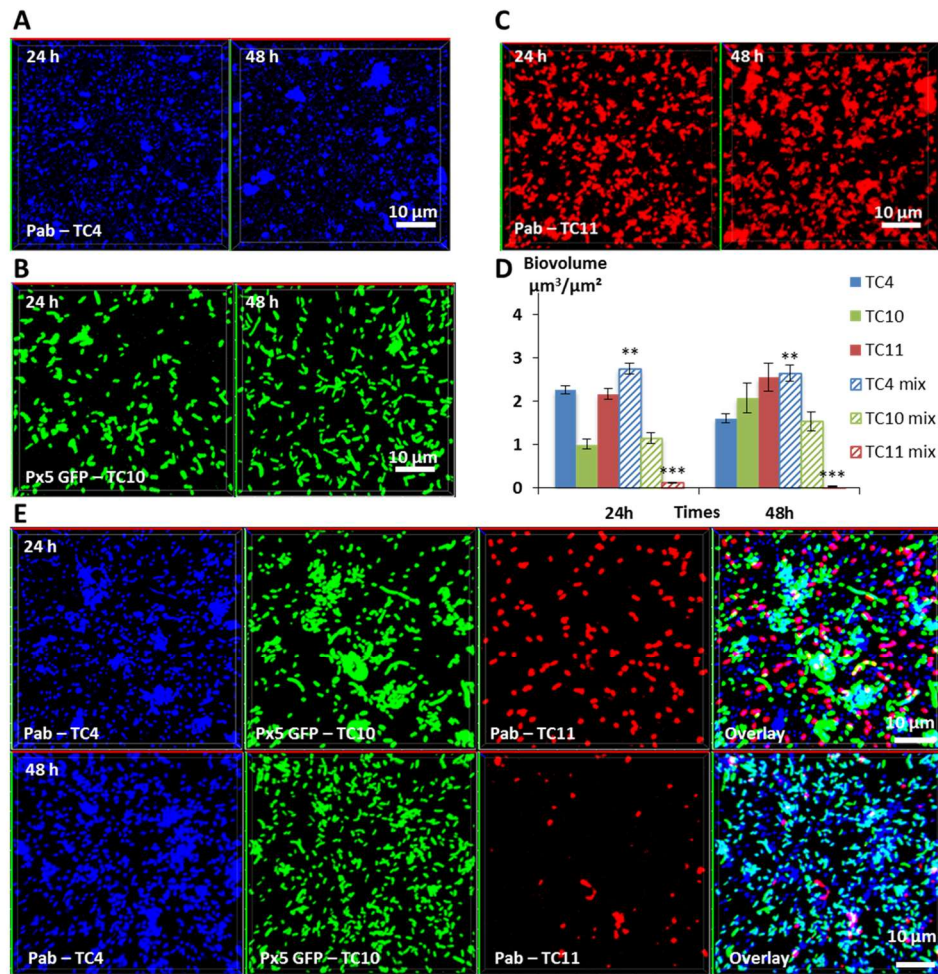


Figure 43: Biovolumes and spatial patternings of bacteria in three-species biofilms after 24h or 48h of incubation in ASW. Representative Images of the single-species biofilms with *Persicivirga mediterranea* TC4 (A), *Shewanella* sp. TC10 (B) and *Shewanella* sp. TC11 (C). (D) Biovolumes of each strain in three-species biofilms compared to when incubated alone. (E) Representative spatial patterning images after 24h or 48h of bacteria in three-species biofilms. Values are the mean of three replicates, error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant difference to the strain incubated alone (p: **<0.01 and ***<0.001).

TC5 outfits its competitors in a four species biofilm

In order to know which of the 4 bacteria would overtake the other ones in a four-species biofilm, the biofilm comprising the four bacteria inoculated in the same proportion onto glass coverslips was monitored using CLSM at 24h and 48h (figure 44). After 24h, the TC4 biovolume was not modified in the presence of its 3 other partners compared to its monospecific biofilm (figure 44A, 44E and 44F) similarly to the results obtained in the bispecific and three-specific biofilms. For all the other strains, the biofilm biovolumes decreased sharply at 24h. However, at 48h, TC4 decreased strongly while TC11 maintained its biofilm at the same level between 24h and 48h in the four-species biofilm. While TC10 was subjected to a small but significant increase, it is TC5 which displayed the more important growth at 48h compared to 24h. Therefore, even

though, they were all impacted compared to their respective monospecific biofilms, TC5 was able to regain a stronger biofilm at 48h. It is possible that the fact that TC5 displayed a strong inhibition on TC11 and TC10 in the bispecific biofilms, which might have impacted the TC4 growth indirectly, might have made TC5 the strongest fit in this four-species biofilm.

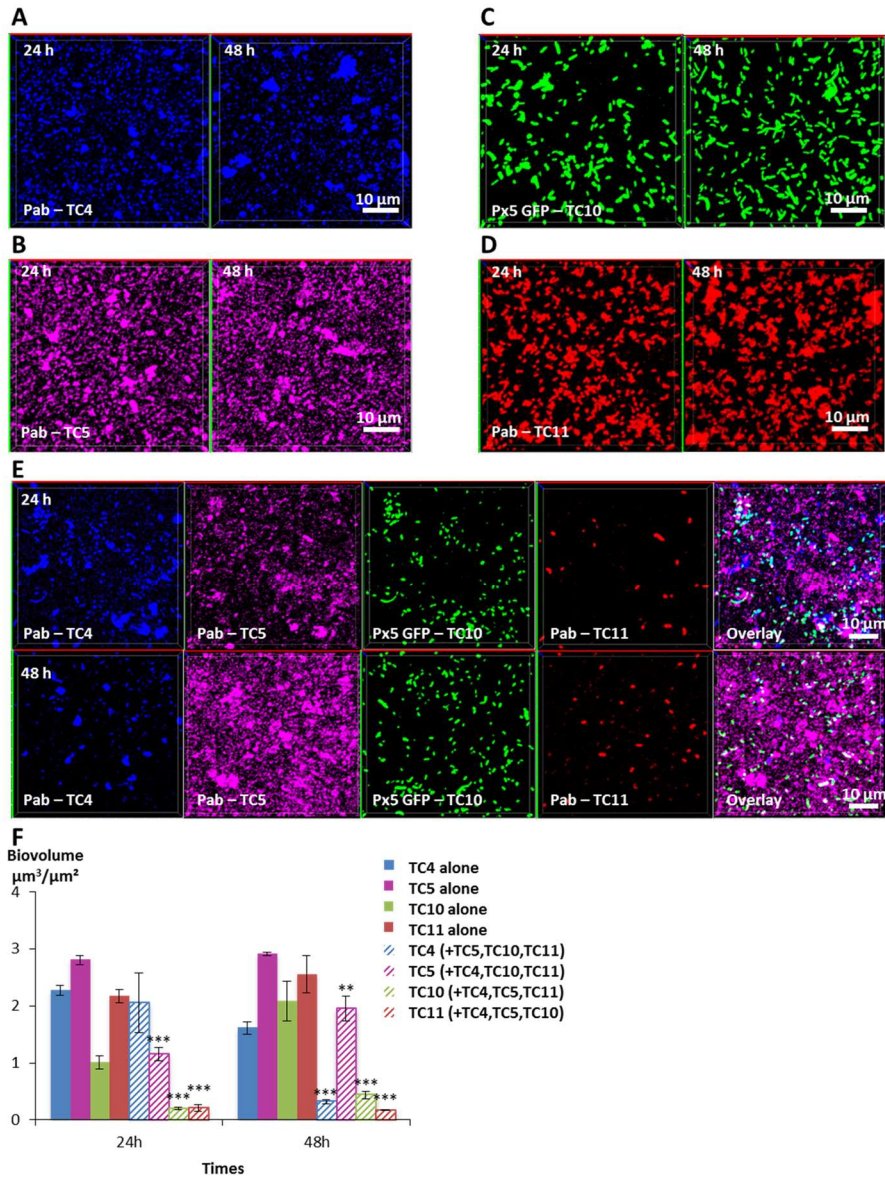


Figure 44: Biovolumes and spatial patternings of bacteria in four-species biofilms after 24h or 48h of incubation in ASW. Representative images of the single-species biofilms with *Persicivirga mediterranea* TC4 (A), *Polaribacter* sp. TC5 (B), *Shewanella* sp. TC10 (C) and *Shewanella* sp. TC11 (D). (E) Representative spatial patternings after 24h or 48h of development in four-species biofilms. (F) Biovolumes of each strain in four species biofilms compared to when incubated alone. Values are the mean of three replicates, error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant difference to the strain incubated alone (p: **<0.01 and ***<0.001).

Discussion

In this study, we decided to pursue the comparison between the different biofilm formation abilities of several marine strains isolated from the Mediterranean sea (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014), with the objectives to understand to which extent they capacity of adhesion and biofilm formation are different in other conditions and how they could interact and compete with each other when cultivated in multispecies biofilm. In order to get closer from the natural marine environment and to induce bacterial metabolic or competitive interactions, we used artificial sea water for all the experiments. To set up multispecies biofilms, we selected four strains with different phenotypical particularities and abilities to adhere and to form biofilms (Brian-Jaisson et al., 2014; El-Kirat-Chatel et al., 2017), hypothesizing that even if in some conditions bacteria appear to produce more biofilms than others, the outcome in a multispecies biofilm is not easily predictable, due to the existence of multiple types of interactions (antagonistic, synergetic..). The four strains displayed different characteristics in terms of adhesion, biofilm formation, hydrophobicity, motility (Brian-Jaisson et al., 2014). TC4 a newly identified species of *Persicivirga mediterranea*, and TC5 a *Polaribacter* strain, characterized by a higher hydrophobicity, both non-motile rods produced small biofilms when cultivated in microplates and rich media. Two motile bacilli belonging to the *Shewanella* genus, TC10 and TC11 appeared to produce more biofilm in the same conditions (Brian-Jaisson et al., 2014). In addition, TC11 formed an important biofilm when inoculated in ASW on glass surface at high OD_{600nm}, compared to TC5 and TC10 (El-Kirat-Chatel et al., 2017). However, using Atomic Force Microscopy (AFM), TC11 appeared to display a phenotypic heterogeneity in the very early stage of the adhesion in sharp contrast with TC5 or TC10 (El-Kirat-Chatel et al., 2017).

In this study, we show that the strain which adhered and covered the most the surface when in monospecific and static conditions is a strain initially described as a poor biofilm producer *Persicivirga mediterranea* TC4 (Brian-Jaisson et al., 2014). Overall, the development of most bacterial biofilms within the multispecies biofilms appears to be altered compared to the development of their respective single species biofilm, with the exception of TC4. In two- and three species biofilms, this strain is the only one able to benefit from its interaction with one of its partners, here *Shewanella* sp. TC10. In the four-species biofilm, *Polaribacter* sp. TC5 outfits all the other strains, including TC4, but its biofilm biovolume is still below the one measured in its monospecific biofilm. In contrast, the strain which appears to be overall the most impacted is *Shewanella* sp. TC11. In bispecific biofilms, TC11 appears to be impacted negatively by all

the strains and to be outfitted by its partners in the three- and four-species biofilms. However, since none of the TC11 cells have completely disappeared at 48h, it is possible that due to its potential phenotypical heterogeneity (El-Kirat-Chatel et al., 2017), presumably increasing its bacterial fitness, this strain could become a tolerant slow-growth subpopulation and/or could play a role in the overall growth fitness and spatial organization of the multispecies biofilm, as it has been recently shown (Liu et al., 2017; Grote et al., 2015). Specific sub-population of persister bacteria corresponding to phenotypic variants, which emerge under stressful conditions such as nutrient limitation, antibiotic pressure, or transition from planktonic to biofilm state, may be still present in small proportions in the biofilm. Quorum sensing and/or horizontal genes transfer may alter gene expression of the bacteria and be responsible for the persister phenotype (Wen et al., 2014; Grote et al., 2015). On another hand, TC11 might simply be less resistant to harsh or competitive conditions such as in multispecies biofilms than the other strains.

In our case, the only strain which appears to secrete molecule(s) with an anti biofilm activity is *Polaribacter* sp. TC5. However, we show that the TC5 supernatant inhibits the *Shewanella* sp. TC10 biofilm but not the one of *Shewanella* sp. TC11, although TC5 is able to inhibit both *Shewanella* in their bispecific biofilms. This suggests that the secreted molecule(s) could be involved in TC10 inhibition while a direct interaction is required to inhibit TC11. Therefore, in our experiments, TC5 is potentially able to inhibit the two *Shewanella* strains TC10 and TC11 biofilms through different mechanisms. Whether this secretion has help TC5 to outcompete in particular at 48h the others strains in the four species biofilm is not known. Some bacteria may secrete enzymes that could interfere with mechanisms involved in this secretion or counteract the secreted effectors and therefore could interfere with a specific population beneficial phenotype (reviewed in(Sanchez-Vizueté et al., 2015)). In addition, direct or physical interactions between bacteria, which involve for instance horizontal gene transfer (HGT), could have taken place between the isolates, inducing different phenotypical consequences on the receiver (Sanchez-Vizueté et al., 2015). For instance, they could be responsible for the upregulation of genes that promote persistence in microbial communities through the ability to invade a new niche or to improve its performance in its current niche. HGT is an efficient mechanism to improve adaption and to originate new ecological populations (reviewed in (Wiedenbeck and Cohan, 2011)). Although, we have tried repeatedly to transform the four strains with plasmids carrying GFP without success, except for TC10, this does not mean that gene transfer cannot occur in these biofilms conditions. It is interesting to note that TC4 and

TC5 secrete mainly eDNA in their matrix in sharp contrast with TC10 and TC11 and that in TC10 and TC4 bispecific biofilms, eDNA was still present. As explained by Wiedenbeck *et al.*, adaptive HGT occurs mainly “through promiscuity of genetic exchange and the shortness of segments” (Wiedenbeck and Cohan, 2011). Overall, how these mechanisms take place within multispecies biofilms are difficult to decipher and poorly studied up to now.

In our study, we clearly witnessed competition between most bacteria through the inhibition of their biofilm. In the bispecific biofilms, *Percisivirga mediterranea* TC4 is the only bacteria able to benefit from *Shewanella* sp. TC10, and to not be impacted by *Polaribacter* sp. TC5. Overall, TC4 appeared to cope better with the presence of the other partners, while TC5 induced two of the biggest diminution of the biofilm biovolumes on the *Shewanella* TC10 and TC11 strains. Interestingly, TC4 and TC10, produced a newly secreted compound (exopolysaccharide made of mannose and glucose residues), that was not present in their respective monospecific biofilm. When TC11 is added to the bispecific biofilm of TC4 and TC10, the inhibitory effect of TC11 observed independently in the bispecific biofilms towards TC10 and TC4, does not affect the beneficial interactions between TC10 and TC4 in the three-species biofilm. Cooperative phenotypes could include the production of exopolymers in the biofilm matrix which can enhance biofilm-related properties, such as resistance or growth. Secreted molecules can also be considered as cooperative public goods as they can be utilized by bacteria that are not producing them. The mechanisms by which public goods-producing bacteria avoid exploitation in biofilm is not fully understood. Public goods usually benefit nearby clonemates and factors such as restricted diffusion of nutrients, inoculation under flow or at low density are benefiting the public goods producing bacteria (Drescher *et al.*, 2014; van Gestel *et al.*, 2014). While studies on the mechanisms involved in competition or synergy are rare in multispecies biofilms, a transcriptomic study focusing on gene expression analyses in multispecies biofilms involving *Xanthomonas retroflexus*, has recently shown that the majority of the genes only regulated in the four strains biofilm were downregulated, suggesting that *X. retroflexus* seems to deprioritize vital functions for mono species cultures as partners in the four species biofilm may share products from energy-consuming pathways (Hansen *et al.*, 2017).

Numerous studies focusing on spatial organization, tend to show that bacteria reside in multispecies biofilms by positioning themselves in response of interspecific interactions as it may help bacteria enhancing their fitness and influences community assembly and function. (reviewed in (Liu *et al.*, 2016)). It has been shown that two distinct bacteria are expected to intermix, if both are found in strong cooperative interactions and benefit from being spatially

located closed to each other (Momeni et al., 2013b). In our case, we noticed that TC10 appear to avoid TC5 in the four-species biofilm at 24h and 48h as well as in the two-species experiments, while TC10 and TC4 labelling often overlapp in the two-, three- and four species biofilms, in accordance with the fact that both strains appear to be beneficial to each other. TC4 and TC5 appear also to stay away from each other, although while TC4 inhibits the TC5 biofilm, TC4 does not appear to mind the presence of TC5 except in the four-species biofilm. Similarly, TC11 tend to avoid TC4 and somewhat TC10 but not TC5, while they are inhibiting each other. The reason why TC5 and TC11, which have both a negative impact on each other biofilm, are not staying away from each other is not known. In our study, we only observed the initial stage of the biofilm development in relation to the initial interactions. A longer incubation time might have given a different organization. However, mechanisms explaining how interspecies interactions affect spatial organization are poorly understood as it corresponds to complex and multiples dynamics sequential events involving many external parameters. Growth of some strains might be initially affected by both cooperative and competitive interactions, but this interrelationship might change over time with the development of the community in response to both cell-cell interactions and environmental factors. For instance, types of cell-cell interactions such as exploitation might be transient as the selective pressure upon the partner benefitted from may induce modifications in order for this partner to avoid being exploited (Liu et al., 2016).

References

- Angeloni, S., Ridet, J.L., Kusy, N., Gao, H., Crevoisier, F., Guinchard, S. et al. (2005) Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. *Glycobiology* **15**: 31-41.
- Bazire, A., Shioya, K., Soum-Soutera, E., Bouffartigues, E., Ryder, C., Guentas-Dombrowsky, L. et al. (2010) The sigma factor AlgU plays a key role in formation of robust biofilms by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**: 3001-3010.
- Bloch, S., Thurnheer, T., Murakami, Y., Belibasakis, G.N., and Schaffer, C. (2017) Behavior of two *Tannerella forsythia* strains and their cell surface mutants in multispecies oral biofilms. *Mol Oral Microbiol* **32**: 404-418.
- Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magne, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y., and Molmeret, M. (2014) Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microb Ecol* **68**: 94-110.
- Burmolle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sorensen, S.J., and Kjelleberg, S. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3916-3923.

- Camps, M., Briand, J.F., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Bazire, A., and Blache, Y. (2011) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Mar Pollut Bull* **62**: 1032-1040.
- Drescher, K., Nadell, C.D., Stone, H.A., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. (2014) Solutions to the public goods dilemma in bacterial biofilms. *Curr Biol* **24**: 50-55.
- El-Kirat-Chatel, S., Puymege, A., Duong, T.H., Van Overtvelt, P., Bressy, C., Belec, L. et al. (2017) Phenotypic heterogeneity in attachment of marine bacteria toward antifouling copolymers unraveled by AFM. *Front Microbiol* **8**: 1399.
- Favre, L., Ortalo-Magne, A., Greff, S., Perez, T., Thomas, O.P., Martin, J.C., and Culioli, G. (2017) Discrimination of four marine biofilm-forming bacteria by LC-MS metabolomics and influence of culture parameters. *J Proteome Res* **16**: 1962-1975.
- Filoche, S.K., Anderson, S.A., and Sissons, C.H. (2004a) Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **19**: 322-326.
- Filoche, S.K., Zhu, M., and Wu, C.D. (2004b) In situ biofilm formation by multi-species oral bacteria under flowing and anaerobic conditions. *J Dent Res* **83**: 802-806.
- Goldstein, I.J., Hollerman, C.E., and Merrick, J.M. (1965) Protein-Carbohydrate Interaction. I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. *Biochim Biophys Acta* **97**: 68-76.
- Grote, J., Krysciak, D., and Streit, W.R. (2015) Phenotypic heterogeneity, a phenomenon that may explain why quorum sensing does not always result in truly homogenous cell behavior. *Appl Environ Microbiol* **81**: 5280-5289.
- Hansen, L.B., Ren, D., Burmolle, M., and Sorensen, S.J. (2017) Distinct gene expression profile of *Xanthomonas retroflexus* engaged in synergistic multispecies biofilm formation. *ISME J* **11**: 300-303.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., and Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* **146**: 2395-2407.
- Johnsen, A.R., Hausner, M., Schnell, A., and Wuertz, S. (2000) Evaluation of fluorescently labeled lectins for noninvasive localization of extracellular polymeric substances in *Sphingomonas* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3487-3491.
- Kuboniwa, M., Tribble, G.D., James, C.E., Kilic, A.O., Tao, L., Herzberg, M.C. et al. (2006) *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Mol Microbiol* **60**: 121-139.
- Lee, K.W., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., and Rice, S.A. (2014) Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J* **8**: 894-907.

- Liu, W., Roder, H.L., Madsen, J.S., Bjarnsholt, T., Sorensen, S.J., and Burmolle, M. (2016) Interspecific bacterial interactions are reflected in multispecies biofilm spatial organization. *Front Microbiol* **7**: 1366.
- Liu, W., Russel, J., Roder, H.L., Madsen, J.S., Burmolle, M., and Sorensen, S.J. (2017) Low-abundant species facilitates specific spatial organization that promotes multispecies biofilm formation. *Environ Microbiol* **19**: 2893-2905.
- Mårdén, P., Tunlid, A., Malmcrona-Friberg, K., Odham, G., and Kjelleberg, S. (1985) Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Archives of Microbiology* **142**: 326-332.
- Momeni, B., Waite, A.J., and Shou, W. (2013a) Spatial self-organization favors heterotypic cooperation over cheating. *Elife* **2**: e00960.
- Momeni, B., Briley, K.A., Fields, M.W., and Shou, W. (2013b) Strong inter-population cooperation leads to partner intermixing in microbial communities. *Elife* **2**: e00230.
- Neu, T.R., and Lawrence, J.R. (1999) Lectin-binding analysis in biofilm systems. In *Methods in Enzymology*. Doyle, R.J. (ed): Academic Press, pp. 145-152.
- Okshevsky, M., and Meyer, R.L. (2014) Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *J Microbiol Methods* **105**: 102-104.
- Pamp, S.J., Sternberg, C., and Tolker-Nielsen, T. (2009) Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. *Cytometry A* **75**: 90-103.
- Ren, D., Madsen, J.S., Sorensen, S.J., and Burmolle, M. (2015) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME J* **9**: 81-89.
- Roder, H.L., Sorensen, S.J., and Burmolle, M. (2016) Studying bacterial multispecies biofilms: where to start? *Trends Microbiol* **24**: 503-513.
- Sanchez-Vizueté, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., and Briandet, R. (2015) Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front Microbiol* **6**: 705.
- Sherry, L., Lappin, G., O'Donnell, L.E., Millhouse, E., Millington, O.R., Bradshaw, D.J. et al. (2016) Viable compositional analysis of an eleven species oral polymicrobial biofilm. *Front Microbiol* **7**: 912.
- Strathmann, M., Wingender, J., and Flemming, H.C. (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* **50**: 237-248.
- Stubbendieck, R.M., Vargas-Bautista, C., and Straight, P.D. (2016) Bacterial communities: interactions to scale. *Front Microbiol* **7**: 1234.

van Gestel, J., Weissing, F.J., Kuipers, O.P., and Kovacs, A.T. (2014) Density of founder cells affects spatial pattern formation and cooperation in *Bacillus subtilis* biofilms. *ISME J* **8**: 2069-2079.

Wen, Y., Behiels, E., and Devreese, B. (2014) Toxin-Antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog Dis* **70**: 240-249.

Wiedenbeck, J., and Cohan, F.M. (2011) Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 957-976.

Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D.R., Bork, P., and Patil, K.R. (2015) Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 6449-6454.

Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Romling, U. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **39**: 1452-1463.

Author contributions

RG has performed all the experiments of this article under the direction of MM and the co-direction of CB. The flow experiments have been performed under the direction of AB in the LBCM laboratory, Université of Bretagne-Sud, in Lorient. RG, helped by AB, set up the flow system experiments in the MAPIEM laboratory, UTLN, La Garde and to extract and analyze data from the related CLSM images.

Funding

RG is the recipient of a French PACA Region doctoral fellowship.

Supplementary Figures

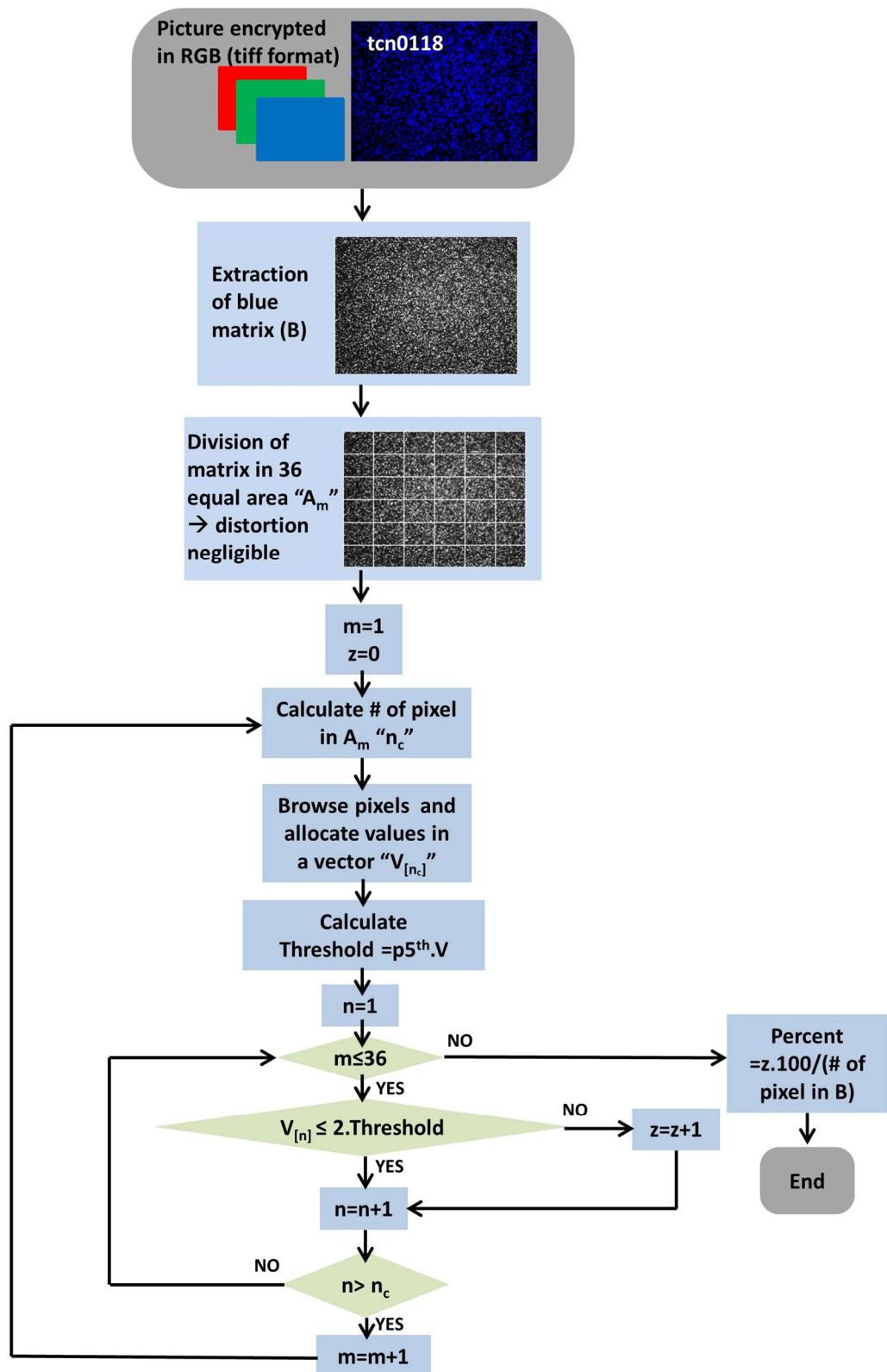


Figure 45: (Supplementary Figure) Flow chart of the processing of the epifluorescence pictures to calculate the percentage of bacterial coverage on the surfaces.

Ce graphique (Figure 45) représente les décisions qui sont prises lors du calcul du pourcentage de recouvrement à partir des images de microscopie à épifluorescence. A partir d'une image codé en RGB, la matrice contenant les données du bleu est extraite. Cette matrice est divisée en 36 zones égales afin de rendre négligeable la distortion inhérente à l'utilisation de la microscopie optique. Sur chaque zone, le seuil de fluorescence d'un pixel est défini par une valeur supérieure au double du percentile 5% de la totalité des valeurs de pixel de la zone. Pour finir, le pourcentage de recouvrement est défini comme le ratio entre le nombre de pixel fluorescent par rapport à la totalité des pixels d'une image.

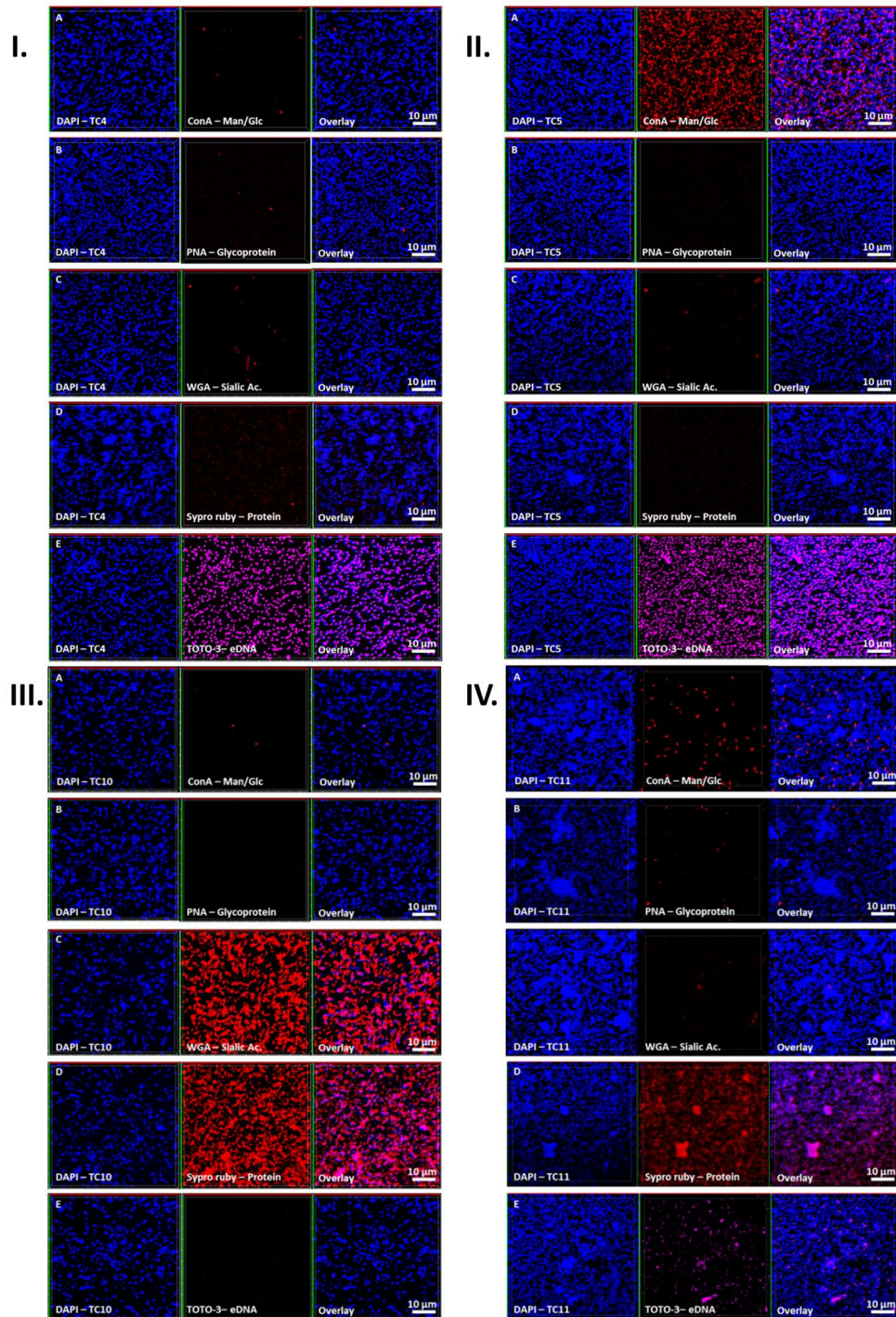


Figure 46: (Supplementary Figure) Exopolymeric matrix components secreted by the marine bacterial strains in ASW after 48h of static biofilm formation. Representative pictures of the labelled components secreted in the matrix of *Persicivirga mediterranea* TC4 (I), *Polaribacter* sp. TC5 (II), *Shewanella* sp. TC10 (III) and *Shewanella* sp. TC11 (IV) are presented. Different markers tagged with fuorochromes were used (Concanavaline A for exopolysaccharides of glucose and/or mannose (A), PNA for exopolysaccharides containing glycoprotein (B), WGA for exopolysaccharides of sialic acids by lectin (C), Sypro Ruby for proteins (D) and TOTO3 for eDNA (E)).

Ces photos (figure 46) mettent en évidence que sur l'ensemble des marqueurs utilisés, un certain nombre ne fluoresce pas en fonction des souches sur lesquels ils sont appliqués.

Chapitre III :
Etude des interactions entre différentes
bactéries marines et l'amibe *A.*
castellanii

Les amibes et protistes amiboïdes forment un groupe large et diversifié d'eucaryotes caractérisés généralement par différents types de pseudopodes. Ils représentent une part importante de la diversité eucaryotique. En 2007, il y a avait plus de 15 000 espèces décrites (Adl *et al.*, 2007). La campagne « Tara Oceans » a mis en évidence que la plupart de la biodiversité planctonique eucaryote au sein des groupes de protiste hétérotrophe pouvait être considérée comme étant des brouteurs de bactéries. Aujourd'hui pour les sédiments ou les zones benthiques, il n'y a pas de grandes campagnes océanographiques qui aient explorées la diversité micro-eucaryotique en milieu marin. Dans de multiples études, différents auteurs ont mis en évidence l'abondance des Rhizaria, parmi eux les taxons des Acantharea et Vampyrellidae et les Polycistines tandis que les Tubulinea semblent dominer chez les Amoebozoa (Forster *et al.*, 2016 ; Massana *et al.*, 2015 ; Park *et al.*, 2008). Les énumérations ont permis de mettre en évidence l'abondance des Rhizaria, parmi eux les taxons des Acantharea et Vampyrellidae et les Polycistines tandis que les Tubulinea semblent dominer chez les Amoebozoa (Forster *et al.*, 2016 ; Massana *et al.*, 2015 ; Park *et al.*, 2008). Les énumérations ont permis de mettre en évidence l'abondance des Rhizaria, parmi eux les taxons des Acantharea et Vampyrellidae et les Polycistines tandis que les Tubulinea semblent dominer chez les Amoebozoa (Forster *et al.*, 2016 ; Massana *et al.*, 2015 ; Park *et al.*, 2008).

Afin de complexifier le modèle du biofilm, il a été choisi d'étudier les interactions entre un panel de bactéries marines et un de leurs principaux prédateurs, les amibes. Dans un premier temps, différentes amibes marines que nous avons commandées à des centres internationaux de collections de cultures d'organismes marins (Culture Collection of Algae and Protozoa, Scottish Marine Institute, Dunbeg, Oban, UK), telles que *Acanthamoeba griffini* CCAP 1501/4 ou *Vahlkampfia dummonica* CCAP 1588/9 ont été cultivées au laboratoire. Cependant, du fait des difficultés pour axéniser ces cultures et du manque d'information générale sur ces souches, un organisme modèle a été choisi. L'amibe *Acanthamoeba castellanii* est un organisme ubiquiste qui a été isolé à partir de différentes sources incluant le sol, les eaux naturelles ou artificielles (comme les réseaux de distribution) et les eaux marines (Fernandez *et al.*, 1989 ; Page, 1983 ; Rogerson et Laybourn-Parry, 1992 ; Sawyer, 1980). De plus, les amibes libres telles qu'*A. castellanii* sont considérées comme des brouteurs sur surfaces. Par conséquent, des bactéries en biofilm pourraient donc partager la même niche écologique que les bactéries de la collection de Toulon (Huws, McBain, et Gilbert, 2005 ; Seiler *et al.*, 2017). Elle a également

l'avantage d'être utilisée comme modèle dans les interactions bactérie/amibe avec différentes souches bactériennes y compris des souches d'origine marine (Hilbi et al., 2007 ; Laskowski-Arce et Orth, 2008 ; Reyes-Batlle et al., 2017 ; Van der Henst et al., 2016).

Les mêmes bactéries que précédemment ont été choisies. Comme expliqué au chapitre précédent, ces bactéries qui ont été isolées à partir de biofilm de la rade de Toulon, ont des capacités différentes à adhérer et à former du biofilm (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Camps *et al.*, 2011 ; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2017). On peut se demander si ces différences en terme de formation de biofilm par exemple peuvent influencer l'interaction qu'elles peuvent mettre en place avec l'amibe ou l'efficacité du broutage opéré par ce protozoaire. Il est intéressant de noter que *P. mediterranea* TC4 est également une espèce qui se détache le plus métaboliquement de ces compatriotes (Favre *et al.*, 2017) L'objectif est donc d'abord dans ce chapitre d'étudier les interactions amibe-bactérie 2 à 2 avant d'étudier dans le chapitre suivant ce que l'ajout de l'amibe sur les biofilms préformés de ces bactéries pourrait engendrer. Ces travaux font l'objet d'une publication qui est en cours de soumission.

Dans cette étude, les différents anticorps développés précédemment et dirigés contre ces 4 bactéries ont été utilisés afin de suivre le devenir des bactéries dans les amibes et de vérifier si l'association étroite des bactéries et des protozoaires aboutit à la mise en place de stratégies d'adaptation et de survie des bactéries ou si elles sont toutes rapidement digérées par l'amibe (Matz et Kjelleberg, 2005 ; Matz *et al.*, 2008).

Different intracellular trafficking of marine bacteria within amoeba cells: from expelled vesicles to the first description of an intranucleolar niche

Richard Guillonueau, Claudine Baraquet, Maëlle Molmeret

Laboratoire MAPIEM, EA4323, Université de Toulon, La Garde, France

Running title: Intracellular fate of marine bacteria in amoeba

Summary

Free-living amoeba are members of microbial communities in terrestrial, fresh and marine habitats. Protozoa are known to live in close association with bacteria, against which they are considered to be a major predator in many ecosystems. The first associations between amoeba and bacteria have been described for human pathogenic bacteria, which can multiply within its host. Other potential paths for bacterial adaptations against predation by protozoa have been recently described. Despite their potential importance, very little is known on protozoa, for which very few molecular and cellular tools, and genetic information are available. Overall, very few studies have focused on interactions between marine bacteria and protozoa. This is the first investigation of interactions between marine bacteria isolated from immersed biofilms displaying different phenotypical traits and the ubiquitous amoeba *Acanthamoeba castellanii*. Here, we show that each bacterium are following a singular intracellular path within this host cell. Among those, one of them appears to be expelled into vesicles outside the protozoan host. Using a CLSM colocalization approach with the nucleolin, we also made the first original observation of an intranucleolar bacteria within an eukaryotic host cell.

Keywords: Marine bacteria, amoeba, intracellular trafficking, vesicles expulsion, intranucleolar niche

Introduction

Protozoa such as free-living amoeba are important members of microbial communities in all terrestrial, fresh and marine environments. Protozoa are known to live in close association with bacteria in many ecosystems such as biofilms (Matz et al., 2008a). Predation by protozoa is considered to be the leading cause of bacterial death (Sherr and Sherr, 2002). Nowadays, studies are mostly focused on understanding the physiology and regulation of sessile bacteria without enough taking in consideration other major players of microbial communities (Matz et al.,

2008a). The close association of bacteria and protozoa in biofilm and their long co-evolutionary history are thought to give rise to a series of bacterial adaptations ensuring survival and coexistence (Matz and Kjelleberg, 2005). Protozoa are considered like a “Trojan horse” for the selection of pathogen bacteria (Barker and Brown, 1994; Molmeret et al., 2005). In marine environment, protozoa could be having a major impact on the selection of bacteria in biofilm ecosystem and on the selection of pathogens in aquaculture. Studies on the coexistence of bacteria and protozoa including amoeba in the environment are emerging but little is known on the establishment of this type of relationship in particular when marine microorganisms are considered.

The first interactions between amoeba and bacteria that have been reported involved human pathogenic bacteria (Rowbotham, 1980; Molmeret et al., 2005). Since then, various potential routes of bacterial adaptations against predation by protozoa have been described. Two types of bacterial adaption or resistance towards amoeba has been recently proposed: pre-ingestional and post-ingestional with various adaptation strategies associated with bacterial size or grouping, bacterial speed, amoeba surface masking, digestional resistance, toxin release or intracellular growth (Matz and Kjelleberg, 2005). In recent years, original interactions have also been discovered in marine environments. For instance, several intranuclear bacterial symbionts of marine amoeba have been identified (reviewed in (Schulz and Horn, 2015)). While different types of interactions have been described with various bacteria, mostly human pathogens, very few studies have been interested in interactions between marine and more widely non-pathogenic bacteria with protozoa, their intracellular fate and the potential outcome within the microbial communities.

Different marine bacteria have been isolated from biofilm recovered from Toulon bay, France (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014). These bacteria have been identified and characterized on their capacity to swim, adhere and form a biofilm *in vitro* in different conditions (Brian-Jaisson et al., 2014). Among the Toulon collection (TC) strains, we have identified, a new species of *Persicivirga* named *mediterranea* (TC4), a species belonging to the *Polaribacter* genus (TC5), and 2 strains of *Shewanella* (TC10 and TC11). In this study, we have investigated the interactions between these four different marine bacterial strains selected on the basis of their phenotypical differences (Brian-Jaisson et al., 2014; El-Kirat-Chatel et al., 2017; Favre et al., 2017) and an amoeba susceptible to occupy the same ecological niche, the ubiquitous axenized amoeba, *Acanthamoeba castellanii*. *A. castellanii* has been isolated from various sources including soil, natural and tap waters as well as marine samples (Sawyer, 1980;

Page, 1983; Fernandez et al., 1989; Rogerson and Laybourn-Parry, 1992) and has been used as a model organism for bacteria-amoeba interaction studies with different bacteria, including marine bacteria (Hilbi et al., 2007; Laskowski-Arce and Orth, 2008; Van der Henst et al., 2016; Reyes-Batlle et al., 2017). We show that first all the bacteria are phagocytized within the protozoan cells and that bacterial uptake occurs at very different efficiency; second, none of them are totally eliminated by *A. castellanii* during the 48h incubation, even when inoculated at low concentration; third and most importantly, each bacteria are following a singular intracellular fate. Among these intracellular paths, *Shewanella* sp. TC11 appears to be expelled from the amoeba in vesicles at 24h and we made the first observation of an intranucleolar bacteria (*P. mediterranea* TC4) within an eukaryotic host cell.

Results

A. castellanii phagocytizes the marine bacteria TC5, TC10 and TC11.

To study marine bacteria-amoeba interactions, a medium in which both partners could survive, without replicating, had to be selected. Among a set of media tested (data not shown), NSS, which tends to mimic the marine environment composition, appeared to be the most promising one. NSS did not induce a significant decrease in the overall bacteria and amoebae number and, none of them grew either in this low nutrient solution (figure 52 SF). The advantage low nutrient media is that they tend to promote interactions between both partners (Schulz et al., 2014).

To know if bacteria could exert a potential cytotoxic effect on the protozoan cells, propidium iodide was used on the protozoa incubated with each of the strains at MOI 100 . The results show that none of the bacteria triggered a cytotoxic effect on *A. castellanii*, similar to the non-infected cells and in sharp contrast with the formalin-killed control samples (figure 53 SF).

With the purpose of evaluating the bacterial fate when cocultured with amoeba, amoeba were cultivated in the presence of bacteria in NSS, lysed, harvested then bacteria cells were enumerated within lysed amoeba cells (figure 54 SF). An absence of bacteria cells within amoeba would generally suggest an absence of phagocytosis, a decrease of bacteria cells count over time would indicate that the phagocytosis is followed by a digestion of bacteria or a release of bacteria in the medium, whereas an increase in bacteria numeration would indicate a replication of bacteria within the amoebal cells. Our results showed that intracellular bacteria CFU decreased significantly for TC5, TC10 and TC11 by a factor 10 to 1000 depending on the bacteria (figure 54 SF). For TC4, no bacteria could be detected, however in contrast with the

other strains, TC4 appeared sensitive to the triton treatment used for amoeba cell lysis (data not shown).

Taken together, these results show that when cultivated alone in NSS, the overall proportion of amoeba and bacterial cells in the coculture experiments did not show variations over 48h. However when in interaction, no bacteria cytotoxic effect toward amoeba was detected but an overall decrease of intracellular bacterial concentrations for TC5, TC10 and TC11, suggesting that a phagocytosis of bacteria by the amoeba occurs, followed by bacterial digestion and/or release.

All the marine bacteria are phagocytized in different proportion and persist over 48h within *A. castellanii*

To characterize the mechanisms behind the phagocytosis events, the interaction between *A. castellanii* and the four bacterial marine strains were analyzed using CLSM. The monitoring of the coincubated micro-organisms over the 48h time period using CLSM shows that bacteria were phagocytized by *A. castellanii* in different proportions and appeared to display different behavioral patterns (figure 47 and 48). The evaluation of the presence of intracellular bacteria within *A. castellanii* indicates that most (i.e 90%) of all amoeba contained *P. mediteranea* TC4 at both MOI 10 and MOI 100 (figure 47A) at all time points. The fact that no increase or decrease of the number of infected cells was observed suggests some stability in the interaction over time. *Shewanella* sp. TC11 was present in most amoeba at T0h (about 99%), but their numbers sharply decreased from T24h at both MOI and reached about 57% and 19% at MOI 10 and 100, respectively at T48h (figure 47B). For *Polaribacter* sp. TC5, only 50% at MOI 10 and 72% at MOI 100 could be observed at most (figure 47C). A significant decrease of infected cells was observed after 24h at both MOI and this number stayed stable up to 48h. The phagocytosis of *Shewanella* sp. TC10 was observed in about 21% or 53% of the cells at MOI 10 and 100 respectively from T0h (figure 47D). These numbers decreased as well afterward but bacteria were still present within cells at T48h. Therefore, these results show that *A. castellanii* phagocytosis occurred at different rate, and that marine bacteria behave in a different manner once inside, which could suggest that they utilize different mechanisms to circumvent rapid amoebal predation, since the four bacteria are still present at 48h.

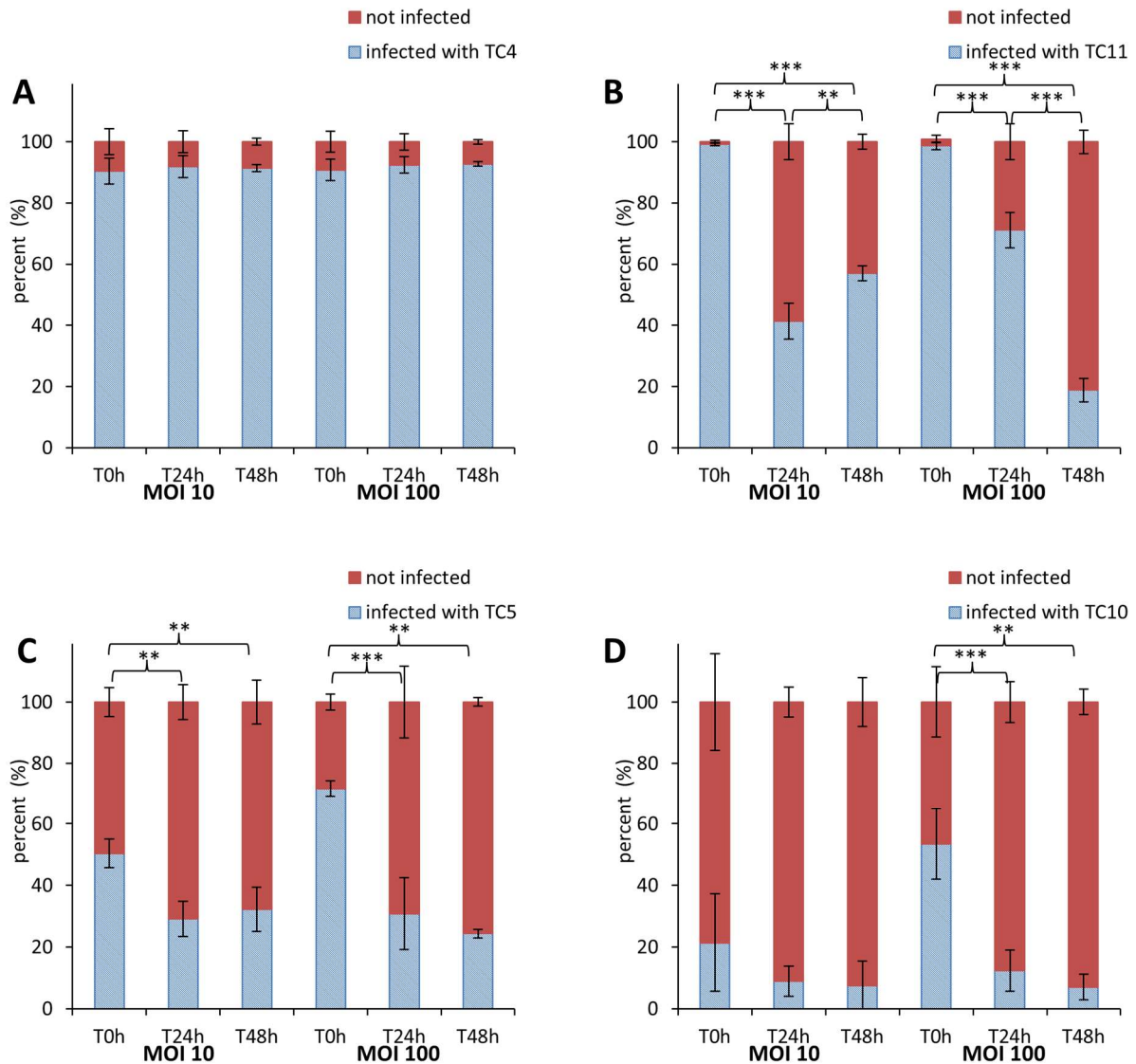


Figure 47: The marine bacteria are phagocytized and persists within *A. castellanii* over 48h. Kinetics of *A. castellanii* infection was monitored over a course of 48h at MOI 10 and MOI 100 by marine bacterial strains: *Persicivirga mediterranea* TC4 (A), *Schewanella* sp. TC11 (B), *Polaribacter* sp. TC5 (C) and *Schewanella* sp. TC10 (D). The percentage of amoeba containing bacteria was determined at T0h, T24h and T48h. Values are the means of three replicates, error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences to the samples (P: **<0.01 and ***<0.001).

TC4 is located within the nucleolar compartment

Analysis of CLSM images show that most of the protozoan cells have invaginated few TC4 (figure 48Aa-e). Most of the TC4 immunostaining appeared to be associated with the DAPI staining (figure 48Ae). The results show that at T0h more than 60% of the bacteria colocalized with DAPI and this number increased with incubation time, reaching 90% at 48h (figure 48A and 49A). It suggests that this bacterium is localized within or nearby the nucleus of the host cells. This observation could be made at all time points and at both MOI (data not shown), suggesting that the bacterium goes quickly (within the 3h of contact time) toward the nucleus area and stays in this intracellular niche for over 48h. The 3D images displayed in two axial

planes y/x and z/x (rotation of 3D images) showed that TC4 staining was mostly detected in the middle of the DAPI staining area, suggesting a central location of the bacteria in the nucleus (**figure 49A**). To confirm the location of TC4 in the amoeba nucleus, we performed TEM experiments. TEM photographs showed the presence of one to six electron dense structures of the size of a bacteria per amoeba (**figure 50a and b**). A large majority of these structures were observed in the nucleus of the amoeba and more precisely they were observed in the electron-dense area of the nucleus, corresponding to the nucleolar compartment. This result suggests that TC4 cells are located in the nucleolus of amoebal cells. To verify this observation, antibodies directed toward the nucleolin protein known to be located within the nucleolus were used (Lozano-Amado et al., 2016). The results show that at T0h around 50% of bacteria colocalized with the nucleolin labelling, demonstrating that bacteria were already located within the nucleolus by that time (**figure 49B and C**). At T24h and T48h, the proportion of bacteria colocalizing with the nucleolin labelling increased to reach over 60%. Therefore, more than half of TC4 are already associated with the host nucleolus within the first 3h of the contact time and stay there during at least 48h. Therefore, our data suggest that TC4 goes rapidly in the nucleolar compartment of the amoebal cells and stays there for a long period.

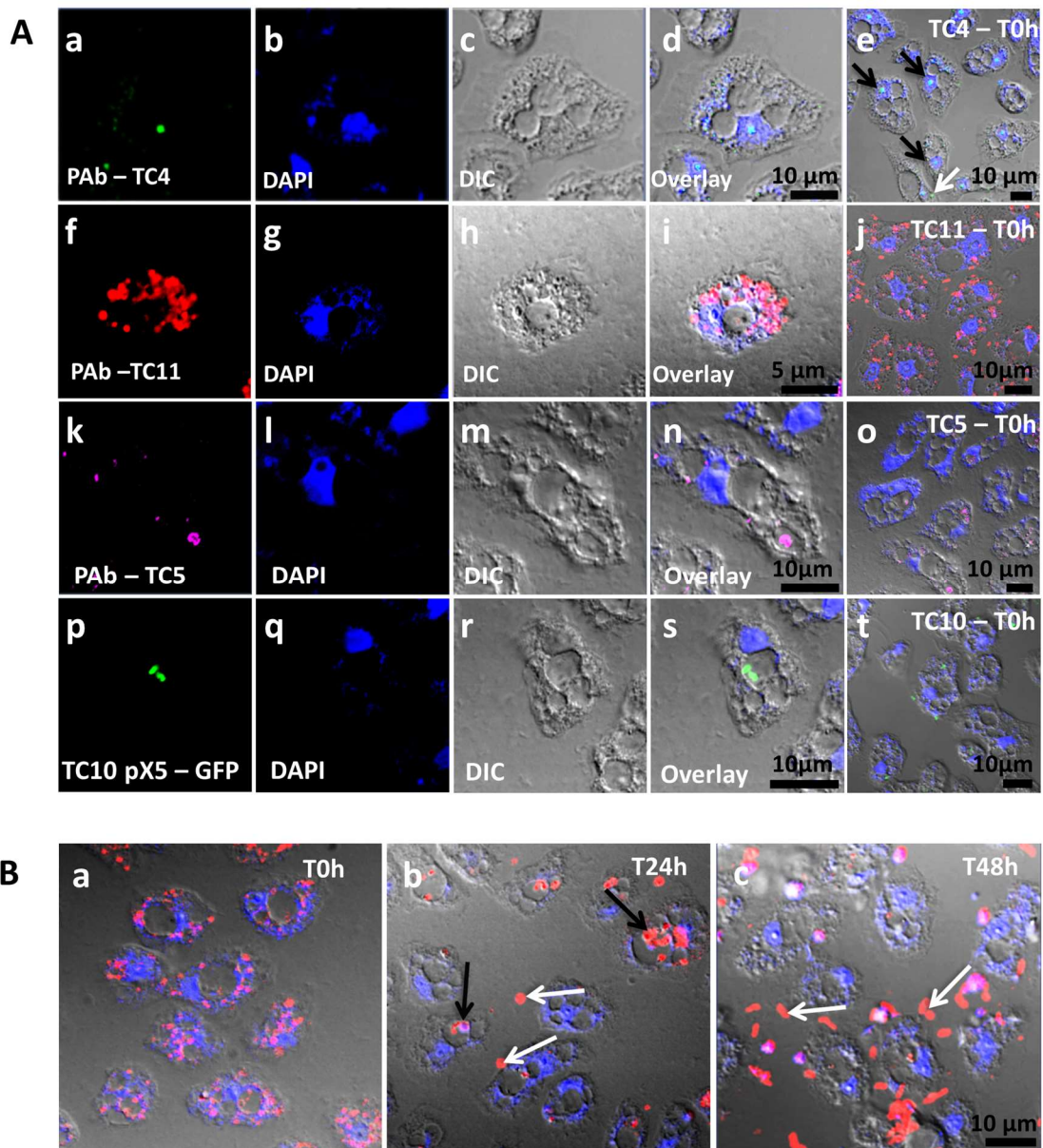


Figure 48: Bacteria are found in distinct locations within *A. castellanii*. (A) TC4 is located nearby the nucleus while TC5, TC10, TC11 are cytoplasmic. *Persicivirga mediterranea* TC4 (a, b, c, d, e) was visualized using FITC (green)-conjugated polyclonal antibodies (PAb)(black arrows: nuclear bacteria; white arrows: cytoplasmic bacteria). *Shewanella* sp. TC11 (f, g, h, i, j) was labelled with Alexa Fluor 594 (red)-conjugated PAb. *Polaribacter* sp. TC5 (k, l, m, n, o) was observed with PAb conjugated to Alexa Fluor 633 (magenta). *Shewanella* sp. TC10 (p, q, r, s, t) harbored the plasmid pX5-GFP (green). For all bacteria, pictures were taken using CLSM at T0h and at MOI 100. (B) TC11 is expelled in vesicles out of the cells over a course of 48h. *Shewanella* sp. TC11 was observed in association with amoeba at MOI 100 at T0h (a), T24h (b), T48h (c) (g and h black arrows: intracellular bacteria-filled vesicles; white arrows: expelled bacteria-filled vesicles). In each picture, amoeba were observed using DAPI (blue) and with the corresponding DIC picture of the CLSM.

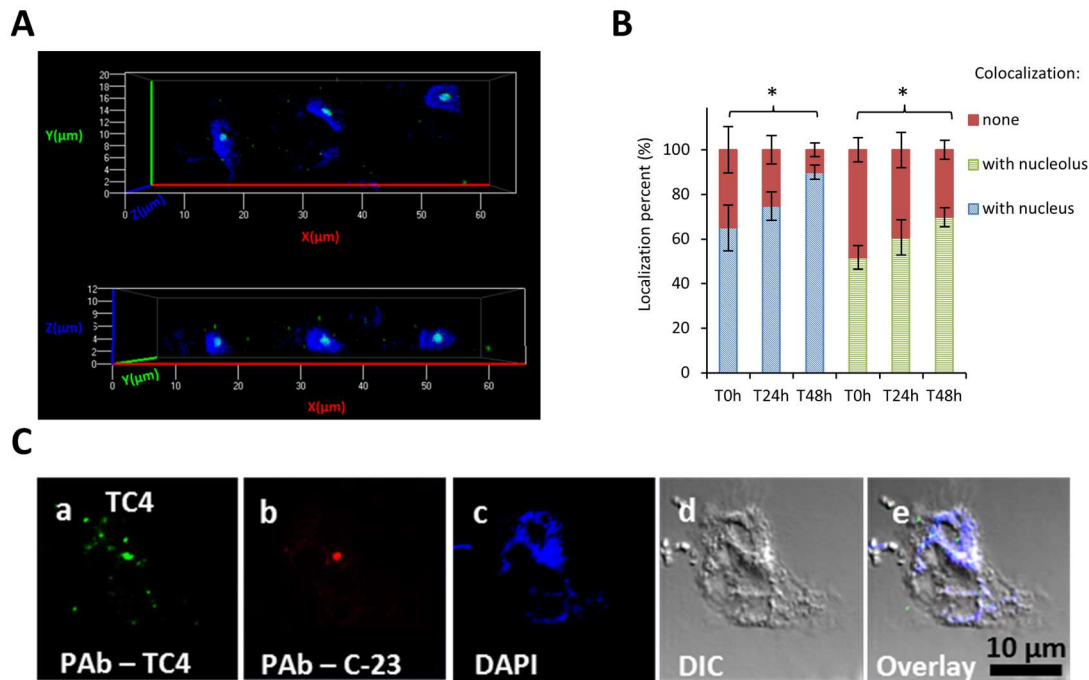


Figure 49: TC4 is located within the nucleolus. *Persicivirga mediterranea* TC4 (a, b, c, d, e) was visualized using FITC (green)-conjugated polyclonal antibodies (PAb) and amoeba cells were labelled with DAPI. The 3D CLSM images of TC4 are displayed in 2 axial planes (A). *Persicivirga mediterranea* TC4 (a, b, c, d, e) and amoeba were labelled as above. The nucleolin protein is labelled with C23 antibodies conjugated to CruzFluor™594. The related evaluations in percentage of the colocalization with DAPI and C23 stainings for each of the intracellular bacteria or group of bacteria at T0h, T24h, and T48h (B and C). Values are the means of three replicates, error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences to the samples (P: * <0.05 and ** <0.01).

TC5, TC10 and TC11 are localized in the cell cytoplasm and TC11 appears to be expelled outside the protozoan host at 24h

Analysis of the CLSM images as well as TEM photographs showed that TC5, TC10 and TC11 are located in the cytoplasm (figure 48Af-t). TC11 are phagocytized in numerous phagosomes within the protozoan host and by groups of one or more bacteria at both MOI (figure 48Af-j and figure 50g-j). At T24h, structures resembling to vesicles (also called pellets) containing bacteria appeared outside the amoeba (figure 48Bb, white arrows and 4k) and at T48h, bacteria seem to have been released from their vesicles (figure 48Bc, white arrows). This suggests that TC11 have been expelled from the cells and this is further supported by the decrease of intracellular bacteria in the CFU experiments (figure 47B). In CLSM images, TC5 is also shown within the cell cytoplasm in isolated phagosomes (figure 48Ak-o). TEM Images suggests that at T0h one or two bacteria are within phagosomes, some within intact phagosome, others within phagosomes with compromised membranes (figure 50c, d). Similarly, TC10 appears to be

within the cytoplasmic area of the protozoan cells on CLSM and TEM images within intact and disrupted membranes (figure 48Ap-t and 50e, f). In addition, while TC11 is present in groups in 5 to 20 phagosomes, filling most area of the cell cytoplasm of bacteria, TC4, TC5 and TC10 appears to have been invaginated in very small groups of bacteria in one or 2 phagosomes at the time (figure 48Ae, j, o, t). Therefore, our results show that the four marine bacteria are phagocytized in different quantity/rate and they follow most probably different intracellular fate when they are phagocytized within *A. castellanii*. This suggests that bacteria utilize different mechanisms triggering such different patterns within their host.

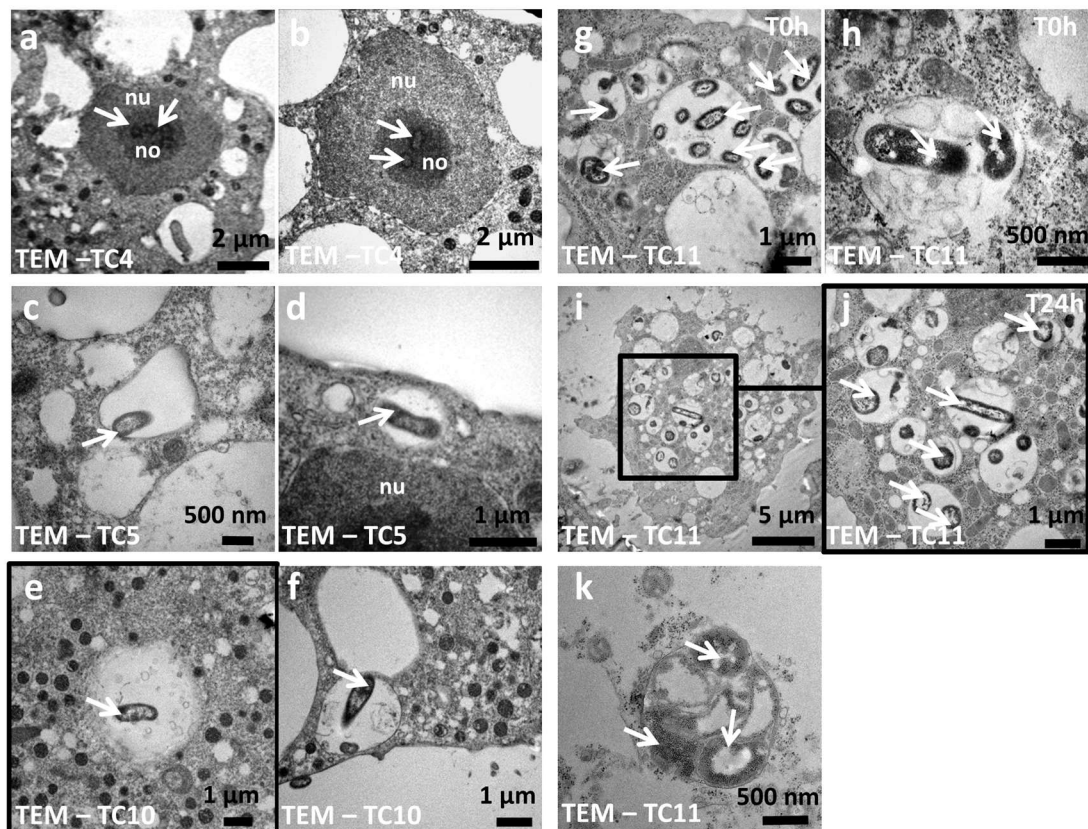


Figure 50: TEM photographs show the morphological characteristics of the bacteria and their phagosomes within *A. castellanii*. Photographs were taken at T0h for *P. mediterranea* TC4 (a, b), *Polaribacter* sp. TC5 (c, d), *Shewanella* sp. TC10 (e, f), *Shewanella* sp. TC11 (g, h) and at T24h for *Shewanella* sp. TC11 (i, j) within amoeba, or within a vesicle outside the amoeba cells (k) (white arrows: bacteria; nu: nucleus; no: nucleolus).

The bacterial strains follow different intracellular paths within *A. castellanii*

In order to better understand to which extent these marine bacteria could follow each a different intracellular path, colocalization studies were performed using CLSM with an intracellular marker, the pHrodo™ Red Dextran staining, which color goes toward the red along with the vacuoles acidification.

We showed previously that at T0h more than 60% of the TC4 bacteria colocalized with DAPI, and that this value increased to 90% at T48h (figure 49B). In order to check if the bacteria that were in the cytoplasm were in acidified endosomes, cells were subjected to pHrodo™ Red Dextran staining. The results show that about 70% of the cytoplasmic TC4 strains colocalized with pHrodo™ Red Dextran staining at T0, which suggest that lysosomal fusion with bacterial endosomes occurred for a majority of the cytoplasmic bacteria (**figure 51A**).

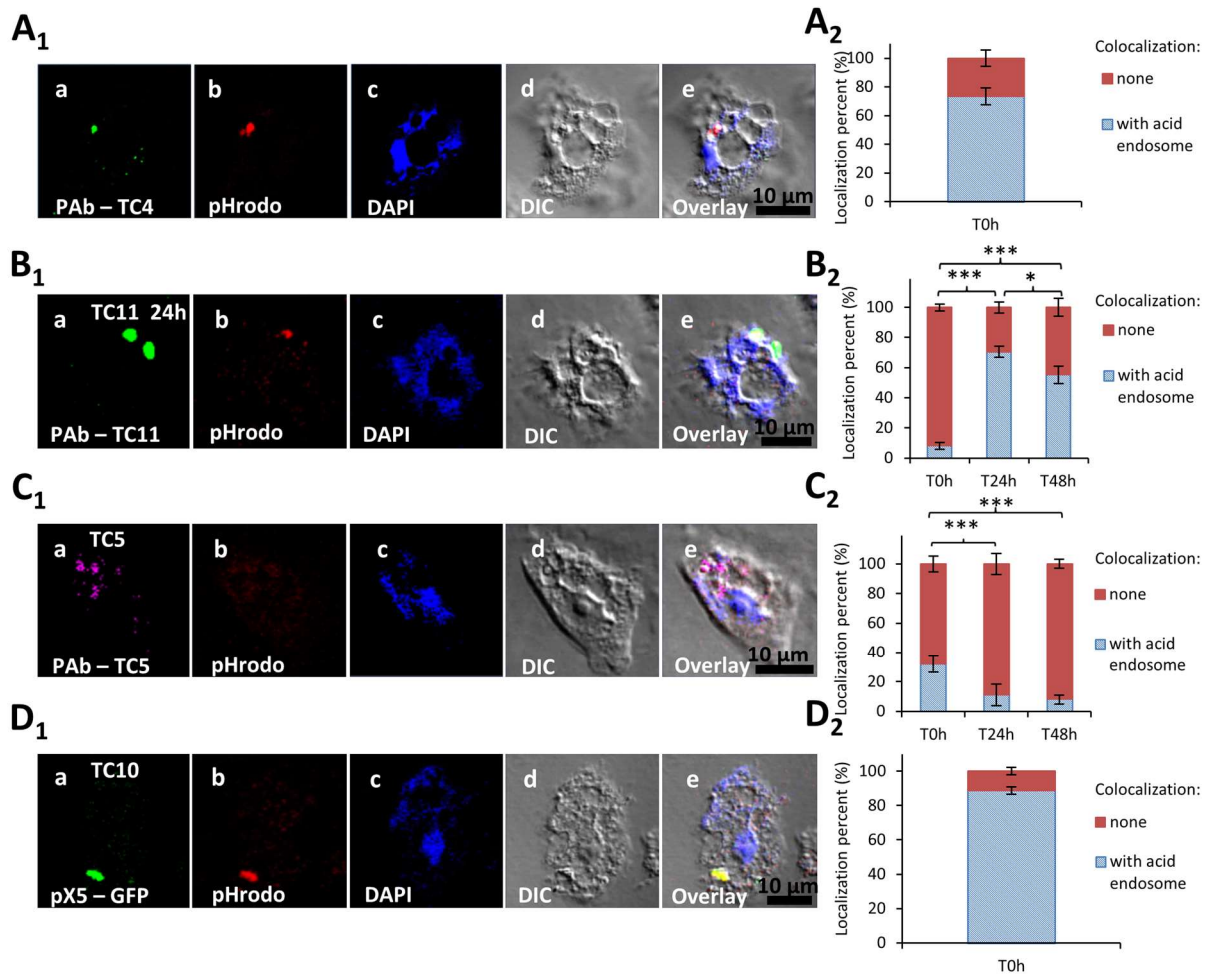


Figure 51: The four marine bacteria follow a specific intracellular trafficking within *A. castellanii*. Colocalization of *P. mediterranea* TC4 (A1), *Shewanella* sp. TC11 (B1), *Polaribacter* sp. TC5 (C1), and of *Shewanella* sp. TC10 (D1) was performed with acid endosome pHrodo staining at T0h. Bacteria were labelled with either polyclonal antibodies conjugated with FITC (green) for TC4, Alexa Fluor 633 for TC5, Alexa fluor 594 (red) or CruzFluor™ 488 (green) for TC11, or with the pX5-GFP for TC10. DAPI staining (blue) was used for the visualization of the host cell. Each set of pictures includes a superposition with the corresponding DIC picture. A2, B2, C2, D2 are the related evaluations in percentage of the colocalization with pHrodo staining for each of the intracellular bacteria filled-phagosomes at T0h, or T0h, T24h, and T48h. Values are the means of three replicates, error bars represent standard deviations and asterisks indicate significant differences to the samples (P: * <0.05 and ** <0.01).

The other bacteria TC5, TC10 and TC11 appeared to be in the cytoplasm. The most striking difference was associated with *Shewanella* sp. TC11 intracellular trafficking with a high phagocytosis proportion of this strain, in multiples phagosomes compared to the other bacteria,

and an important expulsion of bacteria-containing vesicles outside the host cell at 24h. In order to know if some of the numerous phagocytized bacteria were routed to acidified compartment, pHrodo™ Red Dextran staining was used on the infected cells at T0h, T24h and T48h. The staining of endocytic compartments shows that compartments are not or little acidified at T0h (figure 51B₁ and B₂). After 24h and 48h post infection, about 70% and 60%, respectively, of the bacteria-containing vacuoles colocalized with the pHrodo staining. Therefore, acidification of the TC11 phagosomes occurs after 24h or 48h, which does not appear to prevent expulsion of bacteria filled vesicles outside the host cells and subsequent release of the bacteria in the extracellular medium.

Both *Polaribacter* sp. TC5 and *Schewanella* sp. TC10 were phagocytized into phagosomes by *A. castellanii* at both MOI. Only 1 to 4 bacteria per infected amoeba were observed at T0h. The pHrodo staining was then used to verify if these bacteria were within acidified endocytic compartments as suggested by TEM pictures (figure 50d, e). At T0h, while only about 30% of TC5 colocalized with pHrodo staining, more than 80 % of TC10 did (figure 51C₁, C₂, D₁ and D₂). For TC5, the percentage of acidified endosomes decreased with the time to reach about 5% at T48h. This suggests that TC10 is the bacteria the more rapidly digested within amoebae, while for TC5, the digestion appears slower. This is also supported by CFU numeration of intracellular bacteria (figure 54 SF). Taken together, these results show that acidification occurs in different proportion and different paces for each strain, while undergoing their own intracellular trafficking, suggesting that bacteria utilize different mechanisms to circumvent or resist this process.

Discussion

This study is the first description of interactions between 4 different marine bacteria isolated from the Mediterranean Sea (Brian-Jaisson et al., 2014) and the amoeba *A. castellanii*. The 4 marine bacteria have been isolated from immersed biofilms, where they are supposed to encounter predators such as amoeba. The consumption of bacteria by protozoa is a well-known phenomenon in most environments including the marine environment. Our findings show that protozoan interactions with bacteria considered as non-pathogenic can unravel different intracellular paths including intranucleolar localization and expulsion of bacteria-filled vesicles outside the protozoan cells, when we could have expected a quick bacterial grazing for all of them. Despite an important diversity of amoeba present in the marine environment, these microorganisms and their interactions with bacteria are poorly studied and understood.

Our results show that *P. mediterranea* TC4 was found within the nucleolar compartment of *A. castellanii*. To our knowledge, this location has never been described in the literature for bacteria. In some cases, bacterial symbionts have been identified in the nucleus of protozoan cells (reviewed in (Schulz and Horn, 2015)) but due to the difficulty of recovering non-culturable bacteria from this location, very few infection studies have been performed, which usually allow further molecular and/or cellular investigations (Rautian and Wackerow-Kouzova, 2013; Sato et al., 2014; Schulz et al., 2014; Mehari et al., 2015). For instance, the re-infection of an isolated protozoa by intranuclear symbiotic bacteria, which is able to recolonize again the nucleus of cells of *Hartmannella* sp. and *A. castellanii* (Schulz et al., 2014) or of some ciliates *Paramecium* (Bella et al., 2016) have been described. Intranuclear bacterial parasites have also been identified within mussels from deep sea environments (Zielinski et al., 2009) or other invertebrates (Elston, 1986; Azevedo, 1989; Friedrich et al., 1999), and few pathogenic bacteria such as *Burkholderia pseudomallei* (Vadivelu et al., 2017) or obligate intracellular bacteria belonging to the *Rickettsia* genus (Burgdorfer et al., 1968; Burgdorfer and Brinton, 1970; Urakami et al., 1982) have been detected in the nucleoplasm of murine or human cells.

Studies on the mechanisms explaining how the bacteria reach the nucleus are very rare. In the case of *B. pseudomallei*, while bacteria are mostly cytoplasmic, few dormant bacteria were found within the nucleus of human and murine epithelial cells, which they reach after escape and multiplication into the cytoplasm, and formation of actin comet tails to enter this location (Vadivelu et al., 2017). In the case of the symbiont *Candidatus Nucleicultrix amoebiphila* recovered from *Hartmannella* sp. isolated from an activated sludge sample, the purified bacterium was used for re-infection studies and was able to reach the nucleus of *Hartmannella* sp. within 4 to 6h and quickly started replicating. They reached this location right after bacterial escape in the cytoplasm from endosomes fused with lysosomes. The bacteria became lytic for *Hartmannella* sp. FS5 and *A. castellanii* after 96h, while being located within the nucleus. Infection was not observed for *Acanthamoeba* sp UWC8 and *Naegleria gruberi* (Schulz et al., 2014) suggesting it is a host cell-dependent mechanism. In our case, TC4 appears to find, in a similar time frame, a stable niche in the nucleolar compartment, in which it stays for at least 48h, without any signs of elimination, expulsion, or replication. No difference between MOI 10 and 100 was observed suggesting that the phagocytosis capacity of the amoeba cells were already at its maximum at MOI 10. Since a majority of the few cytoplasmic bacteria colocalized with acidified endosomes, it is possible that either some bacteria are quickly digested during the infection process while others are routed to the nucleolus or, they manage to escape after

lysosomal fusion into the cytoplasm before going to the nucleolus as previously described (Schulz et al., 2014). The mechanism by which the TC4 bacterium goes from the endosomal to the nucleolus compartment remains to be discovered. Nucleolus is known to be often hijacked by effector proteins secreted by pathogenic intracellular bacteria such as *L. pneumophila*, as its first role is rRNA synthesis, ribosome biogenesis, mitosis regulation and cell proliferation, that bacteria may exploit for their own survival as do numerous viruses (Bierne, 2013). The intranuclear and even more intranucleolar location may represent the best protective niche for establishing symbiosis or parasitism within host cells, as bacteria are protected from cytoplasmic processes such as digestion (Schulz and Horn, 2015). Culturable bacteria such as TC4 may help understanding how bacteria enter the nucleolus and stay there. It is interesting to note that it's the first description of an endonuclear and therefore endonucleolar bacteria among flavobacteria.

Another interesting intracellular fate found in this study is the one of *Schewanella* sp. TC11, which are found in expelled vesicles after 24h infection of *A. castellanii*. The formation of vesicles or fecal pellets have been shown to represent an advantage against harsh conditions and allows bacterial survival such as chlorine, antibiotics, and biocides (Berk et al., 1998; Brandl et al., 2005; Raghu Nadhanan and Thomas, 2014). It is also involved in spreading on long distance of respirable particles (Berk et al., 1998). *A. castellanii* are able to produce both cysts, vesicles, and multilamellar bodies containing bacteria such as *L. pneumophila* or *Francisella tularensis* (Berk et al., 1998; Abd et al., 2007; Bouyer et al., 2007; Berk et al., 2008; El-Etr et al., 2009; Lambrecht et al., 2015; Sanchez-Hidalgo et al., 2017). Bacteria in cysts are less likely to be able to easily propagate as they are originated from a single trophozoite cell, while numerous vesicles containing bacteria are released through exocytosis, which is a continuous process for some grazing protozoa (Berk et al., 2008; Denoncourt et al., 2014; Bella et al., 2016; Van der Henst et al., 2016). Vesicles can be of different morphologies as described previously (Berk et al., 2008; Trigui et al., 2016). For instance in the case of the protozoa *Tetrahymena pyriformis*, some vesicles contained amorphous material and fragments of membranes, others contained non continuous membranous materials or whorls, while sometimes they lacked of defined membrane around them or were a mix of all above descriptions (Berk et al., 1998; Berk et al., 2008). The ability of the bacteria to be packaged by the protozoa is known to be dependent on the bacterial strains, the protozoa and the culture conditions (Chen et al., 2004; Berk et al., 2008; Paquet et al., 2013; Denoncourt et al., 2016). In our case, the TEM picture of the Figure 4k shows that a membrane is surrounding the vesicle

that contains at least one TC11 bacteria. This expulsion and propagation of bacteria-filled vesicles from protozoa could be a widespread phenomenon in environment including in the marine environment.

Polaribacter Sp TC5 and most importantly *Schewanella sp. TC10* are the least able to be phagocytized by *A. castellanii*. While few TC5 colocalize with acidified endosomes, a majority of TC10 did. One observation that could explain a poor phagocytosis is the fact that TC10 is able to filament in some conditions, which was not observed with the other bacteria. In NSS the bacteria appeared to filament in a lesser extent than in the rich VNSS medium (figure 55a, b SF). When either the filtered supernatants of *A. castellanii* or the amoebae themselves are inoculated with the bacteria (whether at the same time or 24h after bacteria settlement), TC10 appears as longer and bigger filaments (figure 55c, e, f SF). Within the cell, TC10 displays smaller shape than filamentous bacteria found outside the cell. It is therefore possible that bacteria are able to shape filaments as a defense mechanism to avoid amoeba phagocytosis, which would up-take only the smaller bacteria. This hypothesis would need to be further investigated. Morphological plasticity as part of phenotypic heterogeneity have been poorly studied while it may play a functional role within isogenic bacterial populations (reviewed in (Shen and Chou, 2016)). Filamentous morphology is known to provide survival advantages in particular during environmental stress, the presence of antibiotics or predators (reviewed in (Justice et al., 2008)). While some intracellular replicating bacteria form filaments within its host cells, it has been shown that in order to survive in their environment, some opportunist bacteria can modify their morphologies when in presence of their predator to avoid grazing (Hahn and Höfle, 2001; Jürgens and Matz, 2002). The size and shape depend on the bacteria and preference for grazing on the protists (Horvath et al., 2011; Lamrabet and Drancourt, 2013). The mechanisms behind it is still to be understood, as it is not clear what really triggers the filamentation, unavailability of some nutrients or molecules produced by the protists. While in our experiments, media seem to play a role, amoeba definitely appear to trigger a change in TC10 morphology. Moreover, swimming speed of the bacteria can also be a way for the bacteria to escape phagocytosis by the protozoan host (Matz and Jurgens, 2005). It is interesting to note that in our case, the phagocytosis rate is not correlated to the presence of flagella, as non-motile TC5 and TC4 and motile TC10 and TC11 were phagocytized in very different proportions. At last, *Polaribacter sp. TC5* appears to resist or slow down the rate of phagosomes acidification as very few bacteria at 24h and 48h colocalized with pHrodo compared to TC10 at T0h. Although the decrease in intracellular TC5 CFU appears the slowest, it is surprising that the

decrease in the proportion of infected amoeba was similar to TC10. One explanation could be that the bacteria did not bear acidification of their compartments similarly. It is well known that some bacteria can resist acidified environments and that acidification of phagolysosomes is not the only cause of bacterial death (Butler et al., 2010). Overall, if we consider that part or most of the bacteria are being digested, which is supported for TC5, TC10 and TC11 by the decrease of the number of infected amoeba over time, as well as the decrease of the intracellular bacteria CFU, the digestion process, occurring through different potential mechanisms that remain to be better characterized, still allow the observation of bacteria at 48h.

In conclusion, as most microorganisms live preferably in close association in biofilm communities, understanding interactions between protozoa and bacteria is of major importance to understand the place of grazing and its role in the biofilm ecology. This study represents the first investigation of various interactions between *A. castellanii* and marine bacterial strains. The analysis of only four marine bacterial strains, has led to the description of four specific and, for one strain, original patterns of intracellular trafficking. To our knowledge, we have made the first description of an intranucleolar bacteria within an eukaryotic host cell. The other bacteria present in the host cell cytoplasm are either able to be expelled within vesicles outside the host cell, or follow their own elimination process through different strategies. Overall, this study brings a preview of the diversity of the interactions between eukaryotic cells and bacteria that could exist in the marine environment and that remains to be investigated.

Experimental procedures

Bacterial and protozoan strains:

Four marine bacterial strains were used in this study: *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4 (Toulon Collection), *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10, and *Shewanella* sp. TC11. These strains were isolated from surfaces immersed in the bay of Toulon (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014). All bacterial strains were grown in VNSS (Mårdén et al., 1985) at 20°C, with shaking at 120 rpm. When the TC10 strain harbors the pX5 plasmid encoding GFP (kindly constructed by Dr. Aurore Puymège) the VNSS medium is supplemented with 6 µg/mL of chloramphenicol.

A. castellanii is an axenized environmental isolate that was provided by Pr. F. Pernin (Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques-Faculté de Pharmacie-Université Lyon1, Lyon, France). The amoeba, whose axenization implies that they do not require any addition of bacteria for growth, were grown into 175 cm² tissue culture flasks (Nunc™, Thermo Scientific,

Roskilde, Denmark) containing 30 mL of PYG (Peptone, Yeast-extract, Glucose) at 20°C. The coculture assays were performed in the NSS solution (Mårdén et al., 1985; Matz et al., 2008b).

Bacterial labelling:

TC10 pX5-GFP was obtained by conjugation using *E. coli* WM3064 as a donor strain. Briefly, post-exponential phase culture of WM3064 transformed with pX5-GFP by CaCl₂ chemical choc was mated with post-exponential phase *Shewanella* sp. TC10 in a 1:1 ratio on VNSS plates containing 100 µg/ml of DAP (2,6-Diaminopimelic acid) (Sigma-aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) overnight at 20°C. *Shewanella* sp. TC10 transconjugants were selected on VNSS DAP free agar plates containing 6 µg/mL chloramphenicol.

Because transformation and conjugation assays of the bacterial strains only resulted in the creation of TC10 pX5-GFP despite numerous different conditions tested on the strains, 3 polyclonal antibodies directed against the 3 other strains, TC4, TC5 and TC11 were ordered (ACRIS Antibodies GmbH, Herford, Germany) for labelling purposes. Strains were grown to post exponential phases and washed in PBS 1X by centrifugation at 3700 g for 10 min. The pellets were suspended in formalin 0,1 % PBS 1X at 4°C during 10 h and washed thrice with PBS 1X prior to obtaining a final concentration of approximately 10⁸ cells/ml before sending them. The antigens were emulsified with an equal volume of Complete Freund's Adjuvant and injected into three to four subcutaneous sites for the primary immunization. Subsequent immunizations were performed depending on hosts. TC4, TC5 and TC11 polyclonal antibodies were respectively designed into chicken, goat and rabbit hosts.

Bacterial and amoeba numeration in NSS:

Growth kinetics in NSS of amoeba has been performed every 24h over a time course of 96h directly on 175 cm² tissue culture flasks using an inverted optical Motic AE21 microscope (Motic, Kowloon, Hong Kong). Evaluation of bacterial concentration was performed at the same time points by measuring absorbance at OD_{600nm}.

Bacterial survival during *A. castellanii* co-incubation:

Amoebae suspensions obtained by scrapping culture flasks (Corning Incorporated Costar®, New York, USA) were inoculated into 96 transparent well plates at 1.10⁵ cells per well. Plates were incubated during 12h at 20°C to initiate amoebae adhesion at the bottom of the wells. Post exponentially grown bacteria suspended in NSS were inoculated on amoebae monolayers at a multiplicity of infection (MOI) of 10 or 100. Low speed centrifugation (5 min at 900 g) was used to move slowly the bacteria down toward the adhered protozoan cells, and initiate and

synchronize physical interaction between bacteria and amoeba as it is usually performed in many studies of bacteria-host cell interactions (Harrison et al., 2013; Allombert et al., 2014; Kicka et al., 2014; Lampe et al., 2016; Taylor-Mulneix et al., 2017). After 3h of contact time, the samples were washed off 3 times with NSS to remove extracellular bacteria and start the kinetics study at T0h, T24h and T48h. At each time points of the kinetic, host cell samples, treated with Triton™ X-100 (0.05%) during 15 min on ice, were submitted to serial dilutions before plating 5 µl drops on VNSS agar plates for the estimation of the intracellular bacteria concentration.

Cytotoxicity assay against *A. castellanii*:

Bacteria and amoeba were prepared as previously described except that 24 well plates (Corning Incorporated Costar®, New York, USA) containing a sterilized glass coverslip into each well were used and that $5 \cdot 10^5$ cells per well were added in each well. Only MOI 100 samples were performed. After 24h, amoeba-associated bacteria were stained with propidium iodide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions followed by 20 min incubation at room temperature in the dark. Samples were then washed thrice with NSS before formalin fixation and mounting on a slide with a drop of ProLong™ Diamond Antifade (Molecular Probes™, Eugene, Oregon, USA). The percentage of live or dead cells was determined using CLSM (Zeiss LSM 510). A negative control corresponding to the non-infected amoeba and a positive control corresponding to the non-infected amoeba treated with Formalin 3,7 % and Triton™ X-100 (0.05%) to kill the cells were prepared before propidium iodide addition and subsequent fixation and mounting procedures.

Bacterial localization within *A. castellanii* using CLSM:

Bacteria and amoebae were prepared as previously described except that 24 well plates (Corning Incorporated Costar®, New York, USA) containing a sterilized glass coverslip into each well were used, that $5 \cdot 10^5$ amoeba cells were added in each well and that bacteria were both inoculated at both MOI10 and MOI100. At T0h, T24h and T48h, cells were fixed using Formalin 3,7 % during 1h for amoeba-associated TC10 pX5-GFP and TC5 strains, and using Acetone/Methanol (1:1, v:v) during 20 min at -20°C for amoeba-associated TC4 and TC11 strains. The permeabilization steps were performed using Triton™ X-100 (0.05%) during 15 min or using Tween® 20 (0.5%) during 20 min in order for the TC4 antibodies to access the nucleus. For the immunostaining, samples were blocked with BSA 3% (Acros organics, Geel, Belgium) in PBS 1X overnight at 4°C. The primary antibodies were added during 1h in BSA 3% at 1/300 for Chicken-anti-TC4, 1/100 for Goat-anti-TC5 and 1/300 for Rabbit-anti-TC11.

After a second blocking step of 2h at room temperature, secondary antibodies were added in BSA 3% with DAPI at 5µg/mL (Sigma-aldrich, Darmstadt, Germany), at a concentration of 1/4000 for Goat anti-Chicken IgY (H+L) conjugated to FITC (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA) for 1h, at a concentration of 1/2000 for Donkey anti-Goat IgG (H+L) coupled to Alexa Fluor 633 (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA) for 1h, at a concentration of 45 µL/mL for Donkey anti-Rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 during 30 min and at a concentration of 1/200 for Mouse anti-rabbit IgG coupled to CruzFluor™ 488. Finally, the coverslips were mounted with a drop of ProLong™ Diamond Antifade before observation using CLSM.

For the observation of TC10 shapes and sizes experiments in function of the media or the presence of amoeba, post-exponential TC10 pX5-GFP grown in VNSS were let to adhere for 3h on the surface or were resuspended in NSS just before the 3h adhesion step, or were added to amoeba monolayers at MOI100 (corresponding to OD_{600nm} of 0.05) in NSS. In a second set of experiments, post-exponential TC10 pX5-GFP grown in VNSS were resuspended in NSS at an OD_{600nm} of 0.4 and added to the surface for 3h. After 3 washes, they were either incubated for additional 24h alone, or in presence of a filtered amoeba supernatants or in presence of 5.10⁵ cells/mL amoeba. After 24h incubation in NSS, the fixation, permeabilization, the DAPI labelling and the mounting steps were performed as above.

At least three replicated infection experiments were performed and at least 100 amoeba cells were counted per sample under the 63x/1.40 Oil DIC objective.

Colocalization studies with cellular organelles:

The bacteria and the amoeba were prepared at MOI 100, as described above. The colocalization study of TC4, TC5, TC10 and TC11 strains with acid endosomes was performed at T0h, T24h and T48h using 40 µg/mL of pHrodo™ Red Dextran (Molecular probes™, Eugene, Oregon, USA). Samples were incubated during 20 min at 37°C. The colocalization with the nucleolus was carried out using mouse anti-nucleolin primary antibody (C-23(MS-3): sc-8031) (Santa Cruz biotechnology, Dallas, Texas U.S.A.) at 1/50 during 1h as previously performed (Lozano-Amado et al., 2016). The secondary mouse antibody IgGκ (m-IgGκ BP-CFL 594: sc-516178) (Santa Cruz biotechnology, Dallas, Texas U.S.A.) conjugated to CruzFluor™ 594 was applied during 1 h at 1/50.

Bacterial localization within *A. castellanii* using Transmission electron microscopy (TEM): Coculture experiments took place in 24 well plates at MOI 100. At T0h, T24h and T48h, samples were fixed in 3.5% glutaraldehyde during 45 min at 4°C in NSS and post fixed with 1% osmium tetroxide (OsO₄) in 0.1 M sodium Sorenson's buffer for 1h. Dehydration in increasing ethanol concentration solutions was followed by embedding of the samples in LX112 resin (Ted Pella, Redding, California, USA). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate followed or not by lead citrate at the CIQLE (Centre d' Imagerie Quantitative Lyon Est, platform of lyon1 university) or at the PiCSL-FBI core facility (IBDM UMR CNRS 7288, Aix-Marseille University) and examined with a Tecnai G2 electron microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) operating at 200 kV at the PiCSL-FBI core facility.

Statistics:

For each experiment, at least 3 replicates were performed. To test for statistically significant differences ($P < 0.05$) between different conditions and time points, a two way analysis of variance including the Bonferroni post-test were performed using SPSS 13.0 (IBM, Armonk, New York, USA).

Acknowledgements

We would like to thank Dr. A. Puymège for her help in transforming TC10 with the pX5-GFP plasmid. We also thank J. Gralnick (BioTechnology Institute and Department of Plant and Microbial Biology, University of Minnesota, USA) for providing the *E. coli* WM3064 strain and X. Charpentier (CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team "Horizontal gene transfer in bacterial pathogens", Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308) for providing the pX5-GFP plasmid. The electron microscopy experiments were performed in the CIQLE (Centre d' Imagerie Quantitative Lyon Est, platform of lyon1 university) and the PiCSL-FBI core facility (IBDM UMR CNRS 7288, Aix-Marseille University), member of the France-BioImaging national research infrastructure. This work was supported by the French National Research Agency through the "Investments for the Future" program (France-BioImaging, ANR-10-INSB-04). We thank Aïcha Aouane, Fabrice Richard and Nicolas Brouilly (PiCSL-FBI core facility) and Artemis Kosta (Institut de Microbiologie de la Méditerranée imagery facility) for training and helpful discussions during the electron microscope experiments. R. Guillonneau is the recipient of a French PACA Region doctoral fellowship which is supported by the "Pôle Mer Méditerranée".

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G.B., and Sandstrom, G. (2007) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 33-39.
- Allombert, J., Vianney, A., Laugier, C., Petry, S., and Hébert, L. (2014) Survival of taylorellae in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *BMC Microbiol* **14**: 69.
- Azevedo, C. (1989) Fine structure of endonucleobiotic bacteria in the gill epithelium of *Ruditapes decussatus*. *Marine Biology* **100**: 339-341.
- Barker, J., and Brown, M.R. (1994) Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology (Reading, England)* **140 (Pt 6)**: 1253-1259.
- Bella, C., Koehler, L., Grosser, K., Berendonk, T.U., Petroni, G., and Schrällhammer, M. (2016) Fitness impact of obligate intranuclear bacterial symbionts depends on host growth phase. *Front Microbiol* **7**: 2084.
- Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W., and Ashburn, R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**: 279-286.
- Berk, S.G., Faulkner, G., Garduño, E., Joy, M.C., Ortiz-Jimenez, M.A., and Garduño, R.A. (2008) Packaging of Live *Legionella pneumophila* into Pellets Expelled by *Tetrahymena* spp. Does Not Require Bacterial Replication and Depends on a Dot/Icm-Mediated Survival Mechanism. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2187-2199.
- Bierne, H. (2013) Nuclear microbiology—bacterial assault on the nucleolus. *EMBO Reports* **14**: 663-664.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.H., and Hechard, Y. (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol* **9**: 1341-1344.
- Brandl, M.T., Rosenthal, B.M., Haxo, A.F., and Berk, S.G. (2005) Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1562-1569.
- Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magne, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y., and Molmeret, M. (2014) Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microb Ecol* **68**: 94-110.
- Burgdorfer, W., and Brinton, L.P. (1970) Intranuclear growth of *Rickettsia canada*, a member of the Typhus group. *Infect Immun* **2**: 112-114.
- Burgdorfer, W., Anacker, R.L., Bird, R.G., and Bertram, D.S. (1968) Intranuclear growth of *Rickettsia rickettsii*. *J Bac* **96**: 1415-1418.

- Butler, R.E., Cihlarova, V., and Stewart, G.R. (2010) Effective generation of reactive oxygen species in the mycobacterial phagosome requires K⁺ efflux from the bacterium. *Cell Microbiol* **12**: 1186-1193.
- Camps, M., Briand, J.F., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Bazire, A., and Blache, Y. (2011) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Mar Pollut Bull* **62**: 1032-1040.
- Chen, J., de Felipe, K.S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G., and Shuman, H.A. (2004) *Legionella* Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. *Science* **303**: 1358.
- Denoncourt, A.M., Paquet, V.E., and Charette, S.J. (2014) Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front Microbiol* **5**.
- Denoncourt, A.M., Paquet, V.E., Sedighi, A., and Charette, S.J. (2016) Identification of Proteins Associated with Multilamellar Bodies Produced by *Dictyostelium discoideum*. *PLoS One* **11**: e0158270.
- El-Etr, S.H., Margolis, J.J., Monack, D., Robison, R.A., Cohen, M., Moore, E., and Rasley, A. (2009) *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7488-7500.
- El-Kirat-Chatel, S., Puymege, A., Duong, T.H., Van Overtvelt, P., Bressy, C., Belec, L. et al. (2017) Phenotypic Heterogeneity in Attachment of Marine Bacteria toward Antifouling Copolymers Unraveled by AFM. *Front Microbiol* **8**: 1399.
- Elston, R.A. (1986) An intranuclear pathogen [nuclear inclusion X (NIX)] associated with massive mortalities of the Pacific razor clam, *Siliqua patula*. *J Invertebr Pathol* **47**: 93-104.
- Favre, L., Ortalo-Magne, A., Greff, S., Perez, T., Thomas, O.P., Martin, J.C., and Culioli, G. (2017) Discrimination of Four Marine Biofilm-Forming Bacteria by LC-MS Metabolomics and Influence of Culture Parameters. *J Proteome Res* **16**: 1962-1975.
- Fernandez, M.C.A., Crespo, E.P., Mallen, M.M., Ares, M.P.M.P., and Casas, M.L.C. (1989) Marine Amoebae from Waters of Northwest Spain, with Comments on a Potentially Pathogenic Euryhaline Species. *J protozool* **36**: 239-241.
- Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P., and Hentschel, U. (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mar Biol* **134**: 461-470.
- Hahn, M.W., and Höfle, M.G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **35**: 113-121.
- Harrison, C.F., Kicka, S., Trofimov, V., Berschl, K., Ouertatani-Sakouhi, H., Ackermann, N. et al. (2013) Exploring Anti-Bacterial Compounds against Intracellular *Legionella*. *PLoS ONE* **8**: e74813.
- Hilbi, H., Weber, S.S., Ragaz, C., Nyfeler, Y., and Urwyler, S. (2007) Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ Microbiol* **9**: 563-575.

- Horvath, D.J., Jr., Li, B., Casper, T., Partida-Sanchez, S., Hunstad, D.A., Hultgren, S.J., and Justice, S.S. (2011) Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes Infect* **13**: 426-437.
- Jürgens, K., and Matz, C. (2002) Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Anton Leeuw* **81**: 413-434.
- Justice, S.S., Hunstad, D.A., Cegelski, L., and Hultgren, S.J. (2008) Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol* **6**: 162-168.
- Kicka, S., Trofimov, V., Harrison, C., Ouertatani-Sakouhi, H., McKinney, J., Scapozza, L. et al. (2014) Establishment and Validation of Whole-Cell Based Fluorescence Assays to Identify Anti-Mycobacterial Compounds Using the *Acanthamoeba castellanii* - *Mycobacterium marinum* Host-Pathogen System. *PLoS ONE* **9**: e87834.
- Lambrecht, E., Bare, J., Chavatte, N., Bert, W., Sabbe, K., and Houf, K. (2015) Protozoan Cysts Act as a Survival Niche and Protective Shelter for Foodborne Pathogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **81**: 5604-5612.
- Lampe, E.O., Brenz, Y., Herrmann, L., Repnik, U., Griffiths, G., Zingmark, C. et al. (2016) Dissection of *Francisella*-Host Cell Interactions in *Dictyostelium discoideum*. *Appl Environ Microbiol* **82**: 1586-1598.
- Lamrabet, O., and Drancourt, M. (2013) *Mycobacterium gilvum* illustrates size-correlated relationships between mycobacteria and *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* **79**: 1606-1611.
- Laskowski-Arce, M.A., and Orth, K. (2008) *Acanthamoeba castellanii* Promotes the Survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7183-7188.
- Lozano-Amado, D., Herrera-Solorio, A.M., Valdés, J., Alemán-Lazarini, L., Almaraz-Barrera, M.d.J., Luna-Rivera, E. et al. (2016) Identification of repressive and active epigenetic marks and nuclear bodies in *Entamoeba histolytica*. *Parasit Vectors* **9**: 19.
- Mårdén, P., Tunlid, A., Malmcrona-Friberg, K., Odham, G., and Kjelleberg, S. (1985) Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch Microbiol* **142**: 326-332.
- Matz, C., and Kjelleberg, S. (2005) Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* **13**: 302-307.
- Matz, C., and Jurgens, K. (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 921-929.
- Matz, C., Moreno, A.M., Alhede, M., Manefield, M., Hauser, A.R., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2008a) *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *ISME J* **2**: 843-852.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S. et al. (2008b) Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS ONE* **3**: e2744.

- Mehari, Y.T., Hayes, B.J., Redding, K.S., Mariappan, P.V., Gunderson, J.H., Farone, A.L., and Farone, M.B. (2015) Description of '*Candidatus Berkiella aquae*' and '*Candidatus Berkiella cookevillensis*', two intranuclear bacteria of freshwater amoebae. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**: 536-541.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Abu Kwaik, Y. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**: 20-28.
- Page, F.C. (1983) *Marine Gymnamoebae*. Cambridge: Institute of Terrestrial Ecology.
- Paquet, V.E., Lessire, R., Domergue, F., Fouillen, L., Filion, G., Sedighi, A., and Charette, S.J. (2013) Lipid composition of multilamellar bodies secreted by *Dictyostelium discoideum* reveals their amoebal origin. *Eukaryot Cell* **12**: 1326-1334.
- Raghu Nadhanan, R., and Thomas, C.J. (2014) *Colpoda* secrete viable *Listeria monocytogenes* within faecal pellets. *Environ Microbiol* **16**: 396-404.
- Rautian, M.S., and Wackerow-Kouzova, N.D. (2013) Phylogenetic placement of two previously described intranuclear bacteria from the ciliate *Paramecium bursaria* (Protozoa, Ciliophora): '*Holospora acuminata*' and '*Holospora curviuscula*'. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 1930-1933.
- Reyes-Batlle, M., Martín-Rodríguez, A.J., López-Arencibia, A., Sifaoui, I., Liendo, A.R., Bethencourt Estrella, C.J. et al. (2017) *In vitro* interactions of *Acanthamoeba castellanii* Neff and *Vibrio harveyi*. *Exp Parasitol* **183**: 167-170.
- Rogerson, A., and Laybourn-Parry, J. (1992) The abundance of marine naked amoebae in the water column of the Clyde estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **34**: 187-196.
- Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179-1183.
- Sanchez-Hidalgo, A., Obregon-Henao, A., Wheat, W.H., Jackson, M., and Gonzalez-Juarrero, M. (2017) *Mycobacterium bovis* hosted by free-living-amoebae permits their long-term persistence survival outside of host mammalian cells and remain capable of transmitting disease to mice. *Environ Microbiol*.
- Sato, T., Kuwahara, H., Fujita, K., Noda, S., Kihara, K., Yamada, A. et al. (2014) Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut. *ISME J* **8**: 1008-1019.
- Sawyer, T.K. (1980) Marine amebae from clean and stressed bottom sediments of the atlantic ocean and gulf of Mexico. *J protozool* **27**: 13-32.
- Schulz, F., and Horn, M. (2015) Intranuclear bacteria: inside the cellular control center of eukaryotes. *Trends Cell Biol* **25**: 339-346.
- Schulz, F., Lagkouvardos, I., Wascher, F., Aistleitner, K., Kostanjšek, R., and Horn, M. (2014) Life in an unusual intracellular niche: a bacterial symbiont infecting the nucleus of amoebae. *ISME j* **8**: 1634-1644.

Shen, J.-P., and Chou, C.-F. (2016) Morphological plasticity of bacteria—Open questions. *Biomicrofluidics* **10**: 031501.

Sherr, E.B., and Sherr, B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Anton Leeuw* **81**: 293-308.

Taylor-Mulneix, D.L., Bendor, L., Linz, B., Rivera, I., Ryman, V.E., Dewan, K.K. et al. (2017) *Bordetella bronchiseptica* exploits the complex life cycle of *Dictyostelium discoideum* as an amplifying transmission vector. *PLoS Biology* **15**: e2000420.

Trigui, H., Paquet, V.E., Charette, S.J., and Faucher, S.P. (2016) Packaging of *Campylobacter jejuni* into multilamellar bodies by the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Appl Environ Microbiol* **82**: 2783-2790.

Urakami, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A. (1982) Intranuclear *Rickettsia tsutsugamushi* in cultured mouse fibroblasts (L Cells). *Microbiol Immunol* **26**: 445-447.

Vadivelu, J., Vellasamy, K.M., Thimma, J., Mariappan, V., Kang, W.T., Choh, L.C. et al. (2017) Survival and intra-nuclear trafficking of *Burkholderia pseudomallei*: strategies of evasion from immune surveillance? *PLoS Negl Trop Dis* **11**: e0005241.

Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C., and Blokesch, M. (2016) An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *ISME J* **10**: 897-910.

Zielinski, F.U., Pernthaler, A., Duperron, S., Raggi, L., Giere, O., Borowski, C., and Dubilier, N. (2009) Widespread occurrence of an intranuclear bacterial parasite in vent and seep bathymodiolin mussels. *Environ Microbiol* **11**: 1150-1167.

Supplementary figures

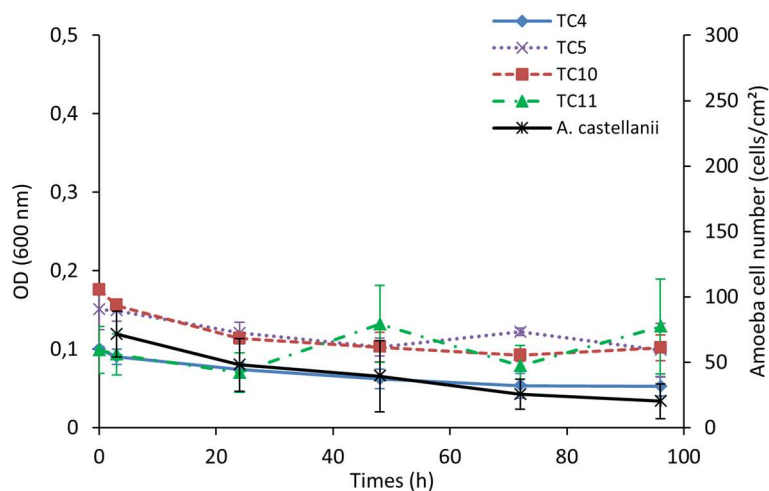


Figure 52: (Supplementary Figure) The NSS medium does not trigger major variations of cell numbers over 96h. Growth kinetics in NSS of *P. mediterranea* TC4 (blue line), *Polaribacter* sp. TC5 (purple dot line), *Schewanella* sp. TC10 (red dash line), *Schewanella* sp. TC11 (green dash and dot line) and *A. castellanii* (black line) were evaluated using an inverted optical microscope for the amoeba and by OD_{600nm} measurement over a course of 96h. Error bars show standard deviation based on three independent experiments.

Les courbes de croissance mettent en évidence qu'il n'y a pas d'évolution stricte du nombre de cellule au cours des 96h en milieu NSS.

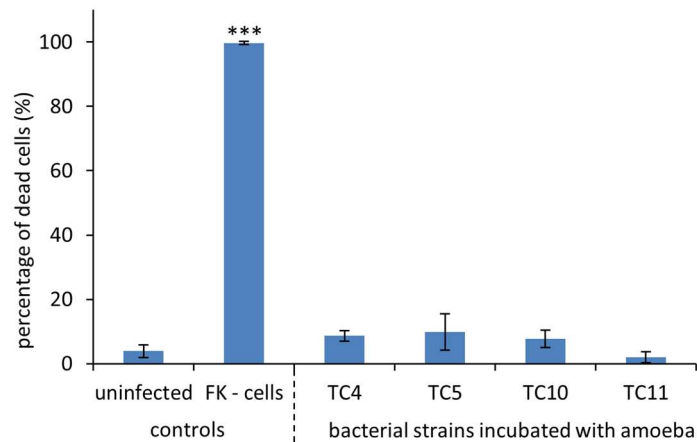


Figure 53: (Supplementary figure) None of the 4 marine strains are cytotoxic towards *A. castellanii*. *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Schewanella* sp. TC10 and *Schewanella* sp. TC11 were inoculated in presence of *A. castellanii* and a cytotoxicity assay was performed 24h post infection using Propidium Iodide (PI). The number of dead amoeba cells were evaluated for *A. castellanii* in incubated with bacteria. The 2 controls includes non-infected amoeba and Formalin-killed(FK) amoeba. Values are the means of three replicates and error bars represent standard deviations. The results are representative of three different experiments.

L'histogramme mets en évidence le taux de cellule morte de différents échantillons par utilisation de l'iodure de propidium. Il s'agit d'un marqueur fluorescent qui rentre dans les cellules perméables. Aucune des quatre souches ne présente d'effet cytotoxique envers *Acanthamoeba castellanii*.

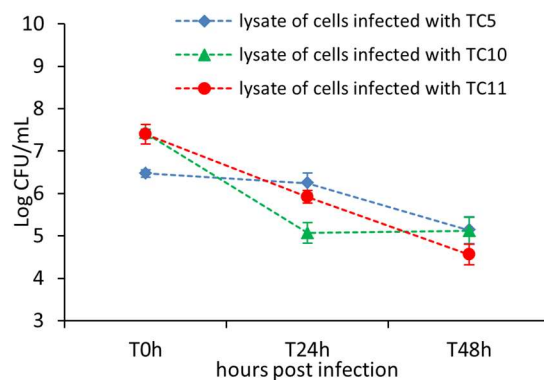


Figure 54: (Supplementary Figure) The TC5, TC10, TC11 intracellular concentrations decrease during *A. castellanii* infection. *Polaribacter* sp. TC5 (blue-full line), *Schewanella* sp. TC10 (green-dotted line) and *Schewanella* sp. TC11 (red-dashed line) were cocultured with *A. castellanii* at MOI 100 and the amoeba lysates in presence of each bacteria were analyzed by CFU numeration at T0h, T24h and T24h. Values are the means of triplicate samples, and error bars represent standard deviations. The results are representative of three different experiments.

Les concentrations des bactéries TC5, TC10 et TC11 diminuent au cours du temps dans le lysat des amibes. Cela indique un potentiel relargage ou une potentielle digestion de celles-ci par *A. castellanii*.

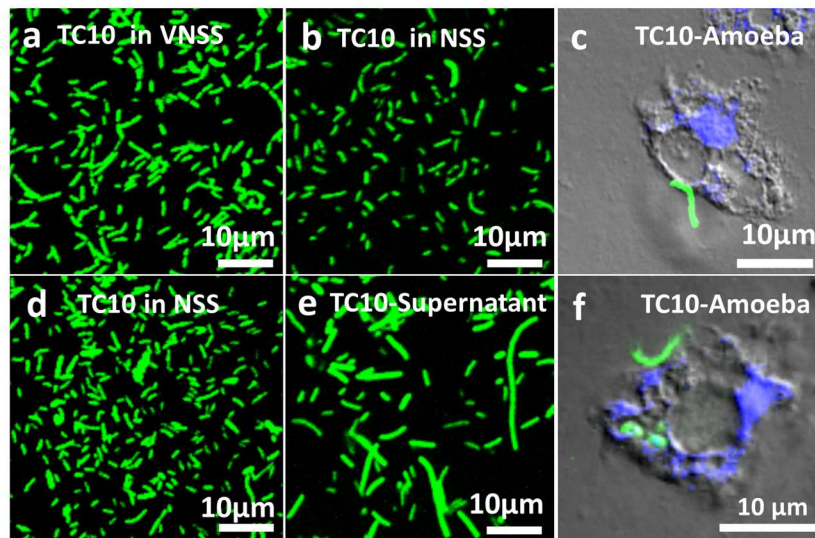


Figure 55 : (Supplementary Figure) TC10 display different sizes and shapes in presence of amoeba. Post-exponential TC10 pX5-GFP grown in VNSS were let to adhere for 3h (a), were resuspended in NSS prior to the 3h adhesion step (b) or were added to amoeba at MOI 100 in NSS (c). Post-exponential TC10 pX5-GFP grown in VNSS were resuspended in NSS at an OD600nm of 0.4 and added to the surface for 3h. After 3 washes, they were either incubated for additional 24h alone (d), or in presence of a filtered amoeba supernatants (e) or in presence of amoeba. Additional 24h incubation was performed prior to fixation, permeabilization, labelling and the mounting steps.

La bactérie *Shewanella* sp. TC10 forme des filaments en présence d'amibe ou uniquement de surnageant préconditionné d'amibe alors qu'elle ne présente que peu de ces filaments seul en milieu VNSS ou NSS.

Chapitre IV :
Etude des interactions entre l'amibe *A. castellanii* et les biofilms monospécifiques et multispécifiques des différentes bactéries marines

Le broutage planctonique par les protistes hétérotrophes est considéré comme une source majeure de mortalité bactérienne dans les environnements du sol, marins ou d'eaux douces (Huws, McBain et Gilbert, 2005). Celui-ci peut cependant induire des réponses à l'échelle de la communauté bactérienne et à l'échelle de l'espèce, tels que des changements morphologiques en termes de taille ou de filamentation des bactéries ou des changements de comportements tels que la formation d'agrégats bactériens.

Aujourd'hui, le mode de vie en biofilm est toujours considéré comme étant un mécanisme adaptatif de défense contre les prédateurs en particulier contre les brouteurs (Matz et Kjelleberg, 2005). Cependant, dès les années 90, des déclarations ont mis en lumière que les effets du broutage par les protozoaires pouvaient probablement être le facteur le plus important de contrôle de la composition des biofilms dans les écosystèmes aquatiques (Pedersen, 1990 ; Sun, Kjelleberg et McDougald, 2013). Il a également été rapporté une abondance non négligeable des protistes amiboïdes au sein des communautés de biofilms, ces protistes seraient capables de se déplacer au travers du biofilms, de brouter les bactéries et de causer des perturbations et des détachements importants de consortium cellulaire (Bigot et al., 2013 ; Erken et al., 2011 ; Jackson et Jones, 1991). Certains auteurs ont indiqué que la présence de protozoaires au sein d'un biofilm peut même stimuler la croissance du biofilm (Hahn et Hofle, 1998). Jusqu'à présent, les études sur le biofilm se sont centrées sur les communautés procaryotes ou alors sur certaines algues comme les diatomées associées aux surfaces (Molino et Wetherbee, 2008). Au contraire du grand nombre de publication sur ces organismes associés aux surfaces, celles traitant du rôle des protozoaires dans ces environnements restent relativement peu nombreuses.

Ces protozoaires ont pourtant été trouvés dans de multiples environnements y compris à différentes interfaces tels que celles entre les surfaces solides et l'air (Cowling, 1994), à l'interface air/eau (Pennak, 1963), ou les interfaces eau/surface solide. Sur cette dernière, les protozoaires ont été isolées sur les roches (Foissner, 1992), les macrophytes (Baldock, Baker, et Sleigh, 1983), les animaux (Fenchel, 1965), les détritiques tels que les microplastiques (Franco, 1998), dans des agrégats de la colonne d'eau (Arndt, 1993 ; Caron, 1991) aussi bien que sur différents substrats artificiels (Cairns et Yongue, 1968 ; Foissner, 1992 ; Jackson et Jones, 1991). Certains d'entre eux peuvent être eux-mêmes pathogènes pour l'animal (Hvas *et al.*, 2017). Par conséquent, étudier la place que peuvent avoir ces microorganismes dans l'environnement et leur lien avec les biofilms peut apporter des informations capitales dans divers secteurs d'activités y compris dans la gestion de l'eau, en raison de leur contrôle des

populations bactériennes et par conséquent leur impact sur la qualité de l'eau (Fried *et al.*, 2000 ; Sibille *et al.*, 1998).

Afin de comprendre qu'elle est la place de l'amibe dans les modèles de biofilms établis précédemment avec les quatre bactéries marines sélectionnées présentant des caractéristiques phénotypiques et une capacité à former du biofilm différentes, les interactions entre le biofilm préformé par les bactéries marines et *Acanthamoeba castellanii* ont été étudiées. Comme indiqué au chapitre précédent, cette amibe libre ubiquiste isolée à partir de différentes sources incluant le sol, les eaux douces et marines (Fernandez *et al.*, 1989 ; Page *et Protoza*, 1983 ; Rogerson *et Laybourn-Parry*, 1992 ; Swayer, 1980), est utilisée comme modèle pour les études d'interactions bactérie/amibe y compris avec des souches d'origine marine (Hilbi *et al.*, 2007 ; Laskowski-Arce *et Orth*, 2008 ; Reyes-Batlle *et al.*, 2017 ; Van der Henst *et al.*, 2016). Elle est considérée comme une spécialiste du broutage sur surface, donc des bactéries en biofilm (Huws, McBain, *et Gilbert*, 2005 ; Seiler *et al.*, 2017). Celle-ci pourrait donc partager la même niche écologique que les bactéries marines isolées de biofilms de la rade de Toulon.

C'est pourquoi nous avons choisi d'évaluer en présence d'*A. castellanii* le comportement des quatre bactéries marines étudiées précédemment lorsqu'elles sont cultivées en biofilms monospécifiques ou en biofilms multi-spécifiques comportant les 4 souches étudiées au chapitre précédent. Cette étude a été rédigée sous la forme d'un article scientifique bien qu'elle puisse encore être largement complétée par des résultats complémentaires.

Amoeba against bacterial biofilms: chemical cues promote biofilm detachment and filamentous shapes.

Richard Guillonéau, Claudine Baraquet, Maëlle Molmeret

Laboratoire MAPIEM, EA4323, Université de Toulon, La Garde, France

Running title: Amoebae promote detachment of single and multispecies bacterial biofilms

Abstract

Protozoa such as free-living amoeba are important members of microbial communities in all terrestrial, fresh and marine environments. The biofilm and its matrix has been described as a fortress to protect bacteria from various harmful mechanisms, such as antimicrobials or predatory actions. The biofilm and protozoan grazing are poorly understood and very few studies have been interested in interactions between marine bacterial biofilms and protozoa susceptible to occupy the same ecological niche. In this study, we have investigated the interactions between the biofilms of four different marine bacteria with the ubiquitous axenized amoeba, *Acanthamoeba castellanii*. Here, we have shown that first all biofilms were subjected to detachment from the surface during the 24h interaction with amoeba; Second, the amoeba supernatant triggered the elimination of two of the bacteria from the surface, suggesting that *A. castellanii* produces chemical cues that may induce bacterial dispersal from monospecies biofilms and of each bacteria involved in the multispecies biofilm; Third, the formation of filamentous structures with *Shewanella* sp. TC10 has been observed in presence of amoebae and of the amoebae supernatant but not when the medium was added onto the bacteria alone, suggesting that molecule(s) secreted by the amoeba may induce as well phenotypical modifications on at least one of the bacteria. A better understanding of the regulation of cell detachment and the identification of the dispersal signal(s), would give crucial information for potentially future eco-friendly strategies to control bacterial biofilm in a variety of sectors of activity.

Keywords: Marine bacteria, amoeba, biofilm, grazing, detachment

Introduction

In aquatic ecosystems, most bacteria live attached to inert or living surfaces and form communities called biofilms (Costerton et al., 1995; O'Toole et al., 2000; Watnick and Kolter, 2000). The bacteria in biofilm live embedded in a self-produced matrix of exopolysaccharides, eDNA, proteins and lipids (Flemming and Wingender, 2010). The biofilm and its matrix allow the accumulation of nutrients on surfaces and act as a fortress to protect bacteria from various harmful mechanisms, such as antimicrobials or predatory actions (Kjelleberg and Givskov, 2007). In this type of environment, the presence of different microorganisms renders the structure of the biofilms very complex and makes the interaction between organisms necessary. The interactions between bacteria result in an increase or a decrease of the bacterial ability to resist at various stress (Elias and Banin, 2012; Rendueles and Ghigo, 2012). Biofilms is also a feeding environment for protozoa that is different from the one offered by suspensions or planktonic cells. The biofilm and its protozoan grazing are poorly understood. Some results have endowed biofilms with a protection function against the predation (Decho, 1990; Darby et al., 2002; Bjarsholt et al., 2005; Matz et al., 2005; Queck et al., 2006). However, other studies have shown that protozoan grazing may affect biofilm thickness, biomass and morphology (Böhme et al., 2009; Derlon et al., 2012). Furthermore, numerous bacterial biofilms have developed various strategies to avoid or respond to the predation, such as formation of grazing resistant structures or secretion of antiprotozoal factors (Matz et al., 2008b; Böhme et al., 2009; Bigot et al., 2013).

Protozoa such as free-living amoeba are important members of microbial communities in all terrestrial, fresh and marine environments. Protozoa are known to live in close association with bacteria in many ecosystems such as biofilms (Matz et al., 2008a). Nowadays, studies are mostly focused on understanding the physiology and regulation of sessile bacteria without enough taking in consideration other major players of microbial communities (Matz et al., 2008a). Predation by protozoa is considered to be the leading cause of bacterial death (Sherr and Sherr, 2002). However, two types of potential routes for bacterial adaptations against predations by protozoa have been described (Matz and Kjelleberg, 2005; Matz et al., 2008a): pre-ingestional and post-ingestional with various adaptation strategies associated with bacterial size or grouping, bacterial speed, amoeba surface masking, digestionnal resistance, toxin release or intracellular growth (Matz and Kjelleberg, 2005). In marine, freshwater, and terrestrial ecosystems, pre-ingestional morphological adaptations, such filament formation or clumping (Hahn et al., 1999; Corno and Jürgens, 2006; Queck et al., 2006), or the production

of toxic secondary metabolites (Matz et al., 2008b; Mazzola et al., 2009; Jousset et al., 2010) are the most described strategies to avoid engulfment. In recent years, the spotting of protozoa and specially amoeba of their prey and the modification of their behavioral, morphological and genomic expression has been highlighted (Kusch, 1993; Corno and Jürgens, 2006; Blom et al., 2010; Jousset and Bonkowski, 2010; Jousset et al., 2010). While different types of interactions and responses were observed in these studies with various bacteria mostly isolated from terrestrial or fresh water sources, very few studies have been interested in interactions between marine bacterial biofilms and protozoa susceptible to occupy the same ecological niche.

Different marine bacteria have been isolated from biofilms recovered from the Toulon bay, France (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014). These bacteria have been identified and characterized on their different capacity to swim, adhere and form a biofilm *in vitro* in different conditions (Brian-Jaisson et al., 2014) and thereafter various studies have highlighted other phenotypical differences (El-Kirat-Chatel et al., 2017; Favre et al., 2017). Among the Toulon collection (TC) strains, we have identified a new species of *Persicivirga* named *mediterranea* (TC4), a species belonging to the *Polaribacter* genus (TC5), and two strains of *Shewanella* (TC10 and TC11). In this study, we have shown that first all biofilms were greatly eliminated from the surface during the 24h interaction with amoeba, most probably through detachment; Second, the amoeba supernatant triggered the detachment of two of the bacteria from the surface, suggesting that *A. castellanii* produces chemical cues that may induce bacterial dispersal from the monospecies and the three-species biofilms; Third, the formation of filamentous structures with *Shewanella* sp. TC10 has been observed in presence of amoebae and the amoebae supernatant but not when the medium was added onto the bacteria alone, suggesting that molecule(s) secreted by the amoeba may induce as well phenotypical modifications on at least one of the bacterial strains.

Materials and Methods

Bacterial and protozoan strains:

Four marine bacterial strains were used in this study: *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4 (Toulon Collection), *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11. These strains have been isolated from various surfaces immersed in the bay of Toulon and displayed different phenotypical traits regarding motility, adhesion, biofilm formation (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014). All bacterial strains have been grown in VNSS (Mårdén et al., 1985) at 20°C, 120 rpm. The TC10 strain, which harbored the pX5 plasmid

encoding GFP (kindly constructed by Dr Aurore Puymège) was cultured in VNSS supplemented with 6 µg/mL of Chloramphenicol.

Acanthamoeba castellanii is an axenized environmental isolate that was provided by Pr F. Pernin, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques-Faculté de Pharmacie-Université Lyon1, Lyon, France. The amoeba have been cultured into 175 cm² tissue culture flasks (Nunc™, Thermo Scientific, Roskilde, Denmark) containing 30 mL of PYG (Peptone, Yeast-extract, Glucose) at 20°C. The coculture assays were performed in the NSS solution (Mårdén et al., 1985; Matz et al., 2008b).

Biofilm development:

Bacterial biofilms were developed into 96-well microtiter plates (Corning Incorporated Costar®, New York, USA) with 200 µL of bacteria harvested in post exponential growth phase in VNSS and suspended in NSS at an OD_{600nm} of 0.4 into each well. After 15h, 24h, 48h and 72h of development in static conditions and a temperature of 20°C, samples were washed thrice with NaCl (36 g.L⁻¹) and dried during 30 min at 50°C. Biofilms were stained during 15 min with 200 µL of Crystal Violet and rinsed thrice with NaCl (36 g.L⁻¹) and dried 10 min. The quantification of biofilm was evaluated by releasing the stain from the biofilm with absolute ethanol for 10 min at 20°C, 120 rpm and by measuring the absorbance of Crystal Violet solution at 595 nm. At least, three biological replicates of the biofilm development experiments were performed.

Amoeba against bacterial biofilm:

A preformed biofilm of bacteria was established in NSS in 24 well plates (Corning Incorporated Costar®, New York, USA), containing a sterilized glass coverslip into each well, to a final OD_{600nm} of 0.4 (0.1 per strain for multispecies biofilm). After 24h or 48h of incubation at 20°C in static conditions, 1 ml of NSS for the blank, 1 ml of amoeba-preconditioned supernatant or 1 mL of amoeba suspension at 5.10⁵ cells/ml in NSS was added onto the preformed biofilms. The preconditioned supernatant was collected from a culture of amoeba at 5.10⁵ cell/ml in NSS, which was filtrated onto a 0.2 µm filter after 24h of incubation. After 24h of incubation at 20°C in static conditions, cells were fixed using Formalin 3.7% during 3h. The permeabilization steps were performed using Triton™ X-100 (0.05%) during 15 min and using Tween® 20 (0.5%) during 20 min in order for the antibodies to access all cellular compartments. For the immunostaining, samples were blocked with BSA 3% (Acros organics, Geel, Belgium) in PBS 1X overnight at 4°C. The primary antibodies were added during 1h in BSA 3% at 1/300 for

Chicken-anti-TC4, 1/100 for Goat-anti-TC5 and 1/300 for Rabbit-anti-TC11. After a second blocking step of 2h at room temperature, secondary antibodies were added in BSA 3% together with DAPI at 5µg/mL only for the wells containing amoeba (Sigma-aldrich, Darmstadt, Germany), to a concentration of 1/4000 for Goat anti-Chicken IgY (H+L) conjugated to FITC (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA) for 1h, to a concentration of 1/2000 for Donkey anti-Goat IgG (H+L) coupled to Alexa Fluor 633 (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA) for 1h, to a concentration of 45 µL/mL for Donkey anti-Rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 594 (Invitrogen™, Waltham, Massachusetts, USA) during 30 min and to a concentration of 1/500 for Goat anti-chicken IgG coupled to Alexa Fluor 405 (Abcam, Cambridge, United kingdom) for 1h. Finally, the coverslips were mounted with a drop of ProLong™ Diamond Antifade before observation using CLSM. For biofilm of TC10 pX5-GFP, after the fixation step, the samples were directly mounted with the same Antifade mounting medium. At least three biological replicates for the biofilm grazing experiments were performed and at least 10 pictures were analyzed per sample under the 63x/1.40 Oil DIC objective (Zeiss, Göttingen, Germany).

Evaluation of the presence of planktonic bacteria.

A preformed biofilm of bacteria was performed in NSS in 24 well plates, containing a sterilized glass coverslip into each well, to a final OD_{600nm} of 0.4 (0.1 per strain for multispecies biofilm). After 24h of incubation at 20°C in static conditions and after three washes, 1 ml of NSS for the blank, 1 ml of amoeba-preconditioned supernatant prepared as described above, or 1 mL of amoeba suspension at 5.10⁵ ml in NSS was added onto preformed biofilms. After 24h of incubation at 20°C in static conditions, the supernatant of the biofilms were plated on VNSS agar before analyzing CFU enumeration. At least, three biological replicates of the planktonic bacterial enumerations were performed.

Data extraction from images and statistics:

At least three biological replicates and ten pictures per replicate were performed in each case. The pictures have been acquired by CLSM (Zeiss LSM 510, Göttingen, Germany). The biovolume of CLSM pictures was determined with the COMSTAT software developed in MATLAB R2015a (Mathworks, Natick, Massachusetts, USA) (Heydorn et al., 2000). To test for statistically significant differences ($P < 0.05$) between two conditions a T-test was performed and a one way analysis of variance including the Bonferroni post-test were performed between different time points, using SPSS 13.0 (IBM, Armonk, New York, USA).

Results

Biofilm formation in NSS

To evaluate the abilities of various marine bacterial strains to form a biofilm in NSS, a marine solution depleted of carbon sources, kinetics of biofilm formation were performed at 15h, 24h, 48h and 72h using the Crystal Violet method. This medium has been chosen as bacteria and amoeba were able to survive without displaying important variations of cell numbers as shown in our previous study (Guillonnet al., 2018a). In addition, poor or low nutrient marine media may have the advantage to promote cell interactions in multispecies biofilms. The results showed that while the strains are unable to grow planktonically in this medium, all the bacterial strains were able to form a biofilm in NSS with various efficiencies and paces (figure 56). The four bacterial strains formed a biofilm within 15h. A progression of the biofilm formation over the 72h period was observed for all the strains, except for *Polaribacter* sp. TC5, whose biofilm decreased after 24h. The most important progression in the biofilm formation was observed for *Shewanella* sp. TC10 and in a lesser extent, *Shewanella* sp. TC11. Both strains presented a significant difference in their biofilm formation between 15h and 72h as well as between 24h and 72h, which was not the case for TC4 and TC5. Both the TC4 and TC5 biofilms reached a maximal DO_{595nm} of about 4.2 and 4 at 72h and 24h, respectively, while the TC10 and TC11 biofilms reached a maximal DO_{595nm} of 6.4 and 5.8, respectively, both at 72h. These results suggest that the biofilms of the two *Shewanella* strains grew better in NSS than the one of *P. mediterranea* TC4 and *Polaribacter* sp. TC5.

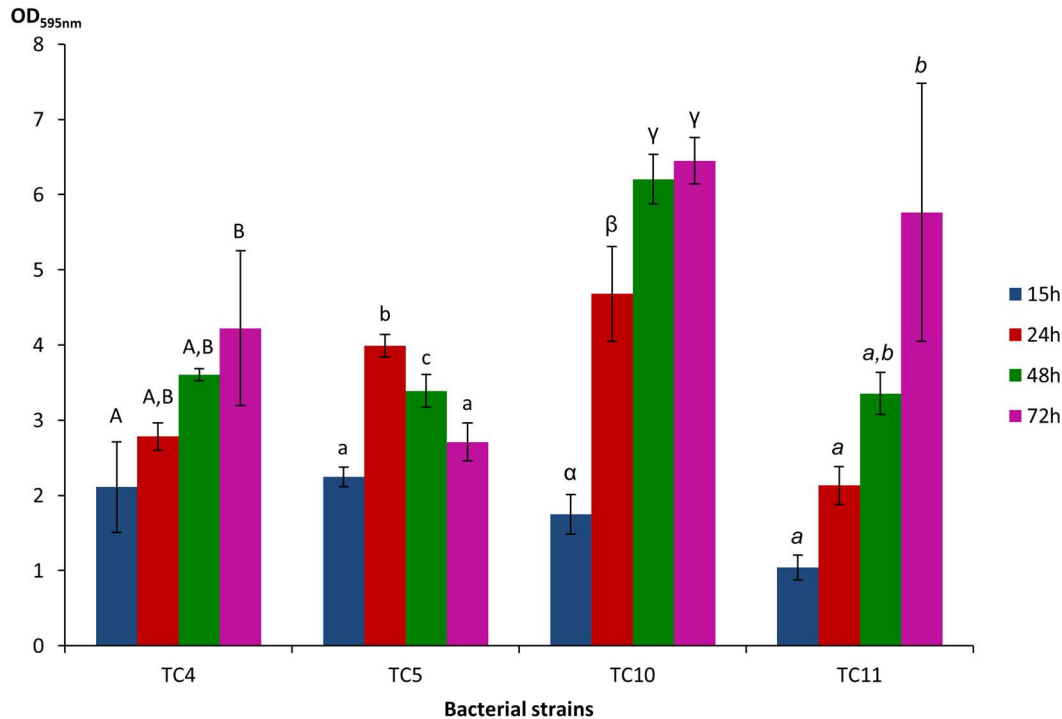


Figure 56: Kinetic of the biofilm formation of *Percisivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11 on microplates measured with Crystal Violet after different incubation times (15h, 24h, 48h and 72h) in NSS. Values are the means of three technical replicates representative of three biological replicates, errors bars represent standard deviation and significant differences between incubation times (p -value <0.05) are displayed by different letters (A versus B) in a same alphabet.

Biofilm fate and bacterial localization during the interaction with *A. castellanii*

In order to evaluate the outcome of preformed single species bacterial biofilms in presence or absence of *Acanthamoeba castellanii*, 24h- and 48h-old biofilms were selected for the grazing experiments as they were relatively important without showing any sign of detachment. The preparation of the 24h- and 48h-old biofilms was followed by a wash and by the addition of first either the NSS medium or the amoeba for another 24h incubation.

The results showed that while in absence of amoeba, all the biofilms presented numerous bacteria spread out onto the surface, most of the bacterial biofilms had disappeared in presence of *A. castellanii* at both time points (figure 57-I A and B, 57-II A and B, 57-III A and B, 57-IV A and B). In presence of the amoeba, only few bacteria were left on the surface or were associated with the amoeba as shown by the calculation of the bacteria biofilm biovolumes in the presence and in the absence of amoebae (figure 57-I D, 57-II-D, 57-III D and 57-IV D). We have noticed that similar to our previous study describing the intracellular interactions of these bacteria with the same amoeba (Guillonneau et al., 2018a), *P. mediterranea* TC4 was mostly associated with the nucleus of *A. castellanii*. We have also observed that extracellular *Shewanella* sp. TC10 were mostly under a filamentous form when *A. castellanii* was present,

in sharp contrast with when TC10 were in the biofilm alone. When TC11 was in the presence of amoebae, we have observed patches of bacteria in rounded shapes, which look like bacteria-containing vesicles, around or within the host cells similar to what we previously observed (Guillonnet al., 2018a). However, for TC5, the few remaining amoebae observed looked bigger as if they had phagocytosed each other, and showed necrotic signs, such as impaired membranes integrity (figure 57-III B). Numerous bacteria were associated with the amoebae which appeared very flat and stressed out. Whether this observation resulted from a high phagocytosis rate of numerous bacteria by the amoeba, resulting in a progressive toxic bacterial indigestion or from a bacterial attachment onto dying amoeba bodies is not known. This result was quite surprising, but all these experiments were performed at the same time with the same initial inoculum of amoebae. For the 3 other bacteria, all the amoebae appeared healthy suggesting that these observations were not linked to a bad batch of amoeba cultures. In addition, these experiments had 3 biological replicates that displayed similar features. It is possible that with a 24h- or 48h-old preformed biofilms, the ratio of bacteria/amoeba was unfavorable for the amoeba in the case of TC5. We had previously shown that TC5 was able to secrete component(s) with an antibiofilm activity on TC10 and that TC5 when in presence of the other strains, exerted 2 of the strongest inhibitory activities toward TC11 and TC10 (Guillonnet al., 2018b). Therefore, while TC4, TC10 and TC11 behaved with the amoebae very similarly as what we had previously observed, it is possible that the phagocytosis of a high number of TC5 may have triggered cytotoxic effect on *A. castellanii*, resulting on a negative outcome for both partners. Overall, except for TC5, few bacteria were associated with the amoeba similar to when the ratio bacteria/amoeba was much lower (Guillonnet al., 2018a), which may suggest that bacteria have detached from the surface rather than being phagocytosed and digested.

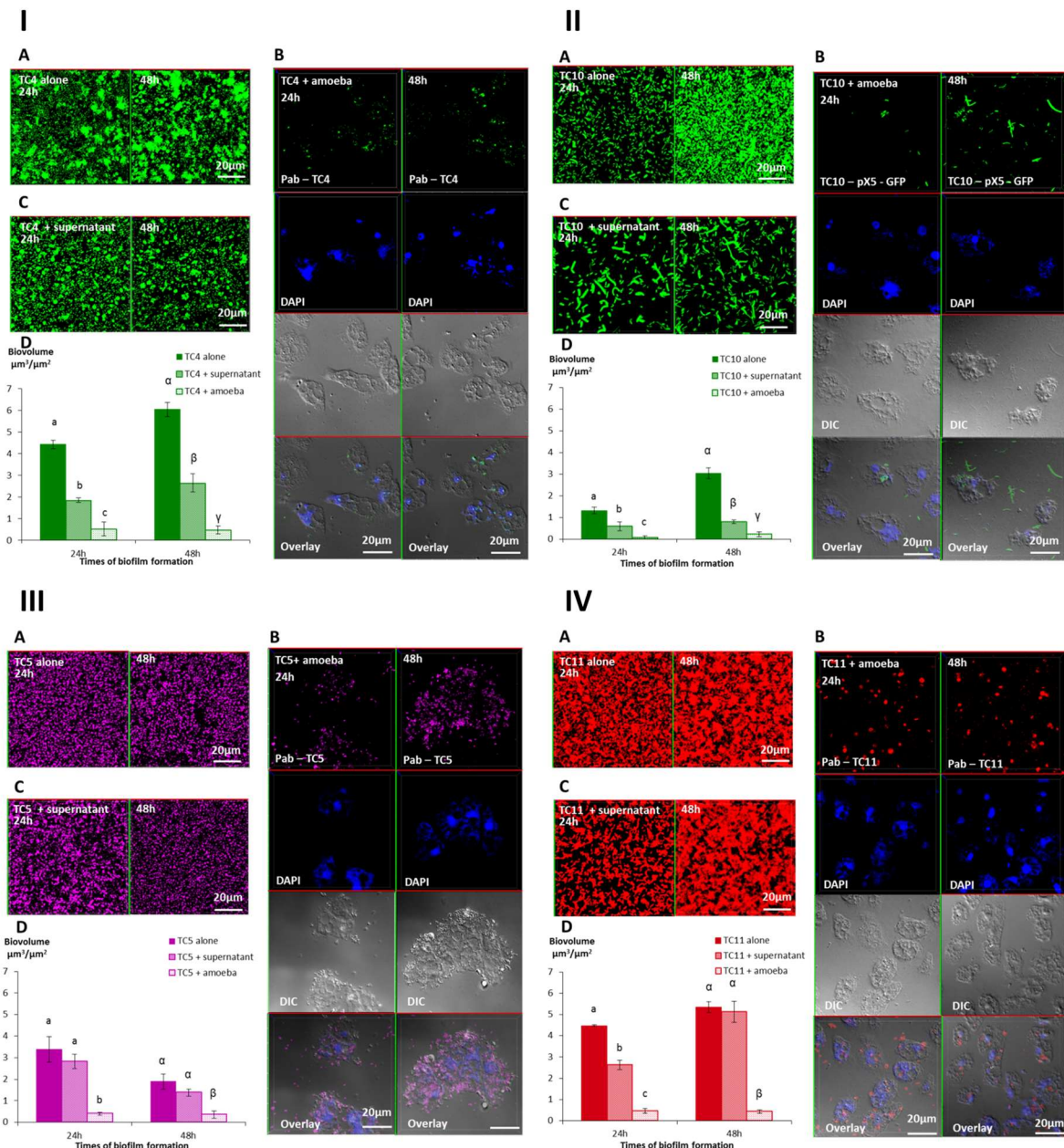


Figure 57: Biofilm formation of *Persicivirga mediterranea* TC4 (I) and *Shewanella* sp. TC10 (II), *Polaribacter* sp. TC5 (III) and *Shewanella* sp. TC11 (IV) in presence of *A. castellanii* and of the amoeba supernatant. The formation of biofilms were monitored using CLSM after the addition for an additional 24h of NSS (control) (A), amoebae (B) and the amoeba supernatant on a 24h- and 48h-old biofilm (C). Pictures are representative of three biological replicates. Bar plot represents the calculated biofilm biovolume in the different conditions relative to the incubation time (D). The biovolumes were evaluated by a COMSTAT algorithmic method. Values are the means of three biological replicates, error bars represent standard deviation and significant differences between incubation times (p -value <0.05) are displayed by different letters (a,b,c) in a same alphabet ($a \neq \alpha$).

Secretion of amoeba chemical cues inducing biofilm detachment

In order to verify if bacterial phagocytosis and subsequent digestion were the sole responsible for the bacterial disappearance, we performed the same experiments but with the addition of amoeba supernatants on to the preformed bacterial biofilms. Therefore, in these experiments, we added on each of the 24h- or 48h-old biofilms, either the NSS medium as a control, the

amoeba supernatant or the amoeba suspension in NSS. The results showed that the biofilm biovolumes of TC4 and TC10 decreased significantly when the amoeba supernatant was added compared to when the bacteria were alone but were significantly higher than when the amoebae were present (figure 57-I D and 57-II D). These suggests that the amoeba supernatant significantly affected the bacterial biofilm, through the potential secretion of molecule(s) present in the amoeba supernatant. However, for TC5, no significant difference was found in the biofilm biovolumes between TC5 alone and when the amoeba supernatant was added (figure 57-III D). This suggests that while adding amoebae triggered the elimination of the bacteria, the supernatant had no significant effect. For TC11, the same result was obtained, except that on a 24h-old biofilm, the addition of the supernatant had initially a significant effect on the bacterial biovolume, which was lost in a the 48h-old biofilm (figure 57-IV D). Therefore, the presence of amoeba was directly responsible for the bacterial elimination of all the strains but *A. castellanii* might secrete component(s) in its supernatants to which TC4 and TC10 are more susceptible to than TC11 and had no effect on TC5.

Interestingly, changes were observed in the biofilms of TC4 and TC10, in the presence of the amoeba supernatant compared to when only NSS was added, while no change was noticed in the TC5 and TC11 biofilms. First, the TC4 patches observed in the biofilm reduced significantly in size when the supernatant was added, which was not the case for the biofilm made of patches of TC11 (figure 57-I A and C). More importantly, TC10 which were all small sized bacteria when grown in NSS, became bigger and filamentous when in presence of the amoeba supernatant (figure 57-II A and C). This tends to suggest that while the supernatant had an effect on TC4 and TC10 in terms of biofilm biovolumes, it triggered also visible changes on the biofilm and the bacteria. Moreover, when amoebae were present on the TC10 biofilm, only small bacteria appeared to be engulfed within the cell, while long and bigger filamentous bacteria (over 10 μm for some) could be seen outside the amoebae (figure 57-II.B). Since these phenotypical changes were triggered by the supernatant of *A. castellanii*, this suggests that it could be induced by molecule(s) secreted by the amoebae. When amoebae were present, these or this component(s) triggering bacterial filamentation and size augmentation could provide a way for the bacteria to avoid full scale phagocytosis by the amoebae.

Detachment by chemical cues was transferred to other strains in multi-species biofilm

In order to know if we would obtain similar results in a multispecies biofilm, we performed the same experiments with the mixed biofilm of *P. mediterranea* TC4, *Shewanella* TC10 and TC11. *Polaribacter* sp. TC5 was not used in these experiments as its interaction with *A. castellanii* appeared to trigger an important stress on the amoebae. Similarly, after 24h and 48h incubation, either NSS alone, *A. castellanii*, or the amoeba supernatant was added on the biofilms, which was incubated for an additional 24h. The mixed and the monospecies biofilms were performed with an OD₆₀₀ of 0.1 per strain, similarly to our previously study (Guillonneau et al., 2018b). Interestingly, the results showed that similar to our previous study, *P. mediterranea* TC4 outfitted the other strains in the three-species biofilm at both time points when they were cultivated in NSS without the amoebae or the amoeba supernatant (figure 58 A and D). Therefore, the NSS appeared to maintain some of the relationships that existed between the strains in ASW (Guillonneau et al., 2018b), where TC4 had a synergetic interaction with TC10. However, the TC10 biofilm seemed more impacted in this mixed biofilm while TC11 appeared less inhibited. Nevertheless, when the amoeba supernatant was added, all the strains had a decreased biofilm biovolume, except for TC11 at 24h only. At 48h the amoeba supernatant has an impact on all the strains. The addition of the amoeba themselves did not induce a significant additional fall in the strains biovolumes except for TC11 at 24h (figure 58 B, C and D). The reason why the TC10 biofilm biovolume was significantly less impacted in presence of the amoeba versus the amoeba supernatant on the 48h-old biofilms is not known. It is possible that the molecules from the prepared supernatant collected on a monoculture of amoebae may be different that the ones secreted from amoeba in presence of bacteria. It is also possible that the other bacteria when together, secreted other molecules or induced changes in amoeba secretions, which changed the overall outcome of the interactions between the partners, making the amoeba supernatants more efficient that when the amoeba were themselves present.

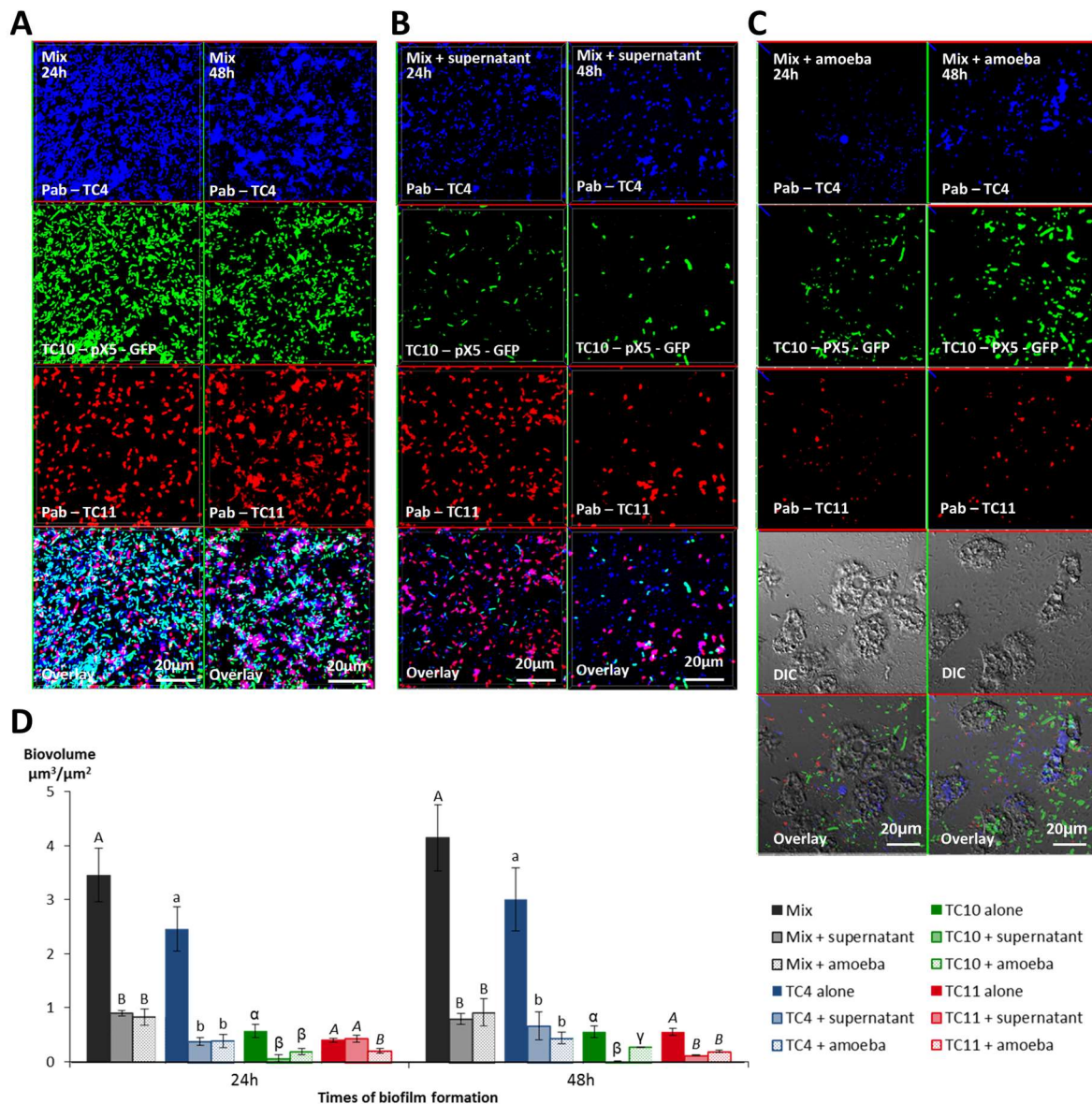


Figure 58: Multispecies biofilm formation including *Persicivirga mediterranea* TC4, *Shewanella* sp. TC10 and *Shewanella* sp. TC11 in presence of *A. castellanii* and *A. castellanii* supernatant. The formation of 24h- and 48h-old biofilms was monitored using CLSM after the addition for an additional 24h of NSS (control) (A), the amoebae supernatant (B) and the amoebae (C). Bar plot represents the calculated biofilm biovolumes in the different conditions (D). Pictures are representative of three biological replicates. Biovolumes were evaluated by a COMSTAT algorithmic method. Values are the means of three biological replicates, error bars represent standard deviation and significant differences between incubation times (p -value <0.05) are displayed by different letters (a,b,c) in a same alphabet ($a\neq a$).

In order to confirm that the presence of the amoeba supernatant or the amoeba themselves on the monospecific or multispecific biofilms induced bacterial detachment, the non-adhered bacteria floating above the single or multispecific biofilms, which had all been treated similarly were plated for CFU enumeration. First, we noticed that even when the bacteria were alone, after the addition of NSS, a substantial concentration of bacteria were found in the biofilm supernatant (figure 59). In addition, this experiment showed that when the amoeba supernatant or the amoeba themselves were added, the dispersal was significantly more important for all

the bacteria. The fact that no significant difference was found between the addition of the supernatant versus of the amoeba, which is less than one log difference, might be due to the sensitivity of the technique. Nevertheless, this experiment showed that a significant bacterial dispersal occurred when amoebae or amoeba supernatants were added to the single species and multispecies biofilms.

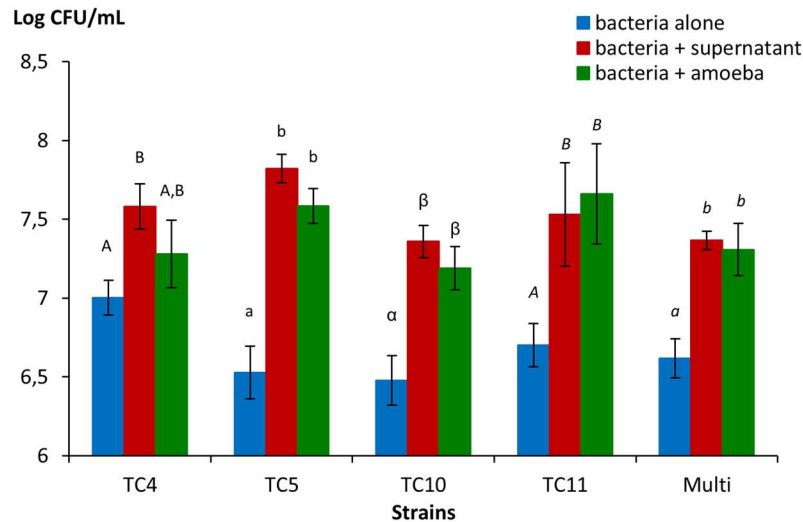


Figure 59: Concentrations of extracellular planktonic bacteria collected from the biofilms of *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10, *Shewanella* sp. TC11 and of the TC4, TC10 and TC11 multispecific biofilm in presence of the amoeba and the amoeba supernatant. After 24h of biofilm formation, samples were washed and either NSS (control), the amoeba or the amoeba supernatant was added and incubated for an additional 24h. Serial dilution and plating of the different biofilm supernatants were performed on VNSS. Values are the means of three technical replicates representative of three biological replicates, error bars represent standard deviation and significant differences between incubation times (p -value <0.05) are displayed by different letters (a,b,c) in a same alphabet ($A \neq a \neq \alpha \neq A \neq a$).

Discussion

In this present study, we tend to assess the impact of grazing by the free living amoeba *Acanthamoeba castellanii* on single and three-species biofilms, set up from a previous study (Guillonneau et al., 2018b). The bacteria were initially isolated from biofilms collected from the Toulon bay (Camps et al., 2011; Brian-Jaisson et al., 2014). Before studying amoeba grazing on bacterial biofilms, we have also described the intracellular fate of the same bacteria, in a host cell-bacteria interaction study using *A. castellanii*, which showed that very different paths are followed by the bacteria, including an intranucleolar location and an expulsion of bacteria containing vesicles outside the host cell (Guillonneau et al., 2018a). Our results showed that first all biofilms were greatly eliminated from the surface during the 24h interaction with the amoeba, most probably through detachment; Second, amoeba supernatant triggered the detachment of two of the bacteria from the surface, suggesting that *A. castellanii* produces chemical cues that may induce bacterial dispersal from monospecies and multispecies biofilms;

Third, the formation of filamentous structures with *Shewanella* sp. TC10 has been observed in the presence of amoebae and of amoebae supernatants but not when the medium was added onto the bacteria alone, suggesting that molecule(s) secreted by the amoeba may induce as well phenotypical modifications on at least one of the bacterial strain.

Sessile microbial biofilms have developed mechanisms that trigger dispersal of differentiated often highly motile cells into the medium. This allows the bacteria to colonize new niches to ascertain spread and survival of the population, propagation and rejuvenation of biofilms, despite the cost and the risk incurred by the population. Two types of detachment have been described: the sloughing, a passive process, which may be mainly triggered by events such as shear forces; the active or seeding dispersal, which is controlled by mechanisms involving environmental factors and bacterial or other organisms signals (Barraud et al., 2015). In our study, the addition of amoebae or the amoeba supernatant induces an important detachment of the bacterial biofilms. The fact that all the samples were submitted to the same amount of washes and were treated in parallel with the NSS medium, the amoebae or the amoeba supernatant, rules out any cause coming from a differential treatment or from the NSS medium itself. Stress such as the presence of protozoan predator or of bacteriophages has been shown to be responsible for dispersal in biofilms. In addition, many organisms are known to produce antifouling compounds that inhibit or induce the dispersion of the biofilm (McDougald et al., 2012; Rendueles and Ghigo, 2012; Marks et al., 2013). Bacteria have developed mechanisms that trigger differential gene expression in responses to these stressful conditions. *Acanthamoeba* sp. are known to be very efficient predators in feeding on sessile bacteria, as it does not belong to swimmers (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Weitere et al., 2005). Therefore, it is possible that bacteria were able to sense the presence of their predator, either directly or indirectly through chemical cues present in the supernatant, which induce dispersion of the biofilms. In the three-species biofilm, the amoeba supernatant was able to induce the detachment of all bacteria including the one, which were not sensitive to the amoeba supernatant in their monospecies biofilm. This may suggest that some kind of communication has taken place to induce its detachment. The amoeba spotting by bacteria have been demonstrated with various strains of amoeba and bacteria. For example, when *Pseudomonas fluorescens* is exposed to the *A. castellanii* supernatant, the expression of the *prnA*, *phlA* and *hcnA* genes involved in the synthesis of the toxins pyrrolnitrin, 2,4-diacetylphloroglucicol (DAPG), and hydrogen cyanide, is increased. These modifications of gene expression increase of 25 % bacterial toxicity (Jousset and Bonkowski, 2010; Jousset et al., 2010). During

interaction between *Staphylococcus aureus* and *Acanthamoeba polyphaga*, some metabolites may be produced in the amoeba supernatant which inhibit bacterial growth (Souza et al., 2017).

In this study, we also show that morphological changes take place in response to the amoeba supernatant. The most striking example is the one linked to *Shewanella* sp. TC10, which forms bigger and filamentous shapes when the amoeba supernatant is added. We have also previously described similar phenotypical modifications. When *Shewanella* sp. TC10 was grown in the rich medium VNSS, filamentous bacteria were observed, in contrast with the NSS medium (Guillonneau et al., 2018a). Therefore, *Shewanella* sp. TC10 in response to change of environmental factors or to the amoeba secretion of chemical cues induces morphological changes. Similarly, in presence of *A. castellanii*, while the intracellular TC10 stay small, the extracellular bacteria appear larger and more filamentous. This mechanism has been shown to be used by bacteria in response to a predator to avoid phagocytosis (Matz and Kjelleberg, 2005; Justice et al., 2008). High grazing pressure is often correlated with the development of filamentous morphotypes (Jürgens et al., 1999; Simek et al., 2001; Hahn et al., 2003; Corno et al., 2008; Justice et al., 2008; Jousset, 2012). If in some cases, the filamentous abilities of bacteria interacting with grazers can be growth rate or quorum sensing dependent (Hahn et al., 1999; Queck et al., 2006; Salcher et al., 2007), others auteurs have shown that filamentous or aggregation abilities are triggered by chemical stimuli released by the predator (Pernthaler et al., 1997; Corno and Jürgens, 2006; Blom et al., 2010). These chemical signals exchanged between organisms have been named “Kairomones” as they can give a benefit to the recipient organism while not being beneficial for the producer (Pohnert et al., 2007; Blom et al., 2010). For instance, the amoeba *Amoeba proteus*, which feeds on ciliates, is known to produce kairomones with a molecular weight between 5,000 and 10,000 Da that induce a size increase of the ciliate *Euplotes octocarinatus* and an avoidance behavior with *E. octocarinatus* and *E. daidales* (Kusch, 1993).

Taken together these results showed that the four marine bacteria harvested from biofilms triggered various strategies to prevent the predation by *A. castellanii* such as dispersal and filamentation. Future investigations are needed to determine which type of compound induces this detachment. The mechanisms by which dispersal is triggered are diverse. A better understanding of the regulation of cell detachment and the identification of the signal involved, would give crucial information for potentially future eco-friendly strategies to control bacterial biofilm in a variety of sectors of activity, including for the design of environmentally friendly antifouling coatings limiting the biofilm development. Therefore, this study reiterates that the

co-evolutionary history of bacteria and amoeba may have developed numerous strategies to spot and avoid predation by amoeba, one of the main bacterial predators.

References

- Barraud, N., Kjelleberg, S., and Rice, S.A. (2015) Dispersal from microbial biofilms. *Microbiol Spectr* **3**.
- Bigot, R., Bertaux, J., Frere, J., and Berjeaud, J.-M. (2013) Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for *Legionella*. *PLOS ONE* **8**: e77875.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Burmølle, M., Hentzer, M., Haagensen, J.A.J., Hougen, H.P. et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology (Reading, England)* **151**: 373-383.
- Blom, J.F., Hornák, K., Simek, K., and Pernthaler, J. (2010) Aggregate formation in a freshwater bacterial strain induced by growth state and conspecific chemical cues. *Environmental Microbiology* **12**: 2486-2495.
- Böhme, A., Risse-Buhl, U., and Küsel, K. (2009) Protists with different feeding modes change biofilm morphology. *FEMS microbiology ecology* **69**: 158-169.
- Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y., and Molmeret, M. (2014) Identification of bacterial strains isolated from the mediterranean sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microbial Ecology* **68**: 94-110.
- Camps, M., Briand, J.-F., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Bazire, A., and Blache, Y. (2011) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Marine Pollution Bulletin* **62**: 1032-1040.
- Corno, G., and Jürgens, K. (2006) Direct and indirect effects of protist predation on population size structure of a bacterial strain with high phenotypic plasticity. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 78-86.
- Corno, G., Caravati, E., Callieri, C., and Bertoni, R. (2008) Effects of predation pressure on bacterial abundance, diversity, and size-structure distribution in an oligotrophic system. *Journal of Limnology* **67**: 107-119.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**: 711-745.
- Darby, C., Hsu, J.W., Ghori, N., and Falkow, S. (2002) *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* **417**: 243-244.
- Decho, A.W. (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography And Marine Biology annual review* **28**: 73-153.
- Derlon, N., Peter-Varbanets, M., Scheidegger, A., Pronk, W., and Morgenroth, E. (2012) Predation influences the structure of biofilm developed on ultrafiltration membranes. *Water Research* **46**: 3323-3333.
- El-Kirat-Chatel, S., Puymege, A., Duong, T.H., Van Overtvelt, P., Bressy, C., Belec, L. et al. (2017) Phenotypic heterogeneity in attachment of marine bacteria toward antifouling copolymers unraveled by AFM. *Frontiers in Microbiology* **8**.

- Elias, S., and Banin, E. (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* **36**: 990-1004.
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Greff, S., Pérez, T., Thomas, O.P., Martin, J.-C., and Culioli, G. (2017) Discrimination of four marine biofilm-forming bacteria by LC-MS metabolomics and influence of culture parameters. *Journal of Proteome Research* **16**: 1962-1975.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 623-633.
- Guillonneau, R., Baraquet, C., and Molmeret, M. (2018a) Different intracellular trafficking of marine bacteria within amoeba cells: from expelled vesicles to the first description of an intranucleolar niche. *Unpublished*.
- Guillonneau, R., Baraquet, C., Bazire, A., and Molmeret, M. (2018b) Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Unpublished*.
- Hahn, M.W., Moore, E.R., and Höfle, M.G. (1999) Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 25-35.
- Hahn, M.W., Lünsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Höfle, M.G., Boenigk, J., and Stadler, P. (2003) Isolation of novel ultramicrobacteria classified as *actinobacteria* from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1442-1451.
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., and Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* **146**: 2395-2407.
- Jousset, A. (2012) Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environmental Microbiology* **14**: 1830-1843.
- Jousset, A., and Bonkowski, M. (2010) The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 1647-1649.
- Jousset, A., Rochat, L., Scheu, S., Bonkowski, M., and Keel, C. (2010) Predator-Prey chemical warfare determines the expression of biocontrol genes by rhizosphere-associated *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 5263-5268.
- Jürgens, K., Pernthaler, J., Schalla, S., and Amann, R. (1999) Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1241-1250.
- Justice, S.S., Hunstad, D.A., Cegelski, L., and Hultgren, S.J. (2008) Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 162-168.
- Kjelleberg, S., and Givskov, M. (2007) *The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations*: Horizon Scientific Press.
- Kusch, J. (1993) Behavioural and morphological changes in ciliates induced by the predator *Amoeba proteus*. *Oecologia* **96**: 354-359.
- Mårdén, P., Tunlid, A., Malmerona-Friberg, K., Odham, G., and Kjelleberg, S. (1985) Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Archives of Microbiology* **142**: 326-332.

- Marks, L.R., Davidson, B.A., Knight, P.R., and Hakansson, A.P. (2013) Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from Asymptomatic Colonization to Disease. *mBio* **4**: e00438-00413.
- Matz, C., and Kjelleberg, S. (2005) Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology* **13**: 302-307.
- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A.M., Yung, P.Y., Yildiz, F.H., and Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16819-16824.
- Matz, C., Moreno, A.M., Alhede, M., Manefield, M., Hauser, A.R., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2008a) *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *The ISME Journal* **2**: 843-852.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S. et al. (2008b) Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS ONE* **3**: e2744.
- Mazzola, M., de Bruijn, I., Cohen, M.F., and Raaijmakers, J.M. (2009) Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 6804-6811.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 39-50.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* **54**: 49-79.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Amann, R., and Psenner, R. (1997) Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 596-601.
- Pohnert, G., Steinke, M., and Tollrian, R. (2007) Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 198-204.
- Queck, S.-Y., Weitere, M., Moreno, A.M., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2006) The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environmental Microbiology* **8**: 1017-1025.
- Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (2012) Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews* **36**: 972-989.
- Rodríguez-Zaragoza, S. (1994) Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* **20**: 225-241.
- Salcher, M.M., Hofer, J., Horňák, K., Jezbera, J., Sonntag, B., Vrba, J. et al. (2007) Modulation of microbial predator-prey dynamics by phosphorus availability: growth patterns and survival strategies of bacterial phylogenetic clades. *FEMS microbiology ecology* **60**: 40-50.
- Sherr, E.B., and Sherr, B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 293-308.
- Simek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M.G., Hornák, K., Dolan, J.R., Nedoma, J. et al. (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2723-2733.

Souza, T.K.d., Soares, S.S., Benitez, L.B., and Rott, M.B. (2017) Interaction between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acanthamoeba polyphaga*. *Current Microbiology* **74**: 541-549.

Watnick, P., and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* **182**: 2675-2679.

Weitere, M., Bergfeld, T., Rice, S.A., Matz, C., and Kjelleberg, S. (2005) Grazing resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms depends on type of protective mechanism, developmental stage and protozoan feeding mode. *Environmental Microbiology* **7**: 1593-1601.

Chapitre V : Discussions générales et perspectives

Ce travail de thèse a permis l'étude et la description de la formation de biofilm par différentes souches bactériennes ainsi que l'étude de leurs comportements sociaux les unes avec les autres. Il a également permis l'étude de leurs comportements durant leurs interactions avec des amibes, des micro-organismes eucaryotes phagocytaires généralement considérés comme prédateurs bactériens.

Les souches utilisées ont été isolées à partir de biofilms issus de la rade de Toulon et caractérisées en fonction de leurs capacités à se mouvoir, à adhérer et à former du biofilm *in vitro* dans différentes conditions (Brian-Jaisson *et al.*, 2014-Jaisson *et al.*, 2011). Au sein de la collection de Toulon (TC), quatre souches bactériennes ont été choisies durant cette étude : une nouvelle espèce précédemment identifiée par le laboratoire *Persicivirga mediterranea* (TC4), une espèce appartenant aux *Polaribacter* sp. (TC5) ainsi que deux souches différentes de *Shewanella* sp. (TC10 et TC11). Ces bactéries ont été choisies sur la base de leurs différentes caractéristiques phénotypiques (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; Camps *et al.*, 2011 ; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2017 ; Favre *et al.*, 2017). Ce travail a permis dans un premier temps de caractériser leurs capacités à adhérer et à former un biofilm à l'échelle cellulaire en conditions statiques et dynamiques, de décrire et d'observer la nature et l'organisation de leurs matrices mais également de voir comment celles-ci interagissent lors de l'établissement de biofilms multi-spécifiques. Dans un second temps ce travail a permis d'étudier les interactions entre ces bactéries et une amibe susceptible d'occuper la même niche écologique. Le choix s'est porté sur *Acanthamoeba castellanii*, un organisme ubiquiste qui a été isolé à partir de différentes sources qu'elles soient telluriques, aquatiques, ou marines (Fernandez *et al.*, 1989 ; Page, 1983 ; Rogerson et Laybourn-Parry, 1992 ; Sawyer, 1980). Il s'agit également d'un organisme model pour les études d'interaction bactérie/amibe avec différentes bactéries incluant certaines souches marines (Hilbi *et al.*, 2007 ; Laskowski-Arce et Orth, 2008 ; Reyes-Batlle *et al.*, 2017 ; Van der Henst *et al.*, 2016) Dans une troisième partie, l'étude du devenir des biofilms mono ou multi-spécifiques de ces mêmes souches en présence d'*A. castellanii* a été entrepris. Le but était d'examiner sur des biofilms bactériens préformés, le comportement des bactéries et des amibes en sachant que la présence d'amibes en biofilm a non seulement été décrite comme responsable de l'élimination de la plupart des bactéries mais aussi comme pouvant stimuler la croissance de certains biofilms. Le biofilm est également considéré comme une forteresse protégeant les bactéries contre les mécanismes nocifs, comme les antimicrobiens ou la prédation (Kjelleberg et Givskov, 2007).

Développement de biofilms multi-spécifiques

Afin d'être plus proche des conditions d'établissement d'un biofilm en milieu marin, l'eau de mer artificielle (ASW pour Artificial Sea Water) a été utilisée. Les milieux pauvres en nutriments tels que l'ASW sont supposés forcer les souches à être en interaction compétitive ou métabolique, comme cela est souvent le cas lorsque les souches colonisent de nouvelles niches en environnement naturel. Des souches d'origine marine présentant des caractéristiques et des capacités différentes à adhérer et à former un biofilm ont été choisies (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Une des hypothèses de départ était que même si certaines de ces souches produisent dans différents milieux plus de biofilms que d'autres, le devenir d'un biofilm multi-spécifique entre ces mêmes souches reste difficilement prévisible et donc ces souches peuvent, pour diverses raisons (synergie, compétition...), se développer de façons complètement différentes par rapport à lorsqu'elles sont cultivées en biofilms monospécifiques.

En regardant la formation du biofilm mono-spécifique de ces souches à l'échelle cellulaire, lors de 2 études précédentes, les souches *Persicivirga mediterranea* TC4 et *Polaribacter* sp. TC5 étaient initialement décrites comme faiblement productrices de biofilm lorsqu'elles sont cultivées dans différentes conditions alors que *Shewanella* sp TC10 et de façon encore plus importante TC11 semblaient en produire plus (Brian-Jaisson *et al.*, 2014 ; El-Kirat-Chatel *et al.*, 2017). Dans l'article de Florence Brian-Jaisson et collaborateurs, *Shewanella* sp TC10 produit un biofilm important mais de façon plus progressive que TC11, ce qui fait qu'à 24h son niveau de biofilm est presque aussi faible que celui de TC5 (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Dans la première partie de notre travail, TC4 et dans une moindre mesure TC5 semblaient mieux adhérer à la surface en milieu pauvre. TC10 et TC5 ont des niveaux de pourcentage de recouvrement relativement similaires en conditions statiques et dynamiques. La seule différence repose sur le biovolume qui progresse significativement pour TC10 alors que la progression chez TC4 ou TC5 est moins flagrante, leur biofilm étant beaucoup plus plat. C'est également ce que nous avons remarqué en milieu riche (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Au final, le fait le plus marquant reste le détachement très important de TC11 en condition dynamique, ce qui a été la principale raison de notre choix de rester en conditions statiques dans les expériences suivantes afin de ne pas rajouter l'effet flux dans l'interprétation de nos résultats pour des bactéries potentiellement en compétition en biofilm multi-spécifiques.

L'étude de la composition de la matrice a mis en évidence avec les quelques marqueurs utilisés que les bactéries étaient plutôt spécialisées dans la sécrétion de certains types

d'exsudats. Ainsi, *P. mediterranea* TC4 et *Polaribacter* sp. TC5 sécrètent plutôt de l'ADN extracellulaire (ADNe) tandis que les deux souches de *Shewanella* TC10 et TC11 sécrètent plutôt des protéines dans leur matrice. De même, les souches TC5 et TC10 sécrètent respectivement, de manière moins importante, des exopolysaccharides contenant du glucose et/ou du mannose pour TC5 et des acides sialiques et/ou du N-acetyl-glucosamine pour TC10. Bien qu'il existe probablement bien plus d'éléments sécrétés que ce que nous avons montrés avec 5 marqueurs d'exopolymères, nous aurions pu nous attendre à des profils de sécrétion plus diversifiés pour certaines de ces souches.

Lors de l'étude des biofilms bispécifiques, il est intéressant de noter que la souche *P. mediterranea* TC4 est la seule à bénéficier de la présence d'un autre partenaire, puisque dans tous les autres cas, une inhibition des souches est la plupart du temps observée. En effet, lorsqu'elle est accompagnée de TC10, la production de biofilm de TC4 est plus importante. De plus, ce couple engendre la formation d'un nouveau composé de la matrice qui n'est pas retrouvé dans les biofilms mono-spécifiques. Il s'agit d'un exopolysaccharide composé de glucose et/ou de mannose. De même, alors que les biofilms mono-spécifiques de ces deux souches semblent fortement impactés par la présence de TC11, lorsque les trois partenaires forment un biofilm multi-spécifique, l'interaction bénéfique de *P. mediterranea* TC4 et *Shewanella* sp. TC10 n'est pas impactée par la présence de *Shewanella* sp. TC11. Cela peut laisser supposer l'existence d'une relation forte entre les souches présentes en biofilm résultant en de profondes modifications de l'expression génique de celles-ci. A moyen terme, il pourrait être intéressant d'effectuer des expériences de transcriptomique (RNAseq) sur TC4 (voire sur TC10), qu'il faudrait préalablement séquencer, durant la formation de biofilms mono-spécifiques et multi-spécifiques. Ceci permettrait de vérifier quelles modifications de l'expression génique se sont mises en place au cours de cette relation synergique, similairement à ce qui a pu être déjà effectué (Hansen *et al.*, 2017 ; Ren *et al.*, 2015). Dans ces 2 études successives effectuées par la même équipe, quatre souches isolées du sol ont été étudiées pour leurs effets synergiques en biofilms multi-spécifiques comparés à leurs biofilms monospécifiques respectifs (Ren *et al.*, 2015). Les études de transcriptomique sur ces quatre souches en biofilm multi-spécifique révèlent des schémas d'interactions complexes et interdépendants. Un grand nombre des fonctions régulées sont liées aux interactions avec l'environnement externe et suggèrent une grande plasticité phénotypique en réponse à la coexistence avec d'autres espèces. En outre, l'expression modifiée des gènes impliqués dans la biosynthèse de certains acides aminés suggère un apport croisé de nutriments comme facteur

contribuant à la production de biofilm synergique observée lorsque ces quatre espèces coexistent dans un biofilm. De façon intéressante, lors de l'étude de transcriptomique dont le focus était centré sur l'une des 4 souches, une majorité de gènes était régulée à la baisse dans le biofilm comprenant les 4 espèces. Ceci suggère que dans ces conditions, certaines fonctions sont dépriorisées car les souches sont potentiellement en mesure de partager certains produits issus de voies métaboliques coûteuses en énergie (Hansen *et al.*, 2017).

Dans nos modèles d'interactions cellulaires en biofilm bispécifique, *Polaribacter* sp. TC5 inhibe la formation de biofilm des deux souches de *Shewanella*. Or les expériences impliquant l'ajout du surnageant de TC5 sur chacun des biofilms montrent que *Polaribacter* sp. TC5 secrèterait une ou des molécule(s) inhibitrice(s) de la formation de biofilm présentant un effet significatif sur un des partenaires, *Shewanella* sp. TC10. Il est donc possible que l'inhibition observée, lorsque les 2 souches sont en présence, soit liée à cette ou ces molécules secrétée(s) dans le surnageant. Cependant, les expériences montrant l'inhibition du surnageant de TC5 sur le biofilm de TC10 ont été effectuées en VNSS, le milieu de croissance des bactéries, car aucune des souches ne poussent planctoniquement dans l'ASW. Il est donc possible que dans le milieu ASW ou qu'en condition de biofilm, ces molécules ne soient pas secrétées ou encore qu'en présence de TC10, l'action de ces molécules ne soit pas effective. Il est intéressant de noter qu'en revanche, TC5 n'a aucun effet en présence de TC4 alors que TC4 inhibe le biofilm de TC5. Ceci aurait pu signifier que TC4 serait la bactérie plus amène de prendre le dessus en biofilm multi-espèces à 4 partenaires, puisqu'elle est stimulée par la présence de TC10, que l'ajout de TC11 n'affecte pas cette stimulation et que TC5 n'a aucun effet sur elle en biofilm bispécifique. Cependant, avec le biofilm à quatre espèces, c'est *Polaribacter* sp. TC5 qui domine largement en terme de biovolume la surface à 48h. TC5 exerçant deux des plus grosses inhibitions du biovolumes en biofilms bispécifiques sur TC10 et TC11, la formation de biofilm de *P. mediterranea* TC4 en biofilm multi-spécifiques à quatre espèces est donc indirectement impactée par l'inhibition des deux souches de *Shewanella* (TC10 et TC11).

Un grand nombre de souches bactériennes est connu pour produire des molécules anti biofilm qui peuvent touchées toutes les phases de la formation du biofilm (Rendueles et Ghigo, 2012). De même, le transfert horizontal de gènes qui peut impliquer un contact physique entre souches, ainsi que plus largement l'ensemble des systèmes de sécrétion bactériens pourraient être responsables de l'inhibition de la capacité de formation du biofilm ou de la stimulation observée chez *Shewanella* sp. TC10 (Sanchez-Vizueté *et al.*, 2015). Il serait intéressant de savoir si le fait que TC5 ou TC4 secrètent de l'ADNe dans leur matrice, ce qui pourrait faciliter

le HGT entre espèces, joue un rôle dans les phénotypes observés. A court ou moyen terme, la caractérisation des potentiels molécules anti-biofilms sécrétées par TC5 dans différentes conditions pourrait être entreprise. L'utilisation de la transcriptomique pourrait nous aider à identifier quels mécanismes sont mis en place par la souche TC5 pour dominer les autres souches lorsqu'elles sont en biofilms multi-espèces à 4 partenaires comme cela a été effectué par Hansen et collaborateurs (Hansen *et al.*, 2017).

Interactions amibes/bactéries

Cette étude présente la première description des interactions entre quatre souches de bactéries marines isolées à partir de la mer Méditerranée et l'amibe *A. castellanii* (Brian-Jaisson *et al.*, 2014). Ces quatre bactéries marines ont été isolées à partir de biofilms immergés ou elles sont supposées rencontrer un de leurs principaux prédateurs, les amibes. La prédation par les protozoaires est considérée comme une cause majeure de mortalité bactérienne (Sherr et Sherr, 2002). De plus, les protozoaires sont considérés comme des « chevaux de Troie » dans la sélection et la dissémination des bactéries pathogènes (Barker et Brown, 1994 ; Molmeret *et al.*, 2005). Dans le monde microbien, les amibes et parmi elles *A. castellanii* sont considérées comme des spécialistes du broutage sur surface (Huws, McBain, et Gilbert, 2005 ; Seiler *et al.*, 2017). Cette étude a eu pour intention première de vérifier si l'association étroite de bactéries marines considérées comme non pathogènes et des protozoaires aboutissait obligatoirement à une élimination rapide des bactéries après ingestion dans l'amibe ou si ces bactéries pouvaient avoir développé des mécanismes d'adaptation assurant leur survie et la coexistence de ces deux partenaires (Matz et Kjelleberg, 2005 ; Matz *et al.*, 2008)

De façon surprenante, les résultats montrent que ces bactéries ne sont pas toutes rapidement éliminées par *A. castellanii* mais que certaines, après 48h, étaient toujours présentes dans la coculture, sans que leur nombre ne soit foncièrement diminué. Le premier résultat intéressant que nous avons mis en évidence est que la souche *P. mediterranea* TC4 se trouve dans le compartiment nucléolaire lors des interactions avec *A. castellanii* à raison de quelques bactéries par cellule et que le nombre d'amibes ayant un marquage fluorescent ciblant TC4 dans le nucléole reste constant sur les 48h. À notre connaissance, cet emplacement n'avait jamais été décrit dans la littérature auparavant pour les bactéries et les cellules eucaryotes. Seule une étude décrit la présence d'un endosymbionte dans l'espace périnucléolaire de l'amibe (Schulz *et al.*, 2015). Dans quelques cas, des symbiontes bactériens ont été identifiés dans le noyau des cellules de protozoaire (Schulz et Horn, 2015) mais dû à la difficulté de récupérer des bactéries

non cultivables à partir de cet emplacement, très peu d'études de re-infection ont été réalisées, permettant généralement des investigations cellulaires et moléculaires plus poussées (Mehari et al., 2015 ; Rautian et Wackerow-Kouzova, 2013 ; Sato *et al.*, 2014 ; Schulz *et al.*, 2014). De même, les études expliquant comment les bactéries gagnent les noyaux sont extrêmement rares. Dans le cas de *Burkholderia pseudomallei*, tandis que la plupart des bactéries sont cytoplasmiques, quelques bactéries dormantes ont été trouvées au sein des noyaux de cellules humaines et épithéliales (Vadivelu *et al.*, 2017). Elles gagneraient ce compartiment après échappement du phagosome et multiplication dans le cytoplasme et formation d'une queue de comète d'actine qui leur permettrait d'accéder à ce sanctuaire. *P. mediterranea* TC4 pourrait potentiellement utiliser des mécanismes similaires à *Candidatus Nucleicultrix amoebiphila* retrouvée dans *Hartmannella* sp. puisque celle-ci entre dans le noyau dans un laps de temps similaire (Schulz *et al.*, 2014). *Candidatus Nucleicultrix amoebiphila* gagne cet emplacement après que la bactérie se soit échappée dans le cytoplasme à partir d'endosomes ayant déjà fusionné avec des lysosomes. Après multiplication intranucléaire, les cellules hôtes *Hartmannella* sp. FS5 et *A. castellanii* deviennent lytiques dès 96h. Dans le cas de *P. mediterranea* TC4, les bactéries cytoplasmiques se retrouvent dans un compartiment acide mais il n'a pas été possible de savoir si les bactéries intranucléolaires étaient originaires d'un compartiment acide. Le nucléole est connu pour être souvent détourné de ces rôles premiers de synthèse d'ARNr (acide ribonucléique ribosomique), de biogénèse de ribosome, de régulation de la mitose et de prolifération cellulaire par des protéines effectrices sécrétées par des bactéries pathogènes intracellulaires tels que *Legionella pneumophila* (Bierne, 2013). Les bactéries pourraient donc exploiter ces mécanismes pour leur propre avantage, comme le font de nombreux virus. Le compartiment intranucléaire et par conséquent intranucléolaire pourrait être une excellente niche protectrice pour l'établissement d'une symbiose ou d'un parasitisme au sein d'une cellule hôte, puisque les cellules sont protégées des processus cytoplasmiques tels que la digestion (Schulz et Horn, 2015).

Shewanella sp. TC11 suit également une voie intracellulaire intéressante puisqu'elle est retrouvée dans des vésicules expulsées par l'amibe après 24h d'infection. La souche TC11 est phagocytée en grand nombre dès le premier temps de mesure puis elle se retrouve rapidement empaquetée dans des vésicules qui peuvent être expulsées de la cellule après 24h d'interaction. Un des faits remarquables observés est que les bactéries après 48h semblent capables de se libérer des vésicules et de recoloniser la surface. La formation ou la localisation des bactéries dans ces vésicules ou pelotes fécales représenterait un avantage pour survivre face à des

conditions néfastes tels que des milieux contenant des antibiotiques ou des biocides (Berk et al., 1998 ; Brandl *et al.*, 2005 ; Raghu, Nadhanan et Thomas, 2014). Elles sont également impliquées dans la propagation sur de longues distances de bactéries (Berk et al., 1998). *A. castellanii* est capable de produire à la fois des kystes, et des vésicules contenant des bactéries telles que *L. pneumophila* ou *Francisella tularensis* (Abd et al., 2007 ; Berk *et al.* 2008 ; Berk *et al.*, 1998 ; Bouyer *et al.*, 2007 ; El-Etr *et al.*, 2009 ; Lambrecht *et al.*, 2015 ; Sanchez-Hidalgo *et al.*, 2017). La capacité des bactéries à être empaquetées par des protozoaires est dépendante à la fois des souches bactériennes et de protozoaires ainsi que des conditions de culture (Berk et al., 2008 ; Chen *et al.*, 2004 ; Denoncourt *et al.*, 2016 ; Paquet et al., 2013).

Les deux autres souches *Polaribacter* sp. TC5 et *Shewanella* sp. TC10 sont des souches phagocytées en moins grand nombre que TC11 par *A. castellanii*. Alors que peu de TC5 co-localisent avec des vésicules acides, la plupart des TC10 au premier temps d'infection co-localisent avec celles-ci. Même si les *Shewanella* sp. TC10 qui sont phagocytées sont rapidement digérées par la suite, les TC10 non phagocytées apparaissent le plus souvent plus grosses et filamenteuses contrairement à celles observées intracellulairement. Ceci n'a pas été observé avec les autres souches bactériennes. Les morphologies filamenteuses sont connues pour prodiguer des avantages dans les environnements stressants, ou en présence d'antibiotiques ou de prédateurs (Justice *et al.*, 2008). De plus, la capacité à filamenter ou à devenir plus grosse a été décrite comme un mécanisme d'échappement afin d'éviter la phagocytose et par conséquent les mécanismes de digestion (Matz et Kjelleberg, 2005). Il est également intéressant de noter que dans le cas étudié durant cette thèse, le taux de phagocytose n'est pas corrélé à la présence de flagelle puisque les bactéries non mobiles TC4 et TC5 et les mobiles TC10 et TC11 sont phagocytées en différentes proportions.

Cette étude présente un aperçu de la diversité des interactions que l'on peut rencontrer lors des interactions entre protistes amiboïdes et bactéries en milieu marin. Par la suite, des investigations plus poussées pourraient permettre de comprendre par quel mécanisme TC4 gagne le compartiment nucléolaire, combien de temps elle peut y rester et si elle est capable d'en ressortir. Pour ce faire, l'utilisation de la microscopie à balayage laser confocal peut être complétée par d'autres approches telles que la vidéo microscopie et l'utilisation de différents marqueurs du trafic intracellulaire comme la phalloïdine qui pourrait permettre de vérifier si les comètes d'actine sont impliquées similairement à *B. pseudomallei*. Avec *Shewanella* sp. TC11, la compréhension des mécanismes par lesquels elles sont expulsées de la cellule hôte et à quel ratio, pourrait donner des informations sur sa propagation potentielle dans le milieu et

donc dans l'environnement. Des approches tels que des analyses de RNAseq pourraient donner des informations sur l'état de bactéries telles que TC4 ou TC11 lors de leurs différentes interactions avec l'amibe (dormant versus pleinement actif) ainsi que sur les gènes requis durant le trafic intracellulaire leur permettant de survivre. De même, les nouvelles approches de « dual RNAseq » pourraient permettre d'étudier l'expression des gènes d'*A. castellanii*, dont le génome est séquencé (Clarke *et al.*, 2013), et des bactéries en présence afin de savoir comment la présence de l'un influence celle de l'autre au niveau moléculaire (Westermann *et al.*, 2016).

Interactions amibes/biofilms

Les biofilms et leurs matrices permettent l'accumulation de nutriments à leurs surfaces et agissent comme une forteresse pour protéger les bactéries des mécanismes nocifs comme les agents antimicrobiens ou les actions des prédateurs (Kjelleberg et Givskov, 2007). Dans ce type d'environnement, la présence de différents micro-organismes rend la structure des biofilms très complexes et les interactions entre organismes nécessaires (Elias et Banin, 2012 ; Rendueles et Ghigo, 2012). Les protozoaires tels que les amibes sont connus pour vivre en association étroite avec les bactéries dans de nombreux d'écosystèmes tels que les biofilms (Matz *et al.*, 2008). Jusqu'à présent, les études sur le biofilm se sont la plupart du temps concentrés sur la compréhension de la régulation et de la physiologie des bactéries sessiles sans prendre en compte les autres acteurs majeurs du biofilm. Compte tenu des profils variés d'interaction entre bactéries d'une part et entre amibes et bactéries d'autre part, l'objectif de ce travail était de comprendre le rôle que peuvent jouer les amibes dans un biofilm multi-espèces et d'examiner si une coexistence était possible avec certains des partenaires.

Les résultats de cette présente étude ont mis en évidence qu'en NSS, le milieu salin dans lequel les amibes et les bactéries ne subissent ni de diminution ni d'augmentation importante de leur concentration, les bactéries sont toutes capables de développer un biofilm au moins jusqu'à 72h. Lorsque les amibes sont d'abord ajoutées sur des biofilms mono-espèces de 24h et de 48h en parallèle du milieu NSS, un détachement important de chacune des bactéries est observé. Les bactéries restantes de *Persicivirga mediterranea* TC4, ou de TC10 et TC11, les 2 souches de *Shewanella* sont détectées aux endroits qui ont été décrit dans la partie précédente, c'est-à-dire dans le noyau pour TC4, dans ce qui apparaît comme être des vésicules pour TC11 et dans le cytoplasme pour TC10. Les TC10 extracellulaires, elles semblent beaucoup plus grosses et filamenteuses par rapport aux bactéries phagocytées. En revanche pour *Polaribacter* sp. TC5, les amibes moins nombreuses mais plus grosses, apparaissent stressées et associées avec de

nombreuses bactéries, ce qui n'était pas le cas lors des études d'interactions hôte-bactéries dans la partie précédente. Il semblerait donc que l'interaction qui s'effectue ici avec un ratio bactéries/amibes bien plus important, se fasse non seulement au détriment de l'amibe, mais n'a pas non plus empêché le détachement de la bactérie. D'après l'étude effectuée sur les biofilms, nous savons que non seulement TC5 est capable de sécréter des molécules à activités antibiofilm, mais elle est également capable lorsqu'elle est présente, d'induire 2 des inhibitions de biofilm les plus fortes sur TC10 et TC11, ce qui, au final, lui permet d'être la plus compétitive en biofilm à 4 espèces. Il s'agit donc d'une souche qui possède des mécanismes de défense intrinsèque lui permettant de survivre en présence d'autres organismes et qui pourrait également, à haute dose, présenter une cytotoxicité vis-à-vis d'*A. castellanii*.

Lorsque le surnageant d'amibes est ensuite ajouté, deux des souches *P. mediterranea* TC4 et *Shewanella* sp. TC10 subissent un détachement important contrairement à *Polaribacter* sp. TC5 et *Shewanella* sp. TC11. De nombreux organismes sont connus pour produire des composés antifoulings qui inhibent ou dispersent le biofilm (Marks *et al.*, 2013 ; McDougald *et al.*, 2012 ; Rendueles et Ghigo, 2012). Cependant, *A. castellanii* ne tireraient aucun avantage à produire de tels composés pour éloigner sa source de nourriture, excepté dans le cas où les bactéries sont pathogènes pour elle. Une autre hypothèse serait que *P. mediterranea* TC4 et *Shewanella* sp. TC10 détectent un de leurs principaux prédateurs par des indices chimiques et induisent un détachement massif de leurs biofilms afin de fuir leurs prédateurs. De plus, ce phénomène serait transférable à d'autres souches sur un biofilm mixte, puisque l'ajout de surnageant d'amibes sur un biofilm multi-espèces composé de TC4, TC10, et TC11 induit également le détachement de TC11 qui n'était pas significativement impactée par le surnageant lorsqu'elle était cultivée en biofilm mono-spécifique. Ce phénomène de dispersion des bactéries par la détection de protozoaires de manière directe c'est à dire en présence de l'amibe ou de manière indirecte lorsque le surnageant d'amibes est ajouté, qui n'a pas encore été publié à notre connaissance, a pourtant déjà été observé (McDougald *et al.*, 2012). De plus, il a été précédemment mis en évidence que *Pseudomonas fluorescens* était capable de détecter spécifiquement *A. castellanii* (Jousset et Bonkowski, 2010 ; Jousset *et al.*, 2010). Ainsi, lorsque *P. fluorescens* est exposée au surnageant d'*A. castellanii*, celle-ci augmente l'expression de gènes liés à certaines toxines. Cette modification de l'expression génique augmente de 25 % la toxicité bactérienne.

Dans cette étude, un autre argument en faveur de la présence de composés amibiens pouvant être détectés par les bactéries est lié à l'apparition de changements au niveau du biofilm de TC4 et au niveau de la morphologie de TC10. En effet, l'ajout du surnageant d'amibes sur le biofilm

monospécifique de TC4 induit une modification de la taille des patches des bactéries en biofilm alors que pour TC11 qui présentent également de gros patches dans son biofilm, aucune modification n'est observée dans la structure du biofilm et la forme des bactéries. Concernant TC10, l'ajout du surnageant d'amibes change drastiquement la taille des bactéries, qui deviennent plus grosses, et la forme puisqu'elles deviennent en majorité filamenteuses. Par conséquent, après ajout de la suspension d'*A. castellanii* ou uniquement de son surnageant, des formes filamenteuses sont observables à la surface alors qu'elles ne le sont pas dans le milieu NSS seul. Il est donc vraisemblable que ces changements soient dûs à la sécrétion d'indices chimiques par *A. castellanii* qui induiraient de profondes modifications morphotypiques et phénotypiques.

Lorsque l'amibe est en présence de TC10, comme nous l'avons dit plus haut, seules les bactéries extracellulaires apparaissent plus grosses et filamenteuses. La filamentation des bactéries ou l'augmentation de leur taille est connue pour être un mécanisme pré-ingestionnel permettant d'éviter la prédation par les protozoaires (Justice *et al.*, 2008 ; Matz et Kjelleberg, 2005). Ainsi une exclusion de taille serait effectuée par les protozoaires, ce qui réduirait de façon importante la pression de prédation sur ces bactéries filamenteuses. De nombreuses études ont mis en évidence que la capacité à filamenter fournit une protection contre le broutage par les amibes tandis que le biofilm serait plus une protection contre des protozoaires tels que les ciliées ou les flagellés (Hahn et Höfle, 1998 ; Hahn, Moore, et Höfle, 1999 ; Queck *et al.*, 2006). De plus, une forte pression de broutage est bien souvent corrélée avec le développement de morphotypes filamenteux (Caron, Goldman, et Dennett, 1988 ; Engström-Öst *et al.*, 2002 ; Jürgens et Stolpe, 1995 ; Pernthaler *et al.*, 2004). Cependant, même si dans certains cas la filamentation durant les interactions avec les protozoaires est définie comme étant dépendante de la phase de croissance ou du quorum sensing des bactéries (Hahn, Moore, et Höfle, 1999 ; Queck *et al.*, 2006 ; Salcher *et al.*, 2007), d'autres auteurs décrivent la capacité à filamenter ou à former des agrégats comme un système déclenché par des indices chimiques relargués par le prédateur (Blom *et al.*, 2010 ; Corno et Jürgens, 2006 ; Pernthaler *et al.*, 1997). Ces signaux chimiques sont nommés « Kairomones. » Ils sont définis comme un transfert d'information entre espèces qui induisent un bénéfice chez l'organisme receveur tandis qu'ils ne le sont pas pour l'organisme producteur, comme par exemple dans la détection de prédateurs par les proies (Blom *et al.*, 2010 ; Pohnert, Steinke, et Tollrian, 2007).

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en évidence que sur quatre bactéries isolées à partir de biofilms, différentes stratégies permettant d'empêcher la prédation par les amibes ont été mis

en évidence. Une des suites logiques de ce travail serait d'essayer de caractériser plus précisément quel type de molécules ou kairomones sont produites par l'amibe permettant d'induire des changements phénotypiques tels que la filamentation et/ou ce détachement. Il serait intéressant de savoir s'il s'agit des mêmes molécules ou si plusieurs composés sont nécessaires pour induire ces phénotypes. Une étude transcriptomique, voire métabolomique pourrait peut-être nous permettre d'obtenir quelques réponses. Il serait également intéressant de vérifier si ces kairomones seraient efficaces sur un plus grand nombre de bactéries ou dans différentes conditions. Il pourrait s'agir d'une nouvelle voie de recherche pour l'identification de solutions antibiofilm/antifouling non toxiques et respectueuses de l'environnement.

Conclusion générale

Cette étude est l'une des premières à regarder les interactions entre des micro-organismes susceptibles d'occuper une même niche écologique au sein du biofilm dans le domaine marin. Elle a mis en évidence que les interactions entre bactéries au sein du biofilm étaient complexes et que la connaissance de la formation des biofilms mono-spécifiques n'était pas suffisante pour prédire le devenir des communautés multi-spécifiques. De même, en ajoutant une amibe comme acteur du biofilm, une première mise en lumière du rôle qu'elle peut jouer en présence de bactéries considérées comme non pathogènes a été effectuée.

En perspective à plus long terme, des modèles multi-spécifiques de ce type pourraient être utilisés afin d'évaluer les nouveaux composés ou les nouveaux revêtements/surfaces antibiofilm et antifouling. De plus, l'utilisation d'outils moléculaires pourrait permettre de comprendre en quoi les interactions cellulaires peuvent rendre les biofilms plus résistants ou plus faibles face aux conditions néfastes de l'environnement. Depuis que les nouvelles données de séquençage sur l'abondance des protozoaires en milieu marin sont accessibles, il est nécessaire de redéfinir les modèles biogéochimiques qui régissent les réseaux trophiques microbiens. La compréhension fine des interactions entre bactéries et protozoaires permettra de définir plus précisément ces modèles. L'identification des kairomones et leurs possibles champs d'application pourraient amener à de nouvelles stratégies respectueuses de l'environnement dans la lutte contre le biofouling et plus particulièrement dans des domaines tels que le domaine marin. Pour finir, aujourd'hui les amibes sont utilisées par une société (Amoeba biocide) pour nettoyer les biofilms issues des systèmes d'aération dans l'industrie. Si celles-ci sont difficilement utilisables sur les coques des navires, une utilisation pour nettoyer par exemple les cuves de ballastage peut être imaginée. Depuis la convention internationale pour le contrôle

et la gestion des eaux de ballast réalisée par l'organisation maritime internationale et son entrée en vigueur le 8 septembre 2017, le contrôle des organismes viables rejetés dans les eaux de ballast doit être strictement contrôlé et donc le développement des biofilms dans ces cuves maîtrisé. Aujourd'hui, différents systèmes à la sortie des eaux de ballast permettent d'éliminer un maximum d'organismes. Les cuves de ballastage sont soumises aux impacts néfastes du biofouling et elles pourraient donc être traitées avec des suspensions d'amibes afin d'éliminer le plus précocement possible le biofilm. Les suspensions d'amibes utilisées sont classées pour le moment sans risques physiques, pour la santé humaine, pour l'environnement et pour les manipulateurs, contrairement aux produits toxiques utilisés aujourd'hui dans les solutions antifouling.

Annexes : Fiches techniques

Fiche technique n° 1 : Culture et conservation des souches bactériennes et d'amibes

Introduction

Les milieux de culture permettent aux organismes de trouver l'ensemble des composants indispensables à leur croissance. Ils permettent en général une croissance forte, rapide et répétable des organismes aux cours du temps. Un milieu de culture doit satisfaire à toutes les exigences nutritives des micro-organismes (apport en source d'énergie, de carbone et d'azote, besoins en ions minéraux et facteurs de croissance, pH et force ionique). Il en existe donc un grand nombre présentant des caractéristiques spécifiques permettant une croissance optimale de certains organismes.

La conservation des souches pures dans l'absolu doit permettre de les maintenir viables, disponibles et à l'identique (génotype). Il existe plusieurs méthodes de conservation des souches variants selon les organismes (cryoconservation, lyophilisation...).

Les bactéries issues de la collection de Toulon utilisées dans cette étude ont été cultivées en milieu VNSS (Väätänen nine-salt solution) suivant les résultats de précédentes études (Brian-Jaisson, 2014 ; Camps *et al.*, 2011 ; Mårdén *et al.*, 1985). La souche d'amibe *Acanthamoeba castellanii* a été cultivée en milieu PYG (Peptone Yeast extract Glucose). Ce milieu permet une croissance rapide et facile de l'amibe et de ne pas utiliser d'autres bactéries (mortes ou vivantes) afin de la nourrir. De plus, ce milieu a été utilisé dans un grand nombre d'études (Jousset et Bonkowski, 2010 ; Matz *et al.*, 2008 ; Van der Henst *et al.*, 2016). La conservation de l'ensemble des souches a été faites par cryoconservation à -80°C, une des méthodes les plus simples et efficaces.

Milieu de culture VNSS (bactérie)

Préparation du NSS (Nine-Salt Solution)

Pour 1L de milieu, ajouter 850 mL d'eau distillée et commencer à chauffer à 100°C sous agitation, puis ajouter les produits suivants :

17,6 g de NaCl
 1,47 g de Na₂SO₄
 0,08 g de NaHCO₃
 0,25 g de KCl
 0,04 g de KBr
 1,87 g de MgCl₂ – 6H₂O
 0,31 g de CaCl₂ anhydre
 0,01 g de SrCl₂ – 6H₂O
 0,01 g de H₃BO₃

Compléments à ajouter pour obtenir le VNSS :

1 g de peptone
 0,5 g d'extrait de levure
 0,5 g de glucose
 0,5 g d'amidon soluble (**Note 1**)
 0,01 g de FeSO₄ – 7H₂O
 0,01 g de Na₂HPO₄

Homogénéiser le milieu par chauffage durant 20 min à 100°C sous agitation puis ajouter le volume d'eau distillée requis pour obtenir 1 L avant un autoclavage de 20 min à 121°C.

PYG (amibes)

Préparation de solutions stocks

Les solutions sont préparées dans de l'eau distillée aux concentrations suivantes :

Solution de MgSO ₄ – 7H ₂ O (Sigma)	0,4 M
Solution de CaCl ₂ (Sigma)	0,05 M
Solution de FeNH ₄ (SO ₄) ₂ (Sigma)	0,005 M
Glucose	2,0 M

Les solutions sont filtrées sur 0,2 µm afin d'être stérilisées et conservées.

Préparation du milieu PYG

Pour 1L de milieu, ajouter 800 mL d'eau distillée du volume souhaité et commencer à chauffer à 100°C sous agitation, puis ajouter les produits suivants :

20 g de Peptone Protéase (Difco)
 1 g d'extrait de levure (Difco)
 10 mL de la solution de MgSO₄ – 7H₂O à 0,4 M
 8 mL de la solution de CaCl₂ à 0,05 M
 10 mL de la solution de FeNH₄(SO₄)₂ à 0,005 M

Homogénéiser le milieu puis ajouter le volume d'eau distillée requis afin d'avoir 950 mL avant un autoclavage durant 20 min à 121°C.

Ajouter 50 mL de la solution de Glucose à 2,0 M après autoclavage (**Note 2**).

Croissance

Culture des souches bactériennes

A partir des souches cryoconservées :

- 1- un prélèvement issu des tubes est étalé à l'oese sur une boîte de Pétri contenant du milieu VNSS agar. Les boîtes sont incubées durant 72h à 20°C.
- 2- Une colonie unique est prélevée à l'aide d'un cône et déposée dans un flacon de 60 mL contenant 10 mL de VNSS. La préculture est incubée à 20°C, 120 rpm une nuit.
- 3- A partir de la préculture, une culture de 10 mL dans du VNSS est démarrée en ajustant la DO_{600nm} à 0,1. La culture est incubée à 20°C, 120 rpm jusqu'à la phase post-exponentielle (**Note 3**).

Culture des amibes

A partir des souches cryoconservées :

- 1- Un tube de 1 mL de souche cryoconservée est décongelé puis vidé en totalité dans une flasque de 175 cm² contenant 30 mL de milieu PYG.
- 2- La flasque est allongée puis incubée à 20°C en statique.
- 3- Après 2-3 jours, le milieu est vidé par renversement et 30 mL de nouveau PYG sont ajoutés.
- 4- La flasque est incubée à 20°C en statique jusqu'à ce que les cellules soient arrivées à confluence (**Note 4**).

Cryoconservation Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont conservées par congélation à -80°C.

- 1- Pour ce faire, une culture planctonique sur la nuit de 10 mL est centrifugée à 6000 rpm durant 10 min. Le culot est repris dans 2 mL d'une solution de VNSS contenant 20 % de glycérol. Cette suspension est répartie en cryotubes avant d'être congelée à -80°C.
- 2- Les souches sont relancées par reprise d'une petite quantité de la suspension congelée avec une oese, qui est étalée sur boîte avant d'être incubée durant 72h à 20°C.

Conservation des amibes

Les amibes sont conservées par congélation à -80°C.

- 1- Pour ce faire, une culture adhérente à confluence de 30 mL est grattée à l'aide d'un grattoir souple.
- 2- La suspension ainsi obtenue est centrifugée à 2500 rpm durant 15 min. Le culot est repris dans 3 mL d'une solution de PYG contenant 20 % de DMSO et réparti dans des cryotubes (1 mL/tube). Les cryotubes sont déposés dans un cryoportoir nommé « Mr Freeze » et congelés à -80 °C. Le portoir permet une décroissance progressive de la température durant environ 48h. Après deux jours, les tubes peuvent être stockés définitivement dans une boîte de conservation à -80°C.

- 3- Les souches sont relancées par dépôt de la totalité d'un tube juste fondu dans une flasque contenant 30 mL de PYG. La culture est ensuite incubée à 20 °C durant 10 jours avant de pouvoir être utilisée.

Notes

Note 1 : L'amidon doit normalement être mis en dernier durant la préparation de la solution car cela facilite sa dissolution.

Note 2 : Le glucose est ajouté après la stérilisation par autoclavage pour éviter les réactions de caramélisation de celui-ci.

Note 3 : La phase post-exponentielle est connue pour être majoritairement la phase où les bactéries vont exprimer leurs facteurs de virulence ou avoir une meilleure habilité à adhérer et à former du biofilm. Cependant, cela reste relativement dépendant des souches utilisées.

Note 4 : À partir d'un tube cryoconservé, il faut environ une semaine et demi pour arriver à confluence.

Fiche technique n° 2 : Evaluation du biofilm par le marquage au cristal violet

Introduction

Les tests de formation de biofilm en microplaque, couplés à des colorations capables de quantifier le biofilm, sont depuis quelques dizaines d'années largement utilisés dans les laboratoires de microbiologie. Le cristal violet est le colorant le plus utilisé ; il permet de quantifier le biofilm par une simple mesure de spectrophotométrie. Le cristal violet est un colorant violet qui colore les groupements méthyles. Il devient de plus en plus foncé en fonction de l'importance de leur nombre. Il est également utilisé en microbiologie dans la coloration de Gram ou dans certains milieux sélectifs. Celui-ci marque de façon indifférenciée l'ADN et les protéines issus des cellules bactériennes adhérentes et de la matrice (Feoktistova, Geserick et Leverkus, 2016).

Un grand nombre de protocoles de cristal violet présentant quelques variantes existe. Suivant les protocoles, les concentrations en cristal violet ou les solutions d'extraction utilisées (Ethanol, DMSO) peuvent être différentes (Stepanovic *et al.*, 2000 ; Watnick *et al.*, 2001). La méthode décrite et utilisée durant cette étude est la même que celle utilisée par Brian-Jaisson et collaborateurs durant leurs études sur ces mêmes souches bactériennes (Brian-Jaisson, 2014). Cette méthode a permis une bonne discrimination des différentes souches marines utilisées et de caractériser leurs capacités d'adhésion et de formation de biofilm. Il s'agit d'une méthode dérivée de l'étude de Rivas et collaborateurs (Rivas, Dykes et Fegan, 2007).

Matériels

Equipements et consommables

Lecteur de microplaques
Microplaques transparentes 96 puits transparentes
Centrifugeuse
Incubateurs
Etuve
Agitateur orbital

Milieux et solutions

Milieu VNSS
Milieu NSS
Solution de cristal violet à 0,01% (m/v) dans de l'eau (**Note 1**)
Ethanol 100%

Méthodes

Croissance du biofilm

- 1- La croissance des souches est réalisée à partir d'une préculture planctonique, dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre à 20°C, sous agitation à 120 rpm.
- 2- Les cultures bactériennes sont centrifugées à 6000 rpm durant 10 min et reprises dans du VNSS.
- 3- La suspension est ajustée à $D_{0600nm}=0,4$ (**Note 2 et 3**).
- 4- Un volume de 200 μ L de la suspension bactérienne est ajouté dans chaque puits d'une plaque de 96 puits (en triplicat pour chaque condition) (**Note 4**)
- 5- Les plaques sont incubées à 20°C en statique pendant 3h à 72h.

Marquage et quantification du biofilm

- 1- Suite à l'incubation, les plaques sont renversées afin d'éliminer la majorité des bactéries non adhérentes, suivi de trois rinçages doux à la micropipette au NSS.
- 2- Les plaques sont mises à sécher à l'étuve à 50°C durant 30 min afin de fixer les biofilms.
- 3- La solution de cristal violet à 0,01% est ajoutée dans tous les puits à raison de 200 μ L/puits et est laissée à incuber durant 15 min.
- 4- Les plaques sont rincées de façon douce à la micropipette, trois fois au NSS, puis séchées 10 min à température ambiante.
- 5- L'extraction du cristal violet est réalisée par ajout de 200 μ L d'éthanol dans chaque puits.
- 6- Les plaques sont ensuite mises à agiter durant 10 min à 120 rpm sur un agitateur orbital.
- 7- Le contenu des plaques est transvasé dans de nouvelles plaques.
- 8- L'absorbance est mesurée à 590 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.
- 9- Les résultats sont exprimés par l'équation :

$$X = \frac{D_{0590}(\text{échantillon}) - D_{0590}(\text{blanc})}{D_{0590}(\text{blanc})}$$

Résultats attendus

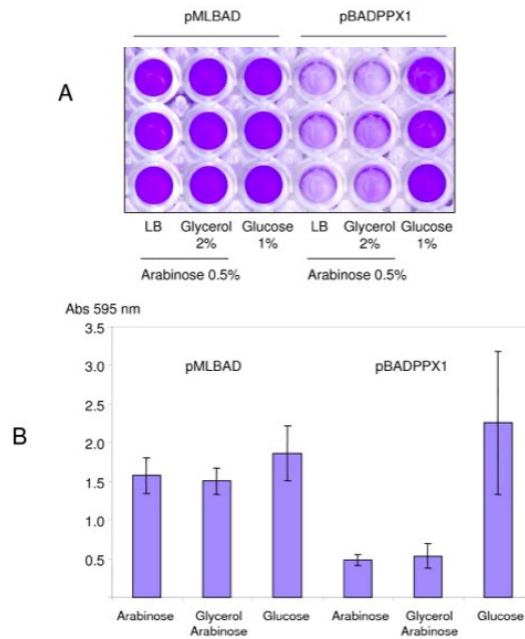


Figure 60 : Représentation de l'extraction du cristal violet (A) et des résultats d'absorbance obtenus sur un biofilm de *Pseudomonas* sp. B4 déficient en polyP (B) en conditions réprimé (glucose 1%) et induit (arabinose 0,5%) dans différents milieux (ChB4 déficient en polyP (B) en co.

Les résultats mettent en évidence que la souche de *Pseudomonas* sp. B4 déficiente en polyP (pBADPPX1) est capable de former du biofilm uniquement quand l'expression de PPX1 est induite par du glucose tandis que le mutant recombinant (pMLBAD) est quant à lui capable de former du biofilm dans les trois milieux testés (Chávez, Mauriaca, et Jerez, 2009). La photographie et l'histogramme mettent en avant le marquage du biofilm par le cristal violet ainsi que l'expression des résultats attendus.

Notes

Notes 1 : Une solution mère de concentration 0,1% a été au préalable préparée et conservée à 4°C, permettant d'avoir une masse facilement mesurable avec une balance de précision classique. La solution fille est ensuite préparée juste avant l'expérience à partir de la solution mère.

Notes 2 : Les mesures de biofilm par le cristal violet ont été réalisées avec un inoculum bactérien de départ à une DO_{600nm} de 0,4 afin d'être en accord avec les expériences réalisées lors des interactions multispécifiques.

Notes 3 : Afin de tester la potentielle activité inhibitrice d'un surnageant de culture, les DO_{600nm} sont ajustées à 0,8.

Notes 4 : Afin de tester la potentielle activité inhibitrice d'un surnageant de culture. Ceux-ci ont été préparés par centrifugation d'une culture

bactérienne planctonique afin d'éliminer le culot bactérien. Le surnageant ainsi préparé est ensuite filtré sur $0,2 \mu\text{m}$ afin de le stériliser (Dos Santos Goncalves et al., 2014). Pour finir, $100 \mu\text{L}$ de surnageant de culture sont ajoutés dans chaque puits ainsi que $100 \mu\text{L}$ de la suspension bactérienne à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,8. Des témoins sont réalisés avec $100 \mu\text{L}$ de NSS et $100 \mu\text{L}$ de la suspension bactérienne ajustée à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,8, afin d'obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,4 final.

Fiche technique n° 3 : Transformation plasmidique

Introduction

La compétence est la capacité naturelle d'un grand nombre de bactéries à facilement absorber de l'ADN exogène par transfert horizontale de gène. La transformation bactérienne naturelle était décrite chez plus de 80 espèces en 2014 (Johnston *et al.*, 2014). Elle leur permet d'acquérir de nouveaux traits génétiques et de s'adapter aux conditions environnementales favorisant la résistance aux antibiotiques (Croucher *et al.*, 2011). La plupart des bactéries transformables n'expriment pas de façon permanente les protéines impliquées et requises au développement de la compétence pour la transformation génétique. La compétence est donc une « fenêtre d'opportunité » transitoire pour l'internalisation de l'ADN et permettre ainsi une transformation (Johnston *et al.*, 2014).

Seul un nombre restreint de bactéries exprime une compétence naturelle, Cependant, la compétence peut être induite de manière artificielle en inhibant par exemple les systèmes de restriction/modification. Les systèmes de restriction/modification sont composés de deux enzymes. La première est une enzyme de restriction qui va cliver de petites séquences nucléotidiques spécifiques situées sur des ADNdb non méthylés, donc de l'ADN exogène. La deuxième est une méthylase qui va méthyler l'ADN double brins chromosomique afin de protéger ce dernier de l'action de l'enzyme de restriction. Un grand nombre de protocoles existe permettant d'arriver à un état de compétence (Mercenier et Chassy, 1988). Cependant en fonction des différentes souches à transformer, les techniques permettant de rendre compétente les bactéries varient en fonction du choc utilisé pour rendre les bactéries perméables (choc physique (électroporation), choc chimique, préchocs thermiques...), les phases de croissance de la bactérie, les milieux de croissance ou de régénération les plus propices, le choix des plasmides différent de façon importante (Mercenier et Chassy, 1988 ; Yoshida et Sato, 2009). Malgré cette variété de méthodes, certaines bactéries restent impossibles à transformer.

Afin de réaliser des biofilms multi-spécifiques et d'avoir un suivi des bactéries lors de leurs interactions avec des amibes et de les visualiser par microscopie à fluorescence, différentes méthodes de transformation ont été testées sur les bactéries de la collection de Toulon récupérées en mer Méditerranée afin de leur ajouter un gène exprimant une protéine fluorescente.

Par choc Chimique :

Matériels

Souches et plasmides

Souches bactériennes : *Polaribacter* sp. TC5, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC9, *Shewanella* sp. TC10, *Shewanella* sp. TC11, *Pseudoalteromonas ulvae* TC14 et *Shewanella frigidimarina* NCIMB400

Plasmides : pX5-GFP, pminp-GFP, pBC-L-GFP-pmip et pLac-redFP-pXDC50

Milieux et solutions

Milieu de croissance et solvants :

Milieu VNSS

Glycérol

Traitements permettant d'obtenir la compétence:

Solution de CaCl₂ à 100 μ M

Solution de CaCl₂ à 200 μ M

Solution de chlorure de rubidium à 100 μ M

Equipements et consommables

Bain marie

Incubateurs

Congélateur à -80°C

Falcons®

Méthodes

Préparation de cellules compétentes

- 1- Croissance des souches dans du milieu riche LB ou VNSS dont la concentration en NSS est diluée ou non au $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, et $\frac{1}{4}$ jusqu'à la phase exponentielle, post-exponentielle et stationnaire en flacon en verre à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique.
- 2- Les flacons contenant les suspensions bactériennes sont transférées sur glace durant 15 min.
- 3- Les suspensions bactériennes sont transférées dans des Falcons® et centrifugées à 2500 rpm durant 10 min à 4°C (**Note 1**).
- 4- Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 2 mL d'un des traitements permettant d'obtenir la compétence puis conservés 15 min sur glace.
- 5- Après centrifugation à 2500 rpm durant 10 min à 4°C, le culot est repris dans 1 mL d'une solution de compétence à 15% de glycérol glacé.
- 6- Enfin après 15 min de repos sur glace, des aliquots de 50 ou 100 μ L sont répartis dans des cryotubes avant d'être conservés à -80°C (**Note 2**).

Transformation bactérienne

- 1- Les aliquots de cellules compétentes sont décongelés de manière progressive sur glace.

- 2- Le préchoc thermique, lorsqu'il a lieu, est réalisé à 42°C pendant 9 min.
- 3- Les cellules compétentes sont mises en contact avec 2 µL de plasmides et mises à reposer sur glace durant 30 min.
- 4- Le choc thermique, lorsqu'il a lieu, est réalisé au bain marie pendant 1 min à 42°C, 40°C, 35°C ou 30°C.
- 5- 300 µL de LB ou VNSS sont ajoutés à la suspension de cellules et de plasmides.
- 6- Les suspensions sont incubées durant 3h, 4h ou 24h à 20 °C sous agitation (120 rpm) afin de régénérer les cellules et de permettre l'expression du plasmide sans pression de sélection.
- 7- Un dépôt de 100 µL de la culture bactérienne est déposé sur des boites d'agar contenant du chloramphénicol. La concentration en chloramphénicol dépend de la sensibilité de chacune des souches à cet antibiotique.
- 8- Les boites de Pétri sont incubées à 20°C en statique durant 72h.

Notes

Note 1 : Les Falcons® doivent être préalablement refroidis sur glace et la température de la centrifugeuse doit être également préalablement descendue à 4°C.

Note 2 : Les cellules compétentes préparées peuvent être conservées à -80°C pendant quelques mois.

Par choc Physique :

Matériels

Souches et plasmides

Souches bactériennes : *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10, *Shewanella* sp. TC11

Plasmides : pX5-GFP, pminp-GFP

Milieux et solutions

Milieu VNSS

Glycérol

Equipements et consommables

Incubateurs

Electroporateur

Cuvette d'électroporation

Falcons®

Méthodes

- 1- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique.

- 2- Les suspensions bactériennes sont transférées dans des Falcons® et centrifugées à 2500 rpm durant 10 min à 4°C (**Note 1**).
- 3- Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 2 mL de glycérol à 10 % et encore centrifugé à 2500 rpm durant 10 min à 4°C (répété 3 fois).
- 4- Le culot est repris dans 50 µL d'une solution à 10% de glycérol.
- 5- 10 à 100 ng de plasmides sont ajoutés à la suspension bactérienne.
- 6- La solution est déposée durant 30 min sur glace avant électroporation.
- 7- Le mélange cellules et plasmides est transféré dans une cuvette d'électroporation (**Note 2**).
- 8- La cuvette d'électroporation est placée sur l'électroporteur avant d'appliquer le choc électrique aux paramètres préétablis (**Note 3**).
- 9- Le mélange est transféré dans 2 mL de milieu glucose SOC ou de VNSS, et incubé sous agitation (120 rpm) à 20°C durant 3h, 4h ou 24h.
- 10- Un dépôt de 100 µL de la culture bactérienne est déposé sur des boîtes d'agar contenant un milieu sélectif.
- 11- Les boîtes de Pétri sont incubées à 20°C en statique durant 72h.

Notes

Note 1 : Les Falcons® doivent être préalablement refroidis sur glace et la température de la centrifugeuse également préalablement descendue à 4°C.

Note 2 : Les cuvettes d'électroporation doivent être préalablement refroidis en les conservant à -20°C au moins 24h ou en les refroidissant sur glace avant la manipulation.

Note 3 : Le système d'électroporation « Gene Pulser » (Biorad) doit être réglé en « Time constant. » Pour une transformation efficace, les réglages suivants doivent être sélectionnés : 200 Ω, 25 µF et 2,5 kV, pour des cuvettes de 2 mm de largeur.

Fiche technique n° 4 : Conjugaison bactérienne

Introduction

Le transfert horizontal de gènes (HGT) est le principal contributeur à la diffusion des gènes de résistance aux antibiotiques (Lopatkin *et al.*, 2016). Les gènes issus du HGT sont acquis via des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, virus ou transposons ou par absorption et incorporation d'ADN nu par recombinaison illégitime ou homologue (Frost *et al.*, 2005 ; She *et al.*, 2001). Un des mécanismes les plus communs pour effectuer ce transfert de gène en plus de la transformation est la conjugaison (Davison, 1999 ; Norman, Hansen et Sørensen, 2009). La conjugaison consiste en une transmission d'ADN plasmidique ou chromosomique d'une souche donneuse vers une souche receveuse, elle se fait par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif. Un plasmide conjugatif est un élément génétique mobile qui porte entre autre les gènes nécessaires à l'encodage de la machinerie de conjugaison (Johnston *et al.*, 2014).

La première étape de la conjugaison implique un pili conjugatif (pili sexuel) sur la bactérie donneuse (appelé F+) qui se lit à la bactérie receveuse dépourvue de pili conjugatif (appelé F-) (Sana, Laubier et Bleves, 2014). Typiquement, le pili conjugatif se rétracte (dépolymérise) en approchant au fur à mesure les deux bactéries jusqu'à ce que celles-ci deviennent liées par un point de contact entre leurs deux enveloppes. Des protéines codées par le plasmide permettent alors l'établissement d'une ouverture et d'un pont entre les deux bactéries. Un des deux brins de l'ADN plasmidique est brisé au niveau du site de l'origine de transfert (*oriT*) et pénètre dans la bactérie receveuse. Par conséquent, un des deux brins passe dans la cellule donneuse tandis que l'autre reste dans la bactérie receveuse. Pour finir les deux brins d'ADN complémentaire sont synthétisés et les deux bactéries possèdent un plasmide conjugatif (Sana, Laubier et Bleves, 2014).

Cependant, de même que pour la transformation un grand nombre de protocole existe, en fonction des différentes souches à modifier. Les ratios de bactéries, les phases de croissance des bactéries, les milieux de croissance ou d'interaction, les plasmides ou encore l'utilisation de deux ou trois partenaires bactériens peuvent être modifiés en fonction des bactéries à conjuguer (Angles, Marshall et Goodman, 1993 ; Goodman *et al.*, 1993 ; Sana, Laubier et Bleves, 2014). Malgré ces nombreuses méthodes, certaines bactéries restent impossibles à transformer par conjugaison.

Afin de réaliser des biofilms multi-spécifiques, d'avoir un suivi des bactéries lors de leurs interactions avec des amibes et de les visualiser par microscopie à fluorescence, différentes méthodes de conjugaison ont été testées sur les bactéries de la collection de Toulon issues de l'environnement marin afin de leur ajouter un gène exprimant une protéine fluorescente.

Conjugaison bipartenaire :

Matériels

Souches et plasmides

Souches bactériennes receveuses : *Polaribacter* sp. TC5, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC9, *Shewanella* sp. TC10, *Shewanella* sp. TC11

Souches bactériennes donneuses : *Escherichia coli* WM3064 (génotype : thrB1004 pro thi rpsL hsdS lacZΔM15 RP4-1360 Δ(araBAD)567 ΔdapA1341::[erm pir]), Souche auxotrophe au DAP

Plasmides : pX5-GFP

Milieux et solutions

Milieu de croissance et solvants :

Milieu VNSS et LB

DAP : acide diaminopimélique

Solution de lavage :

Solution de MgSO₄ à 10 μM

Solution (1 :1) de NSS et MgSO₄ à 10 μM

Equipements et consommables

Vortex

Incubateurs

Tubes Eppendorfs 1,5 mL

Boite de pétri

Micropipettes et cônes

Filtres

Méthodes

Croissance des souches

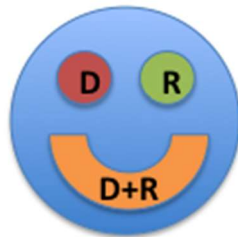
- 1- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes receveuses sont réalisées dans du milieu riche LB ou VNSS jusqu'à la phase exponentielle, post-exponentielle et stationnaire en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique.
- 2- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes doneuses sont réalisées dans du milieu riche LB ou VNSS avec ou sans antibiotique jusqu'à la phase exponentielle, post-exponentielle et stationnaire en flacon en verre de 60 mL à 37°C, 180 rpm à partir d'une préculture planctonique.

Méthode 1 : Conjugaison bipartite avec interaction sur boîte

1- **Méthode 1.1** : les suspensions bactériennes sont centrifugées à 6000 rpm, 10 min et le culot est repris dans 5 mL d'une solution de lavage

Méthode 1.2 : Les suspensions bactériennes restent dans leur milieu d'origine.

2- Des spots de 50 µL de bactéries sont déposés sur boîte de Pétri (VNSS + DAP et LB + DAP) issus des suspensions de bactéries donneuses et receveuses et un spot de mélange contenant à la fois les bactéries donneuses et receveuses avec un ratio de 1/1, 1/2 et 1/3 suivant le plan :



→ Le spot D+R est légèrement étalé à l'oise

- 3- Après séchage des spots sous PSMII, les boîtes sont incubées à 20°C, 30°C ou 37°C durant une nuit ou 48h.
- 4- Les spots de mélange sont repris à l'oise et déposés dans 1 mL de LB ou de VNSS, puis vortexés. (**Note 1**)
- 5- Des dilutions de 10 en 10 sont réalisées avant que 100 µL de chacune des dilutions soit étalées avec un râteau sur boîte de Pétri contenant du milieu VNSS ou LB supplémenté en antibiotique avec ou sans DAP à 100 µg/mL (**Note 2**).
- 6- Les boîtes sont incubées durant 72h à 20°C.
- 7- Les clones ayant poussés sur les boîtes de Pétri sans DAP correspondent aux transformants putatifs.

Notes

Note 1 : S'il n'y a pas eu de croissance des spots donneurs (D) ou receveurs (R), le problème est issu de la souche n'ayant pas poussé.

Note 2 : S'il n'y a pas eu de colonie sur les boîtes contenant le DAP, il y a eu un problème avec la souche donneuse. S'il n'y a pas de colonie sur les boîtes contenant uniquement l'antibiotique et le milieu de croissance, il n'y a pas de transformants putatifs.

Méthode 2 : Conjugaison bipartite avec interaction sur filtre

1- **Méthode 2.1** : Des prélèvements de 100 µL de donneur ainsi que de receveur (avec un ratio donneuse/ receveuse de : 1/1, 1/3 et 1/2) sont ajoutés dans 5 mL d'une solution de lavage dans un Falcon® 15 mL et mélangés par retournement. Les suspensions sont filtrées sur 0,22 µm ou 0,45 µm et un lavage est effectué avec 5 mL de solution de lavage.

Méthode 2.2 : Des prélèvements de 100 µL de donneur ainsi que de receveur (avec un ratio donneuse/ receveuse de : 1/1, 1/3 et

- 1/2) sont ajoutés dans 5 mL de milieu VNSS ou LB dans un Falcon® 15 mL et mélangés par retournement. Les suspensions sont filtrées sur 0,22 µm ou 0,45 µm et un lavage est effectué avec 5 mL de VNSS ou LB.
- 2- Les filtres sont déposés sur une boîte de pétri contenant du VNSS et du DAP à 100 µg/mL ou du LB et du DAP à 100 µg/mL (**Note 1**). Les boîtes sont incubées à 20°C, 30°C ou 37°C durant une nuit ou 48h.
 - 3- Les filtres sont roulés puis déposés dans un Falcon® 15 mL contenant 2 mL de VNSS ou LB et vortexés.
 - 4- Des dilutions de 10 en 10 sont réalisées avant que 100 µL de chacune des dilutions soit étalées avec un râteau sur boîte de Pétri contenant du milieu VNSS ou LB supplémenté en antibiotique avec ou sans DAP à 100 µg/mL (**Note 2**).
 - 5- Les boîtes sont incubées durant 72h à 20°C. Les clones ayant poussés sur les boîtes de Pétri sans DAP correspondent aux transformants putatifs

Notes

Note 1 : S'il n'y a pas eu de croissance des spots donneurs (D) ou receveurs (R), le problème est issu de la souche n'ayant pas poussé.

Note 2 : S'il n'y a pas eu de colonie sur les boîtes contenant le DAP, il y a eu un problème avec la souche donneuse. S'il n'y a pas de colonie sur les boîtes contenant uniquement l'antibiotique et le milieu de croissance, il n'y a pas de transformants putatifs

Conjugaison Tripartenaire :

Matériels

Souches et plasmides

Souches bactériennes receveuses : *Polaribacter* sp. TC5, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC9, *Shewanella* sp. TC10, *Shewanella* sp. TC11 (**Note 1**)

Souches bactériennes donneuses : *Escherichia coli* WM3065 et DH5 α

Plasmides : pCJS10 (donneur), pRK600 (helper)

Milieux et solutions

Milieu de croissance et solvants :

Milieu VNSS et LB

Solution de lavage :

Solution de MgSO₄ à 10 µM

Solution (1 :1) de NSS et MgSO₄ à 10 µM

Equipements et consommables

Vortex

Incubateurs

Tubes Eppendorfs 1,5 mL

Boîte de pétri

Micropipettes et cônes

Filtres

Méthodes

Croissance des souches

- 1- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes receveuses sont réalisées dans du milieu riche LB ou VNSS jusqu'à la phase exponentielle, post-exponentielle et stationnaire en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique.
- 2- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes donneuses et helper sont réalisées dans du milieu riche LB ou VNSS avec ou sans antibiotique jusqu'à la phase exponentielle, post-exponentielle et stationnaire en flacon en verre de 60 mL à 37°C, 180 rpm à partir d'une préculture planctonique.

Conjugaison tripartite avec interaction sur filtre

- 1- L'agitation de la bactérie helper doit être arrêtée 30 min avant son utilisation.
- 2- Des prélèvements de 50 µL de donneur et de helper ainsi que 100 µL de receveur sont ajoutés à 5 mL d'une solution de lavage dans un Falcon® 15 mL et mélangés par retournement. Les suspensions sont filtrées sur 0,22 µm ou 0,45 µm et un lavage est effectué avec 5 mL de solution de lavage.
- 3- Les filtres sont déposés sur une boîte de pétrie contenant du VNSS ou du LB supplémenté en DAP à 100 µg/mL (**Note 2**). Les boîtes sont incubées à 20°C, 30°C ou 37°C durant une nuit ou 48h.
- 4- Les filtres sont roulés puis déposés dans un Falcon® 15 mL contenant 800 µL de VNSS ou LB et vortexés.
- 5- Des dilutions de 10 en 10 sont réalisées avant que 100 µL de chacune des dilutions ne soit étalées avec un râteau sur boîte de Pétri contenant du milieu VNSS ou LB supplémenté en antibiotique avec ou sans DAP à 100 µg/mL (**Note 3**).
- 6- Les boîtes sont incubées durant 72h à 20°C.
- 7- Les clones ayant poussés sur les boîtes de Pétri sans DAP correspondent aux transformants putatifs.

Notes

Note 1 : Les souches receveuses doivent être naturellement résistantes à la Streptomycine, ou avoir été préalablement sélectionnées.

Note 2 : Les filtres sont déposés sur la gélose côté bactéries vers le haut.

Note 3 : S'il n'y a pas eu de colonie sur les boîtes contenant le DAP, il y a eu un problème avec la souche donneuse. S'il n'y a pas de colonie sur les boîtes contenant uniquement l'antibiotique et le milieu de croissance, il n'y a pas de transformants putatifs.

Résultats attendus

Les souches TC10 et NCIMB 400 expriment le plasmides pX5 – GFP après conjugaison :

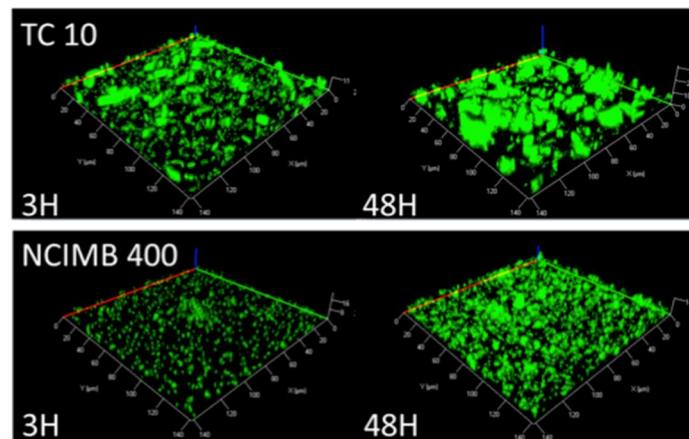


Figure 61 : Formation de biofilm en condition dynamique à 3mL/h (flow cells) de *Shewanella* sp. TC10 et *Shewanella frigidimarina* NSCIMB400 contenant le plasmide pX5 - GFP en eau de mer artificielle après 3h et 24H d'incubation.

Les deux souches TC10 et NCIMB400 ont été transformées par conjugaison avec la méthode 1. Durant la conjugaison de la souche TC10, la bactérie donneuse a effectué sa croissance sans antibiotique, aidant à la transformation de la souche TC10. Cette différence a été majeure et est potentiellement due à la forte sensibilité au chloramphénicol de la bactérie.

Fiche technique n° 5 : Conception d'anticorps anti bactérie pour l'immunomarquage

Introduction

En biologie et biochimie, l'immunomarquage concerne toutes approches basées sur l'utilisation des anticorps pour détecter des motifs moléculaires spécifiques dans un échantillon. Elle a commencé à être utilisé en 1942 par Albert Coons et ses collaborateurs qui ont localisé des antigènes de pneumocoque dans une section de foie grâce à un anticorps lié à une protéine fluorescente (Coons, Creech et Jones, 1942). Par la suite, l'utilisation d'anticorps pour localiser des structures ou des éléments dans des cultures cellulaires ou sur des sections de tissu est devenue une méthode extrêmement puissante et elle est responsable de beaucoup de découvertes importantes (Burry, 2011). Cependant, l'utilisation d'anticorps dans un environnement cellulaire complexe et hétérogène peut aboutir quelques fois à la liaison des anticorps avec des antigènes aspécifiques. Pour éviter de mauvaises interprétations, un ensemble de contrôles doit montrer que tous les aspects du marquage et de la spécificité ont été correctement testés afin de ne pas laisser de doutes sur la fiabilité des résultats (Burry, 2011).

Aujourd'hui l'utilisation d'anticorps permet de repérer un grand nombre d'antigènes dans différentes utilisations. Ils sont classés selon leur capacité à reconnaître un ou plusieurs épitopes d'un antigène, on parle alors respectivement d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux. L'utilisation des anticorps polyclonaux couplés à de la fluorescence pour le marquage des bactéries permet aisément de suivre le devenir d'une bactérie lors d'un processus d'infection ou lors de la réalisation de biofilm (Hall-Stoodley *et al.*, 2006 ; Lepanto *et al.*, 2014). Le marquage par les anticorps peut être direct ou indirect. Dans le cas du marquage direct, l'anticorps qui reconnaît l'antigène d'intérêt est directement couplé à une protéine fluorescente. Dans le cas du marquage indirect, l'anticorps dit « primaire » reconnaît l'antigène d'intérêt mais un second anticorps couplé à une protéine fluorescente dit « secondaire » est ajouté et reconnaît l'anticorps primaire. L'immunomarquage indirect permet d'amplifier le signal de fluorescence.

Afin de réaliser des biofilms multi-spécifiques et d'avoir un suivi des bactéries lors de leurs interactions avec des amibes et de les visualiser par microscopie à fluorescence, la conception

d'anticorps polyclonaux sur différents animaux a été réalisée sur les bactéries de la collection de Toulon afin de réaliser des immunomarquages indirects.

I - Conception des anticorps primaires

Matériels

Souches

Persicivirga mediterranea TC4, *Polaribacter* sp. TC5 et *Shewanella* sp. TC11

Milieux et solutions

Milieu VNSS

PBS 1X

Formaldéhyde

Equipements et consommables

Falcon®

Bain marie

Incubateurs

Centrifugeuse

Méthodes

- 1- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique.
- 2- Les cultures sont transférées dans un Falcon® 15 mL et centrifugées à 6000 rpm durant 10 min, puis repris dans 10 mL de PBS 1X.
- 3- **Méthode 1 :** Les cellules sont inactivées par la chaleur en plongeant le Falcon® 15 mL contenant la suspension bactérienne 1h dans un bain marie à 48°C (**Note 1**).
Méthode 2 : Du formaldéhyde est ajouté à la suspension bactérienne pour obtenir une concentration de 0,01 %. La suspension est incubée durant 10h à 4°C. La suspension est rincée par une centrifugation de 10 min à 6000 rpm et le culot est repris dans 10 mL de PBS 1X. Trois rinçages successifs sont effectués (**Note 2**).
- 4- La concentration des suspensions doit être approximativement de 10^8 cellules/mL.
- 5- **Les étapes suivantes ont été réalisées par la société ACRIS Antibodies GmbH, Herford, Allemagne :** Les antigènes ont été émulsifiés par mélange avec un volume égal d'adjuvant de Freud complet.
- 6- Trois à quatre injections sous cutanées ont été réalisées dans différents hôtes (Poulet pour TC4, Chèvre pour TC5 et Lapin pour TC11) à différents endroits en immunisation primaire.
- 7- Des immunisations supplémentaires ont été réalisées en fonction de l'hôte.

Notes

Note 1 : Cette étape a été réalisée, mais les anticorps ont par la suite été produit avec l'inactivation au formaldéhyde (méthode 2), du fait d'un risque de moins bonne conservation durant la durée du transport.

Notes 2 : L'utilisation d'aldéhydes pour l'inactivation peut aboutir à un « cross linking » des complexes protéiques de la bactérie et donc à une modification de la reconnaissance de l'antigène cible par la suite.

II – Marquage aux anticorps de biofilm multispécifique

Matériels

Souches

Persicivirga mediterranea TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 contenant le plasmide pX5-GFP et *Shewanella* sp. TC11

Milieux et solutions

Milieu VNSS

Milieu ASW (eau de mer artificielle à 36g/L)

PBS 1X

Formaldéhyde

BSA (Albumine de sérum bovin)

DAPI

Equipements et consommables

Microplaques 24 puits

Coverslips (diamètre 13 mm, épaisseur 0)

Falcon®

Spectrophotomètre

Pince à dissection fine sans griffes

Cure-dents

Parafilm

Lampe UV

Agitateur à balancement 3D

Micropipettes et cônes stériles

Incubateurs

Centrifugeuse

Méthodes

Coculture des souches

- 1- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique (**Note 1**).

- 2- Les cultures sont transférées dans un Falcon® 50 mL et centrifugées à 6000 rpm durant 10 min, puis repris dans 10 mL d'ASW.
- 3- Des suspensions dans de l'ASW sont réalisées afin d'obtenir un échantillon pour chacune des souches bactériennes à une $DO_{600nm}=0,1$, ou un échantillon contenant les quatre souches à une $DO_{600nm}=0,1$ finale
- 4- Les suspensions sont inoculées dans des plaques 24 puits contenant un coverslip préalablement stérilisé par exposition aux UV durant 20 min, 1 mL de chacune des suspensions est ajouté dans chacun des puits (**Note 2 et 3**).
- 5- Les plaques sont incubées durant 24h, 48h ou 72h à 20°C en conditions statiques.
- 6- A chaque temps d'incubation, les plaques sont rincées : les plaques sont renversées afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rempli avec 1 mL d'ASW, trois rinçages successifs à l'ASW sont effectués (**Note 4**).
- 7- La fixation des cellules est réalisée par ajout d'1 mL par puits d'une solution de formaldéhyde à 3,7% dans du PBS 1X durant 20 min (**Note 5**).
- 8- Trois rinçages successifs au PBS 1X sont effectués puis les plaques sont conservées à 4°C (**Note 6**).

Immunomarquage des bactéries en biofilm à quatre espèces

- 1- **Blocage 1** : Les plaques sont vidées par retournement et 700 µL d'une solution de BSA à 3% dans du PBS 1X sont ajoutés dans chacun des puits. Les plaques sont incubées à 4°C durant une nuit (**Note 7**).
- 2- **Anticorps primaires** : Des solutions d'anticorps primaires sont préparées aux concentrations suivantes dans une solution de BSA à 3 % :

Souches	Espèce de l'anticorps	Concentration
TC4	Poulet	1/300
TC5	Chèvre	1/100
TC11	Lapin	1/300

Les plaques sont vidées par retournement puis 300 µL des solutions d'anticorps sont ajoutés aux puits correspondant à leurs cibles. Une solution contenant les trois anticorps en même temps est préparée et ajoutée dans les puits de la plaque contenant le mélange bactérien. Les puits contenant uniquement la bactérie TC10 pX5-GFP subissent le même traitement avec uniquement la solution de BSA à 3%.

Les plaques sont incubées durant une heure à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (**Note 8**).

- 3- **Blocage 2** : Les plaques sont vidées par retournement puis trois rinçages au PBS 1X sont effectués. Une solution de blocage de BSA à 3% est ajoutée dans chaque puits à hauteur de 700 µL/puits. Les plaques sont incubées durant 2h à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (**Note 8 et 9**).
- 4- **Anticorps secondaires** : Des solutions d'anticorps secondaires sont préparées aux concentrations suivantes avec ou sans DAPI dans de la BSA à 3% :

Souches	Types	Espèces	Fuorochromes	Concentrations
TC4	Anti poulet	Chèvre	Alexa fluor 405	1/500
TC4	Anti poulet	Chèvre	FITC DAPI	1/2000 5 µg/mL
TC5	Anti chèvre	Âne	Alexa fluor 633 DAPI	1/1000 5 µg/mL
TC11	Anti Lapin	Âne	Alexa Fluor 594 DAPI	45 µL/mL 5 µg/mL
TC10 – pX5-GFP			DAPI	5 µg/mL

Dans le cas du biofilm mixte à 4 espèces, une seule solution contenant les deux anticorps suivants est d'abord préparée dans un tube contenant de la BSA à 3% (**Note 10**):

Souches	Types	Espèces	Fuorochromes	Concentrations
TC5	Anti chèvre	Âne	Alexa fluor 633	1/1000
TC11	Anti Lapin	Âne	Alexa Fluor 594	45 µL/mL

- 5- **Méthode 1** : Les plaques sont vidées par retournement puis :
- 300 µL/puits de la solution d'anti poule couplée à la FITC sont déposés sur le biofilm monospécifique de TC4
 - 300 µL/puits de la solution d'anti chèvre couplé à l'Alexa fluor 633 sont déposés sur le biofilm monospécifique de TC5
 - 300 µL/puits de la solution d'anti lapin couplé à l'Alexa fluor 594 sont déposés sur le biofilm monospécifique de TC11
 - 300 µL/puits de la solution contenant uniquement le DAPI sont déposés sur le biofilm monospécifique de TC10 – pX5-GFP.
 - Enfin 300 µL/puits de la solution contenant à la fois l'anti chèvre et l'anti lapin sont déposés sur le biofilm mixte à quatre espèces (contenant TC5 et TC11).

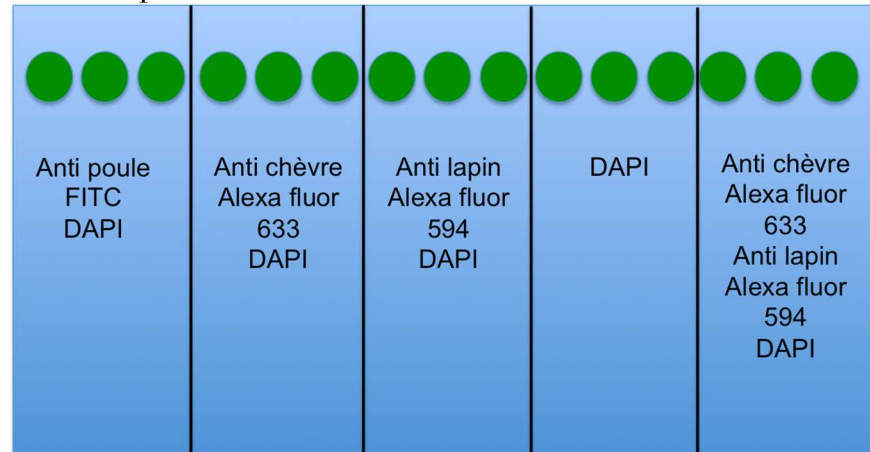
Les plaques sont mises à incuber durant 1h à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (**Note 8**).

Les plaques sont rincées trois fois avec une solution de PBS 1X.

Blocage 3 : Uniquement dans les puits contenant le biofilm mixte, ceux-ci sont vidés par retournement et 700 µL/puits de la solution de BSA à 3% sont ajoutés. Les plaques contenant les biofilms mixtes sont incubées durant 1h à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (**Note 8**). Ensuite 300 µL/puits de la solution contenant l'anti poule couplé à l'Alexa fluor 405 sont

déposés sur le biofilm mixte. Les plaques sont incubées durant 1h à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (**Note 8**). Puis les plaques sont rincées trois fois au PBS 1X.

- 6- **Méthode 2** : des gouttes de 70 μ L des solutions d'anticorps sont déposées sur une feuille de parafilm dans une chambre humide suivant le plan :

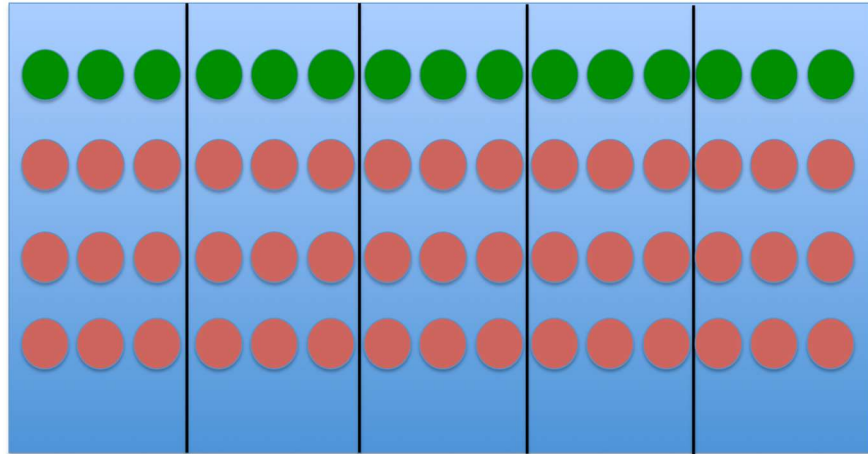


A l'aide d'une pince et d'un cure-dent les coverslips sont extraits et déposés sur les gouttes suivant le plan :

- le biofilm monospécifique de TC4 sur la solution d'anti poule couplé à la FITC
- le biofilm monospécifique de TC5 sur la solution d'anti chèvre couplé à l'Alexa fluor 633
- le biofilm monospécifique de TC11 sur la solution d'anti lapin couplé à l'Alexa fluor 594
- le biofilm monospécifique de TC10 – pX5-GFP sur la solution contenant uniquement le DAPI
- Enfin le biofilm mixte sur la solution contenant à la fois l'anti chèvre et l'anti lapin

Les coverslips sont laissés incuber durant 1h dans une chambre humide à l'abri de la lumière.

Des gouttes de PBS de 200 μ L sont disposées sur la feuille de parafilm comme ci-dessous :



Les coverslips sont prélevés à l'aide de la pince, égouttés sur la tranche sur du papier absorbant et déposés sur la première goutte de rinçage durant 5 min, puis sur la seconde et enfin sur la troisième (**Note 11**).

Blocage 3 : Uniquement pour les coverslips contenant le biofilm mixte à quatre espèces, ceux-ci sont déposés sur une goutte de 200 μL d'une solution de BSA à 3% et incubés durant 1h en chambre humide. Les coverslips sont ensuite égouttés sur la tranche sur du papier absorbant puis déposés sur une goutte de 70 μL de la solution contenant l'anti poule couplé à l'Alexa fluor 405 durant 1h. Enfin trois lavages successifs sont effectués à l'aide de trois gouttes de 200 μL de PBS 1X.

- 6- Les coverslips sont ensuite montés sur une lame (montage entre lame et lamelle) avec une goutte de Prolong diamond antifade ou de Mowiol antifade (**Note 12**).
- 7- Les lames sont mises à sécher à l'obscurité durant 48h, avant d'être rangées en boîte et conservées à 4°C (**Note 13**).

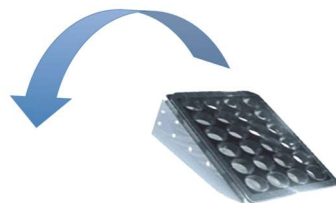
Notes

Note 1 : Toutes les souches bactériennes doivent arriver à la phase post exponentielle en même temps.

Note 2 : Les lampes UVs incorporées dans les PSMII suffisent pour permettre la stérilisation des plaques contenant des coverslips.

Note 3 : Les puits contenant le biofilm mixte doivent être préparés sur une plaque séparée des biofilms monospécifiques avec la méthode 1, car ceux-ci seront plus faciles à traiter et subissent une étape de blocage ainsi qu'une étape de marquage en plus.

Note 4 : Le rinçage s'effectue par renversement des plaques : le geste doit être fait en un mouvement circulaire en une fois sans à-coups.



Note 5 : La fixation peut être effectuée avec une solution d'acétone/méthanol (1 :1, v : v) durant 20 min à -20°C, certains anticorps ne supportant pas certains types de fixation, en particulier les anticorps qui visent la bactérie TC5 ne supporte pas la fixation à l'acétone/méthanol.

Note 6 : Les plaques peuvent être conservées entre 1 et 2 semaines à 4 °C après la fixation.

Note 7 : Le blocage permet d'éliminer le bruit de fond en masquant les sites antigéniques aspécifiques : plusieurs solutions de blocages peuvent être utilisées en fonctions des anticorps (Albumine de sérum de diverses espèces, Regilait,...). Durant ces expériences, la BSA qui présentait les meilleurs résultats a été utilisée en priorité.

Note 8 : Un agitateur orbital peut également être utilisé, mais le marquage a tendance à être moins bon.

Note 9 : Le reste des manipulations doit se faire à l'obscurité.

Note 10 : Lors de la réalisation du marquage à quatre espèces, une première solution contenant les anticorps secondaires anti chèvre visant la bactérie TC5 et les anti lapin visant la bactérie TC11 est utilisée en premier sur ces biofilms. Dans une seconde étape l'anticorps anti poulet réalisé dans une chèvre est ajouté. Cela évite d'avoir une cross réaction ou les anticorps anti chèvre visant la bactérie TC5 irait se fixer sur les anticorps secondaire anti poulet visant TC4 qui ont été réalisée dans la chèvre.

Note 11 : Il est nécessaire d'utiliser un vrai papier absorbant (pas de papier kimtech), sinon les rinçages seront de mauvaise qualité.

Note 12 : Le Mowiol antifade donne moins de bruit de fond lors de l'imagerie, mais la conservation des lames est potentiellement moins bonne.

Note 13 : Les lames une fois les solutions de montage polymérisées peuvent se conserver au moins 1 an sans perte importante de fluorescence.

III – Marquage aux anticorps des bactéries phagocytées par les amibes

Matériels Souches

Acanthamoeba castelanii, *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 contenant le plasmide pX5-GFP et *Shewanella* sp. TC11

Milieux et solutions

Milieu PYG

Milieu VNSS

Milieu NSS

PBS 1X

Formaldéhyde

BSA (Albumine de sérum bovin)

DAPI

Equipements et consommables

Microplaques 24 puits

Grattoir souple (Costar®)

Coverslips (diamètre 13 mm, épaisseur 0)

Falcon®

Cellule de Malassez
Spectrophotomètre
Pince à dissection fine sans griffes
Cure-dents
Parafilm
Lampe UV
Agitateur à balancement 3D
Micropipettes et cônes stériles
Incubateurs
Centrifugeuse

Méthodes **Coculture : Interaction amibes/bactéries**

- 1- Des cultures de 30 mL d'amibes cultivées en flasques en PYG arrivées à congruence sont grattées à l'aide d'un grattoir et centrifugées durant 15 min à 2500 rpm.
- 2- Le culot est repris dans 20 mL de NSS et la suspension est ajustée à 5.10^5 cellules/mL par comptage à la cellule de Malassez.
- 3- La suspension est inoculée dans des plaques 24 puits contenant des coverslips préalablement stérilisés par exposition aux UVs durant 20 min, 1 mL de la suspension est ajouté dans chacun des puits et incubé à 20°C durant une nuit (**Note 1**).
- 4- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique (**Note 2**).
- 5- Les cultures sont transférées dans un Falcon® 50 mL et centrifugées à 6000 rpm durant 10 min, puis reprises dans 10 mL de NSS.
- 6- Les suspensions dans du NSS sont ajustées afin d'obtenir une MOI de 10 et 100 pour chacune des souches bactériennes (MOI 10 = $DO_{600nm}=0,005$ et MOI 100 = $DO_{600nm}=0,05$)
- 7- Les plaques contenant les amibes sont rincées : elles sont renversées afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rerepli avec 1 mL de NSS, trois rinçages successifs sont effectués (**Note 3**).
- 8- Les suspensions sont inoculées dans les plaques 24 puits contenant les amibes (1mL/puit). Une centrifugation des plaques est effectuée durant 5 min à 900g (en utilisant un rotor à microplaque).
- 9- Après 3h de mise en contact des bactéries et des amibes, les plaques sont rincées par renversement afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rerepli avec 1 mL de NSS, trois rinçages successifs sont effectués, afin d'éliminer les bactéries extracellulaires non phagocytées (**Note 3**).
- 10- Les plaques sont incubées durant 0h, 24h ou 48h à 20°C en condition statique.
- 11- A chaque temps d'incubation, les plaques sont rincées par renversement afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rerepli avec 1 mL de NSS, trois rinçages successifs sont effectués (**Note 3**).
- 12- La fixation des cellules est réalisée par ajout d'1 mL par puit d'une solution de formaldéhyde à 3,7% dans du PBS 1X durant 4 heures ou

par ajout d'une solution d'Acétone/méthanol (1 :1, v :v) durant 20 min à -20°C (**Note 4**).

- 13- Trois rinçages successifs sont effectués puis les plaques sont conservées à 4°C (**Note 5**).

Immunomarquage des bactéries phagocytées

- 1- **Perméabilisation** : Les plaques fixées au formaldéhyde sont vidées par retournement puis une solution de Triton X100 à 0,05% dans du PBS 1X est ajoutée (1 mL/puits) durant 15 min à température ambiante. Les plaques contenant la bactérie TC4 sont vidées par retournement puis une solution de Tween 20 à 0,5% dans du PBS 1X est ajoutée durant 20 min. Les plaques sont rincées trois fois au PBS 1X (**Note 6**).
- 2- **Blocage 1** : Les plaques sont vidées par retournement et 700 µL d'une solution de BSA à 3% dans du PBS 1X est ajoutée dans chacun des puits, les plaques sont incubées à 4°C durant une nuit (**Note 7**).
- 3- **Anticorps primaire** : Des solutions d'anticorps primaires sont préparées aux concentrations suivantes dans une solution de BSA à 3 % réalisée dans du PBS 1X :

Souches	Espèce de l'anticorps	Concentration
TC4	Poulet	1/300
TC5	Chèvre	1/100
TC11	Lapin	1/300

Les plaques sont vidées par retournement (**Note 3**) puis 300 µL des solutions d'anticorps sont ajoutées aux puits correspondant à leurs cibles. Les puits contenant uniquement la bactérie TC10 pX5-GFP et les amibes subissent le même traitement avec uniquement la solution de BSA à 3%.

Les plaques sont incubées durant une heure à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (**Note 8**).

- 4- **Blocage 2** : Les plaques sont vidées par retournement puis trois rinçages au PBS 1X sont effectués. Une solution de blocage de BSA à 3% est ajoutée dans chaque puits à hauteur de 700 µL/puits. Les plaques sont incubées durant 2h à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (**Note 7, 8 et 9**).
- 5- **Anticorps secondaires** : Des solutions d'anticorps secondaires sont préparées aux concentrations suivantes avec du DAPI dans de la BSA à 3%:

Souches	Types	Espèces	Fuorochromes	Concentrations
TC4	Anti poulet	Chèvre	FITC DAPI	1/2000 5 µg/mL
TC5	Anti chèvre	Âne	Alexa fluor 633 DAPI	1/1000 5 µg/mL
TC11	Anti Lapin	Âne	Alexa Fluor 594 DAPI	45 µL/mL 5 µg/mL
TC10 – pX5-GFP			DAPI	5 µg/mL

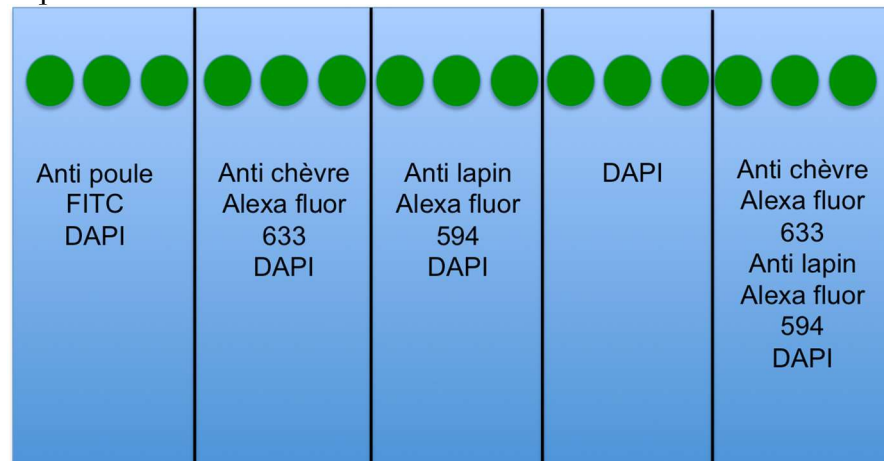
(Note 10).

- 6- **Méthode 1** : Les plaques sont vidées par retournement puis :
- 300 µL/puits de la solution d'anti poule couplé à la FITC sont déposés sur les amibes contenant TC4
 - 300 µL/puits de la solution d'anti chèvre couplé à l'Alexa fluor 633 sont déposés sur les amibes contenant TC5
 - 300 µL/puits de la solution d'anti lapin couplé à l'Alexa fluor 594 sont déposés sur les amibes contenant TC11
 - 300 µL/puits de la solution contenant uniquement le DAPI sont déposés sur les amibes contenant TC10 – pX5-GFP.

Les plaques sont mises à incuber durant 1h à température ambiante sur un agitateur à balancement à 50 rpm (Note 8).

Les plaques sont rincées par renversement trois fois avec une solution de PBS 1X (Note 3).

- 6- **Méthode 2** : des gouttes de 70 µL des solutions d'anticorps sont déposées sur une feuille de parafilm dans une chambre humide suivant le plan :



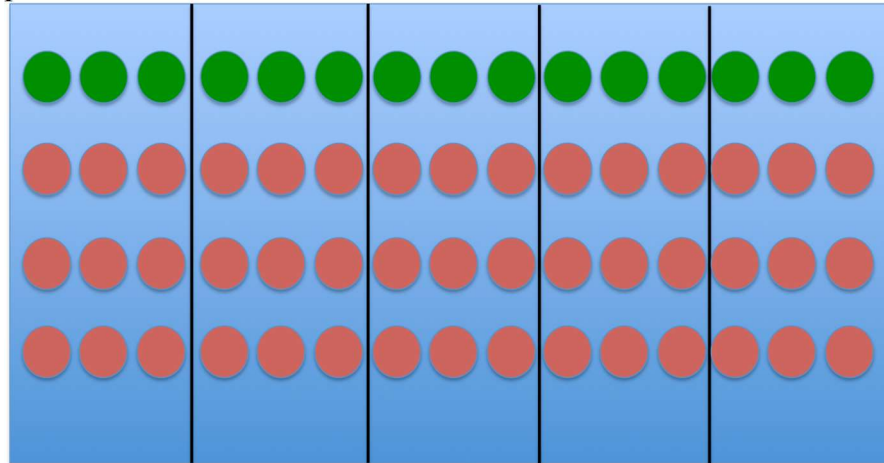
A l'aide d'une pince et d'un cure-dent les coverslips sont extraits et déposés sur les gouttes suivant le plan :

- Les amibes contenant TC4 sur la solution d'anti poule couplé à la FITC

- Les amibes contenant TC5 sur la solution d'anti chèvre couplé à l'Alexa fluor 633
- Les amibes contenant TC11 sur la solution d'anti lapin couplé à l'Alexa fluor 594
- Les amibes contenant TC10 – pX5-GFP sur la solution contenant uniquement le DAPI

Les coverslips sont laissés incuber durant 1h dans une chambre humide en statique.

Des gouttes de PBS 1X de 200 μ L sont disposées sur la feuille de parafilm comme ci-dessous :



Les coverslips sont prélevés à l'aide de la pince égouttés sur la tranche sur du papier absorbant et déposés sur la première goutte de rinçage durant 5 min, puis même chose sur la seconde et enfin sur la troisième (**Note 11**).

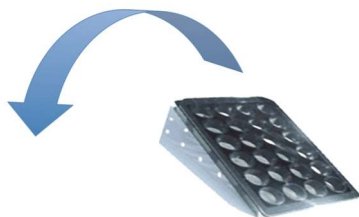
- 7- Les coverslips sont ensuite montés sur une lame (montage entre lame et lamelle) avec une goutte de Prolong diamond antifade ou de Mowiol antifade (**Note 12**)
- 8- Les lames sont mises à sécher à l'obscurité durant 48h, avant d'être rangées en boîte et conservé à 4°C (**Note 13**).

Notes

Note 1 : Les lampes UVs incorporées dans les PSMII suffisent pour permettre la stérilisation des plaques et des coverslips.

Note 2 : Toutes les souches bactériennes doivent arrivées à la phase post exponentielle en même temps.

Note 3 : Le rinçage s'effectue par renversement des plaques : le geste doit être fait en un mouvement circulaire en une fois sans à-coups.



Note 4 : La fixation est effectuée avec une solution d'Acétone/méthanol (1 :1, v :v) durant 20 min à -20°C pour les amibes en interaction avec TC4, TC10 – pX5-GFP et TC11. La fixation est effectuée avec du formaldéhyde 3,7 % durant 4h avec les amibes en interaction avec TC5. Certains anticorps ne supportent pas certains types de fixation.

Note 5 : Les plaques peuvent être conservées entre 1 et 2 semaines à 4 °C après la fixation.

Note 6 : La perméabilisation permet aux anticorps de pouvoir pénétrer dans la cellule. La fixation à l'acétone/méthanol permet déjà une perméabilisation, cependant non optimum pour tous les compartiments cellulaires, d'où l'utilisation du Tween 20, pour la bactérie TC4 qui est localisée dans le compartiment nucléaire.

Note 7 : Le blocage permet d'éliminer le bruit de fond en masquant les sites antigéniques aspécifiques : plusieurs solutions de blocages peuvent être utilisées en fonctions des anticorps (Albumine de sérum de diverses espèces, Regilait,...). Durant ces expériences, la BSA qui présentait les meilleurs résultats a été utilisée en priorité.

Note 8 : Un agitateur orbital peut également être utilisée, mais le marquage a tendance à être moins bon.

Note 9 : Le reste des manipulations doit se faire à l'obscurité.

Note 10 : Afin de ne pas avoir de fuite du DAPI en dehors des zones nucléaires, ne pas ajouter le DAPI aux solutions d'anticorps secondaires. Le marquage au DAPI est alors effectué indépendamment grâce à une solution de DAPI dans du PBS 1X à 5 μ g/mL. Le marquage est réalisé durant 20 min suivie par trois rinçages aux PBS 1X.

Note 11 : Il est nécessaire d'utiliser un vrai papier absorbant (pas de papier kimtech), sinon les rinçages seront de mauvaise qualité.

Note 12 : Le Mowiol antifade donne moins de bruit de fond lors de l'imagerie, mais la conservation des lames est potentiellement moins bonne.

Note 13 : Les lames, une fois les solutions de montage polymérisées, peuvent se conserver au moins 1 an sans perte importante de fluorescence.

Résultats attendus

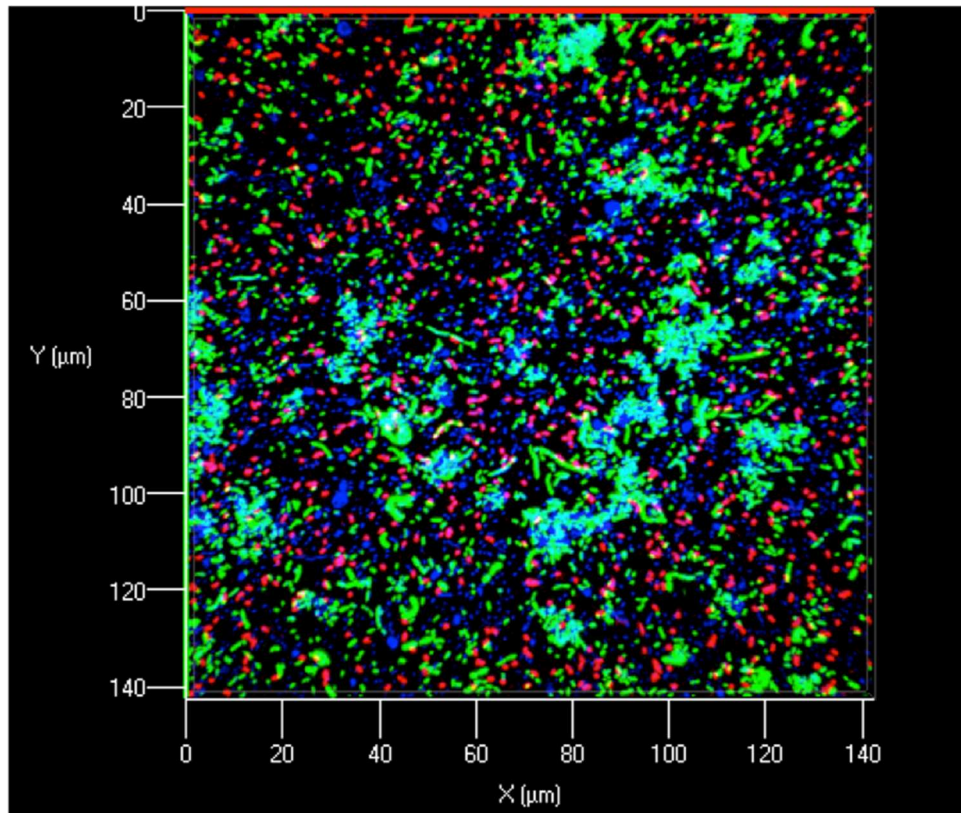


Figure 62 : Biofilm multi-spécifique comprenant les souches *Persicivirga mediterranea* TC4 (bleu), *Shewanella* sp. TC10 contenant le plasmide pX5 - GFP (vert), *Shewanella* sp. TC11 (rouge) après 24h d'incubation en condition statique à 20 °C avec un inoculum de départ de $DO_{600nm}=0,1$.

Fiche technique n° 6 : Marquages des bactéries et des composants de la matrice

Introduction

Durant leur mode de vie en biofilm, les bactéries sont enchâssées avec différents types de biopolymères dans une matrice. La matrice peut être considérée comme la maison des cellules du biofilm au sein de laquelle elles s'organisent et se développent (Flemming, 2011 ; Kåhrström, 2012). Pendant longtemps, la matrice était définie comme ne contenant majoritairement que des exopolysaccharides. Aujourd'hui de nombreuses recherches ont démontré que le biofilm contient différents types de molécules (en plus de l'eau, des cellules et des exopolysaccharides) comme des protéines, de l'ADN extracellulaire (ADNe) ou encore des lipides (Flemming et Wingender, 2010). Les techniques de microscopie combinées avec différents marquages comme par exemple les anticorps ou les lectines ont démontré l'ubiquité des composants de la matrice non seulement dans l'environnement naturel marin, d'eau douce ou de sol mais également dans les systèmes de distribution d'eau ou encore associé à certaines infections chroniques chez l'homme ainsi que dans des cultures pures expérimentales (Flemming et Wingender, 2010).

L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser couplée à des sondes fluorescentes restent un des outils qui permet l'étude structure/fonction non destructive *in situ* des composants des SPEs en biofilm (Neu et Lawrence, 1999). De telles approches permettent d'avoir une idée de l'arrangement complexe des SPEs dans un biofilm (Flemming et Wingender, 2010). L'étude des composés de la matrice et en particulier des exopolysaccharides par le marquage aux lectines est depuis de nombreuses années largement utilisée (Neu et Lawrence, 2014 ; Strathmann, Wingender et Flemming, 2002). Cependant, jusqu'à récemment, l'utilisation d'autres marqueurs permettant de marquer les autres composants de la matrice comme les protéines ou l'ADNe était moins répandue, même si certaines études s'y sont intéressées (Gloag *et al.*, 2013 ; Lynch *et al.*, 2007 ; Mann *et al.*, 2009 ; Tielker *et al.*, 2005).

Matériels Souches

Persicivirga mediterranea TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC10 et *Shewanella* sp. TC11

Milieux et solutions

Milieu VNSS

Milieu ASW (eau de mer artificielle à 36g/L)
 PBS 1X
 Formaldéhyde
 DAPI
 Con A : Concanavalin A couplé à la tetramethylrhodamine (**Note 1**)
 WGA : Agglutinine de germe de blé couplé à l'Alexa fluor 555 (**Note 1**)
 PNA : Lectine d'*Arachis hypogaea* (cacahuète) couplé à l'alexa fluor 568 (**Note 1**)
 TOTO – 3 (**Note 1**)
 Film Tracer Sypro Ruby (**Note 1**)

Equipements et consommables

Microplaques 24 puits
 Coverslips (diamètre 13 mm, épaisseur 0)
 Falcon®
 Spectrophotomètre
 Pince à dissection fine sans griffes
 Cure-dents
 Parafilm
 Lampe UV
 Micropipettes et cônes stériles
 Incubateurs
 Centrifugeuse

Méthodes Culture des souches

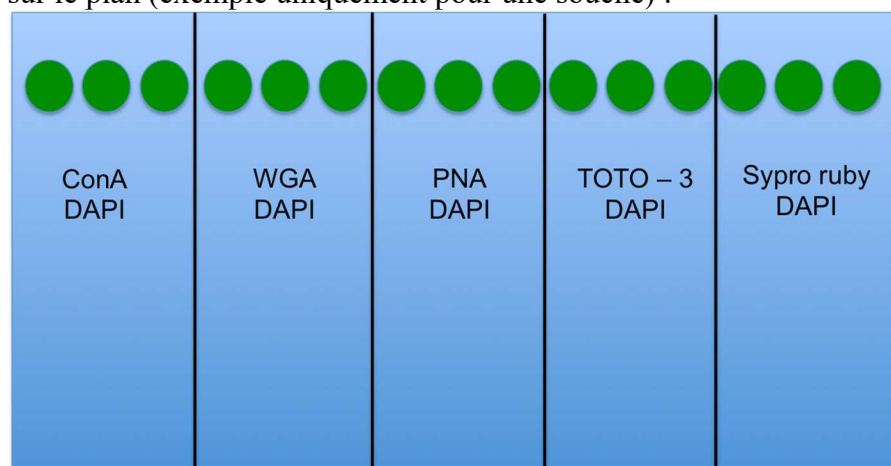
- 1- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique (**Note 2**).
- 2- Les cultures sont transférées dans un Falcon® 50 mL et centrifugées à 6000 rpm durant 10 min, puis repris dans 10 mL d'ASW.
- 3- Des suspensions dans de l'ASW sont réalisées afin d'obtenir une DO_{600nm} de 0,3 pour chacune des souches bactériennes.
- 4- Les suspensions sont inoculées dans des plaques 24 puits contenant un coverslip préalablement stérilisé par exposition aux UVs durant 20 min, 1 mL de chacune des suspensions est ajoutée dans chacun des puits (**Note 3**).
- 5- Les plaques sont incubées durant 48h à 20°C en conditions statiques.
- 6- Après 48h d'incubation, les plaques sont rincées : les plaques sont renversées afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rempli avec 1 mL d'ASW, trois rinçages successifs sont effectués (**Note 4**).
- 7- La fixation des cellules est réalisée par ajout d'1 mL par puit d'une solution de formaldéhyde à 3,7% dans du PBS 1X durant 20 min.
- 8- Trois rinçages successifs sont effectués puis les plaques sont conservées à 4°C (**Note 5**).

Marquage des biofilms : bactéries et composants de la matrice

- 1- Des solutions de marqueurs contenant du DAPI sont préparées aux concentrations suivantes dans du PBS 1X (**Note 6**) :

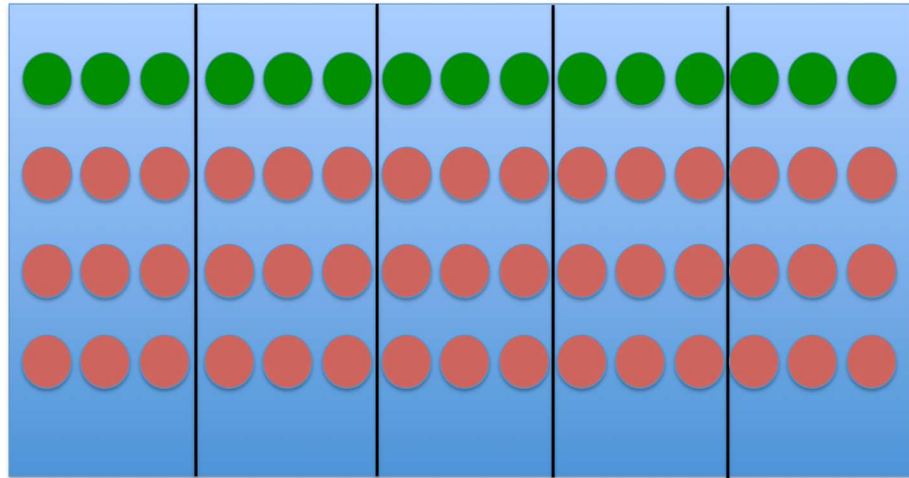
Marqueurs	Fuorochromes	Concentrations
Con A DAPI	TRITC	20 µg/mL 5 µg/mL
WGA DAPI	Alexa fluor 555	100 µg/mL 5 µg/mL
PNA DAPI	Alexa Fluor 568	50 µg/mL 5 µg/mL
TOTO – 3 DAPI	Alexa Fluor 633	2 µM 5 µg/mL
Sypro ruby DAPI		100 % (pur) 5 µg/mL

- 2- **Méthode 1** : Les plaques sont vidées par retournement puis :
- 300 µL/puits des solutions de marqueurs sont ajoutés sur les différents biofilms.
 - Les plaques sont incubées durant 30 min à l'obscurité.
 - Les plaques sont vidées par retournement puis trois rinçages au PBS 1X sont effectués.
- 2- **Méthode 2** : des gouttes de 70 µL des solutions de marqueurs sont déposées sur une feuille de parafilm dans une chambre humide comme sur le plan (exemple uniquement pour une souche) :



- A l'aide d'une pince et d'un cure-dent, les coverslips sont extraits et déposés sur les gouttes correspondantes.

- Les coverslips sont laissés à incuber durant 30 min dans une chambre humide.
- Des gouttes de PBS de 200 μ L sont disposées sur la feuille de parafilm comme ci-dessous



- Les coverslips sont prélevés à l'aide de la pince, égouttés sur la tranche sur du papier absorbant et déposés sur la première goutte de rinçage durant 5 min (**Note 7**).
 - La même chose sur la seconde et enfin sur la troisième ligne de gouttes.
- 3- Les coverslips sont ensuite montés sur une lame (montage entre lame et lamelle) avec une goutte de Prolong diamond antifade ou de Mowiol antifade (**Note 8**).
 - 4- Les lames sont mises à sécher à l'obscurité durant 48h, avant d'être rangées en boîte et conservées à 4°C (**Note 9**).

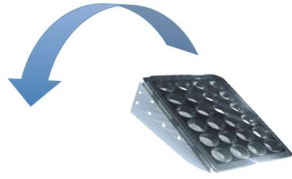
Notes

Note 1 : Le DAPI marque les cellules bactériennes en marquant l'ADN. La Con A se lie spécifiquement au monosaccharides d' α -D-glucose et d' α -D-mannose mais il peut également ciblé les polysaccharydes contenant des dérivés tel que le dextran, le glycogène, le mannane, les amylopectines (Goldstein, Hollerman *et al.* 1965) et le sphingan (Johnsen, Hausner *et al.* 2000) ou avec certains polysaccharydes contenant des derives de sucres spécifiques tel que l'alginate (Strathmann, Wingender *et al.* 2002). Le WGA marque le N-acetyl-glucosamine et les dérivés de la famille des acides sialiques contenus dans les peptidoglycanes de la paroi cellulaire et dans les lipopolysaccharides (Strathmann, Wingender *et al.* 2002). La PNA marque préférentiellement les résidus β -galactose quand ils sont espacés par un glucose dans la chaîne principale de l'exopolysaccharyde, il est généralement utilisée pour marquer les glycoprotéines (Angeloni, Ridet *et al.* 2005). Le TOTO – 3 marque l'ADNe tandis que Le Sypro ruby marque les protéines.

Note 2 : Toutes les souches bactériennes doivent arrivées à la phase post exponentielle en même temps.

Note 3 : Les lampes UVs incorporées dans les PSMII suffisent pour permettre la stérilisation des plaques et des coverslips.

Note 4 : Le rinçage s'effectue par renversement des plaques : le geste doit être fait en un mouvement circulaire en une fois sans à-coups.



Note 5 : Les plaques peuvent être conservées entre 1 et 2 semaines à 4 °C après la fixation.

Note 6 : À partir de cette étape, les manipulations doivent se faire à l'obscurité.

Note 7 : Il est nécessaire d'utiliser un vrai papier absorbant (pas de papier kimtech), sinon les rinçages seront de mauvaise qualité.

Note 8 : Le Mowiol antifade donne moins de bruit de fond lors de l'imagerie, mais la conservation des lames est potentiellement moins bonne.

Note 9 : Les lames, une fois les solutions de montage polymérisées, peuvent se conserver au moins 1 an sans perte importante de fluorescence.

Résultats attendus

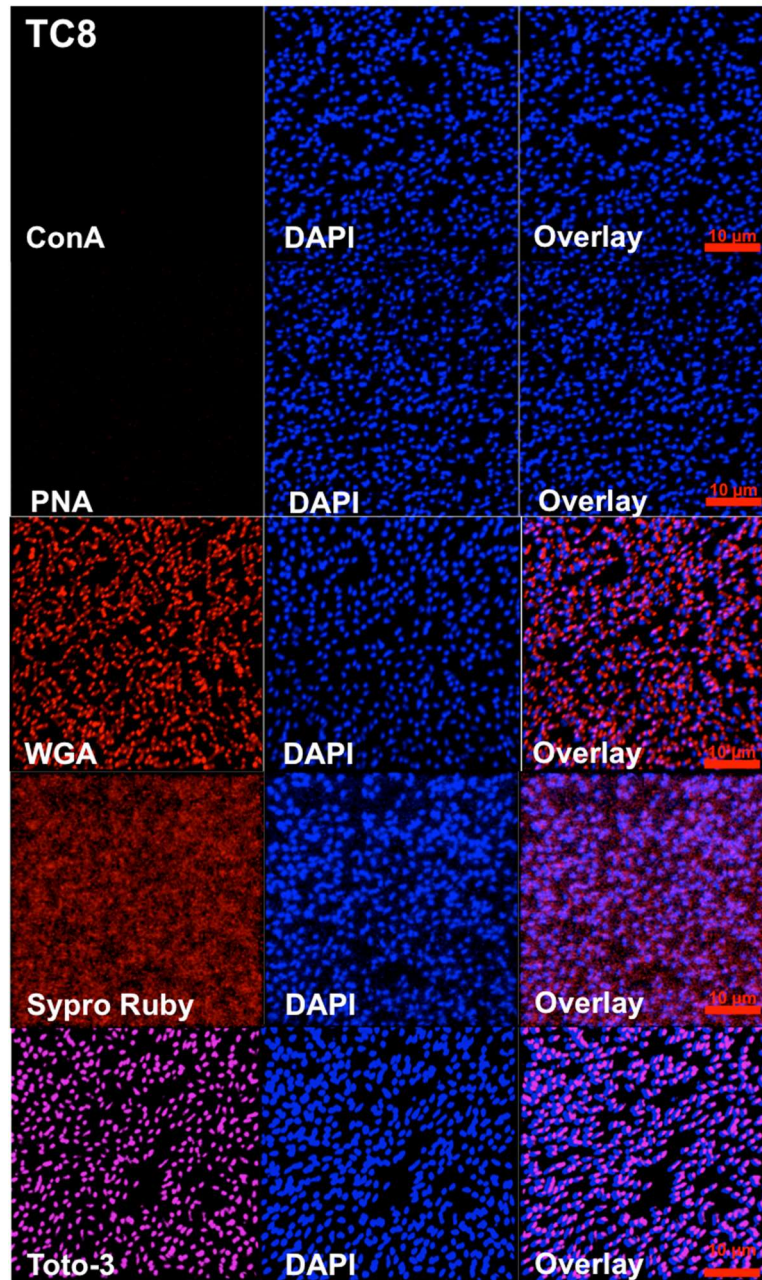


Figure 63 : Substances polymériques extracellulaires secrétées par *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 en conditions statiques après 48h après l'inoculation. Différents marqueurs fluorescents ont été utilisés : La Concanavoline A marque les exopolysachharydes contenant du glucose et du mannose. La lectine WGA marque les exopolysaccharides contenant des dérivées d'acide sialique et le N-acetyl-glucosamine. La lectine PNA marque les exopolysaccharides contenant des glycoprotéines. Le TOTO-3 marque l'ADNe et le Syproruby les protéines.

Les marquages mettent en évidence que la souche *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 produit dans sa matrice des dérivés d'acide sialique et ou de N-acétyl-glucosamine, des protéines ainsi que de l'ADNe.

Fiche technique n° 7 : Marquages des bactéries adhérees en conditions dynamiques (« Flow cell »)

Introduction

Les biofilms sont des communautés microbiennes sessiles qui se développent sur des surfaces, et qui sont fréquemment enchâssés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires. Ils sont caractérisés par une forte densité et par une organisation structurale (Stoodley *et al.*, 1999). L'organisation structurale des communautés microbiennes est influencée par de nombreux facteurs comme la composition en nutriments, les forces de cisaillement et la température (Heydorn, Ersbøll, *et al.*, 2000). Les biofilms dans la nature sont souvent difficiles à étudier et les conditions expérimentales à définir. Pour ce faire, des systèmes expérimentaux de biofilm en laboratoire ont été développés. Ces systèmes permettent l'étude des biofilms dans des conditions définies, afin de pouvoir reproduire des expériences bien contrôlées (Heydorn, Ersbøll, *et al.*, 2000). En milieu marin, les biofilms et plus largement le biofouling qui est localisé par exemple sur les navires, peuvent se développer en conditions de flux plus ou moins importants selon si le navire est à l'arrêt en zone portuaire ou s'il est en déplacement (les courants, la marée, la houle, les vagues induisant un mouvement d'eau pouvant avoir un effet).

L'utilisation de système de « flow cell » permet de mimer le développement de biofilm en conditions dynamiques. Son utilisation reste aisée et associée à l'utilisation d'algorithme de quantification du biofilm (COMSTAT, cf Fiche Technique n°10). La reproductibilité de ces expériences est bonne et permet la mesure de nombreux paramètres (Heydorn, Ersbøll, *et al.*, 2000 ; Heydorn, Nielsen, *et al.*, 2000). Aujourd'hui, son utilisation est classique dans l'étude de la formation de biofilm et les études précédentes ont permis de mettre en avant l'établissement de structures particulières en conditions dynamiques par rapport aux conditions statiques (Ksontini, Kachouri, et Hamdi, 2013 ; Rieu *et al.*, 2008).

Matériels Souches

Persicivirga mediterranea TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella* sp. TC10 contenant le plasmide pX5-GFP,

Shewanella sp. TC11 et *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 contenant le plasmide pX5-GFP.

Milieux et solutions

Milieu VNSS

Milieu ASW (eau de mer artificielle à 36g/L)

PBS 1X

Syto 61

Javel

Equipements et consommables

Pompe péristaltique Watson Marlow 205S

Falcon®

Spectrophotomètre

Micropipettes et cônes stériles

Incubateurs

Centrifugeuse

Erlenmeyer 1L

Filtre PTFE 0,2 μ m

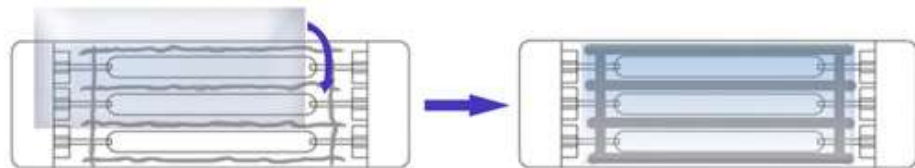
Petits consommables, raccords et tubes (**Note 1**)

Méthodes Collage des flow cells

- 1- Une seringue munie d'un cône coupé de 200 μ L à l'embouchure est remplie de colle comme ci-dessous :



- 2- La colle est déposée comme ci-dessous sur la flow cell, puis le coverslip est collé en appuyant doucement avec le doigt :

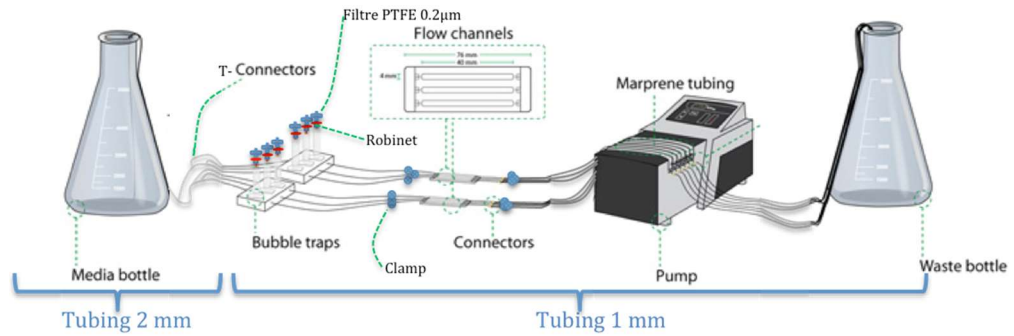


(**Note 2**)

- 3- Les flow cells sont laissées à sécher au moins 12h.

Montage du système de flow cell

- 1- Le système de flow cell est monté comme ci-dessous :



- 2- Une solution de 500 mL de Javel à 0,5% (v : v) est réalisée dans de l'eau distillée en erlenmeyer avec un tube de 2 mm de diamètre plongé dedans et dont une extrémité est en dehors de l'erlenmeyer.
- 3- Les flow cells sont connectées sur le système entre les clamps (**Note 3**).
- 4- Les connecteurs en T sont connectés au tuyau de l'Erlenmeyer de javel. La pompe est amorcée :
 - La pompe est mise en marche à vitesse maximale jusqu'à ce que des gouttes de javel arrivent dans les pièges à bulles.
 - La pompe est alors stoppée et les robinets sur les pièges à bulles sont ouverts jusqu'à ce que les pièges à bulles se remplissent (≈ 1 ; le chiffre 1 est indiqué sur le piège à bulles) (**Note 4**).
 - Les robinets au-dessus des pièges à bulles sont fermés, la pompe est relancée.
 - Quand le système est entièrement rempli, la pompe est mise à sa vitesse de croisière (2 rpm \rightarrow 4 mL/h) (**Note 5**)
- 5- Le système est laissé à tourner une nuit ou une journée (≈ 12 h).

Rinçage du système et inoculation du milieu

- 1- Le tuyau plongé dans la javel est tiré afin qu'une entrée d'air s'effectue. La vitesse de la pompe est accélérée afin que le système se vide.
- 2- Nos mains sont désinfectées à l'éthanol, les connecteurs en T sont déconnectés de l'Erlenmeyer de javel, et désinfectés en déposant quelques gouttes d'éthanol dessus et connectés aux tuyaux d'un Erlenmeyer contenant de l'eau distillée stérile (**Note 6**).
- 3- La pompe est amorcée avec de l'eau stérile et le système est mis en vitesse de croisière durant au moins 4h ou une nuit (**Note 7**).
- 4- Faire de même avec l'Erlenmeyer contenant le milieu de formation du biofilm (ASW). Le système doit tourner durant au moins 2h avec le milieu de formation du biofilm avant l'inoculation des bactéries.

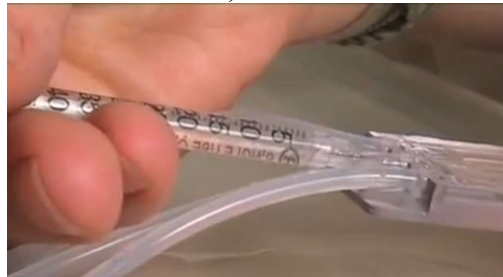
Culture des souches bactériennes

- 1- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique (**Note 8**).
- 2- Les cultures sont transférées dans un Falcon® 50 mL et centrifugées à 6000 rpm durant 10 min, puis repris dans 10 mL d'ASW.

- 3- Des suspensions dans de l'ASW sont réalisées afin d'obtenir une DO_{600nm} de 0,3 pour chacune des souches bactériennes.

Inoculation des bactéries

- 1- La pompe est stoppée et les tuyaux sont clampés en amont des flow cells. Les cassettes entraînant le flux dans les tubes en marpène sont déconnectées afin que le flux puisse s'écouler (**Note 9**).
- 2- Les bactéries préparées sont prélevées avec une seringue de 1 mL. Les bulles d'air de la seringue sont évacuées.
- 3- Le tuyau en amont de la flow cell est désinfecté avec un peu d'éthanol au niveau du point d'inoculation. Le tuyau est piqué dans l'axe de celui-ci et les bactéries sont inoculées doucement ($\approx 300 \mu\text{L}$ par canal) sans faire rentrer d'air, comme ci-dessous :



- 4- La flow cell est clampée en aval.
- 5- Le tuyau est désinfecté au niveau de l'orifice d'inoculation des bactéries avec de l'éthanol et le trou est rebouché à la colle comme ci-dessous :



- 6- Les cassettes sont réinsérées sur la pompe et les bactéries sont laissées à incuber durant 3h pour permettre l'adhésion à 20°C .
- 7- Après 3h, le tuyau est déclampé en amont et en aval de la flow cell et le flux est relancé en vitesse de croisière durant 0h, 24h et 48h.

Marquage des bactéries

- 1- **Méthode 1 ; Pour les bactéries marquées à la GFP :** A chaque temps d'incubation : les bactéries sont imagées en déposant les flow cells directement sur le microscope confocal.
- 1- **Méthode 2 ; Pour les bactéries à marquer :** Une solution de Syto 61 diluée au 1/1000 est préparée. La solution est inoculée comme précédemment avec les bactéries dans les flow cells ($\approx 300\mu\text{L}/\text{canal}$).

- 2- Après 20 min d'incubation, Les cellules sont rincées en déclampant les flow cells et en allumant la pompe à sa vitesse de croisière durant 20 – 30 min.
- 3- Les biofilms sont imagés en déposant directement les flow cells sur le microscope confocale.

Désinfection et Nettoyage

- 1- Pour tuer les bactéries, le système est mis à tourner avec une solution de javel à 0,5% (v : v).
- 2- Si le système n'est pas directement réutilisé, celui –ci est rincé à l'eau distillée.
- 3- Lors d'un long arrêt du système, celui-ci doit être vidé complètement.
- 4- Afin de faciliter le décollement des coverslips des flow cells, celles-ci sont plongées dans l'éthanol 100%, au moins durant une nuit.

Notes

Note 1 :

Matériel	Référence	Fournisseur
Flow cell pour microscope inversé	1A	Univ. Copenhague
Piège à bulles		Univ. Copenhague
Lamelle Menzel-Gläser	MENZBB024050A033	VWR
Cole parmer polypropylene straight	12459570	Fisher
Cole parmer Raccord T 1/8'	11769709	Fisher
Cole parmer pp droit 3,2mm	11725169	Fisher
Cole parmer raccord T 1/16'	12606187	Fisher
Cole parmer pharmed BPT 2 stop pump tubing	11735748	Fisher
Cole parmer silastic laboratory tubing	11759989	Fisher
Bel art SP Acience Ware Mini tubing clamp	11744615	Fisher
Cole parmer stopcocks with luer conections	11772645	Fisher
Seringue	8050025	Sigma
Seringue	8040040	Sigma
Cole parmer autoclavable PP straight	12418700	Fisher
Cole parmer silastic laboratory tubing	11789699	Fisher
Aiguille hypodermique stérile	8002613	Grosseron
Cole 3M Clear gasket sealant		Ignite procurement

Note 2 : Il ne doit pas y avoir de passage d'air ni entre les canaux ni vers l'extérieur. Il ne doit pas y avoir non plus de colle dans les canaux.

Note 3 : Si les tuyaux ont déjà été préalablement percés, les tuyaux sont coupés 1 cm en amont du point d'inoculation.

Note 4 : Si les filtres en PTFE ont reçu du liquide, il faut les changer sinon le système ne fonctionnera plus.

Note 5 : Les bulles d'air dans la flow cell sont enlevées en tapant dessus avec le doigt ou en pinçant le tuyau en amont. Si les bulles sont trop importantes, le système est vidé et les étapes précédentes sont reprises une à une.

Note 6 : Les milieux sont stérilisés à l'autoclave dans un Erlenmeyer fermé à l'aide de papier aluminium et avec un tuyau dont une des extrémités, qui est

fermée au papier aluminium, sort de l'Erlenmeyer tandis que l'autre est plongée dans le milieu.

Note 7 : A partir de cette étape, le système doit être sous température régulée. Il doit être placé dans un incubateur afin d'éviter la formation de bulles d'air.

Note 8 : Les bactéries doivent arriver en même temps en phase post exponentiel au moment où le système est prêt à être inoculé.

Note 9 : L'Erlenmeyer contenant les déchets est mis à la même hauteur que le reste du système afin d'éviter l'entrée de bulles d'air durant l'injection.

Résultats

attendus

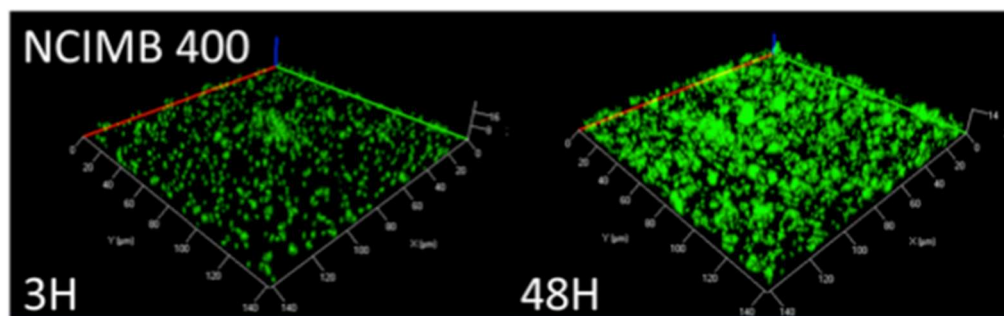


Figure 63 : Images représentative de la formation de biofilm par *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 en flow cell avec un flux de 3 mL/h en eau de mer artificielle après 3h et 48h d'incubation.

Fiche technique n° 8 : Préparation des échantillons amibes/bactéries pour microscopie électronique à transmission

Introduction

Les protozoaires tels que les amibes libres sont des membres importants de la communauté microbienne dans tous les environnements. Ils vivent en collaboration étroite avec les bactéries dans la plupart des écosystèmes (Matz *et al.*, 2008) et leur prédation est considérée comme une cause majeure de mortalité bactérienne (Sherr et Sherr, 2002). L'association étroite des bactéries et des protozoaires dans les biofilms et leur longue histoire co-évolutive a donné lieu à une série d'adaptation bactérienne assurant leur survie et leur coexistence (Matz *et al.*, 2005 ; Matz *et al.*, 2008). Dans l'environnement marin, les protozoaires peuvent avoir un impact majeur sur la sélection des bactéries dans les écosystèmes de biofilm ou dans l'aquaculture. Cependant jusqu'à présent, la plupart des interactions décrites portent sur des modèles pathogènes et très peu d'études se sont intéressées aux interactions entre amibes et bactéries dans le domaine marin.

Dans l'étude des interactions entre amibes et bactéries, la microscopie électronique à transmission reste un des outils essentiels pour donner des informations aux niveaux cellulaires ou des organelles. Celui-ci permet d'atteindre une résolution de 0,5 nm contrairement à la microscopie optique qui a une résolution de 200 nm. Cependant, l'utilisation de la microscopie électronique implique que les organismes doivent être fixés, déshydratés (la plupart du temps) préservés dans une résine et marqués tout en limitant les altérations cellulaires que ces manipulations peuvent engendrées (Eid et Parent, 2017).

Matériels Souches

Acanthamoeba castellanii, *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 et *Shewanella* sp. TC11.

Milieux et solutions

Milieu PYG

Milieu VNSS

Milieu NSS

Solution tampon phosphate de Sorenson à 0,1 M

Glutaraldehyde pour microscopie électronique

Tetraoxyde d'osmium (OsO₄)

Ethanol
 Acétone
 Azote liquide
 Uranyl Acetate (8% saturé dans eau)
 Citrate de plomb

Résine d'enrobage

- 1- Dans un petit pot en verre ajouter
 26 g de LX112 (Ladd)
 12,5 g de DDSA (EMS)
 10 g de NMA (EMS)
- 2- Le mélange est agité à l'aide d'un bâton de verre, puis il est mis sur une plaque agitant avec un bâton aimanté durant 3 minutes afin de l'homogénéiser
- 3- Le durcisseur est ajouté : 0,73 g de DMP 30 (Ted Pella). Le mélange est agité au bâton puis sur la plaque agitante durant 30 à 45 min (**Note 1**).

Equipements et consommables

Microplaques 24 puits (marque Falcon® ou Corning)
 Falcon®
 Coverslips
 Papier Benchkote™
 Pipette pasteur
 Grattoirs souples (Costar®)
 Capsule d'enrobage Beem®, taille 00
 Pince à dissection
 Papier filtre en fibre de verre wathman GF/F sans matière carboné
 Spectrophotomètre
 Micropipettes et cônes stériles
 Incubateurs
 Centrifugeuse
 Papier Benchkote™

Méthodes Coculture : Interaction amibes/bactéries

- 1- Des cultures de 30 mL d'amibes cultivées en flasques en PYG arrivées à congruence sont grattées à l'aide d'un grattoir souple et centrifugées durant 15 min à 2500 rpm.
- 2- Le culot est repris dans 20 mL de NSS et la suspension est ajustée à $5 \cdot 10^5$ cellules/mL par comptage à la cellule de Malassez.
- 3- La suspension est inoculée dans des plaques 24 puits contenant ou non un coverslip préalablement stérilisé par exposition aux UVs durant 20 min, 1 mL de la suspension est ajouté dans chacun des puits et incubé à 20°C durant une nuit (**Note 2**).
- 4- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en

- verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique (**Note 3**).
- 5- Les cultures sont transférées dans un Falcon® 50 mL et centrifugées à 6000 rpm durant 10 min, puis repris dans 10 mL de NSS.
 - 6- Des suspensions dans du NSS sont réalisées afin d'obtenir une MOI de 100 pour chacune des souches bactériennes (La MOI 100 correspond ici à une DO_{600nm} de 0,05).
 - 7- Les plaques contenant les amibes sont rincées : elles sont renversées afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rerepli avec 1 mL de NSS. Puis trois rinçages successifs sont effectués (**Note 4**).
 - 8- Les suspensions sont inoculées dans les plaques 24 puits contenant les amibes (1mL/puit). Une centrifugation des plaques est effectuée durant 5min à 900g (grâce à un rotor à microplaques).
 - 9- Après 3h, les plaques sont rincées par renversement afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rerepli avec 1 mL de NSS. Puis trois rinçages successifs sont effectués, afin d'éliminer les bactéries extracellulaires non phagocytées (**Note 4**).
 - 10- Les plaques sont incubées durant 0h, 24h ou 48h à 20°C en conditions statiques.
 - 11- A chaque temps d'incubation, les plaques sont rincées avec du tampon Sorenson par renversement afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rerepli avec 1 mL de tampon de Sorenson. Puis, trois rinçages successifs sont effectués (**Note 4**).
 - 12- La fixation des cellules est réalisée par ajout de 500 µL par puit d'une solution de glutaraldéhyde à 3,5% dans du tampon de Sorenson durant 45 min à 4°C.
 - 13- Trois rinçages successifs au tampon de Sorenson sont effectués puis les plaques sont conservées à 4°C (**Note 4 et 5**).

Post fixation et incorporation en résine

- 1- Une post fixation est réalisée par ajout d'une solution de tétraoxyde d'Osmium à 1% durant 45 min à 4°C (500 µL/puits).
- 2- Laver trois fois par renversement au tampon de Sorenson (**Note 4**).
- 3- Une déshydratation des échantillons est réalisée dans des bains successifs d'éthanol de 30 min chacun (de 50% à 100% dans l'eau, de 10% en 10%).
- 4- Deux bains d'éthanol 100% supplémentaires sont effectués.

Méthode 1 : (dans les plaques ne contenant pas de coverslips)

- Refaire de même avec des bains de résine dans l'éthanol (exemple : 50% résine / 50% éthanol) de 50% à 100% (**Note 5**).
- Un nouveau bain de résine est mis à agiter sous une lampe durant 4h ou à agiter à 4°C durant une nuit (le couvercle des microplaques ouvert).
- Les microplaques sont renversées sur un papier type Benchkote™.
- Les capsules Beem® sont remplies avec la résine jusqu'à la formation d'un dôme important au-dessus des capsules, comme ci-dessous :



(Note 5 et 6)

- Les capsules sont renversées rapidement au fond des puits afin que la résine polymérise et que les couches d'amibe contenues au fond des puits soient au niveau de l'ouverture de la capsule.
- Les capsules sont mises à polymériser à 60°C durant 72h.
- Les plaques sont ramenées à température ambiante et les capsules sont séparées d'un coup sec des microplaques.

Méthode 2 : (dans les plaques contenant des coverslips)

- Des bains d'acétone dans l'éthanol (exemple : 50% acétone / 50% éthanol) de 50% à 100% acétone de 10% en 10 % sont effectués (Note 5)
- Des bains de résine dans l'acétone (exemple : 50% résine / 50% acétone) de 50% à 100% résine de 10% en 10 % sont également effectués (Note 5).
- Un nouveau bain de résine est mis à agiter à 4°C durant une nuit (le couvercle des microplaques ouvert)
- Les microplaques sont renversées sur un papier type Benchkote™.
- Les capsules Beem® sont remplies avec de la résine jusqu'à la formation d'un dôme important au-dessus des capsules, comme ci-dessous :



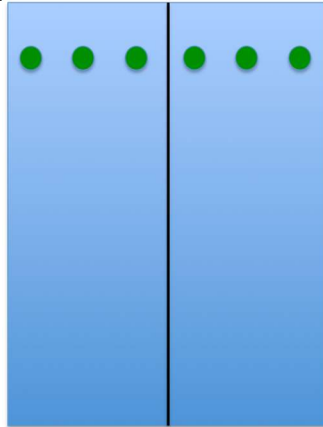
(Note 5 et 6)

- Les coverslips sont extraits à l'aide d'une pince à dissection et d'un cure-dent et sont déposés sur les dômes formés par la résine dans les capsules (le côté cellules contre le dôme).
- Les capsules sont mises à polymériser à 60°C durant 72h.
- Pour détacher les coverslips des capsules, les capsules sont jetées dans un bain d'azote liquide jusqu'à entendre un crac (environ 1 min).

Marquage (Note 6)

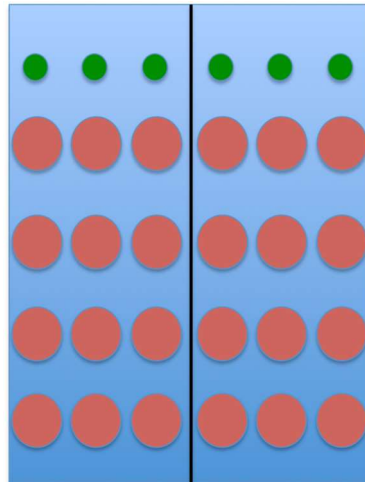
- 1- Les capsules sont découpées en tranches de 70 nm à l'aide d'un ultramicrotome et d'un couteau diamant.
- 2- Les tranches sont déposées sur des grilles.

- 3- Des petites gouttes d'uranyl acétate sont déposées sur une feuille de parafilm comme ci dessous :



Les grilles sont déposées dessus à l'aide d'une pince durant 5 min (le coté résine contre la goutte) en prenant soin de ne pas les endommager.

- 4- Des grosses gouttes d'eau sont déposées sur une feuille de parafilm comme ci dessous :



- 5- Les grilles sont prélevées à l'aide de la pince égouttées sur la tranche sur du papier filtre et déposées sur les premières gouttes de rinçage, puis sur les secondes gouttes de rinçage durant 5 min. Les grilles sont prélevées, égouttées sur le papier filtre et remises sur les troisièmes gouttes de rinçage durant 5 min. La même chose est effectuée sur la quatrième goutte.
- 6- Des petites gouttes de citrate de plomb sont déposées sur du parafilm comme précédemment. Les grilles sont égouttées sur papier filtre et déposées 2 min sur les gouttes de citrate de plomb. Le rinçage par gouttes est effectué comme précédemment.

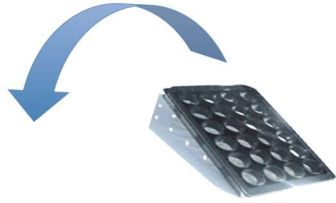
Notes

Note 1 : Normalement la résine peut être conservée en aliquot à -20°C (non testé ici) ou utilisée dans les 2h – 3h qui suivent. Les goulots des bouteilles doivent être nettoyés à l'acétone avant de refermer les bouteilles.

Note 2 : Les lampes UVs incorporées dans les PSMII suffisent pour permettre la stérilisation des plaques et des coverlips.

Note 3 : Toutes les souches bactériennes doivent arriver à la phase post exponentielle en même temps.

Note 4 : Le rinçage s'effectue par renversement des plaques : le geste doit être fait en un mouvement circulaire en une fois sans à-coups.



Note 5 : Des pipettes pasteur en plastique dont le bout a été coupé sont utilisées pour prélever la résine.

Note 6 : Le marquage doit se faire dans un laboratoire habilité à travailler avec des produits radioactifs.

Résultats attendus

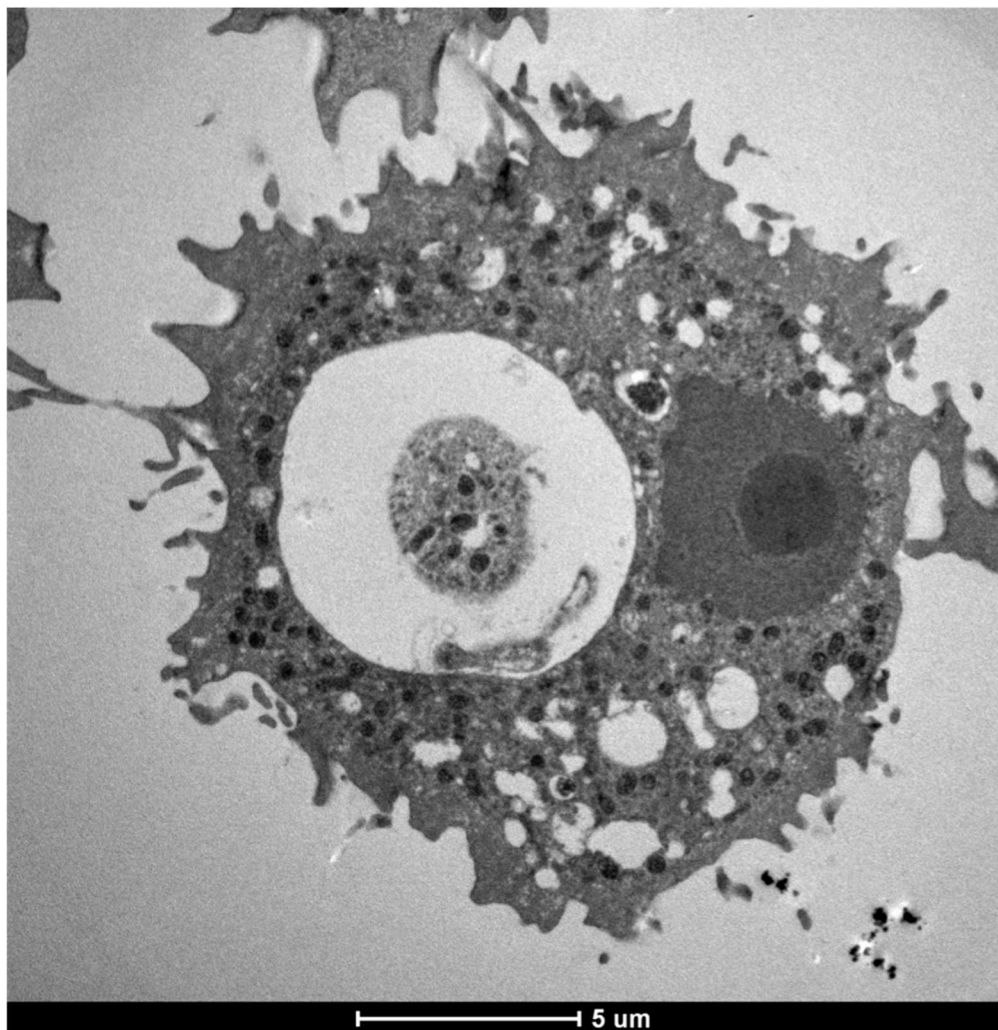


Figure 64 : *Acanthamoeba castellanii* observée en microscopie électronique à transmission.

L'image ci-dessus a été réalisée avec la méthode n°1.

Fiche technique n° 9 : Dénombrement des bactéries en interaction avec les amibes

Introduction

La première interaction entre amibes et bactéries qui a été reportée impliquait des bactéries pathogènes pour l'homme (Rowbotham, 1980). Depuis différentes routes potentielles d'adaptation bactérienne contre la prédation par les protozoaires ont été décrites (Matz et Kjelleberg, 2005). Les amibes sont pourtant considérées comme le principal prédateur des bactéries. Pour se nourrir, les amibes phagocytent donc les bactéries, puis les digèrent intracellulairement, ce qui aboutit à une baisse de la concentration bactérienne. Mais grâce à des mécanismes de résistance ingénieux, certaines bactéries arrivent à résister à la phagocytose ou à la digestion, voire dans certains cas à les utiliser comme support de multiplication et vecteur de propagation (Cateau *et al.*, 2011 ; Huws *et al.*, 2008 ; Matz et Kjelleberg, 2005).

Traditionnellement, la méthode la plus couramment utilisée pour l'analyse quantitative des cultures bactériennes pures ou en co-cultures repose sur le dépôt de dilution en série de l'échantillon bactérien à étudier sur des milieux de culture solides, suivie par l'incubation des milieux de culture en conditions optimales pour la croissance bactérienne et le dénombrement d'unité formant des colonies (CFU) (Sieuwerts *et al.*, 2008). Dans les années 2000, un grand nombre de méthodes alternatives à haut débit ont gagné en popularité (Liu, Li et Hu, 2004). Cependant, la plupart de ces méthodes mesurent différents paramètres. De plus, ces méthodes requièrent l'utilisation d'équipements spécifiques, de développement de protocole coûteux et sont souvent peu compatibles entre les différents échantillons. Cela explique que les CFUs soient toujours largement utilisées.

Matériels Souches

Acanthamoeba castelanii, *Persicivirga mediterranea* TC4, *Polaribacter* sp. TC5, *Shewanella* sp. TC10 contenant le plasmide pX5-GFP et *Shewanella* sp. TC11.

Milieux et solutions

Milieu PYG
Milieu VNSS
Milieu VNSS agar
Milieu NSS
Triton X100

Equipements et consommables

Microplaque 96 puits
 Falcon®
 Grattoirs souples (Costar®)
 Cellule de Malassez
 Spectrophotomètre
 Micropipettes monocanals et multicanals (12 canaux : P200 et P20)
 Cônes stériles
 Incubateurs
 Centrifugeuse

Méthodes Coculture : Interactions amibes/bactéries

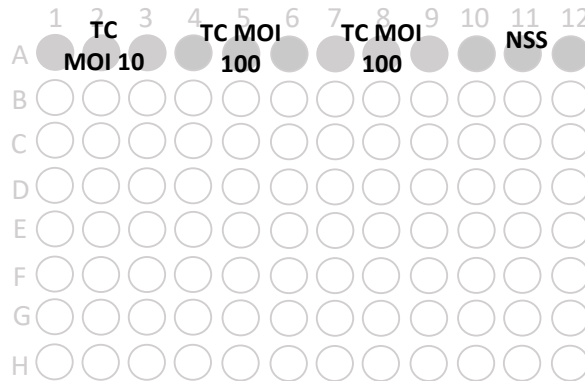
- 1- Des cultures de 30 mL d'amibes cultivées en flasque en PYG arrivées à congruence sont grattées à l'aide d'un grattoir souple et centrifugées durant 15 min à 2500 rpm.
- 2- Le culot est repris dans 20 mL de NSS et la suspension est ajustée à 5.10^5 cellules/mL par comptage à la cellule de Malassez.
- 3- La suspension est inoculée dans des plaques 96 puits, et 200 μ L de la suspension sont ajoutés dans chacun des puits (soit 1.10^5 cellules), suivant le plan (une plaque par souche bactérienne) :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Amibes	Amibes		Amibes						Amibes		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Les plaques sont incubées à 20°C durant une nuit.

- 4- Des cultures de 10 mL des souches bactériennes sont réalisées dans du milieu riche VNSS jusqu'à la phase post-exponentielle en flacon en verre de 60 mL à 20°C, 120 rpm à partir d'une préculture planctonique (**Note 1**).
- 5- Les cultures sont transférées dans un Falcon® 50 mL et centrifugées à 6000 rpm durant 10 min, puis repris dans 10 mL de NSS.
- 6- Des suspensions dans du NSS sont réalisées afin d'obtenir une MOI de 10 et 100 pour chacune des souches bactériennes (Dans ce cas, une MOI de 10 correspond à une DO_{600nm} de 0,005 et une MOI de 100 correspond à une DO_{600nm} de 0,05).
- 7- Les plaques contenant les amibes sont rincées : elles sont renversées d'un coup sec afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rempli avec 200 μ L de NSS avec la micropipette multicanale. Puis, trois rinçages successifs sont effectués.

- 8- Les suspensions bactériennes ou de NSS sont inoculées dans les plaques 96 puits contenant les amibes (200 μ L/puit) suivant le plan (1 plaque par souche bactérienne) (TC : bactéries de la collection de Toulon):



Une centrifugation des plaques est effectuée durant 5min à 900g (grâce à un rotor à microplaques) (**Note 2**).

- 9- Après 3h, les plaques contenant les amibes sont rincées : elles sont renversées d'un coup sec afin de les vider de leur contenu et chacun des puits est rempli avec 200 μ L de NSS avec la micropipette multicanale. Puis trois rinçages successifs sont effectués.
- 10- Les plaques sont incubées durant 0h, 24h ou 48h à 20°C en conditions statiques.
- 11- A chaque temps d'incubation : le surnageant des plaques est transféré dans une nouvelle plaque sur la ligne A en gardant la même organisation (Il s'agit de la « plaque surnageants »). Les puits des plaques contenant les amibes adhérentes et/ou les bactéries sont remplis avec 200 μ L de NSS (**Note 3**).
- 12- Tous les autres puits de la « plaque surnageant » (de la ligne B à H) sont remplis à la pipette multicanale avec 180 μ L de NSS.

Libération des bactéries phagocytées

- 1- **Sur les plaques contenant les amibes adhérentes uniquement** : Les puits contenant les amibes sont vidés à la micropipette puis une solution de Triton X100 à 0,05% dans du NSS est ajoutée (100 μ L/puits) durant 15 min sur glace, permettant une lyse chimique.
- 2- Des aller-retours à la micropipette multicanal en grattant au fond des puits permettent également une lyse mécanique des amibes et de libérer les bactéries (15 aller-retours).
- 3- Un prélèvement de 20 μ L est ajouté dans la ligne A d'une nouvelle plaque, qui a été préparée (il s'agit de la « plaque lysats ») pour les dilutions en série par ajout de 180 μ L de NSS à la pipette multicanale dans chaque puits des lignes B à H.

Dilution et croissance des CFUs

- 1- Un prélèvement de 20 μ L des échantillons de la « plaque surnageants » de la ligne A (dilution 10^0) est ajouté à la ligne B (dilution 10^{-1}).

- 2- La ligne B est homogénéisée par des aller-retours à la micropipette multicanal (P200) et 20 μL des lignes B des microplaques sont transférés à la micropipette et ajoutés à la ligne C (dilution à 10^{-2}).
- 3- La même chose est réalisée jusqu'à la ligne H (soit une dilution à 10^{-7}).
- 4- Chaque ligne est homogénéisée à la pipette multicanal (P200) avant de prélever 5 μL des suspensions issues des puits à la pipette multicanal (P20) et de déposer celle-ci sur boîte de VNSS agar, par exemple comme ci-dessous :

	TC MOI 10	TC MOI 100	TC MOI 100	NSS
A	10^0		10^0	
B	10^{-1}		10^{-1}	
C	10^{-2}		10^{-2}	
D	10^{-3}		10^{-3}	
E	10^{-4}		10^{-4}	
F	10^{-5}		10^{-5}	
G	10^{-6}		10^{-6}	
H	10^{-7}		10^{-7}	

- 5- Les boîtes sont incubées durant 72h à 20°C en statique avant énumération des colonies formées. La même procédure est effectuée pour la « plaque lysats ».

Notes

Note 1 : Toutes les souches bactériennes doivent arriver à la phase post exponentielle en même temps.

Note 2 : Les puits TC MOI 10 avec amibes correspondent aux bactéries en interaction avec les amibes à MOI 10. Les puits TC MOI 100 avec amibes correspondent aux bactéries en interaction avec les amibes à MOI 100. Les puits TC MOI 100 correspondent aux témoins bactéries seules. Les puits NSS avec amibes correspondent aux témoins amibes seules.

Note 3 : Les amibes ne doivent jamais être laissées à sec.

Résultats attendus

Les dépôts sur les boîtes VNSS agar doivent pousser après 72h comme l'exemple ci dessous :

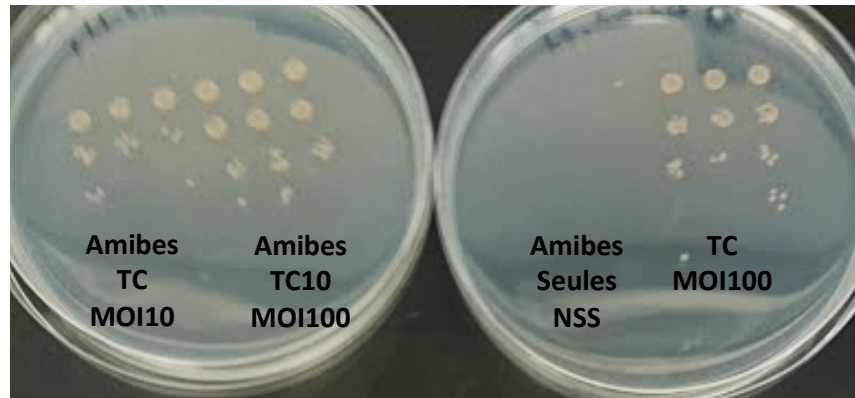


Figure 65 : Photographie de la croissance des CFUs de la souche *Shewanella* sp. TC11 sur boîtes VNSS.

Le comptage des CFUs est effectué et les résultats sont ramenés aux différentes concentrations présentes dans les échantillons, les graphiques ci-dessous permettent d'évaluer les différentes concentrations.

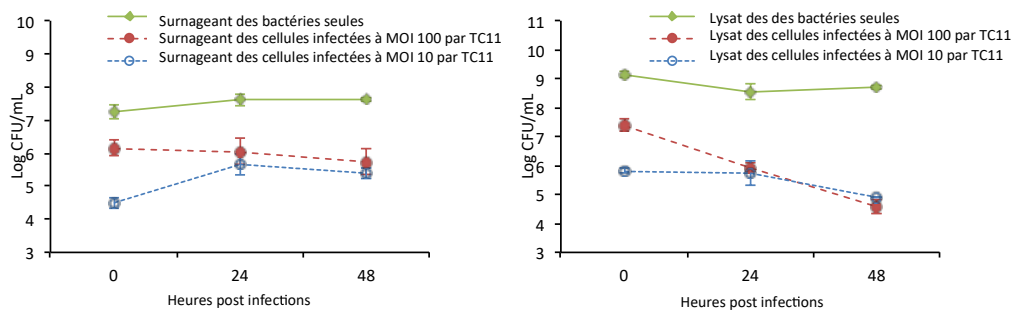


Figure 66 : Cinétique de la concentration bactérienne durant un processus d'infection d'*Acanthamoeba castellanii* par *Shewanella* sp. TC11 dans le surnageant (A) et dans le lysat des cellules (B). Les lignes pleines vertes représentent la condition témoin, les lignes hachurées rouges représentent une infection à MOI 100 tandis que les lignes hachurées bleues représentent une infection à MOI 10.

Après réalisation des courbes, le surnageant et le lysat des bactéries seules ne présentent pas d'évolution au cours du temps, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'évolution de la concentration bactérienne en conditions témoins. Le surnageant des cellules infectées à MOI 10 et à MOI 100 par TC11 ne semble pas présenter de variation tandis que celui du lysat diminue au cours du temps ce qui indique une digestion des cellules.

Fiche technique n°10 : Traitement des images de fluorescence de biofilms par des méthodes algorithmiques

Introduction

Les biofilms sont des communautés microbiennes sessiles qui se développent sur des surfaces et qui sont fréquemment enchâssés dans une matrice de substances polymériques extracellulaires. Ils sont caractérisés par une forte densité et par une organisation structurale (Stoodley *et al.*, 1999). Ils sont capables de s'adapter aux changements environnementaux et augmentent leurs résistances aux antibiotiques en modifiant l'expression de leurs gènes pouvant se traduire par une modification de leur physiologie générale (Davies, 2003 ; Flemming et Wingender, 2010 ; O'Toole et Kolter, 1998). Une des voies par lesquelles ils s'adaptent à ces changements est la modification de leur organisation structurale en biofilm (Nielsen *et al.*, 2000). Afin d'étudier l'organisation structurale de ces biofilms, un des instruments clefs le plus souvent utilisé encore aujourd'hui est la microscopie couplée à la fluorescence. Cependant, un traitement des images obtenus est nécessaire afin d'obtenir des données quantitatives.

Les méthodes algorithmiques permettent un calcul rapide par informatique de façon plus ou moins automatisée de différents paramètres issus des images de microscopie. Différentes méthodes d'étude des biofilms par microscopie à épifluorescence existent. Cependant, ces méthodes reposent souvent sur l'utilisation de logiciels relativement lourds (ImageJ) et leur mise en fonction est coûteuse en temps (analyse image par image et établissement des paramètres à chaque image). L'analyse des images tridimensionnelles permet en outre la mesure de différents paramètres mais il s'agit également souvent de méthodes plus automatisées et donc plus rapides. Les paramètres sélectionnés peuvent permettre de caractériser un biofilm suivant son pourcentage de recouvrement, son biovolume, son épaisseur moyenne, son épaisseur maximale...

Méthodes I – Analyse des biofilms imagés par microscopie à épifluorescence

Préambule

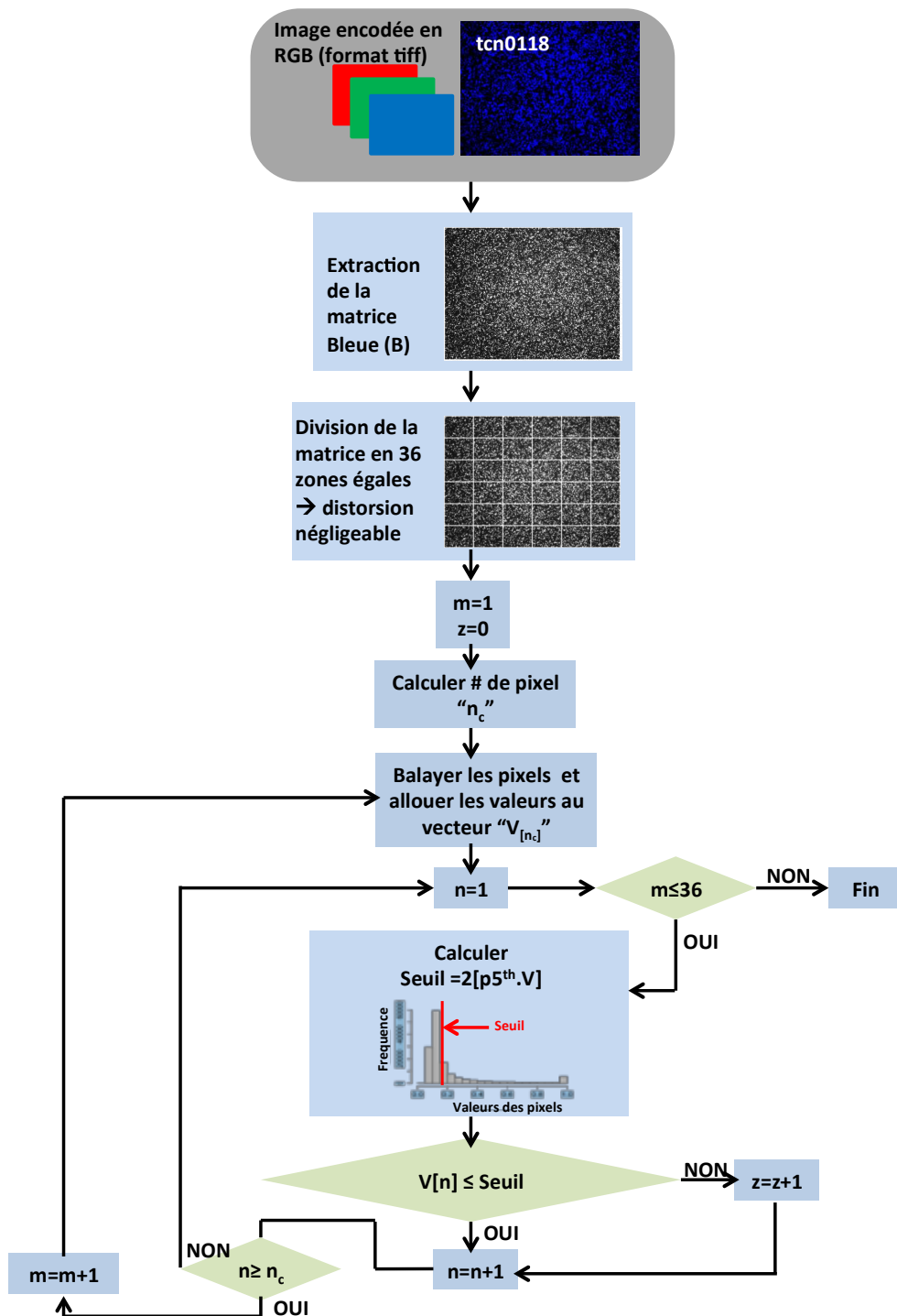


Figure 67 : Diagramme de flux représentant le calcul du pourcentage de recouvrement des images 2D issues de la microscopie à épifluorescence.

- 1- A partir d'une image de biofilm issue de microscopie à épifluorescence, la matrice bleue de l'image codée en RGB est extraite.

- 2- Celle-ci est divisée en 36 zones égales afin de rendre négligeable la distorsion inhérente à l'utilisation de la microscopie optique. La distorsion mesurée de notre microscope est visualisable ci-dessous :



- 3- Le seuil au-dessus duquel un pixel est compté comme fluorescent est calculé comme le double de la valeur du percentile 5 de la zone analysée.
- 4- Le nombre de pixels fluorescents est ramené au nombre de pixels totaux de l'image afin d'obtenir un pourcentage de recouvrement.

Code et mise en application

- 1- Le logiciel Rcran est téléchargé et les library « pixmap » et « rtiff » ajoutées.
- 2- Le « working directory » est défini (lieu de stockage des fichiers sources).
- 3- Le code ci-dessous est collé :

```
#Définir le "Working directory"
#package nécessaire (à charger)
library(pixmap)
library(rtiff)
#Définir le nom du fichier
b<-'NAME'
#ouverture du fichier tiff dans le script R
tiff<-readTiff(b)
#Variable (ne pas toucher)
x<-1 # abscisse de chaque pixel
y<-1 # ordonné de chaque pixel
z<-0 # nombre de pixels au-dessus du seuil
#carré [1,1]
y1<-1
```



```

y2<-324
Y<-324
x1<-1
x2<-432
X<-432
while (x2<=2592)
{
  while (y2<=1944)
  {
while
(x<=x2) # tant que l'abscisse de chaque pixel est inférieure à la borne externe
#du carré An (Note 2)

#calcul du seuil : peut se modifier en fonction des échantillons #(modification
du facteur multiplicatif, ici 2) (Note 1)
{ seuil<-(quantile(tiff@blue[y1:y2,x1:x2], c(.05))*2)

  while
(y<=y2) # tant que l'ordonné de chaque pixel est inférieure à la borne #externe
du carré An
{
  if (tiff@blue[y,x] >=seuil) # Si la donnée d'une cellule unique est #supérieure
au seuil
    {z<-z+1} #alors le nombre de pixels au-dessus du seuil augmente de 1
    y<-y+1 #l'ordonné augmente de 1 (soit on passe à la cellule d'en dessous)
  }
x<-x+1 # l'abscisse augmente de 1 (soit on passe à la cellule de droite)
y<-y1 #l'ordonné retourne à 1 (soit la première cellule de la colonne)
#Renvoie le nombre de pixels au-dessus du seuil
y1<-y1+Y
y2<-y2+Y
}
x<-x1

```

```
y<-y1
}
x1<-x1+X
x2<-x2+X
y<-y1+Y
}
#calcul le pourcentage du nombre de pixels au-dessus du seuil
Pourcent<-z*100/5038848 #5038848=nombre de pixel de l'image
Pourcent
```

- 4- Le nom du fichier '**NAME**' est modifié en fonction du fichier à analyser (**Note 3**).
- 5- Le logiciel est lancé « Run » et il doit retourner le pourcentage de recouvrement de l'image.

II – Analyse des biofilms imagés en 3D par microscopie confocale

Préambule

Les paramètres issus des biofilms ont été calculés par l'utilisation de l'algorithme COMSTAT utilisé sur MATLAB® (Heydorn, Nielsen, et al., 2000).

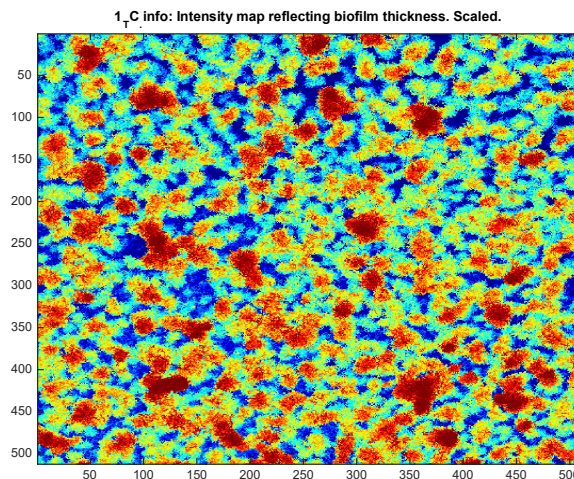
Mise en application

- 1- Les fichiers images de microscopie confocale doivent être enregistrés en « .tif » dans un même dossier et nommés « 1_nom_ ». Chaque tranche de l'image 3D doit être numéroté par ordre d'apparition : « 1_nom_13 » (ici tranche n°13) (**Note 4**).
- 2- Chaque dossier d'image doit contenir un fichier .info contenant les infos comme ci-dessous :
Range
#2#
#13#
Pixelsize (x)
0.28
Pixelsize (y)
0.28
Pixelsize (z)

0.32

Le « range » signifie que les images entre les tranches 2 et 13 seront utilisées pour l'analyse. Les « Pixelsize » définissent la taille des pixels en x, en y et en z.

- 3- Les cinq programmes du package COMSTAT doivent être enregistrés sur l'ordinateur (COMSTAT, CHECKALL, LOOK, LOOKTIF and CONVERT000). Ces fichiers sont appelés dans MATLAB® à l'aide du « set path » et sauvés (**Note 5**).
- 4- Le dossier contenant les images est ouvert dans le « current folder » de MATLAB.
- 5- Le calcul est réalisé en tapant « comstat » dans la « command windows ».
- 6- Au lancement de l'algorithme, répondez aux questions suivantes :
 - Enter the number of the first image stack that you want to analyze (1-1) > 1
 - Enter the number of the last image stack that you want to analyze (1-1) > 1
 - Setting of threshold values: The threshold value for each image stack must be known
From image stack number 1 to image stack number > 1
 - Enter threshold value > 5
 - Do you want to save the report files (and filtered images) in the current directory (y/n) > y
- 7- L'algorithme renvoie une image en dégradé de rouge et bleu ou les zones bleues doivent correspondre à des zones vides de bactéries et les zones rouges doivent correspondre à des zones pleines de bactéries comme ci-dessous :



- 8- L'algorithme enregistre les données en fichier texte dans le dossier contenant les images analysées. Les paramètres mesurés sont : la biomasse ou le biovolume total (en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), les pourcentages de chaque tranche occupée par les bactéries, les pourcentages d'épaisseur du biofilm, l'épaisseur moyenne et l'épaisseur maximale.

Notes

Note 1 : Le seuil peut être modifié en fonction du fluorochrome utilisé ou de l'analyse réalisée ici DAPI durant la formation de biofilm par des bactéries marines.

Note 2 : Si la matrice d'acquisition n'est pas la bleue dans l'image RGB, celle-ci peut être modifiée en changeant les « tiff@blue » dans le code par :

« tiff@red » pour la matrice rouge

« tiff@green » pour la matrice verte.

Note 3 : Une automatisation du calcul des différentes images est possible par algorithmique si les noms des fichiers évoluent par numérotation dans un même dossier : Rcran peut alors incrémenter les noms de fichier et la valeur du pourcentage de recouvrement correspondante dans un fichier excel.

Note 4 : Le « nom » peut être défini au choix. Les fichiers natifs .tif peuvent être renommés avec le logiciel « Ant Renamer. »

Note 5 : Les fichiers sont enregistrés à un endroit où vous ne les effacerez pas pour ne pas avoir à refaire la manipulation 3 les fois suivantes.

Résultats

I – Analyse des biofilms imagés par microscopie à épifluorescence

attendus



Figure 68 : Image représentative de la formation de biofilm par *Shewanella frigidimarina* NCIMB400 après 48h en eau de mer artificielle marquée au DAPI (A), de l'extraction de la matrice bleue issue de l'image native (B) et des pixels calculés au-dessus du seuil par méthode algorithmique en blanc (C).

A partir de cette image, l'algorithme renvoie comme résultat un pourcentage de recouvrement de 59,74%

II – Analyse des biofilms imagés en 3D par microscopie confocale

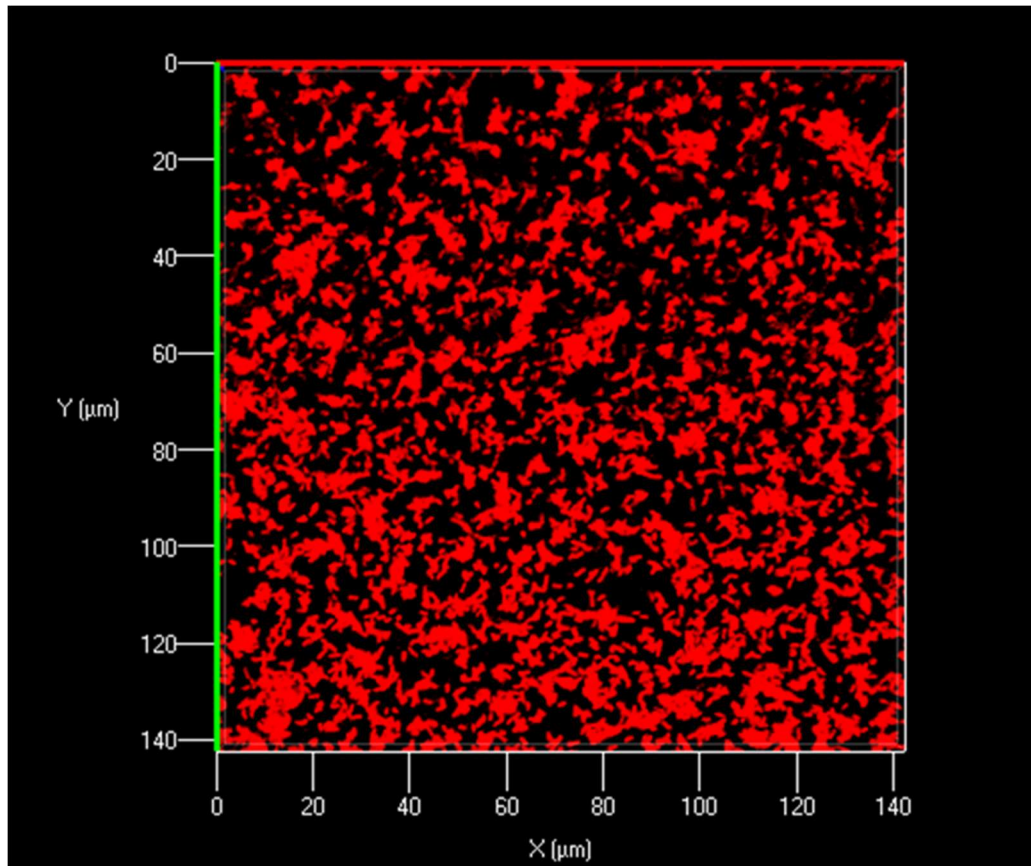


Figure 69 : Image représentative de la formation de biofilm par *Shewanella* sp. TC11 après 24h en NSS marqué au Syto 61.

Pour chaque image analysée, l'algorithme renvoie ces données :

GENERAL INFO

Infofilename 1_TC_.info
 Number of images/slices 20
 Threshold 5
 Pixelsize x,y (μm) 0.28
 Pixelsize z (μm) 0.32
 Voxelsize (μm³) 0.025088
 Filtration method Connected volume filtered

BIOMASS

Total biomass (μm³/μm²) 1.56629

AREA OCCUPIED BY CELLS

Portion of slice occupied by bacteria (%)	2.948	62.8323	61.4162
58.0772	54.5017	50.5508	44.2097
29.3915	22.9733	18.9644	13.6826
7.42874	5.24292	3.60603	2.58179
1.37367	1.00098		

THICKNESS

Thickness distribution (μm)	0	0.32	0.64	0.96	1.28	1.6	1.92
2.24	2.56	2.88	3.2	3.52	3.84	4.16	4.48
4.8	5.12	5.44	5.76	6.08			

Thickness distribution (spots measured) 63682 8302 10253 10594
12952 18835 22241 20439 18529 15301 15521 11344 9749 7145
5175 3387 2401 2066 1604 2624
Thickness distribution (% of total number of spots) 24.2928 3.16696
3.91121 4.04129 4.9408 7.18498 8.48427
7.79686 7.06825 5.83687 5.92079 4.32739
3.71895 2.7256 1.97411 1.29204 0.915909
0.788116 0.611877 1.00098
Average thickness (μm) 1.87307
MAXIMUM THICKNESS OF THE BIOFILM
Maximum thickness (μm) 6.08

Références Bibliographiques

- Abd, H., Saeed, A., Weintraub, A., Nair, G.B., and Sandström, G. (2007) *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 33–39.
- Adam, B., Baillie, G.S., and Douglas, L.J. (2002) Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* **51**: 344–349.
- Adams, M.B. and Nowak, B.F. (2001) Distribution and structure of lesions in the gills of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., affected with amoebic gill disease. *J. Fish Dis.* **24**: 535–542.
- Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G.B., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., et al. (2007) Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.* **56**: 684–689.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., et al. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**: 399–451.
- Alkawash, M.A., Soothill, J.S., and Schiller, N.L. (2006) Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **114**: 131–138.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., et al. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**: 1114–1128.
- An, D., Danhorn, T., Fuqua, C., and Parsek, M.R. (2006) Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 3828–3833.
- Anderson, G.G. and O’Toole, G.A. (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 85–105.
- Anderson, O.R. (2014) Living together in the plankton: a survey of marine protist symbioses. *Acta Protozool.* **2014**: 2938.
- Anderson, O.R. and Be, A.W.H. (1976) The ultrastructure of a planktonic foraminifer, *Globigerinoides sacculifer* (Brady), and its symbiotic dinoflagellates. *J. Foraminifer. Res.* **6**: 1–21.
- Angles M. L., Marshall K. C., Goodman A. E. « Plasmid transfer between marine bacteria in the aqueous phase and biofilms in reactor microcosms ». *Appl. Environ. Microbiol.* 3 janvier 1993. Vol. 59, n°3, p. 843-850.
- Antonova, E.S. and Hammer, B.K. (2011) Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **322**: 68–76.
- Armentano, I., Arciola, C.R., Fortunati, E., Ferrari, D., Mattioli, S., Amoroso, C.F., et al. (2014) The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: A Review. *Sci. World J.*
- Azemar, F., Faÿ, F., Réhel, K., and Linossier, I. (2015) Development of hybrid antifouling paints. *Prog. Org. Coat.* **87**: 10–19.
- Balzano, S., Corre, E., Decelle, J., Sierra, R., Wincker, P., Da Silva, C., et al. (2015) Transcriptome analyses to investigate symbiotic relationships between marine protists. *Front. Microbiol.* **6**:
- Bamford, C.V., d’ Mello, A., Nobbs, A.H., Dutton, L.C., Vickerman, M.M., and Jenkinson, H.F. (2009) *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect. Immun.* **77**: 3696–3704.
- Banks, M.K. and Bryers, J.D. (1992) Deposition of bacterial cells onto glass and biofilm surfaces. *Biofouling* **6**: 81–86.

- Barker, J. and Brown, M.R. (1994) Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol. Read. Engl.* **140** (Pt 6): 1253–1259.
- Barnes, A.M.T., Ballering, K.S., Leibman, R.S., Wells, C.L., and Dunny, G.M. (2012) *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *mBio* **3**: e00193–00112.
- La Barre, S.L. and Haras, D. (2007) Rencontres avec les bactéries marines. *J. Société Biol.* **201**: 281–289.
- De Bary, A. (1879) Die Erscheinung der symbiose. *Verl. Von Karl J Trubn. Strassbg.*
- Bella, C., Koehler, L., Grosser, K., Berendonk, T.U., Petroni, G., and Schrällhammer, M. (2016) Fitness impact of obligate intranuclear bacterial symbionts depends on host growth phase. *Front. Microbiol.* **7**:
- Bendaoud, M., Vinogradov, E., Balashova, N.V., Kadouri, D.E., Kachlany, S.C., and Kaplan, J.B. (2011) Broad-spectrum biofilm inhibition by *Kingella kingae* exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **193**: 3879–3886.
- Bergin, F., Kucuksezgin, F., Uluturhan, E., Barut, I.F., Meric, E., Avsar, N., and Nazik, A. (2006) The response of benthic foraminifera and ostracoda to heavy metal pollution in Gulf of Izmir (Eastern Aegean Sea). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **66**: 368–386.
- Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W., and Ashburn, R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 279–286.
- Berk, S.G., Faulkner, G., Garduño, E., Joy, M.C., Ortiz-Jimenez, M.A., and Garduño, R.A. (2008) Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. Does not require bacterial replication and depends on a Dot/Icm-mediated survival mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2187–2199.
- Bermingham, M.L. and Mulcahy, M.F. (2007) *Neoparamoeba* sp. and other protozoans on the gills of Atlantic salmon *Salmo salar* smolts in seawater. *Dis. Aquat. Organ.* **76**: 231–240.
- Berney, C., Romac, S., Mahé, F., Santini, S., Siano, R., and Bass, D. (2013) Vampires in the oceans: predatory cercozoan amoebae in marine habitats. *ISME J.* **7**: 2387–2399.
- Bernhard, J.M. and Browser, S.S. (1992) Bacterial biofilms as a trophic resource for certain benthic foraminifera. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **83**: 263–272.
- Bianchi, M. (1989) Unusual bloom of star-like prosthecate bacteria and filaments as a consequence of grazing pressure. *Microb. Ecol.* **17**: 137–141.
- Biard, T., Stemmann, L., Picheral, M., Mayot, N., Vandromme, P., Hauss, H., et al. (2016) In situ imaging reveals the biomass of giant protists in the global ocean. *Nature* **532**: 504–507.
- Bierne, H. and Cossart, P. (2012) When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. *Cell. Microbiol.* **14**: 622–633.
- Bierne, H. (2013) Nuclear microbiology—bacterial assault on the nucleolus. *EMBO Rep.* **14**: 663–664
- Biller, S.J., Schubotz, F., Roggensack, S.E., Thompson, A.W., Summons, R.E., and Chisholm, S.W. (2014) Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* **343**: 183–186.
- Bird, C., Darling, K.F., Russell, A.D., Davis, C.V., Fehrenbacher, J., Free, A., et al. (2017) Cyanobacterial endobionts within a major marine planktonic calcifier (*Globigerina bulloides*, Foraminifera) revealed by 16S rRNA metabarcoding. *Biogeosciences* **14**: 901–920.
- Blaber, S.J.M. (1970) The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *J. Molluscan Stud.* **39**: 231–233.

- Blom, J.F., Horňák, K., Simek, K., and Pernthaler, J. (2010) Aggregate formation in a freshwater bacterial strain induced by growth state and conspecific chemical cues. *Environ. Microbiol.* **12**: 2486–2495
- Bobrov, A.A., Andreev, A.A., Schirrmeister, L., and Siegert, C. (2004) Testate amoebae (Protozoa: Testacealobosea and Testaceafilosea) as bioindicators in the Late Quaternary deposits of the Bykovsky Peninsula, Laptev Sea, Russia. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **209**: 165–181.
- Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T.R., Wecke, J., Lawrence, J.R., and Szewzyk, U. (2006) Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**: 31–38.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.-H., and Héchard, Y. (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ. Microbiol.* **9**: 1341–1344
- Bowman, J.P. and Nowak, B. (2004) Salmonid gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease. *J. Fish Dis.* **27**: 483–492.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**: 20–26.
- Brandl, M.T., Rosenthal, B.M., Haxo, A.F., and Berk, S.G. (2005) Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1562–1569
- Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y., and Molmeret, M. (2014) Identification of bacterial strains isolated from the mediterranean sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microb. Ecol.* **68**: 94–110.
- Burgdorfer, W., Anacker, R.L., Bird, R.G., and Bertram, D.S. (1968) Intranuclear growth of *Rickettsia rickettsii*. *J. Bacteriol.* **96**: 1415–1418.
- Burgdorfer, W. and Brinton, L.P. (1970) Intranuclear Growth of *Rickettsia canada*, a member of the typhus group. *Infect. Immun.* **2**: 112–114.
- Burki, F. and Keeling, P.J. (2014) Rhizaria. *Curr. Biol.* **24**: R103–R107.
- Burmølle, M., Bahl, M.I., Jensen, L.B., Sørensen, S.J., and Hansen, L.H. (2008) Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains. *Microbiology* **154**: 187–195.
- Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., and Sørensen, S.J. (2014) Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* **22**: 84–91.
- Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., and Kjelleberg, S. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3916–3923.
- Burry R. W. « Controls for immunocytochemistry ». *J. Histochem. Cytochem.* janvier 2011. Vol. 59, n°1, p. 6-12.
- Busscher, H.J. and van der Mei, H.C. (2006) Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 127–141.
- Butler, H. and Rogerson, A. (1997) Consumption rates of six species of marine benthic Naked amoebae (*Gymnamoebia*) from sediments in the Clyde Sea area. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **77**: 989–997.
- Del Campo, J., Not, F., Forn, I., Sieracki, M.E., and Massana, R. (2013) Taming the smallest predators of the oceans. *ISME J.* **7**: 351–358.
- Camps, M., Briand, J.-F., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Bazire, A., and Blache, Y. (2011) Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived

- products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Mar. Pollut. Bull.* **62**: 1032–1040.
- Canette, A., Branchu, P., Grimaud, R., and Naïtali, M. (2015) Imaging bacterial cells and biofilms adhering to hydrophobic organic compound–water interfaces. In, *hydrocarbon and lipid microbiology protocols*, Springer Protocols Handbooks., pp. 71 – 83.
- Caron, D.A. (2016) Ocean science: The rise of Rhizaria. *Nature* **532**: 444–445.
- Caron, D.A., Goldman, J.C., and Dennett, M.R. (1988) Experimental demonstration of the roles of bacteria and bacterivorous protozoa in plankton nutrient cycles. *Hydrobiologia* **159**: 27–40
- Cateau E., Verdon J., Fernandez B., Hechard Y., Rodier M.-H. « *Acanthamoeba* sp. Promotes the survival and growth of *Acinetobacter baumannii* ». *FEMS Microbiol. Lett.* 1 juin 2011. Vol. 319, n°1, p. 19-25.
- Chavez-Dozal, A., Gorman, C., Erken, M., Steinberg, P.D., McDougald, D., and Nishiguchi, M.K. (2013) Predation response of *Vibrio fischeri* biofilms to bacterivorous protists. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 553–558.
- Chávez F. P., Mauriaca C., Jerez C. A. « Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria ». *BMC Res. Notes.* 26 mars 2009. Vol. 2, p. 50.
- Chen, M.-Y., Lee, D.-J., Yang, Z., Peng, X.F., and Lai, J.Y. (2006) Fluorescent staining for study of extracellular polymeric substances in membrane biofouling layers. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 6642–6646.
- Chen, J., de Felipe, K.S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G., and Shuman, H.A. (2004) Legionella effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**: 1358–1361
- Christensen, B.B., Haagensen, J.A.J., Heydorn, A., and Molin, S. (2002) Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2495–2502.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Eberl, L., Møller, S., Givskov, M., and Molin, S. (1998) Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2247–2255.
- Christopher, A.B., Arndt, A., Cugini, C., and Davey, M.E. (2010) A streptococcal effector protein that inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm development. *Microbiol. Read. Engl.* **156**: 3469–3477.
- Chung, H.C., Lee, O.O., Huang, Y.-L., Mok, S.Y., Kolter, R., and Qian, P.-Y. (2010) Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. *ISME J.* **4**: 817–828.
- Chun, S.-K. (1979) Amoeba infection in oyster (*Crassostrea gigas*). *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **12**: 281–285.
- Clark, A. and Nowak, B.F. (1999) Field investigations of amoebic gill disease in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Tasmania. *J. Fish Dis.* **22**: 433–443.
- Clarke, M., Lohan, A.J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., et al. (2013) Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.* **14**: R11
- Conlon, B.P. (2014) *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: Evidence of a role for persister cells: An investigation of persister cells, their formation and their role in *S. aureus* disease. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **36**: 991–996.
- Coons A., Creech H., Jones R. « The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody ». *J. Immunol.* 1 novembre 1942. Vol. 45, n°3, p. 159-170.
- Corno, G. and Jürgens, K. (2006) Direct and Indirect Effects of Protist Predation on

- Population Size Structure of a Bacterial Strain with High Phenotypic Plasticity. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 78–86
- Cosson, P. and Soldati, T. (2008) Eat, kill or die: when amoeba meets bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 271–276.
- Costerton, J.W. and Stewart, P.S. (2001) Battling Biofilms. *Sci. Am.* **285**: 74–81.
- Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H., and Tainer, J.A. (2006) Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions. *Mol. Cell* **23**: 651–662.
- Cram, J.A., Parada, A.E., and Fuhrman, J.A. (2016) Dilution reveals how viral lysis and grazing shape microbial communities. *Limnol. Oceanogr.* **61**: 889–905.
- Crosbie, P.B.B., Macleod, C., Forbes, S., and Nowak, B.F. (2005) Distribution of *Neoparamoeba* sp. in sediments around marine finfish farming sites in Tasmania. *Dis. Aquat. Organ.* **67**: 61–66.
- Croucher N. J., Harris S. R., Fraser C., Quail M. A., Burton J., Van der Linden M., McGee L., Von Gottberg A., Song J. H., Ko K. S., Pichon B., Baker S., Parry C. M., Lambertsen L. M., Shahinas D., Pillai D. R., Mitchell T. J., Dougan G., Tomasz A., Klugman K. P., Parkhill J., Hanage W. P., Bentley S. D. « Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions ». *Science*. 28 janvier 2011. Vol. 331,n°6016, p. 430-434.
- Crusz, S.A., Popat, R., Rybtke, M.T., Cámara, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., et al. (2012) Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology. *Biofouling* **28**: 835–842.
- Cruz-Perera, D.L., I, C., Ren, D., Blanchet, M., Dendooven, L., Marsch, R., et al. (2013) The ability of soil bacteria to receive the conjugative IncP1 plasmid, pKJK10, is different in a mixed community compared to single strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **338**: 95–100.
- Czajkowski, R. and Jafra, S. (2009) Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochim. Pol.* **56**: 1–16.
- Dang, H. and Lovell, C.R. (2000) Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 467–475.
- Dang, H. and Lovell, C.R. (2002) Numerical dominance and phylotype diversity of marine *Rhodobacter* species during early colonization of submerged surfaces in coastal marine waters as determined by 16S Ribosomal DNA sequence analysis and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 496–504.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., and O’Toole, G.A. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**: 1027–1036.
- Davies, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**: 114–122.
- Davison J. « Genetic exchange between bacteria in the environment ». *Plasmid*. septembre 1999. Vol. 42, n°2, p. 73-91.
- Van Delden, C. and Iglewski, B.H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**: 551–560.
- Denoncourt, A.M., Paquet, V.E., and Charette, S.J. (2014) Potential role of bacteria packaging by protozoa in the persistence and transmission of pathogenic bacteria. *Front. Microbiol.* **5**:
- Denoyelle, M., Jorissen, F.J., Martin, D., Galgani, F., and Miné, J. (2010) Comparison of benthic foraminifera and macrofaunal indicators of the impact of oil-based drill mud disposal. *Mar. Pollut. Bull.* **60**: 2007–2021.

- Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P., and Winzer, K. (2006) The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **8**: 1095–1104.
- Ding, Y., Zhou, Y., Yao, J., Szymanski, C., Fredrickson, J., Shi, L., et al. (2016) In situ molecular imaging of the biofilm and its matrix. *Anal. Chem.* **88**: 11244–11252.
- Domenech, M., García, E., Prieto, A., and Moscoso, M. (2013) Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ. Microbiol.* **15**: 502–516.
- Dong, Y.-H., Gusti, A.R., Zhang, Q., Xu, J.-L., and Zhang, L.-H. (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1754–1759.
- Dong, Y.-H. and Zhang, L.-H. (2005) Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J. Microbiol. Seoul Korea* **43 Spec No**: 101–109.
- Dos Santos Goncalves M., Delattre C., Balestrino D., Charbonnel N., Elboutachfai R., Wadouachi A., Badel S., Bernardi T., Michaud P., Forestier C. « Anti-Biofilm Activity: A Function of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide ». *PLoS ONE*. 16 juin 2014. Vol. 9, n°6
- Douglas, A.E. (2010) The symbiotic habit princeton university press.
- Dunne, W.M. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 155–166.
- Dusane, D.H., Pawar, V.S., Nancharaiyah, Y.V., Venugopalan, V.P., Kumar, A.R., and Zinjarde, S.S. (2011) Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*. *Biofouling* **27**: 645–654.
- Eichorst, S.A., Strasser, F., Woyke, T., Schintlmeister, A., Wagner, M., and Wobken, D. (2015) Advancements in the application of NanoSIMS and Raman microspectroscopy to investigate the activity of microbial cells in soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**:
- Eid L., Parent M. « Preparation of non-human primate brain tissue for pre-embedding immunohistochemistry and electron Microscopy ». *JoVE J. Vis. Exp*
- Elias, S. and Banin, E. (2012) multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 990–1004.
- El-Kirat-Chatel, S., Puymege, A., Duong, T.H., Van Overtvelt, P., Bressy, C., Belec, L., et al. (2017) Phenotypic heterogeneity in attachment of marine bacteria toward antifouling copolymers unraveled by AFM. *Front. Microbiol.* **8**:
- Elvers, K.T., Leeming, K., and Lappin-Scott, H.M. (2002) Binary and mixed population biofilms: time-lapse image analysis and disinfection with biocides. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 331–338.
- El-Etr, S.H., Margolis, J.J., Monack, D., Robison, R.A., Cohen, M., Moore, E., and Rasley, A. (2009) *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7488–7500.
- Engström-Öst, J., Koski, M., Schmidt, K., Viitasalo, M., Jonasdottir, S., Kokkonen, M., et al. (2002) Effects of toxic cyanobacteria on plankton assemblage: community development during decay of *Nodularia spumigena*. *Mar. Ecol. - Prog. Ser.* **232**: 1–14
- FAO (2000) FAO yearbook, Fishery statistics; Aquaculture production 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Greff, S., Pérez, T., Thomas, O.P., Martin, J.-C., and Culioli, G. (2017) Discrimination of four marine biofilm-forming bacteria by LC–MS metabolomics and influence of culture parameters. *J. Proteome Res.* **16**: 1962–1975.
- Feoktistova M., Geserick P., Leverkus M. « Crystal violet assay for determining viability of cultured cells ». *Cold Spring Harb. Protoc.* 1 avril 2016. Vol. 2016, n°4,

- p. [pdb.prot087379](#).
- Fernandez, M.-C.A., Crespo, E.P., Mallen, M.M., Ares, M.P.M.P., and Casas, M.C. (1989) Marine amoebae from waters of northwest Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species. *J. Protozool.* **36**: 239–241.
- Fernández-Piñar, R., Cámara, M., Dubern, J.-F., Ramos, J.L., and Espinosa-Urgel, M. (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone quorum sensing signal alters the multicellular behaviour of *Pseudomonas putida* KT2440. *Res. Microbiol.* **162**: 773–781.
- Filoche, S.K., Anderson, S.A., and Sissons, C.H. (2004) Biofilm growth of *Lactobacillus* species is promoted by *Actinomyces* species and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**: 322–326.
- Flemming, H.-C. (2011) The perfect slime. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **86**: 251–259.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623–633.
- Forster, D., Dunthorn, M., Mahé, F., Dolan, J.R., Audic, S., Bass, D., et al. (2016) Benthic protists: the under-charted majority. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**:
- Frost L. S., Leplae R., Summers A. O., Toussaint A. « Mobile genetic elements: the agents of open source evolution ». *Nat. Rev. Microbiol.* [En ligne]. septembre 2005. Vol. 3, n°9, p. 722-732.
- Fujishima, M. and Kodama, Y. (2012) Endosymbionts in *Paramecium*. *Eur. J. Protistol.* **48**: 124–137.
- Gast, R.J. and Caron, D.A. (2001) Photosymbiotic associations in planktonic foraminifera and radiolaria. *Hydrobiologia* **461**: 1–7.
- Ghigo, J.M. (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**: 442–445.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2005) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**: 894–904.
- Gloag, E.S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L.M., et al. (2013) Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 11541–11546.
- Gödeke, J., Paul, K., Lassak, J., and Thormann, K.M. (2011) Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME J.* **5**: 613–626.
- Goldsworthy, M.J.H. (2008) Gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA within a catheter-associated urinary tract infection biofilm model. *Biosci. Horiz. Int. J. Stud. Res.* **1**: 28–37.
- Goodman A. E., Hild E., Marshall K. C., Hermansson M. « Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions ». *Appl. Environ. Microbiol.*
- Goodwin, A.E., Park, E., and Nowak, B.F. (2005) Successful treatment of largemouth bass, *Micropterus salmoides* (L.), with epitheliocystis hyperinfection. *J. Fish Dis.* **28**: 623–625.
- Götz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **43**: 1367–1378.
- Grande, R., Celia, C., Mincione, G., Stringaro, A., Di Marzio, L., Colone, M., et al. (2017) Detection and Physicochemical Characterization of Membrane Vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. *Front. Microbiol.* **8**:
- Grande, R., Di Marcantonio, M.C., Robuffo, I., Pompilio, A., Celia, C., Di Marzio, L., et al. (2015) *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 outer membrane vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Front. Microbiol.* **6**:

- Grube, M., Seckbach, J., and Muggia, L. (2016) Algal and cyanobacteria symbioses world Scientific.
- Guardiola, M., Uriz, M.J., Taberlet, P., Coissac, E., Wangenstein, O.S., and Turon, X. (2015) Deep-sea, deep-sequencing: metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PLoS One* **10**: e0139633.
- Guilbaud, M., Piveteau, P., Desvaux, M., Brisse, S., and Briandet, R. (2015) Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomb-Like morphotype. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 1813–1819.
- Haagensen, J.A.J., Klausen, M., Ernst, R.K., Miller, S.I., Folkesson, A., Tolker-Nielsen, T., and Molin, S. (2007) Differentiation and Distribution of Colistin- and Sodium Dodecyl Sulfate-Tolerant Cells in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J. Bacteriol.* **189**: 28–37.
- Ha, D.-G. and O’Toole, G.A. (2015) c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiol. Spectr.* **3**:
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95–108.
- Hall-Stoodley L., Hu F. Z., Gieseke A., Nistico L., Nguyen D., Hayes J., Forbes M., Greenberg D. P., Dice B., Burrows A., Wackym P. A., Stoodley P., Post J. C., Ehrlich G. D., Kerschner J. E. « Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media ». *JAMA* . 12 juillet 2006. Vol. 296, n°2, p. 202-211.
- Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sambanthamoorthy, K., Dice, B., Nguyen, D., Mershon, W.J., et al. (2008) Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol.* **8**: 173.
- Hahn, M.W. and Höfle, M.G. (1998) Grazing Pressure by a Bacterivorous Flagellate Reverses the Relative Abundance of *Comamonas acidovorans*PX54 and *Vibrio* Strain CB5 in Chemostat Cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1910–1918.
- Hahn, M.W., Moore, E.R., and Höfle, M.G. (1999) Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 25–35.
- Hansen, L.B.S., Ren, D., Burmølle, M., and Sørensen, S.J. (2017) Distinct gene expression profile of *Xanthomonas retroflexus* engaged in synergistic multispecies biofilm formation. *ISME J.* **11**: 300–303
- Hammer, B.K. and Bassler, B.L. (2003) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **50**: 101–104.
- Hansen, S.K., Rainey, P.B., Haagensen, J.A.J., and Molin, S. (2007) Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**: 533–536.
- Haras, D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l’analyse du phénomène aux stratégies de prévention Biofilms and deteriorations of materials: From analysis of the phenomenon to prevention strategies. *Matér. Tech.* **93**: 15.
- Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C., and Blokesch, M. (2016) An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *ISME J.* **10**: 897–910.
- Heydorn A., Ersbøll B. K., Hentzer M., Parsek M. R., Givskov M., Molin S. « Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms ». *Microbiology*. 2000. Vol. 146, n°10, p. 2409-2415.
- Heydorn A., Nielsen A. T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B. K., Molin S. « Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat ». *Microbiology*. 2000. Vol. 146, n°10, p. 2395-2407.

- Hilbi, H., Weber, S.S., Ragaz, C., Nyfeler, Y., and Urwyler, S. (2007) Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ. Microbiol.* **9**: 563–575
- Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., and O’Toole, G.A. (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* **49**: 905–918.
- Hoffman, L.R., Déziel, E., D’Argenio, D.A., Lépine, F., Emerson, J., McNamara, S., et al. (2006) Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 19890–19895.
- Holcombe, L.J., McAlester, G., Munro, C.A., Enjalbert, B., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R., et al. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* secreted factors impair biofilm development in *Candida albicans*. *Microbiol. Read. Engl.* **156**: 1476–1486.
- Hori, K. and Matsumoto, S. (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* **48**: 424–434.
- Van Houdt, R. and Michiels, C.W. (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1117–1131.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., et al. (2001) The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiol. Read. Engl.* **147**: 2517–2528.
- Huggett, M.J., Nedved, B.T., and Hadfield, M.G. (2009) Effects of initial surface wettability on biofilm formation and subsequent settlement of *Hydroides elegans*. *Biofouling* **25**: 387–399.
- Hu, W., Li, L., Sharma, S., Wang, J., McHardy, I., Lux, R., et al. (2012) DNA builds and strengthens the extracellular matrix in *Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides. *PLoS ONE* **7**:
- Huws, S. a., McBain, A. j., and Gilbert, P. (2005) Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 238–244.
- Huws S. A., Morley R. J., Jones M. V., Brown M. R. W., Smith A. W. « Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga* ». *FEMS Microbiol. Lett.* 1 mai 2008. Vol. 282, n°2, p. 258-265.
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., et al. (2010) *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* **465**: 346–349.
- Jahn, A. and Nielsen, P.H. (1998) Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci. Technol.* **37**: 17–24.
- Jefferson, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* **236**: 163–173.
- Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., et al. (2015) Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 11353–11358.
- Johnson-Mackinnon, J., Oldham, T., and Nowak, B. (2016) Amoebic gill disease: a growing threat. *Microsc.*
- Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J.-P. « Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control ». *Nat. Rev. Microbiol.* mars 2014. Vol. 12, n°3, p. 181-196.
- Joint, I., Tait, K., and Wheeler, G. (2007) Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed *Ulva*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **362**: 1223–1233.

- Jones, P.R., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., and Dexter, S.C. (2007) Bacterial community structure of biofilms on artificial surfaces in an estuary. *Microb. Ecol.* **53**: 153–162.
- Jousset A., Bonkowski M. « The model predator *Acanthamoeba castellanii* induces the production of 2,4, DAPG by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 ». *Soil Biol. Biochem.* 1 septembre 2010. Vol. 42, n°9, p. 1647-1649.
- Jousset, A., Rochat, L., Scheu, S., Bonkowski, M., and Keel, C. (2010) Predator-Prey Chemical Warfare Determines the Expression of Biocontrol Genes by Rhizosphere-Associated *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 5263–5268.
- Jurcisek, J.A., Bookwalter, J.E., Baker, B.D., Fernandez, S., Novotny, L.A., Munson, R.S., and Bakaletz, L.O. (2007) The PilA protein of non-typeable *Haemophilus influenzae* plays a role in biofilm formation, adherence to epithelial cells and colonization of the mammalian upper respiratory tract. *Mol. Microbiol.* **65**: 1288–1299.
- Jurcisek, J.A., Brockman, K.L., Novotny, L.A., Goodman, S.D., and Bakaletz, L.O. (2017a) Nontypeable *Haemophilus influenzae* releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E6632–E6641.
- Jurcisek, J.A., Brockman, K.L., Novotny, L.A., Goodman, S.D., and Bakaletz, L.O. (2017b) Nontypeable *Haemophilus influenzae* releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E6632–E6641.
- Jürgens, K. and Stolpe, G. (1995) Seasonal dynamics of crustacean zooplankton, heterotrophic nanoflagellates and bacteria in a shallow, eutrophic lake. *Freshw. Biol.* **33**: 27–38
- Justice, S.S., Hunstad, D.A., Cegelski, L., and Hultgren, S.J. (2008) Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 162–168.
- Kadurugamuwa, J.L. and Beveridge, T.J. (1995) Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**: 3998–4008.
- Kährström, C.T. (2012) Biofilms: Watching bacteria build their homes. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011) Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresour. Technol.* **102**: 4827–4833.
- Kaplan, J.B., Raganath, C., Ramasubbu, N., and Fine, D.H. (2003) Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.* **185**: 4693–4698.
- Kawaguchi, T. and Decho, A.W. (2000) Biochemical Characterization of Cyanobacterial Extracellular Polymers (EPS) from Modern Marine Stromatolites (Bahamas). *Prep. Biochem. Biotechnol.* **30**: 321–330.
- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 634–644.
- Keeling, P.J., Burki, F., Wilcox, H.M., Allam, B., Allen, E.E., Amaral-Zettler, L.A., et al. (2014) The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): Illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. *PLOS Biol.* **12**: e1001889.
- Kennedy, J.F., Palva, P.M.G., Corella, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., and Coelho, L.C.B.B. (1995) Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydr. Polym.* **26**: 219–230.

- Kim, W.-S., Kong, K.-H., Kim, J.-O., Jung, S.-J., Kim, J.-H., and Oh, M.-J. (2017) Amoebic gill disease outbreak in marine fish cultured in Korea. *J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc* **29**: 357–361.
- Kim, Y., Oh, S., and Kim, S.H. (2009) Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**: 324–329.
- Kjørboe, T., Tang, K., Grossart, H.-P., and Ploug, H. (2003) Dynamics of microbial communities on marine snow aggregates: colonization, growth, detachment, and grazing mortality of attached bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3036–3047.
- Kirby, H. (1944) The structural characteristics and nuclear parasites of some species of *Trichonympha* in termites. *Univ Calif Berkeley Publ Zool* **49**: 185–282.
- Kjelleberg, S. and Givskov, M. (2007) The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations horizon Scientific Press
- Klein, G.L., Soum-Soutéra, E., Guede, Z., Bazire, A., Compère, C., and Dufour, A. (2011) The anti-biofilm activity secreted by a marine *Pseudoalteromonas* strain. *Biofouling* **27**: 931–940.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., and Losick, R. (2010) D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* **328**: 627–629.
- Konstantinou, I.K. and Albanis, T.A. (2004) Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. Int.* **30**: 235–248.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J. (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**:
- Ksontini H., Kachouri F., Hamdi M. « Impact of *Lactococcus lactis* spp. lactis Bio adhesion on pathogenic *Bacillus cereus* biofilm on silicone flowing system ». *Indian J. Microbiol.* septembre 2013. Vol. 53, n°3, p. 269-275.
- Kuboniwa, M., Tribble, G.D., James, C.E., Kilic, A.O., Tao, L., Herzberg, M.C., et al. (2006) *Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community. *Mol. Microbiol.* **60**: 121–139.
- Kuchma, S.L., Connolly, J.P., and O’Toole, G.A. (2005) A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**: 1441–1454.
- Kulp, A. and Kuehn, M.J. (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 163–184.
- Kumada, M., Motegi, M., Nakao, R., Yonezawa, H., Yamamura, H., Tagami, J., and Senpuku, H. (2009) Inhibiting effects of *Enterococcus faecium* non-biofilm strain on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* **42**: 188–196.
- Lambrecht, E., Baré, J., Chavatte, N., Bert, W., Sabbe, K., and Houf, K. (2015) Protozoan cysts act as a survival niche and protective shelter for foodborne pathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 5604–5612
- Lasa, I. and Penadés, J.R. (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* **157**: 99–107.
- Laskowski-Arce, M.A. and Orth, K. (2008) *Acanthamoeba castellanii* promotes the survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7183–7188
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Leppard, G.G., Araki, T., Zhang, X., West, M.M., and Hitchcock, A.P. (2003) Scanning transmission X-Ray, laser scanning, and transmission

- electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5543–5554.
- Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., and Lee, D.-H. (2008) Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *J. Microbiol. Seoul Korea* **46**: 174–182.
- Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., and Rice, S.A. (2014) Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J.* **8**: 894–907.
- Lei, Y.-L., Stumm, K., Wickham, S.A., and Berninger, U.-G. (2014) Distributions and biomass of benthic ciliates, foraminifera and amoeboid protists in marine, brackish, and freshwater sediments. *J. Eukaryot. Microbiol.* **61**: 493–508.
- Lejars, M., Margailan, A., and Bressy, C. (2012) Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings. *Chem. Rev.* **112**: 4347–4390.
- Lepanto P., Lecumberry F., Rossello J., Kierbel A. « A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells ». *Mol. Cell. Probes.* février 2014. Vol. 28, n°1, p. 1-5.
- Lewis, K. (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **322**: 107–131.
- Liu B., Li S., Hu J. « Technological Advances in High-Throughput Screening ». *Am. J. Pharmacogenomics.* 1 août 2004. Vol. 4, n°4, p. 263-276.
- Loeb, G.I. and Neihof, R.A. (1975) Marine Conditioning Films. In, *Applied Chemistry at Protein Interfaces*, Advances in Chemistry. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, pp. 319–335.
- Lopatkin A. J., Huang S., Smith R. P., Srimani J. K., Sysoeva T. A., Bewick S., Karig D. K., You L. « Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics ». *Nat. Microbiol.* 11 2016. Vol. 1, n°6, p. 16044.
- Luppens, S.B.I., Kara, D., Bandounas, L., Jonker, M.J., Wittink, F.R.A., Bruning, O., et al. (2008) Effect of *Veillonella parvula* on the antimicrobial resistance and gene expression of *Streptococcus mutans* grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbiol. Immunol.* **23**: 183–189.
- Lynch, D.J., Fountain, T.L., Mazurkiewicz, J.E., and Banas, J.A. (2007) Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**: 158–165.
- Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., et al. (2004) Biofilm development and cell death in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3232–3238.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, D.J. (2009) Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* **5**: e1000354.
- Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., et al. (2009) Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS ONE* **4**:
- Mårdén P., Tunlid A., Malmcrona-Friberg K., Odham G., Kjelleberg S. « Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial islates ». *Arch. Microbiol.* 1 septembre 1985.
- Marks, L.R., Davidson, B.A., Knight, P.R., and Hakansson, A.P. (2013) Interkingdom signaling induces *Streptococcus pneumoniae* biofilm dispersion and transition from asymptomatic colonization to disease. *mBio* **4**: e00438-13

- Massana, R., Gobet, A., Audic, S., Bass, D., Bittner, L., Boutte, C., et al. (2015) Marine protist diversity in European coastal waters and sediments as revealed by high-throughput sequencing. *Environ. Microbiol.* **17**: 4035–4049.
- Matsuyama, T. and Nakagawa, Y. (1996) Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J. Microbiol. Methods* **25**: 165–175.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 289–314.
- Matz, C. and Kjelleberg, S. (2005) Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* **13**: 302–307.
- Matz, C., McDougald, D., Moreno, A.M., Yung, P.Y., Yildiz, F.H., and Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 16819–16824.
- Matz, C., Moreno, A.M., Alhede, M., Manefield, M., Hauser, A.R., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *ISME J.* **2**: 843–852.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., et al. (2008) Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS ONE* **3**: e2744.
- Maybruck, B.T. and Rogerson, A. (2004) Protozoan epibionts on the prop roots of the red mangrove tree, *Rhizophora mangle*.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., and Flemming, H.C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* **26**: 3–16.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 39–50
- McNab, R., Ford, S.K., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G.S., and Lamont, R.J. (2003) LuxS-Based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **185**: 274–284.
- Mehari, Y.T., Jason Hayes, B., Redding, K.S., Mariappan, P.V.G., Gunderson, J.H., Farone, A.L., and Farone, M.B. (2016) Description of “*Candidatus Berkiella aquae*” and “*Candidatus Berkiella cookevillensis*”, two intranuclear bacteria of freshwater amoebae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**: 536–541.
- Mercenier A., Chassy B. M. « Strategies for the development of bacterial transformation systems ». *Biochimie*. avril 1988. Vol. 70, n°4, p. 503-517.
- Mireles, J.R., Toguchi, A., and Harshey, R.M. (2001) *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* **183**: 5848–5854.
- Mojtahid, M., Jorissen, F., and Pearson, T.H. (2008) Comparison of benthic foraminiferal and macrofaunal responses to organic pollution in the Firth of Clyde (Scotland). *Mar. Pollut. Bull.* **56**: 42–76.
- Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 255–261.
- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Kwai, Y.A. (2005) Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 20–28.
- Monroe, D. (2007) Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* **5**: e307.

- Morán, X.A.G., Gasol, J.M., Pernice, M.C., Mangot, J.-F., Massana, R., Lara, E., et al. (2017) Temperature regulation of marine heterotrophic prokaryotes increases latitudinally as a breach between bottom-up and top-down controls. *Glob. Change Biol.* **23**: 3956–3964.
- Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S., and Ramage, G. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **313**: 96–102.
- Musthafa, K.S., Saroja, V., Pandian, S.K., and Ravi, A.V. (2011) Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on N-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1). *J. Biosci.* **36**: 55–67.
- Muto, Y. and Goto, S. (1986) Transformation by extracellular DNA produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* **30**: 621–628.
- Neu, T.R., Dengler, T., Jann, B., and Poralla, K. (1992) Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2531–2537.
- Neu, T.R. and Lawrence, J.R. (1999) Lectin-binding analysis in biofilm systems. In, Doyle, R.J. (ed), *Methods in Enzymology*, Biofilms. Academic Press, pp. 145–152.
- Neu, T.R. and Lawrence, J.R. (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 11–25.
- Neu, T., Swerhone, G.D., and Lawrence, J.R. (2001) Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiol. Read. Engl.* **147**: 299–313.
- Ng, W.-L. and Bassler, B.L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 197–222.
- Nichols, C.A.M., Guezennec, J., and Bowman, J.P. (2005) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Mar. Biotechnol. N. Y. N* **7**: 253–271.
- Nielsen, A.T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K.B., and Molin, S. (2000) Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environ. Microbiol.* **2**: 59–68.
- Nijland, R., Hall, M.J., and Burgess, J.G. (2010) Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PLoS ONE* **5**:
- Nikolaev, S.I., Mitchell, E.A.D., Petrov, N.B., Berney, C., Fahrni, J., and Pawlowski, J. (2005) The testate lobose amoebae (order Arcellinida Kent, 1880) finally find their home within Amoebozoa. *Protist* **156**: 191–202.
- Nithya, C., Devi, M.G., and Karutha Pandian, S. (2011) A novel compound from the marine bacterium *Bacillus pumilus* S6-15 inhibits biofilm formation in gram-positive and gram-negative species. *Biofouling* **27**: 519–528.
- Nithyanand, P., Thenmozhi, R., Rathna, J., and Pandian, S.K. (2010) Inhibition of *Streptococcus pyogenes* biofilm formation by coral-associated actinomycetes. *Curr. Microbiol.* **60**: 454–460.
- Ogawa, A., Furukawa, S., Fujita, S., Mitobe, J., Kawarai, T., Narisawa, N., et al. (2011) Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 1572–1580.
- Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H., and Watanabe, Y. (1999) Analyses of spatial distributions of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5107–5116.
- Okabe, S., Satoh, H., and Watanabe, Y. (1999) In Situ Analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3182–3191.

- Okshevsky, M. and Meyer, R.L. (2014) Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *J. Microbiol. Methods* **105**: 102–104.
- Oldham, T., Rodger, H., and Nowak, B.F. (2016) Incidence and distribution of amoebic gill disease (AGD) — An epidemiological review. *Aquaculture* **457**: 35–42.
- Or, D., Phutane, S., and Dechesne, A. (2007) Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils. *Vadose Zone J.* **6**: 298–305.
- Ortell, N. and Ortmann, A. (2014) Interactions among members of the microbial loop in an estuary dominated by microzooplankton grazing. *Aquat. Microbial Ecol.* **72**: 63–71.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* **28**: 449–461.
- Pachiadaki, M.G., Taylor, C., Oikonomou, A., Yakimov, M.M., Stoeck, T., and Edgcomb, V. (2014) In situ grazing experiments apply new technology to gain insights into deep-sea microbial food webs. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* **129**: 223–231.
- Page, F.C. and Protoza, C.C. of A. and (1983) Marine Gymnamoebae Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, England.
- Palmer, J., Flint, S., and Brooks, J. (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 577–588.
- Paperna, I. (1977) Epitheliocystis infection in wild and cultured sea bream (*Sparus aurata*, Sparidae) and grey mullets (*Liza ramada*, Mugilidae). *Aquaculture* **10**: 169–176.
- Park, S.-J., Park, B.-J., Pham, V.H., Yoon, D.-N., Kim, S.-K., and Rhee, S.-K. (2008) Microeukaryotic diversity in marine environments, an analysis of surface layer sediments from the East Sea. *J. Microbiol.* **46**: 244–249.
- Paquet, V.E., Lessire, R., Domergue, F., Fouillen, L., Filion, G., Sedighi, A., and Charette, S.J. (2013) Lipid composition of multilamellar bodies secreted by *Dictyostelium discoideum* reveals their amoebal origin. *Eukaryot. Cell* **12**: 1326–1334
- Pawlowski, J. and Burki, F. (2009) Untangling the phylogeny of amoeboid protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**: 16–25.
- Pawlowski, J., Lejzerowicz, F., Apotheloz-Perret-Gentil, L., Visco, J., and Esling, P. (2016) Protist metabarcoding and environmental biomonitoring: Time for change. *Eur. J. Protistol.* **55**: 12–25.
- Payne, R.J. (2013) Seven reasons why protists make useful bioindicators. *Acta Protozool.* **52**: 105–113.
- Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A. (1988) Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 2171–2178.
- Periasamy, S. and Kolenbrander, P.E. (2010) Central Role of the Early Colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J. Bacteriol.* **192**: 2965–2972.
- Pernice, M.C., Giner, C.R., Logares, R., Perera-Bel, J., Acinas, S.G., Duarte, C.M., et al. (2016) Large variability of bathypelagic microbial eukaryotic communities across the world's oceans. *ISME J.* **10**: 945–958.
- Pernthaler, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 537–546.
- Pernthaler, J., Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Amann, R., and Psenner, R. (1997) Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 596–601.

- Pernthaler, J., Zöllner, E., Warnecke, F., and Jürgens, K. (2004) Bloom of Filamentous Bacteria in a Mesotrophic Lake: Identity and Potential Controlling Mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 6272–6281
- Piganeau, G., Eyre-Walker, A., Jancek, S., Grimsley, N., and Moreau, H. (2011) How and why DNA barcodes underestimate the diversity of microbial eukaryotes. *PloS One* **6**: e16342.
- Pohlschroder, M. and Esquivel, R.N. (2015) Archaeal type IV pili and their involvement in biofilm formation. *Front. Microbiol.* **6**:
- Pohnert, G., Steinke, M., and Tollrian, R. (2007) Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends Ecol. Evol.* **22**: 198–204
- Poirier, A.C., Roques, C., Lopez-Joven, C., Rubio, T.P., Auguet, J.-C., Julie, N., et al. (Unpublished) Phagocytosis resistance against marine grazers by the facultative intracellular pathogen *Vibrio tasmaniensis* LGP32.
- Poli, A., Anzelmo, G., and Nicolaus, B. (2010) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar. Drugs* **8**: 1779–1802.
- Qin, Z., Yang, L., Qu, D., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products inhibit staphylococcal growth, and disrupt established biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Read. Engl.* **155**: 2148–2156.
- Queck, S.-Y., Weitere, M., Moreno, A.M., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2006) The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol.* **8**: 1017–1025.
- Raghu Nadhanan, R. and Thomas, C.J. (2014) Colpoda secrete viable *Listeria monocytogenes* within faecal pellets. *Environ. Microbiol.* **16**: 396–404
- Ramsing, N.B., Kühl, M., and Jørgensen, B.B. (1993) Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3840–3849.
- Rao, D., Webb, J.S., and Kjelleberg, S. (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1729–1736.
- Rautian, M.S. and Wackerow-Kouzova, N.D. (2013) Phylogenetic placement of two previously described intranuclear bacteria from the ciliate *Paramecium bursaria* (Protozoa, Ciliophora): “*Holospora acuminata*” and “*Holospora curviuscula*.” *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 1930–1933.
- Reen, F.J., Mooij, M.J., Holcombe, L.J., McSweeney, C.M., McGlacken, G.P., Morrissey, J.P., and O’Gara, F. (2011) The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and its precursor HHQ, modulate interspecies and interkingdom behaviour. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**: 413–428.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., and Lovley, D.R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* **435**: 1098–1101.
- Ren, D., Madsen, J.S., Sørensen, S.J., and Burmølle, M. (2015) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME J.* **9**: 81–89
- Rendueles, O. and Ghigo, J.-M. (2012) Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 972–989.
- Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E., and Ghigo, J.-M. (2011) Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. *mBio* **2**: e00043–11.

- Reyes-Batlle, M., Girbau, C., López-Arencibia, A., Sifaoui, I., Liendo, A.R., Bethencourt Estrella, C.J., et al. (2017) Variation in *Campylobacter jejuni* culturability in presence of *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Exp. Parasitol.* **183**: 178–181
- Rickard, A.H., Palmer, R.J., Bleher, D.S., Campagna, S.R., Semmelhack, M.F., Eglund, P.G., et al. (2006) Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol. Microbiol.* **60**: 1446–1456.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., et al. (2001) N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiol. Read. Engl.* **147**: 3249–3262.
- Rieu A., Briandet R., Habimana O., Garmyn D., Guzzo J., Piveteau P. « *Listeria monocytogenes* EGD-e Biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains ». *Appl. Environ. Microbiol.* [En ligne]. 15 juillet 2008.
- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., and Martinotti, M.G. (2009) Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**: 541–553.
- Rivas L., Dykes G. A., Fegan N. « A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method ». *J. Microbiol. Methods* avril 2007. Vol. 69, n°1, p. 44-51.
- Roche, E., Pachiadaki, M.G., Cobban, A., Kujawinski, E.B., and Edgcomb, V.P. (2015) Protist community grazing on prokaryotic prey in deep ocean water masses. *PLoS ONE* **10**:
- Røder, H.L., Sørensen, S.J., and Burmølle, M. (2016) Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? *Trends Microbiol.* **24**: 503–513.
- Rodrigues, L., van der Mei, H., Banat, I.M., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2006) Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**: 107–112.
- Rogerson, A., Hannah, F., and Gothe, G. (1996) The grazing potential of some unusual marine benthic amoebae feeding on bacteria. *Eur. J. Protistol.* **32**: 271–279.
- Rogerson, A. and Laybourn-Parry, J. (1992) The abundance of marine naked amoebae in the water column of the Clyde estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **34**: 187–196.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* **3**: 229–236.
- Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**: 1179–1183.
- Ryder, C., Byrd, M., and Wozniak, D.J. (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 644–648.
- Sakuragi, Y. and Kolter, R. (2007) Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**: 5383–5386.
- Salcher, M.M., Hofer, J., Hornák, K., Jezbera, J., Sonntag, B., Vrba, J., et al. (2007) Modulation of microbial predator-prey dynamics by phosphorus availability: growth patterns and survival strategies of bacterial phylogenetic clades. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**: 40–50
- Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., and Briand, J.-F. (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* **15**: 2879–2893.
- Samuelsen, O., Haukland, H.H., Kahl, B.C., von Eiff, C., Proctor, R.A., Ulvatne, H., et al. (2005) *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferricin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 1126–1129.
- Sana T. G., Laubier A., Bleves S. « Gene Transfer: Conjugation ». In : *Pseudomonas Methods Protoc.* : Humana Press, New York, NY, 2014. p. 17-22.
- Sanchez-Hidalgo, A., Obregón-Henao, A., Wheat, W.H., Jackson, M., and Gonzalez-Juarrero, M. (2017) *Mycobacterium bovis* hosted by free-living-amoebae permits their long-term

- persistence survival outside of host mammalian cells and remain capable of transmitting disease to mice. *Environ. Microbiol.* **19**: 4010–4021.
- Sanchez-Vizueté, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., and Briandet, R. (2015) Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front. Microbiol.* **6**:
- Sand, W. and Gehrke, T. (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* **157**: 49–56.
- Sarmento, H., Montoya, J.M., Vázquez-Domínguez, E., Vaqué, D., and Gasol, J.M. (2010) Warming effects on marine microbial food web processes: how far can we go when it comes to predictions? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **365**: 2137–2149.
- Sato, T., Kuwahara, H., Fujita, K., Noda, S., Kihara, K., Yamada, A., et al. (2014) Intranuclear verrucomicrobial symbionts and evidence of lateral gene transfer to the host protist in the termite gut. *ISME J.* **8**: 1008–1019.
- Sauer, K., Cullen, M.C., Rickard, A.H., Zeef, L. a. H., Davies, D.G., and Gilbert, P. (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J. Bacteriol.* **186**: 7312–7326.
- Sawyer, T.K. (1980) Marine Amebae From Clean and Stressed Bottom Sediments of the Atlantic Ocean and Gulf of Mexico,, - SAWYER - 1980 - Journal of Eukaryotic Microbiology - Wiley Online Library. *J. protozool* 13–32.
- Sayem, S.A., Manzo, E., Ciavatta, L., Tramice, A., Cordone, A., Zanfardino, A., et al. (2011) Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb. Cell Factories* **10**: 74.
- Van Schaik, E.J., Giltner, C.L., Audette, G.F., Keizer, D.W., Bautista, D.L., Slupsky, C.M., et al. (2005) DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J. Bacteriol.* **187**: 1455–1464.
- She Q., Peng X., Zillig W., Garrett R. A. « Genome evolution: Gene capture in archaeal chromosomes ». *Nature* janvier 2001. Vol. 409, n°6819, p. 478.
- Sherr E. B., Sherr B. F. « Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs ». *Antonie Van Leeuwenhoek*. août 2002. Vol. 81, n°1-4, p. 293-308.
- Scheibling, R.E. and Hennigar, A.W. (1997) Recurrent outbreaks of disease in sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* in Nova Scotia: evidence for a link with large-scale meteorologic and oceanographic events. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **152**: 155–165.
- Schipper, C., Hornung, C., Bijtenhoorn, P., Quitschau, M., Grond, S., and Streit, W.R. (2009) Metagenome-derived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 224–233.
- Schooling, S.R. and Beveridge, T.J. (2006) Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* **188**: 5945–5957.
- Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R., and Schleifer, K.H. (1996) Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4641–4647.
- Schulz, F. and Horn, M. (2015) Intranuclear bacteria: inside the cellular control center of eukaryotes. *Trends Cell Biol.* **25**: 339–346.
- Schulz, F., Lagkouravdos, I., Wascher, F., Aistleitner, K., Kostanjšek, R., and Horn, M. (2014) Life in an unusual intracellular niche: a bacterial symbiont infecting the nucleus of amoebae. *ISME J.* **8**: 1634–1644.
- Schulz, F., Tysl, T., Pizzetti, I., Dyková, I., Fazi, S., Kostka, M., and Horn, M. (2015) Marine amoebae with cytoplasmic and perinuclear symbionts deeply branching in the Gammaproteobacteria. *Sci. Rep.* **5**: 13381.

- Schwarz, S., West, T.E., Boyer, F., Chiang, W.-C., Carl, M.A., Hood, R.D., et al. (2010) Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog.* **6**: e1001068.
- Schwechheimer, C. and Kuehn, M.J. (2015) Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 605–619.
- Seiler, C., van Velzen, E., Neu, T.R., Gaedke, U., Berendonk, T.U., and Weitere, M. (2017) Grazing resistance of bacterial biofilms: a matter of predators' feeding trait. *FEMS Microbiol. Ecol.* **93**:
- Sherr, E.B. and Sherr, B.F. (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 293–308.
- Siegert, W. (1999) Biofilms - the unknown source of contamination. *ResearchGate*.
- Sieuwerts S., De Bok F. a. m., Mols E., De Vos W. m., Van Hylckama Vlieg J. e. t. « A simple and fast method for determining colony forming units ». *Lett. Appl. Microbiol.* 1 octobre 2008. Vol. 47, n°4, p. 275-278.
- Singh, R., Soni, P., Kumar, P., Purohit, S., and Singh, A. (2009) Biodegradation of high explosive production effluent containing RDX and HMX by denitrifying bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 269–275.
- Skillman, L.C., Sutherland, I.W., and Jones, M.V. (1998) The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J. Appl. Microbiol.* **85 Suppl 1**: 13S–18S.
- Smith, B.S. (1981) Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. *J. Appl. Toxicol. JAT* **1**: 141–144.
- Söderling, E.M., Marttinen, A.M., and Haukioja, A.L. (2011) Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr. Microbiol.* **62**: 618–622.
- Staudt, C., Horn, H., Hempel, D.C., and Neu, T.R. (2004) Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* **88**: 585–592.
- Steinberger, R.E. and Holden, P.A. (2005) Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5404–5410.
- Steinum, T., Kvellestad, A., Rønneberg, L.B., Nilsen, H., Asheim, A., Fjell, K., et al. (2008) First cases of amoebic gill disease (AGD) in Norwegian seawater farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and phylogeny of the causative amoeba using 18S cDNA sequences. *J. Fish Dis.* **31**: 205–214.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. « A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation ». *J. Microbiol. Methods.* avril 2000. Vol. 40, n°2, p. 175-179
- Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 199–210.
- Strathmann, M., Wingender, J., and Flemming, H.-C. (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol. Methods* **50**: 237–248.
- Stoodley P., Boyle J. D., DeBeer D., Lappin-Scott H. M. « Evolving perspectives of biofilm structure ». *Biofouling* 1 juin 1999. Vol. 14, n°1, p. 75-90.
- Stubbendieck, R.M., Vargas-Bautista, C., and Straight, P.D. (2016) Bacterial communities: interactions to scale. *Front. Microbiol.* **7**: 1234.
- Sumei, L., Klein, M.I., Heim, K.P., Fan, Y., Bitoun, J.P., Ahn, S.-J., et al. (2014) *Streptococcus mutans* eDNA is up-regulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J. Bacteriol.* JB.01493–14.

- Sun, S., Tay, Q.X.M., Kjelleberg, S., Rice, S.A., and McDougald, D. (2015) Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* **9**: 1812.
- Sutherland, I.W. (2001) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9**: 222–227.
- Tamura, S., Yonezawa, H., Motegi, M., Nakao, R., Yoneda, S., Watanabe, H., et al. (2009) Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **24**: 152–161.
- Tang, J., Kang, M., Chen, H., Shi, X., Zhou, R., Chen, J., and Du, Y. (2011) The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. *Sci. China Life Sci.* **54**: 863–869.
- Thenmozhi, R., Nithyanand, P., Rathna, J., and Pandian, S.K. (2009) Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **57**: 284–294.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiol. Read. Engl.* **151**: 1313–1323.
- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., and Eberl, L. (2012) Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J. Proteome Res.* **11**: 4906–4915.
- Tsai, A.Y., Gong, G.-C., and Shiau, W. (2015) Viral lysis and nanoflagellate grazing on prokaryotes: effects of short-term warming in a coastal subtropical marine system. *Hydrobiologia* **751**: 43–54.
- Urakami, H., Tsuruhara, T., and Tamura, A. (1982) Intranuclear *Rickettsia tsutsugamushi* in cultured mouse fibroblasts (L cells). *Microbiol. Immunol.* **26**: 445–447.
- Vadivelu, J., Vellasamy, K.M., Thimma, J., Mariappan, V., Kang, W.-T., Choh, L.-C., et al. (2017) Survival and intra-nuclear trafficking of *Burkholderia pseudomallei*: strategies of evasion from immune surveillance? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**:
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., and Ghigo, J.-M. (2006) Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 12558–12563.
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A., and Filloux, A. (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 6911–6916.
- Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C., and Blokesch, M. (2016) An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *ISME J.* **10**: 897–910
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., and De Vuyst, L. (2004) Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 900–912.
- De Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., et al. (2015) Ocean plankton. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* **348**: 1261605.
- Velraeds, M.M., van der Mei, H.C., Reid, G., and Busscher, H.J. (1996) Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1958–1963.
- Vidović, J., Dolenc, M., Dolenc, T., Karamarko, V., and Žvab Rožič, P. (2014) Benthic foraminifera assemblages as elemental pollution bioindicator in marine sediments

- around fish farm (Vrgada Island, Central Adriatic, Croatia). *Mar. Pollut. Bull.* **83**: 198–213.
- Wahl, M. (1989) Marine Epibiosis .1. Fouling and Antifouling - Some Basic Aspects. *ResearchGate*.
- Walencka, E., Rózalska, S., Sadowska, B., and Rózalska, B. (2008) The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on *staphylococcal* adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol. (Praha)* **53**: 61–66.
- Wang, B.-Y., Deutch, A., Hong, J., and Kuramitsu, H.K. (2011) Proteases of an early colonizer can hinder *Streptococcus mutans* colonization in vitro. *J. Dent. Res.* **90**: 501–505.
- Wang, X., Dubey, A.K., Suzuki, K., Baker, C.S., Babitzke, P., and Romeo, T. (2005) CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**: 1648–1663.
- Watnick, P.I., Fullner, K.J., and Kolter, R. (1999) A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**: 3606–3609.
- Watnick, P.I. and Kolter, R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* **34**: 586–595.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L., and Kolter, R. (2001) The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol. Microbiol.* **39**: 223–235.
- Watnick, P. and Kolter, R. (2000) Biofilm, City of Microbes. *J. Bacteriol.* **182**: 2675–2679.
- Webster, N.S., Smith, L.D., Heyward, A.J., Watts, J.E.M., Webb, R.I., Blackall, L.L., and Negri, A.P. (2004) Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1213–1221.
- Westermann, A.J., Förstner, K.U., Amman, F., Barquist, L., Chao, Y., Schulte, L.N., et al. (2016) Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. *Nature* **529**: 496–501
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
- Wingender, J., Jaeger, K., and Flemming, H.C. (1999) Microbial Extracellular Polymeric Substances - | Jost Wingender | Springer Springer.
- Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S.J., Wilken, S., Zimmerman, A.E., and Keeling, P.J. (2015) Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* **347**: 1257594.
- Wu, J. and Xie, H. (2010) Role of arginine deiminase of *Streptococcus cristatus* in *Porphyromonas gingivalis* colonization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 4694–4698.
- Xu, D., Li, R., Hu, C., Sun, P., Jiao, N., and Warren, A. (2017) Microbial eukaryote diversity and activity in the water column of the south china sea based on DNA and RNA high throughput sequencing. *Front. Microbiol.* **8**:
- Xu, H. and Liu, Y. (2011) d-Amino acid mitigated membrane biofouling and promoted biofilm detachment. *J. Membr. Sci.* **376**: 266–274.
- Xu, K.D., Stewart, P.S., Xia, F., Huang, C.T., and McFeters, G.A. (1998) Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4035–4039.
- Yanin, L., Kang, H.-S., Hong, H.-K., Jeung, H.-D., Kim, B.-K., Le, T.C., et al. (2013) Molecular and histological identification of *Marteilioides* infection in Suminoe Oyster
- Yoshida N., Sato M. « Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies ». *Appl. Microbiol. Biotechnol.* juillet 2009. Vol. 83, n°5, p. 791-798. *Crassostrea*

- ariakensis*, Manila Clam *Ruditapes philippinarum* and Pacific Oyster *Crassostrea gigas* on the south coast of Korea. *J. Invertebr. Pathol.* **114**: 277–284.
- You, J., Xue, X., Cao, L., Lu, X., Wang, J., Zhang, L., and Zhou, S. (2007) Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 1137–1144.
- Young, N.D., Dyková, I., Snekvik, K., Nowak, B.F., and Morrison, R.N. (2008) *Neoparamoeba perurans* is a cosmopolitan aetiological agent of amoebic gill disease. *Dis. Aquat. Organ.* **78**: 217–223.
- Ytreberg, E., Karlsson, J., and Eklund, B. (2010) Comparison of toxicity and release rates of Cu and Zn from anti-fouling paints leached in natural and artificial brackish seawater. *Sci. Total Environ.* **408**: 2459–2466.
- Yuasa, T., Horiguchi, T., Mayama, S., Matsuoka, A., and Takahashi, O. (2012) Ultrastructural and molecular characterization of cyanobacterial symbionts in *Dictyocoryne profunda* (polycystine radiolaria). *Symbiosis* **57**: 51–55.
- Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D.R., Bork, P., and Patil, K.R. (2015) Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 6449–6454.
- Zhang, R.Y., Neu, T.R., Bellenberg, S., Kuhlicke, U., Sand, W., and Vera, M. (2015) Use of lectins to in situ visualize glycoconjugates of extracellular polymeric substances in acidophilic archaeal biofilms. *Microb. Biotechnol.* **8**: 448–461.
- Zhang, Y., Hong, H., and Cai, W. (2010) Imaging with Raman spectroscopy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**: 654–661.
- Zielinski, F.U., Pernthaler, A., Duperron, S., Raggi, L., Giere, O., Borowski, C., and Dubilier, N. (2009) Widespread occurrence of an intranuclear bacterial parasite in vent and seep *bathymodiolin* mussels. *Environ. Microbiol.* **11**: 1150–1167.
- Zippel, B. and Neu, T.R. (2011) Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectin-binding analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 505–516.
- Zoccarato, L., Malusà, A., and Umani, S.F. (2016) Major contribution of prokaryotes to carbon fluxes in the pelagic microbial food webs of the Mediterranean Sea. *Adv. Oceanogr. Limnol.* **7**:
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* **39**: 1452–1463.
- Zubkov, null and Sleight, null (1999) Growth of amoebae and flagellates on bacteria deposited on filters. *Microb. Ecol.* **37**: 107–115.

Richard GUILLONNEAU

Laboratoire MAPIEM, Université de Toulon

**Diversité des interactions microbiennes au sein de l'environnement marin :
de biofilms multi-spécifiques à multi-organismes**

Résumé

La formation de biofilm multi-organismes est rarement étudiée en particulier avec des organismes marins. Ce travail a d'abord mis en évidence une hétérogénéité des capacités de formation du biofilm et de la matrice de bactéries isolées de Méditerranée. L'étude de biofilms multi-espèces a permis de révéler des effets antagonistes et bénéfiques de certaines souches sur le développement du biofilm de leurs partenaires. Les interactions entre amibes et bactéries marines inoculées à un faible ratio ont ensuite montré que toutes les souches testées ont été phagocytées par *Acanthamoeba castellanii*. Cependant, différents mécanismes d'échappement à leur prédateur ont été mis en évidence tels qu'une localisation intranucléolaire des bactéries ou au sein de pelotes fécales expulsées de l'amibe. En revanche, lorsque les amibes ont été ajoutées sur des biofilms monospécifiques ou multi-spécifiques préalablement formés, une majorité de bactéries a fini par se détacher. Le surnageant amibien a également induit un détachement chez deux des bactéries de leur biofilm monospécifique, ainsi que des modifications phénotypiques chez ces mêmes souches, suggérant que des composés amibiens sont secrétés et détectés par les bactéries. Par conséquent, alors qu'on aurait pu s'attendre à un simple broutage des bactéries marines par les amibes, une diversité de comportements bactériens a été mise en évidence donnant une idée sur la diversité des mécanismes d'interaction pouvant exister dans l'environnement marin.

Mot clés : Biofilm, Bactéries marines, Interactions multi-organismes, Amibes, Mécanismes d'échappement.

**Diversity of microbial interactions in the marine environment:
from multi-specific to multi-organisms biofilms**

Abstract

The formation of multi-organisms biofilms is poorly studied especially with marine organisms. This work first showed that strains harvested in biofilms from the Mediterranean Sea displayed a heterogeneity in their biofilm formation abilities and a diversity of matrix compounds. The study of multi-species biofilms revealed antagonistic and beneficial effects of some strains on the biofilm development of their partners. The interactions between amoebae and marine bacteria inoculated at a low ratio showed that all the strains tested were phagocytosed by *Acanthamoeba castellanii*. However, different mechanisms of escapement from their predators have been unraveled, such as a bacterial localization within the cell nucleolus or within fecal pellets expelled from amoebae. However, when the amoebae were added to a preformed bacterial monospecies or multispecies biofilms, a majority of bacteria detached from the surface. The amoebae supernatant induced also a bacterial detachment on two of the bacteria in monospecies biofilms, as well as morphological changes of these bacteria, suggesting that amoeba chemical cues are secreted and detected by the bacteria. Therefore, although a simple grazing of non-pathogenic marine bacteria by amoebae could have been expected, a diversity of bacterial behaviors was unraveled giving an idea on the diversity of interaction mechanisms that may exist in the marine environment.

Keywords: Biofilm, Marine bacteria, Multi-organisms interactions, Amoebae, Escapement mechanisms.