

**Étude et valorisation de composés naturels ou
d'analogues de synthèse contrôlant l'adhésion de
salissures marines**

Tiffany Le Norcy

► **To cite this version:**

Tiffany Le Norcy. Étude et valorisation de composés naturels ou d'analogues de synthèse contrôlant l'adhésion de salissures marines. Bactériologie. Université de Bretagne Sud, 2017. Français. NNT : 2017LORIS453 . tel-01769717

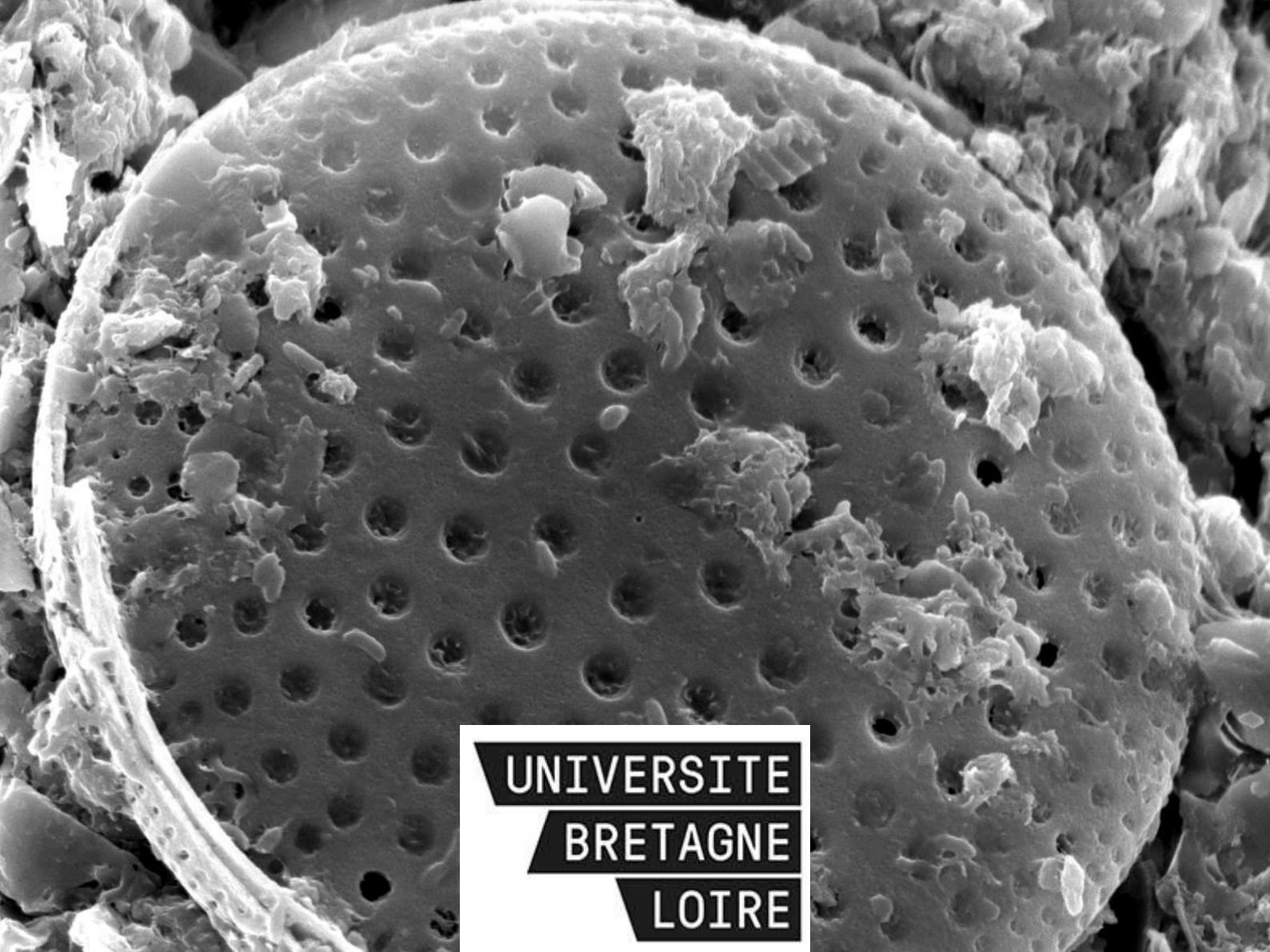
HAL Id: tel-01769717

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01769717>

Submitted on 18 Apr 2018

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

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



THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE-SUD
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE-SUD

Mention : Biologie marine
École Doctorale des Sciences de la Mer

Présentée par

Tiffany LE NORCY

Préparée à l'EA 3884

Laboratoire de Biotechnologie et de Chimie Marines

Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin

Thèse soutenue le 18 septembre 2017

Devant le jury composé de :

Sophie Sablé

Maitre de conférences (HDR), Université de La Rochelle / Rapporteur

Romain Briandet

Directeur de recherche, INRA AgroParistech / Rapporteur

Gaël Bougaran

Directeur de recherche, IFREMER / Examineur

Marie-Lise Bourguet-Kondracki

Directeur de recherche CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle /
Examineur

David Mimeau

Ingénieur de recherche, Nautix / Examineur

Fabienne Faÿ

Maitre de conférences (HDR), Université de Bretagne Sud / Co-directrice de
thèse

Claire Hellio

Professeur, Université de Bretagne Occidentale / Co-directrice de thèse

Étude et valorisation de composés naturels et d'analogues de synthèse contrôlant l'adhésion de salissures marines

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire résultent d'un co-encadrement entre le Laboratoire de Biotechnologie et de chimie Marines (LBCM, Université de Bretagne-Sud) à Lorient et le Laboratoire des sciences de L'Environnement MARin (LEMAR, Université de Bretagne Occidentale) à Brest, Plouzané.

Je commencerai par remercier la région Bretagne et l'Université de Bretagne Occidentale pour avoir financé ces travaux de recherche. Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail : Mme **Sophie SABLE**, Mr **Romain BRIANDET**, Mr **Gaël BOUGARAN**, Mme **Marie-Lise BOURGUET-KONDRACKI** et Mr **David MIMEAU**

Je remercie également les directeurs de laboratoire d'avoir accepté de m'accueillir au sein de leurs laboratoires : **Alain DUFOUR** et **Nathalie BOURGOUGNON** pour le LBCM et **Olivier RAGUENEAU** pour le LEMAR.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes directrices et encadrantes de thèse : **Fabienne FAY**, **Claire HELLIO**, **Karine REHEL** et **Isabelle LINOSSIER**. Merci de m'avoir acceptée sur ce sujet passionnant qui allie la biologie à la chimie. Ces trois années de doctorat furent très agréables à leurs côtés et ont été très enrichissantes pour moi. Merci pour leur disponibilité, leur gentillesse et leurs conseils.

Je remercie **Johan SVENSON** du Département de la chimie, des matériaux et des surfaces de l'institut de recherche technique de Suède et **Peter PROKSCH** de l'institut pharmaceutique de biologie et de biotechnologie pour nous avoir fourni les composés, pour leur amabilité et leur aide. Je remercie les personnes travaillant avec eux pour les synthèses des composés étudiés : **Hendrick NIEMANN**, **Lindon MOODIE** et **Christophe LABRIERE**.

Merci à **Karen TAIT** du Laboratoire Marin de Plymouth de m'avoir accueillie au cours d'une mobilité d'un mois afin d'étudier la communication bactérienne. Cette mobilité n'aurait pas été possible sans le financement de l'Université Bretagne-Loire.

Merci également à **Ana OTERO** de l'université de St Jacques de Compostelle et à **Miguel CAMARA** de l'université de Nottingham de m'avoir fourni des souches bactériennes.

Merci à **Fabienne PONCIN-EPAILLARD** et à **Cyrille DECHANCE** de l'institut des molécules et matériaux du Mans (IMMM, Université du Maine) pour la préparation des surfaces en

réacteur à plasma et pour m'avoir présenté cette technique que je ne connaissais pas. Merci également à **Jean-Marie HERRY, Marie-Noëlle BELLON-FONTAINE, Morgan GUILBAUD, Margareth RENAULT et Gilles GERLOT** de l'équipe Microbiologie de l'Alimentation au service de la Santé (Micalis, INRA, Agroparistech) pour l'analyse AFM des surfaces et l'étude des propriétés physico-chimiques des microalgues. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir aidée pour ces analyses.

Je tiens à remercier **Fabienne GUERARD** (LEMAR, UBO) et **Christine BRESSY** (MAPIEM, Université de Toulon) pour avoir été membre de mon comité de thèse.

Je remercie également **Rozenn TREPOS** de la plateforme BIODIMAR (LEMAR, UBO) pour les tests enzymatiques, son accueil et sa sympathie.

Je remercie **Anthony LE MAGUERESSE** (IRDL, UBS) pour les analyses en microscopie électronique à balayage.

Merci à **Patrick BOURSEAU** (GEPEA, UBS) pour son aide dans la mécanique des fluides notamment pour le calcul de la contrainte cisaillement.

Merci à **Gwénola HOREL** et **Florence HABASQUE** pour les bons moments passés avec elles lors des TP.

Un grand merci aux membres du LBCM pour tous ces bons moments passés en leurs compagnies ; à notre gestionnaire : **Florence** ; aux enseignants : **Alexis, Pierre, Gaël, Chrystèle, Pierre-Emmanuelle, Gilles** ; aux ingénieurs, post-doc, ATER et doctorants : **Alexandre, Sophie, Fabrice, Laure, Dalyal, Maëlle, Charline, Claudia, Charlotte, Éric, Cédric, Adrien, Sterenn, Anne-Sophie** et **Romain**.

Bon courage aux nouveaux doctorants, la thèse vous réserve plein de surprises : **Albane, Tatiana, Matthieu** et **Guillaume**.

Merci aux stagiaires qui m'ont aidé dans ces travaux : **Jamison, Alizée, Manuella, Océane, Chloé**.

Je finirai par remercier mes amis, ma famille et mon chéri. Merci pour leurs soutiens et leurs encouragements.

MERCI à vous tous

Table des matières

Abréviations.....	1
INTRODUCTION GENERALE.....	2
CHAPITRE I.....	6
Tables des illustrations.....	7
Introduction.....	8
<i>I – Le Fouling en milieu marin.....</i>	<i>8</i>
<i>II – L’utilisation de substances d’origine naturelle à activité antifouling.....</i>	<i>22</i>
<i>III – Molécules anti-quorum sensing et anti-bioadhésion.....</i>	<i>24</i>
<i>IV – Techniques de mise en évidence de propriétés antifouling.....</i>	<i>33</i>
Conclusion.....	37
Bibliographie.....	38
CHAPITRE II.....	48
Table des illustrations.....	50
Introduction.....	53
Matériels et méthodes.....	56
<i>I – Culture et caractérisation des souches bactériennes.....</i>	<i>56</i>
<i>II – Criblage de l’activité antibactérienne en microplaque.....</i>	<i>58</i>
<i>III – Étude du mode d’action des molécules.....</i>	<i>59</i>
Résultats et discussion.....	69
<i>I – Caractérisation des souches bactériennes.....</i>	<i>69</i>
<i>II – Criblage de l’activité antibactérienne en microplaque.....</i>	<i>71</i>
<i>III – Étude du mode d’action des molécules.....</i>	<i>83</i>
Conclusion.....	105
Bibliographie.....	107

CHAPITRE III	112
Table des illustrations.....	114
Introduction.....	117
Matériels et méthodes.....	119
<i>I – Impact des composés de la famille des hemibastadins sur quatre souches de microalgues</i>	119
<i>II – Capacité de formation de biofilms</i>	121
<i>III – Étude des propriétés physico-chimiques des surfaces</i>	126
Résultats et discussion.....	129
<i>I – Impact des composés de la famille des hemibastadins sur quatre souches de microalgues</i>	129
<i>II – Capacité de formation de biofilms</i>	136
<i>III – Étude des propriétés physico-chimiques des surfaces</i>	161
Conclusion.....	172
Bibliographie.....	175
CHAPITRE IV	180
Table des illustrations.....	182
Introduction.....	184
Matériels et méthodes.....	186
<i>I – Évaluation de l’activité anti-microfouling de deux familles de composés (batatasins et hemibastadines) en condition naturelle</i>	186
<i>II – Évaluation du DBHB en conditions contrôlées</i>	188
<i>III – Évaluation du DBHB sur le macrofouling</i>	193
Résultats et discussion.....	194
<i>I – Évaluation de l’activité anti-microfouling de deux familles de composés (batatasins et hemibastadines) en condition naturelle</i>	194
<i>II – Évaluation du DBHB en conditions contrôlées, impact sur un biofilm mixte</i>	200
<i>III – Évaluation du DBHB sur le macrofouling</i>	212
Conclusion.....	215

Bibliographie.....	217
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	220
Annexes.....	223
Annexe 1 – Programme JAVA.....	225
Annexe 2 – Diffusion scientifique.....	226

Abréviations

AB :	Autoinducer bioassay
AC :	numéro de souche pour les microalgues issues de l'algoBank, Caen
AF :	Antifouling
AFM :	Atomic Force Microscopy
AIP :	Peptide autoinducteur
AMM :	Autorisation de mise sur le marché
ANSES :	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ASW :	Artificial Sea Water
C-di-GMP :	Bis-(3'-5')-Cyclic Dimeric Guanosine MonoPhosphate
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CPCB :	Commission des produits chimiques et biocides
DBHB :	Dibromohemibastadin
DCOIT :	4,5-Dichloro-2-octoyl-4-isothiazolin-3-one
DGPR :	Direction générale de la prévention des risques
DO :	Densité Optique
DSF :	Diffusible signal factor
EPS :	Substances Polymériques Extracellulaires
HSL :	Homosérine Lactone
CI₅₀ :	Concentration inhibant 50 % de la population
IMO :	Organisation Maritime Internationale
LB :	Luria Bertani
LC-MS-MS :	Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
MB :	Marine Broth
MCBL :	Microscopie Confocale à Balayage Laser
MEB :	Microscopie Électronique à Balayage
NBHB :	Norbromohemibastadin
OMI :	Organisation Maritime Internationale
PBR :	Règlement sur les produits biocides
PQS :	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
PSU :	Practical Salinity Unit
QS :	Quorum Sensing
RAP :	Aspartyl phosphate phosphatase
SRB :	Bactéries sulfato-réductrices
TBT :	Tributylétain
u.a :	Unité Arbitraire
UFC :	Unité Formant Colonie
XPS :	X-ray photoelectron spectroscopy

Introduction générale

En milieu marin, les organismes mettent en place des procédés physiques, comportementaux, mécaniques et chimiques pour se développer et se défendre (Ralston & Swain., 2009). Ces mécanismes sont principalement retrouvés chez les organismes mous, fixés ou lents (Zimmer & Butman., 2000).

Il a ainsi été estimé que près de 500 millions de substances chimiques sont présentes dans les océans, dont moins de 100 000 restent connues (Kim & Wijesekara., 2010). Ces substances, identifiées dans le domaine marin, sont d'une diversité remarquable et présentent une multitude d'activités biologiques (Thomas *et al.*, 2010). Ainsi, l'écologie chimique est la discipline scientifique qui étudie les rôles des signaux chimiques présents dans les interactions intra et inter-espèces. Ces signaux sont généralement des métabolites spécialisés. Les principes actifs issus des organismes peuvent être valorisés pour des applications dans de nombreux domaines tels que la médecine, la pharmacologie, l'aquaculture ou encore dans l'alimentation humaine et animale.

Parmi les organismes valorisés, nous pouvons citer la spiruline qui est utilisée comme complément alimentaire. Il s'agit d'une microalgue appartenant au genre *spirulina* ou aussi nommé *Arthrospira*. 2 000 espèces de spiruline ont été décrites mais seules 36 espèces sont comestibles. L'espèce la plus utilisée en complément alimentaire est *spirulina platensis*, elle présente une forte teneur en protéines végétales, vitamines et minéraux. La spiruline a montré des propriétés bénéfiques sur le traitement de l'hypercholestérolémie en réduisant les lipides sanguins (Mao *et al.*, 2005). Dans le cas du diabète, l'apport de spiruline permet de contrôler le taux glyco-lipidique. Une prise de 5 grammes par jour permet une réduction du diabète (Mazo *et al.*, 2007). La glycémie est contrôlée grâce aux antioxydants (β -carotène, vitamine E, zinc, sélénium et superoxyde dismutase) contenus dans la spiruline (Dillon *et al.*, 1995).

D'autres principes actifs sont valorisés dans des traitements médicaux. Par exemple, le Yondelis® a été développé pour lutter contre le sarcome des tissus mous. Il aura fallu 30 ans pour permettre la mise sur le marché du principe actif (trabectédine) de ce médicament identifié chez une ascidie *Ecteinascidia turbinata* (Cuevas & Francesch., 2009).

Parmi le panel d'organismes marins, les bactéries et les microalgues sont une source importante de composés actifs à fonctions diverses : communication, compétition de l'espace... Les molécules extraites de ces organismes peuvent présenter, par exemple, des activités antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires ou antifouling (Satheesh *et al.*, 2016 ; Blunt *et al.*, 2016). Ainsi des polysaccharides sulfatés, extraits de microalgues du genre *Porphyridium* notamment, comme les espèces *Porphyridium cruemtum* et *Porphyridium aerugineum* possèdent des propriétés antibactériennes contre des souches bactériennes pathogènes humaines et aquacoles à Gram positif

et à Gram négatif (Raposo *et al.*, 2013). D'autres espèces de microalgues sont capables de produire des composés inhibant la croissance et l'adhésion d'autres microalgues ; ainsi une souche de *Chlorella* est connue pour produire un composé nommé chlorellin présentant des propriétés antimicroalgales (Pratt., 1948 ; de Morais *et al.*, 2015).

Plus d'un millier de substances sont en cours d'étude afin de déterminer leur mode d'action mais également leurs effets néfastes éventuels tels que la toxicité, la bioaccumulation, etc. Toutefois, une des limites à leur utilisation à grande échelle repose sur les besoins en biomasse importants pour des utilisations à l'échelle industrielle et l'impact associé sur la biodiversité marine en cas de prélèvement dans l'environnement.

Afin de pallier à cette pression sur le milieu marin, deux stratégies sont possibles. La première est d'identifier le gène responsable de leur synthèse au sein de l'organisme et de l'intégrer au sein d'une bactérie. La molécule bioactive pourra être produite à grande échelle, en bioréacteur par exemple. Néanmoins, ces études de génie génétique sont souvent longues et compliquées à mettre en place. Une seconde voie intéressante repose sur l'utilisation de synthèses chimiques. Après avoir identifié un composé naturel, sa structure et son mode d'action, il peut être possible de synthétiser cette molécule. La synthèse de dérivés structuraux cherche à accroître l'activité du composé. Cependant, de nombreuses synthèses sont coûteuses en temps et en matériel et certains produits peuvent être onéreux.

Cette diversité de substances actives, produites par les organismes en milieu marin, motive les chercheurs à développer de nouveaux procédés pour répondre aux besoins industriels. Parmi les problèmes que l'Homme cherche à contrôler, la formation de salissures marines, nommée biofouling, cause de nombreux soucis d'un point de vue économique et environnemental (surconsommation de carburant, introduction d'espèces invasives, pollution). En effet, toute surface immergée dans le milieu marin est rapidement colonisée par des microorganismes et des macroorganismes (Wahl., 1989). Pour lutter contre le développement de ces salissures marines, des peintures antisalissures ou antifouling (AF) ont été mises au point. Elles permettent de contrôler le développement de ces espèces sur les surfaces immergées en mer, dont notamment les coques de bateaux. Néanmoins, l'utilisation de certaines substances comme les composés organométalliques à base de tributylétain (TBT) a engendré des contaminations environnementales graves (développement de pathologie chez différents organismes marins) (Alzieu., 2000). Ce composé a été interdit en 2008 par l'Organisation Maritime Internationale (IMO).

Avec le durcissement des nouvelles législations en matière de peintures AF (règlement sur les produits biocides (PBR)), il est nécessaire aujourd'hui de travailler à l'élaboration de nouvelles formulations AF respectueuses de l'environnement.

Le milieu marin est une source naturelle de composés à activité antifouling ; en effet certains organismes y vivent sans être colonisés par d'autres espèces. L'épibiose est une relation entre un hôte et une espèce, l'épibionte. Cette relation apporte des bénéfices à l'épibionte sans apporter ni bénéfice, ni préjudice pour l'hôte. Cet échange nécessite une différence de taille entre les deux organismes. Deux épibiontes sont décrits, les épiphytes dans le cas où l'épibionte vit sur une plante et l'épizoaire lorsque l'hôte est un animal. Dans le milieu marin, l'épibiose est très répandue. Il a été identifié, les spirorbes, des vers annélides qui vivent dans de petits tubes de calcaires qu'ils forment à la surface des algues. Des mollusques bivalves peuvent être colonisés par de petits crustacés : balanes, pouce-pied, des anémones de mer, des éponges ou coraux. À partir de ces relations positives, il est possible de s'inspirer de la nature afin d'identifier de nouvelles alternatives antibactériennes ou AF (Wahl., 2008). Les recherches actuelles s'orientent donc vers la valorisation de ces substances dans des formulations AF. Ces études pourraient permettre le développement de revêtements dont l'activité serait issue de produits AF naturels ou de synthèse.

Ce manuscrit s'articule selon quatre chapitres. Une synthèse bibliographique présentant le phénomène de biofouling et les enjeux des recherches actuelles sera exposée dans un premier chapitre.

Le second chapitre exposera l'évaluation de l'activité antibactérienne (trois bactéries marines : *Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Vibrio* sp. D66 et une bactérie terrestre : *Pseudomonas aeruginosa* PAO1) d'une centaine de composés. Ils appartiennent à la famille des batatasins (dont le composé naturel est isolé de la plante *Empetrum hermaphroditum*) et la famille des hemibastadins (dont les composés naturels, les bastadins sont isolés d'éponges, notamment l'espèce *Ianthella basta*). Le mode d'action au niveau cellulaire des composés sera investigué.

Le troisième chapitre sera consacré au criblage de l'activité des composés sur quatre souches de microalgues : *Cylindrotheca closterium*, *Halamphora coffeaeformis*, *Exanthemachrysis gayraliae* et *Porphyridium purpureum*. La caractérisation de ces microalgues sera présentée ainsi que leurs propriétés d'adhésion. Un protocole de formation de biofilm de microalgues en condition dynamique est mis en place et permet d'évaluer l'efficacité des substances anti-microalgales. La force d'attachement des microalgues est également étudiée. L'impact de la rugosité ou de l'hydrophobie de surface sur l'adhésion des microalgues sera également abordé.

Le chapitre quatre présentera la formulation de revêtements AF contenant les composés d'intérêts sélectionnés dans les chapitre 2 et 3. Les résultats d'immersion en conditions naturelles et en conditions contrôlées seront présentés. Pour se faire, trois méthodes d'immersion en photobioréacteur seront développées.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

TABLES DES ILLUSTRATIONS.....	7
INTRODUCTION	8
I – Le fouling en milieu marin	8
I – A - Mise en place du fouling	8
I – A – 1 – Formation du film primaire.....	8
I – A – 2 – Adhésion des bactéries.....	9
I – A – 3 – Formation du biofilm	10
I – A – 4 – Biofilm de microalgues	11
I – A – 5 – Biofilm mixte bactéries - microalgues.....	15
I – A – 6 – Développement du macrofouling.....	16
I – B - Impact sur les activités humaines	16
I – B – 1 – Sur l'économie.....	16
I – B – 2 – Sur l'environnement	17
I – C - Prévention et moyens de lutte	18
I – C – 1 – Historique.....	18
I – C – 2 – Conséquences environnementales.....	19
I – C – 3 – Moyens actuels.....	20
II – L'utilisation de substances d'origine naturelle à activité antifouling.....	22
III – Molécules anti-quorum sensing et anti-bioadhésion	24
III – A – Les bactéries à Gram négatif.....	24
III – A – 1 – Le modèle de Quorum sensing chez <i>Vibrio fischeri</i>	25
III – A – 2 – Les systèmes Las et Rhl du quorum sensing chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	26
III – A – 3 – Composés perturbant le quorum sensing.....	28
III – B – Les bactéries à Gram positif.....	29
III – C – Connection entre les systèmes de communication des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ..	31
III – D – Implication du quorum sensing dans la formation du biofilm	31
III – E – Technique d'étude du quorum sensing	31
III – E – 1 – Bactéries biosenseurs ou biorapporteurs.....	31
III – E – 2 – Étude génétique.....	32
IV – Techniques de mise en évidence de propriétés antifouling	33
IV – A – Étude sur le microfouling	34
IV – B – Étude sur le macrofouling.....	34
CONCLUSION.....	37
BIBLIOGRAPHIE.....	38

Tables des illustrations

Liste des figures

Figure I-1 : Formation du biofouling	8
Figure I-2 : Schématisation de la formation du biofilm bactérien	10
Figure I-3 : Observation d'une diatomée pennée, <i>Cocconeis</i> sp., le trait indique le raphé	12
Figure I-4 : Schématisation du complexe d'adhésion chez les microalgues possédant un raphé	12
Figure I-5 : Observation de l'adhésion de la microalgue <i>Achnanthes longipes</i> , une structure d'adhésion, le « stalk » est constitué du « collar », « shaft » et le point d'accroche, le « pad »	13
Figure I-6 : Adhésion au bout de 4 heures de la diatomée <i>A. coffeaeformis</i> sur une surface en verre et marquage du mucilage produit par le Stain-all®	13
Figure I-7 : Mode de déplacement de la diatomée <i>C. closterium</i> , A =glisse sans rotation sur l'axe X ; B =glisse avec rotation sur l'axe X ; C, D =Tire-bouchon « corkscrew » en glissant vers l'avant ou l'arrière ; E = pirouette ; F = pirouette en glissant ; G = pivot ; H, I = « rock and roll » ; J = par flexion	14
Figure I-8 : Structure des furanones, R = partie variable (A) et du N-butanoyl-L-homosérine lactone (B)	15
Figure I-9 : Les antifouling « biocide release coatings », schématisation de la libération dans le temps, matrice dure (A, B et C), matrice érodable (D, E et F)	20
Figure I-10 : Modèle de quorum sensing chez <i>V. fisheri</i>	25
Figure I-11 : Schématisation du système Las et Rhl chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	26
Figure I-12 : Schématisation du système impliquant le « <i>Pseudomonas</i> quinolone signal » (PQS)	27
Figure I-13 : Mode de communication chez les bactéries à Gram positif	30
Figure I-14 : Schématisation du principe de la puce à ADN	33
Figure I-15 : Métamorphose du bryzoaire <i>Bugula neritina</i>	35
Figure I-16 : Réaction faisant intervenir la phénoloxydase.....	36

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Historique des stratégies antifouling	18
Tableau I-2 : Liste des biocides autorisés dans les antifouling	21
Tableau I-3 : Exemples de composés naturels d'origine marin présentant des propriétés biologiques	23
Tableau I-4 : Structures des messagers intracellulaires : le 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) et le « <i>Pseudomonas</i> quinolone signal » (PQS).....	28
Tableau I-5 : Exemples de stratégies antifouling décrites dans la littérature	29

Introduction

Ce chapitre bibliographique s'organise en quatre parties. La première porte sur le biofouling : composition, mise en place et impact sur les activités humaines. La seconde partie est consacrée à l'utilisation de substances d'origine naturelle à activité AF. La troisième partie abordera des stratégies de lutte contre le biofouling de par l'utilisation de composés anti-quorum sensing et anti-bioadhésion. Puis, ce chapitre se conclura sur les techniques de mise en évidence des propriétés antifouling.

I – Le fouling en milieu marin

Lorsqu'une surface est immergée dans l'eau de mer, elle est rapidement colonisée par des organismes marins de différents niveaux trophiques. Ce phénomène, appelé biofouling, se déroule en cinq étapes (Figure I-1). Le biofouling a été décrit pour la première fois par Wahl dès 1989 (Wahl., 1989 ; Wahl & Lafargue., 1990).

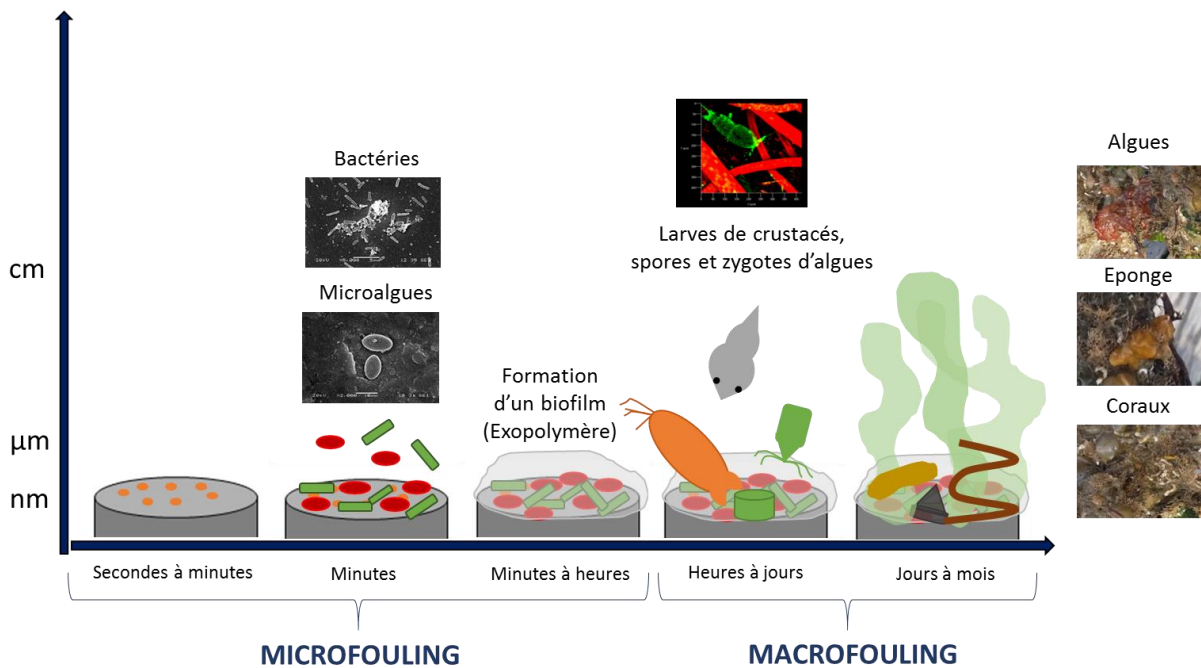


Figure I-1 : Formation du biofouling

I – A – Mise en place du fouling

I – A – 1 – Formation du film primaire

Dès qu'une surface non-traitée est immergée, des composés organiques et/ou minéraux tels que des polysaccharides, des protéines, des lipides ou des sels s'adsorbent à la surface (Baier., 1972). Ce dépôt définit le conditionnement chimique des surfaces immergées en milieu aqueux. Les types de composés adhérents sont dépendants de la nature du substrat mais aussi des propriétés du milieu (composition, température, pH, salinité, lumière...) (Compère *et al.*, 2001). Ce dépôt modifie les propriétés physico-

chimiques de la surface en la rendant plus favorable à l'adhésion de certains organismes. Ainsi, ce film primaire favorise l'adhésion de microorganismes comme les bactéries, les levures, les champignons ou les microalgues. Ces microorganismes forment un biofilm, appelé également microfouling. Un biofilm est défini comme une communauté de microorganismes adhérents sur des surfaces et recouverts par une matrice protectrice d'exoproduits. Cette matrice est constituée essentiellement de protéines, d'ADN extracellulaire, de polysaccharides et de sels (Flemming & Wingender., 2010). La formation de ce biofilm suit un cycle de développement précis allant vers des niveaux trophiques successifs plus élevés.

1 – A – 2 – Adhésion des bactéries

Les bactéries sont des cellules procaryotes naturellement présentes dans l'environnement. Elles peuvent être identifiées soit à l'état planctonique, soit sessile (fixées sur des surfaces biotiques ou abiotiques). Zobell, en 1943 a été le premier à mettre en évidence le fait que les bactéries vivaient essentiellement en communauté plutôt qu'en suspension dans un milieu (Zobell., 1943). Dans les années 70, la notion de biofilm a vu le jour. Donlan et Costerton ont démontré, que 99 % des bactéries avaient la capacité de se développer en biofilm (Donlan & Costerton., 2002).

Les bactéries présentes dans le milieu planctonique peuvent être transportées vers la surface à coloniser par différents processus comme la sédimentation (due aux forces de gravité), les forces hydrodynamiques, la diffusion par des mouvements browniens ou par la mobilité propre (flagelles, *pili*) des bactéries (Katsikogianni & Missirlis., 2004 ; An & Friedman., 1998).

La première étape dans la formation du biofilm est l'adhésion dite réversible. Suite au conditionnement chimique de la surface immergée, les microorganismes perçoivent ces composés et interagissent avec la surface. Cette première étape d'adhésion fait intervenir des liaisons chimiques faibles, à longue distance (supérieure à 10 nm), non-covalentes de type Van der Waals, électrostatiques ou de Lewis. L'adhésion réversible permet aux bactéries d'évaluer si la surface conditionnée convient à leur développement. Cette première étape d'adhésion se déroule en quelques minutes. Les cellules se fixeront de manière irréversible, lorsque la surface sera propice à leur survie et à leur développement. Dans le cas contraire, elles peuvent retourner à l'état planctonique afin de rechercher une autre surface plus adéquate.

Les microorganismes adhérents s'agglomèrent alors pour former des micro-colonies en produisant des substances polymériques, afin d'établir une matrice extracellulaire qui sera sécrétée autour des cellules bactériennes. Cette matrice renforcera l'adhésion sur la surface en augmentant les forces d'interactions (distance inférieure à 2 nm). Les bactéries consolident également leur fixation en se liant entre-elles par le biais des flagelles et des *pili* de type IV (Heydorn *et al.*, 2002). L'adhésion devient irréversible en quelques minutes à quelques heures.

I – A – 3 – Formation du biofilm

Après plusieurs heures, les microorganismes entrent en phase de croissance. La division des bactéries permet d'accroître la taille des colonies afin de former une structure tridimensionnelle étendue sur la surface colonisée. La maturation du biofilm se poursuit, accompagnée de la production de matrice extracellulaire (également nommée glycocalix) qui constitue de 50 à 90 % du biofilm mature (Haras., 2005). Elle est composée majoritairement de protéines et de polysaccharides chargés négativement ou positivement en fonction du Gram des bactéries (Dunne., 2002 ; Donlan., 2002). D'autres constituants tels que des lipides ou des acides nucléiques sont identifiés dans la matrice du biofilm et permettent sa stabilisation (Simões *et al.*, 2010). Les exopolymères (EPS) constitutifs de cette matrice sont généralement amphiphiles et confèrent une élasticité au biofilm. La formation du biofilm est schématisée sur la Figure I-2.

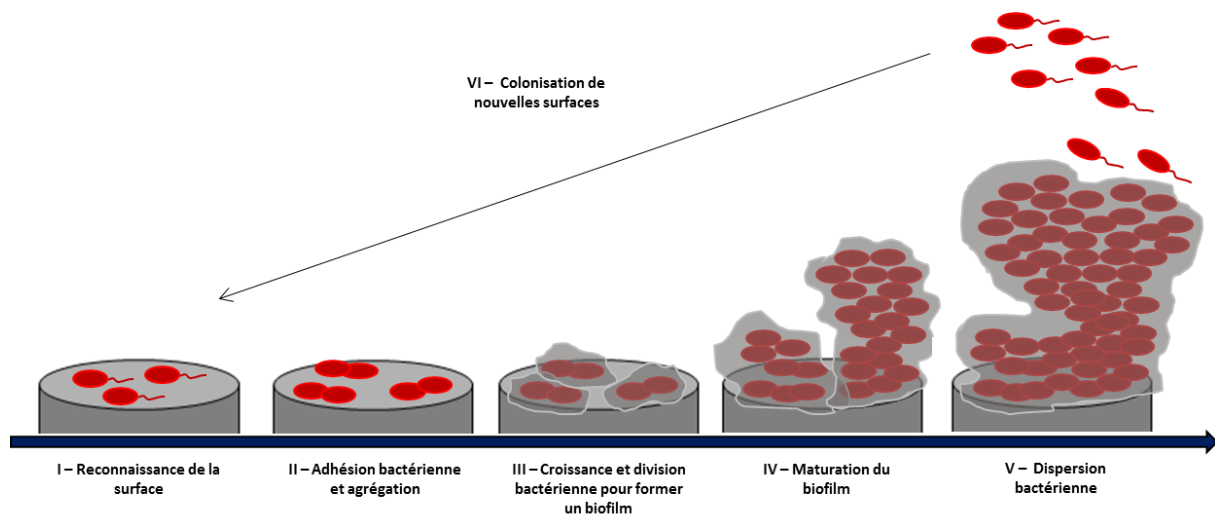


Figure I-2 : Schématisation de la formation du biofilm bactérien

La matrice permet des échanges entre les bactéries au sein du biofilm. Les flux de nutriments, toxines ou d'oxygène sont facilités (Filloux & Vallet., 2003 ; Haras., 2005). Cette matrice confère également un rôle de barrière pour les bactéries vis-à-vis de la prédation. Elle agit comme un filtre et limite l'apport de molécules pouvant être nocives pour les bactéries comme des composés antibactériens (Donlan., 2002). La composition du biofilm, ainsi que sa forme, sont modifiées en fonction du milieu dans lequel les bactéries se développent. Il a été montré que dans un milieu pauvre (sans nutriment), le biofilm peut se développer sous forme de petits amas alors que dans un milieu riche (avec nutriment), le biofilm aurait une structure tridimensionnelle plus développée (Hall-Stoodley & Stoodley., 2002). La morphologie des biofilms dépend de la biodiversité présente. Certaines bactéries sont capables de former des filaments ou de se développer en suivant des morphologies précises. Par exemple, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* présente des biofilms en structure de champignons. La morphologie des biofilms peut être dépendante de l'hydrodynamisme du milieu. Dans le cas de biofilms d'eaux

usées, différentes morphologies ont été observées. En fonction des conditions hydrodynamiques, des micro-colonies en forme de cascade (ripple like) ou en forme allongée (streamers) ont été identifiées (Battin *et al.*, 2003).

Une fois le biofilm formé, certaines cellules se décrochent et sont emportées par le flux de milieu afin de coloniser d'autres surfaces. Le détachement permet aux bactéries de se déplacer dans un milieu plus propice au développement d'un biofilm. Le manque de nutriments, l'âge du biofilm, le stress physique, chimique et biologique ainsi que les conditions hydrodynamiques sont des facteurs pouvant intervenir dans le détachement du biofilm et la dispersion des bactéries dans le milieu (Kaplan., 2010). Ce détachement est favorisé par la matrice mais aussi par la densité atteinte par le biofilm. Des études mathématiques ont permis de modéliser les procédés de détachement impliquant les valeurs de biovolume ou d'épaisseur du biofilm (Stewart., 1993).

I – A – 4 – Biofilm de microalgues

Dans le milieu marin, la formation du biofilm bactérien est couplée à l'adhésion et à la formation d'un biofilm microalgal. Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques, eucaryotes ou procaryotes, autotrophes. Elles peuvent se développer à partir de nutriments simples tels que des sels minéraux et du dioxyde de carbone (Mata *et al.*, 2010).

Ces cellules peuvent être observées à l'état unicellulaire ou pluricellulaire indifférenciées. Certaines cellules peuvent posséder des flagelles afin de faciliter leurs déplacements dans le milieu aqueux. Ces végétaux aquatiques possèdent diverses formes et couleurs avec des tailles allant de 1 à 100 µm. Il existe entre 200 000 et 1 000 000 d'espèces ; seules 30 000 sont connues actuellement et moins d'une centaine sont cultivables en laboratoire (Cannell., 1993).

Les microalgues eucaryotes, généralement identifiées en milieu marin, appartiennent aux embranchements des bacillariphytes, charophytes, chlorophytes, chrysophytes, cryptophytes, dinophytes, euglenophytes, glaucophytes, haptophytes, phaeophytes et rhodophytes. Ces microalgues eucaryotes sont délimitées par une membrane plasmique et possèdent divers organites comme les chloroplastes, les amyloplast, les mitochondries et un noyau (Sharma & Rai., 2010), tandis que les microalgues procaryotes regroupent l'ensemble des cyanobactéries.

Les microalgues sont identifiées dans la plupart des niches écologiques. Elles sont majoritaires dans les environnements aquatiques mais elles peuvent aussi être retrouvées sur les sols, roches ou arbres (Macedo *et al.*, 2009).

Les microalgues possèdent deux modes de vie, à l'état planctonique ou à l'état benthique. Les microalgues benthiques adhèrent sur différents substrats : sédiments, roches, organismes marins... Ainsi, les microalgues sont les organismes majoritairement identifiés sur les surfaces artificielles

immergées en conditions naturelles (Salta *et al.*, 2013). Les microalgues produisent des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui interviennent dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la formation de colonies, l'adhésion ou encore la mobilité (Hoagland *et al.*, 1993 ; Underwood & Paterson., 2003).

Les substances adhésives sécrétées par les microalgues sont nommées mucilages et sont excrétées au niveau du raphé chez les diatomées ; ce raphé intervient également dans le processus de mobilité appelé « gliding » (Figure I-3).

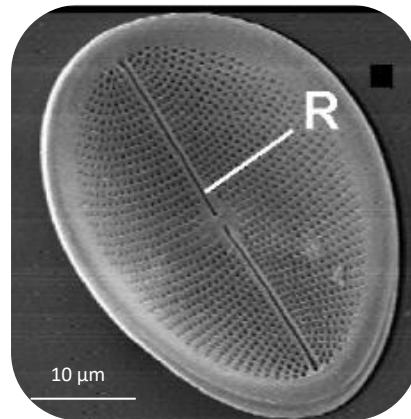


Figure I-3 : Observation d'une diatomée pennée, *Cocconeis sp.*, le trait indique le raphé (R)

Ce mode de déplacement peut avoir lieu dans le cas où la microalgue recherche un endroit plus favorable pour son développement (Mitbavkar & Anil., 2004 ; Mitbavkar & Anil., 2007). Le déplacement est permis par des interactions entre les filaments d'actine et de myosine, comme représenté sur la Figure I-4.

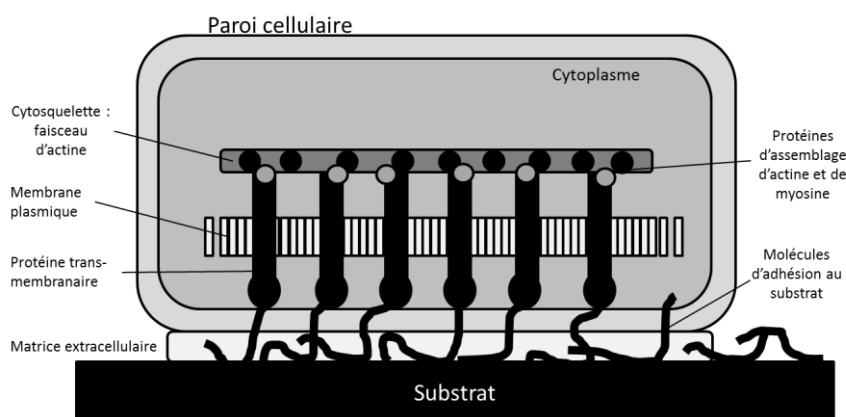


Figure I-4 : Schématisation du complexe d'adhésion chez les microalgues possédant un raphé (Molino & Wetherbee., 2008)

Plusieurs étapes d'adhésion ont été décrites pour les diatomées. Premièrement, la microalgue perçoit la surface et adhère de façon réversible en synthétisant une matrice extracellulaire composée des EPS produits au niveau du raphé ainsi que des EPS de la membrane. Toutefois, les substances adhésives

sont principalement retrouvées au niveau du raphé (Higgins *et al.*, 2003). Une fois la première étape réalisée, la microalgue s'oriente par rapport à la surface et rend irréversible son adhésion en activant le système actine/myosine.

D'autres espèces comme les genres *Achnanthes* produisent des structures adhésives secondaires comme les « pads » ou les « stalks ». Ces microalgues peuvent renforcer leur adhésion et leur dispersion sur la surface en formant des tapis (Wang *et al.*, 2000). Une observation de la microalgue *A. longipes* avec les structures adhésives est présentée sur la Figure I-5.

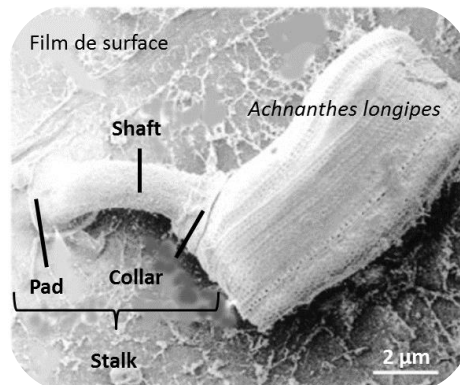


Figure I-5 : Observation de l'adhésion de la microalgue *Achnanthes longipes*, une structure d'adhésion, le « stalk » est constitué du « collar », « shaft » et le point d'accroche, le « pad » (Wang *et al.*, 2000)

Une étude de Molino *et al.*, a suivi la colonisation d'une surface de verre pendant 20 heures par *Amphora coffeaeformis* (Molino *et al.*, 2006). Au cours du temps, les microalgues colonisent la totalité de la surface en associant deux mécanismes : la division cellulaire et la production d'EPS. La Figure I-6 présente l'adhésion de *A. coffeaeformis* au bout de 4 heures, par marquage au Stain-all® (acides nucléiques et protéines). Le mucilage produit est visible en bleu et recouvre la totalité de la surface. Ce mucilage renforce l'adhésion de la microalgue sur la surface.

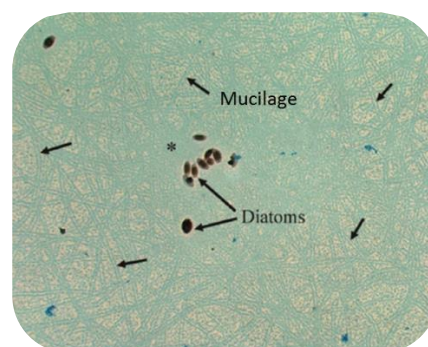


Figure I-6 : Adhésion au bout de 4 heures de la diatomée *A. coffeaeformis* sur une surface en verre et marquage du mucilage produit par le Stain-all® (Molino & Wetherbee., 2008)

Ce genre de mécanisme d'adhésion et de mobilité n'a été mis en évidence que chez certains genres de microalgues comme *Amphora*, *Achnantes*, *Navicula*. Cependant, chez la plupart des espèces, il reste encore inconnu à cause des difficultés de culture en laboratoire.

Toutefois, certaines microalgues modèles ont été étudiées. La souche *Cylindrotheca closterium*, appartenant à l'embranchement des diatomées, possède plusieurs mécanismes de déplacement. *C. closterium* peut se déplacer selon le mode de déplacement « gliding » de façon horizontale à la surface, mais également par rotation horizontale (pirouette)... Les modes de déplacement de *C. closterium* sont visibles sur la Figure I-7.

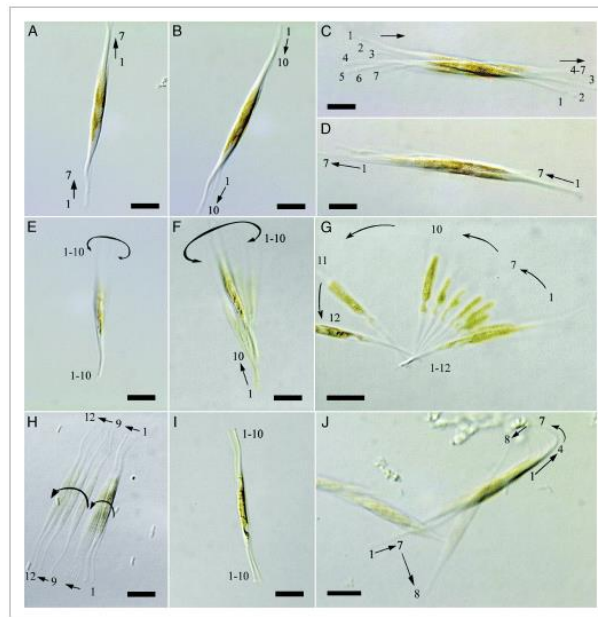


Figure I-7 : Mode de déplacement de la diatomée *C. closterium*, A = glisse sans rotation sur l'axe X ; B = glisse avec rotation sur l'axe X ; C, D = Tire-bouchon « corkscrew » en glissant vers l'avant ou l'arrière ; E = pirouette ; F = pirouette en glissant ; G = pivot ; H, I = « rock and roll » ; J = par flexion (Apoya-Horton *et al.*, 2006)

Apoya-Horton *et al.*, ont montré que des paramètres environnementaux comme la salinité du milieu ou la concentration en nutriments pouvaient impacter la capacité de la microalgue à se déplacer sur la surface (Apoya-Horton *et al.*, 2006).

Dans une étude de Staats *et al.*, les chercheurs se sont intéressés à la composition des EPS produits par deux diatomées : *Navicula salinarum* et *Cylindrotheca closterium*. Pour ces diatomées, les EPS contenaient principalement des polysaccharides sulfatés et non sulfatés ainsi que des protéines et des acides uroniques. Après analyse en chromatographie en phase gazeuse des extraits, les sucres majoritaires présents étaient le glucose et le xylose (Staats *et al.*, 1999). Les biofilms de microalgues formés sont dépendants des paramètres environnementaux puisque la structure du biofilm dépend fortement des exopolymères produits dépendant eux-mêmes des propriétés du milieu (Tolhurst *et al.*,

2008). Les EPS permettent aussi l'adhésion d'autres organismes sur les colonies de microalgues, notamment les bactéries (Becker., 1996 ; Wustman *et al.*, 1997) .

I – A – 5 – Biofilm mixte bactéries - microalgues

Le microfouling joue un rôle important dans la mise en place du macrofouling que ce soit en le facilitant ou le limitant (Dobretsov *et al.*, 2006). Par exemple dans une étude de Dahms *et al.*, l'impact du microfouling impliquant trois souches bactériennes marines (*Pseudoalteromonas* sp., *Vibrio* sp. et une bactérie non identifiée) et cinq souches de diatomées (*Achnantes* sp., *Amphora coffeaeformis*, *Amphora tenerrima*, *Nitzschia frustulum* et *Nitzschia constricta*) a été étudié sur l'adhésion des larves de *Bugula neritina* (bryozoaire). Le développement du microfouling avec une ou plusieurs espèces ainsi que la densité du biofilm mixte formé impacte l'adhésion de *B. neritina*. Le pourcentage d'adhésion est réduit d'environ 25 % lorsqu'un biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. est formé sur la surface. Lorsque qu'une culture mixte entre *Pseudoalteromonas* sp. et *N. frustulum* est réalisée, le biofilm formé à la surface réduit l'adhésion des larves de *B. neritina* d'environ 20 %. Dans d'autres cas, l'ajout d'une seconde bactérie ou l'ajout de la diatomée *A. coffeaeformis*, favorise l'adhésion des larves de *B. neritina* de 5 à 10 % (Dahms *et al.*, 2004).

Plus généralement, il est probable que des liens existent entre les différents organismes du fouling. Une étude de Tait et Havenhand a montré l'implication des molécules de communication bactérienne dans les relations entre bactéries, microalgues et macroorganismes (spores d'*Ulva* ou larves de balanes) (Tait & Havenhand., 2013 ; Tait *et al.*, 2009). Des travaux ont montré qu'une lectine produite par des larves d'invertébrés marins participerait à la reconnaissance du biofilm formé par les microorganismes (Hadfield., 2011).

Il a également été démontré que la production de messagers chimiques : les acyl-homosérine lactones, perturberaient le déplacement des spores d'algue (Wheeler *et al.*, 2006). La N-butanoyl-L-homosérine lactone (C₄-HSL) a été montrée comme régulant la sporulation de l'algue rouge *Acrochaetium* sp. : pour des concentrations de 10 à 100 µM, la sporulation est induite (Weinberger *et al.*, 2007). Le remplacement d'HSL naturelles par des HSL de synthèse ne favorise pas autant l'adhésion des larves (Huang *et al.*, 2007). La production de molécules semblables aux HSL a été identifiée chez des algues, notamment l'algue *Delisea pulchra* qui secrète des furanones (Suga & Smith., 2003). La structure des furanones est présentée sur la Figure I-8.

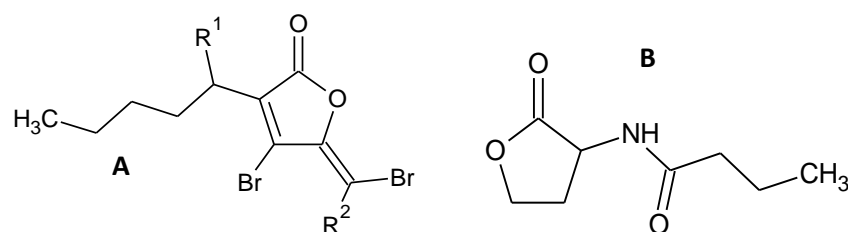


Figure I-8 : Structure des furanones, R = partie variable (A) et du N-butanoyl-L-homosérine lactone (B)

Ces composés sont des analogues de structure des HSL et peuvent inhiber le quorum sensing (Steinberg *et al.*, 1997). Dans l'étude sur l'induction de la sporulation de *Acrochaetium sp.*, l'halofuranone était capable d'inhiber la reconnaissance de la C₄-HSL à des concentrations dix fois plus faibles.

En mettant en évidence des liens entre les microorganismes et les macroorganismes par le biais des homosérines lactones, des bloqueurs de ces messagers chimiques pourraient être de bons candidats pour inhiber la formation du biofilm et par la suite inhiber l'adhésion des larves d'invertébrés, ralentissant alors le biofouling (partie III).

I – A – 6 – Développement du macrofouling

Une fois le biofilm formé par les microorganismes (bactéries et microalgues notamment), les spores d'algues et/ou les larves d'invertébrés adhèrent. Dans le milieu marin, les organismes supérieurs, participant au macrofouling, possèdent différents stades de vie, nécessaires à leur multiplication. Le premier stade de vie larvaire est un mode de vie mobile. Puis les organismes adoptent un mode de vie sessile en se fixant à un substrat. Cette fixation induit des mécanismes de métamorphose, indispensables pour la survie de ces organismes. Cette colonisation se fait en deux étapes, les larves se fixent sur le biofilm formé de façon réversible puis les larves entament leur métamorphose. Le passage au stade adulte des spores/zygotes et larves fait apparaître des macroorganismes comme des algues (*Ulva sp.*), des coquillages (*Mytilus sp.*), des bryozoaires (*Bugula neritina*) (Qian *et al.*, 2003). L'installation des larves et des spores/zygotes de macroalgues dépend des conditions du milieu, notamment de la saison ainsi que des propriétés physico-chimiques et biologiques du milieu environnant. Tous les auteurs ne s'accordent pas sur l'implication du biofilm bactérien sur l'adhésion des organismes supérieurs. Dans certains cas, la présence d'un biofilm favorise le développement alors que dans d'autres cas, les larves et spores peuvent adhérer sur des surfaces dépourvues de biofilm (Patil & Anil., 2005 ; Hadfield., 2011).

Ces macrosalissures peuvent former des couches épaisses pouvant atteindre plusieurs millimètres à centimètres. Cette épaisseur finale est accentuée par le développement des macroalgues.

I – B – Impact sur les activités humaines

La formation de ces salissures marines sur les surfaces immergées provoque de nombreux problèmes économiques et environnementaux (Yebra *et al.*, 2004).

I – B – 1 – Sur l'économie

Le biofouling peut se former sur tout type de surfaces immergées : installations maritimes (hydroliennes, plateformes pétrolières, pipelines, structures portuaires...), sur les coques de bateaux et tous les types d'installation utilisées en aquaculture. Il s'agit d'un phénomène qui touche ainsi de nombreux secteurs économiques : l'industrie navale, l'aquaculture et les particuliers. Les coûts

économiques dû au biofouling sont estimés à plusieurs milliards d'euros par an (Schultz *et al.*, 2011). Les travaux de Dafforn *et al.*, ont estimé à plus de 4 milliards de dollars par an le surcoût mondial dû au biofouling (Dafforn *et al.*, 2011).

L'accumulation de biofouling sur les surfaces immergées augmente la rugosité des surfaces et provoquer une augmentation concomitante des forces de friction. Le maintien de la vitesse des navires induit une surconsommation en carburant pouvant atteindre cinquante pourcents (Löschau & Krätke., 2005). Cette surconsommation de carburant provoque au cours du temps, une augmentation des émissions de gaz comme le dioxyde de carbone, l'oxyde de carbone, le dioxyde de soufre ou le dioxyde d'azote participant au réchauffement global de la planète (Rodrigue., 2006). De plus, un biofilm d'un millimètre peut induire un ralentissement de quinze pourcents de la vitesse d'un navire (Evans., 2003). Cette colonisation de surface favorise également une détérioration accélérée de la coque des navires, appelée biocorrosion. Les microorganismes adhérents et notamment la formation de biofilm par les bactéries sulfato-réductrices (SRB) induit un phénomène électrochimique sur la surface. Cette corrosion correspond à une dégradation accélérée de matériaux conducteurs (Coetser & Cloete., 2005).

Les peintures antifouling limitent ces problèmes en réduisant la cinétique de développement mais les coûts d'entretien dû au carénage et au renouvellement de ces revêtements généralement toxiques restent très élevés. De plus, certaines structures comme les plateformes sont difficiles à nettoyer.

1 – B – 2 – Sur l'environnement

La colonisation de surfaces peut provoquer le déplacement et l'introduction d'espèces invasives pouvant être à l'origine de problèmes écologiques importants (Minchin & Gollasch., 2003). Les navires ou tout type de support colonisé deviennent des vecteurs d'importation de nouvelles espèces. Il a ainsi été dénombré en 2007 que 277 espèces d'algues avaient été introduites dans de nouveaux environnements, dont 77 espèces étaient issues d'une adhésion sur des coques de bateaux (Williams & Smith., 2007).

Un exemple d'espèce invasive introduit par les flux maritimes est *Cordylophora caspia*, un hydrozoaire appartenant à la famille des Cnidaires. Cette espèce est originaire de la mer caspienne mais s'est répandue en mer du Nord, mer Baltique et est aujourd'hui rencontrée sur les côtes de nombreux pays en Europe (Bulgarie, Roumanie, Pologne, Allemagne, France...) mais également en dehors de l'Europe (États-Unis, Canada, Amérique du Sud...) (Wasson *et al.*, 2001).

Un autre exemple d'espèce introduite est l'algue rouge *Grateloupia turuturu*. Cette espèce a été introduite accidentellement lors de l'import de naissains d'huitres. Des spores de *G. turuturu* étaient adhérentes aux naissains. D'origine japonaise, l'algue est aujourd'hui rencontrée sur l'ensemble des côtes européennes et notamment en Bretagne depuis 1990. Cette espèce s'adapte très bien aux

environnements et peut supporter de grandes variations de salinité. Toutefois, cette espèce n'est pas décrite comme ayant causé un impact écologique majeur (Mathieson *et al.*, 2007).

L'introduction de l'éponge *Celtodoryx girardae* dans le Golfe du Morbihan en 1999 s'est traduite par une compétition avec des espèces locales comme des gorgones ou d'autres éponges (Henkel & Janussen., 2011).

I – C – Prévention et moyens de lutte

Afin de lutter contre la formation de ces salissures marines et les dégradations associées sur les surfaces immergées, depuis plus de 2000 ans, l'Homme a mis au point des solutions visant à stopper ou ralentir l'adhésion et le développement des salissures marines sur les surfaces.

I – C – 1 – Historique

Les premières techniques identifiées par les historiens remontent à l'époque de l'antiquité. À cette période, les Phéniciens et Carthaginois, qui étaient pour la plupart navigateurs ou commerçants, utilisaient des clous ou des revêtements à base de cuivre (Yebra *et al.*, 2004).

Une autre civilisation, les vikings luttait contre le biofouling en étalant de la graisse de phoque sur la surface de leurs drakkars. Une multitude de méthodes ont vu le jour dans le passé, à base de métaux (ciment à base de poudre de fer), chaux, cire, goudrons, toile, caoutchouc... Le Tableau I-1 reprend les dates importantes dans la mise en place de stratégies antifouling (Dafforn *et al.*, 2011).

Tableau I-1 : Historique des stratégies antifouling

Dates	Stratégies antifouling et évolution
300 Av J.C - 1500	Utilisation de plaques en cuivre et plomb disposées sur les bateaux en bois
1800 – 1900	Incorporation de métaux lourds (cuivre, arsenic, mercure) dans des peintures, cires
1960	Utilisation du TBT dans les peintures
1974	Problème de croissance sur le développement des huitres
1987 – 1990	Restriction du TBT
1990 – aujourd'hui	Restriction du cuivre au Danemark, USA
2000 – aujourd'hui	Recherche de composés respectueux de l'environnement
2008	Interdiction totale des peintures à base de TBT
Aujourd'hui	Réglementation forte des molécules testées [REACH, réglementation sur les produits biocides (PBR)] en Europe

À partir du XIX^{ème} siècle, les peintures antifouling ont été employées. Elles étaient composées de biocides (substance capable de tuer les organismes colonisateurs) : oxydes de cuivre, mercure ou

arsenic. Ils étaient ajoutés dans des résines, huiles de lin ou du goudron afin d'obtenir un revêtement (Almeida *et al.*, 2007).

À partir des années 1950, divers types de composés actifs sont employés comme les métaux (cuivre, plomb) et notamment les organoétains (tributylétain, TBT). Cependant l'utilisation importante de certains de ces composés a provoqué des problèmes environnementaux majeurs (Alzieu., 1991).

I - C - 2 - Conséquences environnementales

L'utilisation importante du TBT dans les années 70 dans les peintures AF a induit une bioaccumulation de la substance dans les chaînes alimentaires provoquant la mortalité d'espèces marines principalement dans les parcs de conchylicultures. Le TBT a été classé comme perturbateur de la calcification des coquilles d'huîtres. Ce composé nuisait également à la reproduction des huîtres (effet néfaste sur leurs œufs et larves) (His & Robert., 1987). Le TBT s'est révélé être également un perturbateur endocrinien induisant des troubles dans la différenciation sexuelle de mollusques à des teneurs de l'ordre du ng/L (Lee., 1991). Ces composés organostanniques ont la capacité de se dissoudre dans le milieu marin et de subir une dégradation lente permettant aux organismes vivants de les capter. Des traces persistent encore aujourd'hui au sein des sédiments marins (Antizar-Ladislao., 2008).

Suite à ces pollutions et à l'impact économique dans les parcs conchylicoles, l'organisation maritime internationale a interdit l'ajout de composés à base d'étain dans les peintures AF depuis 2008 (Règlement CE n°782/2003) (Gipperth., 2009).

La pression réglementaire s'est ensuite accrue par un règlement européen ayant pour objectif de répertorier l'ensemble des substances dans le but de restreindre leur utilisation. Ce règlement européen (UE 528/2012) a été voté par le parlement européen en 2012. Il classe les substances biocides en fonction de leur utilisation que ce soit en hygiène humaine, ou encore en produit d'entretien pour le bois. Les substances utilisées en AF sont représentées par une dizaine de molécules validées suite à des tests écotoxicologiques, envers la faune et la flore. Actuellement tout produit biocide utilisé par un fabricant de peintures AF doit être déclaré. Pour les nouvelles substances, des tests sont à réaliser afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France et en Europe. Cette AMM est valable pour dix ans. Pour être validés, les composés doivent montrer une absence de toxicité pour l'homme et une absence d'écotoxicité envers l'environnement. Dans ce but, des tests vis-à-vis d'espèces marines référentes appartenant à différents niveaux trophiques sont réalisés (Okamura *et al.*, 2002). Les biocides doivent aussi montrer une efficacité ; leur persistance et dégradation au cours du temps doivent être connues. Après avoir validée une substance, il faut également que la formulation de la peinture comprenant la substance conserve son activité et ne soit pas toxique.

En France, les autorisations sont délivrées par la direction générale de la prévention des risques (DGPR), du ministère de l'écologie et du développement durable et de l'énergie qui valide la substance suite à une évaluation effectuée par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). Le ministère peut aussi demander l'avis de la commission des produits chimiques et biocides (CPCB) pour prendre sa décision.

I - C - 3 - Moyens actuels

Il existe deux types de famille de revêtements AF. La première qui ne contient pas de biocides mais qui agit par effet de surface est appelée « fouling release coatings ». Elle limite la prolifération des organismes colonisateurs en réduisant les énergies d'interaction entre les organismes et les surfaces. Ces revêtements sont principalement basés sur des matrices silicones. La seconde famille contient une molécule active libérée au cours de l'immersion. Ces revêtements, appelés « biocide release coatings », sont basés sur l'effet bioactif des composés (Chambers *et al.*, 2006). Dans cette seconde famille, différents types de matrices sont rencontrés, variant par leur capacité à l'érosion (matrice érodable) ou non (matrice dure) (Figure I-9).

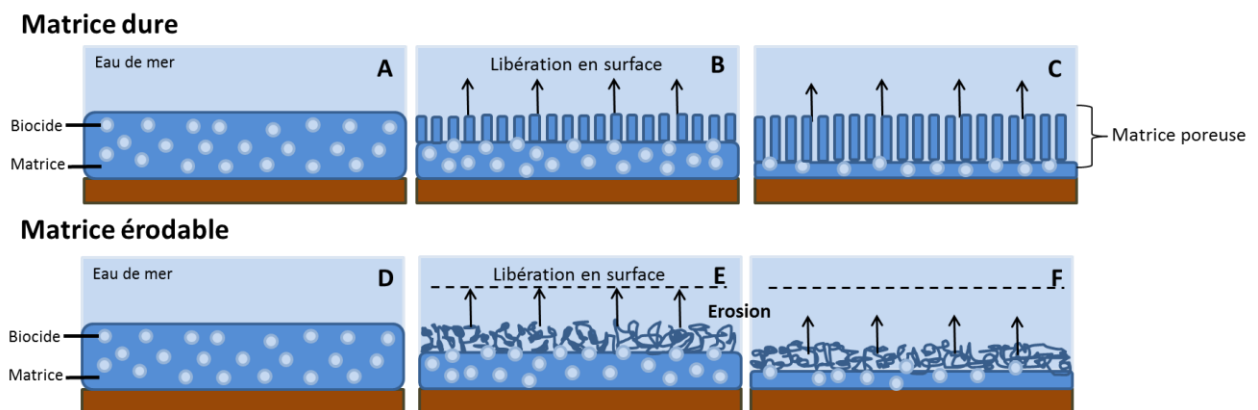


Figure I-9 : Les antifouling « biocide release coatings », schématisation de la libération dans le temps, matrice dure (A, B et C), matrice érodable (D, E et F)

La matrice dure est très peu érodable et nécessite que la peinture soit fortement chargée en biocide afin de prolonger l'efficacité. Dans le cas des matrices érodables, la matrice se décompose facilement libérant progressivement le biocide en surface. Le choix de la matrice appliquée dépend du navire et de sa fréquence d'utilisation.

Actuellement, huit biocides sont autorisés en formulation de peintures AF. Une substance a été interdite récemment (Irgarol) et trois composés sont en attente de validation : le zinc pyrithione, cuivre pyrithione et la médétomidine. Parmi les molécules validées, trois formes de cuivre sont présentes, sept co-biocides mélangés à différentes proportions avec un cuivre et deux composés

pouvant remplacer le cuivre mais possédant des efficacités moindres sont validés ou en cours de validation. Ces composés sont présentés dans le Tableau I-2.

Tableau I-2: Liste des biocides autorisés dans les antifouling

	Nom du biocide	Statut	Remarque
Cuivre	Thiocyanate de cuivre	Approuvé	-
	Oxyde de cuivre	Approuvé	-
	Cuivre métallique	Approuvé	-
Co-biocides	DCOIT (4.5-Dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one)	Approuvé	Usage professionnel uniquement
	Zineb	Approuvé	-
	Cuivre pyrithione	En attente	Usage professionnel uniquement
	Dichlofluaniid	Approuvé	Bateaux > 25 m
	Tolyfluaniid	Approuvé	Interdit en eau douce
	Zinc pyrithione	En attente	-
	Cybutryne/Irgarol	Refusé	-
Substitution au cuivre	Tralopyril (ECONEA)	Approuvé	-
	Médétomidine/Selektope	En attente	Problème de toxicité et de persistance

Suite à l'interdiction de nombreux composés, le cuivre reste la principale substance active utilisée. Trois formes de cuivre sont toujours présentes dans les peintures : le thiocyanate de cuivre, l'oxyde de cuivre et le cuivre métallique, même si des risques environnementaux existent. En effet, les ions Cu^{2+} peuvent se lier à la matière organique ou aux particules en suspension et s'accumuler dans les sédiments marins. Toutefois, ces composés possèdent le meilleur ratio performance/risque et restent les biocides de référence. Si le cuivre venait à être interdit en France, la recherche de substances AF alternative deviendrait urgente. En effet dans d'autres pays comme les États-Unis, le cuivre subit déjà des restrictions sur son utilisation. Par exemple, à San Diego, l'utilisation de cuivre dans les AF a été restreinte et la législation américaine souhaiterait voter une loi d'ici janvier 2018 dans le but d'interdire l'utilisation du cuivre (Lee., 2012).

Aujourd'hui l'enjeu est donc de trouver une alternative à ces composés actifs afin de conserver une activité antisalissure marine avec un impact réduit sur l'environnement. La commercialisation de nouvelles peintures antifouling est donc un réel défi de par la réglementation stricte.

II – L'utilisation de substances d'origine naturelle à activité antifouling

Les organismes marins représentent un immense réservoir de principes bioactifs. Ces composés, souvent des métabolites secondaires, peuvent posséder diverses fonctions comme la protection contre les prédateurs. Ils peuvent intervenir dans la compétition pour des substrats ou dans les mécanismes de survie. Un état de l'art récent montre que 214 composés naturels découverts entre 2009 et 2014 issus du milieu marin présentent une activité AF (Qian *et al.*, 2015). Certaines de ces substances sont présentées dans le Tableau I-3.

Les principaux composés d'origine naturelle possédant des propriétés AF appartiennent à des familles variées : les terpènes, les lipides, les furanones, les alcaloïdes, les oses, ...

Ces composés ont été identifiés chez différentes espèces comme de macroalgues, d'éponges ou de bryozoaires par exemple.

Les éponges sont des organismes très étudiés dans la recherche de principes actifs à activité antimicrobienne ou antibiofilm. La plupart des composés possédant des activités biologiques issus du domaine marin sont des métabolites produits par les éponges. En effet, ces organismes ont été identifiés dans de nombreuses symbioses avec des bactéries ou champignons induisant la production de métabolites secondaires (Taylor *et al.*, 2007).

Une symbiose est définie comme une association entre deux organismes appartenant à des espèces différentes. Les organismes impliqués dans cette association sont qualifiés de symbiotes ou de symbiontes. Cette association apporte un intérêt aux deux organismes qui y participent.

Parmi la centaine de composés isolés chez les éponges, les composés halogénés sont prédominants (Blunt *et al.*, 2016). Les composés bromés identifiés chez des éponges sont connus comme possédant des propriétés AF : des activités d'inhibition de l'adhésion des larves de balanes ont notamment été démontrées. Plusieurs dérivés de bromotyrosines ont été décrits : les pseudocératidines (Tsukamoto *et al.*, 1996b), les cératinamines (Tsukamoto *et al.*, 1996c) et les cératinamides (Tsukamoto *et al.*, 1996d). La présence de groupements halogénés est fréquente dans les composés démontrés comme AF. Cependant, une publication de Fusetani en 2004 présente divers composés non halogénés comme des stéroïdes, des sesquiterpènes ou triterpènes avec des propriétés AF (Fusetani., 2004). Par exemple, l'éponge *Haliclona subarmigera*, isolée au sud de la Chine, produit un stéroïde et un lipide bromé polyinsaturé possédant tous deux des propriétés biologiques (Kong *et al.*, 2016).

Une étude de Drobetsov montre que beaucoup de métabolites possédant des propriétés AF sont identifiés chez les bactéries (Dobretsov *et al.*, 2006). De nombreuses bactéries impliquées dans des symbioses sont responsables des activités antibactériennes, antibiofilm ou AF rencontrées chez ces

organismes. Dans une étude de Shnit-Orland et Kushmaro, il a été montré que 20 % des extraits antibactériens issus de coraux étaient associés à des bactéries (Shnit-Orland & Kushmaro., 2009).

Tableau I-3 : Exemples de composés naturels d'origine marin présentant des propriétés biologiques

	Espèce	Composé	Propriétés	Référence
Algues	<i>Halidrys siliquosa</i>	Méroditerpène	Antifouling	(Culioli <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Grateloupia turuturu</i>	Floridoside, acide iséthionique	Anti-adhésion	(Hellio <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Delisea pulchra</i>	Furanones halogénées	Antifouling, antibactérien, anti-quorum sensing	(Dworjanyn <i>et al.</i> , 2006)
Halophytes	<i>Apocynum venetum</i>	Flavonoïde	Antibiofilm, Antifouling	(Kong <i>et al.</i> , 2014)
Eponges	<i>Agelas mauritiana</i>	Mauritamide	Antifouling	(Tsukamoto <i>et al.</i> , 1996a)
	<i>Agelas</i> sp.	Pyrroles bromés	Antifouling, antibiofilm	(Hertiani <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Luffariella variabilis</i>	Manoalide	Antibiofilm, Anti-inflammatoire	(Ebada <i>et al.</i> , 2010)
Microalgues	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Acide eicosapentaénoïque (EPA) et Acide hexadécatriénoïque (HTA)	Antibactérien	(Desbois <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Porphyridium</i> sp.	Polysaccharides sulfatés	Antibactérien, anti-adhésion	(Guzman-Murillo & Ascencio., 2000)
	<i>Chlorella</i> sp.	Chlorelline	Antimicroalgal	
Bactéries	<i>Shewanella oneidensis</i>	Acide 1-hydroxymyristique, Acide 9-Z-oléique	Inhibition de la germination des spores d' <i>Ulva</i>	(Bhattarai <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>	Métalloprotéase	Inhibition de l'adhésion des balanes	(Dobretsov <i>et al.</i> , 2007)

Plusieurs bactéries appartenant au genre de *Pseudoalteromonas* ont été identifiées comme produisant des composés antibactériens ou antibiofilm. Il y a par exemple la bactérie *Pseudoalteromonas tunicata*, identifiée chez l'algue *Ulva lactuca* en Australie. Cette bactérie a la capacité de produire plusieurs composés extracellulaires inhibant l'adhésion d'autres organismes marins tels que les larves d'invertébrés, spores d'algues, bactéries, champignons ou microalgues (Holmström & Kjelleberg., 1999).

III – Molécules anti-quorum sensing et anti-bioadhésion

L'environnement est une source d'inspiration en matière de moyen de lutte contre le biofouling. En effet, plusieurs types d'activités antifouling ont été décrits dans les années passées. Une étude de Ralston et Swain présente des stratégies biomimétiques pouvant être des modèles utilisables pour répondre à des problématiques de lutte contre le biofouling (Ralston & Swain., 2009). L'étude fait figurer différentes espèces telles que les échinodermes, bryozoaires, éponges, coraux, crustacés, poissons, requins ou encore dauphins possédant des moyens de lutte chimique, physique, mécanique, comportemental ou des combinaisons. À partir de cette étude, une stratégie envisageable est la combinaison d'un nettoyage mécanique (grooming) couplé au relargage d'une substance AF ou d'une surface de type silicone avec une topographie de surface et des propriétés inhibant l'adhésion. Nous nous focaliserons sur l'approche chimique.

Pour les composés communément utilisés, l'activité repose sur une lyse cellulaire. L'utilisation de ces composés dits bactéricides ou algicides induit un risque lié au relargage de ces substances dans l'environnement. Ces composés nocifs pour les organismes marins peuvent avoir des conséquences importantes sur l'écosystème.

Les composés AF actuellement recherchés doivent répondre à plusieurs critères comme une activité non bactéricide, une absence de toxicité, une production à grande échelle... Une des stratégies prometteuses pour la recherche de composés AF respectueux de l'environnement est l'identification de composés inhibant la fixation ou le développement de biofilm sans induire de mortalité.

Des organismes comme les éponges, coraux, poissons ou mammifères marins sont capables de produire des composés chimiques avec différentes cibles biologiques. Une voie possible repose sur l'utilisation d'inhibiteur de la communication de ces espèces. Ces inhibiteurs peuvent agir sur des voies de régulation (Nir & Rech., 2016).

III – A – Les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif, le système de communication connu est le quorum sensing (QS). Le QS a été identifié pour la première fois chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* par la mise en évidence de la production de luminescence (Nealson., 1977). Le QS est défini comme un mode de

communication bactérienne dépendant de la densité cellulaire et reposant sur la synthèse et la perception de petites molécules signal appelées autoinducteurs. Chez les bactéries à Gram négatif, ces autoinducteurs sont généralement des acyl homosérines lactones (HSL). Ces molécules sont produites par des synthases de type I et reconnues par des régulateurs de type R pour former un complexe régulant la transcription de nombreux gènes. Cette signalisation repose sur la perception de la densité cellulaire permettant d'une part, l'activation de comportements coordonnés de populations (production de facteurs de virulence, maturation de biofilms...), mais aussi la production de métabolites secondaires en coordonnant l'expression des gènes concernés. La compréhension de cette régulation chez *V. fischeri* a donné naissance au terme de quorum sensing en 1994 (Fuqua *et al.*, 1994).

III – A – 1 – Le modèle de Quorum sensing chez *Vibrio fischeri*

La bactérie *Vibrio fischeri* est une bactérie marine à Gram négatif. Cette bactérie a été identifiée comme symbionte chez plusieurs animaux marins comme le calamar *Euprymna scolopes*. Cette bactérie est présente dans les organes lumineux de ces animaux (Fuqua *et al.*, 1994).

La luminescence perçue provient de la luciférase qui est produite en réponse à la présence de deux autres protéines : LuxR et LuxI. La protéine LuxI est la synthase permettant la production de l'autoinducteur, une molécule signal de type N-Acyl Homosérine lactone. Ce messenger est excrété en dehors de la cellule. Lorsqu'il atteint une concentration seuil, la molécule entre à nouveau dans la cellule et se fixe à son récepteur LuxR. Le complexe autoinducteur-LuxR induit la transcription du gène *luxCDABE* codant la luciférase et son substrat (Schaefer *et al.*, 1996). La Figure I-10 schématise cette voie de communication chez *V. fischeri*.

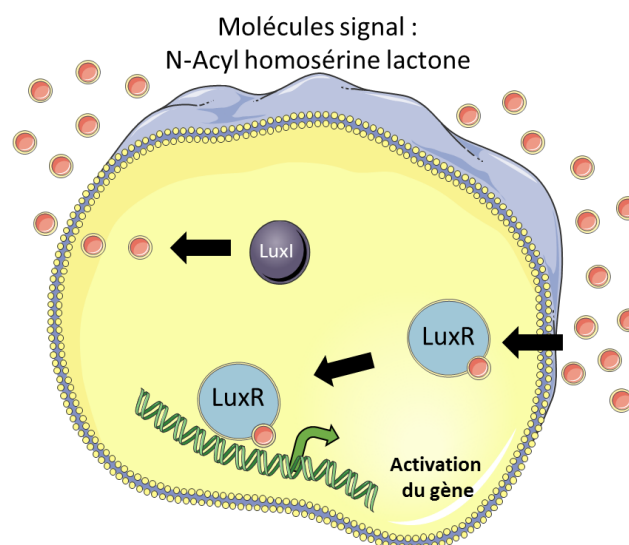


Figure I-10 : Modèle de quorum sensing chez *V. fischeri*

Ce système de régulation a ensuite été identifié chez d'autres bactéries à Gram négatif (Delden *et al.*, 2001). Notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* qui est devenue un modèle d'étude pour la compréhension des voies de régulation du QS (Latifi *et al.*, 1995).

III – A – 2 – Les systèmes Las et Rhl du quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Le premier système de cette régulation chez *P. aeruginosa* débute par la transcription de *lasR* lors de la phase de croissance exponentielle. Ce gène code pour une protéine régulatrice LasR et le gène *lasI* code pour une enzyme, autoinducteur synthase LasI. LasI est nécessaire à la synthèse de la N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂-HSL). La 3-oxo-C₁₂-HSL diffuse librement à l'extérieur de la cellule. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, la 3-oxo-C₁₂-HSL se lie à deux protéines LasR et ce complexe induit la transcription de plusieurs gènes régulant notamment la production d'élastase (Gambello & Iglewski., 1991), de protéases (Gambello *et al.*, 1993) et de systèmes de sécrétion.

Le second système Rhl suit le même schéma. Le gène *rhlR* code pour la protéine RhlR et le gène *rhlI* code pour une enzyme intervenant dans la synthèse de la N-butyryl-L-homosérine lactone (C₄-HSL). De même, la formation du complexe RhlR-C₄-HSL contrôle plusieurs gènes impliqués dans la production de rhamnolipides (Dusane *et al.*, 2010) et de facteurs de virulence comme la pyocyanine ou des exotoxines.

Ces deux systèmes ne sont pas indépendants puisqu'il existe des régulations qui modifient l'activation de gènes. La formation du complexe LasR-3-oxo-C₁₂-HSL induit la transcription des gènes *rhlR* et *rhlI*. Il existe même un système de compétition entre la C₄-HSL et la 3-oxo-C₁₂-HSL vis-à-vis de RhlI. Cette compétition permet un rétrocontrôle de ce système (Latifi *et al.*, 1996). Ces deux systèmes sont représentés sur la Figure I-11.

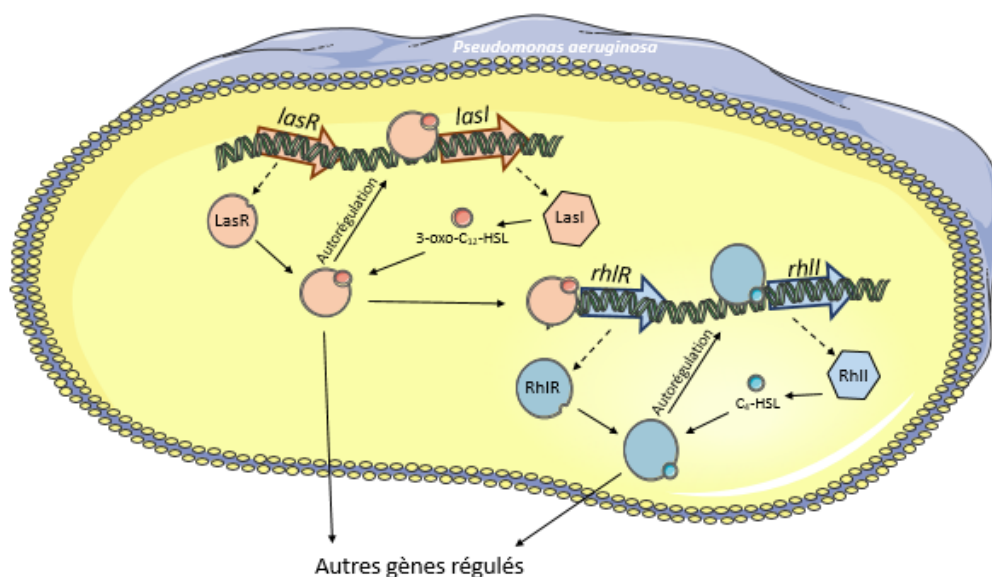


Figure I-11 : Schématisation du système Las et Rhl chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Les molécules de communication de type homosérine lactone n'interviennent pas uniquement dans les reconnaissances avec les récepteur LasR ou RhlR. Ces molécules signal sont aussi impliquées dans des systèmes à deux composants (Bassler., 1999) : la détection des HSL induit la phosphorylation du récepteur activant ou inhibant la transcription de différents gènes. Le phosphate ajouté sur le régulateur de transcription est transféré *via* une histidine kinase membranaire. Chez *P. aeruginosa*, un système à deux composants, constitués de la protéine réceptrice PprA et du régulateur de transcription PprB sont impliqués dans la régulation du QS. L'inactivation du gène *PprB* chez *P. aeruginosa* réduit l'expression des gènes *lasI*, *rhlI* et *rhlR* empêchant l'expression de gènes du QS impliqués dans la virulence ou la mobilité (Dong Y.H *et al.*, 2005).

P. aeruginosa est la bactérie pour laquelle le QS est le plus détaillé. Chez d'autres genres bactériens, des similitudes existent mais beaucoup de systèmes, régulateurs, voies restent à identifier.

Chez les bactéries à Gram négatif, d'autres molécules de communication peuvent intervenir dans les voies de signalisation. Chez *P. aeruginosa*, une production de 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolones aussi appelée PQS « *Pseudomonas* quinolone signal » a été identifiée lors de la phase de croissance exponentielle. Cette production est régulée par le complexe LasR-3-oxo-C₁₂-HSL (Pesci *et al.*, 1999). Dans une étude de McGrath *et al.*, l'ajout de PQS exogène induisait la production de C₄-HSL, tandis qu'une forte concentration en C₄-HSL réprimait la production de PQS (McGrath *et al.*, 2004) . Le système impliquant le PQS est décrit sur la Figure I-12. Le système PQS est connecté au système Las et Rhl *via* les complexes PqsR-HHQ et PqsR-PQS. Le HHQ est la forme précurseur du PQS, sans groupement hydroxyle, les structures sont visibles dans le Tableau I-4.

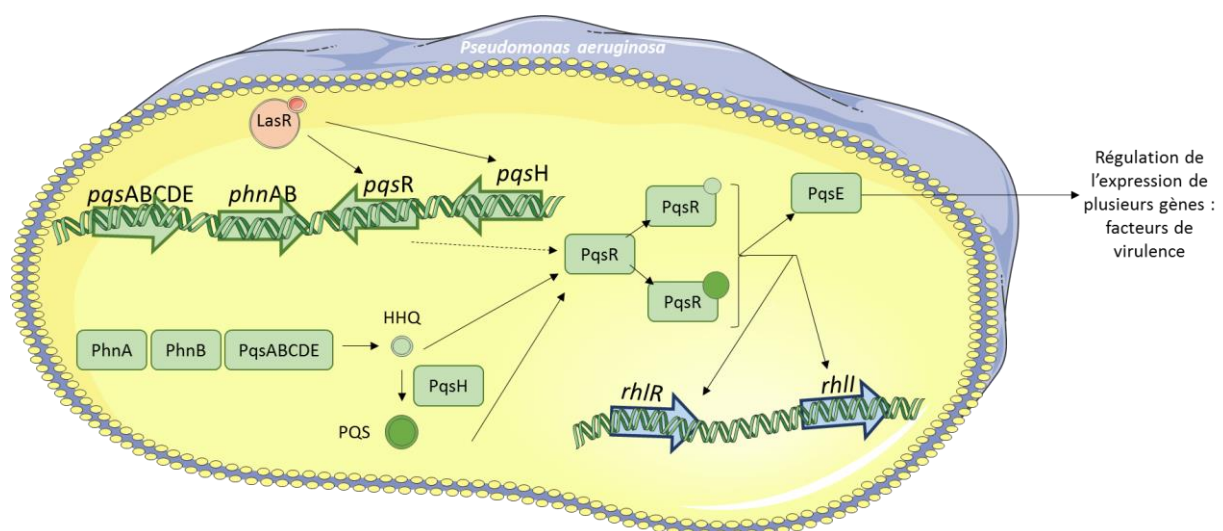
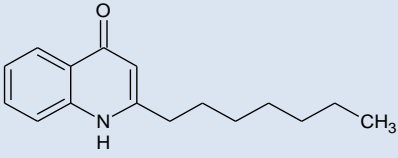
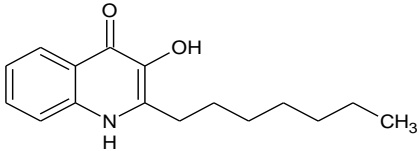


Figure I-12 : Schématisation du système impliquant le « *Pseudomonas* quinolone signal » (PQS) (Papaioannou *et al.*, 2013)

Tableau I-4 - Structures des messagers intracellulaires : le 2-heptyl-4-quinolone (HHQ) et le « *Pseudomonas* quinolone signal » (PQS)

Molécules de communication	Structures
HHQ : 2-heptyl-4-quinolone	
PQS : 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone	

Des dipeptides cycliques (DKP ou diketopiperazine) ont également été identifiés comme molécules signal produites par *P. aeruginosa*. Ces molécules interagiraient sur le système de signalisation LuxR/LuxI en entrant en compétition avec les HSL au niveau du site de liaison avec le récepteur LuxR. Les DKP permettraient l'autorégulation du QS, contrôlant ainsi la production des différentes HSL (Holden *et al.*, 1999). L'expression du gène *pqsR* induit la production du PQS qui peut se lier à son récepteur PsqR régulant la transcription de *psqABCDE*. Ce système permet l'autorégulation des PQS mais régule aussi la transcription de *rhlI* (Gallagher *et al.*, 2002).

La présence de ces nombreux régulateurs dans les voies du QS rend complexe sa compréhension. En effet, il est possible que certaines voies ne soient pas encore décrites ou identifiées.

III – A – 3 – Composés perturbant le quorum sensing

Des composés perturbant la signalisation bactérienne ont déjà été mis en évidence. Des exemples sont présentés dans le Tableau I-5 (Hentzer., 2003 ; Hentzer *et al.*, 2012).

Un exemple de composé ciblant les homosérines lactones repose sur une enzyme de type lactonase produite par la bactérie *Bacillus cereus*. Cette enzyme est capable de cliver les cycles lactones des HSL (Dong & Zhang., 2005). En dégradant les HSL, la reconnaissance avec le récepteur associé n'est plus possible. De plus, le cycle lactone est commun à l'ensemble des homosérines lactones, permettant de cibler la totalité des autoinducteurs de la famille.

D'autres composés sont capables d'inhiber le quorum sensing de part une reconnaissance avec les complexes LasR ou RhlR. La première découverte dans ce domaine est issue du milieu marin. En effet, en 1995, les propriétés antisalissures de l'algue *Delisea pulchra* ont été démontrées (Nys *et al.*, 1995). En 1997, un composé halogéné de type furanone a été identifié chez cette algue (Kjelleberg., 1997). Plus tard des études ont montré que la structure proche entre ce composé furanone et les HSL lui

donnait un rôle d'antagoniste (Manefield *et al.*, 1999). La reconnaissance du composé furanone à la place de l'HSL induit une atténuation de la virulence bactérienne et une réduction de la colonisation bactérienne conduisant à une diminution du biofilm formé (Smith *et al.*, 2002).

Tableau I-5 : Exemples de stratégies antifouling décrites dans la littérature

Inhibiteur du quorum sensing	Origine	Mode d'action	Référence
Lactones, furanones synthétiques ou naturelles	Bactéries, algues	Structure semblable aux HSL	(Kim <i>et al.</i> , 2007 ; Frezza <i>et al.</i> , 2008 ; Estephane <i>et al.</i> , 2008)
Triclosan	Synthèse	Inhibiteur enoyl-ACP reductase	(Hoang & Schweizer., 1999)
S-adénosylcystéine	Bactéries	Inhibition de LuxI	(Parsek <i>et al.</i> , 1999)
Closantel	Synthèse	Inhibiteur de phénol kinase	(Stephenson <i>et al.</i> , 2000)
Curcumin	Végétale	Réduction de la production des HSL	(Rudrappa & Bais., 2008)
Enzymes : lactonase, acylase	Bactéries	Dégradation des HSL	(Dong <i>et al.</i> , 2001 ; Dong & Zhang., 2005)

En connaissant les différentes étapes de régulation des voies de signalisation bactérienne, il est possible d'envisager des stratégies d'inhibition. En effet, en inhibant la communication, d'autres phénotypes sont réprimés comme la formation de biofilm, un phénotype cible intéressant dans la lutte contre le microfouling. De plus, les HSL étant reconnues par d'autres organismes que les bactéries, inhiber leur production ralentirait également le macrofouling (Wheeler *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2016).

III – B – Les bactéries à Gram positif

Après avoir développé largement des modèles de communication chez les bactéries à Gram négatif, depuis quelques années, des études se sont intéressées aux voies de communication chez les bactéries à Gram positif.

Des oligopeptides, appelés phéromones, ont été décrits comme impliqués dans les échanges cellulaires. Les oligopeptides sont des peptides extracellulaires de faible masse molaire (< 10 acides

aminés) intervenant également dans des systèmes à deux composants. Ces molécules de communication sont aussi appelées peptides autoinducteurs (AIP). Les peptides signal de type phéromone sont produits dans la cellule et excrétés. Il s'avère que ce système de communication est actif à de faibles concentrations. Par exemple, chez les bactéries, *Streptomyces thermophilis* et *Streptomyces pneumonia*, des concentrations de 4 à 7 nM ont été quantifiées dans les surnageants (Yang *et al.*, 2010 ; Fleuchot *et al.*, 2013).

Deux voies de reconnaissance ont été identifiées, l'une extracellulaire et l'autre intracellulaire. Les modes de communication sont représentés sur la Figure I-13. Pour la voie extracellulaire, les peptides matures sont reconnus sur la membrane bactérienne par une histidine kinase. La reconnaissance induit la phosphorylation de l'histidine kinase provoquant à son tour la phosphorylation du récepteur impliqué dans le système à deux composants. L'activation du récepteur active la transcription de gènes cibles (Cook & Federle., 2014).

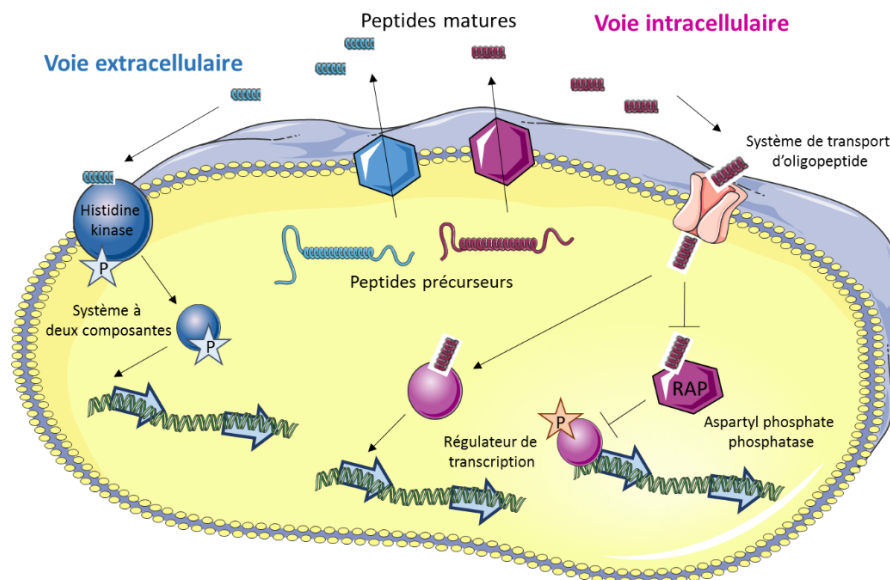


Figure I-13 : Mode de communication chez les bactéries à Gram positif (Monnet *et al.*, 2016)

Pour la seconde voie, dite intracellulaire, les phéromones pénètrent dans la cellule *via* un système de transport d'oligopeptides. Une fois dans la cellule, le peptide active des régulateurs de transcription activant ou inhibant l'expression de divers gènes (Rocha-Estrada *et al.*, 2010). Le peptide une fois dans la cellule peut également inhiber une aspartyl phosphate phosphatase (RAP) inhibant ainsi la phosphorylation de régulateur de transcription et donc l'expression des gènes (Sol & Marina., 2013 ; Monnet *et al.*, 2016).

Comme pour les bactéries à Gram négatif, d'autres molécules signal sont décrites. Ainsi, chez la bactérie *Xanthomonas*, un signal DSF (diffusible signal factor) contenant l'acide *cis*-11-méthyl-2-dodécanoïque a été découvert (Wang *et al.*, 2004). Néanmoins, les structures moléculaires identifiées

sont variables en fonction des genres bactériens. Par exemple, chez les bactéries *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, des γ -butyrolactones ont été identifiées (Choi *et al.*, 2003).

III – C – Connection entre les systèmes de communication des bactéries à Gram positif et à Gram négatif

Les furanosyl borate diesters, aussi nommées AI-2, sont des molécules signal identifiées chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Cette molécule signal pourrait être un moyen de communication entre les deux Gram. Cette inter-communication a été mise en évidence pour la première fois par Surette et Bassler en 1998, entre *Escherichia coli* et *Vibrio harveyi*. Afin de produire l'autoinducteur AI-2, une protéine LuxS a été identifiée chez ces espèces (Surette & Bassler., 1998). Ce signal permettrait la formation de biofilm mixte (Fong *et al.*, 2001). Toutefois, les voies de communication entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif restent peu décrites.

III – D – Implication du quorum sensing dans la formation du biofilm

La communication bactérienne définie par le quorum sensing est un processus qui semble être fortement actif dans les voies de formation du biofilm bactérien. Il a déjà été montré que certaines voies de régulation étaient présentes dans les étapes de croissance, de structuration mais aussi de dispersion du biofilm. Par exemple chez la bactérie *P. aeruginosa*, les systèmes LasR/LasI et RhIR/RhII, précédemment décrits, sont impliqués dans la régulation de gènes activant la formation du biofilm. Dans une étude de Huang *et al.*, environ 30 % des espèces bactériennes identifiées dans des biofilms marins seraient capables de produire des HSL (Huang *et al.*, 2008). Il a également été montré que sous forme de biofilm, en raison de la forte densité cellulaire, les HSL excrétées atteignent plus rapidement les seuils d'activation des voies du QS qu'à l'état planctonique (Parsek & Greenberg., 2005).

Néanmoins, il existe des molécules inhibitrices du QS. Par exemple, dans une étude de O'Loughlin *et al.*, une molécule inhibitrice des récepteurs LasR et RhIR est capable d'induire une diminution du biofilm formé (O'Loughlin *et al.*, 2013).

Ces molécules inhibitrices du système de communication ou du biofilm pourraient être des candidats intéressants dans la lutte contre les salissures marines.

III – E – Technique d'étude du quorum sensing

Pour étudier les voies de signalisation bactériennes ou mettre en évidence des composés perturbant la régulation de gènes ou de protéines du QS, peu de techniques existent.

III – E – 1 – Bactéries biosenseurs ou biorapporteurs

Certaines bactéries produisent des substances détectables et quantifiables en réponse aux voies du QS. Ces bactéries sont appelées biosenseurs ou biorapporteurs et permettent d'évaluer de façon qualitative et/ou quantitative des phénotypes exprimés par le QS. Dans la plupart des cas, ces

perceptions sont assez sensibles de par la faible quantité d'HSL produites (nM à μ M). La reconnaissance des HSL entraîne, par exemple, la production de violacéine chez *Chromobacterium violaceum* ou la production de luminescence chez *Vibrio harveyi* ou *Vibrio fischeri* (Steindler & Venturi., 2007).

Il existe également des souches bactériennes mutantes, dans lesquelles un système de reconnaissance du QS a été inclus par le biais d'un plasmide. Un plasmide est un fragment d'ADN circulaire distinct de l'ADN chromosomique, capable de répllication autonome et pouvant être transmis à d'autres bactéries par le biais de la conjugaison. Il s'agit d'une méthode de transfert unidirectionnel d'ADN plasmidique ou chromosomique entre deux bactéries. Ce transfert est rendu possible à l'aide de *pili*. Les bactéries mutées impliquées dans la reconnaissance de système du QS possèdent un mécanisme phénotypique détectable mais artificiel. Il a ainsi été introduit des gènes produisant de la β -galactosidase (*lacZ*), de la luminescence (*luxCDABE*) ou de la fluorescence verte (*gfp*) (Farrand *et al.*, 2002). Dans la plupart des cas, un gène de résistance à un antibiotique a été ajouté dans le plasmide dans le but de sélectionner les bactéries possédant le plasmide d'intérêt.

De façon générale, les biosenseurs utilisés ne produisent pas d'HSL et nécessitent l'ajout d'HSL exogène afin d'activer le plasmide. Les biosenseurs principalement rencontrés sont les bactéries : *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. tumefaciens*, *V. harveyi* ou *V. fischeri*. Ces biorapporteurs sont souvent utilisés pour la mise en évidence d'une activité anti-quorum sensing. La mise en place du test est simple et peu onéreuse. Cependant, une limite à l'utilisation des biorapporteurs est la gamme de détection d'HSL qui peut être restreinte par la longueur de la chaîne carbonée de l'HSL. Les phénotypes détectés peuvent aussi être perturbés par d'autres voies du métabolisme (McClellan *et al.*, 1997 ; Defoirdt *et al.*, 2013).

III - E - 2 - Étude génétique

Afin de comprendre l'implication de gènes dans les voies de communication bactérienne des études génétiques ont été réalisées. La formation de mutants a permis l'identification de gènes impliqués dans le QS. En désactivant le gène étudié, il est possible de comprendre son rôle et son implication dans le QS.

Les études utilisant les puces à ADN ont permis de mieux comprendre le fonctionnement du QS. Les composés inhibant des gènes du QS ont par exemple été mis en évidence. Ces puces à ADN sont utilisées dans les études du transcriptome afin de pouvoir détecter et quantifier les ARN messagers (ARNm) présents à un instant t.

À partir d'un échantillon, les ARNm sont extraits. Une transcriptase inverse ou rétrotranscriptase couplée à un marquage est effectuée afin d'obtenir les ADN complémentaires (ADNc) totaux et

marqués. Ces ADNc sont ensuite hybridés sur la puce à ADN. Le marquage peut être visualisé par fluorescence ou par radioactivité. En comparant les transcrits de la population témoin avec les transcrits d'une bactérie mutante ou d'une bactérie mise en contact d'un composé inhibant la communication bactérienne, il est possible de déterminer l'impact de la mutation ou du composé. Les données obtenues permettent d'obtenir un profil d'expression et de déterminer les gènes activés ou réprimés (Sчена *et al.*, 1998). Le principe de la puce à ADN est présenté sur la Figure I-14.

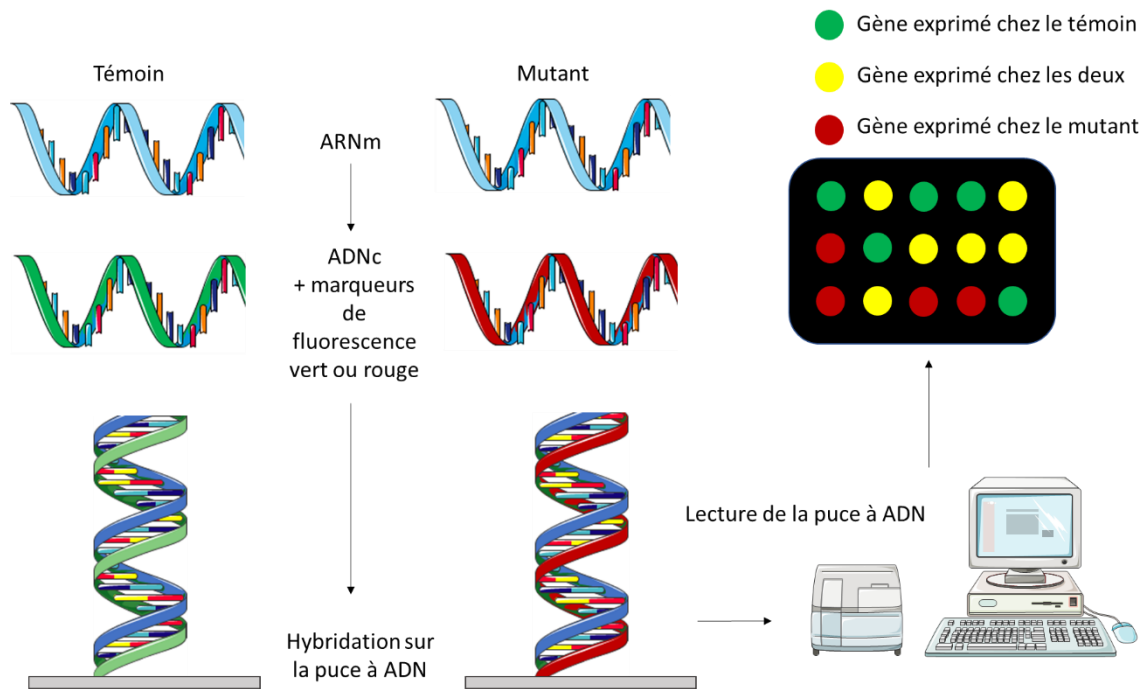


Figure I-14 : Schématisation du principe de la puce à ADN

Ces tests permettent de mieux cibler l'activité d'une molécule sur la transcription des gènes. Néanmoins, ces tests sont plus coûteux et nécessitent plus de temps. Enfin, les étapes d'hybridation peuvent être complexes.

IV – Techniques de mise en évidence de propriétés antifouling

Depuis plusieurs années, des recherches s'intéressent à la mise en évidence de l'activité de composés antifouling. L'activité des molécules peut être étudiée à différents stade du biofouling. Par exemple sur les microorganismes (bactéries, microalgues) ou sur les macroorganismes (larves, spores, invertébrés) (Briand., 2009). Cependant, le stade microfouling est moins étudié que l'installation des larves ou des spores de macroorganismes. En effet, les microorganismes sont moins problématiques dans la lutte contre les salissures marines. Cependant, le développement du microfouling favorise l'installation des organismes supérieurs. De plus, ces organismes se cultivent facilement et rapidement, ce qui les rend intéressants dans le cadre d'une étude en laboratoire.

IV – A – Étude sur le microfouling

Dans le but d'étudier l'impact de substances sur le développement des microorganismes marins notamment envers les bactéries et les microalgues, le test le plus rencontré repose sur un criblage en microplaque (Hellio & Yebra., 2009). Ce genre de test, permet d'évaluer rapidement une multitude de substances sur diverses espèces en quantifiant leur impact sur la croissance ou l'adhésion. Il est possible d'accéder à différentes données comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou la concentration inhibant la croissance ou l'adhésion de 50 % de la population (CI₅₀) (Aguila-Ramírez *et al.*, 2014). L'identification se fait par mesure de densité optique à 600 nm pour les bactéries et par mesure de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 638 - 720 \text{ nm}$) pour les microalgues.

La maturation du biofilm est également détectable par des colorations au Crystal violet. Après formation du biofilm au sein des microplaques, celui-ci est marqué au Crystal violet, solubilisé et quantifié par mesure de la densité optique à 595 nm (Genevaux *et al.*, 1996 ; Coffey & Anderson., 2014). Des variantes de cette méthode existent, les cellules peuvent être marquées par exemple par fluorescence : DAPI (Leroy *et al.*, 2007).

L'utilisation de ces marqueurs permet de quantifier les bactéries adhérees ou formant un biofilm. Cependant l'utilisation de fluorochrome reste onéreuse. De plus, le marquage avec le Crystal violet peut, dans certains cas, fixer le polystyrène de la microplaque et induire de faux positifs. De plus ce test est dépendant du manipulateur, pour ce marqueur, de grands écarts-types sont souvent obtenus.

Les biofilms sont aussi étudiés en condition dynamique, par de tests en chambre à flux. Dans ce système, les bactéries adhérees sur du verre forment un biofilm par le passage d'un flux de milieu nutritif. Les biofilms sont généralement observés en microscopie confocale à balayage laser après un marquage fluorescent. Ce test offre la possibilité de faire apparaître plusieurs éléments du biofilm : protéines, lipides, ADN... Les tests en conditions dynamiques permettent d'obtenir des résultats plus reproductibles et répétables (Tolker-Nielsen & Sternberg., 2014).

Ces tests permettent d'étudier les substances sur des espèces variées. Il s'agit souvent de souches isolées de biofilms formés en conditions naturelles par immersion d'un substrat.

IV – B – Étude sur le macrofouling

La majorité des tests antifouling visent à montrer la capacité de substances à inhiber l'adhésion de larves d'invertébrés comme les balanes (*Balanus amphitrite*), les bryozoaires ou les spores de macroalgues comme *Ulva* sp. (Khandeparker & Anil., 2007).

Le test d'adhésion des larves de balane a été décrit pour la première fois par Rittschof *et al.* Pour ce test, le dernier stade cypris est employé. Les larves sont mises en contact de la molécule testée, puis

un dénombrement des organismes adhérents est réalisé par observations microscopiques (Rittschof *et al.*, 1992).

Pour le bryzoaire *Bugula neritina*, le test est réalisé en microplaque 24 puits. Vingt larves sont ajoutées par puits, puis mises en contact des substances. Pour le cycle de développement des bryzoaires, les larves ont besoin d'adhérer. Après le temps de contact, le nombre de larves métamorphosées et adhérentes sont dénombrés. Ce test permet l'identification des molécules inhibant la métamorphose des larves et donc le développement des bryzoaires (Dobretsov *et al.*, 2007). Le cycle de vie des bryzoaires est présenté sur la Figure I-15.

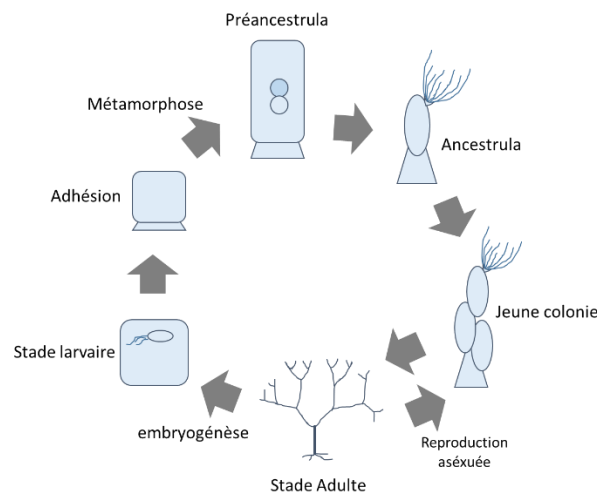


Figure I-15 : Métamorphose du bryzoaire *Bugula neritina*

D'autres organismes modèles utilisés dans l'étude de substances antifouling sont les spores de macroalgues. Ce test vise à étudier la capacité d'une substance à inhiber l'adhésion des spores ou leur germination dans l'objectif d'inhiber le développement de macroalgues. Le genre d'algue le plus rencontré pour ce test est *Ulva* sp. Des extraits de la bactérie *Pseudoalteromonas tunicata* ont ainsi été démontrés comme contrôlant la germination des spores de *Ulva lactuca*. Le taux de germination et le taux d'adhésion sont estimés par observation microscopique (Egan *et al.*, 2001).

Un autre type de test vise à étudier l'impact de substances potentiellement antifouling sur des enzymes intervenant dans les étapes d'adhésion d'invertébrés. Le test enzymatique le plus fréquemment rencontré est celui de la phénoloxydase. Cette enzyme induit chez plusieurs invertébrés marins (balanes, moules) l'oxydation d'acides aminés aromatiques comme la tyrosine ou la phénylalanine induisant la formation d'ortho-di-quinone. Ces réactions permettent la synthèse d'un biopolymère impliqué dans l'adhésion des invertébrés. Chez ces organismes, afin d'empêcher une polymérisation spontanée, la phénoloxydase est présente sous forme de précurseur (pro-

phénoloxydase). Le passage de la forme précurseur à la forme enzymatique est catalysé par diverses protéases contrôlées par un messenger intracellulaire (Ca^{2+}) (Bayer *et al.*, 2011).

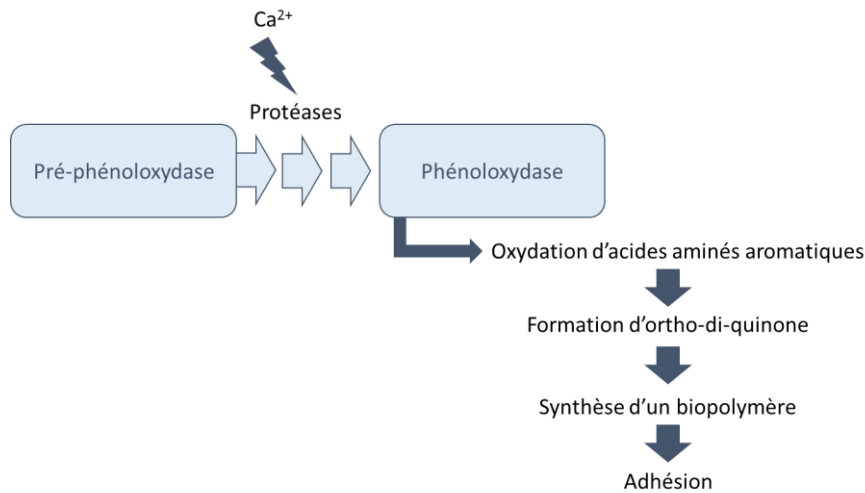


Figure I-16 : Réaction faisant intervenir la phénoloxydase

Pour ce test, l'enzyme est incubée avec son substrat (L-DOPA) et la molécule dont l'activité est évaluée. Le déroulement de la réaction enzymatique est suivi par mesure de densité optique à 475 nm (Hellio *et al.*, 2000).

Ce test enzymatique a permis de mettre en évidence plusieurs inhibiteurs naturels de la phénoloxydase : le quercétine, des flavonoides, la mimosine ou encore l'acide kojique (Chen *et al.*, 1991 ; Kubo *et al.*, 2000 ; Kim & Uyama., 2005 ; Kim *et al.*, 2006).

Les tests réalisés sur les organismes supérieurs permettent d'évaluer l'activité des substances sur plusieurs mécanismes d'adhésion. Cependant, les résultats sont obtenus par des dénombrements en microscopie pouvant être contraignants. En effet, il faut identifier les bons stades larvaires et ces observations peuvent être longues à réaliser. De plus, les mêmes organismes sont souvent utilisés pour ces tests, mais il est probable que des espèces plus sensibles ou plus résistantes soient rencontrées dans la nature.

Conclusion

L'étude bibliographique réalisée dans cette partie a montré l'avancée des recherches dans le domaine de l'antifouling. Depuis de nombreuses années, l'Homme cherche à trouver des solutions afin de limiter le développement de salissures marines sur les structures immergées.

Plusieurs espèces participent à la formation de ces salissures. Deux groupes sont représentés : les microorganismes et les macroorganismes. Des études ont défini les mécanismes mis en place afin de permettre l'adhésion et la formation de biofilm. Sur les biofilms formés, les stades larvaires des organismes supérieurs peuvent se fixer et se développer. Des liens entre ces organismes ont été décrits, notamment par la production de messagers intracellulaires comme les homosérines lactones. Ces HSL sont principalement rencontrées dans la voie de communication bactérienne telle que le quorum sensing. La présence de connections entre micro et macroorganismes pourrait être une cible intéressante de lutte contre le biofouling. En inhibant ces molécules de communication, le biofilm bactéries-microalgues serait inhibé mais également l'adhésion des larves et spores de macroorganismes. Cependant, les voies de communication restent complexes et sont décrites chez quelques espèces seulement.

L'enjeu est aujourd'hui de pouvoir identifier une substance capable d'inhiber l'installation de ces salissures marines mais sans impacter l'environnement. L'utilisation de substances dangereuses et néfastes dans le passé a durci la législation. La réglementation actuelle rend difficile la mise sur le marché de nouveaux composés et de nouvelles formulations. Cette réglementation renforce l'intérêt des approches biomimétiques basées notamment sur la perturbation de la communication inter-organismes.

Au cours de ce doctorat, une centaine de composés a été étudiée. L'activité de deux familles est présentée dans les chapitres suivants. Le chapitre II reprend l'ensemble des tests réalisés sur les bactéries afin de déterminer le potentiel antibactérien (anti-bioadhésion et anti-biofilm) des substances et leur mode d'action. Le chapitre III présente l'activité d'un composé sur l'adhésion et la formation de biofilm de microalgues. Puis le dernier chapitre présente l'intégration de certains composés de la famille des batatasins et des hemibastadines dans des revêtements. Ces films ont ensuite été immergés en conditions naturelles et en conditions contrôlées pour évaluer leur efficacité.

Bibliographie

- Aguila-Ramírez RN, Hernández-Guerrero CJ, González-Acosta B, Id-Daoud G, Hewitt S, Pope J, Hellio C. 2014. Antifouling activity of symbiotic bacteria from sponge *Aplysina gerardogreeni*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 90:64–70.
- Almeida E, Diamantino TC, de Sousa O. 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*. 59:2–20.
- Alzieu C. 1991. Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research*. 32:7–17.
- Alzieu C. 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. *Science of The Total Environment*. 258:99–102.
- An YH, Friedman RJ. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res*. 43:338–348.
- Antizar-Ladislao B. 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environment International*. 34:292–308.
- Apoya-Horton MD, Yin L, Underwood GJC, Gretz MR. 2006. Movement Modalities and Responses to Environmental Changes of the Mudflat Diatom *Cylindrotheca closterium* (bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 42:379–390.
- Baier RE. 1972. Organic films on natural waters: Their retrieval, identification, and modes of elimination. *J Geophys Res*. 77:5062–5075.
- Bassler BL. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*. 2:582–587.
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Cheng X, Hansen C. 2003. Effects of Current Velocity on the Nascent Architecture of Stream Microbial Biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 69:5443–5452.
- Bayer M, Hellio C, Maréchal J-P, Frank W, Lin W, Weber H, Proksch P. 2011. Antifouling Bastadin Congeners Target Mussel Phenoloxidase and Complex Copper(II) Ions. *Mar Biotechnol*. 13:1148–1158.
- Becker K. 1996. Exopolysaccharide production and attachment strength of bacteria and diatoms on substrates with different surface tensions. *Microb Ecol*. 32:23–33.
- Bhattarai HD, Lee YK, Cho KH, Lee HK, Shin HW. 2006. The study of antagonistic interactions among pelagic bacteria: a promising way to coin environmental friendly antifouling compounds. *Hydrobiologia*. 568:417–423.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. 2016. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 33:382–431.
- Briand J-F. 2009. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling*. 25:297–311.
- Cannell RJP. 1993. Algae as a source of biologically active products. *Pestic Sci*. 39:147–153.
- Chambers LD, Stokes KR, Walsh FC, Wood RJK. 2006. Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*. 201:3642–3652.
- Chen JS, Wei C, Rolle RS, Otwell WS, Balaban MO, Marshall MR. 1991. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *J Agric Food Chem*. 39:1396–1401.

- Choi S-U, Lee C-K, Hwang Y-I, Kinoshita H, Nihira T. 2003. Gamma-butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non- *Streptomyces actinomycetes* producing commercially important secondary metabolites. *Arch Microbiol.* 180:303–307.
- Coetser SE, Cloete TE. 2005. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems. *Critical Reviews in Microbiology.* 31:213–232.
- Coffey BM, Anderson GG. 2014. Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods Mol Biol.* 1149:631–641.
- Compère C, Bellon-Fontaine M-N, Bertrand P, Costa D, Marcus P, Poleunis C, Pradier C-M, Rondot B, Walls MG. 2001. Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling.* 17:129–145.
- Cook LC, Federle MJ. 2014. Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *FEMS Microbiol Rev.* 38:473–492.
- Cuevas C, Francesch A. 2009. Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat Prod Rep.* 26:322–337.
- Culioli G, Ortalo-Magné A, Valls R, Hellio C, Clare AS, Piovetti L. 2008. Antifouling Activity of Meroditerpenoids from the Marine Brown Alga *Halidrys siliquosa*. *J Nat Prod.* 71:1121–1126.
- Dafforn KA, Lewis JA, Johnston EL. 2011. Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin.* 62:453–465.
- Dahms H-U, Dobretsov S, Qian P-Y. 2004. The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan *Bugula neritina*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 313:191–209.
- Defoirdt T, Pande GSJ, Baruah K, Bossier P. 2013. The apparent quorum-sensing inhibitory activity of pyrogallol is a side effect of peroxide production. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:2870–2873.
- Delden C van, Comte R, Bally AM. 2001. Stringent Response Activates Quorum Sensing and Modulates Cell Density-Dependent Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 183:5376–5384.
- Desbois AP, Lebl T, Yan L, Smith VJ. 2008. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:755–764.
- Dillon JC, Phuc AP, Dubacq JP. 1995. Nutritional Value of the Alga Spirulina. 77:32–46.
- Dobretsov S, Dahms H-U, Qian P-Y. 2006. Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites. *Biofouling.* 22:43–54.
- Dobretsov S, Xiong H, Xu Y, Levin LA, Qian P-Y. 2007. Novel Antifoulants: Inhibition of Larval Attachment by Proteases. *Mar Biotechnol.* 9:388–397.
- Dong Y-H, Wang L-H, Xu J-L, Zhang H-B, Zhang X-F, Zhang L-H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature.* 411:813–817.
- Dong Y-H, Zhang L-H. 2005. Quorum sensing and quorum-quenching enzymes. *J Microbiol.* 43 Spec No:101–109.
- Dong Y-H, Zhang X-F, Soo H-ML, Greenberg EP, Zhang L-H. 2005. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology.* 56:1287–1301.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Dis.* 8:881–890.

- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15:167–193.
- Dunne WM. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clin Microbiol Rev.* 15:155–166.
- Dusane DH, Zinjarde SS, Venugopalan VP, McLean RJC, Weber MM, Rahman PKSM. 2010. Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 27:159–184.
- Dworjanyn SA, Nys R de, Steinberg PD. 2006. Chemically mediated antifouling in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar Ecol Prog Ser.* 318:153–163.
- Ebada SS, Lin W, Proksch P. 2010. Bioactive Sesterterpenes and Triterpenes from Marine Sponges: Occurrence and Pharmacological Significance. *Marine Drugs.* 8:313–346.
- Egan S, James S, Holmström C, Kjelleberg S. 2001. Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiol Ecol.* 35:67–73.
- Estephane J, Dauvergne J, Soulère L, Reverchon S, Queneau Y, Doutheau A. 2008. N-Acyl-3-amino-5H-furanone derivatives as new inhibitors of LuxR-dependent quorum sensing: Synthesis, biological evaluation and binding mode study. *Bioorg Med Chem Lett.* 18:4321–4324.
- Evans LV. 2003. *Biofilms: Recent Advances in their Study and Control.* CRC press.
- Farrand SK, Qin Y, Oger P. 2002. Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Meth Enzymol.* 358:452–484.
- Filloux A, Vallet I. 2003. Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences.* 19:77–83.
- Flemming H-C, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Micro.* 8:623–633.
- Fleuchot B, Guillot A, Mézange C, Besset C, Chambellon E, Monnet V, Gardan R. 2013. Rgg-Associated SHP Signaling Peptides Mediate Cross-Talk in *Streptococci*. *PLOS ONE.* 8:e66042.
- Fong KP, Chung WO, Lamont RJ, Demuth DR. 2001. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect Immun.* 69:7625–7634.
- Frezza M, Soulère L, Reverchon S, Guiliani N, Jerez C, Queneau Y, Doutheau A. 2008. Synthetic homoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 16:3550–3556.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 176:269–275.
- Fusetani N. 2004. Biofouling and antifouling. *Nat Prod Rep.* 21:94–104.
- Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C. 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 184:6472–6480.
- Gambello MJ, Iglewski BH. 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol.* 173:3000–3009.
- Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH. 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun.* 61:1180–1184.

- Genevaux P, Muller S, Bauda P. 1996. A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiology Letters*. 142:27–30.
- Gipperth L. 2009. The legal design of the international and European Union ban on tributyltin antifouling paint: Direct and indirect effects. *Journal of Environmental Management*. 90, Supplement 1:S86–S95.
- Guzman-Murillo M a., Ascencio F. 2000. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Letters in Applied Microbiology*. 30:473–478.
- Hadfield MG. 2011. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Ann Rev Mar Sci*. 3:453–470.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:228–233.
- Haras D. 2005. Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Mater Tech*. 93:s.27-s.41.
- Hellio C, Bourgougnon N, Gal YL. 2000. Phenoloxidase (E.C. 1.14.18.1) from the byssus gland of *Mytilus edulis*: Purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities. *Biofouling*. 16:235–244.
- Hellio C, Simon-Colin C, Clare A, Deslandes E. 2004. Isethionic Acid and Floridoside Isolated from the Red Alga, *Grateloupia turuturu*, Inhibit Settlement of *Balanus amphitrite* Cyprid Larvae. *Biofouling*. 20:139–145.
- Hellio C, Yebra D. 2009. *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Elsevier.
- Henkel D, Janussen D. 2011. Redescription and new records of *Celtodoryx ciocalyptoides* (Demospongiae: Poecilosclerida)—a sponge invader in the north east Atlantic Ocean of Asian origin? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 91:347–355.
- Hentzer M. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*. 22:3803–3815.
- Hentzer M, Eberl L, Nielsen J, Givskov DM. 2012. Quorum Sensing. *BioDrugs*. 17:241–250.
- Hertiani T, Edrada-Ebel R, Ortlepp S, van Soest RWM, de Voogd NJ, Wray V, Hentschel U, Kozytska S, Müller WEG, Proksch P. 2010. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18:1297–1311.
- Heydorn A, Ersbøll B, Kato J, Hentzer M, Parsek MR, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Molin S. 2002. Statistical Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility, Cell-to-Cell Signaling, and Stationary-Phase Sigma Factor Expression. *Appl Environ Microbiol*. 68:2008–2017.
- Higgins MJ, Molino P, Mulvaney P, Wetherbee R. 2003. The Structure and Nanomechanical Properties of the Adhesive Mucilage That Mediates Diatom-Substratum Adhesion and Motility¹. *Journal of Phycology*. 39:1181–1193.
- His E, Robert R. 1987. Comparative effects of two antifouling paints on the oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol*. 95:83–86.
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. 1993. Diatom Extracellular Polymeric Substances: Function, Fine Structure, Chemistry, and Physiology. *Journal of Phycology*. 29:537–566.

- Hoang TT, Schweizer HP. 1999. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J Bacteriol.* 181:5489–5497.
- Holden MT, Ram Chhabra S, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 33:1254–1266.
- Holmström C, Kjelleberg S. 1999. Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology.* 30:285–293.
- Huang Y-L, Dobretsov S, Ki J-S, Yang L-H, Qian P-Y. 2007. Presence of Acyl-Homoserine Lactone in Subtidal Biofilm and the Implication in Larval Behavioral Response in the Polychaete *Hydroides elegans*. *Microb Ecol.* 54:384–392.
- Huang Y-L, Ki J-S, Lee OO, Qian P-Y. 2008. Evidence for the dynamics of Acyl homoserine lactone and AHL-producing bacteria during subtidal biofilm formation. *ISME J.* 3:296–304.
- Kaplan JB. 2010. Biofilm Dispersal. *J Dent Res.* 89:205–218.
- Katsikogianni M, Missirlis YF. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater.* 8:37–57.
- Khandeparker L, Anil AC. 2007. Underwater adhesion: The barnacle way. *International Journal of Adhesion and Adhesives.* 27:165–172.
- Kim D, Park J, Kim J, Han C, Yoon J, Kim N, Seo J, Lee C. 2006. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem.* 54:935–941.
- Kim JS, Kim YH, Seo YW, Park S. 2007. Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 12:308.
- Kim S-K, Wijesekara I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods.* 2:1–9.
- Kim Y-J, Uyama H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci.* 62:1707–1723.
- Kjelleberg S. 1997. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquatic Microbial Ecology.* 13:85–93.
- Kong C-J, Li L, Chen M, Cao F, Wang C-Y. 2016. Brominated Polyunsaturated Lipids and Steroids from the South China Sea Sponge *Haliclona subarmigera*. *Chemistry of Natural Compounds.* 5:883–885.
- Kong N-N, Fang S-T, Liu Y, Wang J-H, Yang C-Y, Xia C-H. 2014. Flavonoids from the halophyte *Apocynum venetum* and their antifouling activities against marine biofilm-derived bacteria. *Nat Prod Res.* 28:928–931.
- Kubo I, Kinst-Hori I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sánchez Y, Ogura T. 2000. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg Med Chem.* 8:1749–1755.
- Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology.* 21:1137–1146.

- Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GSAB, Lazdunski A, Williams P. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecular Microbiology*. 17:333–343.
- Lee B. 2012. Washington state phases out copper-based bottom paint: what the legislation means for you and what the alternatives are | Clean Boating Foundation. Article online.
- Lee RF. 1991. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Marine Environmental Research*. 32:29–35.
- Leroy C, Delbarre-Ladrat C, Ghillebaert F, Rochet MJ, Compère C, Combes D. 2007. A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents. *Lett Appl Microbiol*. 44:372–378.
- Löschau M, Krätke R. 2005. Efficacy and toxicity of self-polishing biocide-free antifouling paints. *Environmental Pollution*. 138:260–267.
- Macedo MF, Miller AZ, Dionísio A, Saiz-Jimenez C. 2009. Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean Basin: an overview. *Microbiology*. 155:3476–3490.
- Manefield M, de Nys R, Naresh K, Roger R, Givskov M, Peter S, Kjelleberg S. 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*. 145:283–291.
- Mao T., Water J, Gershwin M. 2005. Effects of a Spirulina-Based Dietary Supplement on Cytokine Production from Allergic Rhinitis Patients. *Journal of Medicinal Food*. 8:27–30.
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14:217–232.
- Mathieson AC, Dawes CJ, Pederson J, Gladych RA, Carlton JT. 2007. The Asian red seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta) invades the Gulf of Maine. *Biol Invasions*. 10:985–988.
- Mazo VK, Gmoshinski IV, Zorin SN. 2007. New food sources of essential trace elements produced by biotechnology facilities. *Biotechnology Journal*. 2:1297–1305.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, et al. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*. 143:3703–3711.
- McGrath S, Wade DS, Pesci EC. 2004. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett*. 230:27–34.
- Minchin D, Gollasch S. 2003. Fouling and Ships' Hulls: How Changing Circumstances and Spawning Events may Result in the Spread of Exotic Species. *Biofouling*. 19:111–122.
- Mitbavkar S, Anil AC. 2004. Vertical migratory rhythms of benthic diatoms in a tropical intertidal sand flat: influence of irradiance and tides. *Marine Biology*. 145:9–20.
- Mitbavkar S, Anil AC. 2007. Species interactions within a fouling diatom community: roles of nutrients, initial inoculum and competitive strategies. *Biofouling*. 23:99–112.
- Molino PJ, Hodson OM, Quinn JF, Wetherbee R. 2006. Utilizing QCM-D to Characterize the Adhesive Mucilage Secreted by Two Marine Diatom Species in-Situ and in Real-Time. *Biomacromolecules*. 7:3276–3282.
- Molino PJ, Wetherbee R. 2008. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling*. 24:365–379.

- Monnet V, Juillard V, Gardan R. 2016. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 42:339–351.
- Morais MG, Vaz B da S, de Morais EG, Costa JAV. 2015. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*. 2015:1–15.
- Nealson KH. 1977. Autoinduction of bacterial luciferase. *Arch Microbiol*. 112:73–79.
- Nir S, Reches M. 2016. Bio-inspired antifouling approaches: the quest towards non-toxic and non-biocidal materials. *Current Opinion in Biotechnology*. 39:48–55.
- Nys RD, Steinberg PD, Willemsen P, Dworjanyn SA, Gabelish CL, King RJ. 1995. Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*. 8:259–271.
- Okamura H, Watanabe T, Aoyama I, Hasobe M. 2002. Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere*. 46:945–951.
- O’Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack MF, Bassler BL. 2013. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *PNAS*. 110:17981–17986.
- Papaioannou E, Utari PD, Quax WJ. 2013. Choosing an Appropriate Infection Model to Study Quorum Sensing Inhibition in *Pseudomonas* Infections. *Int J Mol Sci*. 14:19309–19340.
- Parsek MR, Greenberg EP. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol*. 13:27–33.
- Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Greenberg EP. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *PNAS*. 96:4360–4365.
- Patil JS, Anil AC. 2005. Influence of diatom exopolymers and biofilms on metamorphosis in the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar Ecol Prog Ser*. 301:231–245.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:11229–11234.
- Plouguerné E. 2006. Étude écologique et chimique de deux algues introduites sur les côtes bretonnes, *Grateloupia turuturu* Yamada et *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt : nouvelles ressources biologiques de composés à activité antifouling. Doctoral dissertation, Brest.
- Pratt R. 1948. Studies on *Chlorella vulgaris*. XI. Relation between Surface Tension and Accumulation of Chlorellin. *American Journal of Botany*. 35:634–637.
- Qian P, Thiyagarajan V, Lau SCK, Cheung SCK. 2003. Relationship between bacterial community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*. *Aquat Microb Ecol*. 33:225–237.
- Qian P-Y, Li Z, Xu Y, Li Y, Fusetani N. 2015. Mini-review: marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009-2014. *Biofouling*. 31:101–122.
- Ralston E, Swain G. 2009. Bioinspiration—the solution for biofouling control? *Bioinspir Biomim*. 4:015007.
- Raposo MF de J, de Morais RMSC, Bernardo de Morais AMM. 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*. 11:233–252.
- Rittschof D, Clare AS, Gerhart DJ, Mary SA, Bonaventura J. 1992. Barnacle in vitro assays for biologically active substances: Toxicity and Settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite* darwin. *Biofouling*. 6:115–122.

- Rocha-Estrada J, Aceves-Diez AE, Guarneros G, de la Torre M. 2010. The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87:913–923.
- Rodrigue J-P. 2006. Transportation and the Geographical and Functional Integration of Global Production Networks. *Growth and Change.* 37:510–525.
- Ruby EG, Lee K-H. 1998. The *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* Light Organ Association: Current Ecological Paradigms. *Appl Environ Microbiol.* 64:805–812.
- Rudrappa T, Bais HP. 2008. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *J Agric Food Chem.* 56:1955–1962.
- Salta M, Wharton JA, Blache Y, Stokes KR, Briand J-F. 2013. Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environ Microbiol.* 15:2879–2893.
- Satheesh S, Ba-akdah MA, Al-Sofyani AA. 2016. Natural antifouling compound production by microbes associated with marine macroorganisms — A review. *Electronic Journal of Biotechnology.* 21:26–35.
- Schaefer AL, Hanzelka BL, Eberhard A, Greenberg EP. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J Bacteriol.* 178:2897–2901.
- Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology.* 16:301–306.
- Schultz MP, Bendick JA, Holm ER, Hertel WM. 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling.* 27:87–98.
- Sharma NK, Rai AK. 2010. Biodiversity and biogeography of microalgae: progress and pitfalls. *Environ Rev.* 19:1–15.
- Shnit-Orland M, Kushmaro A. 2009. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiology Ecology.* 67:371–380.
- Simões M, Simões LC, Vieira MJ. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology.* 43:573–583.
- Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. 2002. The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-Homoserine Lactone Contributes to Virulence and Induces Inflammation In Vivo. *J Bacteriol.* 184:1132–1139.
- Sol FG del, Marina A. 2013. Structural Basis of Rap Phosphatase Inhibition by Phr Peptides. *PLOS Biology.* 11:e1001511.
- Staats N, Winder BD, Stal L, Mur L. 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology.* 34:161–169.
- Steinberg PD, Schneider R, Kjelleberg S. 1997. Chemical defenses of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation.* 8:211–220.
- Steindler L, Venturi V. 2007. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett.* 266:1–9.
- Stephenson K, Yamaguchi Y, Hoch JA. 2000. The mechanism of action of inhibitors of bacterial two-component signal transduction systems. *J Biol Chem.* 275:38900–38904.
- Stewart PS. 1993. A model of biofilm detachment. *Biotechnol Bioeng.* 41:111–117.

- Suga H, Smith KM. 2003. Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Current Opinion in Chemical Biology*. 7:586–591.
- Surette MG, Bassler BL. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *PNAS*. 95:7046–7050.
- Tait K, Havenhand J. 2013. Investigating a possible role for the bacterial signal molecules N-acylhomoserine lactones in *Balanus improvisus* cyprid settlement. *Mol Ecol*. 22:2588–2602.
- Tait K, Williamson H, Atkinson S, Williams P, Cámara M, Joint I. 2009. Turnover of quorum sensing signal molecules modulates cross-kingdom signalling. *Environmental Microbiology*. 11:1792–1802.
- Taylor MW, Radax R, Steger D, Wagner M. 2007. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71:295–347.
- Thomas TRA, Kavlekar DP, LokaBharathi PA. 2010. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review. *Marine Drugs*. 8:1417–1468.
- Tolhurst TJ, Consalvey M, Paterson DM. 2008. Changes in cohesive sediment properties associated with the growth of a diatom biofilm. *Hydrobiologia*. 596:225–239.
- Tolker-Nielsen T, Sternberg C. 2014. Methods for Studying Biofilm Formation: Flow Cells and Confocal Laser Scanning Microscopy. In: Filloux A, Ramos J-L, editors. *Pseudomonas Methods and Protocols* p. 615–629.
- Tsukamoto S, Kato H, Hirota H, Fusetani N. 1996b. Pseudoceratidine: A new antifouling spermidine derivative from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron Letters*. 37:1439–1440.
- Tsukamoto S, Kato H, Hirota H, Fusetani N. 1996c. Ceratinamine: An Unprecedented Antifouling Cyanoforamide from the Marine Sponge *Pseudoceratina purpurea*. *J Org Chem*. 61:2936–2937.
- Tsukamoto S, Kato H, Hirota H, Fusetani N. 1996d. Ceratinamides A and B: New antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. *Tetrahedron*. 52:8181–8186.
- Tsukamoto S, Kato H, Hirota H, Fusetani N. 1996a. Mauritiamine, a New Antifouling Oroidin Dimer from the Marine Sponge *Agelas mauritiana*. *J Nat Prod*. 59:501–503.
- Underwood GJC, Paterson DM. 2003. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipellic diatoms. In: *Research B-A in B*, editor. Vol. 40. p. 183–240.
- Wahl M. 1989. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*. 58, 175-189.
- Wahl M. 2008. Ecological lever and interface ecology: epibiosis modulates the interactions between host and environment. *Biofouling*. 24:427–438.
- Wahl M, Lafargue F. 1990. Marine epibiosis. *Oecologia*. 82:275–282.
- Wang L-H, He Y, Gao Y, Wu JE, Dong Y-H, He C, Wang SX, Weng L-X, Xu J-L, Tay L, et al. 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol Microbiol*. 51:903–912.
- Wang Y, Chen Y, Lavin C, Gretz MR. 2000. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). iv. ultrastructure of *Achnanthes longipes* and *Cymbella cistula* as revealed by high-pressure freezing/freezing substitute and cryo-field emission scanning electron microscopy. *Journal of Phycology*. 36:367–378.

- Wasson K, Zabin CJ, Bedinger L, Cristina Diaz M, Pearse JS. 2001. Biological invasions of estuaries without international shipping: the importance of intraregional transport. *Biological Conservation*. 102:143–153.
- Weinberger F, Beltran J, Correa JA, Lion U, Pohnert G, Kumar N, Steinberg P, Kloareg B, Potin P. 2007. Spore Release in *Acrochaetium* Sp. (rhodophyta) Is Bacterially Controlled¹. *Journal of Phycology*. 43:235–241.
- Wheeler GL, Tait K, Taylor A, Brownlee C, Joint I. 2006. Acyl-homoserine lactones modulate the settlement rate of zoospores of the marine alga *Ulva intestinalis* via a novel chemokinetic mechanism. *Plant Cell Environ*. 29:608–618.
- Williams SL, Smith JE. 2007. A Global Review of the Distribution, Taxonomy, and Impacts of Introduced Seaweeds. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 38:327–359.
- Wustman BA, Gretz MR, Hoagland KD. 1997. Extracellular Matrix Assembly in Diatoms (Bacillariophyceae) (I. A Model of Adhesives Based on Chemical Characterization and Localization of Polysaccharides from the Marine Diatom *Achnanthes longipes* and Other Diatoms). *Plant Physiol*. 113:1059–1069.
- Yang C, Fang S, Chen D, Wang J, Liu F, Xia C. 2016. The possible role of bacterial signal molecules N-acyl homoserine lactones in the formation of diatom-biofilm (*Cylindrotheca* sp.). *Marine Pollution Bulletin*. 107:118–124.
- Yang J, Evans BA, Rozen DE. 2010. Signal diffusion and the mitigation of social exploitation in pneumococcal competence signalling. *Proc Biol Sci*. 277:2991–2999.
- Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K. 2004. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*. 50:75–104.
- Zimmer R, Butman C. 2000. Chemical signaling processes in the marine environment. *The Biological Bulletin*. 198:168–187.
- Zobell CE. 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity¹. *J Bacteriol*. 46:39–56.

Chapitre II

Étude de l'activité antibactérienne de composés naturels et d'analogues de structure

TABLE DES ILLUSTRATIONS	50
INTRODUCTION.....	53
MATERIELS ET METHODES.....	56
I – Culture et caractérisation des souches bactériennes	56
I – A – Souches et milieux de culture.....	56
I – B – Conditions de croissance	57
I – C – Cinétiques bactériennes	57
I – D – Caractérisation des souches bactériennes	57
I – D – 1 – Microscopie électronique à balayage.....	57
I – D – 2 – Dosage des molécules de communication de type Acyl-homosérine lactone (HSL)	58
II – Criblage de l'activité antibactérienne et anti-adhésion en microplaque	58
III – Étude du mode d'action des molécules	59
III – A – Communication bactérienne	60
III – A – 1 – Mise en évidence des propriétés anti-quorum sensing	60
Impact de la nature de la chaîne carbonée de l'homosérine lactone	60
III – A – 2 – Validation de l'absence d'activité du DBHB sur la production de luminescence.....	62
III – B – Mobilité bactérienne	63
III – C – Adhésion et formation de biofilm en conditions dynamiques	64
III – C – 1 – Impact des composés sur l'adhésion bactérienne.....	66
Ajout du composé lors de l'injection bactérienne.....	66
Conditionnement du support par le composé.....	66
III – C – 2 – Impact des composés sur le biofilm bactérien	66
Effet des composés sur la formation du biofilm	67
Effet des composés sur un biofilm formé.....	67
III – D – Impact des composés sur la viabilité cellulaire des bactéries.....	67
RESULTATS ET DISCUSSION.....	69

I – Caractérisation des souches bactériennes	69
I – A – Cinétiques bactériennes	69
I – B – Caractérisation des souches bactériennes.....	70
II – Criblage de l’activité antibactérienne et anti-adhésion en microplaque	71
II – A – Molécules de référence.....	71
II – B – Famille des Batatasins (BAT)	73
II – B – 1 – Groupe 1	73
II – B – 2 – Groupe 2	76
II – C – Famille des hemibastadines.....	78
II – C – 1 – Groupe 1	78
II – C – 2 – Groupe 2	81
III – Étude du mode d’action des molécules	83
III – A – Communication bactérienne	84
III – A – 1 – Détermination du potentiel anti-quorum sensing.....	84
Impact des molécules sur la reconnaissance HSL – récepteur.....	84
Impact des molécules sur la reconnaissance HSL-récepteur en faisant varier la nature de la chaîne carbonée de l’homosérine lactone.....	86
III – A – 2 – Validation de l’absence d’activité du DBHB sur la biosynthèse de luminescence	89
III – B – Impact des composés sur la mobilité bactérienne	91
Composés de la famille des batatasins (BAT).....	91
Composés de la famille des hemibastadines	92
III – C – Adhésion et formation de biofilm	92
III – C – 1 – Impact des composés sur l’adhésion bactérienne.....	93
Ajout des composés dans la suspension bactérienne	93
Conditionnement du support par le composé	94
III – C – 2 – Impact des composés sur la formation du biofilm.....	95
Bactéries à Gram négatif, produisant des homosérines lactones : <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et <i>Paracoccus</i> sp. 4M6	95
Étude des composés NBHB et DBHB sur la formation de biofilm par la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	95
Étude des composés NBHB et DBHB sur la formation de biofilm par la bactérie <i>Paracoccus</i> sp. 4M697	
Étude de l’impact du composé DBHB sur la formation d’un biofilm par une bactérie à Gram négatif ne produisant pas d’homosérine lactone : <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6	99
Étude de l’impact du composé DBHB sur la formation d’un biofilm par une bactérie à Gram positif : <i>Bacillus</i> sp. 4J6	100
III – C – 3 – Impact des composés sur un biofilm préformé.....	101
III – D – Influence des composés sur la viabilité cellulaire	103
CONCLUSION	105
BIBLIOGRAPHIE	107

Table des illustrations

Liste des figures

Figure II-1 : Structure du batatasin naturel (A), extrait d' <i>Empetrum hermaphroditum</i> (B).....	53
Figure II-2 : Structure commune au bastadine (A) naturellement présent chez <i>lanthella basta</i> (B).....	54
Figure II-3 : Montage du système de chambre à flux.....	65
Figure II-4 : Schématisation de la chambre à flux.....	65
Figure II-5 : Schématisation de l'injection dans la chambre à flux.....	65
Figure II-6 : Cinétiques bactériennes pendant 30 heures ((log(DO _{600nm} *100) en fonction du temps).....	69
Figure II-7 : Observation en microscopie électronique à balayage des bactéries <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 (A), <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6 (B), <i>Vibrio</i> sp. D66 (C) et <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (D).....	70
Figure II-8 : Cinétique de la reconnaissance HSL-récepteur plasmidique de la souche pSB401 en présence des composés BAT 47 (A), BAT 97 (B), NBHB (C) et DBHB (D) à 5, 10 et 50 µg/mL en fonction du temps.....	85
Figure II-9 : Structure de l'acide kojique (A) et de la C ₆ -HSL (B).....	86
Figure II-10 : Cinétique de reconnaissance HSL-récepteur induisant la production de luminescence pour pSB401 avec ajout de l'acide kojique à 5 µg/mL.....	86
Figure II-11 : Cinétique de luminescence produite lors de la reconnaissance HSL-récepteur en fonction de l'ajout de DBHB à 50 µg/mL et en fonction du temps (A : 6 carbones, B : 8 carbones, C : 10 carbones).....	87
Figure II-12 : Structure du composé Fur-5.....	88
Figure II-13 : Cinétique de production de luminescence par le biorapporteur <i>V. harveyi</i> JAF548 en présence et en absence du DBHB testé à 5, 10, 50, 100 et 200 µg/mL.....	90
Figure II-14 : Cinétique de production de luminescence par le biorapporteur <i>V. harveyi</i> JAF548 en présence et en absence de l'acide kojique testé à 5, 10 et 50 µg/mL.....	90
Figure II-15 : Diamètre de migration du swimming, swarming et twitching de PAO1 en présence des composés de la famille des BAT.....	91
Figure II-16 : Diamètre de migration du swimming, swarming ou twitching de PAO1 en présence des composés de la famille des hemibastadine à 10 µg/mL.....	92
Figure II-17 : Observation de l'adhésion après 2 heures lors de l'injection de NBHB et de DBHB simultanément à la suspension bactérienne avec les pourcentages de recouvrement (%) déterminés par le programme JAVA. Condition témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E) et ajout de DBHB (C et F).....	93
Figure II-18 : Observation en MCBL de l'adhésion bactérienne après conditionnement à 10 µg/mL par le NBHB ou le DBHB avec les pourcentages de recouvrement (%) déterminés par le programme JAVA. Condition témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E), ajout de DBHB (C et F).....	94
Figure II-19 : Observation des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en MCBL lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin.....	95
Figure II-20 : Observation des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en MCBL lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin.....	96
Figure II-21 : Observation des biofilms de <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 en MCBL lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin.....	97

Figure II-22 : Observation des biofilms de <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 en MCBL lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin.....	98
Figure II-23 : Structure de l'oroidin (A) et du DBHB (B).....	99
Figure II-24 : Observations des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 avec ou sans ajout de NBHB et DBHB à 10 µg/mL sur le biofilm déjà formé, Témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E), ajout de DBHB (C et F). Les valeurs indiquées représentent le pourcentage de cellules détachées après traitement par le DBHB des biofilms préformés.....	101
Figure II-25 : Biomasses des biofilms de <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 et <i>P. aeruginosa</i> PAO1 après injection des composés NBHB et DBHB à 10 µg/mL sur un biofilm formé (Test ANOVA, *p< 0,01).....	102
Figure II-26 : Marquage Syto/Sytox des biofilms de <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 et <i>P. aeruginosa</i> PAO1 lors de l'ajout de NBHB et DBHB à 10 µg/mL dans le flux de milieu nutritif à 150 µL/min, condition témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E), ajout de DBHB (C et F).....	103
Figure II-27 : Bilan des activités de la molécule DBHB décrites dans ce chapitre II et dans la littérature.....	106

Liste des tableaux

Tableau II-1 : Homosérines lactones testées pour l'évaluation de l'activité anti-quorum sensing.....	61
Tableau II-2 : Ensemble des informations apportées par les biorapporteurs utilisés.....	63
Tableau II-3 : Caractérisation des souches bactériennes : taille moyenne, temps de génération, rapport DO/densité cellulaire et l'identification des HSL produits.....	71
Tableau II-4 : Structures chimiques des molécules de référence.....	72
Tableau II-5 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices des molécules de référence (µg/mL) contre les souches bactériennes (<i>Paracoccus</i> sp. 4M6, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6, <i>Vibrio</i> sp. D66 et <i>P. aeruginosa</i> PAO1).....	72
Tableau II-6 : Structure des composés du groupe 1 de la famille des batatasins.....	73
Tableau II-7 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices (µg/mL) pour les quatre souches bactériennes (<i>Paracoccus</i> sp. 4M6, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6, <i>Vibrio</i> sp. D66 et <i>P. aeruginosa</i> PAO1) avec les composés du groupe 1 de la famille des batatasins.....	74
Tableau II-8 : Structures des composés dérivés de bibenzyl isolés des orchidées <i>Epidentrum rigidum</i> et <i>Nidema boothii</i>	75
Tableau II-9 : Structure des composés du groupe 2 de la famille des batatasins.....	76
Tableau II-10 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices (µg/mL) contre les quatre souches bactériennes (<i>Paracoccus</i> sp. 4M6, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6, <i>Vibrio</i> sp. D66 et <i>P. aeruginosa</i> PAO1) avec les composés du groupe 2 de la famille des batatasins.....	77
Tableau II-11 : Structures chimiques des composés du groupe 1 de la famille des hemibastadines.....	79
Tableau II-12 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices (µg/mL) contre les souches bactériennes (<i>Paracoccus</i> sp. 4M6, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6, <i>Vibrio</i> sp. D66 et <i>P. aeruginosa</i> PAO1) avec les composés du groupe 1 de la famille des hemibastadines.....	81
Tableau II-13 : Structure des composés du groupe 2 de la famille des hemibastadines.....	82
Tableau II-14 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices (µg/mL) contre les souches bactériennes (<i>Paracoccus</i> sp. 4M6, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6, <i>Vibrio</i> sp. D66 et <i>P. aeruginosa</i> PAO1) des composés du groupe 2 de la famille des hemibastadines.....	82
Tableau II-15 : Valeurs de biovolumes des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL.....	
Tableau II-16 : Valeurs de biovolumes des biofilms de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL.....	96
Tableau II-17 : Valeurs de biovolumes des biofilms de <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL.....	97

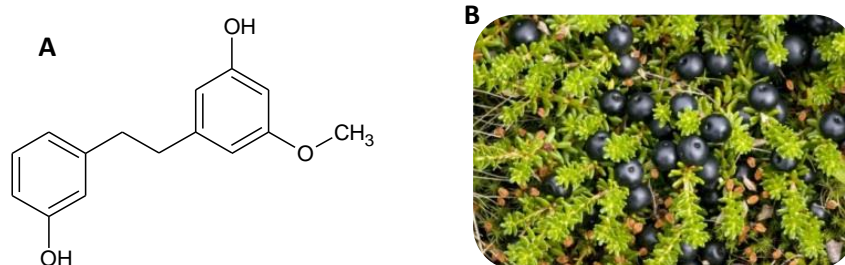
Tableau II-18 : Valeurs de biovolumes des biofilms de <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL.....	98
Tableau II-19 : Valeurs de biovolumes des biofilms de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6 lors de l'ajout de DBHB à 10 et 20 µg/mL.....	100
Tableau II-20 : Valeurs de biovolumes des biofilms de <i>Bacillus</i> sp. 4J6 lors de l'ajout de DBHB à 10 et 20 µg/mL.....	100
Tableau II-21 : Biovolumes des cellules vivantes et mortes, ainsi que le pourcentage de mortalité lors de l'ajout de DBHB à 10 µg/mL dans le flux de milieu de croissance du biofilm.....	104

Introduction

L'objectif des études réalisées dans ce chapitre est dans un premier temps de cribler et sélectionner une centaine de composés potentiellement intéressants : présentant une forte activité bactéricide et/ou des propriétés antiadhésive. Ce criblage permettra de mettre en évidence les concentrations induisant un effet bactéricide (concentration minimale inhibitrice, CMI), une inhibition de l'adhésion ou une absence de toxicité. Le criblage permet également de déterminer des relations entre la structure et l'activité des composés. Il sera réalisé sur quatre bactéries (trois marines et une terrestre).

L'ensemble des composés testés au cours de ce doctorat, appartiennent à deux familles chimiques : batatasins et hemibastadines.

Les composés appartenant à la famille des batatasins sont dérivés de la molécule naturelle : le batatacin-III. Cette molécule, aussi appelée 3,3'-dihydroxy-5-méthoxybibenzyle, est isolée de la plante *Empetrum hermaphroditum*. Le composé est sécrété au niveau des feuilles. Le batatacin-III est un composé phénolique de la classe des dyhydrostilbènes : deux cycles phénols sont présents sur la structure ainsi que deux groupements hydroxyles. La structure de la molécule est présentée sur la Figure II-1.



Ce composé a, dans un premier temps, été décrit comme possédant des propriétés allélopathiques. L'allélopathie comprend l'ensemble des interactions biochimiques directes ou indirectes d'une plante vis-à-vis d'une autre espèce de par la production de métabolites secondaires. Ce composé est retrouvé majoritairement au printemps lors de la germination et de la croissance de la plante (González *et al.*, 2015).

La première activité décrite de cette molécule est une diminution de la croissance de plantes. Le composé interagit au niveau des voies de biosynthèse. Il induit une inhibition de l'absorption de l'azote par les racines. La molécule est également capable d'inhiber la germination de *Populus tremula* (Odén

et al., 1992), de bloquer l'élongation racinaire de *Pinus sylvestris* (Nilsson et al., 1993) ou encore d'inhiber la photosynthèse chez *Betula pendula* (Wallstedt et al., 2001).

Des composés phénoliques isolés chez des plantes ont déjà été décrits comme possédant des activités antibiofilm comme les composés appartenant à la classe des coumarines (coumarine, umbelliférone...), des tannins (catéchine, acide gallique...) ou des flavonoïdes (chalcone, phlorétine...) (Slobodníková et al., 2016). Les activités antibiofilm décrites se sont focalisées sur des bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus* mais des bactéries marines pourraient très bien y être sensibles.

Actuellement d'autres propriétés biologiques aux batatasins sont recherchées comme des activités antibactériennes ou antimicroalgales. C'est dans cet objectif que des dérivés de synthèse ont été préparés à partir du batatasin-III. Les modifications apportées au composé naturel sont l'ajout de groupements méthyles, hydroxyles ou l'ajout de double liaison ou de liaison oxime. La liaison oxime permet le greffage d'un atome d'azote porteur d'un groupement hydroxyle. Les travaux réalisés visent à développer les activités antibactériennes (Chapitre II) et antimicroalgales (Chapitre III) de ces substances.

La seconde famille de composés étudiée est la famille des hemibastadines. Les hemibastadines sont les sous unités formant un composé bastadine. Plusieurs bastadine naturels ont déjà été identifiés chez des éponges notamment chez l'éponge *Ianthella basta* (Niemann et al., 2013). Cette éponge a été décrite pour la première fois en Indonésie. Les bastadines sont constitués de groupements tyrosine et tyramine bromés liés entre eux par une liaison peptidique pour former une unité appelée hemibastadin. Deux hemibastadines liés par une liaison carbone forment un bastadine. Les bastadines peuvent être sous forme cyclique ou linéaire et ces composés possèdent des liaisons oximes. La liaison oxime est entourée sur la structure visible en Figure II-2.

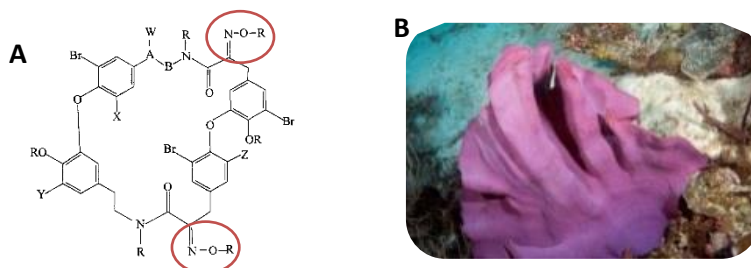


Figure II-2 : Structure commune au bastadine (A) naturellement présent chez *Ianthella basta* (B)

Il y a actuellement environ trente bastadines d'origine naturelle connus. Les bastadines ont été montrés comme possédant des propriétés AF. Ils sont capables d'inhiber l'adhésion des larves de balanes et d'inhiber la synthèse d'adhésifs chez les moules. Dans une étude d'Ortlepp et al, il a été

montré que la liaison oxime était nécessaire à l'activité AF. Lors de la synthèse de composés analogues aux bastadines naturels, la présence de groupements bromés a été montrée comme impliquée dans les propriétés AF (Ortlepp *et al.*, 2007). Le composé ianthelline, un dérivé bromotyrosiné isolé de l'éponge *Stryphnus fortis* a également montré des activités antifouling prometteuses : inhibition du microfouling (bactéries et microalgues, CMI de 2,5 µg/mL) et du macrofouling (cypride de balane, CI₅₀ de 3 µg/mL et adhésif de la moule, CI₅₀ de 45,2 µg/mL) (Hanssen *et al.*, 2014). Les points communs entre les hemibastadines et le composé ianthelline sont la présence de tyrosine, tyramine et des groupements bromés.

Un test de toxicité sur *Artemia* sp. (Crustacé marin, modèle en écotoxicologie), a montré une absence de toxicité des bastadines et des analogues de structure (Ortlepp *et al.*, 2007). À partir des bastadines, des dérivés de synthèse ont été réalisés. Certains de ces composés sont décrits dans l'étude de Bayer *et al.* Dans cet article, il a été montré que le dibromohemibastadine (DBHB) était capable d'inhiber une enzyme, la phénoloxydase impliquée dans des voies d'adhésion de la moule bleue avec une valeur CI₅₀ de 0,84 µM (Bayer *et al.*, 2011). Cette inhibition est due à la complexation de la liaison oxime présente dans la structure du DBHB avec le centre catalytique de l'enzyme contenant des ions Cu²⁺. Ces premiers résultats montrent un intérêt pour le composé DBHB en tant qu'inhibiteur du biofouling mais aucune étude n'a formulé de revêtement contenant du DBHB. En effet, les études montrant une activité de molécules AF incorporées dans un revêtement sont rares car nécessitant de plus grandes quantités de produits à tester, des mises au point de formulations et des suivis d'immersion sur des temps plus longs.

Ce chapitre II développera l'ensemble des tests réalisés afin de déterminer l'activité biologique de plusieurs composés d'origine naturelle ou synthétisés en laboratoire sur des bactéries terrestres et marines. Les tests réalisés permettent d'étudier l'activité des molécules sur la communication bactérienne (biorapporteurs : *V. harveyi*, *E. coli* mutées), sur l'adhésion ou la formation de biofilm bactérien ou encore sur la viabilité bactérienne au sein d'un biofilm. Les résultats permettront de déterminer si les composés possèdent des propriétés antibactériennes, anti-Quorum Sensing, anti-adhésion ou antibiofilm. Ces résultats permettront de sélectionner les composés intéressants pour évaluer leurs propriétés sur le microfouling naturel par incorporation dans un revêtement (chapitre IV).

Matériels et Méthodes

Dans ce chapitre, une centaine de composés est étudiée. Ces molécules sont issues de différentes familles et sont soit d'origine naturelle, soit synthétisées en laboratoire. Parmi ces molécules, les composés de la famille des batatasins et des hemibastadines sont présentés.

L'ensemble des composés sont fournis par les équipes du Pr Johan Svenson et du Pr Peter Proksch. L'équipe du Pr Johan Svenson a fourni une soixantaine de composés (un naturel et 57 dérivés de synthèse), il était alors rattaché au département des analyses pharmaceutiques de l'Université de Tromsø (Norvège). L'équipe du Pr Peter Proksch nous a envoyé une quarantaine de dérivés de synthèse provenant de l'Institut pharmaceutique de biologie et de biotechnologie, Université de Düsseldorf (Allemagne). Des programmes collaboratifs sur l'évaluation de composés à activité antifouling étaient déjà en cours depuis plusieurs années entre les équipes de Tromsø, Düsseldorf et UBO/UBS.

I – Culture et caractérisation des souches bactériennes

Dans le but de travailler sur différentes souches bactériennes, il est nécessaire de les caractériser. Les propriétés de croissance, de production de molécules de communication ou encore leur morphologie sont déterminés.

I – A – Souches et milieux de culture

Les bactéries marines utilisées sont des souches isolées en rade de Brest (*Vibrio* sp. D66) ou dans le Golfe du Morbihan (*Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 et *Bacillus* sp. 4J6). Ces souches marines permettent de représenter une population de bactéries marines locales (Grasland., 2002) participant au fouling marin et appartiennent à la collection du LBCM (UBS).

Les bactéries marines sont cultivées soit en milieu pauvre (dit minimum) Artificial Sea Water (ASW 30 g/L), soit en milieu riche Zobell (tryptone 4 g/L, yeast extract 1 g/L, sea salt 30 g/L). Les souches sont conservées en milieu liquide Zobell dans du glycérol à 15 % (v : v) à -80 °C. Les constituants des milieux de croissance ont été commandés chez Sigma-Aldrich.

Pseudomonas aeruginosa PAO1 est une souche bactérienne de référence dans les études de formation de biofilm et du Quorum Sensing (QS). Le milieu de culture pauvre est l'eau physiologique (NaCl 9 g/L) et le milieu optimum est le Luria Bertani (LB : NaCl 10 g/L, yeast extract 5 g/L, Tryptone 10 g/L). La souche est conservée en milieu LB dans du glycérol à 15 % (v : v) à -80 °C.

Pour l'ensemble des milieux de culture, la stérilisation est effectuée par autoclave à 121°C à une pression de 1 bar pendant 21 minutes. Tout travail en bactériologie est effectué en conditions stériles sous hotte à flux laminaire ou à la flamme.

I – B – Conditions de croissance

Les souches bactériennes marines sont inoculées dans un volume de 5 mL de milieu riche (Zobell) à une concentration cellulaire de 10^6 UFC/mL (début de phase exponentielle) et incubées à 20°C sous une agitation de 180 rotations par minutes (rpm) pour les milieux liquides. La souche PAO1 est inoculée dans 5 mL de milieu LB à 10^6 UFC/mL et incubée à 37°C, sous agitation (180 rotations par minutes).

Dans un premier temps, des pré-cultures sont réalisées dans un volume de 1/5 de la capacité du contenant puis après 24 heures d'incubation des cultures sont réalisées dans 10 mL. Les pré-cultures sontensemencées à partir d'un nouvel aliquot stocké à -80 °C.

I – C – Cinétiques bactériennes

Des cinétiques de croissance bactérienne sont réalisées pendant 30 heures pour l'ensemble des souches. Ce temps permet de visualiser les différentes phases de croissance bactérienne. Les cultures bactériennes sont préparées dans des erlenmeyers de 200 mL. Un volume de 100 mL de milieu riche est inoculé à une concentration bactérienne de 10^6 UFC/mL. Toutes les trente minutes, un prélèvement de 100 μ L est effectué et la densité optique (DO) est mesurée à 600 nm. Afin de tracer les courbes de croissance, la DO à 600 nm est multipliée par 100, et cette valeur est traitée par la fonction logarithmique, ces données sont exprimées au cours du temps.

Des étalements (50 μ L) sont réalisés de la dilution 10^{-1} à 10^{-10} sur boîtes gélosées (90 mm) en milieu Zobell à 1,5 % en agar pour les souches marines (48 heures à 20 °C) et sur boîtes gélosées en milieu LB à 1,5 % agar pour PAO1 (24 heures à 37 °C) afin de déterminer le nombre d'unités formant colonies (UFC/mL) par unité de DO.

I – D – Caractérisation des souches bactériennes

I – D – 1 – Microscopie électronique à balayage

Afin d'obtenir les tailles moyennes et les morphologies des bactéries, des observations en microscopie électronique à balayage sont réalisées. Les bactéries sont inoculées à une concentration de 10^6 UFC/mL dans des boîtes de Petri (90 mm) contenant six supports en verre (1 cm²). L'adhésion est réalisée en milieu minimum. Après trois heures d'adhésion, les échantillons à observer en microscopie électronique à balayage sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % pendant 24 heures. Ensuite les échantillons sont lavés trois fois pendant dix minutes dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,35.

Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des solutions d'éthanol de plus en plus anhydres : 50 %, 70 %, 95 % et 100 %. Trois rinçages de 10 minutes sont réalisés pour chaque échantillon. Après l'étape de déshydratation dans l'éthanol absolu, les échantillons sont séchés selon la méthode de dessiccation au point critique. Les échantillons sont ensuite métallisés à l'or avant observation. Les

microorganismes adhérents sur les supports sont observés par Microscopie Électronique à Balayage (MEB, Jeol JSM 6460LV).

I – D – 2 – Dosage des molécules de communication de type Acyl-homosérine lactone (HSL)

L'extraction des HSL est réalisée en suivant un protocole mis au point par le Dr Morin (Morin *et al.*, 2003). Des cultures bactériennes de 24 heures (200 mL inoculées à 10^6 UFC/mL) sont utilisées. Un volume de 100 mL est prélevé et centrifugé pendant 10 minutes à 4000 g et à 4 °C. Le surnageant contenant les molécules de communication est récupéré puis ces composés sont séparés par 50 mL d'acétate d'éthyle acidifié à 1 % HCl sous agitation. La phase organique supérieure est à nouveau soumise à une extraction par 50 mL d'acétate d'éthyle acidifié. La totalité de la phase organique est récupérée et déshydratée par passage au rotavapor. L'extrait est repris avec 500 μ L d'acétonitrile puis filtré à 0,45 μ m. Les extraits sont analysés en LC-MS-MS (Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry) sur une colonne C₁₈ (colonne Hypersil, 4.6 x 250mm, 5 μ m). Le protocole d'élution est un profil isocratique de méthanol/eau 50 : 50 pendant 10 minutes suivi d'un gradient linéaire de 50 à 90 % de méthanol pendant 15 minutes, puis d'un profil isocratique méthanol/eau 90 :10 pendant 25 minutes. Le débit est fixé à 0,4 mL/min. Les composés sont détectés par spectrométrie de masse de type électrospray. Les différents types d'HSL sont identifiés en fonction de leur temps de rétention en LC et en fonction de leurs spectres MS-MS obtenus par fragmentation des ions [M+H]⁺.

II – Criblage de l'activité antibactérienne et anti-adhésion en microplaque

Afin d'identifier des composés d'intérêt, cent molécules sont étudiées. Les activités recherchées sont l'inhibition de l'adhésion et/ou de la croissance de bactéries.

Ce criblage est réalisé sur *Paracoccus* 4M6, *Pseudoalteromonas* 5M6 et *Vibrio* D66 et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (souche de référence).

Dans l'objectif de sélectionner les composés d'intérêt, ceux présentant une activité bactéricide, bactériostatique ou inhibitrice de l'adhésion sont recherchés. Pour se faire, des cultures en phase stationnaire de 24 heures en milieu LB pour la souche *P. aeruginosa* PAO1 et en milieu Zobell pour les souches marines sont utilisées. À partir de ces cultures, des suspensions bactériennes à une concentration de 10^6 UFC/mL sont préparées. Les composés à tester sont repris dans du méthanol pour 6 concentrations de 0,01 à 50 μ g/mL, déposés en 6 réplicats dans chacun des puits de la microplaque (96 puits, transparentes, Fisher scientifique). Ces concentrations sont classiquement testées lors de la recherche d'activité antibactérienne par des composés naturels ou d'analogues de structure (Aguila-Ramírez *et al.*, 2014).

La souche seule est utilisée comme contrôle négatif et le 4,5-Dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one (DCOIT), utilisé à 0,1 μ g/mL comme contrôle positif. Après évaporation du méthanol pendant deux

heures sous hotte aspirante, 150 µL de la suspension bactérienne (10^6 UFC/mL) sont déposés dans chacun des puits. Les microplaques sont incubées à 37 °C pour PAO1 et à 20 °C pour les souches marines pendant 48 heures. Les croissances bactériennes sont mesurées à DO_{600nm} (TECAN, Magellan). À partir de ces valeurs, la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est déterminée pour chacun des composés.

Afin d'évaluer la biomasse adhérente au sein des puits, ceux-ci sont vidés par renversement, rincés trois fois avec de l'eau physiologique ou de l'eau de mer artificielle (ASW). Après les rinçages, 150 µL de Crystal violet à 1,5 % sont ajoutés à chacun des puits et les microplaques sont laissées pendant 10 minutes à température ambiante afin de permettre le marquage des cellules par le Crystal violet. Les puits sont ensuite vidés et rincés de façon à éliminer le surplus de Crystal violet, puis 200 µL d'éthanol à 95 % sont ajoutés dans le but de solubiliser le Crystal violet colorant les bactéries adhérentes aux parois des puits. Cette coloration est quantifiée en mesurant la DO à 595 nm (Filloux & Ramos., 2014). De même que pour l'étude sur la croissance, les valeurs de CMI sont déterminées. Un test statistique ANOVA est réalisé afin de valider la significativité des résultats en comparaison au témoin (sans composé).

Les résultats présentent les concentrations inhibant d'une part la croissance bactérienne et d'autre part l'adhésion bactérienne. À partir des valeurs de CMI et des analyses de structures, il est possible d'étudier les liens potentiels entre la présence et/ou absence de groupements spécifiques et la variation des activités biologiques. Cela permettra de sélectionner les composés les plus prometteurs en vue de l'incorporation pour les essais de formulation (chapitre IV).

III – Étude du mode d'action des molécules

Après avoir réalisé un criblage sur les souches bactériennes : cinq composés appartenant à la famille des batatasins (BAT 47, BAT 76, BAT 97, BAT 125 et BAT III) et trois composés de la famille des hemibastadines (Tyrosintyramide, NBHB et DBHB) sont sélectionnés afin d'étudier leur mode d'action au niveau cellulaire.

Cette caractérisation permet la mise en évidence d'une activité potentiellement inhibitrice de la communication bactérienne par l'utilisation de souches mutées sur des gènes impliqués dans les voies de régulation du QS.

L'autre test de caractérisation réalisé, étudie l'impact de deux composés de la famille des hemibastadines, le NBHB et le DBHB, sur l'adhésion bactérienne et la formation de biofilm bactérien en condition dynamique.

III – A – Communication bactérienne

III – A – 1 – Mise en évidence des propriétés anti-quorum sensing

Afin de valider un effet d'inhibition du QS par les composés, un biorapporteur, une souche d'*E. coli* modifiée, est utilisé. Ce test permet de déterminer si les composés peuvent inhiber la reconnaissance HSL-récepteur. Cette reconnaissance induit l'émission d'une luminescence quantifiable.

E. coli pSB401 permet la reconnaissance des HSL de longueur de chaîne entre 6 et 10 carbones, la reconnaissance des HSL sur le récepteur plasmidique provoque l'émission d'une luminescence par l'activation du gène *luxCDABE*. La sélection des bactéries contenant le plasmide d'intérêt se fait par l'ajout de tétracycline à 10 µg/mL.

Pour ce test, une microplaque noire à fond transparent en polypropylène de 96 puits est préparée en déposant 10 µL de la C₆-HSL à une concentration finale de 0,5 µg/mL dans chacun des puits. La C₆-HSL étant en solution dans de l'acétonitrile, le solvant est évaporé pendant 10 minutes sous une hotte à flux laminaire. La microplaque est ensuiteensemencée avec une culture de *E. coli* pSB401 à 10⁶ UFC/mL dans du milieu LB contenant l'antibiotique associé. Puis, les composés à tester sont ajoutés : BAT 47, BAT 97, NBHB et DBHB à trois concentrations (5, 10 et 50 µg/mL). Le volume final par puits est de 200 µL. Les microplaques sont incubées à 30 °C pendant 8 heures. Une mesure de la DO à 600 nm et de la fluorescence ou luminescence en fonction du biorapporteur utilisé est réalisée.

Le test est réalisé en trois réplicats, soit 36 valeurs par condition. Une analyse statistique est réalisée afin de déterminer si les différences obtenues sont significativement différentes du témoin (Test ANOVA, $p < 0,01$). Les résultats sont présentés sous forme de courbes donnant la valeur de luminescence ou de fluorescence rapportée à la DO à 600 nm en fonction du temps.

Impact de la nature de la chaîne carbonée de l'homosérine lactone

Pour ce test, la longueur et la nature de la chaîne carbonée de l'HSL sont étudiées. Les HSL testées sont présentées dans le Tableau II-1. Ce test permet de déterminer si l'activité anti-Quorum Sensing est spécifique à une HSL. Six HSL sont utilisées. Les concentrations testées ne sont pas identiques car les biorapporteurs ne possèdent pas la même sensibilité aux différentes HSL.

Tableau II-1 : Homosérines lactones testées pour l'évaluation de l'activité anti-quorum sensing

Homosérine lactone	Structure	Concentration testée (µg/mL)
N-3-oxohexanoyl-homosérine lactone (OC₆)		0,5
N-hexanoyl-homosérine lactone (C₆)		0,5
N-3-oxooctanoyl-homosérine lactone (OC₈)		50
N-octanoyl-homosérine lactone (C₈)		50
N-3-oxodécanyol-homosérine lactone (OC₁₀)		50
N-décanyol-homosérine lactone (C₁₀)		50
N-3-hydroxydécanyol-homosérine lactone (HC₁₀)		50

10 µL d'HSL sont déposés dans chacun des puits. L'acétonitrile est évaporé pendant dix minutes ouverte sous la hotte à flux laminaire.

Dans chacun des puits estensemencée une culture de *E. coli* pSB401 à 10^6 UFC/mL dans du milieu LB contenant la tétracycline. Pour ce test, seul le composé DBHB est testé à 50 $\mu\text{g/mL}$. Les paramètres d'incubation et de suivi sont identiques à la partie III-A-1.

Le test est réalisé en trois réplicats (36 données par condition). Une analyse statistique est réalisée afin de déterminer si les différences obtenues sont significativement différentes du témoin (Test ANOVA, $p < 0,01$). Les résultats sont présentés sous forme de courbes : les valeurs de luminescence ou de fluorescence sont rapportées à la valeur de DO à 600 nm en fonction du temps.

Dans l'étude des propriétés anti-QS, l'acide kojique, déjà décrit comme inhibiteur d'un récepteur membranaire du QS tel que LasR, est utilisé comme contrôle positif pour les tests avec le biorapporteur pSB401 et est testé à 5 $\mu\text{g/mL}$ (Dobretsov *et al.*, 2011).

III – A – 2 – Validation de l'absence d'activité du DBHB sur la production de luminescence

Dans le but de valider l'activité inhibitrice de la molécule DBHB sur le QS, un autre test avec la souche *Vibrio harveyi* JAF548 est mené. L'objectif de ce test, est de démontrer que le composé ne perturbe pas les voies de biosynthèse de la luminescence. Chez *V. harveyi* JAF548, une mutation sur le gène *luxOD47E* induit le maintien de la phosphorylation de la protéine LuxO provoquant une production continue de la luminescence. En testant l'impact de la molécule DBHB sur ce biorapporteur, il est possible de démontrer une possible interaction du composé sur la production de luminescence en s'affranchissant des voies de régulation du QS (Freeman & Bassler., 1999).

Pour ce test du milieu AB (autoinducer bioassay) est préparé à partir d'une base : NaCl 12,5 g, MgSO_4 12,3 g et un mélange d'acides aminés et vitamines 2,0 g pour 970 mL d'eau distillée. Le pH de la base est ajusté à 7,5 et filtré sur 0,45 μm . La base est ensuite complétée avec des solutions stériles de sodium phosphate 1 M (10 mL), de L-Arginine 0,1 M (10 mL) et glycérol 100 % (10 mL) (Greenberg *et al.*, 1979).

Dans une microplaque noire à fond transparent, 100 μL du milieu AB contenant l'antibiotique de sélection, la kanamycine à 30 $\mu\text{g/mL}$, la bactérie JAF548 à 10^6 UFC/mL et le DBHB à 1, 5, 10 et 50 $\mu\text{g/mL}$ sont déposés. La microplaque est incubée pendant 12 heures à 28°C sous agitation. Toutes les heures, la DO à 600 nm ainsi que la luminescence sont mesurées. L'expérience est réalisée en *triplicata* (36 données par condition) et un test statistique (ANOVA, $p < 0,01$) est effectué afin de valider la significativité des résultats. Les résultats sont exprimés en courbe présentant la production de luminescence rapportée à la DO à 600 nm au cours du temps.

Dans le but de valider nos résultats, d'autres biorapporteurs ont été testés. L'ensemble de ces biorapporteurs sont présentés dans le Tableau II-2. Les résultats obtenus montrent tous la même activité. Seuls les résultats obtenus avec deux biorapporteurs seront donc présentés dans ce chapitre.

Tableau II-2 : Ensemble des informations apportées par les biorapporteurs utilisés

Biorapporteur	HSL détectées	Système induit	Information apportée	Référence
<i>C. violaceum</i>	Toute longueur de chaîne	Violacéine	Détection des HSL	(Morohoshi <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli</i> pSB406	HSL courte chaîne (C4, C6)	Luminescence	Reconnaissance HSL-récepteur Production d'HSL	(Struss <i>et al.</i> , 2012)
<i>E. coli</i> pSB1142	HSL longue chaîne (C8, C10, C12)	Luminescence	Reconnaissance HSL-récepteur Production d'HSL	(Buseti., 2014)
<i>E. coli</i> pSB401	HSL moyenne chaîne (C6, C8, C10)	Luminescence	Reconnaissance HSL-récepteur Production d'HSL	(Bodini <i>et al.</i> , 2009)
<i>E. coli</i> pJBA89	HSL moyenne chaîne (C6, C8, C10)	Fluorescence	Reconnaissance HSL-récepteur Production d'HSL	(Mason <i>et al.</i> , 2005)
<i>V. harveyi</i> JAF548	aucun	Luminescence	Biosynthèse de luminescence	(Freeman & Bassler., 1999)

III – B – Mobilité bactérienne

L'impact des composés est évalué sur la mobilité de la bactérie *P. aeruginosa* PAO1. Le swimming, le swarming et le twitching sont évalués.

Ces types de mobilité sont rendus possibles de par la présence de *pili* de type IV ou de flagelles. La synthèse de ces constituants membranaires est régulée par les voies du QS (Feldman *et al.*, 1998 ; Tang *et al.*, 1996). Les flagelles permettent la mobilité dans des milieux aqueux ou semi-solides, ils participent au swimming mais également à la reconnaissance et l'adhésion sur des supports (Simpson *et al.*, 1992). Ils interviennent aussi dans la formation de colonies lors de la mise en place d'un biofilm (O'Toole & Kolter., 1998). Chez *P. aeruginosa*, les flagelles sont principalement constitués de deux protéines : FliC et FliD. Les travaux de Wolfgang *et al.*, ont montré que le système Rhl était capable de réprimer le gène *fliC* codant la flagelline un constituant important des flagelles (Wolfgang *et al.*, 2004).

D'autres types de mobilité sont rencontrés chez les bactéries grâce à la présence de *pili* de type IV. Les *pili* de type IV interviennent dans le swarming et le twitching. Mais ces organites possèdent aussi des

rôles dans l'adhésion des bactéries. En effet, des études ont montré que la mutation des gènes induisant la synthèse des *pili* provoque une inhibition de l'adhésion bactérienne (Comolli *et al.*, 1999). Le QS peut contrôler le swarming en modifiant l'expression du gène *rhlAB* produisant les rhamnolipides impliqués dans le swarming (De Kievit., 2009).

L'étude sur la mobilité bactérienne n'a pas été réalisée sur les souches marines car ces trois bactéries (4M6, 5M6 et D66) ne sont pas mobiles. Seul l'impact des composés sur la mobilité de la souche *Pseudomonas aeruginosa* a été étudié. Pour ce test, une suspension bactérienne (10^6 UFC/mL) contenant le composé à une concentration de 10 µg/mL et une suspension bactérienne témoin sont inoculées dans trois types de géloses agar : 0,3 % pour le swimming, 0,6 % pour le swarming et 1,5 % pour le twitching (Rashid & Kornberg., 2000). Les boîtes de Petri (90 mm) sont incubées pendant 24 heures à 37 °C.

La mobilité avec l'ajout de composés est comparée à la mobilité de la souche témoin, un test statistique est réalisé (ANOVA) dans le but de valider la significativité des résultats.

III – C – Adhésion et formation de biofilm en conditions dynamiques

Dans l'objectif de mettre en évidence une activité anti-adhésion ou anti-biofilm des composés NBHB et DBHB, un test en chambre à flux est réalisé (Tolker-Nielsen & Sternberg., 2014). L'étude en chambre à flux nécessite de grands volumes de milieux et donc des quantités plus importantes de composés et seules ces deux molécules (NBHB et DBHB) étaient disponibles en quantité suffisante.

Le système présenté sur la Figure II-3 contient une pompe péristaltique qui permet l'apport du milieu jusqu'à un piège à bulle puis jusqu'à la chambre à flux.

La chambre à flux (Figure II-4) est au préalable préparée en collant une lamelle de verre de dimension 24 x 50 mm sur les trois canaux de la chambre à flux. Puis le système est connecté suivant le schéma de la Figure II-3. Afin de stériliser le système, de l'eau de javel à 1,5 % est passée pendant 24 heures à un flux de 430 µL/min.

Après nettoyage par le flux de javel, le système est connecté avec le milieu d'adhésion. Il s'agit d'un milieu minimum, sans nutriment, favorisant l'adhésion et non la division cellulaire (Tolker-Nielsen & Sternberg., 2014).

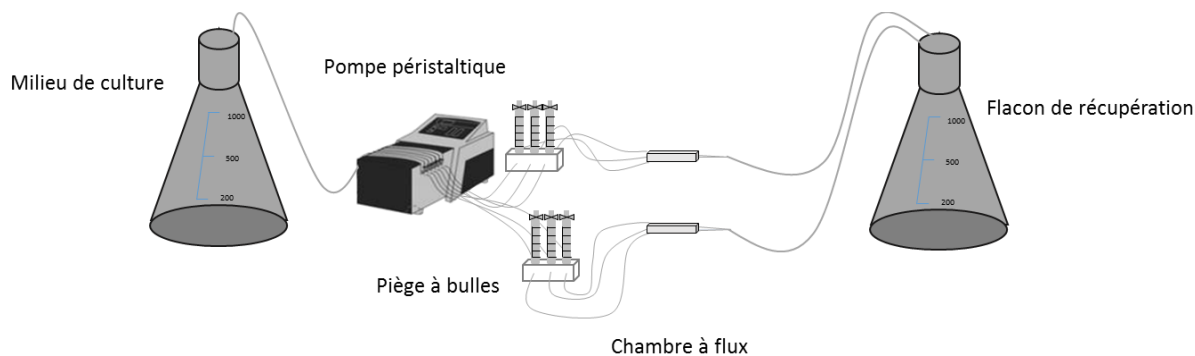


Figure II-3 : Montage du système de chambre à flux

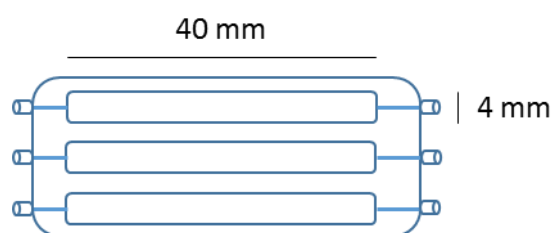


Figure II-4 : Schématisation de la chambre à flux

En parallèle, la suspension bactérienne est préparée à partir d'une pré-culture, en mesurant la DO à 600 nm. Un aliquot d'un mL d'une suspension bactérienne de concentration cellulaire à 10^6 UFC/mL est préparé et centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C. Le culot est lavé avec le milieu minimum et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le culot est resuspendu dans 1 mL de milieu d'adhésion. Ce volume est prélevé avec une seringue de 1 mL qui permet l'injection dans le canal de la chambre à flux. La Figure II-5 présente l'injection dans la chambre à flux.

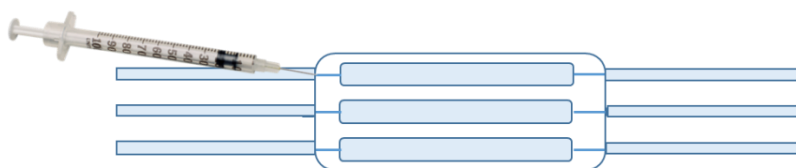


Figure II-5 : Schématisation de l'injection dans la chambre à flux

Après l'étape d'injection de la solution bactérienne, les pinces « stop-flow » sont fermées et la chambre à flux est posée sur le côté lamelle de verre.

Après 2 heures d'adhésion à 20 °C pour les souches marines et 37 °C pour *P. aeruginosa*, les pinces sont ouvertes et le flux est réglé à 150 μ L/min afin d'éliminer les bactéries non adhérentes pendant 30 minutes. L'adhésion peut être observée en lumière blanche ou en ajoutant un fluorochrome comme le Syto9® en microscopie confocale à balayage laser. À partir des observations, le pourcentage de

recouvrement est déterminé par un programme JAVA (Annexe 1). Ce programme permet de quantifier le nombre de pixel noir, vert, bleu ou rouge afin de déterminer le pourcentage de bactéries adhérentes.

Le Syto9[®] est un marqueur de fluorescence des acides nucléiques permettant de mettre en évidence les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sans distinction de viabilité ($\lambda_{\text{excitation}} = 488\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 493 - 543 \text{ nm}$) (Mah *et al.*, 2003). Le marqueur est ajouté à 5 μM . 5 minutes de marquage sont réalisées à l'obscurité puis la pompe est activée 10 minutes pour retirer le marqueur excédant.

Après l'étape d'adhésion, il est possible de poursuivre par l'étape de formation de biofilms. Pour cela un flux de milieu de culture est connecté à la chambre à flux (Zobell pour la souche 4M6 ou LB pour la souche PAO1). Le flux est réglé à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 24 à 48 heures afin de permettre le développement d'un biofilm en condition dynamique. De la même façon que pour l'adhésion, la formation du biofilm est observée en microscopie confocale à balayage laser en marquant les bactéries avec du Syto9[®]. La biomasse, l'épaisseur moyenne et l'épaisseur maximale du biofilm sont déterminées par le programme COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000).

III – C – 1 – Impact des composés sur l'adhésion bactérienne

Afin d'évaluer l'impact des composés sur l'adhésion, deux conditions sont testées.

Ajout du composé lors de l'injection bactérienne

Le composé est ajouté à la culture bactérienne lors de l'injection des bactéries dans la chambre à flux. L'adhésion est observée après deux heures d'incubation par microscopie confocale à balayage laser et marquage au Syto9[®].

Conditionnement du support par le composé

La lamelle de verre est conditionnée pendant deux heures en présence de la molécule d'intérêt. Pour cela, les composés sont solubilisés dans un milieu minimum à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et mis au contact de la lamelle par l'intermédiaire d'un flux à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 2 heures. Les bactéries sont ensuite injectées et l'adhésion est observée après deux heures en condition statique.

Pour chaque test, trois observations sont réalisées dans trois canaux indépendants (27 données par condition). À partir des observations, les pourcentages de recouvrement permettront de déterminer si les conditions évaluées impactent l'adhésion des bactéries, un test statistique (ANOVA) est réalisé afin de valider la significativité des résultats en comparaison au témoin.

III – C – 2 – Impact des composés sur le biofilm bactérien

Afin d'évaluer l'impact sur la maturation du biofilm, deux conditions sont étudiées :

Effet des composés sur la formation du biofilm

Les composés évalués (NBHB et le DBHB), sont ajoutés au flux (150 $\mu\text{L}/\text{min}$) de milieu nutritif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'impact du DBHB est évalué à quatre concentrations (1, 5, 10 et 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sur quatre bactéries. Deux bactéries à Gram négatif produisant des HSL ont été sélectionnées : la bactérie terrestre *P. aeruginosa* PAO1 et la bactérie marine *Paracoccus* sp. 4M6. Le DBHB est également testé sur une bactérie marine à Gram négatif ne produisant pas d'HSL, la bactérie *Pseudoalteromonas* sp. 5M6. Enfin, *Bacillus* sp. 4J6, est une bactérie à Gram positif possédant probablement un autre système de communication n'impliquant pas les HSL. Ce test permet d'observer l'effet du DBHB sur la formation de biofilm chez des espèces bactériennes possédant des modes de communication différents.

La molécule NBHB est quant à elle, testée uniquement contre la formation de biofilm chez les bactéries *P. aeruginosa* PAO1 et *Paracoccus* sp. 4M6, également à quatre concentrations (1, 5, 10 et 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Les biofilms sont observés après 24 heures d'incubation à 37 °C pour la bactérie *P. aeruginosa* PAO1 et après 48 heures pour les bactéries marines *Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 et *Bacillus* sp. 4J6, incubées à 20 °C.

Effet des composés sur un biofilm formé

Cette condition permet d'évaluer l'impact des composés NBHB et DBHB sur un biofilm préformé après 24 heures pour *P. aeruginosa* et 48 heures pour *Paracoccus* sp. 4M6.

Afin de mettre en évidence un effet sur le détachement du biofilm, les composés sont injectés dans la chambre à flux mélangés au milieu nutritif à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Après l'injection des composés, la chambre à flux est clipsée et retournée pendant deux heures. Après le temps d'incubation, le flux est activé à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ afin de retirer les cellules non adhérentes et le biofilm est observé. De même, trois observations sont réalisées dans trois canaux indépendants (27 données par condition). À partir des observations microscopiques, les valeurs de biovolumes sont déterminées par le programme COMSTAT. Ces données permettent de déterminer si les composés et les concentrations évaluées impactent la formation du biofilm bactérien. Un test statistique est réalisé (ANOVA, $p < 0,01$) pour valider les inhibitions du biofilm.

III – D – Impact des composés sur la viabilité cellulaire des bactéries

La mortalité au sein du biofilm est quantifiée par des marquages Syto/Sytox. Les cellules endommagées sont marquées avec le fluorochrome Sytox Red® (Tawakoli *et al.*, 2013). Ce marqueur ne met en évidence que les acides nucléiques des cellules perméabilisées ($\lambda_{\text{excitation}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 638 - 688 \text{ nm}$), tandis que la totalité des cellules bactériennes sont marquées par le Syto9®.

Les conditions pour la formation du biofilm et l'ajout des composés sont les mêmes que précédemment (partie III-C-2). Les biovolumes des cellules vivantes et mortes sont comparés afin de mettre en évidence une potentielle interaction des composés sur la viabilité cellulaire. À partir des biovolumes, les pourcentages de mortalité sont déterminés, un test statistique (ANOVA, $p < 0,01$) validera l'effet létal d'un composé sur le biofilm bactérien.

Résultats et discussion

I – Caractérisation des souches bactériennes

Les tests réalisés ont porté sur la croissance, la morphologie et la production de molécules de communication par les souches bactériennes étudiées. Cette caractérisation préalable est nécessaire à l'étude de l'impact des composés naturels et de synthèses sélectionnés.

I – A – Cinétiques bactériennes

Des mesures de DO à 600 nm sont réalisées pendant 30 heures afin de tracer la cinétique de croissance des quatre bactéries étudiées. Sur la Figure II-6 sont représentées les courbes de croissance ($\log(\text{DO}_{600\text{nm}} \cdot 100)$) en fonction du temps) des quatre souches bactériennes étudiées.

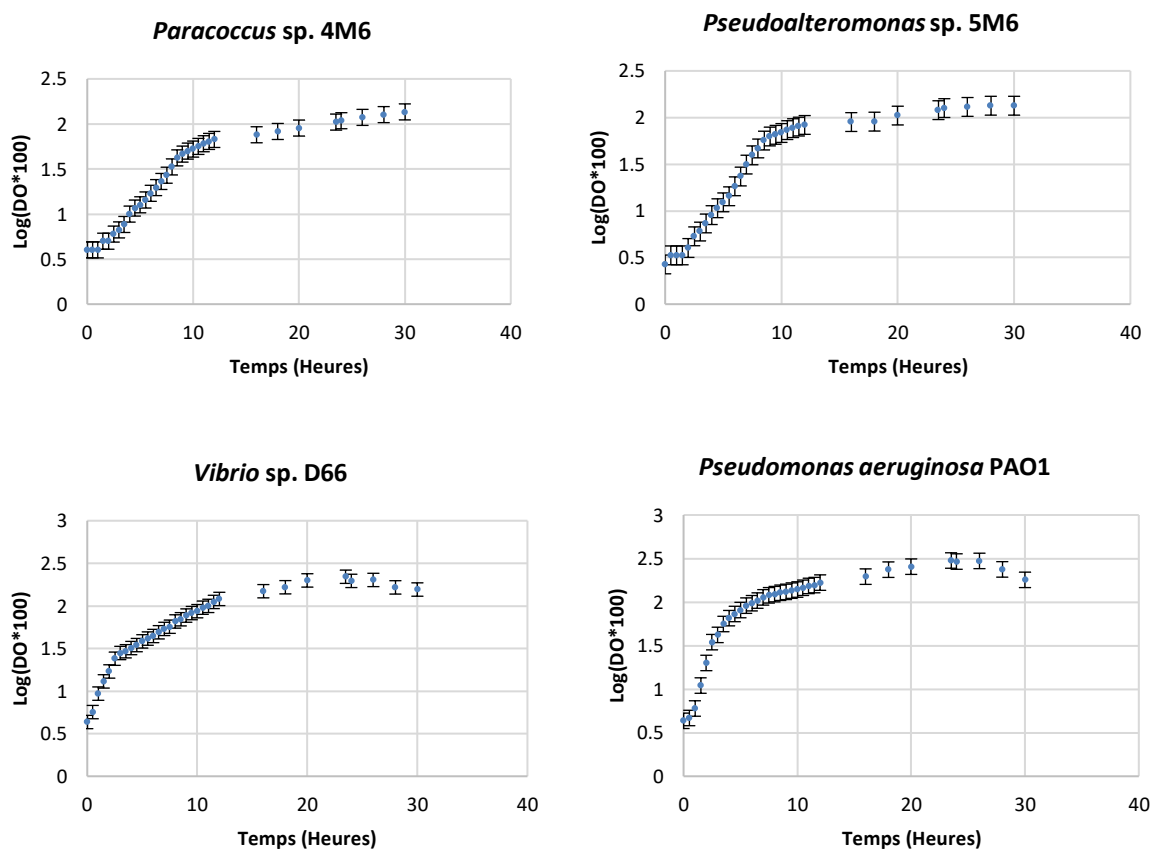


Figure II-6 : Cinétiques bactériennes pendant 30 heures ($\log(\text{DO}_{600\text{nm}} \cdot 100)$ en fonction du temps), les barres représentent les écarts-types

P. aeruginosa PAO1 atteint à partir de 3 h, sa phase exponentielle de croissance. Les deux souches marines *Paracoccus* sp. 4M6 et *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 ont des profils de croissance semblables. Leur phase exponentielle débute à 3 h pour prendre fin après 8 h. Tandis que la souche *Vibrio* sp. D66 a une croissance plus longue, avec deux phases de croissance : une première assez rapide pendant 3 h puis une seconde phase plus longue jusqu'à 12 h.

Pour les bactéries *P. aeruginosa* PAO1 et *Vibrio* sp. D66, les phases de déclin sont observables à partir de 26 heures alors qu'elles ne sont pas observées pour les bactéries *Paracoccus* sp. 4M6 et *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 pendant les 30 h de suivi. À partir de ces courbes de croissance, le temps de génération correspondant au temps nécessaire à la bactérie pour se diviser par un facteur de 2ⁿ et le rapport entre la DO et la densité cellulaire (partie I-B) sont déterminés.

I – B – Caractérisation des souches bactériennes

Les observations en MEB ont permis de déterminer la taille moyenne des bactéries étudiées (Figure II-7).

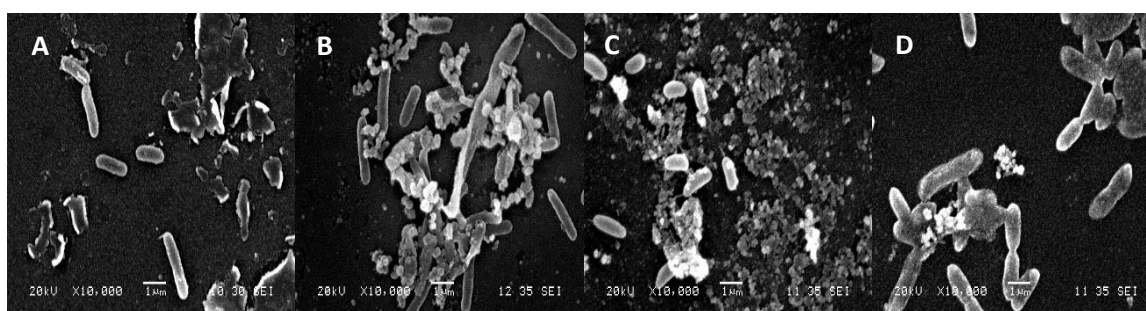


Figure II-7 : Observation en microscopie électronique à balayage des bactéries *Paracoccus* sp. 4M6 (A), *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 (B), *Vibrio* sp. D66 (C) et *P. aeruginosa* PAO1 (D)

L'analyse des courbes de croissance permet de calculer le temps de génération de chaque souche. Cette cinétique, associée au dénombrement des colonies sur milieu gélosé, a permis de déterminer le rapport entre la DO et la densité cellulaire. Ce rapport permet de quantifier les bactéries en unité formant colonie par millilitre (UFC/mL) à partir de la mesure de DO à 600 nm.

L'extraction des HSL dans les surnageants bactériens puis les analyses en LC-MS-MS permettent d'identifier les familles d'HSL produites par chacune des souches bactériennes (Morin *et al.*, 2003). Ces données sont présentées dans le Tableau II-3.

Parmi les quatre souches bactériennes étudiées, *P. aeruginosa* PAO1 a la plus grande taille (jusqu'à 2 µm de longueur) et le temps de génération le plus rapide (47 minutes). L'analyse des HSL produites confirme les données figurant dans la littérature avec la synthèse de C₄-HSL et 3-oxo-C₁₂-HSL (Duan & Surette., 2007).

Les souches marines *Paracoccus* sp. 4M6 et *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 possèdent des caractéristiques morphologiques proches. Elles mesurent entre 1,6 et 1,9 µm et ont les temps de génération similaires avec des valeurs de 60 et 59 minutes. Par contre, la bactérie *Paracoccus* sp. 4M6

est capable de produire une variété d'HSL à courtes et longues chaînes (C₄-HSL, C₆-HSL, C₈-HSL, 3-oxo-C₁₀-HSL) tandis que la bactérie 5M6 ne produit pas de molécules de communication de type HSL.

Tableau II-3 : Caractérisation des souches bactériennes : taille moyenne, temps de génération, rapport DO/densité cellulaire et identification des HSL produits

Bactéries	Taille Moyenne (µm)	Temps de génération (min)	Rapport DO/Densité cellulaire (UFC/mL)	Production HSL
<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	1,65 ± 0,45	60	1 DO = 4,8.10 ⁷ x NC	C ₄ -HSL C ₆ -HSL C ₈ -HSL 3-oxo-C ₁₀ -HSL
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6	1,96 ± 0,35	59	1 DO = 3,5.10 ⁷ x NC	-
<i>Vibrio</i> sp. D66	1,25 ± 0,21	132	1 DO = 1,8.10 ⁶ x NC	C ₄ -HSL C ₆ -HSL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	2,05 ± 0,63	47	1 DO = 2,7.10 ⁸ x NC	C ₄ -HSL 3-oxo-C ₁₂ -HSL

DO : densité optique à 600 nm, - non détecté, NC : nombre d'UFC/mL

La dernière bactérie marine étudiée, D66, possède le temps de génération le plus long (132 minutes) parmi les souches étudiées. Ce temps de génération est déterminé en moyennant les deux phases de croissance exponentielle entre 0 et 10 h. *Vibrio* sp. D66 possède la capacité de produire des HSL de courtes chaînes impliquées dans les voies de communication bactérienne (C₄-HSL et C₆-HSL).

II – Criblage de l'activité antibactérienne et anti-adhésion en microplaque

Dans cette partie, les résultats du criblage sont rassemblés en famille (Batatasin ou Hemibastatine) puis en groupe comprenant des molécules de structures semblables afin de déterminer des relations entre la structure des composés et leur activité antibactérienne. L'activité de ces molécules sera comparée à des molécules de référence.

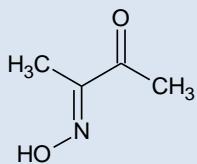
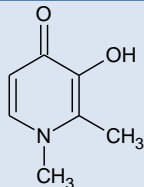
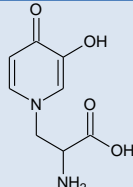
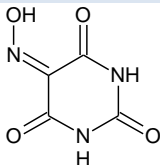
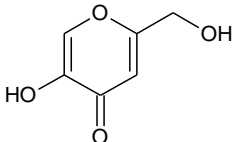
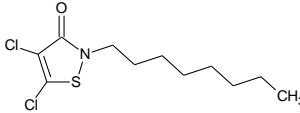
II – A – Molécules de référence

Ce premier groupe reprend les molécules de référence (composés commerciaux) employés dans l'étude des activités d'inhibition de l'adhésion des moules. Ces composés sont sélectionnés par l'équipe du Pr Peter Proksch en raison de leur faible valeur CI₅₀ vis-à-vis du test enzymatique de la phénoloxydase (chapitre I, partie IV-B). Les structures des composés du groupe 3 sont présentées dans le Tableau II-4.

Le DCOIT (4,5-Dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one) utilisé comme contrôle positif a été ajouté dans cette série. Le DCOIT est le principe actif du Seanine[®], un bactéricide à large spectre, algicide et

fongicide. Son temps de demi-vie est de 24 heures en eau de mer et 1 heure dans les sédiments. Le DCOIT se dégrade facilement lorsqu'il est libéré dans le milieu marin. L'hydrolyse du cycle permet de réduire la toxicité de la molécule (Jacobson & Willingham., 2000).

Tableau II-4 : Structures chimiques des molécules de référence

Composé	Structure	Composé	Structure	Composé	Structure
2,3-BMO		Ferriprox		Mimosine	
Violuric acid		Kojic acid		DCOIT	

Les résultats des criblages contre les espèces bactériennes sont présentés dans le Tableau II-5 :

Tableau II-5 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices des molécules de référence ($\mu\text{g/mL}$) contre les souches bactériennes (*Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Vibrio* sp. D66 et *P. aeruginosa* PAO1)

	4M6		5M6		D66		PAO1	
	C	A	C	A	C	A	C	A
2,3-BMO	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Ferriprox	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Mimosine	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Acide violurique	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Acide kojique	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
DCOIT	1	1	10	10	10	10	50	50

C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : $\mu\text{g/mL}$

Les composés commerciaux de ce groupe ne possèdent aucune activité antibactérienne. Ces résultats montrent que les contrôles utilisés pour un test axé sur le macrofouling ne sont pas pertinents pour des tests axés sur les organismes du microfouling. Les mécanismes d'adhésion mis en place par les micro et macroorganismes diffèrent. Il est nécessaire d'utiliser un composé à large spectre d'action ou plusieurs composés dont l'activité est ciblée afin de stopper l'ensemble des espèces colonisatrices.

La molécule DCOIT utilisée comme contrôle négatif, montre des inhibitions de l'adhésion et de la croissance pour les quatre souches testées. Parmi les quatre bactéries, *P. aeruginosa* PAO1 est la moins sensible avec une CMI de 50 µg/mL. Sur les trois bactéries marines utilisées, *Paracoccus* sp. 4M6 est la plus sensible avec une CMI de 1 µg/mL. Les CMI du DCOIT seront comparées aux CMI obtenues afin d'identifier un composé aussi actif que ce contrôle.

II – B – Famille des Batatasins (BAT)

Les composés formant la famille des BAT sont dérivés du composé naturel BAT-III étudié dans ce criblage. Pour la famille des BAT, les composés étudiés sont classés en deux groupes.

II – B – 1 – Groupe 1

Ce premier groupe de composés comprend le composé naturel BAT-III. BAT-III possède deux cycles aromatiques reliés par trois liaisons carbone-carbone. Sur ces cycles aromatiques, sont greffés des groupements méthoxy et hydroxyles. La structure de base comprenant les deux cycles aromatiques et les trois liaisons carbone-carbone ne sont pas modifiées. Les groupements ajoutés en comparaison à la structure du composé naturel, le BAT-III sont entourés sur les structures présentées dans le Tableau II-6.

Tableau II-6 : Structure des composés du groupe 1 de la famille des batatasins, les modifications structurelles sont entourées

Composé	Structure	Composé	Structure	Composé	Structure
BAT III		BAT 20		BAT 45	
BAT 46		BAT 47		BAT 56	
BAT 61		BAT 70		BAT W	

L'activité des composés contre les quatre souches bactériennes est présentée dans le Tableau II-7 :

Tableau II-7 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) pour les quatre souches bactériennes (*Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Vibrio* sp. D66 et *P. aeruginosa* PAO1) avec les composés du groupe 1 de la famille des batatasins

	4M6		5M6		D66		PAO1	
	C	A	C	A	C	A	C	A
BAT III	> 50	> 50	50	50	50	50	> 50	> 50
BAT 20	10	10	10	10	50	50	10	10
BAT 45	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10
BAT 46	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
BAT 47	50	50	50	50	> 50	> 50	50	50
BAT 56	10	10	50	50	50	50	50	50
BAT 61	10	10	> 50	> 50	10	10	> 50	10
BAT 70	10	10	10	10	50	50	> 50	10
BAT W	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10

C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : $\mu\text{g/mL}$

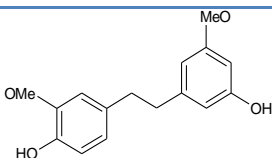
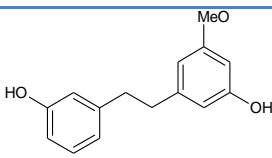
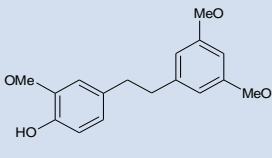
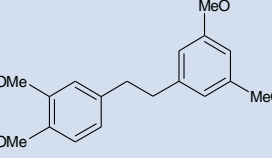
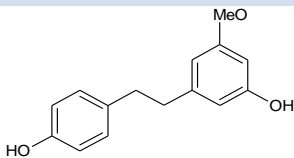
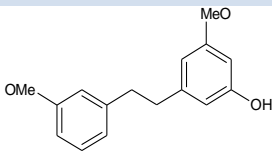
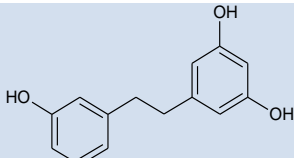
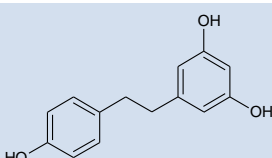
Les résultats du criblage de ce premier groupe montrent que le seuil de sensibilité n'est pas le même entre les espèces bactériennes. Par exemple, pour le composé BAT W, la bactérie PAO1 est sensible contrairement aux trois souches marines. Ces résultats démontrent également que l'activité sur la croissance et sur l'adhésion bactérienne est renforcée lorsque les composés possèdent au moins deux groupements hydroxyles. Pour la molécule BAT 20, deux groupements hydroxyles sont identifiés et ce composé est capable d'inhiber la croissance des quatre bactéries étudiées.

Dans la littérature, les relations entre la structure et l'activité AF de composés ont déjà été étudiés. Les conclusions relatives à cette question sont variables. La majorité des tests réalisés dans la littérature présentent l'activité de molécules sur l'adhésion des larves de balanes plutôt que sur les bactéries. La balane est une espèce emblématique du fouling et crée de nombreux problèmes pour les bateaux. Les résultats obtenus dans cette partie seront parfois comparés à ces données.

Dans l'étude de Wang *et al.*, l'ajout de groupements brome, acétate ou acétyle induisait une augmentation de l'activité AF, évaluée en fonction de l'adhésion des larves de balanes, tandis que l'ajout de groupements hydroxyles diminuait cette activité (Wang *et al.*, 2016).

A l'inverse, dans une étude de Chen *et al*, l'ajout de groupements hydroxyles augmentait l'activité antifouling sur un composé de la famille des diterpénoïdes alors que le greffage de méthoxy, acétoxy ou méthanosulfonyloxy diminuait l'inhibition de l'adhésion des larves de balanes (Chen *et al.*, 2010). Nos résultats corroborent les données publiées par Chen *et al*, l'apport de groupements hydroxyles accroît l'activité de la molécule naturelle. Une étude de Hernandez-Romero *et al* a rapporté que l'ajout de groupements méthoxy en position C₃ ou C₅ sur des dérivés de dibenzyle isolés à partir des orchidées *Epidentrum rigidum* et *Nidema boothii* favorisait l'activité phytotoxique. Les structures de ces substances sont présentées dans le Tableau II-8. Les structures sont similaires aux composés du groupe 1 (Hernández-Romero *et al.*, 2005).

Tableau II-8 : Structures des composés dérivés de dibenzyle isolés des orchidées *Epidentrum rigidum* et *Nidema boothii* (Hernández-Romero *et al.*, 2005)

 <p>3',4-Dihydroxy-3,5'-dimethoxybibenzyl</p>	 <p>3,3'-Dihydroxy-5-methoxybibenzyl</p>
 <p>4'-Hydroxy-3,3',5-trimethoxybibenzyl</p>	 <p>3,3',4',5- Tétraméthoxybibenzyl</p>
 <p>3,4'-Dihydroxy-5-methoxybibenzyl</p>	 <p>3',5-Diméthoxy-3-hydroxybibenzyl</p>
 <p>3,3',5-Trihydroxybibenzyl</p>	 <p>3,4',5-Trihydroxybibenzyl</p>

Dans ce premier groupe, les composés BAT 20, BAT 47, BAT 56 et BAT 70 possèdent entre deux et quatre groupements hydroxyles. Ces composés présentent les activités les plus importantes ou semblables au composé naturel. Les résultats obtenus montrent que la présence de groupements hydroxyles sur les molécules accroît l'activité antibactérienne.

II – B – 2 – Groupe 2

Le deuxième groupe de la famille des batatasins regroupe des composés de structures proches au composé naturel : la présence de deux cycles aromatiques liés par liaisons carbone-carbone. Mais il est ajouté à ces liaisons carbone-carbone une fonction oxime. La liaison oxime est entourée en rouge sur les structures présentées dans le Tableau II-9. Cette fonction oxime a déjà été identifiée au sein de composés antibactériens (Ortlepp *et al.*, 2007). Le composé BAT 112 a été ajouté dans ce groupe, ce composé ne possède pas de fonction oxime, mais contrairement au groupe 1, une liaison hydroxyle a été ajoutée. De même que pour le premier groupe, des groupements méthoxy ou hydroxyles sont présents sur les cycles aromatiques au niveau de différents carbones.

Tableau II-9 : Structure des composés du groupe 2 de la famille des batatasins, cercle : liaison oxime

Composé	Structure	Composé	Structure
BAT 76		BAT 80	
BAT 82		BAT 84	
BAT 85		BAT 89	
BAT 90		BAT 94	
BAT 96		BAT 97	
BAT 112		BAT 113	
BAT 125			

Le Tableau II-10 présente les CMI de l'adhésion et la croissance des quatre espèces bactériennes étudiées.

Tableau II-10 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g}/\text{mL}$) contre les quatre souches bactériennes (*Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Vibrio* sp. D66 et *P. aeruginosa* PAO1) avec les composés du groupe 2 de la famille des batatasins

	4M6		5M6		D66		PAO1	
	C	A	C	A	C	A	C	A
BAT 76	10	10	10	10	> 50	> 50	10	10
BAT 80	10	50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BAT 82	10	10	> 50	> 50	50	50	10	10
BAT 84	10	10	> 50	> 50	50	50	> 50	> 50
BAT 85	50	50	> 50	> 50	10	10	> 50	> 50
BAT 89	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
BAT 90	> 50	> 50	> 50	> 50	1	1	50	10
BAT 94	50	50	> 50	> 50	10	10	10	10
BAT 96	50	50	> 50	> 50	10	10	10	> 50
BAT 97	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
BAT 112	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BAT 113	10	10	10	10	> 50	> 50	> 50	> 50
BAT 125	10	10	10	10	> 50	> 50	> 50	> 50

C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : $\mu\text{g}/\text{mL}$

Dans ce groupe, les quatre composés (BAT 76, BAT 82, BAT 94, BAT 96) qui possèdent l'activité à plus large spectre (au moins trois souches bactériennes) possèdent au moins un groupement hydroxyle. Pour ces composés, l'ajout d'une fonction oxime n'accroît pas l'activité des molécules comparées à BAT-III. Par exemple, la comparaison des CMI des BAT 80 et BAT-III montre que le BAT 80 inhibe uniquement la croissance et l'adhésion de *Paracoccus* sp. 4M6. Ce composé possède une fonction oxime, un groupement méthoxy et deux groupements hydroxyles. L'activité de la molécule est moins importante au contraire, moins de souches sont inhibées par rapport au BAT-III. La molécule BAT 90 montre une faible CMI de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vis-à-vis de *Vibrio* sp. D66. Ce composé possède une liaison oxime et trois groupements méthoxy.

En comparant les activités des composés de la famille des BAT avec les CMI obtenues avec le DCOIT, seuls deux composés présentent une activité à large spectre. Une inhibition de la croissance bactérienne sur les quatre souches évaluées est observée par les composés BAT 20 et BAT 56 mais les CMI sont plus élevées (> 10 µg/mL) que celles du DCOIT.

Les travaux de Balasubramanian *et al* ont montré que la substitution de la fonction cétone par une fonction oxime jouait un rôle important dans l'apport de l'activité antibactérienne. Dans cette étude, l'activité des molécules était testée sur des pathogènes humains : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Pour les molécules possédant la fonction oxime, les concentrations minimales inhibitrices comprises entre 10 et 100 µg/mL se rapprochent des concentrations des molécules contrôle (Pénicilline et Streptomycine) (Balasubramanian *et al.*, 2006).

Un autre travail de Lindon *et al* a montré l'activité antibactérienne et antimicroalgale de composés des groupes 1 et 2. D'après les résultats obtenus, il était difficile de déterminer des relations entre la structure des molécules et l'activité associée. Cependant, il semblerait que la toxicité envers les larves de *Balanus improvus* ou l'inhibition de la métamorphose de *Ciona savignyi* soit augmentée par des composés contenant des groupements méthoxy (Communication personnelle : Lindon *et al.*, 2017).

Pour la suite, seuls les composés BAT 47, BAT 76, BAT 97 et BAT 125 seront étudiés. Ces composés appartiennent aux groupes 1 et 2 et présentent des activités sur au moins trois espèces bactériennes à différents seuils de concentrations (10 ou 50 µg/mL).

II – C – Famille des hemibastadines

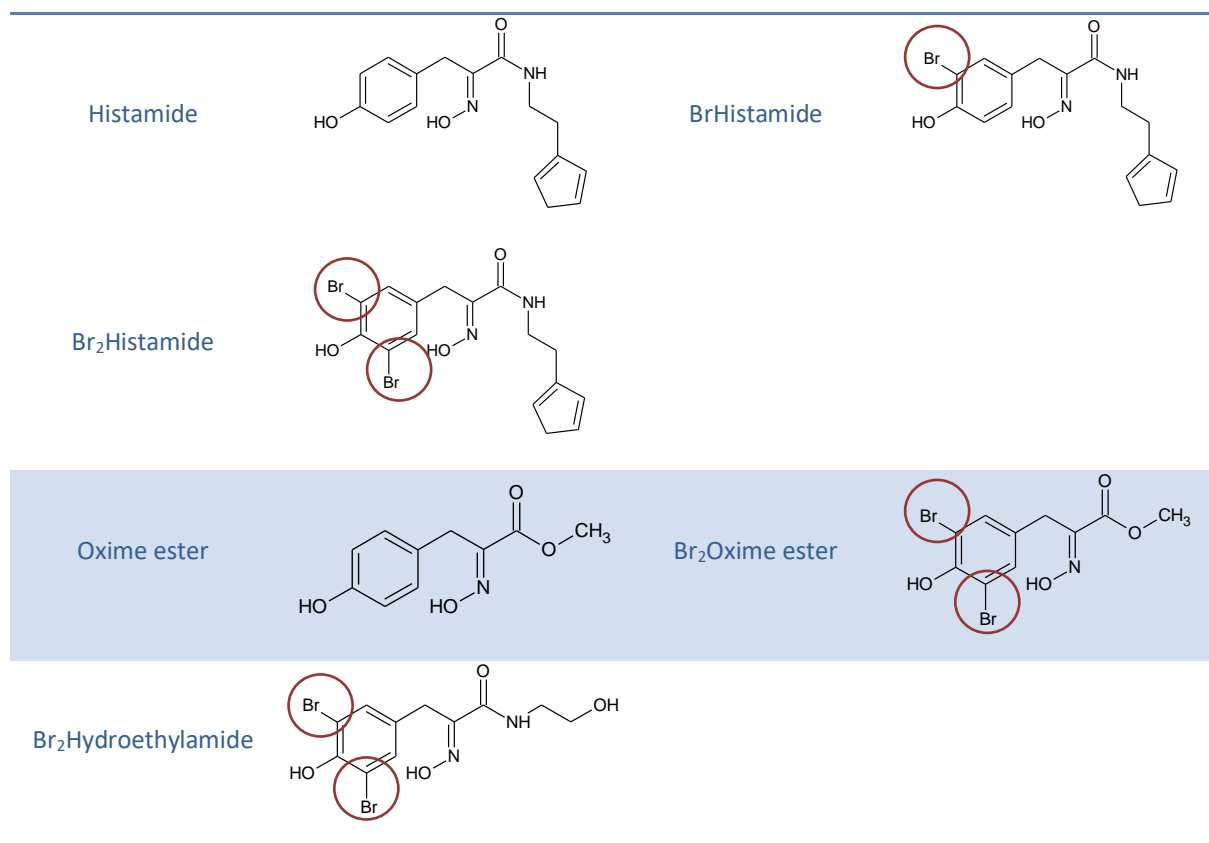
Les hemibastadines sont dérivés de molécules actives identifiées chez *Ianthella basta* en Indonésie (Niemann *et al.*, 2013). Dans cette famille, les composés sont classés en trois groupes d'après leur structure chimique, mais aucun bastadine d'origine naturelle n'a été testé faute de disponibilité.

II – C – 1 – Groupe 1

Le premier groupe de cette famille comporte huit sous-groupes, au sein desquels les variations de structure portent sur l'ajout d'un ou deux groupements brome. Ces molécules sont représentées dans le Tableau II-11.

Tableau II-11: Structures chimiques des composés du groupe 1 de la famille des hemibastadines, les bromes sont entourés

Composé	Structure	Composé	Structure
Hexylamide		BrHexylamide	
Br ₂ Hexylamide			
Isobutylamide		Brisobutylamide	
Cyclohexylamide		BrCyclohexylamide	
Br ₂ Cyclohexylamide			
Phenethylamide		BrPhenethylamide	
Br ₂ Phenethylamide			
Tryptamide		Br ₂ Tryptamide	



Les résultats du criblage contre les souches bactériennes sont présentés dans le Tableau II-12.

Pour le criblage contre les souches bactériennes, l'ajout d'un groupement brome permet d'augmenter l'activité du composé. Le composé BrHexylamide possède un atome de brome comparé à la molécule Hexylamide. Cet ajout induit une inhibition de croissance contre les bactéries *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 et *Vibrio* sp. D66. Lorsque deux groupements bromes sont greffés sur la molécule l'activité antibactérienne devient semblable au composé non bromé : pour les composés Br₂Hexylamide et Hexylamide aucune inhibition de croissance n'est observée.

15 à 20 % des produits d'origine naturelle présentant des activités biologiques contiennent des groupements halogénés (Gribble., 1998). La présence de groupes halogénés a déjà été décrite comme liée à des activités antibactériennes. Ainsi, dans une étude de Vairappan *et al*, l'impact de métabolites halogénés issus d'algues rouges de l'espèce *Laurencia* a été testé sur huit espèces marines : *Alcaligenes aquamarinus*, *Alteromonas* sp., *Azomonas agilis*, *Azotobacter beijerinckii*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia coli*, *Halobacterium* sp. et *Halococcus* sp. (Vairappan *et al.*, 2001). Ils ont émis l'hypothèse que la présence de composés halogénés, contenant des groupements brome pourrait être un moyen de protection contre des contaminations bactériennes.

Tableau II-12 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) contre les souches bactériennes (*Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Vibrio* sp. D66 et *P. aeruginosa* PAO1) avec les composés du groupe 1 de la famille des hemibastadines

	4M6		5M6		D66		PAO1	
	C	A	C	A	C	A	C	A
Hexylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BrHexylamide	> 50	> 50	10	10	10	10	> 50	> 50
Br₂Hexylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Isobutylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BrIsobutylamide	10	10	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
CycloHexylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BrCycloHexylamide	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	50	50
Br₂CycloHexylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	50	50
Phénéthylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BrPhénéthylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10	50	50
Br₂Phénéthylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
Tryptamide	> 50	> 50	> 50	> 50	50	50	> 50	1
Br₂Tryptamide	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10	> 50	1
Histamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BrHistamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	1
Br₂Histamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	1
Oxime ester	> 50	> 50	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50
Br₂oxime ester	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	1
Br₂Hydroéthylamide	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

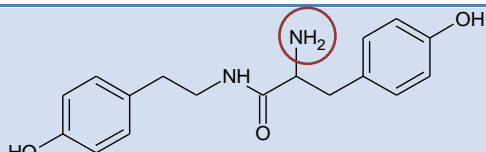
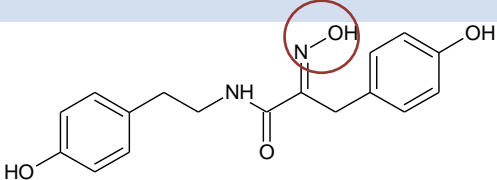
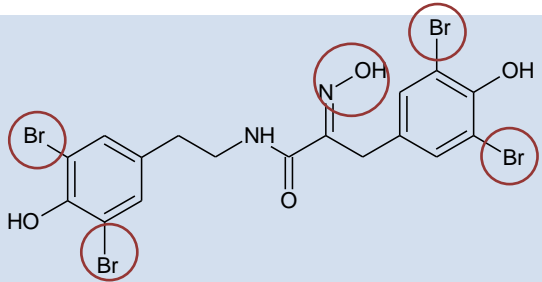
C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : $\mu\text{g/mL}$

II – C – 2 – Groupe 2

Ce second groupe de composés regroupe trois molécules possédant les structures les plus proches des unités formant des composés naturellement actifs isolés chez plusieurs espèces d'éponge, les bastadines (Niemann *et al.*, 2013).

Les structures des composés du groupe 2 sont présentées dans le Tableau II-13. Le composé Tyrosintyramide ne possède ni fonction oxime, ni groupement bromé. Le NBHB contient une fonction oxime et le DBHB a une fonction oxime ainsi que quatre groupements bromés.

Tableau II-13 : Structure des composés du groupe 2 de la famille des hemibastadines

Composé	Structure
Tyrosintyramide	
Norbromohemibastadine (NBHB)	
Dibromohemibastadine (DBHB)	

Les résultats des criblages contre les souches bactériennes sont présentés dans le Tableau II-14 :

Tableau II-14 : Valeurs de concentrations minimales inhibitrices ($\mu\text{g/mL}$) contre les souches bactériennes (*Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Vibrio* sp. D66 et *P. aeruginosa* PAO1) des composés du groupe 2 de la famille des hemibastadines

	4M6		5M6		D66		PAO1	
	C	A	C	A	C	A	C	A
Tyrosintyramide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	50
Norbromohemibastadine	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Dibromohemibastadine	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : $\mu\text{g/mL}$

Pour ce second groupe de la famille des hemibastadines, les trois composés ne présentent pas d'activité sur la croissance et l'adhésion bactérienne. Seul le composé Tyrosintyramide montre une inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* PAO1 à 50 $\mu\text{g/mL}$.

Toutefois, ces composés ont déjà suscité un intérêt dans le domaine des substances AF. Une étude de Niemann *et al* a montré des relations entre la structure de composés dérivés du DBHB et l'activité inhibitrice de phénoloxydase, une enzyme impliquée dans des voies de biosynthèse régulant l'adhésion des moules. Dans cette étude, plusieurs modifications de structures ont été

réalisées notamment la substitution des groupements brome par du chlore ou de l'iode. Pour ces deux substitutions, l' Cl_{50} était proche de celle du DBHB (1 μ M). Le brome a également été retiré de la structure par la synthèse du composé NBHB. Pour cette molécule (NBHB), l' Cl_{50} était légèrement augmentée (3 μ M). Dans un autre cas, la liaison oxime a été substituée par un groupement NH_2 , avec la synthèse du composé tyrosintyramide. Pour ce composé l'activité sur la phénoloxydase était perdue avec une $Cl_{50} > 100 \mu$ M (Niemann *et al.*, 2015).

Dans le cas de l'adhésion des moules, la présence de la fonction oxime couplée à la présence de groupements halogénés apportent une activité envers la phénoloxydase. Pour les bactéries, l'activité n'est pas liée à la structure. Néanmoins, le DBHB ayant déjà été décrit dans la littérature comme possédant des activités AF prometteuses par l'inhibition d'une enzyme impliquée dans l'adhésion de la moule ou par l'inhibition de l'adhésion des larves de balanes (Ortlepp *et al.*, 2007 ; Niemann *et al.*, 2015) ces trois composés seront étudiés par la suite.

Parmi le large choix de composés évalués, aucune molécule ne présente des activités antibactériennes semblables au DCOIT. Néanmoins, l'utilisation de composés antibactériens en vue d'une application AF n'est pas une stratégie idéale de par la réglementation contraignante pour la mise sur le marché de biocides. Dans le passé, l'utilisation de certains composés toxiques a conduit à des problèmes environnementaux majeurs. Dorénavant les stratégies développées reposent sur une perturbation de l'adhésion des organismes plutôt qu'un effet toxique.

Ce criblage, vis-à-vis des bactéries marines et terrestres, a permis de sélectionner des composés pour la suite de l'étude. Les critères de choix sont : i) une activité antimicrobienne ciblée ou large ou ii) une absence de toxicité et iii) une quantité suffisante. Dans la famille des batatasins, le BAT 47, BAT 76, BAT 97 et BAT 125 ont été sélectionnés puisqu'ils présentaient des activités inhibitrices sur au moins deux souches marines ou inhibaient la souche référente *P. aeruginosa* PAO1. Les CMI déterminées pour ces composés sont de 10 μ g/mL. Pour la famille des hemibastadines, les composés tyrosintyramide, NBHB et DBHB ont été choisis d'une part en raison de leur disponibilité et de l'absence de létalité. D'autre part, des études ont montré une activité antifouling de ces molécules.

III – Étude du mode d'action des molécules

Après avoir sélectionné les composés d'intérêt par un criblage en microplaque, le mode d'action de ces molécules est étudié en évaluant leur interaction dans les voies cellulaires.

En effet, dans la littérature de nombreux composés sont criblés en vue d'une application antifouling mais leurs modes d'action sont rarement décrits. Les composés peuvent, par exemple, impacter l'adhésion ou la communication bactérienne (QS).

III – A – Communication bactérienne

Les premiers tests réalisés ont pour objectif de comprendre si les composés peuvent perturber certaines voies de communication bactérienne. Au sein des cellules bactériennes, le QS contrôle de nombreux phénotypes tels que l'expression de la virulence, la mobilité, l'adhésion ou la formation de biofilm bactérien. En perturbant les voies de communication, il est probable que la formation de colonies bactériennes présentes dans le microfouling soit réduite.

Pour étudier l'effet des composés sur le QS, les biorapporteurs *Escherichia coli* (pSB401) et *Vibrio harveyi* (JAF548) sont utilisés.

III – A – 1 – Détermination du potentiel anti-quorum sensing

Afin d'étudier les propriétés anti-quorum sensing du DBHB, des biorapporteurs sont testés. Les HSL utilisées pour activer les systèmes plasmidiques sont des HSL de synthèse qui seront ajoutées au milieu de croissance. La bactérie *E. coli* ne produit pas naturellement d'HSL. Ce test permet de mettre en évidence si les composés peuvent interagir sur la reconnaissance HSL-récepteur en s'affranchissant des voies de synthèse des HSL.

Impact des molécules sur la reconnaissance HSL – récepteur

Le biorapporteur *E. coli* pSB401 reconnaît les HSL (C₆ à C₁₀), la reconnaissance HSL-récepteur induit la production d'une luminescence. L'utilisation du biorapporteur montre que les composés BAT 47, BAT 97 et NBHB ne possèdent pas de propriétés inhibitrices du QS (Figure II-8. A-B et C).

Le composé DBHB induit une diminution du ratio RLU par rapport à la DO (Figure II-8. D) qui est fonction de la concentration.

Les résultats de ce test montrent que le DBHB possède des propriétés inhibitrices du QS et inhibe la reconnaissance HSL-récepteur. Ce résultat permet d'émettre différentes hypothèses. D'une part, le DBHB pourrait se lier aux récepteurs des HSL. Néanmoins, la structure du DBHB est différente des HSL. D'autre part, le DBHB serait capable de se lier aux HSL. L'encombrement stérique résultant empêcherait la reconnaissance HSL-récepteur.

Le DBHB peut aussi interagir à un autre niveau, sur des voies de phosphorylation contrôlées par le QS permettant l'activation ou la répression de certaines voies cellulaires.

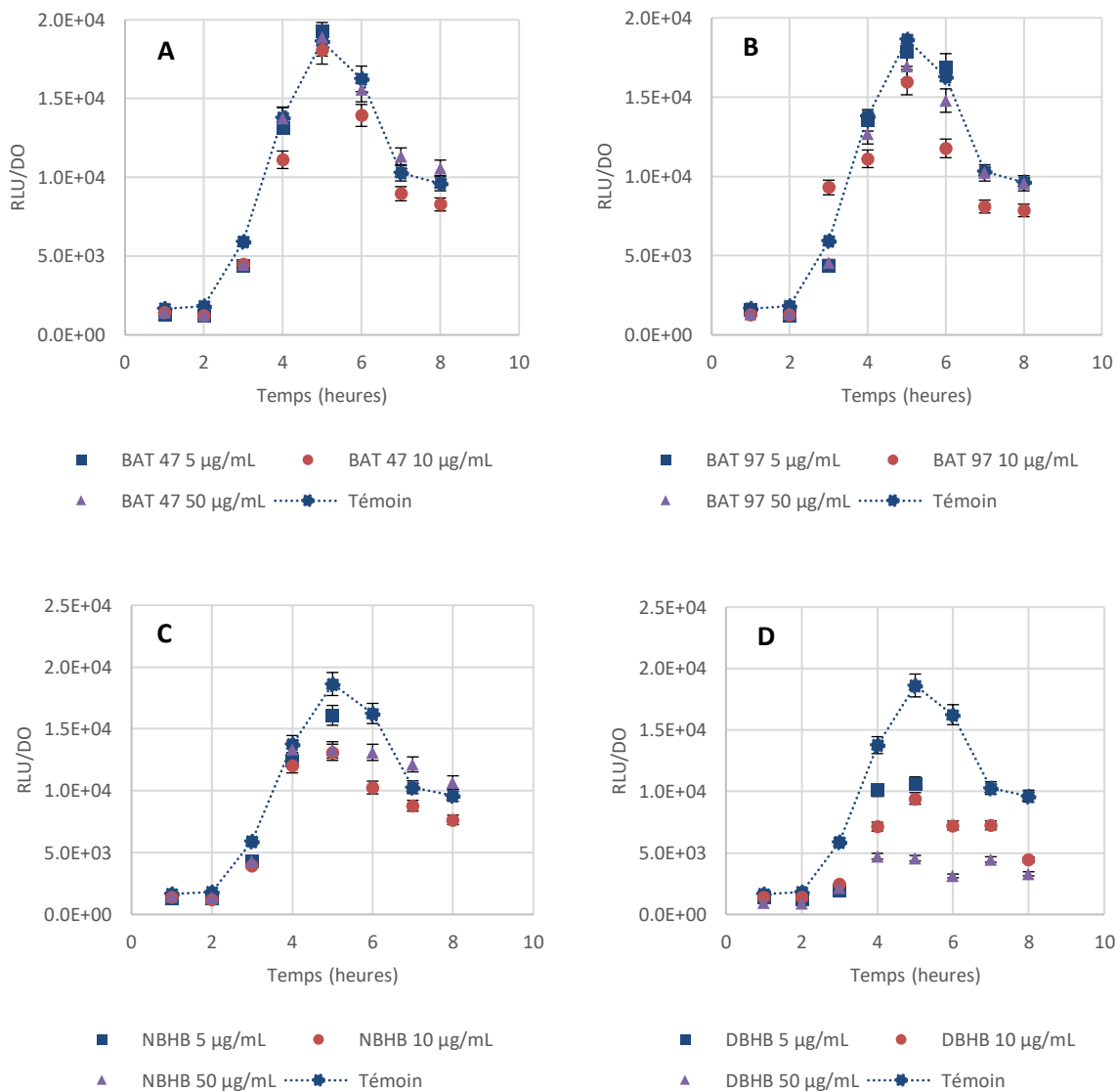
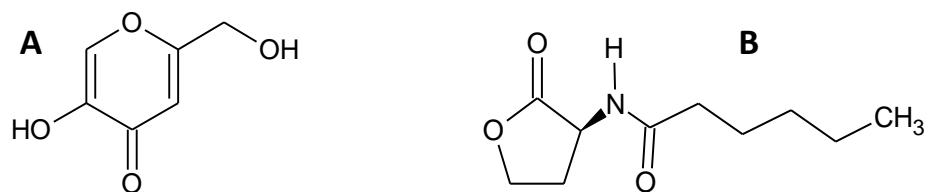


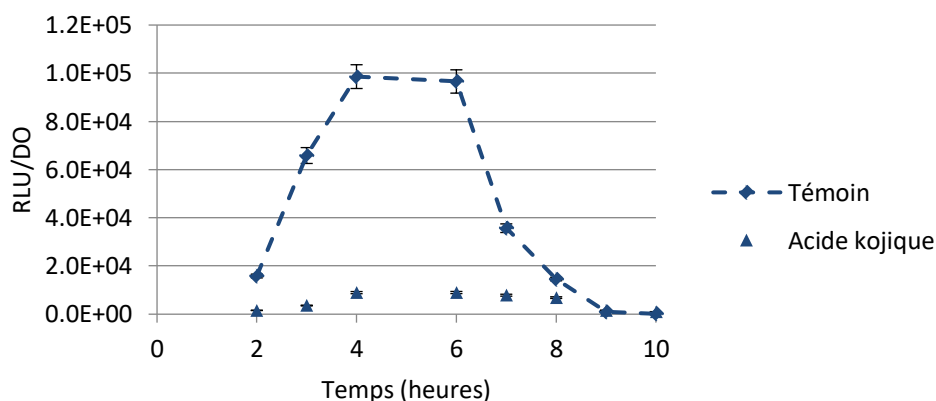
Figure II-8 : Cinétique de la reconnaissance HSL-récepteur plasmidique de la souche pSB401 en présence des composés BAT 47 (A), BAT 97 (B), NBHB (C) et DBHB (D) à 5, 10 et 50 µg/mL en fonction du temps, les barres représentent les écarts-types

Pour vérifier ces hypothèses, l'activité du DBHB est comparée à l'activité d'une molécule déjà décrite comme inhibiteur du QS, l'acide kojique testée à 5 µg/mL.

L'acide kojique aussi nommé 5-hydroxy-2-hydroxyméthyl-4H-pyran-4-one est une substance antibiotique produite par de nombreuses espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Dans une étude de Drobretsov *et al*, l'activité inhibitrice du QS de l'acide kojique a été étudiée avec les biorapporteurs *E. coli* pSB1075 (Rapporteur du système LasR) et pSB401 (Rapporteur du système LuxR). En présence du biorapporteur pSB401, l'ajout d'acide kojique à 34 µM induit une inhibition de la luminescence liée à la reconnaissance HSL- récepteur (Figure II-9).

Figure II-9 : Structure de l'acide kojique (A) et de la C₆-HSL (B)

L'acide kojique a une activité ciblée puisque l'ensemble des systèmes du QS ne sont pas inhibés par ce composé. L'effet de l'acide kojique avait également été étudié sur la formation de communauté microbienne. Une concentration de 330 μM à 1 mM d'acide kojique diminue significativement la densité bactérienne (Dobretsov *et al.*, 2011). Une autre étude de Dobretsov *et al.*, présente l'activité de l'acide kojique comme semblable aux furanones, sa structure proche des HSL peut expliquer son interaction sur le QS et son activité d'inhibition de formation de biofilm (Figure II-9) (Dobretsov *et al.*, 2007).

Figure II-10 : Cinétique de reconnaissance HSL-récepteur induisant la production de luminescence pour pSB401 avec ajout de l'acide kojique à 5 $\mu\text{g/mL}$, les barres représentent les écarts-types

En comparant les inhibitions par le DBHB et l'acide kojique, les résultats obtenus sont différents. Dans le cas de l'acide kojique l'inhibition est plus marquée (Figure II-10). L'émission de luminescence est réprimée par l'acide kojique d'un facteur de plus de 5 au maximum de production à 3 heures, tandis que dans le cas du DBHB, le facteur d'inhibition au maximum d'émission à 5 heures est de 2 (Figure II-8). Il est probable que le DBHB possède un mode d'action différent de l'acide kojique et ne bloque donc pas le QS au niveau du récepteur.

Impact des molécules sur la reconnaissance HSL-récepteur en faisant varier la nature de la chaîne carbonée de l'homosérine lactone

Les résultats sont classés en fonction de la longueur de la chaîne carbonée des HSL (6, 8 ou 10 carbones) et sont présentés sur la Figure II-11.

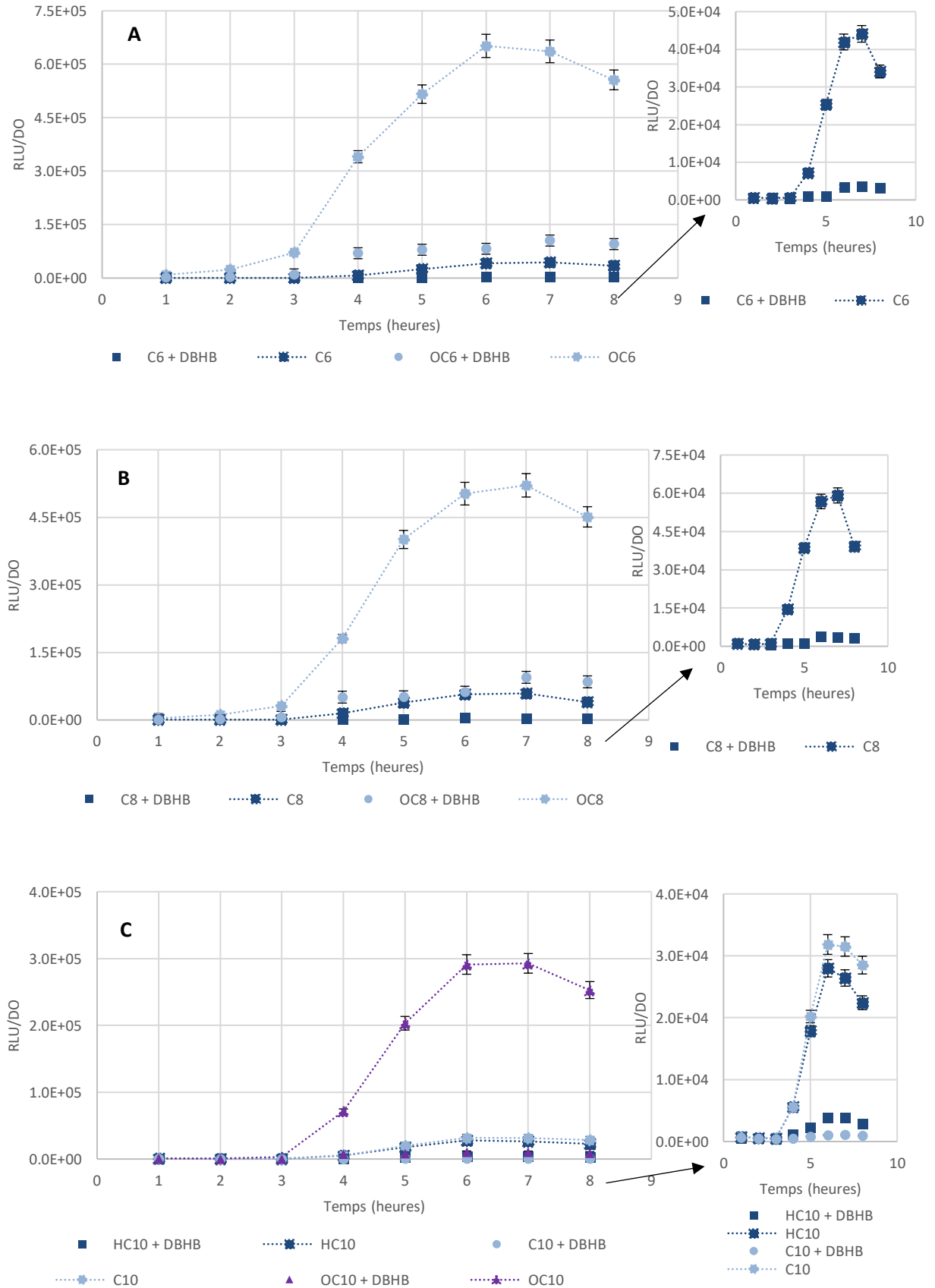


Figure II-11 : Cinétique de luminescence produite lors de la reconnaissance HSL-récepteur en fonction de l'ajout de DBHB à 50 µg/mL et en fonction du temps (A : 6 carbones, B : 8 carbones, C : 10 carbones), les barres représentent les écarts-types

Le composé DBHB ne possède pas une activité spécifique sur un type d'HSL. Mais ce composé peut inhiber la reconnaissance des HSL : C₆, OC₆, C₈, OC₈, C₁₀, OC₁₀ et HC₁₀. La nature ou la longueur de la chaîne ne diminue pas l'activité du DBHB. Un facteur d'inhibition entre 8 et 10 est obtenu pour l'ensemble des HSL testées. Ce composé est un inhibiteur du QS mais il est difficile de déterminer avec certitude la cible exacte de cette molécule. Les hypothèses que nous pouvons émettre à ce stade sont soit des interactions avec les HSL empêchant leur reconnaissance avec le récepteur du QS, soit une interaction dans une autre étape de régulation impactant la reconnaissance HSL-récepteur (voie de phosphorylation par exemple).

Des études ont décrit l'impact de composés sur des voies intracellulaires mais ces résultats sont difficiles à obtenir. Par exemple, des furanones bromées ont déjà été décrites comme inhibiteurs de régulation phénotypique du QS chez les bactéries à Gram négatif. Le mode d'action de ces molécules a été validé par les puces à ADN chez les bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa*. Il a été montré que 80 % des gènes chez *P. aeruginosa* peuvent être réprimés par des furanones et 79 % des gènes chez *E. coli* (Hentzer *et al.*, 2003 ; Ren *et al.*, 2004). Les travaux de Janssens *et al.*, ont montré l'activité de furanones bromées inhibant la formation de biofilm sans agir directement sur les voies du QS. D'autres voies de régulation étaient modifiées par ces composés comme les voies de réponse au stress. Dans cette même étude, la furanone bromée Fur-5 inhibait des voies de biosynthèse des flagelles et le phénomène de swimming chez la bactérie *Salmonella* sp. (Janssens *et al.*, 2008).

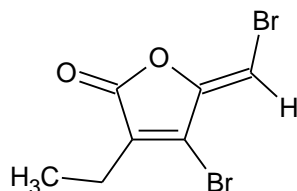


Figure II-12 : Structure du composé Fur-5 (Janssens *et al.*, 2008)

L'interaction sur la voie de biosynthèse des flagelles pourrait expliquer l'inhibition de la formation du biofilm par *Salmonella* sp.. En effet, il a déjà été montré que la présence de flagelles pouvait être indispensable à la formation de biofilm chez certaines bactéries (Teplitski *et al.*, 2006).

Les furanones halogénées ont été montrées comme inhibiteur du QS en inhibant les HSL ou les AI-2 chez les bactéries à Gram négatif telles que *E. coli* (Ren *et al.*, 2004), *P. aeruginosa* (Hentzer *et al.*, 2002) ou *C. violaceum* (Martinelli *et al.*, 2004). Néanmoins, chez *Salmonella* sp., les systèmes de régulation du QS ne sont pas modifiés par Fur-5. Les expériences en puces à ADN n'ont montré aucune activité de Fur-5 sur l'expression des gènes du système d'AI-2 ou sur le récepteur SdiA semblable au récepteur RhIR ou LasR chez *Salmonella* sp. (Janssens *et al.*, 2008).

Des hypothèses ont été émises. Il est probable que i) les furanones ciblent un autre système de QS non décrit à l'heure actuelle chez *Salmonella* sp., ii) que la cible des furanones ne possède aucun lien avec le QS, iii) ou que les observations d'inhibition de biofilm résultent d'une combinaison d'effets par une activité des furanones sur plusieurs cibles cellulaires.

Cette étude illustre la difficulté à déterminer les cibles de certains composés. Dans le cas du DBHB, une étude moléculaire pourrait permettre de répondre à certaines hypothèses. De plus, le QS est un système bien décrit pour certaines bactéries comme *P. aeruginosa* ou *V. fisheri*. Mais chez de nombreuses bactéries comme les bactéries marines, les systèmes de communications ne sont pas aussi bien décrits et connus.

Dans une étude de Kalia en 2013, quatre critères de sélection pour un composé inhibiteur du QS ont été donnés, i) la molécule doit être de petite taille et réprime l'expression de gènes du QS, ii) la molécule doit avoir une forte spécificité vis-à-vis d'un récepteur donné, iii) la molécule ne doit pas perturber la croissance du biorapporteur, iv) la molécule doit être stable et résistante (Kalia., 2013).

Dans notre étude, le DBHB possède une taille semblable aux HSL, la molécule ne perturbe pas la croissance des biorapporteurs ou des autres bactéries marines ou terrestres testées. La molécule est également stable puisque son activité est conservée dans le temps. Cependant, il n'a pas été démontré si la molécule inhibait l'expression de gènes, ni quel était son site d'action.

Dans les études réalisées, le DBHB a montré des inhibitions de la production de la luminescence ou de la fluorescence chez les biorapporteurs étudiés. Mais il pourrait être possible que la molécule interfère sur les voies de synthèse de réponse à la reconnaissance HSL-récepteur, comme par exemple en inhibant la voie de biosynthèse de la luminescence.

III – A – 2 – Validation de l'absence d'activité du DBHB sur la biosynthèse de luminescence

Dans le but de valider le potentiel anti-quorum sensing du DBHB, un test supplémentaire utilisant la souche *Vibrio harveyi* JAF548 a été réalisé. Ce test permet de confirmer l'absence d'interaction de la molécule sur le système de production de luminescence.

Le suivi de production de luminescence pendant 8 heures avec ou sans la molécule est présenté sur la Figure II-13 pour le DBHB et sur la Figure II-14 pour l'acide kojique.

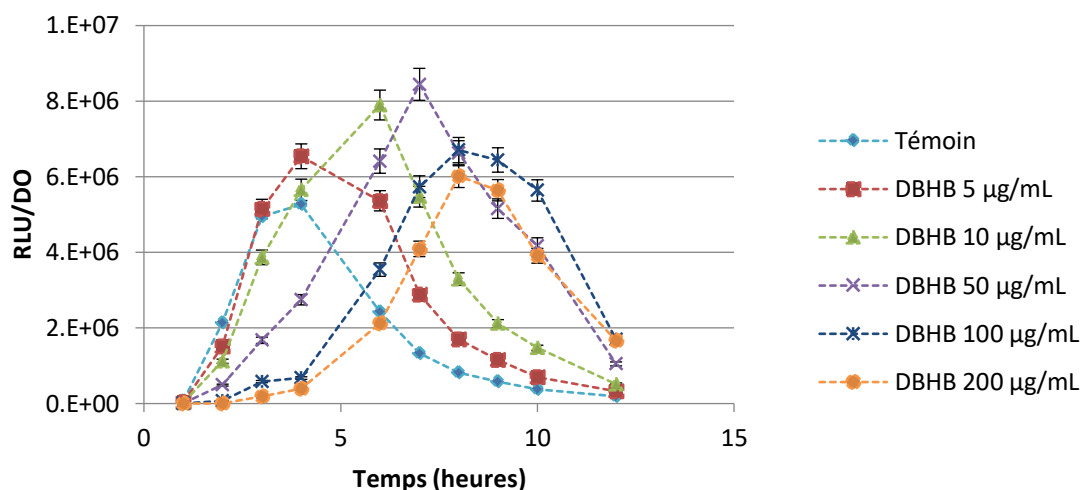


Figure II-13 : Cinétique de production de luminescence par le biorapporteur *V. harveyi* JAF548 en présence et en absence de DBHB testé à 5, 10, 50, 100 et 200 µg/mL, les barres représentent les écarts-types

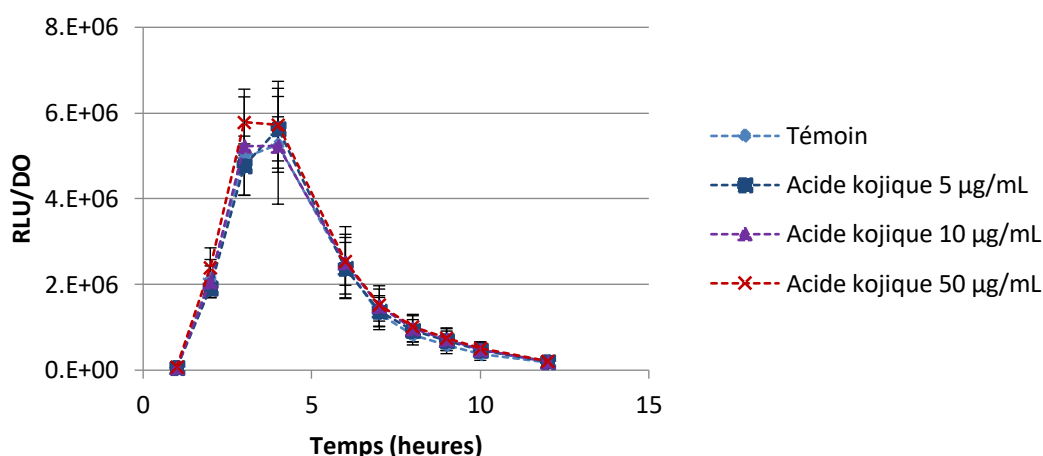


Figure II-14 : Cinétique de production de luminescence par le biorapporteur *V. harveyi* JAF548 en présence et en absence de l'acide kojique testé à 5, 10 et 50 µg/mL, les barres représentent les écarts-types

Dans le cas de l'acide kojique, aux trois concentrations testées, la production de luminescence par *V. harveyi* JAF548 est strictement identique au témoin (Figure II-14). L'acide kojique ne possède aucun effet sur les voies de biosynthèse de la luminescence. Au contraire, lors de l'ajout de DBHB (Figure II-13), un décalage du maximum de production est observé avec l'augmentation de la concentration en DBHB. Aux concentrations de 5 et 10 µg/mL, la différence de production n'est pas significativement différente (ANOVA, $p < 0,01$). Cependant, à partir de 50 µg/mL, la production de luminescence est significativement retardée. D'après ces résultats il est fort probable que le DBHB n'interagisse pas directement sur les systèmes de communication comme l'acide kojique mais plutôt sur des voies de régulation comme des chaînes de phosphorylation activant ou inhibant des protéines régulant le QS.

Cette seconde partie a permis de mettre en évidence que les composés BAT 47, BAT 97 et NBHB ne possédaient pas d'activité inhibitrice du QS tandis que la molécule DBHB en possède une. Cette

molécule est capable d'inhiber de 5 à 50 µg/mL la production de luminescence ou de fluorescence liée à la reconnaissance HSL-récepteur plasmidique. L'inhibition n'est dépendante ni de la nature de chaîne carbonée de l'HSL, ni du système de détection. Cependant en comparant l'activité du DBHB et de l'acide kojique, une molécule déjà décrite comme inhibiteur du QS, les réponses ne sont pas semblables. Il est probable que ces deux molécules n'agissent pas sur les mêmes cibles cellulaires. Les différences de taille et de structure entre les composés pourraient expliquer ce résultat.

III – B – Impact des composés sur la mobilité bactérienne

L'impact des composés a également été étudié sur la mobilité bactérienne.

Les organites employés dans les mécanismes de déplacement bactériens sont sous le contrôle du QS et sont impliqués dans les étapes d'adhésion et de formation de biofilms. L'impact des composés sur les mécanismes de mobilité bactérienne ne permet pas de valider un effet sur le QS. Les voies de régulation de la mobilité sont bien contrôlées par le QS mais plusieurs intermédiaires interviennent (Verstraeten *et al.*, 2008).

L'effet est étudié sur trois types de mobilité : le swimming, swarming et twitching faisant intervenir principalement deux organites ; les flagelles et les *pili* de type IV. Les résultats de mobilité bactérienne de la souche *Pseudomonas aeruginosa* en présence des composés appartenant à la famille des batatasins ou des hemibastadines sont présentés sur les Figure II-15 et Figure II-16.

Composés de la famille des batatasins (BAT)

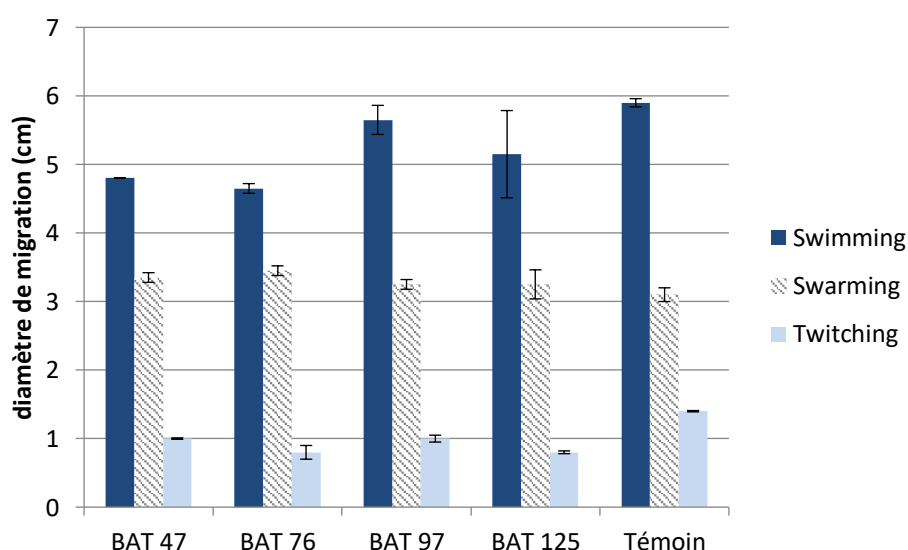


Figure II-15 : Diamètre de migration du swimming, swarming et twitching de PAO1 en présence des composés de la famille des BAT, les barres représentent les écarts-types

Composés de la famille des hemibastadins

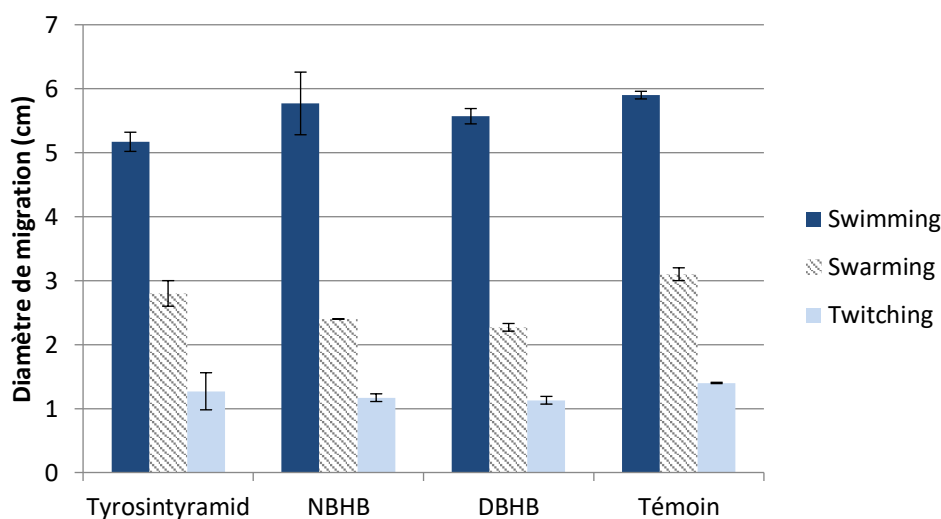


Figure II-16 : Diamètre de migration du swimming, swarming ou twitching de PAO1 en présence des composés de la famille des hemibastadin à 10 µg/mL, les barres représentent les écarts-types

Aucun des composés testés, batatasins et hemibastadins, ne perturbent significativement la mobilité bactérienne (Figure II-15 et Figure II-16).

Aucun composé ne perturbe la mobilité bactérienne, or ces organites, les flagelles et *pili* de type IV sont impliqués dans les mécanismes de formation de biofilm. Dans les étapes de formation de biofilm, les flagelles interviennent à différents stades : par exemple chez la bactérie *P. aeruginosa*, lors de bronchites chroniques ou de mucoviscidose, ce sont les flagelles qui favorisent son implantation dans les cellules épithéliales pulmonaires (Feldman *et al.*, 1998 ; Bucior *et al.*, 2012). Les flagelles et *pili* de type IV sont également impliqués dans la structuration et le développement du biofilm (O'Toole & Kolter., 1998 ; Toutain *et al.*, 2007). Par exemple, lors de mutations de *P. aeruginosa* où les gènes contrôlant la formation de flagelles sont désactivés, le biofilm formé est plus fin et irrégulier (Klausen *et al.*, 2003 ; Robleto *et al.*, 2003). Des composés inhibant le QS peuvent inhiber la mobilité bactérienne. Dans l'étude de Rasmussen *et al.*, l'ajout de furanones halogénées à 20 µM issus de la macroalgue *Delisea pulchra* inhibe la mobilité de la bactérie *Serratia liquefaciens*. Cette absence de mobilité est dû à la réduction du surfactant produit par la bactérie (Rasmussen *et al.*, 2000). Même si les composés NBHB et DBHB n'ont montré aucune activité sur la mobilité bactérienne, l'impact sur l'adhésion et la formation de biofilms bactériens par ces deux composés est étudié. En effet, d'autres mécanismes permettent aux bactéries d'adhérer et de former des biofilms.

III – C – Adhésion et formation de biofilm

L'activité des composés a été étudiée sur les capacités à adhérer et à former un biofilm de plusieurs bactéries (marines et terrestres). La formation de biofilm peut impliquer des procédés et systèmes

contrôlés en partie par le QS. En inhibant une partie du QS, il est probable que certains composés puissent agir sur la capacité des bactéries à former un biofilm et par conséquent inhiber ou réduire le développement du microfouling en milieu marin. Seuls deux composés de la famille des hemibastadins sont testés (NBHB et DBHB).

III – C – 1 – Impact des composés sur l'adhésion bactérienne

Pour l'étude des composés sur l'adhésion bactérienne, deux conditions sont testées. Dans un premier test, les composés sont ajoutés à la suspension bactérienne injectée dans la chambre à flux. Cette condition permet d'observer si les molécules peuvent inhiber les mécanismes d'adhésion tels que l'implication des appendices ou la sécrétion d'EPS. L'autre stratégie consiste à conditionner la surface d'adhésion avec la molécule, et ainsi observer si la molécule peut modifier les propriétés de la surface et inhiber l'adhésion bactérienne.

Ajout des composés dans la suspension bactérienne

La Figure II-17 présente l'adhésion bactérienne dans la chambre à flux après ajout des composés NBHB ou de DBHB à 10 µg/mL dans la suspension bactérienne. Les tests ont été menés sur une bactérie bien décrite : *P. aeruginosa* PAO1 et une bactérie marine isolée dans le Golfe du Morbihan : *Paracoccus* sp. 4M6.

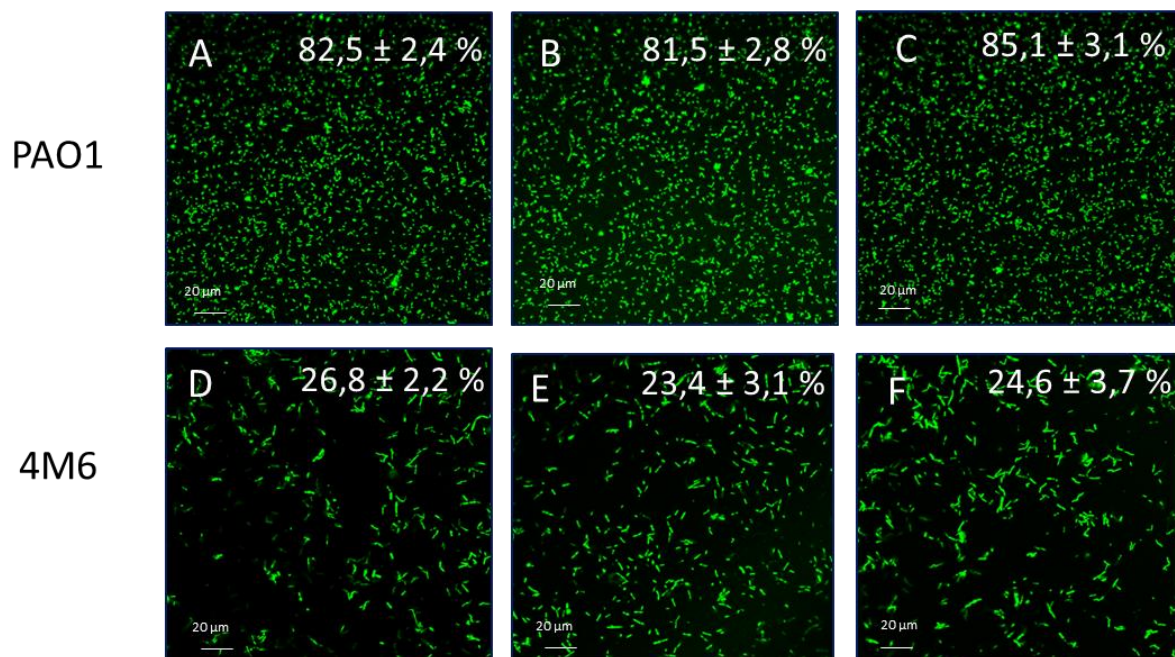


Figure II-17 : Observation de l'adhésion après 2 heures lors de l'injection de NBHB et de DBHB simultanément à la suspension bactérienne avec les pourcentages de recouvrement (%) déterminés par le programme JAVA. Condition témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E) et ajout de DBHB (C et F), les ± représentent les écarts-types

Les observations en MCBL ainsi que les pourcentages de recouvrement bactérien (Figure II-17) ne montrent pas d'activité significative des composés NBHB et DBHB sur l'adhésion bactérienne pour

cette condition. L'ajout de NBHB ou de DBHB dans la suspension bactérienne ne perturbe pas les mécanismes d'adhésion mis en place par les bactéries. Ces résultats sont en adéquation avec les tests sur la mobilité bactérienne : les composés NBHB et DBHB n'ont pas d'effet sur les appendices (flagelle et *pili*). Ces deux composés n'impactent pas les mécanismes d'adhésion.

Conditionnement du support par le composé

La Figure II-18 présente l'adhésion bactérienne de *Paracoccus* sp. 4M6 et *P. aeruginosa* PAO1 après conditionnement du support d'adhésion avec un flux de milieu minimum contenant les composés NBHB ou DBHB à 10 µg/mL.

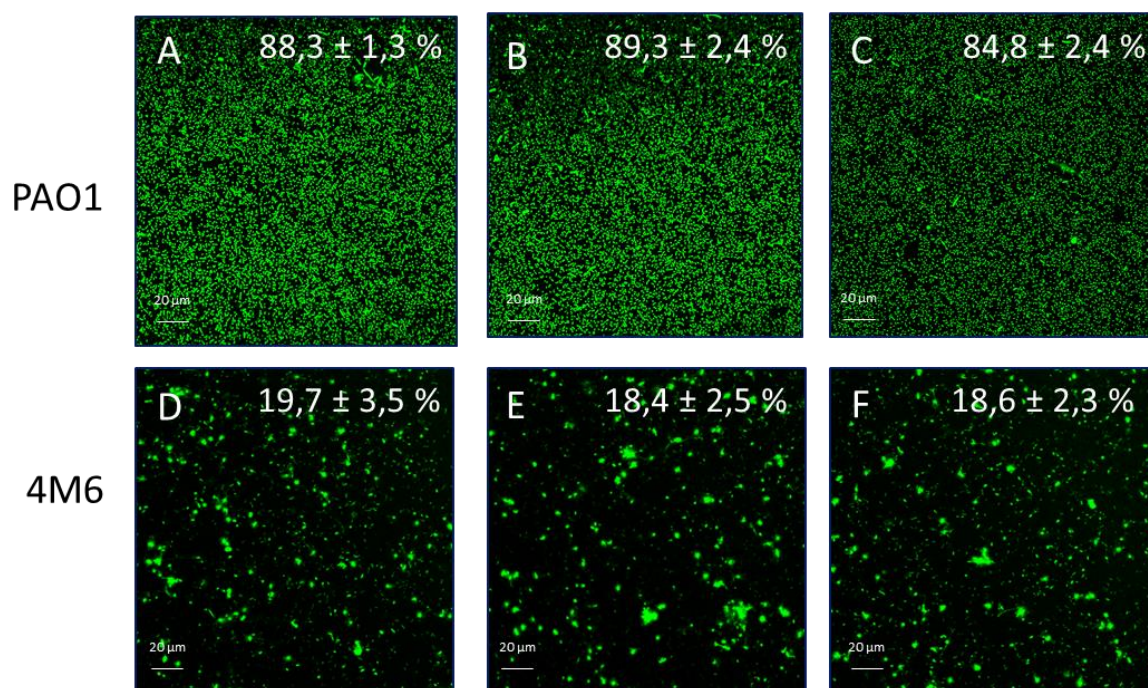


Figure II-18 : Observation en MCBL de l'adhésion bactérienne après conditionnement à 10 µg/mL par le NBHB ou le DBHB avec les pourcentages de recouvrement (%) déterminés par le programme JAVA. Condition témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E), ajout de DBHB (C et F), les ± représentent les écarts-types

Les observations obtenues ainsi que les pourcentages de recouvrement (Figure II-18) indiquent que le conditionnement de la lamelle de verre par les composés n'induit pas d'effet sur l'adhésion bactérienne. Il est possible que l'étape de conditionnement de la surface : i) ne modifie pas les propriétés de la surface, ii) ne permet pas au DBHB de s'adsorber sur cette surface ou iii) le DBHB n'est pas capable de perturber l'adhésion des bactéries étudiées.

Les deux conditions testées permettent de conclure que les composés NBHB et DBHB ne possèdent pas de propriétés anti-adhésion à 10 µg/mL.

III – C – 2 – Impact des composés sur la formation du biofilm

Après avoir étudié l'impact du NBHB et du DBHB sur l'adhésion bactérienne, celui sur la formation de biofilm est recherché. L'effet sur la formation de biofilm est observé chez quatre bactéries, deux bactéries à Gram négatif produisant des HSL (*Paracoccus* sp. 4M6 et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1), une bactérie à Gram négatif ne produisant pas d'HSL (*Pseudoalteromonas* sp. 5M6) et une bactérie à Gram positif (*Bacillus* sp. 4J6).

Bactéries à Gram négatif, produisant des homosérines lactones : *P. aeruginosa* PAO1 et *Paracoccus* sp. 4M6

Afin d'évaluer l'activité des molécules NBHB et DBHB sur la formation du biofilm, deux bactéries à Gram négatif, produisant des HSL sont utilisées (*Pseudomonas aeruginosa* et *Paracoccus* sp. 4M6). Le NBHB et le DBHB sont testés à plusieurs concentrations de 1, 5, 10 et 20 µg/mL.

Étude des composés NBHB et DBHB sur la formation de biofilm par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

- Impact du NBHB sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa* PAO1

Tout d'abord, l'activité du NBHB est évaluée sur la capacité de la bactérie *P. aeruginosa* à former un biofilm. Les observations obtenues après 24 heures en microscopie confocale à balayage laser sont présentées sur la Figure II-19. Les valeurs de biovolume déterminées par le programme COMSTAT sont visibles sur le Tableau II-15.

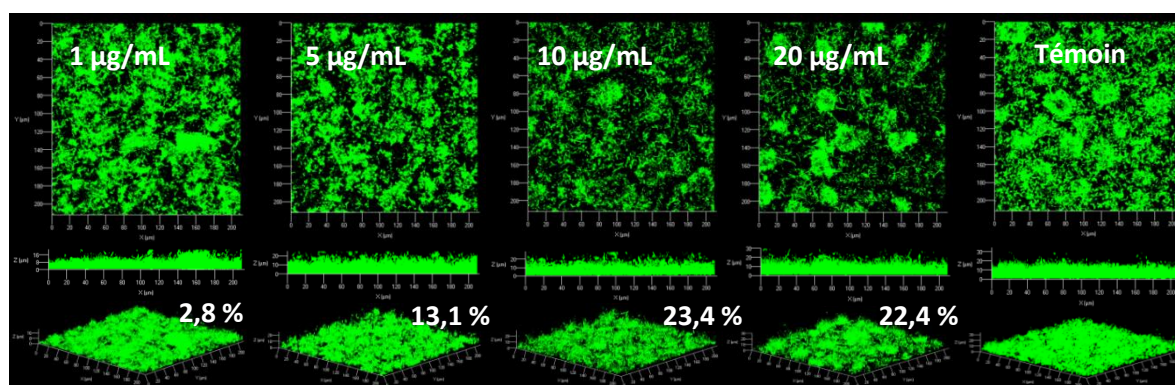


Figure II-19 : Observation des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 en MCBL lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin

Aux quatre concentrations testées : 1, 5, 10 et 20 µg/mL, le biofilm est progressivement inhibé. Les pourcentages de biofilm déterminés à partir des valeurs obtenues pour la condition témoin le prouvent. Plus la concentration en NBHB dans le milieu augmente plus le pourcentage d'inhibition est important. A la plus forte concentration évaluée (20 µg/mL), le biofilm est inhibé de 22 %. Néanmoins, ces inhibitions ne sont pas statistiquement significatives en raison des écarts-types (ANOVA).

Tableau II-15 : Valeurs de biovolumes des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL

	Témoin	1 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
PAO1 Biovolume (µm ³ /µm ²)	10,7 ± 1,1	10,4 ± 0,8	9,3 ± 0,9	8,2 ± 2,1	8,3 ± 1,8
ANOVA		-	-	-	-

- : différence non significative, p > 0,05 par rapport au témoin

Des concentrations supérieures n'ont pu être testées, faute de disponibilité en composés.

- Impact du DBHB sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa* PAO1

Les observations obtenues par MCBL sont présentées sur la Figure II-20.

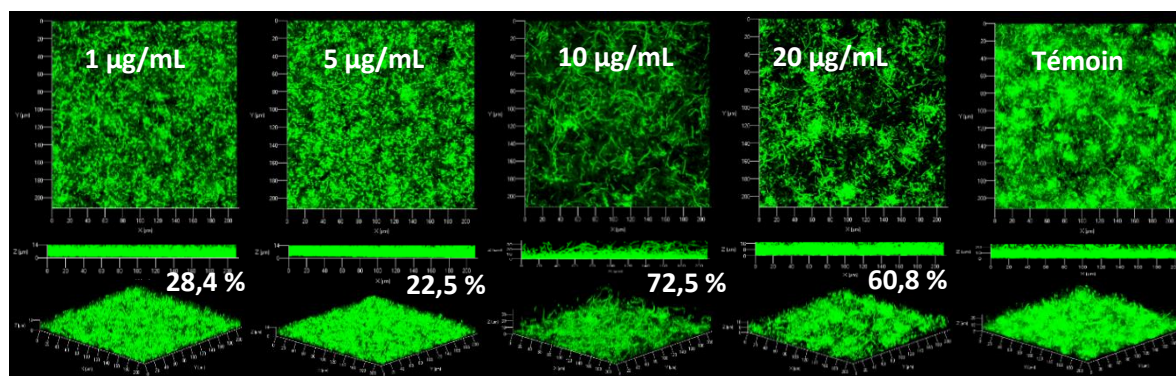


Figure II-20 : Observation des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 en MCBL lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin

Le Tableau II-16 présente les valeurs de biovolume obtenues. L'ajout de DBHB dans le flux de milieu nutritif induit, à 10 et 20 µg/mL, une inhibition significativement différente du témoin (ANOVA, p < 0,01).

Tableau II-16 : Valeurs de biovolumes des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL

	Témoin	1 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
PAO1 Biovolume (µm ³ /µm ²)	10,2 ± 0,8	7,3 ± 1,3	7,9 ± 1,5	2,8 ± 0,4	4,0 ± 0,5
ANOVA		-	-	p < 0,01	p < 0,01

- : différence non significative, p > 0,05 par rapport au témoin

La formation de biofilm est réduite dès 1 µg/mL de DBHB (30 % par rapport à la valeur témoin). Cette inhibition est renforcée par l'augmentation de la concentration en DBHB. Aux concentrations de 10 et 20 µg/mL, le biofilm observé est significativement inhibé de 60 %. Dans le cas du DBHB pour *P. aeruginosa*, l'CI₅₀ est égale à 6,44 µg/mL. Le DBHB montre une activité supérieure à celle du NBHB.

L'impact des composés NBHB et DBHB est également étudié sur la formation du biofilm d'une bactérie marine : *Paracoccus* sp. 4M6

Étude des composés NBHB et DBHB sur la formation de biofilm par la bactérie *Paracoccus* sp. 4M6

- Impact du NBHB sur la formation du biofilm de *Paracoccus* sp. 4M6

De même que pour *P. aeruginosa*, l'activité du composé NBHB est évaluée sur la formation du biofilm de *Paracoccus* sp. 4M6. Les observations en MCBL présentées sur la Figure II-21 montrent que le NBHB inhibe la formation du biofilm. En particulier dès 10 µg/mL, une inhibition significative de 55 % du biofilm est observée.

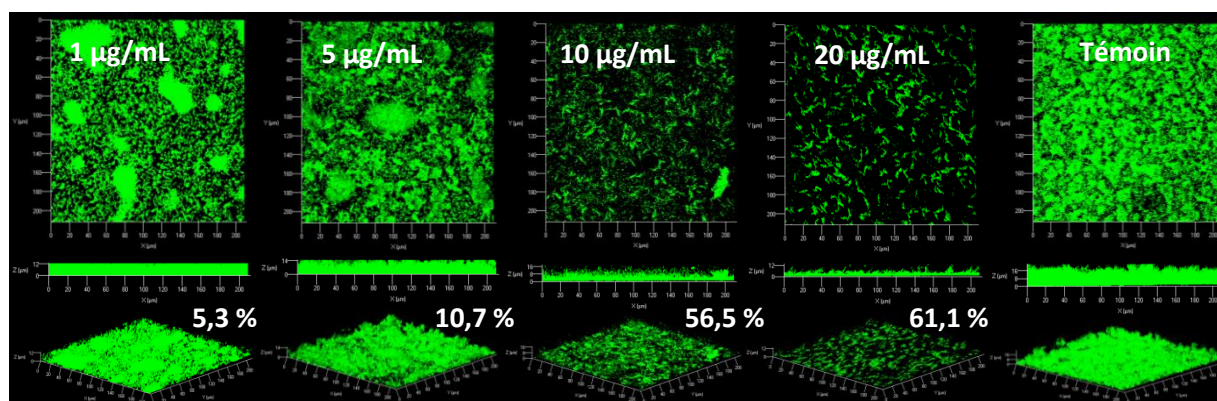


Figure II-21 : Observation des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 en MCBL lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin

Les biovolumes associés à ces observations (Tableau II-17) montrent que la différence avec la condition témoin est significative dès 10 µg/mL. À partir de ces résultats, une valeur d'Cl₅₀ de 12,8 µg/mL est obtenue. En comparant ces deux bactéries à Gram négatif produisant des HSL, il est remarqué que la bactérie marine est plus sensible au NBHB que la bactérie terrestre *P. aeruginosa*, un pathogène humain résistant à de nombreux antibiotiques. Il n'est donc pas surprenant que *P. aeruginosa* soit moins sensible au NBHB que *Paracoccus* sp. 4M6. De plus, la formation d'un biofilm renforce la résistance des bactéries (Mah *et al.*, 2003 ; Høiby *et al.*, 2010).

Tableau II-17 : Valeurs de biovolumes des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 lors de l'ajout de NBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL

	Témoin	1 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
4M6 Biovolume (µm³/µm²)	13,1 ± 0,1	12,4 ± 0,5	11,7 ± 0,5	5,7 ± 0,2	5,1 ± 0,2
ANOVA		-	-	P < 0,01	P < 0,01

- : différence non significative, p > 0,05 par rapport au témoin

- Impact du DBHB sur la formation du biofilm de *Paracoccus* sp. 4M6

L'impact du composé DBHB a également été évalué sur *Paracoccus* sp. 4M6. Aux quatre concentrations testées (1, 5, 10 et 20 µg/mL) le biofilm formé est inhibé de plus de 50 %. Les observations obtenues en MCBL sont présentées sur la Figure II-22.

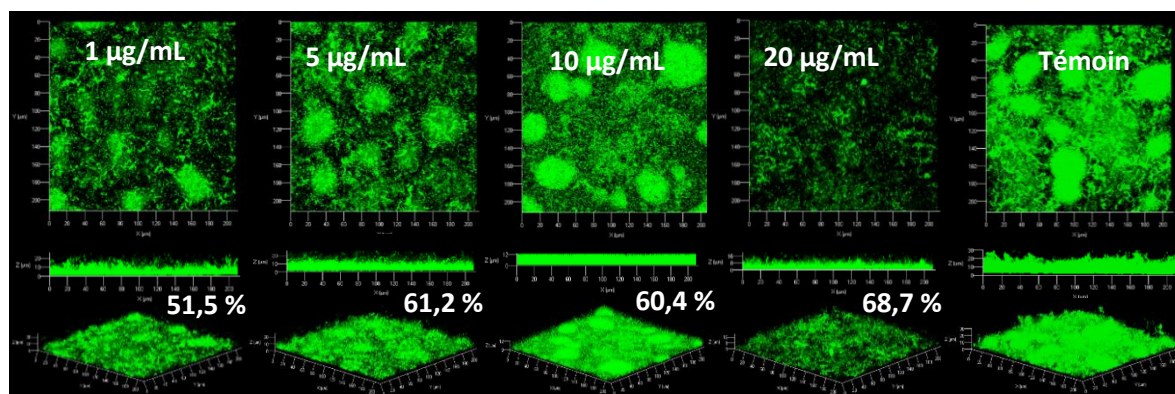


Figure II-22 : Observation des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 en MCBL lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les valeurs mentionnées représentent les pourcentages d'inhibition du biofilm par rapport au biofilm témoin

Les biovolumes déterminés (Tableau II-18) valident une inhibition significative du biofilm lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL. Dans ces conditions, la valeur d' CI_{50} est inférieure à 1 µg/mL. Tout comme le composé NBHB, l'activité du DBHB est plus importante sur la bactérie marine qui est plus sensible à l'activité de ces deux hemibastadins. Ce résultat est intéressant dans le contexte de ce doctorat qui est d'identifier de nouveaux composés antifouling. L'inhibition du biofilm de bactéries marines est un moyen d'inhiber le microfouling constitué en partie de bactéries afin de ralentir le macrofouling. De plus, le DBHB est décrit comme un inhibiteur d'adhésion de macroorganismes : balanes et moules (Ortlepp *et al.*, 2007 ; Niemann *et al.*, 2015).

Tableau II-18 : Valeurs de biovolumes des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 lors de l'ajout de DBHB à 1, 5, 10 et 20 µg/mL, les \pm représentent les écarts-types

	Témoin	1 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
4M6 Biovolume (µm³/µm²)	13,4 ± 0,8	6,5 ± 0,7	5,2 ± 0,6	5,3 ± 0,8	4,2 ± 0,7
ANOVA		p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01

L'unique différence entre les composé NBHB et DBHB est la présence de quatre atomes de brome. Le brome semble être un élément important dans l'apport d'une activité antibiofilm (Rane *et al.*, 2012).

De nombreux composés bromés issus des éponges ont montré des propriétés antifouling, notamment antibiofilm. Parmi les composés identifiés, les pyrroles bromés, les dérivés de bromotyrosine, la

ceratinamide A et B, la psammaphin A ou encore le moroka'iamine ont été décrits comme antibiofilm. Par ailleurs, deux familles de composés présentes chez les éponges peuvent moduler la formation de biofilm sans avoir d'effet toxique envers les bactéries : les terpénoïdes (Hertiani *et al.*, 2010) et les pyrrole-imidazoles (Huigens *et al.*, 2007).

Par exemple le composé oroïdine, isolé de l'éponge *Agelas oroides*, appartenant à la famille des alcaloïdes de type bromopyrrole imidazole a été montré comme inhibant les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* avec une CI_{50} de 190 μ M (Forte *et al.*, 2009). Structurellement, l'oroïdine a une structure proche du DBHB avec deux cycles aromatiques et la présence de deux atomes de brome.

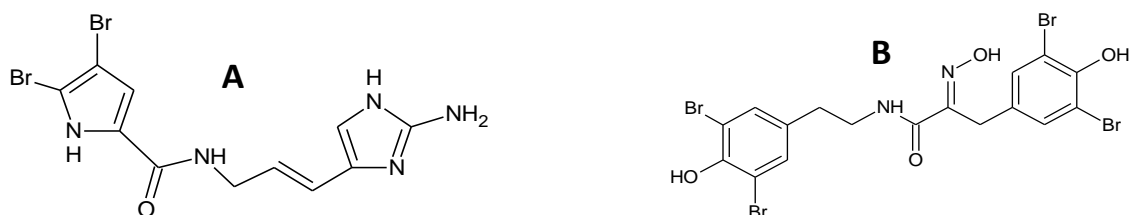


Figure II-23 : Structure de l'oroïdine (Forte *et al.*, 2009) (A) et du DBHB (B)

L'oroïdine est montré comme ralentissant l'adhésion et la colonisation des surfaces par les bactéries. Cependant, en comparant les CI_{50} du DBHB et de l'oroïdine sur l'inhibition de la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1, le DBHB a une CI_{50} de 10 μ M, le DBHB est donc 20 fois plus actif que l'oroïdine (Richards *et al.*, 2008).

Étude de l'impact du composé DBHB sur la formation d'un biofilm par une bactérie à Gram négatif ne produisant pas d'homosérine lactone : *Pseudoalteromonas* sp. 5M6

Dans le but de mieux comprendre l'activité du DBHB qui est le composé de la famille des hemibastadins qui a montré les meilleures activités dans l'étude sur la formation de biofilm, une autre bactérie à Gram négatif mais ne produisant pas naturellement d'HSL a été utilisée.

Dans la partie précédente, le composé DBHB a été décrit comme possédant des propriétés inhibitrices du QS. Chez *P. aeruginosa* et *Paracoccus* sp. 4M6, le DBHB a montré des propriétés anti-biofilm. En évaluant les activités de la molécule sur une bactérie ne produisant pas d'HSL, nous souhaitons mettre en évidence des liens possibles entre l'activité anti-biofilm et anti-quorum sensing.

Le Tableau II-19 présente les biovolumes obtenus après formation du biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 dans un milieu enrichi avec ou sans DBHB à 10 et 20 μ g/mL. Après traitement des observations prises en MBCL, il est constaté que le DBHB n'inhibe pas la formation de biofilm chez *Pseudoalteromonas* sp. 5M6. Au contraire, il favorise la formation du biofilm à 10 μ g/mL, en effet le biovolume obtenu est significativement plus important (ANOVA, $p < 0,01$).

Tableau II-19 : Valeurs de biovolumes des biofilms de *Pseudoalteromonas sp. 5M6* lors de l'ajout de DBHB à 10 et 20 µg/mL, les ± représentent les écarts-types

	Témoin	10 µg/mL	20 µg/mL
5M6 biovolume (µm³/µm²)	22,0 ± 1,5	26,9 ± 1,1	22,1 ± 1,8
ANOVA		P < 0,01	-

- : différence non significative, $p > 0,05$ par rapport au témoin

Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence d'inhibition du DBHB sur le biofilm de cette bactérie est probablement due à l'absence d'HSL. En effet, si le composé DBHB interagit sur une étape de la communication bactérienne impliquant les HSL, les biofilms de *Pseudoalteromonas sp. 5M6* ne devraient donc pas être inhibés.

Chez cette bactérie, aucune HSL n'a été identifiée mais un autre système de communication est probablement présent. Le DBHB semble donc avoir une activité liée au QS, avec l'implication des HSL.

Étude de l'impact du composé DBHB sur la formation d'un biofilm par une bactérie à Gram positif : *Bacillus sp. 4J6*

Toujours dans l'objectif de comprendre le mode d'action du DBHB, l'impact de ce composé est évalué sur un biofilm d'une bactérie à Gram positif, possédant un système différent de communication faisant intervenir d'autres molécules comme des autoinducteurs ou des oligopeptides.

Tableau II-20 : Valeurs de biovolumes des biofilms de *Bacillus sp. 4J6* lors de l'ajout de DBHB à 10 et 20 µg/mL, les ± représentent les écarts-types

	Témoin	10 µg/mL	20 µg/mL
4J6 biovolume (µm³/µm²)	18,9 ± 1,3	21,5 ± 1,1	22,5 ± 1,2
ANOVA		P < 0,01	P < 0,01

L'ajout de DBHB à 10 et 20 µg/mL n'inhibe pas la formation de biofilm et au contraire l'accroît. Cette augmentation est significativement différente du témoin.

La molécule DBHB possède des propriétés anti-biofilm dépendantes du système de communication présent chez la bactérie. Comme décrit précédemment dans la synthèse bibliographique (Chapitre I), il existe des interactions entre QS et formation de biofilm (partie III-D). L'activité du DBHB semble ciblée sur des bactéries produisant des HSL et donc des bactéries à Gram négatif. Cependant des tests

supplémentaires seraient nécessaires. Par exemple, en multipliant le nombre de souches bactériennes testées : à Gram négatif produisant ou non des HSL, et à Gram positif.

Certaines études s'avancent à donner des liens entre QS et formation de biofilm alors que d'autres études expliquent qu'il y a trop de voies de régulation possible pour avoir un lien direct entre les deux mécanismes (Kievit *et al.*, 2001). Dans notre cas, il est possible que l'inhibition de la formation de biofilm soit liée à l'activité de la molécule sur le QS. Dans l'étude de Sybiya Vasantha Packiavathy *et al.*, des extraits de *C. cyminum* à 2 mg/mL réduisaient significativement la maturation du biofilm et la formation de microcolonies. De plus, ces mêmes extraits étaient capables d'inhiber la production de violacéine de 90 %. Les auteurs ont supposé que les extraits étaient capables d'interférer sur l'expression de plusieurs gènes responsables de l'adhésion, facilitant ainsi la réduction du biofilm. De plus, les extraits de *C. cyminum* réduisaient la production d'EPS fragilisant la structure du biofilm (Sybiya Vasantha Packiavathy *et al.*, 2012). Ce processus est également contrôlé par le QS (Vu *et al.*, 2009). Contrairement à cet extrait, dans notre étude, le DBHB ne perturbe ni la mobilité, ni l'adhésion bactérienne. Cependant le biofilm est significativement inhibé ainsi que la communication bactérienne.

III – C – 3 – Impact des composés sur un biofilm préformé

La seconde condition évaluée afin de tester l'effet des composés NBHB et DBHB sur un biofilm bactérien est d'étudier leur interaction potentielle sur le détachement des cellules bactériennes (Figure II-24 et Figure II-25).

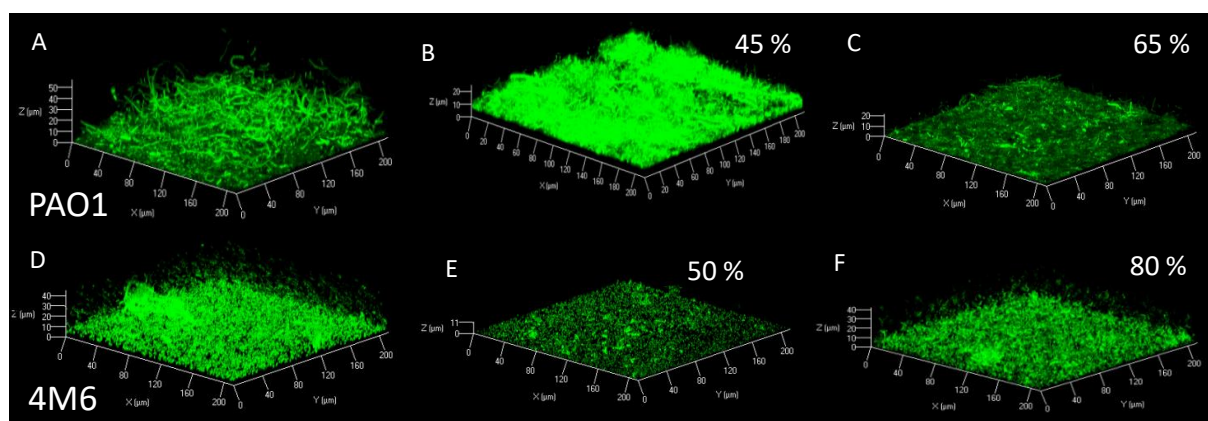


Figure II-24 : Observations des biofilms de *P. aeruginosa* PAO1 et *Paracoccus* sp. 4M6 avec ou sans ajout de NBHB et DBHB à 10 µg/mL sur le biofilm déjà formé, Témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E), ajout de DBHB (C et F). Les valeurs indiquées représentent le pourcentage de cellules détachées après traitement par le DBHB des biofilms préformés

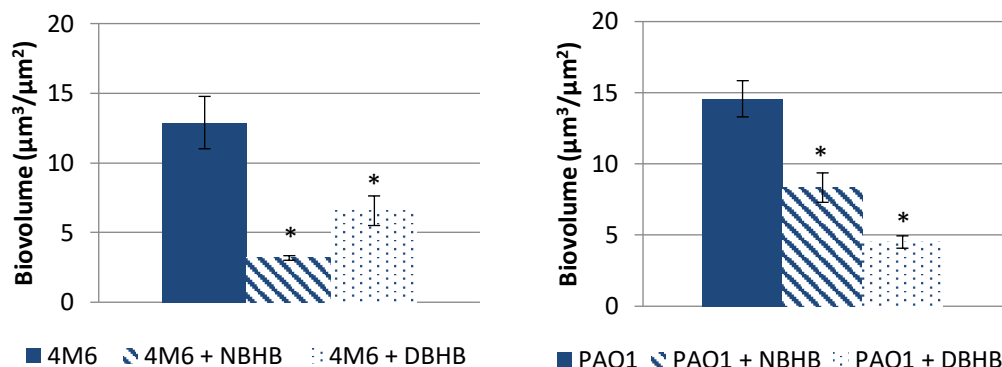


Figure II-25 : Biomasses des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 et *P. aeruginosa* PAO1 après injection des composés NBHB et DBHB à 10 µg/mL sur un biofilm formé (Test ANOVA, * $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types

A partir des valeurs de biovolume et en normalisant à partir du biofilm témoin, le pourcentage de détachement est déterminé. Ce pourcentage est figuré sur les observations en MCBL visibles sur la Figure II-24 ainsi que les calculs de biovolume sur la Figure II-25. Ces données montrent des diminutions de 50 à 80 % du biovolume pour *Paracoccus* sp. 4M6 lors de l'ajout de NBHB ou de DBHB. Tandis que pour la souche *P. aeruginosa* PAO1, l'impact des composés est moins important. Les composés induisent un détachement du biofilm de 45 à 65 %. Ces détachements sont significatifs pour l'ajout des composés NBHB et DBHB (ANOVA, $p < 0,01$). En plus d'inhiber la formation de biofilm, le NBHB et le DBHB sont capables d'induire le détachement des bactéries au sein d'un biofilm afin de le déstructurer.

Le détachement bactérien au sein d'un biofilm est un mécanisme de rupture dans le biofilm dû au milieu ou à des stress environnants. Dans ces conditions, les bactéries produisent des enzymes afin de dégrader l'EPS de la matrice et libérer les bactéries du biofilm (Landini *et al.*, 2010). Il est donc possible que l'ajout de NBHB ou de DBHB sur le biofilm préformé induit un stress et force les bactéries à se détacher.

Plusieurs mécanismes peuvent induire un détachement de bactéries. Chez certaines bactéries, la production d'un tensioactif comme l'acide gras mono insaturé produit par *P. aeruginosa* (acide *cis*-2-décénoïque) induit le détachement bactérien à partir d'un biofilm. Ce composé est capable d'agir sur un biofilm formé par une bactérie à Gram négatif et à Gram positif (Davies & Marques., 2009).

D'autres substances peuvent inhiber la formation du biofilm et favoriser la dispersion bactérienne par des activités intracellulaires, c'est le cas du C-di-GMP (Thormann *et al.*, 2006 ; Morgan *et al.*, 2006). Le C-di-GMP est un messager intracellulaire qui intervient dans la régulation de réponse cellulaire. Il est impliqué dans la différenciation cellulaire, la formation et la dispersion du biofilm, la mobilité ou encore dans la virulence (An *et al.*, 2010). Le C-di-GMP intervient à plusieurs étapes lors de la formation

du biofilm. Lors de l'adhésion, le C-di-GMP s'assemble avec d'autres protéines pour permettre la mobilité flagellaire. En fonction du niveau intracellulaire en C-di-GMP, la mobilité est activée ou inhibée.

Lors de l'étape de formation du biofilm, la concentration intracellulaire en C-di-GMP modifie la production d'exopolymère. Chez *P. aeruginosa*, la présence de C-di-GMP induit l'expression des gènes *pel* et *psl* induisant la synthèse d'exopolymères composant la matrice. Cet exopolymère favorise l'adhésion d'autres bactéries et consolide le biofilm formé (Ha & O'Toole., 2015). Il est possible que le DBHB agisse sur une voie cellulaire activant le c-di-GMP et provoquant le détachement cellulaire. Parmi les produits d'origine marine décrits, le 2-aminobenzimidazole dérivé de l'oroïdine a été montré comme capable de dégrader des biofilms formés par des bactéries à Gram négatif et à Gram positif par chélation des ions zinc, le zinc jouant un rôle dans la stabilisation des biofilms (Rogers *et al.*, 2009).

D'après les résultats obtenus dans cette seconde partie, les composés NBHB et DBHB possèdent des activités antibiofilm. Les activités antibiofilm sont dépendantes des bactéries testées. Il a été constaté que la souche *Paracoccus* sp. 4M6 est plus sensible aux composés NBHB et DBHB tandis que la bactérie *P. aeruginosa* n'est sensible qu'au composé DBHB. Le DBHB et le NBHB diffère au niveau de leur structure moléculaire notamment par la présence de quatre atomes de brome pour le DBHB. Les biofilms de *P. aeruginosa* semblent plus facilement inhibés par des composés bromés.

III – D – Influence des composés sur la viabilité cellulaire

Dans le but de valider une absence de toxicité des composés NBHB et DBHB, un marquage Syto/Sytox des biofilms est réalisé. Le marquage Syto/Sytox visible sur les observations en MCBL, (Figure II-26) montre que les composés n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire que ce soit chez *P. aeruginosa* ou chez *Paracoccus* sp..

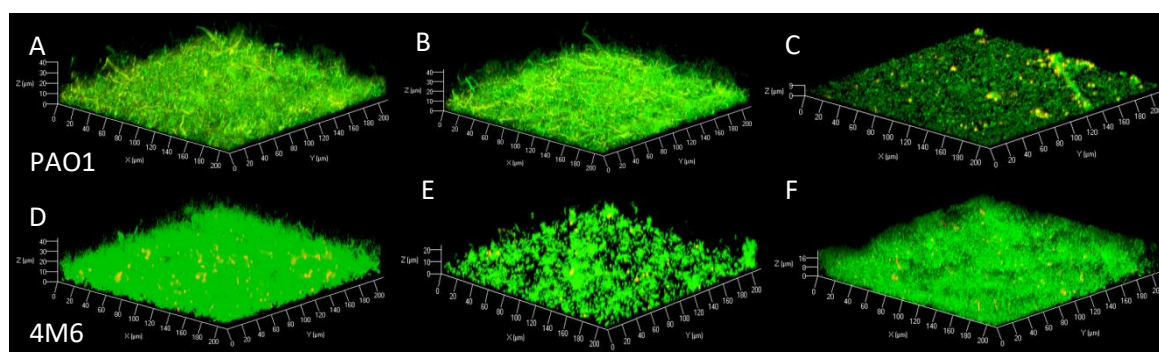


Figure II-26 : Marquage Syto/Sytox des biofilms de *Paracoccus* sp. 4M6 et *P. aeruginosa* PAO1 lors de l'ajout de NBHB et DBHB à 10 µg/mL dans le flux de milieu nutritif à 150 µL/min, condition témoin (A et D), ajout de NBHB (B et E), ajout de DBHB (C et F)

A partir des valeurs de biovolume de cellules vivantes et de cellules mortes, un pourcentage de mortalité est déterminé. Le pourcentage de mortalité présenté dans le Tableau II-21 montre que l'ajout de DBHB n'accroît pas significativement la mortalité bactérienne (ANOVA $p < 0,01$). Le NBHB et le DBHB ne sont donc pas toxiques vis-à-vis des deux bactéries testées.

Tableau II-21 : Biovolumes des cellules vivantes et mortes, ainsi que le pourcentage de mortalité lors de l'ajout de DBHB à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans le flux de milieu de croissance du biofilm, les \pm représentent les écarts-types

	<i>Paracoccus</i> sp. 4M6		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	
	Témoin	DBHB	Témoin	DBHB
Biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) cellules vivantes	12,7 \pm 1,3	4,9 \pm 0,1	14,7 \pm 1,0	4,3 \pm 1,0
Biovolume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) cellules mortes	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03
Mortalité (%)	1,6	2,4	1,4	1,9

Cette absence de toxicité valide bien les résultats du criblage et les propriétés antibiofilm des composés NBHB et DBHB.

Conclusion

Ce second chapitre présente les activités de la centaine de composés synthétisés par les équipes du Pr Johan Svenson et du Pr Peter Proksch. Parmi l'ensemble de ces composés, seuls les familles des batatasins et des hemibastadines sont présentées. Le criblage contre les souches bactériennes a permis de sélectionner les composés dont l'activité allait être étudiée plus précisément. Les critères de sélection sont i) une activité antibactérienne à faible concentration ou ii) une activité autre (anti-adhésion, antibiofilm), sans toxicité pour les organismes.

Parmi le panel de composés testés, les expériences menées ont permis de souligner plus particulièrement l'activité du DBHB. Ce composé peut inhiber la communication bactérienne, la formation de biofilm et induire le détachement au sein d'un biofilm préformé. De plus, le DBHB n'inhibe ni la croissance, ni la viabilité des bactéries étudiées.

À partir des résultats obtenus, il est possible de valider l'absence d'activité du composé sur les voies de biosynthèse de la luminescence à faible concentration (10 µg/mL). Les hypothèses que nous pouvons émettre sur les modes d'action sont que le DBHB interagit soit avec les récepteurs ou les régulateurs de transcription du QS, soit qu'il perturbe une ou plusieurs voies de phosphorylation régulant la communication bactérienne. Cependant en comparant les résultats obtenus en présence de DBHB ou d'acide kojique, les résultats diffèrent. L'acide kojique étant décrit comme inhibant les récepteurs du QS de par sa structure proche avec des HSL, nous pouvons conclure que le DBHB ne bloque pas le QS au niveau des récepteurs. Des études publiées ont proposé que les bastadins puissent perturber les échanges en Ca^{2+} au sein des cellules eucaryotes, notamment chez les larves de balanes (Ortlepp *et al.*, 2007). Le taux de Ca^{2+} est important lors de l'adhésion des larves de balanes sur des surfaces. Lorsque ce niveau est inhibé, l'adhésion des larves l'est également (Rittschof *et al.*, 1986 ; Clare., 1996). Cependant aucune étude n'a prouvé ce mode d'action chez les bactéries.

Une méthode pouvant valider son mode d'action serait l'étude du transcriptome d'une bactérie bien étudiée comme *P. aeruginosa*. En comparant le transcriptome d'une culture témoin et d'une culture en contact du DBHB, il serait possible de voir si l'expression de certains gènes est activée ou réprimée lors de l'ajout de la molécule. Cette technique ciblerait davantage l'activité du DBHB et permettrait de comprendre son interaction au niveau cellulaire.

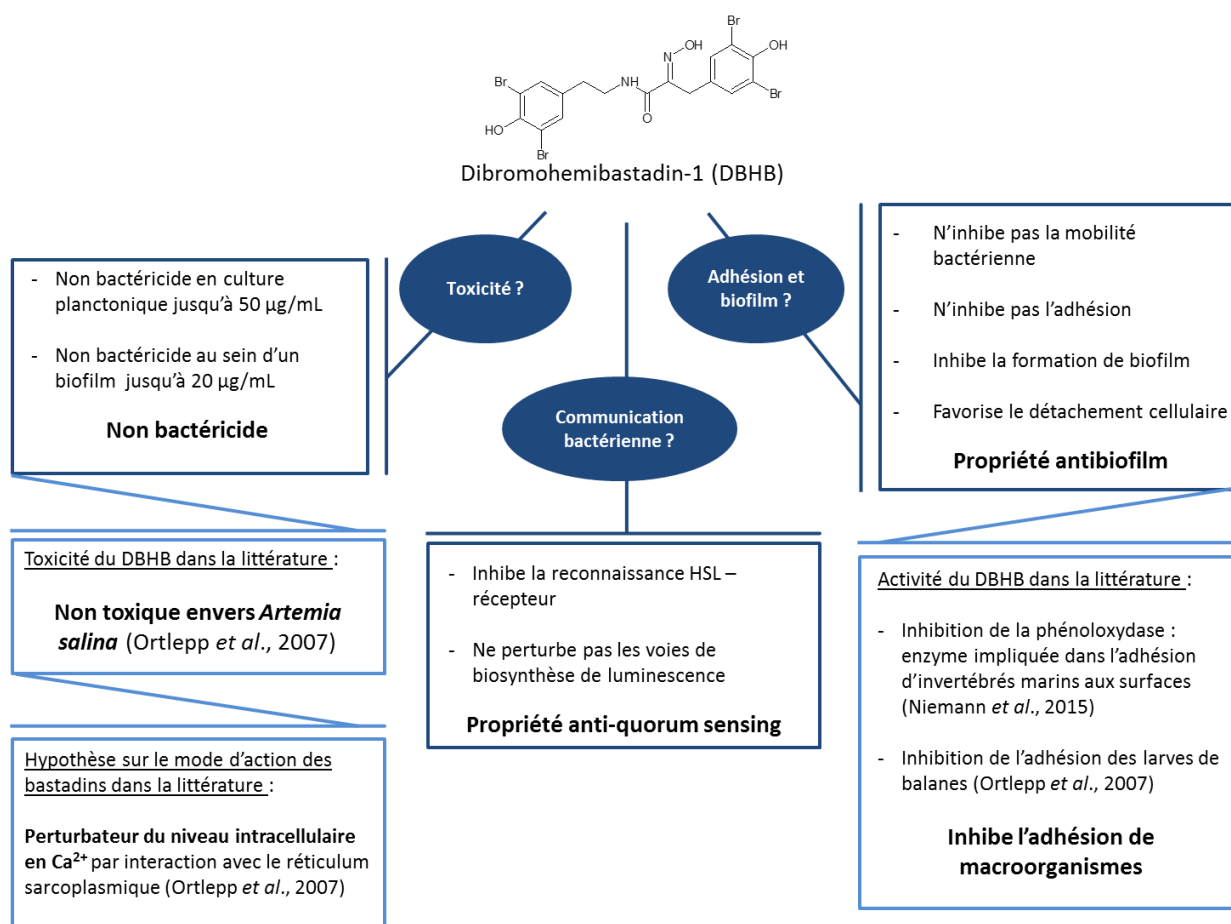


Figure II-27 : Bilan des activités de la molécule DBHB décrites dans ce chapitre II et dans la littérature

L'ensemble des résultats obtenus pour la molécule DBHB sont résumés dans le schéma en Figure II-27. Sur ce schéma, les propriétés antibiofilm et anti-quorum sensing du DBHB sont présentées, ces activités sont probablement liées. En plus des activités sur les bactéries présentées dans ce chapitre, le DBHB a déjà des activités décrites contre d'autres espèces du fouling : les moules et les balanes (Niemann *et al.*, 2015). Nos résultats confirment l'activité anti-biofouling du DBHB en ciblant également les bactéries. L'ensemble de ces résultats font du DBHB un composé AF prometteur. Le chapitre III permettra d'évaluer l'impact du DBHB sur l'adhésion et la formation de biofilm de microalgues. Le chapitre IV présentera l'étude de revêtements contenant le DBHB immergés en condition naturelle et en conditions contrôlées. Il permettra d'appréhender l'activité de ces revêtements contre la formation du microfouling.

Bibliographie

- Aguila-Ramírez RN, Hernández-Guerrero CJ, González-Acosta B, Id-Daoud G, Hewitt S, Pope J, Hellio C. 2014. Antifouling activity of symbiotic bacteria from sponge *Aplysina gerardogreeni*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 90:64–70.
- An S, Wu J, Zhang L-H. 2010. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Dispersal by a Cyclic-Di-GMP Phosphodiesterase with a Putative Hypoxia-Sensing Domain. *Appl Environ Microbiol*. 76:8160–8173.
- Balasubramanian S, Aridoss G, Parthiban P, Ramalingan C, Kabilan S. 2006. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Benzimidazol/Benzoxazolylethoxypiperidone Oximes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29:125–130.
- Bayer M, Hellio C, Maréchal J-P, Frank W, Lin W, Weber H, Proksch P. 2011. Antifouling Bastadin Congeners Target Mussel Phenoloxidase and Complex Copper(II) Ions. *Mar Biotechnol*. 13:1148–1158.
- Bodini S f., Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F. 2009. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Letters in Applied Microbiology*. 49:551–555.
- Bucior I, Pielage JF, Engel JN. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. *PLOS Pathogens*. 8:e1002616.
- Busetti A. 2014. Isolation of novel marine-derived bioactive agents for medical device applications. Doctoral dissertation, Queen's University Belfast.
- Chen J-D, Yi R-Z, Sun C-L, Feng D-Q, Lin Y-M. 2010. Antifouling Activity of Simple Synthetic Diterpenoids against Larvae of the Barnacle *Balanus albicostatus* Pilsbry. *Molecules*. 15:8072–8081.
- Clare AS. 1996. Signal transduction in barnacle settlement: Calcium re-visited. *Biofouling*. 10:141–159.
- Comolli JC, Hauser AR, Waite L, Whitchurch CB, Mattick JS, Engel JN. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* Gene Products PilT and PilU Are Required for Cytotoxicity *In Vitro* and Virulence in a Mouse Model of Acute Pneumonia. *Infect Immun*. 67:3625–3630.
- Davies DG, Marques CNH. 2009. A Fatty Acid Messenger Is Responsible for Inducing Dispersion in Microbial Biofilms. *J Bacteriol*. 191:1393–1403.
- De Kievit TR. 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*. 11:279–288.
- Dobretsov S, Dahms H-U, YiLi H, Wahl M, Qian P-Y. 2007. The effect of quorum-sensing blockers on the formation of marine microbial communities and larval attachment. *FEMS Microbiol Ecol*. 60:177–188.
- Dobretsov S, Teplitski M, Bayer M, Gunasekera S, Proksch P, Paul VJ. 2011. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling*. 27:893–905.
- Duan K, Surette MG. 2007. Environmental Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl Quorum-Sensing Systems. *J Bacteriol*. 189:4827–4836.
- Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. 1998. Role of Flagella in Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Pulmonary Infection. *Infect Immun*. 66:43–51.
- Filloux A, Ramos J-L. 2014. *Pseudomonas* methods and protocols. *Methods Mol Biol*. 1149

- Forte B, Malgesini B, Piutti C, Quartieri F, Scolaro A, Papeo G. 2009. A Submarine Journey: The Pyrrole-Imidazole Alkaloids. *Marine Drugs*. 7:705–753.
- Freeman JA, Bassler BL. 1999. Sequence and Function of LuxU: a Two-Component Phosphorelay Protein That Regulates Quorum Sensing in *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol*. 181:899–906.
- González VT, Junttila O, Lindgård B, Reiersen R, Trost K, Bråthen KA. 2015. Batatasin-III and the allelopathic capacity of *Empetrum nigrum*. *Nordic Journal of Botany*. 33:225–231.
- Grasland B. 2002. Étude du rôle des interactions énergétiques et des communications intercellulaires dans la formation de biofilms bactériens en milieu marin. Doctoral dissertation, Lorient.
- Greenberg EP, Hastings JW, Ulitzur S. 1979. Induction of luciferase synthesis in *Beneckeia harveyi* by other marine bacteria. *Arch Microbiol*. 120:87–91.
- Gribble GW. 1998. Naturally Occurring Organohalogen Compounds. *Acc Chem Res*. 31:141–152.
- Ha D-G, O'Toole GA. 2015. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbiology Spectrum*. Vol 3, no 2.
- Hanssen KØ, Cervin G, Trepos R, Petitbois J, Haug T, Hansen E, Andersen JH, Pavia H, Hellio C, Svenson J. 2014. The Bromotyrosine Derivative lanthelline Isolated from the Arctic Marine Sponge *Stryphnus fortis* Inhibits Marine Micro- and Macrobiofouling. *Mar Biotechnol*. 16:684–694.
- Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Høiby N, et al. 2002. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 148:87–102.
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N, Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, et al. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*. 22:3803–3815.
- Hernández-Romero Y, Acevedo L, de Los Ángeles Sánchez M, Shier WT, Abbas HK, Mata R. 2005. Phytotoxic Activity of Bibenzyl Derivatives from the Orchid *Epidendrum rigidum*. *J Agric Food Chem*. 53:6276–6280.
- Hertiani T, Edrada-Ebel R, Ortlepp S, van Soest RWM, de Voogd NJ, Wray V, Hentschel U, Kozytska S, Müller WEG, Proksch P. 2010. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18:1297–1311.
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology*. 146:2395–2407.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 35:322–332.
- Huigens RW, Richards JJ, Parise G, Ballard TE, Zeng W, Deora R, Melander C. 2007. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation with Bromoageliferin Analogues. *J Am Chem Soc*. 129:6966–6967.
- Jacobson AH, Willingham GL. 2000. Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Science of The Total Environment*. 258:103–110.

- Janssens JCA, Steenackers H, Robijns S, Gellens E, Levin J, Zhao H, Hermans K, Coster DD, Verhoeven TL, Marchal K, et al. 2008. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Appl Environ Microbiol.* 74:6639–6648.
- Kalia VC. 2013. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances.* 31:224–245.
- Kievit TRD, Gillis R, Marx S, Brown C, Iglewski BH. 2001. Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Appl Environ Microbiol.* 67:1865–1873.
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology.* 48:1511–1524.
- Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:813–823.
- Mah T-F, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature.* 426:306–310.
- Martinelli D, Grossmann G, Séquin U, Brandl H, Bachofen R. 2004. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology.* 4:25.
- Mason VP, Markx GH, Thompson IP, Andrews JS, Manefield M. 2005. Colonial architecture in mixed species assemblages affects AHL mediated gene expression. *FEMS Microbiol Lett.* 244:121–127.
- Morgan R, Kohn S, Hwang S-H, Hassett DJ, Sauer K. 2006. BdlA, a Chemotaxis Regulator Essential for Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 188:7335–7343.
- Morin D, Grasland B, Vallée-Réhel K, Dufau C, Haras D. 2003. On-line high-performance liquid chromatography–mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *Journal of Chromatography A.* 1002:79–92.
- Morohoshi T, Kato M, Fukamachi K, Kato N, Ikeda T. 2008. N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiol Lett.* 279:124–130.
- Niemann H, Hagenow J, Chung M-Y, Hellio C, Weber H, Proksch P. 2015. SAR of Sponge-Inspired Hemibastadin Congeners Inhibiting Blue Mussel PhenolOxidase. *Marine Drugs.* 13:3061–3071.
- Niemann H, Lin W, Müller WEG, Kubbutat M, Lai D, Proksch P. 2013. Trimeric Hemibastadin Congener from the Marine Sponge *Ianthella basta*. *J Nat Prod.* 76:121–125.
- Nilsson M-C, Högberg P, Zackrisson O, Fengyou W. 1993. Allelopathic effects by *Empetrum hermaphroditum* on development and nitrogen uptake by roots and mycorrhizae of *Pinus silvestris*. *Can J Bot.* 71:620–628.
- Odén PC, Brandtberg P-O, Andersson R, Gref R, Zackrisson O, Nilsson M-C. 1992. Isolation and characterization of a germination inhibitor from leaves of *Empetrum hermaphroditum* hagerup. *Scandinavian Journal of Forest Research.* 7:497–502.
- Ortlepp S, Sjögren M, Dahlström M, Weber H, Ebel R, Edrada R, Thoms C, Schupp P, Bohlin L, Proksch P. 2007. Antifouling Activity of Bromotyrosine-Derived Sponge Metabolites and Synthetic Analogues. *Mar Biotechnol.* 9:776–785.

- O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*. 30:295–304.
- Rane RA, Sahu NU, Shah CP. 2012. Synthesis and antibiofilm activity of marine natural product-based 4-thiazolidinones derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22:7131–7134.
- Rashid MH, Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. 97:4885–4890.
- Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, Christophersen C, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M. 2000. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology*. 146:3237–3244.
- Ren D, Bedzyk LA, Ye RW, Thomas SM, Wood TK. 2004. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*. 88:630–642.
- Richards JJ, Ballard TE, Huigens RW, Melander C. 2008. Synthesis and Screening of an Oroidin Library against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *ChemBioChem*. 9:1267–1279.
- Rittschof D, Maki J, Mitchell R, Costlow JD. 1986. Ion and neuropharmacological studies of barnacle settlement. *Netherlands Journal of Sea Research*. 20:269–275.
- Robleto EA, López-Hernández I, Silby MW, Levy SB. 2003. Genetic analysis of the AdnA regulon in *Pseudomonas fluorescens*: nonessential role of flagella in adhesion to sand and biofilm formation. *J Bacteriol*. 185:453–460.
- Rogers SA, Kraymer M, Lindsey JS, Melander C. 2009. Tandem dispersion and killing of bacteria from a biofilm. *Org Biomol Chem*. 7:603–606.
- Simpson DA, Ramphal R, Lory S. 1992. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence: distinct genetic loci control attachment to epithelial cells and mucins. *Infect Immun*. 60:3771–3779.
- Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kováč J, Mučaji P. 2016. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules*. 21.
- Struss AK, Pasini P, Flomenhoft D, Shashidhar H, Daunert S. 2012. Investigating the effect of antibiotics on quorum sensing with whole-cell biosensing systems. *Anal Bioanal Chem*. 402:3227–3236.
- Sybiya Vasantha Packiavathy IA, Agilandeswari P, Musthafa KS, Karutha Pandian S, Veera Ravi A. 2012. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*. 45:85–92.
- Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB, Prince A. 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun*. 64:37–43.
- Tawakoli PN, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. 2013. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin Oral Invest*. 17:841–850.
- Teplitski M, Al-Agely A, Ahmer BMM. 2006. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Microbiology*. 152:3411–3424.

- Thormann KM, Duttler S, Saville RM, Hyodo M, Shukla S, Hayakawa Y, Spormann AM. 2006. Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *J Bacteriol.* 188:2681–2691.
- Tolker-Nielsen T, Sternberg C. 2014. Methods for Studying Biofilm Formation: Flow Cells and Confocal Laser Scanning Microscopy. Filloux A, Ramos J-L, editors. *Pseudomonas Methods and Protocols* p. 615–629.
- Toutain CM, Caizza NC, Zegans ME, O'Toole GA. 2007. Roles for flagellar stators in biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology.* 158:471–477.
- Vairappan CS, Suzuki M, Abe T, Masuda M. 2001. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry.* 58:517–523.
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, Vermant J, Michiels J. 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 16:496–506.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. 2009. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules.* 14:2535–2554.
- Wallstedt A, Sommarin M, Nilsson M-C, Munson AD, Margolis HA. 2001. The inhibition of ammonium uptake in excised birch (*Betula pendula*) roots by batatasin-III. *Physiologia Plantarum.* 113:368–376.
- Wang C-Y, Wang K-L, Qian P-Y, Xu Y, Chen M, Zheng J-J, Liu M, Shao C-L, Wang C-Y. 2016. Antifouling phenyl ethers and other compounds from the invertebrates and their symbiotic fungi collected from the South China Sea. *AMB Express.* 6:102.
- Wolfgang MC, Jyot J, Goodman AL, Ramphal R, Lory S. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* regulates flagellin expression as part of a global response to airway fluid from cystic fibrosis patients. *PNAS.* 101:6664–6668.

Chapitre III

Étude de l'adhésion et de la formation de biofilms de microalgues

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	114
INTRODUCTION	117
MATERIELS ET METHODES.....	119
I – Impact des composés de la famille des hemibastadines sur quatre souches de microalgues.....	119
I – A – Souches et milieu de culture.....	119
I – B – Condition de croissance.....	120
I – C – Cinétiques microalgales.....	120
I – D – Caractérisation morphologique des souches microalgales	120
I – E – Criblage des composés de la famille des hemibastadines	120
II – Capacité de formation de biofilms.....	121
II – A – Paramètres influençant l'adhésion.....	121
II – A – 1 – Salinité du milieu.....	122
II – A – 2 – pH du milieu.....	122
II – A – 3 – Présence de nutriments.....	122
II – A – 4 – Densité cellulaire inoculée	122
II – B – Adhésion et formation de biofilm en chambre à flux.....	123
II – B – 1 – Impact du temps sur l'adhésion des microalgues.....	123
II – B – 2 – Impact du débit de milieu pendant la maturation du biofilm	124
II – C – Étude des forces d'attachement de deux microalgues en fonction de différents paramètres	124
II – C – 1 – Impact du débit de milieu sur l'attachement des microalgues à la surface	124
II – C – 2 – Impact du temps d'adhésion sur l'attachement des microalgues à la surface.....	125
II – C – 3 – Impact du DBHB sur l'attachement des microalgues à la surface	126
II – D – Impact du DBHB sur la formation de biofilm de microalgues : <i>Cylindrotheca closterium</i> et <i>Porphyridium purpureum</i>	126
II – D – 1 – Impact du DBHB sur l'adhésion des microalgues <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i>	126
II – D – 2 – Impact du DBHB sur la formation de biofilm par les microalgues <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i>	126

III – Étude des propriétés physico-chimiques des surfaces	126
III – A – Impact de la rugosité des surfaces	126
III – B – Impact de l’hydrophobie des surfaces	127
 RESULTATS ET DISCUSSION	 129
I – Impact des composés de la famille des hemibastadines sur quatre souches de microalgues.....	129
I – A – Cinétiques microalgales.....	129
I – B – Caractérisation des souches microalgales	130
I – C – Criblage des composés de la famille des hemibastadines	132
I – C – 1 – Molécules de référence	132
I – C – 2 – Groupe 1 de la famille des hemibastadines	133
I – C – 3 – Groupe 2 de la famille des hemibastadines	134
 II – Capacité de formation de biofilms.....	 136
II – A – Paramètres influençant l’adhésion.....	136
II – A – 1 – Salinité du milieu	136
II – A – 2 – pH du milieu	138
II – A – 3 – Présence de nutriments.....	141
II – A – 4 – Densité cellulaire inoculée	144
II – B – Adhésion et formation de biofilm en chambre à flux.....	147
II – B – 1 – Impact du temps sur l’adhésion des microalgues.....	147
II – B – 2 – Impact du débit de milieu pendant la maturation du biofilm	148
II – C – Étude des forces d’attachement de deux microalgues en fonction du débit de milieu lors d’une adhésion sur du verre	150
II – C – 1 – Impact du débit de milieu sur le détachement des microalgues.....	151
II – C – 2 – Impact du temps d’adhésion sur le détachement des microalgues.....	152
II – D – Impact du DBHB sur la formation de biofilm de <i>Cylindrotheca closterium</i> et <i>Porphyridium purpureum</i>	154
II – D – 1 – Étude de l’activité du DBHB sur l’adhésion et la formation de biofilm de <i>Cylindrotheca closterium</i>	155
Impact du DBHB sur l’adhésion de <i>C. closterium</i>	155
Impact du DBHB sur la formation de biofilm de <i>C. closterium</i>	156
II – D – 2 – Étude de l’activité du DBHB sur l’adhésion et la formation de biofilm de <i>Porphyridium purpureum</i>	158
Impact du DBHB sur l’adhésion de <i>P. purpureum</i>	158
Impact du DBHB sur la formation de biofilm de <i>P. purpureum</i>	159
II – D – 3 – Impact du DBHB sur le détachement des microalgues.....	160
 III – Étude des propriétés physico-chimiques des surfaces	 161
III – A – Impact de la rugosité de surface	162
III – B – Impact de l’hydrophobie de la surface	166
Validation de la méthode de nettoyage	167
Propriétés physico-chimiques de la surface	167
Évaluation de l’impact des surfaces sur l’adhésion des microalgues <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i>	169
 CONCLUSION	 172
 BIBLIOGRAPHIE.....	 175

Table des illustrations

Liste des figures

Figure III-1 : Cinétique de croissance des quatre microalgues (<i>C. closterium</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>H. coffeaeformis</i> et <i>E. gayraliae</i>), les résultats sont exprimés selon le Log(nombre de cellules/mL) en fonction du temps.....	129
Figure III-2 : Observation en microscopie confocale à balayage laser des quatre microalgues (A : <i>Cylindrotheca closterium</i> , B : <i>Halamphora coffeaeformis</i> , C : <i>Porphyridium purpureum</i> et D : <i>Exanthemachrysis gayraliae</i>).....	130
Figure III-3 : Observation de cellules de <i>Cylindrotheca closterium</i> en microscopie électronique à balayage après 48 heures d'adhésion sur du verre.....	131
Figure III-4 : Structure chimiques des composés Synoxazolidinone C (A) et pulmonarine A (B).....	135
Figure III-5 : Structure des composés ianthelline (A) et barettine (B).....	135
Figure III-6 : Impact des salinités à 10, 20, 30, 40 et 50 g/L sur les microalgues <i>C. closterium</i> (A et B) et <i>P. purpureum</i> (C et D) à l'état planctonique et adhérentes sur la surface (densité cellulaire 10^5 cellules/mL, présence de nutriments, pH 8).....	137
Figure III-7 : Impact du pH : 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 et 9,5 sur les microalgues <i>C. closterium</i> (A et B) et <i>P. purpureum</i> (C et D) à l'état planctonique et adhérentes sur les coupons (densité cellulaire 10^5 cellules/mL, présence de nutriments, salinité 30 g/L).....	139
Figure III-8 : Observations en microscopie électronique à balayage de la microalgue <i>C. closterium</i> à 72 heures d'adhésion (A : pH 5,5, B : pH 7,5, C : pH 9,5).....	140
Figure III-9 : Observation en microscopie confocale à balayage laser des coupons à 72 heures de la microalgue <i>P. purpureum</i> (A : pH 5,5, B : pH 7,5 et C : pH 9,5).....	141
Figure III-10 : Impact de la présence de nutriments sur les microalgues <i>C. closterium</i> (A) et <i>P. purpureum</i> (B) adhérentes et à l'état planctonique (densité cellulaire 10^5 cellules/mL, pH 8, salinité 30 g/L).....	142
Figure III-11 : Observation en microscopie confocale à balayage laser de l'adhésion de <i>C. closterium</i> à 72 h en absence de nutriments (A) et en présence de nutriments (B).....	143
Figure III-12 : Cinétique d'adhésion de <i>C. closterium</i> (A) et <i>P. purpureum</i> (B) inoculées à trois densités cellulaires (pH 8, présence de nutriments, salinité 30 g/L).....	145
Figure III-13 : Rapport du nombre de cellules adhérentes sur le nombre de cellules planctoniques au cours du temps pour les trois densités cellulaires testées (10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL) pour <i>C. closterium</i>	146
Figure III-14 : Rapport du nombre de cellules adhérentes sur le nombre de cellules planctoniques au cours du temps pour les trois densités cellulaires testées (10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL) pour <i>P. purpureum</i>	146
Figure III-15 : Cinétique d'adhésion pendant 72 heures pour <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i> pendant 72 heures.....	147
Figure III-16 : Cinétique de formation de biofilm pour <i>C. closterium</i> (A) et <i>P. purpureum</i> (B) à trois débits (30, 90 et 150 $\mu\text{L}/\text{min}$).....	148
Figure III-17 : Observation en microscopie confocale à balayage laser de la formation de biofilm pour <i>C. closterium</i> pendant 120 heures à un débit de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ (A : 48 h, B : 72 h, C : 96 h, D : 120 h).....	149
Figure III-18 : Observation en microscopie confocale à balayage laser de la formation de biofilm pour <i>P. purpureum</i> pendant 120 heures à un débit de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ (A : 48 h, B : 72 h, C : 96 h, D : 120 h).....	149
Figure III-19 : Dénombrement cellulaire dans la chambre à flux après 24 heures d'adhésion pour <i>C. closterium</i> (A) et <i>P. purpureum</i> (B).....	151
Figure III-20 : Observation en microscopie électronique à balayage des structures d'accroche chez <i>C. closterium</i>	152
Figure III-21 : Courbes de détachement pour <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i> pendant 72 heures.....	153

Figure III-22 : Schématisation du « Trail » formé par la sécrétion de polymère au niveau des pores de la diatomée.....	153
Figure III-23 : Schématisation de la structure d'adhésion identifiée chez les diatomées : le stalk (A), observation de la structure pour la diatomée <i>Achnantes longipes</i> (B).....	154
Figure III-24 : Cinétique d'adhésion <i>C. closterium</i> pendant 24 heures pour la condition témoin et lors de l'ajout de DBHB à 10 et 50 µg/mL lors de l'injection des microalgues dans la chambre à flux.....	155
Figure III-25 : Observations en microscopie confocale à balayage laser de la formation de biofilm de <i>C. closterium</i> après 24 heures d'activation du flux de milieu à 150 µL/min (A : DBHB 1 µg/mL, B : 5 µg/mL, C : 10 µg/mL, D : 50 µg/mL, E : témoin).....	156
Figure III-26 : Cinétique de <i>C. closterium</i> dans un erlenmeyer de 100 mL avec ajout du DBHB à 1, 10 et 50 µg/mL.....	157
Figure III-27 : Cinétique d'adhésion de <i>P. purpureum</i> pendant 24 heures pour la condition témoin et lors de l'ajout de DBHB à 10 et 50 µg/mL lors de l'injection des microalgues dans la chambre à flux.....	159
Figure III-28 : Cinétique de formation de biofilm pour <i>P. purpureum</i> pendant 120 heures pour la condition témoin et lors de l'ajout de DBHB à 10 et 50 µg/mL dans le flux de milieu nutritif.....	159
Figure III-29 : Suivi de détachement de <i>C. closterium</i> (A) et <i>P. purpureum</i> (B) en absence et en présence de DBHB à 10 µg/mL.....	160
Figure III-30 : Principe de la mesure d'angle de contact, A = forme d'une goutte sur une surface superhydrophobe (> 150 °), B = forme d'une goutte sur une surface hydrophobe (> 90 °) et C = forme d'une goutte sur une surface hydrophile (< 90°).....	161
Figure III-31 : Image d'une feuille de lotus (A) et observation de la surface en microscopie électronique à balayage (B).....	161
Figure III-32 : Observation en microscopie électronique à balayage de la peau du requin.....	162
Figure III-33 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de <i>C. closterium</i> sur une surface lisse (< 10 µm) : le verre, les cellules de <i>C. closterium</i> ont été colorées en rouge informatiquement.....	163
Figure III-34 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de <i>C. closterium</i> sur une surface lisse (< 10 µm) : le polycarbonate, les cellules de <i>C. closterium</i> ont été colorées en rouge informatiquement.....	163
Figure III-35 : Cinétique d'adhésion de <i>C. closterium</i> sur les surfaces lisses (< 10 µm : verre et polycarbonate) à 8, 24 et 48 heures.....	164
Figure III-36 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de <i>C. closterium</i> sur une surface rugueuse (> 10 µm) : l'acier inoxydable, les cellules de <i>C. closterium</i> ont été colorées en rouge informatiquement.....	164
Figure III-37 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de <i>C. closterium</i> sur une surface rugueuse (> 10 µm) : le polycarbonate, les cellules de <i>C. closterium</i> ont été colorées en rouge informatiquement.....	164
Figure III-38 : Cinétique d'adhésion de <i>C. closterium</i> sur les surfaces rugueuses (> 10 µm, acier inoxydable et polycarbonate) comparée au verre dont la rugosité est inférieure à 10 µm, les observations sont réalisées à 8, 24 et 48 heures.....	165
Figure III-39 : Schématisation de l'adhésion d'une cellule sur des surfaces dont les rugosités varient.....	166
Figure III-40 : Dénombrement de l'adhésion à 24 heures de <i>C. closterium</i> (A) et <i>P. purpureum</i> (B) sur les surfaces traitées en réacteur à plasma.....	169
Figure III-41 : Schéma bilan de l'étude de l'adhésion et de la formation de biofilm chez les microalgues <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i>	173

Liste des tableaux

Tableau III-1 : Taxonomie des quatre microalgues étudiées (AC : numéro de souche), provenant de l'algoBank de l'université de Caen Normandie.....	119
Tableau III-2 : Correspondances entre le débit et la contrainte de cisaillement exercée dans la chambre à flux.....	125
Tableau III-3 : Caractéristiques des quatre microalgues étudiées.....	130
Tableau III-4 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de référence inhibant la croissance ou l'adhésion des microalgues étudiées : <i>C. closterium</i> , <i>H. coffeaeformis</i> , <i>P. purpureum</i> et <i>E. gayraliae</i>	132
Tableau III-5 : Concentrations minimales inhibitrices des composés du groupe 1 inhibant la croissance et l'adhésion des microalgues : <i>C. closterium</i> , <i>H. coffeaeformis</i> , <i>P. purpureum</i> et <i>E. gayraliae</i>	133
Tableau III-6 : Concentrations minimales inhibitrices des composés du groupe 2 inhibant la croissance ou l'adhésion des microalgues étudiées : <i>C. closterium</i> , <i>H. coffeaeformis</i> , <i>P. purpureum</i> et <i>E. gayraliae</i>	134
Tableau III-7 : Épaisseurs moyennes des biofilms formés par <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i> à 48, 72, 96 et 120 heures en conditions dynamique (flux de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$).....	150
Tableau III-8 : Pourcentage de détachement obtenu en faisant varier la contrainte de cisaillement au sein de la chambre à flux.....	151
Tableau III-9 : Comparaison de l'adhésion de <i>C. closterium</i> en présence de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DBHB à l'aide de deux méthodes (microplaque et chambre à flux).....	156
Tableau III-10 : Mesure d'angles de contact sur les surfaces nettoyées par l'éthanol, la javel ou le RBS.....	167
Tableau III-11 : Angles de contact et énergies de surface des films : témoin, traitements Ar, Ar/O ₂ , Ar/N ₂ et Ar/CF ₄	167
Tableau III-12 : Composition élémentaire des surfaces de polycarbonate traitées, cette composition en pourcentage est déterminée par XPS.....	168
Tableau III-13 : Mesure des rugosités de la surface en fonction du traitement plasma réalisé avec les gaz Ar, Ar/O ₂ , Ar/N ₂ et Ar/CF ₄ pour une proportion de 88/12 (Ra : moyenne, Rms : écart le plus important entre le point le plus bas et le point le plus haut).....	169
Tableau III-14 : Comparaison de l'adhésion de <i>C. closterium</i> et <i>P. purpureum</i> entre une surface hydrophile connue (verre) et une surface fonctionnalisée (Ar/O ₂).....	170

Introduction

Le microfouling est constitué majoritairement de bactéries et de microalgues. L'évaluation de composés et notamment du DBHB ne peut pas se limiter à leur activité vis-à-vis des bactéries. Aujourd'hui, les nouveaux AF doivent posséder des activités spécifiques. Il est donc nécessaire de connaître les espèces sensibles aux composés évalués. Ce troisième chapitre est consacré à l'étude de l'activité du DBHB vis-à-vis des microalgues. Pour se faire, différentes étapes se sont avérées nécessaires.

Ce chapitre III débute par la caractérisation des souches microalgales (croissance, caractéristique morphologique) et l'étude des modes d'action de composés de la famille des hemibastadines. L'étude des microalgues est une thématique récente au sein du laboratoire et nécessite donc le développement de protocoles spécifiques. Historiquement, peu de recherches ont été réalisées sur les microalgues en comparaison aux bactéries. Ces organismes sont pourtant présents majoritairement parmi les espèces du microfouling et semblent être de meilleurs indicateurs de toxicité puisque certaines espèces sont utilisées comme indicateur d'écotoxicologie (Eguchi *et al.*, 2004 ; Aruoja *et al.*, 2009).

L'impact de plusieurs paramètres majeurs (le pH, la salinité, la présence de nutriments et la densité cellulaire) est étudié sur l'adhésion en condition statique de deux microalgues *Cylindrotheca closterium* et *Porphyridium purpureum*. L'étude de ces paramètres permet la mise en place d'un protocole en chambre à flux, en condition dynamique permettant la formation de biofilm de microalgues. L'objectif est d'évaluer l'impact de substances sur l'adhésion ou la formation de colonies microalgales. Le composé montrant le plus fort intérêt dans le chapitre II, le DBHB, est testé. Dans la suite, l'impact du DBHB sur la force d'attachement des microalgues est étudié. Celui-ci est évalué *via* la contrainte de cisaillement exercée par le flux.

Enfin, la dernière partie se focalise sur un aspect encore méconnu des biofilms de microalgues : l'impact de la rugosité et de l'hydrophobie de surface sur l'adhésion des microalgues *C. closterium* et *P. purpureum*.

Dans une étude de Scardino *et al.*, les auteurs se sont intéressés à l'impact d'une surface composée de microstructures en polyimide sur l'adhésion de quatre diatomées : *Fallacia carpentariae*, *Nitzschia pleacea*, *Amphora* sp., *Navicula jeffreyi*. Les travaux ont montré que le nombre de points d'accroche des diatomées sur la surface était différent en fonction de la taille du microorganisme et de la rugosité de la surface. Sur les surfaces lisses, l'ensemble des diatomées présentent une multitude de points

d'accroche tandis que sur les surfaces rugueuses quelques points seulement sont observés. En diminuant le nombre de points d'accroche de la microalgue vis-à-vis de la surface, la force d'adhésion exercée est beaucoup plus faible rendant plus facile le détachement de la diatomée (Scardino *et al.*, 2006). Une autre étude a évalué l'effet de la mouillabilité d'une surface sur l'adhésion de la diatomée *Amphora* sp.. Il s'est avéré que la diatomée adhérait de façon plus forte sur les surfaces hydrophobes. Cependant, l'adhésion à ces surfaces avait tendance à inhiber ses déplacements (Finlay *et al.*, 2002). De par ces études, il est possible de pouvoir inhiber l'adhésion des diatomées en modifiant les propriétés de surface telles que la rugosité ou l'hydrophobie. Ce sont les paramètres étudiés dans la dernière partie de ce chapitre.

Matériels et Méthodes

I – Impact des composés de la famille des hemibastadines sur quatre souches de microalgues

Dans un premier temps, la croissance de quatre souches de microalgues est étudiée.

I – A – Souches et milieu de culture

Les souches de microalgues utilisées sont *Cylindrotheca closterium* AC 170, *Halamphora coffeaeformis* AC 713, *Porphyridium purpureum* AC 122 et *Exanthemachrysis gayraliae* AC 15. Elles ont été fournies par une Algobank (Université de Caen Normandie). Ces microalgues ont été choisies en raison de leur capacité à adhérer sur différents types de support et pour leur implication dans le phénomène de colonisation de surfaces (Staats *et al.*, 2000 ; Schultz *et al.*, 2000 ; Rasmussen & Østgaard., 2001 ; Jellali *et al.*, 2013), ainsi que pour leurs différences morphologiques et phénotypiques (Wetherbee *et al.*, 1998).

Ces microalgues sont cultivées dans un milieu composé d'eau de mer artificielle (ASW, 30 g/L, Sigma Aldrich) supplémenté en f/2 Guillard à 2 % (Guillard & Ryther., 1962, Sigma Aldrich). Pour l'ensemble des milieux de culture, la stérilisation est effectuée par autoclavage à 121°C à une pression de 1 bar pendant 21 minutes. Tout travail est effectué en conditions stériles sous hotte à flux laminaire ou à la flamme.

Parmi ces microalgues, deux appartiennent au groupe des diatomées (classe des *Bacillariophyceae*) : *Cylindrotheca closterium* et *Halamphora coffeaeformis* (Tableau III-1).

Tableau III-1 : Taxonomie des quatre microalgues étudiées (AC : numéro de souche), provenant de l'algobank de l'université de Caen Normandie

Taxonomie	<i>Cylindrotheca closterium</i> AC 170	<i>Halamphora coffeaeformis</i> AC 713	<i>Porphyridium purpureum</i> AC 122	<i>Exanthemachrysis gayraliae</i> AC 15
Règne	Chromista	Chromista	Plantae	Chromista
Division	Bacillariophyta	Bacillariophyta	Rhodophyta	Haptophyta
Classe	Bacillariophyceae	Bacillariophyceae	Porphyridiophyceae	Pavlovophyceae
Ordre	Bacillariales	Naviculales	Porphyridiales	Pavlovales
Famille	<i>Bacillariaceae</i>	<i>Amphipleuraceae</i>	<i>Porphyridiaceae</i>	-
Genre	<i>Cylindrotheca</i>	<i>Halamphora</i>	<i>Porphyridium</i>	<i>Exanthemachrysis</i>
Espèce	<i>closterium</i>	<i>coffeaeformis</i>	<i>purpureum</i>	<i>gayraliae</i>
Autorité(s)	(Ehrenberg) Reimann & Lewin	(Agardh) Levkov	(Bory) Drew & Ross	Lepailleur

I – B – Condition de croissance

Les cultures pour les études de croissance sont réalisées dans des erlenmeyers contenant 200 mL de milieu de culture. Les microalgues sont inoculées à 10^4 cellules/mL (début de phase exponentielle) après dénombrement de la culture mère par cellule de Malassez. Les cultures de microalgues sont axénisées avec trois antibiotiques : le chloramphénicol à 100 $\mu\text{g/mL}$, la pénicilline à 1000 $\mu\text{g/mL}$ et la streptomycine à 500 $\mu\text{g/mL}$, pendant 24 heures (Druehl & Hsiao., 1969). Cette axénisation est réalisée pour l'ensemble des cultures utilisées dans les tests de ce chapitre.

Les cultures de microalgues sont placées dans une armoire phytotronique thermostatée à 20 °C, et sous éclairage pendant douze heures à 250 $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ suivies de douze heures d'obscurité. L'alternance de cycles à la lumière puis à l'obscurité favorise la division cellulaire (Forján *et al.*, 2015). Cette incubation est également identique pour l'ensemble des cultures utilisées dans ce chapitre.

I – C – Cinétiques microalgales

Des cinétiques de croissance sont réalisées pour les cultures de microalgues pendant 25 jours. Six cinétiques sont suivies pour chaque souche. Tous les jours, un prélèvement de la culture est réalisé afin de procéder à un dénombrement en cellule de Malassez et une mesure de fluorescence (TECAN, Magellan) ($\lambda_{\text{excitation}} = 633\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 638 - 720 \text{ nm}$). Ces deux dénombrements permettent de lier l'intensité de fluorescence à la densité cellulaire afin de déterminer le nombre de cellules par unité de fluorescence en s'affranchissant d'un dénombrement cellulaire. Pour chaque souche, six réplicats sont réalisés. Les cinétiques sont présentées sous la forme logarithme du nombre de cellules/mL en fonction du temps.

I – D – Caractérisation morphologique des souches microalgales

Les observations en microscopie confocale à balayage laser (MCBL, Zeiss, LSM710) permettent de caractériser les microalgues et de déterminer des paramètres tels que la taille et la morphologie.

Les microalgues sont observées grâce à leur autofluorescence (Greg Mitchell & Kiefer., 1988). En effet, ces microorganismes possèdent des chloroplastes contenant de la chlorophylle qui, lorsqu'elle est excitée par un laser argon à 633 nm, émet une fluorescence observable entre 638 et 720 nm. Ces longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont conservées pour l'ensemble des observations réalisées en MCBL.

I – E – Criblage des composés de la famille des hemibastadines

Afin de mettre en évidence les composés de la famille des hemibastadines possédant potentiellement des propriétés inhibitrices de la croissance et/ou de l'adhésion des microalgues, un criblage est réalisé

sur *Cylindrotheca closterium* AC 170, *Halamphora coffeaeformis* AC 713, *Porphyridum purpureum* AC 122 et *Exanthemachrysis gayraliae* AC 15.

Les composés de la famille des hemibastadines repris dans du méthanol sont déposés en 6 réplicats dans les puits d'une microplaque à six concentrations de 0,01 à 50 µg/mL (microplaque 96 puits noire à fond transparent, Fisher scientifique) (Aguila-Ramírez *et al.*, 2014). L'évaporation du solvant est réalisée pendant 30 minutes sous hotte à flux laminaire.

La souche seule est utilisée comme contrôle positif et le DCOIT : 4,5-Dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one, utilisé à 0,1 µg/mL comme contrôle négatif.

Après 5 jours de culture, la biomasse de la culture mère est déterminée par mesure de la fluorescence produite. À partir de la culture mère, des cultures de microalgues sont préparées à une densité cellulaire de 10^3 cellules/mL. 150 µL de la suspension sont ajoutés dans chacun des puits d'une microplaque contenant le composé à évaluer. La microplaque est placée pour incubation dans l'armoire phytotronique pendant 5 jours. Après l'étape d'incubation, la fluorescence est mesurée dans le but d'évaluer la densité cellulaire totale en fonction des concentrations testées. Puis la microplaque est vidée par retournement, rincée deux fois avec de l'eau de mer artificielle, complétée à nouveau par l'ASW. La fluorescence est mesurée afin de quantifier les microalgues adhérentes aux puits (Hellio *et al.*, 2002). Dans le but de déterminer le nombre de cellules planctoniques, la différence entre le nombre de cellules totales et le nombre de cellules adhérentes est effectuée. La CMI est définie comme la concentration la plus faible induisant un effet sur la croissance ou l'adhésion des microalgues.

Les résultats des criblages en microplaque sont présentés par famille de composés en donnant les valeurs de concentrations minimales inhibitrices.

II – Capacité de formation de biofilms

II – A – Paramètres influençant l'adhésion

Dans le but de déterminer les paramètres optimaux pour l'adhésion des microalgues, l'impact de la salinité, du pH, de la présence de nutriments et de la densité cellulaire sont évalués.

Ces tests sont réalisés pour deux souches, *C. closterium* et *P. purpureum*, en triplicate. Ces microalgues sont choisies pour leurs différences de morphologie et leur capacité à adhérer sans former d'amas. *H. coffeaeformis* et *E. gayraliae* n'ont pu être étudiées en raison d'une difficulté de comptage conduisant à des résultats peu reproductibles.

Pour chacun des paramètres, une cinétique d'adhésion est réalisée pendant 72 heures. Ces cinétiques présentent à la fois le dénombrement des cellules à l'état planctonique et celles à l'état adhérent. Des

coupons de verre de 1 cm², préalablement nettoyé au RBS® (Chae & Schraft., 2000) sont déposés dans le fond d'une microplaque de 24 puits, transparente.

Le détergent RBS® est préparé à 2 % dans de l'eau déminéralisée stérile, versé dans des cristallisoirs dans lesquels les coupons sont immergés pendant 20 minutes sous agitation à 50 °C. Ce nettoyage au RBS® permet de retirer toutes les souillures organiques et les dépôts de minéraux. Les coupons sont ensuite rincés cinq fois en suivant des bains successifs de cinq minutes dans l'eau distillée à 50 °C puis de cinq minutes dans de l'eau distillée froide (20 °C). Une fois les coupons nettoyés selon ce protocole, ils sont stérilisés par autoclavage.

Après leur préparation, les coupons sont déposés dans les puits de la microplaque. Un coupon est déposé par puits. Chaque condition est réalisée en *triplicata*. Les puits sont ensuite complétés par le milieu de culture étudié (volume total de 2 mL).

Pour l'ensemble des paramètres, les microplaques sont inoculées à 10⁵ cellules/mL. Seule l'étude de la densité cellulaire nécessitera d'inoculer avec des concentrations cellulaires différentes. Les microplaques sont incubées dans le phytotron pendant 72 heures. Des prélèvements en *triplicata* sont réalisés à 6, 24, 36, 48 et 72 heures. Ces prélèvements permettent de quantifier d'une part les microalgues non adhérentes, à l'état planctonique, par dénombrement en cellule de Malassez ou par mesure de la fluorescence. D'autre part, les microalgues adhérentes à la surface de verre sont dénombrées par observation des coupons en microscopie confocale à balayage laser. Le champ observé mesure 0,18 mm², le nombre de cellule dénombré est ensuite rapporté à 1 cm².

L'impact de quatre paramètres est étudié à partir de la condition standard (salinité 30 g/L, pH 8, en présence de nutriments, densité cellulaire de 10⁵ cellules/mL). Un seul paramètre varie à la fois.

II – A – 1 – Salinité du milieu

À partir de la condition standard, la salinité sera évaluée à 10, 20, 30, 40 et 50 g/L.

II – A – 2 – pH du milieu

Le pH du milieu est fixé par des solutions d'acide acétique (1 M) et de soude (1 M) à 5,5 ; 6,5 ; 7,5 ; 8,5 et 9,5.

II – A – 3 – Présence de nutriments

Des adhésions en milieu pauvre (eau de mer artificielle, ASW 30 g/L) ou en milieu riche (ASW + f/2 Guillard 2 %) sont réalisées.

II – A – 4 – Densité cellulaire inoculée

L'impact de trois densités cellulaires d'inoculation est évalué pour *C. closterium* et *P. purpureum* à 10³, 10⁴ ou 10⁵ cellules/mL.

Pour l'ensemble des paramètres évalués, les résultats présentent les cinétiques de croissance à l'état planctonique ainsi que les cinétiques d'adhésion sur le verre immergé. Les résultats sont analysés par un test statistique afin de confirmer la significativité des paramètres évalués (ANOVA, $p < 0,01$).

II – B – Adhésion et formation de biofilm en chambre à flux

Pour les bactéries, il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'impact d'un composé sur l'adhésion ou la formation de biofilm en condition statique ou en condition dynamique (chambre à flux). À l'inverse pour les microalgues, très peu d'études s'intéressent à la formation de biofilm dans le but d'évaluer des substances antibiofilm. Un protocole d'adhésion et de formation de biofilm de microalgue a donc dû être développé en condition dynamique.

Le système est identique à l'étude d'un biofilm bactérien (chapitre II, partie III-C), excepté le placement de la chambre à flux est dans une étuve régulée à 20 °C, sous exposition à la lumière (250 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 12 H : 12 H). Afin de former des biofilms de microalgues, il est nécessaire de déterminer plusieurs paramètres : i) le temps optimal d'adhésion, ii) le débit de milieu pour la maturation du biofilm et iii) le temps de maturation du biofilm. L'étude de formation de biofilm en condition dynamique est réalisée pour les microalgues : *C. closterium* et *P. purpureum*.

II – B – 1 – Impact du temps sur l'adhésion des microalgues

Pour l'étape d'adhésion, la chambre à flux est identique au test bactérien. Le système est stérilisé par un flux de javel pendant une heure (1,5 % à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$) puis rincé par le milieu d'adhésion pendant deux heures. Le milieu d'adhésion testé est une eau de mer artificielle (ASW, 30 g/L) enrichie avec du f/2 Guillard (2 %).

Une fois la chambre à flux stérilisée, les microalgues sont injectées à 10^5 cellules/mL à partir d'une culture mère de 14 jours axénisée. L'adhésion des microalgues est observée à 8, 24, 48 et 72 heures afin de déterminer le temps d'adhésion adéquat avant l'activation du flux de milieu nutritif pour la maturation du biofilm.

Pour l'ensemble des expériences en chambre à flux. Les observations sont réalisées en microscopie confocale à balayage laser. Les expériences sont menées sur trois chambres à flux. Pour chaque expérience, trois observations sont effectuées dans les trois canaux de la chambre à flux (27 données par condition).

Les résultats sont présentés sous forme de dénombrement de cellules adhérees par cm^2 en fonction du temps. En effet, les microalgues étudiées ne mesurent pas la même taille et la fluorescence émise n'est pas proportionnelle à la taille des cellules. Dans le but de comparer les résultats obtenus pour les

différentes espèces, nous avons choisi de présenter les densités cellulaires et non un pourcentage de recouvrement.

L'adhésion en chambre à flux sera comparée à l'adhésion en condition statique (partie II-A).

II – B – 2 – Impact du débit de milieu pendant la maturation du biofilm

Après l'étape d'adhésion, le flux de milieu est activé. Trois débits sont testés, à 30, 90 et 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ces débits sont choisis selon le protocole de formation de biofilm utilisé pour les bactéries (Tolker-Nielsen & Sternberg., 2014). Ces débits induisent trois contraintes différentes avec des valeurs de 3, 23 et 63 Pascal (Pa). La maturation du biofilm est suivie pendant cinq jours en réalisant une observation en microscopie confocale à balayage laser quotidiennement.

Pour les études sur le biofilm, les résultats présentent les valeurs de biovolumes ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) obtenus par le programme COMSTAT (Matlab) au cours du temps (Heydorn *et al.*, 2000). Contrairement à l'adhésion, il n'a pas été possible de dénombrer les cellules au sein du biofilm. Ces biovolumes déterminent l'évolution de la formation du biofilm de *C. closterium* ou de *P. purpureum* au cours du temps. De plus ces observations permettent de visualiser la formation du biofilm.

II – C – Étude des forces d'attachement de deux microalgues en fonction de différents paramètres

Dans l'objectif de comparer les forces d'attachement de différentes microalgues, l'impact du débit, du temps d'adhésion et de la présence du DBHB au sein de la chambre à flux est étudié.

II – C – 1 – Impact du débit de milieu sur l'attachement des microalgues à la surface

La préparation du système est identique à la partie II-B-1. Après l'étape d'adhésion, les chambres à flux sont observées en microscopie confocale à balayage laser afin de dénombrer les cellules adhérentes avant activation du flux. Le flux est ensuite activé à trois débits différents : 150, 270 et 330 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 30 minutes. Les chambres à flux sont à nouveau observées en MCBL afin de déterminer le nombre de cellules adhérentes en fonction des différents débits. À partir de ces dénombrements, il est possible de calculer le pourcentage de cellules détachées en fonction du débit de milieu exercé.

À partir du débit appliqué, la contrainte de cisaillement exercée dans la chambre à flux est déterminée.

Tout d'abord, la vitesse à l'intérieur de la chambre à flux est calculée. Cette vitesse (v) est égale au débit (D) divisé par la section (S) qui est de $4 \cdot 10^{-6}$ m.

$$v = \frac{D}{S}$$

Puis la contrainte de cisaillement (τ) est déterminée suivant l'équation suivante (De Beer *et al.*, 1994):

$$\tau = \frac{1}{2} \cdot \rho \cdot v^2 \cdot f$$

Où ρ est la masse volumique de l'eau (1000 Kg/m³) et f le coefficient de friction égal à $64 / Re$ (nombre de Reynolds = 320 dans le cas d'un cylindre en régime laminaire).

Les correspondances suivantes sont obtenues :

Tableau III-2 : Correspondances entre le débit et la contrainte de cisaillement exercée dans la chambre à flux

Débit ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Contrainte de cisaillement (Pa)
30	2,5
90	22,5
150	60
270	202
330	360
430	514

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un histogramme montrant le nombre de cellules adhérees en fonction de la contrainte exercée. Les essais sont réalisés en *triplicata* pour chaque débit. Le pourcentage de cellules détachées est déterminé en considérant le nombre de cellules adhérees avant et après activation du flux. Afin de valider si le flux induit un détachement significatif, un test statistique est réalisé (ANOVA, $p < 0,01$).

II – C – 2 – Impact du temps d'adhésion sur l'attachement des microalgues à la surface

En plus de la contrainte de cisaillement, l'impact du temps d'adhésion est étudié. La préparation et l'étape d'injection restent identiques. Après 24, 48 et 72 heures d'adhésion, le flux à 330 $\mu\text{L}/\text{min}$ est activé pendant 30 minutes. Les pourcentages de détachement sont déterminés à partir des observations réalisées en microscopie confocale à balayage laser avant et après activation du flux.

À partir des dénombrements, les cinétiques de détachement au cours du temps montreront l'impact du temps d'adhésion sur la force d'adhésion de *C. closterium* et de *P. purpureum*. Dans le but de confirmer si le temps d'adhésion modifie significativement l'adhésion des microalgues, un test statistique est réalisé (ANOVA, $p < 0,01$).

II – C – 3 – Impact du DBHB sur l'attachement des microalgues à la surface

L'effet du DBHB est également étudié sur la capacité des microalgues à adhérer aux surfaces. Le DBHB est ajouté à 10 µg/mL aux suspensions microalgales injectées dans la chambre à flux. Après 24, 48 et 72 heures d'adhésion, le flux de milieu est activé à 330 µL/min pendant 30 minutes. Les observations en microscopie confocale à balayage laser de l'adhésion de *C. closterium* et de *P. purpureum* a permis de déterminer les pourcentages de détachement. L'effet du DBHB sur la force d'adhésion des deux microalgues est validé par un test statistique (ANOVA, $p < 0,01$).

II – D – Impact du DBHB sur la formation de biofilm de microalgues : *Cylindrotheca closterium* et *Porphyridium purpureum*

Le composé DBHB, présenté dans le chapitre II comme possédant des propriétés antibiofilm et anti-quorum sensing, est un composé AF prometteur. Dans ce contexte, l'effet du DBHB est testé sur l'étape d'adhésion et sur la formation du biofilm à deux concentrations (10 et 50 µg/mL) de *C. closterium* et de *P. purpureum*.

II – D – 1 – Impact du DBHB sur l'adhésion des microalgues *C. closterium* et *P. purpureum*

Pour l'étape d'adhésion, le DBHB est ajouté à la suspension de microalgue injectée (10^5 cellules/mL préparée à partir d'une culture mère de 14 jours axénisée) dans la chambre à flux. Des dénombrements cellulaires (cellules/cm²) sont réalisés afin d'établir une cinétique d'adhésion au cours du temps. La cinétique est réalisée pendant 48 heures, les temps d'observation sont 8, 24 et 48 heures.

II – D – 2 – Impact du DBHB sur la formation de biofilm par les microalgues *C. closterium* et *P. purpureum*

Pour observer l'impact du DBHB sur la formation du biofilm microalgal, le DBHB est ajouté dans le flux de milieu. Le débit est réglé à 150 µL/min, des observations en microscopie confocale à balayage laser sont réalisées pendant 120 heures (48, 72, 96 et 120 h) afin de réaliser une cinétique de formation de biofilm. Les biovolumes des biofilms obtenus (µm³/µm²) sont déterminés par le programme COMSTAT sous Matlab. Les résultats sont présentés sous la forme de l'évolution du biovolume du biofilm en fonction du temps. Afin d'interpréter l'ensemble des résultats obtenus, des traitements statistiques sont réalisés (ANOVA, $p < 0,01$).

III – Étude des propriétés physico-chimiques des surfaces

III – A – Impact de la rugosité des surfaces

Dans l'objectif d'étudier l'impact des propriétés physiques d'une surface sur l'adhésion de *C. closterium*, quatre surfaces sont étudiées : une surface lisse (verre), une surface rugueuse (acier inoxydable) et deux surfaces en polycarbonate possédant des rugosités différentes.

Dans un premier temps, l'effet de la rugosité de surface est recherché. Deux types de surface sont utilisés. Deux surfaces dont la rugosité est inférieure à 10 µm : le verre (0,36 µm) et le polycarbonate

(5,34 μm), ainsi que deux surfaces possédant des rugosités supérieures à 10 μm , l'acier inoxydable (10,39 μm) et un autre polycarbonate (22,50 μm).

Le test d'adhésion est réalisé dans une boîte de Pétri (90 mm). Les surfaces sont découpées pour obtenir des coupons de 1 cm^2 et nettoyées par le RBS® (partie II-A). Les coupons sont autoclavés avant d'être déposés dans une boîte de Pétri. Neuf coupons sont déposés par boîte, afin d'obtenir un *triplicata* aux trois temps d'observation. La boîte de Pétri est ensuite remplie avec 20 mL d'ASW supplémentée avec du f/2 Guillard à 2 % et inoculée avec 10^5 cellules/mL à partir d'une culture de 14 jours axénisée. L'impact de la rugosité de surface est évalué uniquement sur l'adhésion de *C. closterium*. En effet, seule cette microalgue possède une morphologie et une taille importante et elle est disponible au laboratoire.

Les boîtes de Pétri préparées, sont incubées dans l'armoire phytotronique. Aux temps d'incubation de 8, 24 et 48 heures, trois coupons sont récupérés et observés en microscopie confocale à balayage laser afin de dénombrer les cellules adhérentes et en microscopie électronique à balayage dans le but d'observer leur morphologie. Les résultats présentent les cinétiques d'adhésion au cours du temps ainsi que des observations microscopiques de la microalgue adhérente aux différentes surfaces.

III – B – Impact de l'hydrophobie des surfaces

Ces travaux s'intègrent dans un projet de recherche, établi au cours de l'année 2016, qui a pour objectif d'étudier la bioadhésion de plusieurs organismes marins, des microorganismes tels que les bactéries ou les microalgues, des macroorganismes et des invertébrés. Les organismes sont sélectionnés en raison des différences de taille et des mécanismes d'adhésion mis en place. Ce projet regroupe trois laboratoires : le laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) réalisant les tests sur l'adhésion de microorganismes marins, le laboratoire des Sciences de l'Environnement MARin (LEMAR) réalisant les tests d'adhésion des macroorganismes et invertébrés marins et l'institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) impliqués dans les modifications de surfaces par traitement plasma et dans la caractérisation physico-chimique (AFM, goniomètre, XPS).

Le support utilisé pour ces tests est le polycarbonate d'épaisseur 6 μm (Goodfellow). Le film de polycarbonate est fixé à une lamelle de verre de dimension 24 x 50 mm avec de la colle silicone de façon à étirer au maximum le film pour n'avoir aucun pli. Ces surfaces sont traitées par un flux de plasma dans un réacteur Bâti RF (IMMM au Mans). Quatre flux de plasma sont testés : un flux à base d'argon, un flux d'argon-dioxygène, un flux d'argon-diazote ou un flux d'argon-tétrafluorure de carbone.

Pour le test d'adhésion des microalgues, l'expérience est réalisée en chambre à flux. La stérilisation du système est étudiée de façon à ne pas modifier les traitements. Les surfaces sont nettoyées soit par de la javel, de l'éthanol 95 % ou par le RBS®. Les angles de contact des surfaces sont mesurés (GBX - Digidrop) afin de valider le protocole de nettoyage.

Après la préparation du système, une solution de microalgues à 10^5 cellules/mL, préparée à partir d'une culture mère de 14 jours axénisée, est injectée au sein de la chambre à flux. La chambre est fermée puis placée dans une étuve à 20 °C, exposée à la lumière (12 H : 12 H). Au bout de 24 heures d'adhésion, les chambres à flux sont observées en microscopie confocale à balayage laser afin de déterminer le nombre de microalgues adhérees sur chacune des surfaces.

Les résultats présentent l'impact des différents traitements plasma sur l'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum*. Les expériences sont réalisées en *triplicata* (soit 27 données par condition). Les résultats présentent les dénombrements de cellules adhérees à 24 heures sur les différentes surfaces. Afin de valider si le traitement induit une différence significative un test statistique est réalisé (ANOVA, $p < 0,01$).

Résultats et discussion

I – Impact des composés de la famille des hemibastadines sur quatre souches de microalgues

C. closterium, *H. coffeaeformis*, *P. purpureum* et *E. gayraliae* sont caractérisées en déterminant leurs paramètres de croissance, leur morphologie et en estimant visuellement leur capacité à produire des exopolymères. Ces espèces ont été choisies en raison de leur capacité à adhérer aux surfaces et pour leur diversité morphologique (Cooksey & Cooksey., 1986 ; Alcoverro *et al.*, 2000 ; Djemai-Zoghliche *et al.*, 2011 ; Jellali *et al.*, 2013).

I – A – Cinétiques microalgales

L'étude des courbes de croissance permet de déterminer le temps de génération mais également le rapport permettant de connaître le nombre de cellules pour une unité de fluorescence. Sur la Figure III-1, sont présentées les courbes de croissance des quatre souches étudiées. Tout comme pour les bactéries, il est possible d'identifier les différentes phases de croissance.

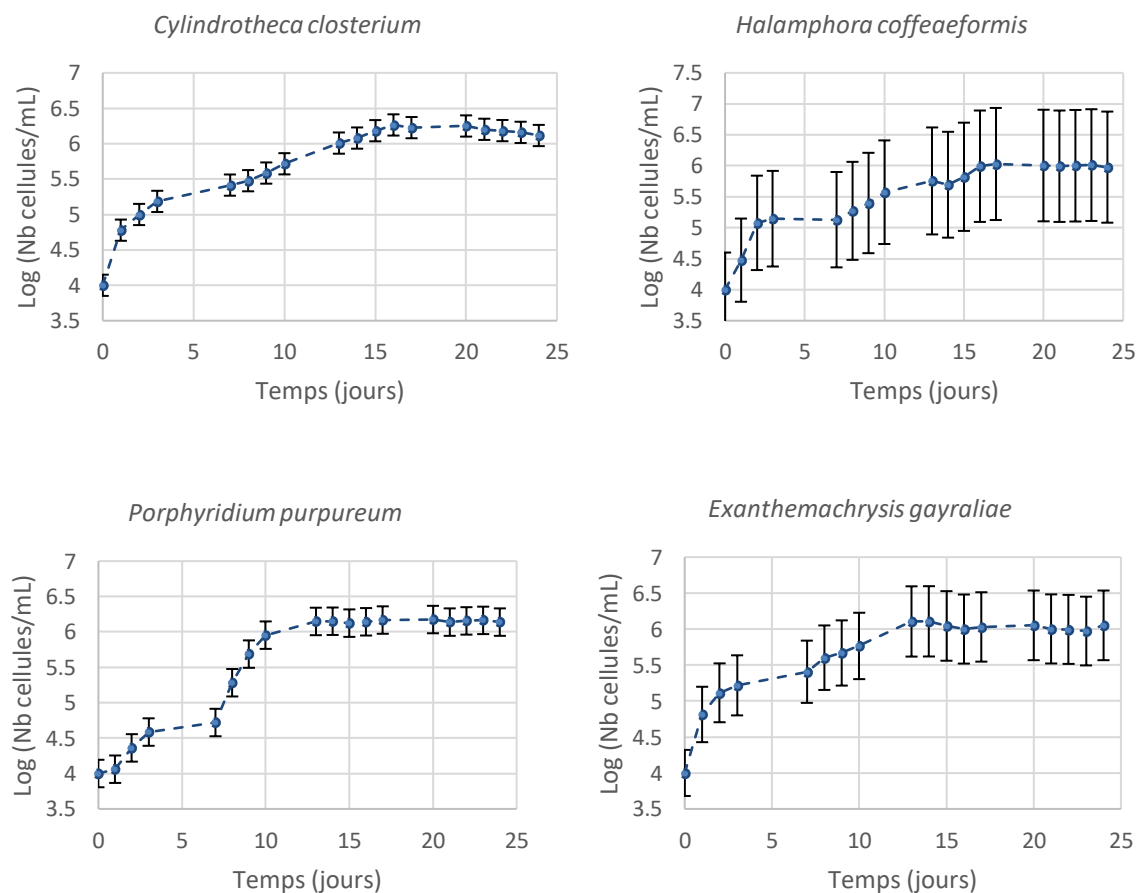


Figure III-1 : Cinétique de croissance des quatre microalgues (*C. closterium*, *P. purpureum*, *H. coffeaeformis* et *E. gayraliae*), les résultats sont exprimés selon le Log(nombre de cellules/mL) en fonction du temps (les barres représentent les écarts-types)

Pour *C. closterium*, *H. coffeaeformis* et *E. gayraliae*, une phase rapide de croissance est observée jusqu'au troisième jour. La croissance est ensuite ralentie avant d'atteindre la phase stationnaire à partir du quinzième jour. Pour *P. purpureum*, une phase de latence plus longue est observée (six premiers jours). La phase stationnaire de croissance débute au douzième jour. Sur l'ensemble des cinétiques réalisées, seule *C. closterium* semble atteindre la phase de déclin au 25^{ème} jour.

Pour *H. coffeaeformis* et *E. gayraliae*, les écarts-types présents sur la courbe de croissance montrent des valeurs plus élevées. Ces écarts-types importants sont dus aux amas formés par ces microalgues rendant difficile leur dénombrement et donc la répétabilité des résultats.

I – B – Caractérisation des souches microalgales

La caractérisation des souches permet de mettre en évidence de grandes différences morphologiques. Par exemple, *Cylindrotheca closterium* est une microalgue de forme allongée qui possède la plus grande taille (environ 65 μm) (Figure III-2), tandis que les autres microalgues possèdent une forme ronde et ont des tailles comprises entre 5 et 15 μm .

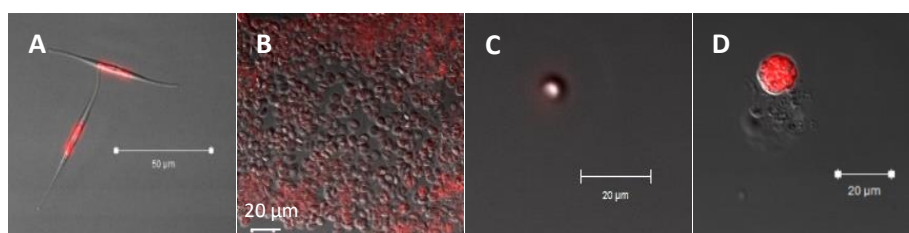


Figure III-2 : Observation en microscopie confocale à balayage laser des quatre microalgues (A : *Cylindrotheca closterium*, B : *Halamphora coffeaeformis*, C : *Porphyridium purpureum* et D : *Exanthemachrysis gayraliae*)

La caractérisation des microalgues est présentée dans le Tableau III-3.

Tableau III-3: Caractéristiques des quatre microalgues étudiées

Microalgues	AC	Taille moyenne (μm)	Temps de génération (heures)	Rapport Fluorescence/Densité cellulaire (cellule/mL)
<i>Cylindrotheca closterium</i>	170	65 \pm 10,5	20	1 u.a = 1,2.10 ⁻³ x NC
<i>Halamphora coffeaeformis</i>	713	10 \pm 1,1	31	1 u.a = 1,1.10 ⁻³ x NC
<i>Porphyridium purpureum</i>	122	5 \pm 0,5	33	1 u.a = 1.10 ⁻⁴ x NC
<i>Exanthemachrysis gayraliae</i>	15	15 \pm 0,6	25	1 u.a = 9.10 ⁻⁴ x NC

AC : numéro de classification, u.a : unité arbitraire, NC : nombre de cellules/mL

Le dénombrement cellulaire et la mesure de fluorescence quotidienne ont permis de définir le rapport entre la fluorescence et la densité cellulaire. Ce rapport est lié à la taille de la microalgue : plus elle est grande plus le nombre de cellules sera faible pour obtenir une unité arbitraire de fluorescence. Dans le cas d'*H. coffeaeformis*, des problèmes d'agrégation de la souche modifient les résultats obtenus. De

par la forte production d'EPS par cette espèce, les cellules adhèrent les unes aux autres ce qui rend difficile le prélèvement d'un volume homogène de cellules.

Pour ces quatre microalgues, le temps de génération reste proche avec des valeurs comprises entre 20 et 33 heures. L'ensemble des souches produisent des exopolymères (EPS) observables en microscopie électronique à balayage. Un exemple est présenté pour *C. closterium* (Figure III-3).

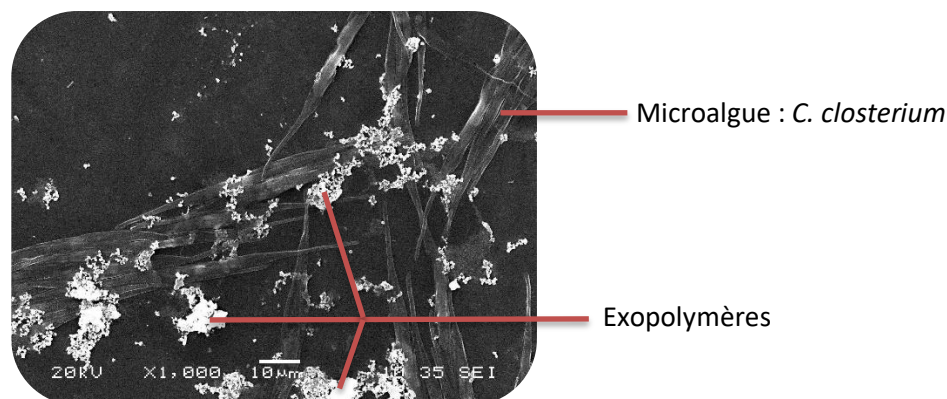


Figure III-3 : Observation de cellules de *Cylindrotheca closterium* en microscopie électronique à balayage après 48 heures d'adhésion sur du verre

La production d'EPS par les microalgues permet l'adhésion des cellules, leur mobilité et un rôle de barrière face à des stress environnementaux tels que des variations de la salinité ou du pH, au sein des biofilms (Steele *et al.*, 2014). Les EPS sont donc une composante clé de la formation de biofilm par les microalgues (Bellinger *et al.*, 2005). Pour les espèces étudiées, la composition des EPS produit par *C. closterium* et *Porphyridium sp.* et *H. coffeaeformis* est publiée (Arad *et al.*, 1985 ; Geresh & Arad., 1991 ; Bhosle *et al.*, 1996 ; Staats *et al.*, 1999). Néanmoins, pour les microalgues du genre *Porphyridium sp.*, les études avaient pour objectif de caractériser les propriétés biologiques des EPS (antibactérien, antiviral...) (Raposo *et al.*, 2013).

En fonction du protocole d'extraction réalisé, il est possible d'identifier les EPS liés aux cellules et les EPS libres. Les travaux de Staats *et al.*, ont montré que chez *C. closterium*, les EPS liés étaient constitués de polysaccharides (61 %), protéines (8 %), acide uronique (21 %) et sulfates (11 %), tandis que les EPS libres sont composés de polysaccharides (86 %), protéines (9 %) et acides uroniques (5 %). Les principales différences entre les EPS libres et liés concernent les quantités de polysaccharides, d'acide uronique et la présence de sulfates. Les sulfates et l'acide uronique seraient impliqués dans l'adhésion des diatomées (Dade *et al.*, 1990). L'identification des monosaccharides au sein des polysaccharides a été réalisée. Les polysaccharides des EPS libres sont constitués de glucose, galactose, mannose, rhamnose et xylose. Les polysaccharides des EPS liés possèdent les mêmes sucres avec en plus l'arabinose. Parmi ces sucres, le xylose et le mannose constitue la paroi cellulaire des diatomées. Ces

exopolymères ne sont pas uniquement impliqués dans des structures d'adhésion mais constituent majoritairement la matrice renforçant l'adhésion (Staats *et al.*, 1999).

Les quatre microalgues seront utilisées pour le criblage de composés potentiellement antifouling. Pour les autres expériences, seules *C. closterium* et *P. purpureum* sont étudiées. Ces choix sont réalisés pour des raisons techniques (formation d'agrégats, vitesse de croissance et morphologie).

I – C – Criblage des composés de la famille des hemibastadines

Les expérimentations présentées dans le chapitre II ont permis de mettre en évidence une bioactivité intéressante de la molécule DBHB (propriétés anti-quorum sensing et antibiofilm). L'objectif de cette partie est d'élargir les connaissances sur cette famille de molécules en évaluant le potentiel d'action sur des microalgues. Les composés de la famille des hemibastadines sont classés en deux groupes. Ces composés sont évalués sur les quatre microalgues : *C. closterium*, *P. purpureum*, *H. coffeaeformis* et *E. gayraliae*.

I – C – 1 – Molécules de référence

Ce premier groupe comprend les molécules de référence (composés commerciaux) utilisées dans les tests d'inhibition d'une enzyme impliquée dans l'adhésion d'invertébrés. Ces molécules sont sélectionnées en raison de leur faible CI_{50} vis-à-vis du test enzymatique de la phénoloxydase. Le contrôle positif (DCOIT) utilisé dans ce criblage est ajouté aux CMI présentées dans le Tableau III-4.

Les structures sont présentées dans le tableau II-4 de la partie II-A du chapitre II.

Tableau III-4 : Concentrations minimales inhibitrices des composés de référence inhibant la croissance ou l'adhésion des microalgues étudiées : *C. closterium*, *H. coffeaeformis*, *P. purpureum* et *E. gayraliae*

	<i>C. closterium</i>		<i>H. coffeaeformis</i>		<i>P. purpureum</i>		<i>E. gayraliae</i>	
	C	A	C	A	C	A	C	A
2,3-BMO	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Ferriprox	0,05	0,05	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Mimosine	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Acide violurique	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Acide kojique	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
DCOIT	10	10	10	10	10	10	10	10

C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : $\mu\text{g/mL}$

Comme pour les souches bactériennes, l'activité de ces substances commerciales est spécifique au test enzymatique. En effet, leur activité est faible vis-à-vis des microalgues. Seule la diatomée *C. closterium* est sensible à trois de ces composés, dont le ferriprox pour lequel la concentration d'inhibition est faible (0,05 $\mu\text{g/mL}$).

Le DCOIT est une molécule AF à large spectre et est active sur les quatre microalgues étudiées avec une CMI de 10 µg/mL. L'activité des molécules de la famille des hemibastadines est comparée aux CMI obtenues avec le DCOIT.

I – C – 2 – Groupe 1 de la famille des hemibastadines

Le premier groupe de cette famille comporte huit sous-groupes, au sein de ces sous-groupes les variations de structure repose sur l'ajout d'un ou de deux groupements brome. Les structures sont présentées dans le tableau II-11 de la partie II-C-1 du chapitre II.

Les résultats du criblage montrent que les quatre microalgues sont, dans l'ensemble, peu impactées par l'ajout de groupements brome. Les concentrations inhibitrices de l'adhésion ou de la croissance sont présentées dans le Tableau III-5.

Tableau III-5 : Concentrations minimales inhibitrices des composés du groupe 1 inhibant la croissance et l'adhésion des microalgues : *C. closterium*, *H. coffeaeformis*, *P. purpureum* et *E. gayraliae*

	<i>C. closterium</i>		<i>H. coffeaeformis</i>		<i>P. purpureum</i>		<i>E. gayraliae</i>	
	C	A	C	A	C	A	C	A
Hexylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BrHexylamide	10	10	> 50	> 50	10	10	10	10
Br₂Hexylamide	10	10	0,01	0,01	> 50	> 50	10	10
Isobutylamide	> 50	> 50	10	10	> 50	> 50	10	10
BrIsobutylamide	10	10	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
CycloHexylamide	> 50	10	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
BrCycloHexylamide	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
Br₂CycloHexylamide	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
Phénéthylamide	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
BrPhénéthylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
Br₂Phénéthylamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
Tryptamide	> 50	> 50	50	50	> 50	> 50	10	10
Br₂Tryptamide	10	10	> 50	> 50	> 50	> 50	10	10
Histamide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
BrHistamide	> 50	> 50	0,01	0,01	> 50	> 50	> 50	> 50
Br₂Histamide	50	50	0,01	0,01	> 50	> 50	> 50	> 50
Oxime ester	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Br₂oxime ester	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Br₂Hydroéthylamide	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50

C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : µg/mL

Les quatre microalgues ne possèdent pas le même seuil de sensibilité aux composés évalués. *P. purpureum* semble être peu sensible aux composés de ce groupe. Seul le composé BrHexylamide inhibe à 10 µg/mL l'adhésion et la croissance de *P. purpureum*. Les différences de morphologie peuvent expliquer ces différences de sensibilité. *H. coffeaeformis* est plus sensible à trois composés : Br₂Hexylamide, BrHistamide et Br₂Histamide. Les valeurs de CMI pour ces trois composés sont très

faibles (0,01 µg/mL). L'ajout de brome semble être toxique pour cette microalgue. *C. closterium* et *E. gayraliae* sont les espèces les plus sensibles aux composés de ce groupe : puisque pour au moins dix composés, les CMI sont comprises entre 10 et 50 µg/mL.

Les microalgues sont de bons indicateurs de toxicité. En effet, une étude de Franz *et al.*, s'est intéressée à la sensibilité de différentes diatomées au triclosan. Le triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol) est un bactéricide à large spectre. La toxicité de cette molécule vis-à-vis de différents organismes marins (bactéries, daphnies, poissons...) a été démontrée (DeLorenzo & Fleming., 2008). Cette étude a montré que les microalgues étaient les organismes les plus sensibles à ce composé parmi les différents organismes marins évalués. Cependant, seules quelques espèces de microalgues sont inhibées. Le triclosan est montré comme plus nocif envers les chlorophytes. Certaines microalgues forment rapidement des colonies ou produisent un EPS les rendant plus résistantes contrairement à d'autres qui restent à l'état planctonique. Il a été publié que la forme de vie, le temps de génération et la classification taxonomique semblent influencer la sensibilité des différentes espèces (Franz *et al.*, 2008).

I – C – 3 – Groupe 2 de la famille des hemibastadines

Ce second groupe de composés regroupe trois molécules possédant les structures les plus proches des unités hemibastadines formant un bastadine, des composés antifouling identifiés chez plusieurs espèces d'éponge (Niemann *et al.*, 2013).

Les structures sont présentées dans le tableau II-13 de la partie II-C-2 du chapitre II.

Tableau III-6 : Concentrations minimales inhibitrices des composés du groupe 2 inhibant la croissance ou l'adhésion des microalgues étudiées : *C. closterium*, *H. coffeaeformis*, *P. purpureum* et *E. gayraliae*

	<i>C. closterium</i>		<i>H. coffeaeformis</i>		<i>P. purpureum</i>		<i>E. gayraliae</i>	
	C	A	C	A	C	A	C	A
Tyrosintyramide	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	50	50
Norbromohemibastadine	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	50	50
Dibromohemibastadine	50	50	> 50	> 50	> 50	> 50	50	50

C = concentration minimale inhibant la croissance, A = concentration minimale inhibant l'adhésion, unité : µg/mL

Les valeurs des concentrations inhibitrices sont présentées dans le Tableau III-6. Parmi les quatre microalgues testées, deux espèces sont sensibles à deux ou aux trois hemibastadines testés : *C. closterium* et *E. gayraliae* avec des CMI de 50 µg/mL.

Dans une étude de Trepos *et al.*, l'activité du synoxazolidinone et du pulmonarine (Figure III-4) a été évaluée sur plusieurs organismes marins (bactéries, microalgues et balanes). Dans ces travaux les microalgues ont des sensibilités différentes en fonction du composé mis en contact.

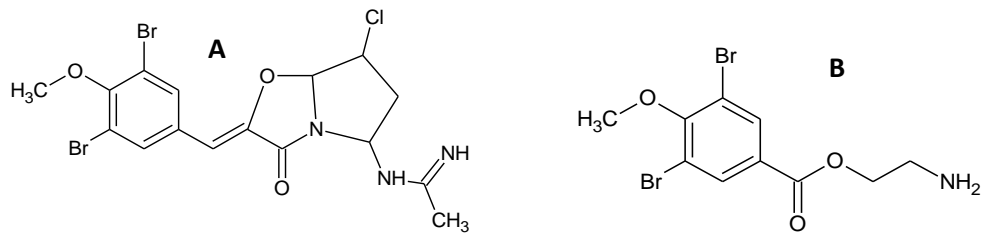


Figure III-4 : Structure chimiques des composés Synoxazolidinone C (A) et pulmonarine A (B)

Les mêmes microalgues que celles de notre étude sont utilisées et les CMI présentées (entre 0,2 et 20 μM) sont légèrement plus faibles que les CMI que nous avons obtenues (Trepos *et al.*, 2014).

Les travaux de Hanssen *et al.*, présentent l'activité de deux composés proches structurellement des hemibastadines, notamment du DBHB : la ianthelline et la barettine (Figure III-5).

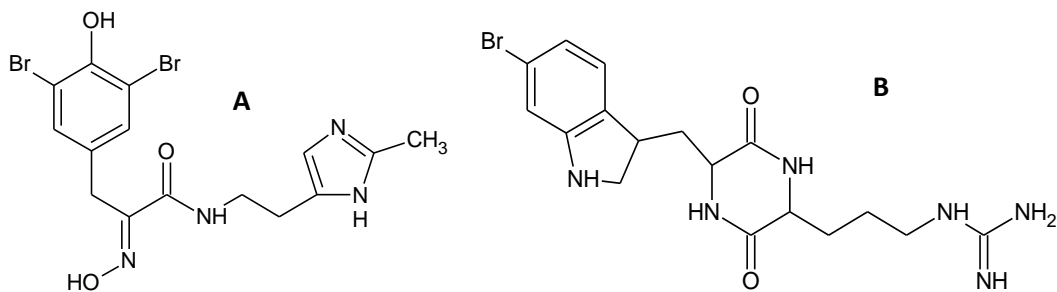


Figure III-5 : Structure des composés ianthelline (A) et barettine (B)

L'impact de ces composés est étudié sur des bactéries marines, des microalgues, de larves de *Balanus improvisus* (balane) et sur l'activité de la phénoloxydase de *Mytilus edulis* (moule). Les deux composés testés n'induisaient pas d'inhibition de la croissance ou de l'adhésion jusqu'à 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour *E. gayraliae* et *H. coffeaeformis*. Seules *C. closterium* et *P. purpureum* voyaient leur croissance et leur adhésion inhibées par la barettine à 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ces deux composés présentent des CMI plus basses (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour *B. improvisus* et 45,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour *M. edulis*) que les composés de la famille des hemibastadines testés (Hanssen *et al.*, 2014).

Parmi les molécules étudiées dans ce criblage, aucun composé n'a montré d'inhibition sur les quatre espèces étudiées. Seuls les composés BrHexylamide et Br₂Hexylamide sont capables d'inhiber la croissance de trois microalgues.

La molécule DBHB possédant des propriétés biologiques intéressantes envers les bactéries, elle induit des inhibitions de croissance et d'adhésion sur deux microalgues (*C. closterium* et *E. gayraliae*). Cependant les CMI restent élevées à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dans la suite, l'activité de cette molécule est évaluée sur la capacité d'adhésion et la formation de biofilms de microalgue en condition dynamique (*C.*

closterium et *P. purpureum*). En plus de ses propriétés biologiques, le DBHB est sélectionné en raison des quantités disponibles. En effet, les tests en condition dynamique nécessitent plus de matière.

En comparaison des résultats du criblage de la famille des hemibastadines obtenus dans le chapitre II envers les bactéries, les microalgues sont globalement plus sensibles que les bactéries. Sur les 28 composés de la famille des hemibastadines évalués, la bactérie la plus sensible, *P. aeruginosa* PAO1 était inhibée par 11 composés. Pour les microalgues, *C. closterium* et *E. gayraliae* sont sensibles à 16 molécules. De plus, pour la diatomée *H. coffeaeformis*, des concentrations minimales inhibitrices faibles sont obtenues (0,01 µg/mL). Les microalgues semblent être des indicateurs de toxicité plus sensibles que les bactéries.

II – Capacité de formation de biofilms

II – A – Paramètres influençant l'adhésion

Afin de tester l'impact de paramètres chimiques et/ou physiques sur l'adhésion des microalgues, il a fallu au préalable déterminer les conditions de culture influençant l'adhésion des microalgues étudiées : *C. closterium* et *P. purpureum*. Des conditions extrêmes sont étudiées afin d'observer l'adaptation des microalgues.

II – A – 1 – Salinité du milieu

L'impact de la salinité a d'abord été étudié pour *C. closterium* et *P. purpureum*.

La Figure III-6 présente l'évolution des dénombrements cellulaires de *C. closterium* et *P. purpureum* à l'état planctonique et adhérent pendant les 72 heures d'expérience.

Pour la diatomée *C. closterium* (Figure III-6.A), une augmentation du nombre de cellules à l'état planctonique est visible pour les milieux contenant 10, 20 et 50 g/L de sel, la microalgue se développe favorablement à l'état planctonique. Pour ces mêmes concentrations, le nombre de cellules adhérentes augmente au cours du temps, les conditions n'empêchent pas l'adhésion mais le nombre de cellules est plus faible qu'aux salinités de 30 et 40 g/L (ANOVA, $p < 0,01$).

Pour des concentrations intermédiaires (30 et 40 g/L), le nombre de cellules planctonique décroît. Cette diminution est significativement différente par rapport au temps initial (ANOVA, $p < 0,01$). Le nombre de cellules adhérentes est plus important avec environ 28 000 cellules/cm² à 72 heures. Ces salinités sont favorables à l'adhésion et au développement de la diatomée à la surface.

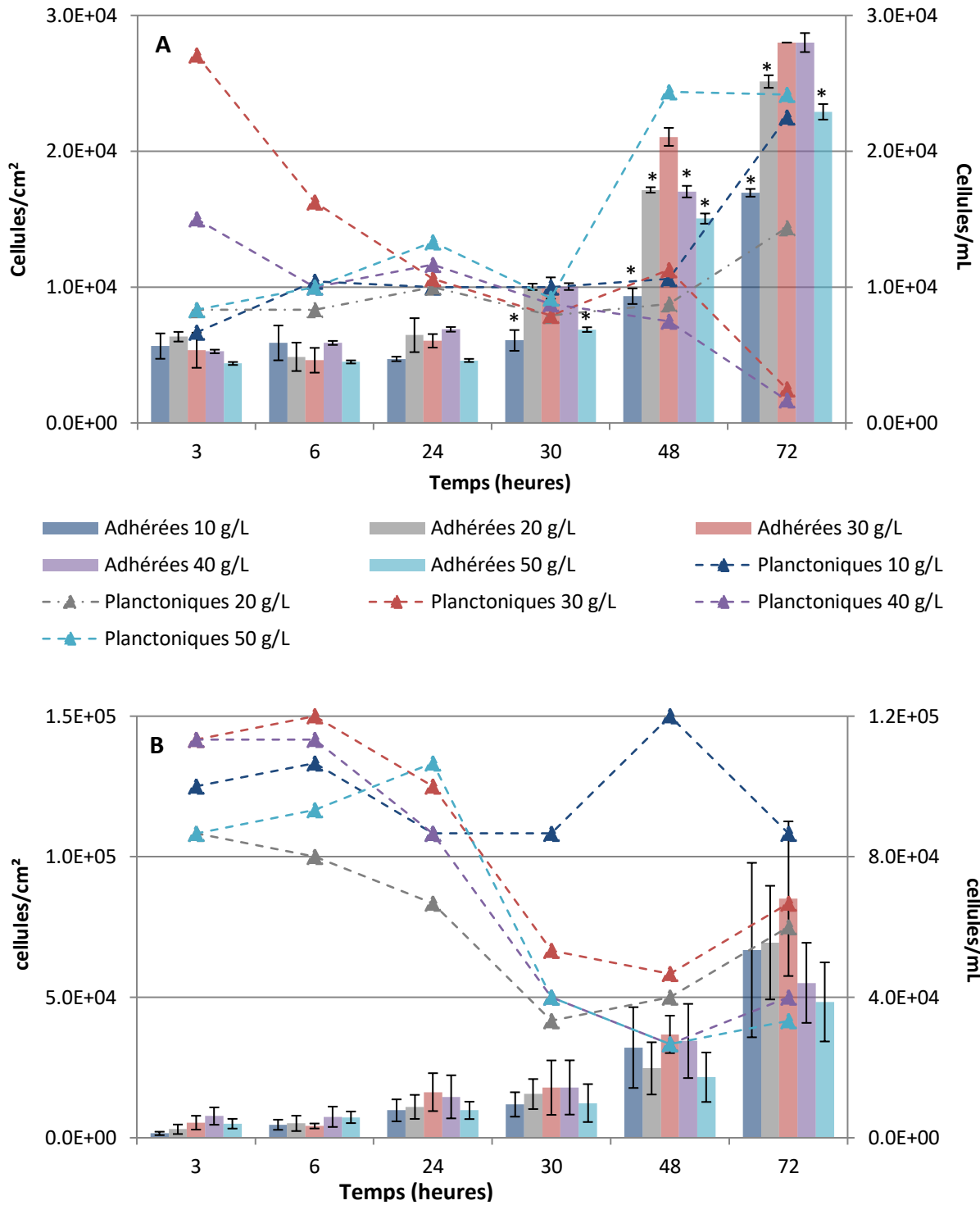


Figure III-6 : Impact des salinités à 10, 20, 30, 40 et 50 g/L sur les microalgues *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B) à l'état planctonique et adhérentes sur la surface (densité cellulaire 10^5 cellules/mL, présence de nutriments, pH 8), test ANOVA (* $p < 0,01$ en comparaison à 30 g/L), les barres représentent les écarts-types, axe de gauche : microalgues adhérentes, axe de droite : microalgues planctoniques. Par soucis de représentation, l'écart-type des cellules planctoniques n'est pas représenté.

Pour la microalgue *P. purpureum* (Figure III-6.B), à une salinité de 10 g/L, le nombre de cellules à l'état planctonique varie peu, l'écart entre le temps initial et final n'est pas significativement différent ($p < 0,05$). À cette salinité, les cellules se divisent et adhèrent.

Pour les salinités les plus fortes (20, 30, 40 et 50 g/L), le nombre de cellules planctoniques diminue au cours du temps. La différence est significative entre le temps initial et final avec une réduction du nombre de cellules/mL d'un facteur de 2 (ANOVA, $p < 0,01$). Cependant, pour les cinq concentrations étudiées, le nombre de cellules adhérentes augmente pendant les 72 heures. Le nombre moyen de microalgues adhérentes est identique quelle que soit la salinité testée. Cependant, une quantité plus importante de cellules est dénombrée à 30 g/L. Cette différence n'est toutefois pas significative ($p > 0,05$).

Pour les deux microalgues évaluées, à une salinité de 30 g/L, le nombre de cellules adhérentes est le plus important.

En comparant les quantités de cellules adhérentes entre les expériences menées sur *C. closterium* et *P. purpureum*, un nombre de cellules adhérentes plus important est observé dans le cas de *P. purpureum*. Cette différence s'explique par l'écart de taille entre les deux microalgues. *C. closterium* mesure 65 μm alors que *P. purpureum* seulement 5 μm . La surface disponible pour l'adhésion est donc comparativement plus importante pour *P. purpureum*. Sur le champ observé en MCBL (0,18 mm^2), une quantité plus importante de *P. purpureum* sera dénombrée comparativement à *C. closterium*.

Dans la littérature, une salinité de 35 PSU (practical salinity unit) soit 35 g/L d'eau de mer est recommandée pour des cultures de diatomées (Rijstenbil., 2003).

La production d'EPS chez les diatomées est une stratégie adaptative afin de supporter le stress salin. La cellule sécrète des EPS sur le contour de la paroi, limitant ainsi les échanges directs avec le milieu. L'étude de Steele *et al.*, confirme que la production d'EPS chez la diatomée *C. closterium* augmente la viabilité cellulaire suite à des stress environnementaux dans le cas de la formation d'un biofilm (Steele *et al.*, 2014). Toutefois, les observations réalisées en MEB n'ont pas permis de visualiser de différences de production d'EPS aux salinités testées.

II – A – 2 – pH du milieu

Le second paramètre étudié concernant la capacité d'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum* est le pH du milieu. La Figure III-7 présente l'évolution du nombre de cellules adhérentes et à l'état planctonique au cours des 72 heures.

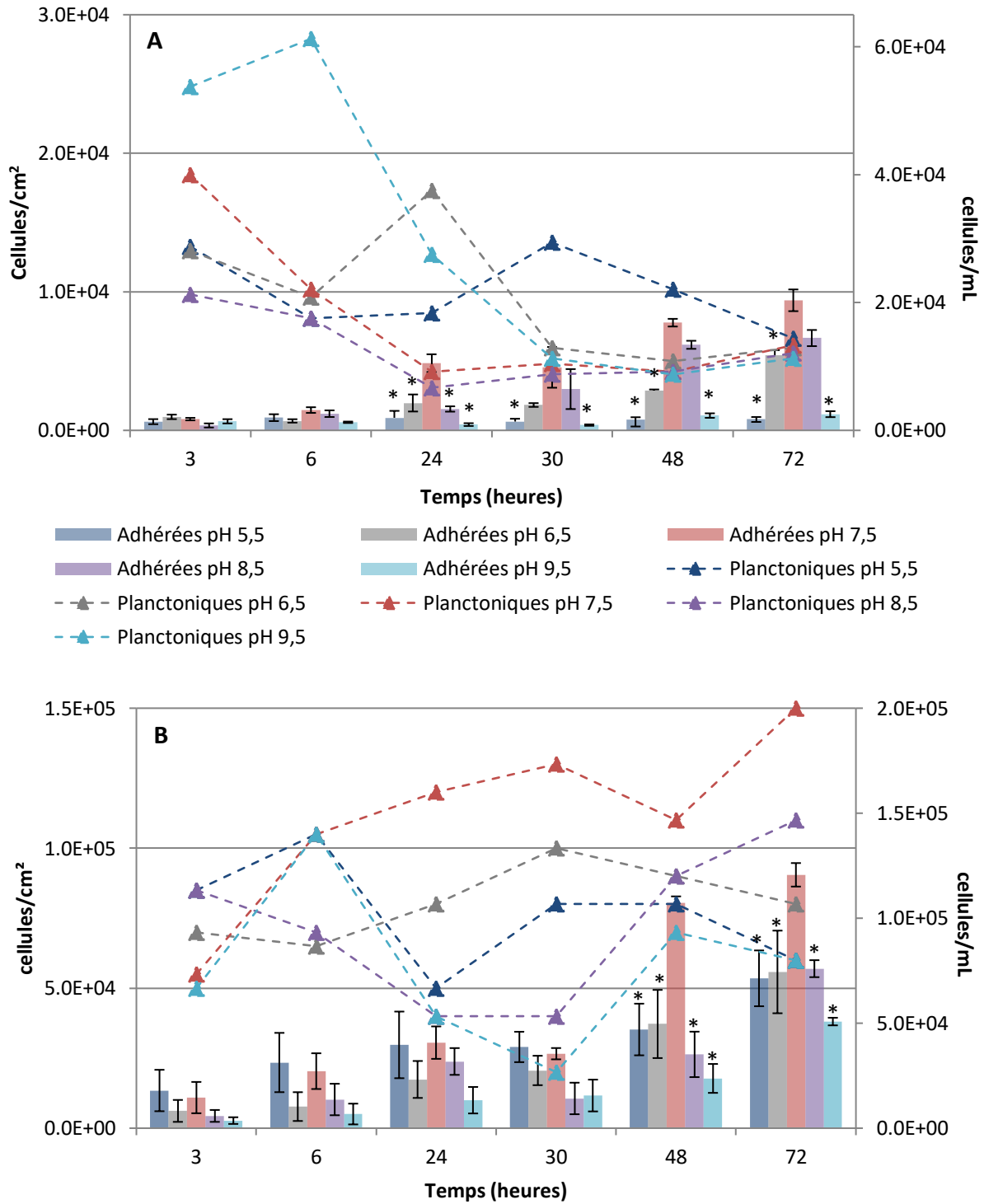


Figure III-7 : Impact du pH : 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 et 9,5 sur les microalgues *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B) à l'état planctonique et adhérees sur les coupons (densité cellulaire 10⁵ cellules/mL, présence de nutriments, salinité 30 g/L), test ANOVA (* p < 0,01, comparé au pH de 7,5), les barres représentent les écarts-types, axe de gauche : microalgues adhérees, axe de droite : microalgues planctoniques. Par soucis de représentation, l'écart-type des cellules planctoniques n'est pas représenté.

Pour la diatomée *C. closterium* (Figure III-7. A), pour l'ensemble des pH, à l'état planctonique, le nombre de cellules décroît au cours du temps. Ce résultat explique d'une part l'adhésion des cellules à la surface de verre et d'autre part une perte potentielle de viabilité des cellules. Dans toutes les conditions, le nombre de cellules adhérees croit, mais reste faible (inférieur à 10 000 cellules/cm²).

Le pH le plus favorable à l'adhésion des cellules est de 7,5 : le nombre de cellules adhérees est significativement plus important. Il est probable que les cellules se divisent à la surface. À des pH extrêmes (inférieur à 6,5 et supérieur à 9,5), l'adhésion est significativement réduite d'un facteur 6. Les pH extrêmes sont défavorables à l'adhésion de *C. closterium*. Pour des pH compris entre 6,5 et 8,5, la diatomée adhère favorablement avec des densités cellulaires comprises entre 5.10³ et 1.10⁴ cellules/cm².

Des observations en MEB montrent qu'aux valeurs de pH extrêmes (5,5 et 9,5) la production d'exopolymères au niveau de la membrane est réduite (Figure III-8).

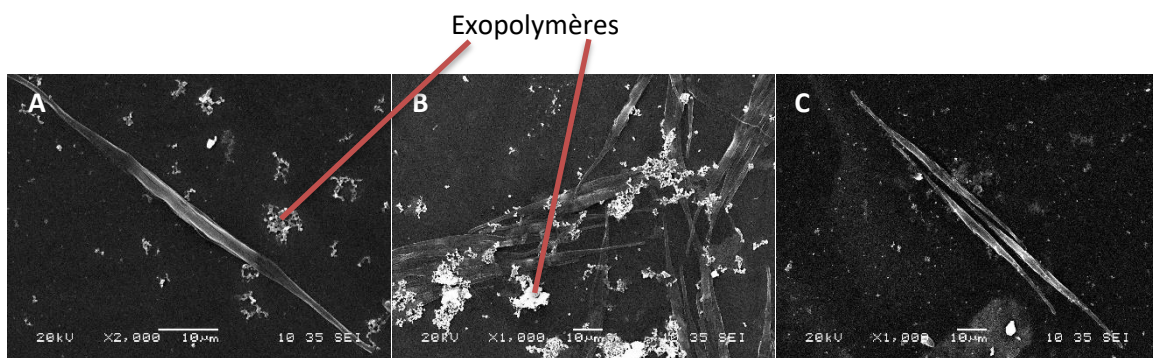


Figure III-8 : Observations en microscopie électronique à balayage de la microalgue *C. closterium* à 72 heures d'adhésion (A : pH 5,5, B : pH 7,5, C : pH 9,5)

Pour *P. purpureum* (Figure III-7. B), à l'état planctonique, la densité cellulaire varie entre 2.10⁴ et 8.10⁴ cellules/mL. Une augmentation du nombre de cellules est uniquement observée à un pH de 7,5. Le nombre de cellule planctonique est augmenté par 3 en 72 heures. A ce pH, l'adhésion et la croissance cellulaire sont plus favorables (90 000 cellules adhérees à 72 heures).

Pour les pH alcalins (8,5 et 9,5), le nombre de cellules planctoniques décroît jusqu'à 30 heures puis le nombre de cellules augmente. Il est possible qu'un temps de latence soit nécessaire pour induire la division cellulaire. Aux pH acides et basiques, 1,5 fois moins de cellules adhérees sont observées (moins de 60 000 cellules adhérees à 72 heures). Cette diminution du nombre de cellules adhérees est significativement différente du pH à 7,5.

Afin de s'adapter à l'augmentation du pH, *P. purpureum* produit des exopolymères visibles sur l'image C de la Figure III-9, recouvrant les cellules adhérees.

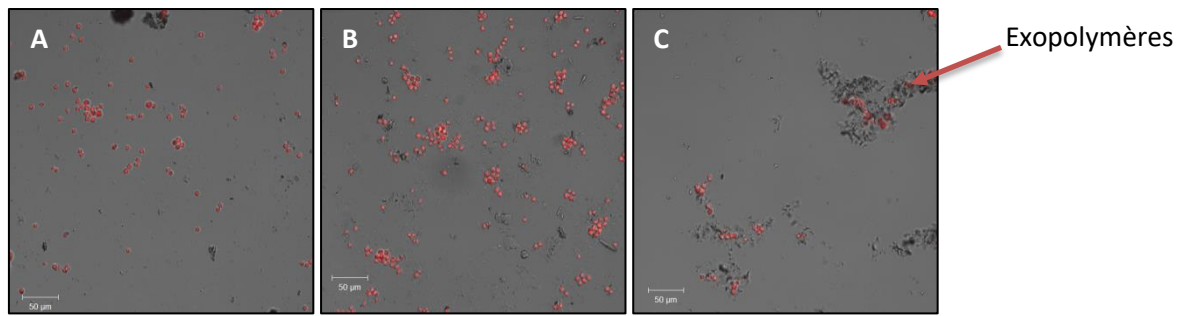


Figure III-9 : Observation en microscopie confocale à balayage laser des coupons à 72 heures de la microalgue *P. purpureum* (A : pH 5,5, B : pH 7,5 et C : pH 9,5)

Tout comme *C. closterium*, *P. purpureum* adhère favorablement à un pH neutre de 7,5. Aux pH acides ou basique, l'adhésion de la microalgue diminue légèrement et est significativement différente à 72 heures du pH 7,5 (ANOVA, $p < 0,01$).

De même que pour la salinité, il est probable que la production d'EPS soit un moyen pour la microalgue de supporter les changements environnementaux. Des études se sont intéressées à l'impact du pH sur la croissance et l'adhésion de microalgues. Des microalgues comme *Spirulina platensis* peuvent croître à des valeurs de pH basiques 9-10 (Qiang *et al.*, 1998) ou *Coccomyxa onubensis*, une microalgue acidophile qui se développe à un pH proche de 2,5. Il a été montré que les pH acides peuvent être favorables au développement des microalgues de par l'absence de pathogènes (Garbayo *et al.*, 2012).

Sekar *et al.*, ont étudié l'impact de plusieurs paramètres dont le pH sur l'adhésion de la diatomée *Nitzschia amphibia* sur du verre immergé dans des milieux aux pH de 6, 7, 8 et 9. L'adhésion était plus importante à un pH de 9. L'adhésion des diatomées semble favorisée à des valeurs de pH alcalins (Sekar *et al.*, 2004). La majorité des microalgues vivent en milieu alcalin. Cette alcalinisation du milieu provient de la consommation de carbone inorganique par les microalgues. Cette consommation induit une augmentation du pH pouvant atteindre des valeurs de 10. Dans l'écosystème marin, le pH se stabilise à des valeurs proches de 8,2 par la présence de carbone inorganique dissous (Forján *et al.*, 2015).

II – A – 3 – Présence de nutriments

Le troisième paramètre étudié concerne l'impact de l'absence de nutriments sur la capacité de *C. closterium* et *P. purpureum* à adhérer aux surfaces. La Figure III-10 présente la cinétique d'adhésion et de croissance de *C. closterium* et *P. purpureum* en présence et en absence de nutriments : f/2 Guillard.

Pour *C. closterium* (Figure III-10.A), à l'état planctonique, la quantité de cellules décroît d'un facteur 11 en présence de nutriments (à 72 heures) alors que le nombre de cellules adhérentes augmentent. Cette diminution est significativement différente entre le temps initial et le temps final (ANOVA, $p < 0,01$). Les cellules adhèrent et se divisent préférentiellement à la surface.

En absence de nutriments, le nombre de microalgues à l'état planctonique augmente significativement en fonction du temps d'un facteur de 2 (ANOVA, $p < 0,01$). L'augmentation du nombre de cellules après 30 heures est probablement dû à un détachement des cellules adhérees. Le nombre de cellules adhérees augmente peu contrairement à la condition en présence de nutriments. En effet, le métabolisme de la microalgue est ralenti. À partir de ces réserves, la diatomée peut encore se diviser mais ce paramètre devient vite limitant. Cette condition entraîne une inhibition du nombre de cellules adhérees ce qui explique la diminution observée à partir de 72 heures. Un détachement des cellules est probable. Il permettrait aux cellules de coloniser d'autres surfaces plus propices à leur développement. D'autre part, une perte de la viabilité des cellules adhérees peut être envisagée.

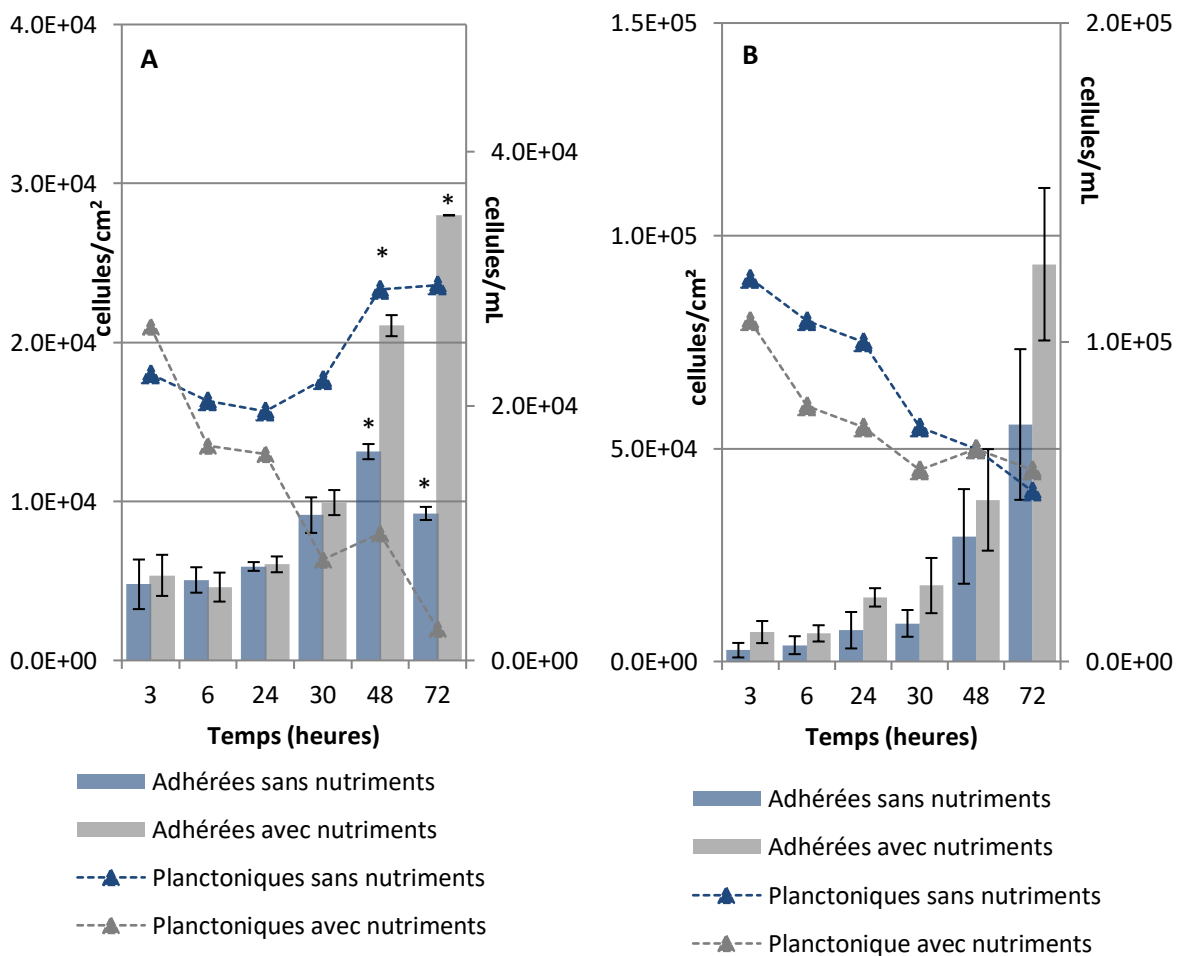


Figure III-10 : Impact de la présence de nutriments sur les microalgues *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B) adhérees et à l'état planctonique (densité cellulaire 10^5 cellules/mL, pH 8, salinité 30 g/L, test ANOVA (* $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types, axe de gauche : microalgues adhérees, axe de droite : microalgues planctoniques. Par soucis de clarté, l'écart-type des cellules planctoniques n'est pas représenté.

En absence de nutriments, la fluorescence émise est moins intense (Figure III-11). Les cellules sont plus fines indiquant que les conditions ne sont pas optimales. De plus les chloroplastes centraux se déplacent vers l'intérieur de la cellule indiquant une lyse cellulaire programmée.

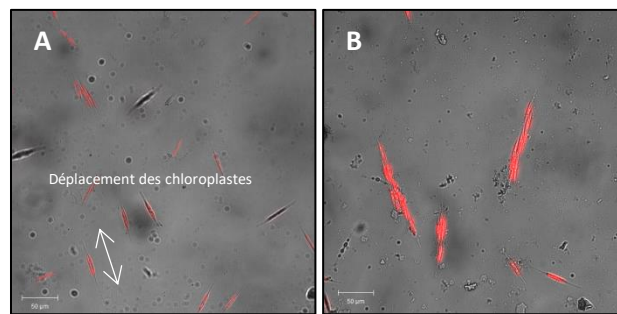


Figure III-11 : Observation en microscopie confocale à balayage laser de l'adhésion de *C. closterium* à 72 h en absence de nutriments (A) et en présence de nutriments (B)

Pour *P. purpureum* (Figure III-10.B), le nombre de cellules planctoniques diminue au cours du temps en présence et en absence de nutriments. L'enrichissement du milieu montre une quantité de cellules adhérees plus importante à 72 heures (92 000 cellules/cm² à 72 heures). En absence de nutriments, le nombre de cellules adhérees, est plus faible (58 000 cellules/cm² à 72 heures). Néanmoins, ces résultats ne sont pas significativement différents à cause de l'importance des écarts-types (ANOVA $p > 0,05$). Un nombre plus important de réplicats aurait été nécessaire pour permettre de valider la significativité des résultats.

Contrairement aux observations réalisées sur *C. closterium*, l'absence de nutriments dans le milieu n'inhibe pas l'adhésion de *P. purpureum*. La mortalité des cellules n'a pas été observée en MCBL par perte ou diminution de la fluorescence. Lors de l'inoculation, le volume de microalgues ajouté contient des nutriments issus de la culture mère. Il est possible que cette quantité soit suffisante au développement de cette microalgue pendant les 72 heures. *P. Purpureum* est dix fois plus petite que *C. closterium*, il est probable que cette microalgue consomme moins de nutriments que *C. closterium* sur un même temps de croissance.

L'absence de nutriments est un paramètre défavorable à l'adhésion et au développement de *C. closterium*. Contrairement aux bactéries, les microalgues ont besoin d'un apport d'éléments organiques et inorganiques pour permettre une adhésion durable. La composition du milieu de croissance est un élément clé dans la croissance des microalgues. Ainsi les microalgues ont besoin de carbone, azote, phosphore, vitamine en quantité importante mais aussi de faibles concentrations de cuivre, manganèse, zinc, cobalt ou nickel pour permettre sa division cellulaire (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2001).

Parmi les macroéléments, le carbone intervient dans les voies de photosynthèse. Il est fixé au niveau des chloroplastes et engendre une multitude de réactions induisant notamment la synthèse de dioxygène (Bauwe *et al.*, 2010). L'azote est rencontré sous forme de nitrate, ammonium ou nitrite.

C'est un élément important pour la production de biomasse microalgale, notamment dans la synthèse de protéines et acide nucléiques (Richmond., 2008).

Dans le milieu marin, la concentration en azote freine fréquemment le développement des microalgues. Le phosphore permet la croissance des microalgues par des procédés biochimiques (synthèse d'acide nucléique, réaction de transfert d'énergie) (Chaichalerm *et al.*, 2012). Les microalgues ont également besoin de microéléments tels que les ions (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^-) et des métaux (Fe, Mn, Cu, Co, Mo) pour leur croissance. Les ions participent principalement aux fonctions métaboliques de la photosynthèse : transport d'électron, réduction des nitrates, nitrites et sulfates, fixation du diazote, et détoxification des ROS (espèces réactives à l'oxygène) (Andersen., 2005).

II – A – 4 – Densité cellulaire inoculée

Le dernier paramètre étudié sur la capacité d'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum* est la densité cellulaire inoculée. La Figure III-12 présente le dénombrement de *C. closterium* et *P. purpureum* à l'état planctonique et à l'état adhérent. Ce suivi est réalisé pendant 72 heures après inoculation à trois densités cellulaires différentes : 10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL.

Pour *C. closterium* (Figure III-12.A), à l'état planctonique, le dénombrement cellulaire diminue au cours du temps pour les deux conditions d'inoculation les plus élevées. Pour l'inoculation à 10^3 cellules/mL, le dénombrement est relativement stable vers 9.10^2 cellules/mL.

Dans les trois conditions, la quantité de cellules adhérentes augmente significativement au cours du temps. Le nombre de cellules adhérentes est plus important pour une inoculation de 10^5 cellules/mL que pour des densités cellulaires d'inoculation plus faibles, respectivement 10 500, 3500 et 680 cellules/cm² sont dénombrées à 72 heures.

Pour la seconde microalgue, *P. purpureum* (Figure III-12.B), à l'état planctonique, pour les trois concentrations d'inoculation testées, le nombre de cellules décroît au cours du temps. Après 72 heures, la densité cellulaire planctonique est réduite d'un facteur 3 pour des inoculations à 10^4 et 10^5 cellules/mL.

Les cinétiques d'adhésion aux trois densités cellulaires évaluées montrent une augmentation du nombre de cellules adhérentes. À 72 heures, 58 000 cellules sont adhérentes lors d'une inoculation à 10^5 cellules/mL, l'inoculation de 10^4 cellules/mL induit une adhésion de 12 000 cellules/cm² et enfin l'inoculation de 10^3 cellules/mL, donne une adhésion de 620 cellules/cm².

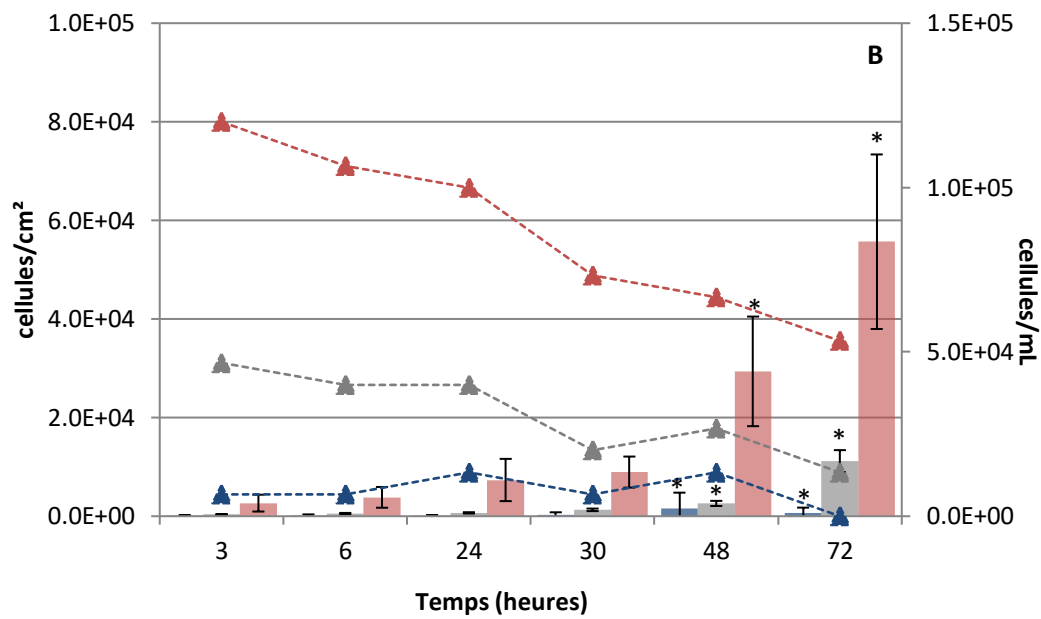
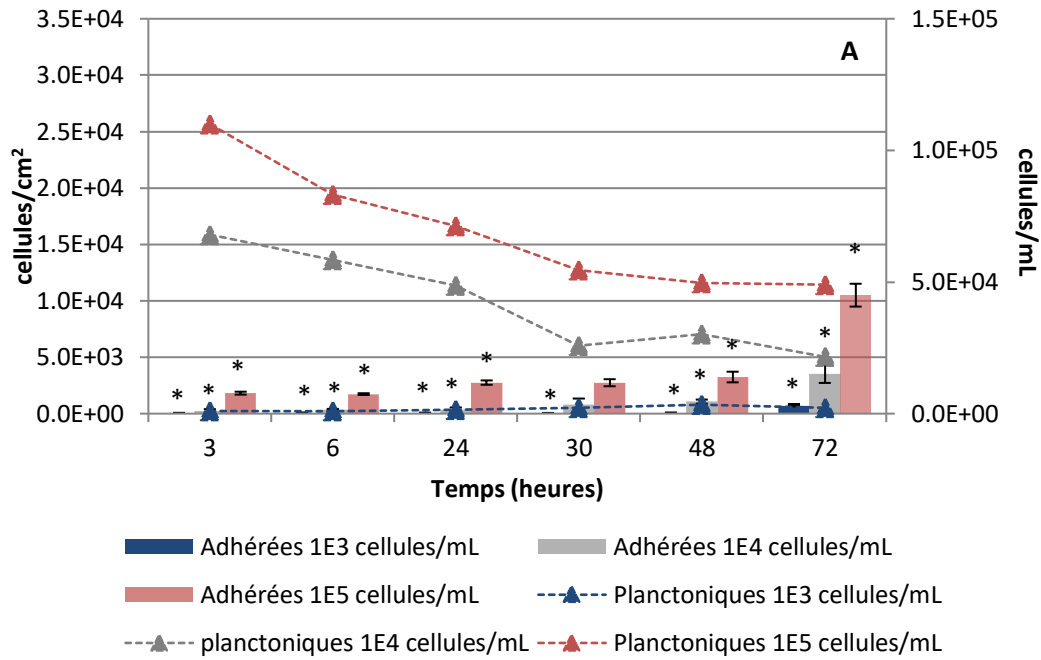


Figure III-12 : Cinétique d'adhésion de *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B) inoculées à trois densités cellulaires (pH 8, présence de nutriments, salinité 30 g/L), test ANOVA (* $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types, axe de gauche : microalgues adhérentes, axe de droite : microalgues planctoniques. Par soucis de représentation, l'écart-type des cellules planctoniques n'est pas représenté.

La Figure III-13 présente le rapport du nombre de cellules adhérentes sur le nombre de cellules planctoniques en fonction du temps. Le rapport entre les concentrations inoculées et les dénombrements sont cohérents. Ce rapport prouve qu'une inoculation de 10^3 cellules/mL est insuffisante. Une phase de latence est observée pendant 48 heures. Pour des inoculations de 10^4 ou 10^5 cellules/mL, le rapport augmente au cours du temps. Une concentration cellulaire de 10^5

cellules/mL sera sélectionnée par la suite afin de favoriser ultérieurement la phase de maturation du biofilm.

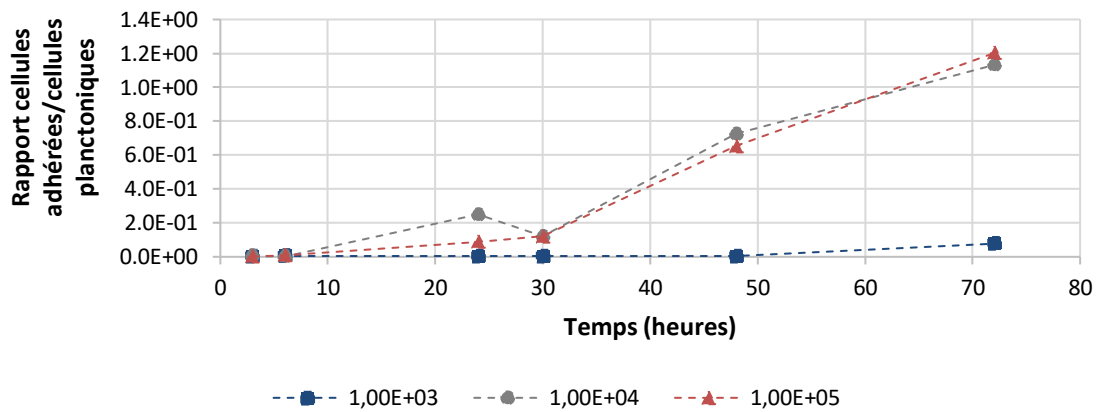


Figure III-13 : Rapport du nombre de cellules adhérees sur le nombre de cellules planctoniques au cours du temps pour les trois densités cellulaires testées (10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL) pour *C. closterium*

Comme pour *C. closterium*, le rapport du nombre de cellules adhérees sur le nombre de cellules planctoniques au cours du temps est déterminé pour *P. purpureum* (Figure III-14).

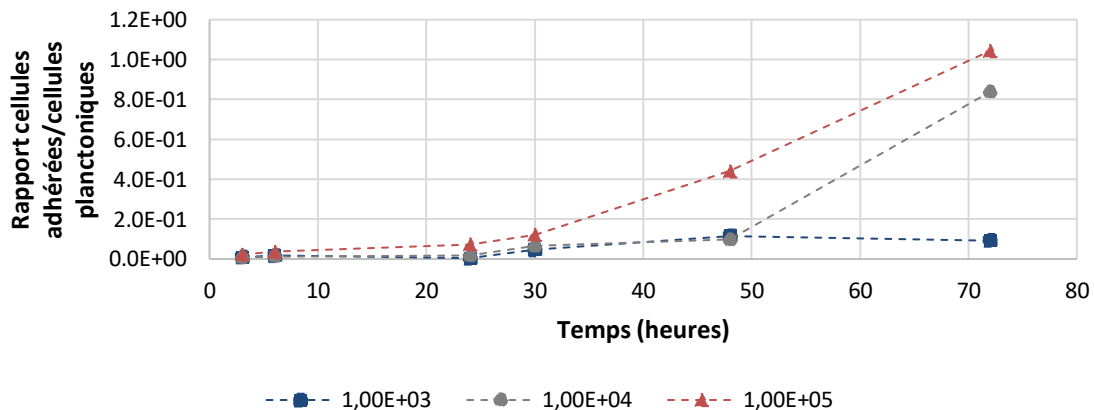


Figure III-14 : Rapport du nombre de cellules adhérees sur le nombre de cellules planctoniques au cours du temps pour les trois densités cellulaires testées (10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL) pour *P. purpureum*

Les rapports obtenus entre les cellules à l'état adhéree et planctonique au cours du temps montrent que dans le cas d'une inoculation de 10^3 cellules/mL, le rapport augmente peu. Pour une inoculation de 10^4 cellules/mL, le nombre de cellules adhérees augmentent significativement après 48 heures. Pour une densité de 10^5 cellules/mL, dès 24 heures, le rapport augmente au cours du temps validant la colonisation de la surface par la microalgue. En se plaçant à une densité plus élevée, la croissance de la microalgue est plus importante. En se référant à la cinétique de croissance, le taux de génération de la microalgue sera réduit à de fortes densités cellulaires : la microalgue sera en phase de croissance exponentielle. Au contraire, à une densité cellulaire de 10^3 cellules/mL, la microalgue *P. purpureum* se

trouve dans une phase de latence, la division cellulaire est ralentie et l'adhésion non favorisée. Nos résultats corroborent avec l'étude de Sekar *et al*, dans le cas de *Nitzschia amphibia*. Les auteurs ont travaillé à des concentrations cellulaires de 2.10^2 , 2.10^3 , 2.10^4 et $2,3.10^5$ cellules/mL. Ils montrent que l'augmentation de la densité cellulaire favorise l'adhésion des microalgues. La concentration cellulaire optimale dans ce cas était estimée à $2,3.10^5$ cellules/mL (Sekar *et al.*, 2004).

À partir de l'ensemble des résultats obtenus pour *C. closterium* et *P. purpureum*, il est possible de définir les paramètres les plus favorables à la croissance et à l'adhésion. Les paramètres sélectionnés sont identiques pour les deux espèces étudiées : un pH de 7,5, une salinité de 30 g/L, un milieu enrichi avec le supplément f/2 Guillard et une densité cellulaire de 10^5 cellules/mL. Ces paramètres seront maintenus lors de la mise au point du protocole de formation de biofilm en chambre à flux.

II – B – Adhésion et formation de biofilm en chambre à flux

Cette partie du chapitre III présente le développement d'un protocole en chambre à flux dans le but d'étudier l'adhésion et la formation de biofilms de microalgues en condition dynamique. Les microalgues étant fortement impliquées dans les premières étapes du biofouling, il est intéressant de pouvoir tester l'impact de molécules sur ce type de biofilm.

L'étude est réalisée pour deux souches : *C. closterium* et *P. purpureum*. Elle a pour objectif de : i) définir le temps d'adhésion, ii) définir le temps de maturation nécessaire à la formation d'un biofilm et iii) définir le débit de milieu permettant la formation du biofilm de microalgues.

II – B – 1 – Impact du temps sur l'adhésion des microalgues

La Figure III-15 présente les cinétiques d'adhésion pour les deux microalgues, au cours des 72 heures. Les résultats obtenus montrent que pour *C. closterium* et *P. purpureum*, le nombre de cellules adhérees augmentent au cours du temps. En 72 heures, le nombre de cellules adhérees de *C. closterium* croit d'un facteur 2,5 tandis que pour *P. purpureum*, une augmentation d'un facteur 3 est obtenu.

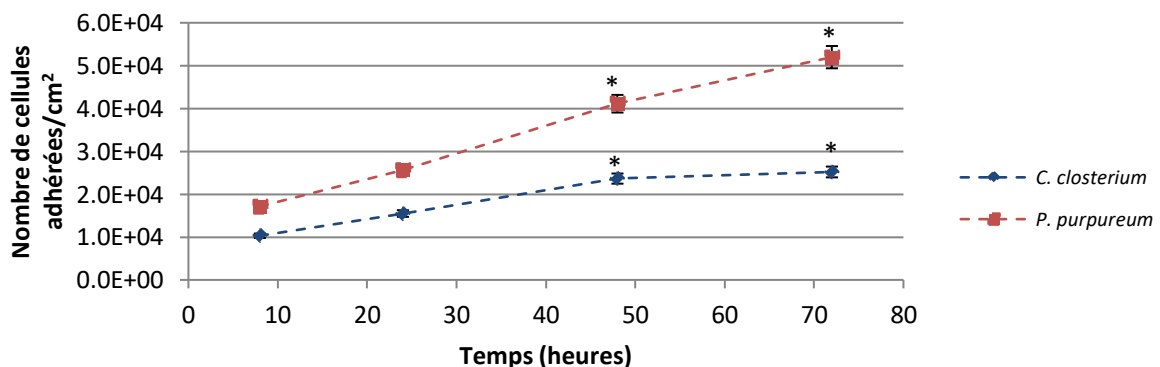


Figure III-15 : Cinétique d'adhésion pendant 72 heures pour *C. closterium* et *P. purpureum* pendant 72 heures, test ANOVA (*, $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types

Il est également observé que l'adhésion de la microalgue *P. purpureum* est plus importante que celle de la microalgue *C. closterium*. L'écart entre les deux microalgues est significatif (ANOVA, $p < 0,01$). Cette différence s'explique par l'écart de taille entre les deux microalgues. Sur le champ observable au MCBL ($0,18 \text{ mm}^2$), une quantité plus importante de microalgues de taille de $1 \mu\text{m}$ peuvent adhérer.

Afin de distinguer l'étape d'adhésion de celle de maturation, l'étape d'adhésion se déroulera pendant 24 heures. Au-delà de ce temps, les microalgues entre en phase de croissance.

II – B – 2 – Impact du débit de milieu pendant la maturation du biofilm

Après avoir déterminé les paramètres optimum d'adhésion (24 heures d'adhésion à $20 \text{ }^\circ\text{C}$ sous exposition à la lumière (12 H : 12 H)), l'étape de maturation de biofilm est étudiée. Le flux du milieu de croissance et le temps de maturation nécessaire pour former un biofilm sont déterminés.

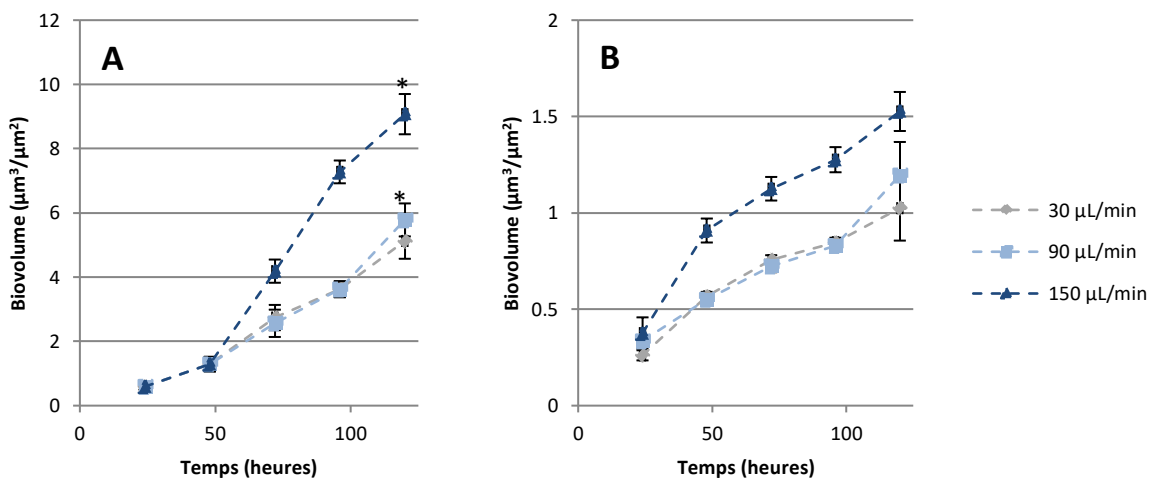


Figure III-16 : Cinétique de formation de biofilm pour *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B) à trois débits (30, 90 et 150 $\mu\text{L}/\text{min}$), test ANOVA (* $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types

La Figure III-16 présente les cinétiques de formation de biofilm à partir des valeurs de biovolumes calculés par le programme COMSTAT. Pour *C. closterium*, le biofilm le plus dense est obtenu à un débit de $150 \mu\text{L}/\text{min}$: après 120 heures, le biofilm formé est de $9,1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. Aux débits de 30 et $90 \mu\text{L}/\text{min}$, les biovolumes à 120 heures sont semblables avec des valeurs proches de $5,5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. L'écart obtenu à 120 heures est significativement différent entre le débit à $150 \mu\text{L}/\text{min}$ et les débits de 30 et $90 \mu\text{L}/\text{min}$ (ANOVA, $P < 0,01$). Les observations en MCBL des biofilms formés pendant les 120 heures au débit de $150 \mu\text{L}/\text{min}$ sont présentées sur la Figure III-17. Aucune structure particulière n'a été mise en évidence. Dans les premiers temps, les microalgues se fixent dans le sens du flux puis ensuite adhèrent les unes aux autres pour former des colonies (Figure III-17.A), puis le biofilm croît (Figure III-17.B, C et D). La plus forte augmentation de densité cellulaire est observée entre 48 et 72 heures avec une augmentation du biovolume de 70 %. Entre 72 et 96 heures, le biovolume est augmenté de 40 %. Enfin,

la dernière étape permet d'accroître le biovolume de 20 %, entre 96 heures et 120 heures. Entre chacun de ces temps, la maturation du biofilm est significativement différente (ANOVA, $p < 0,01$). La diminution de la cinétique de croissance du biofilm montre la fin du processus de maturation dans les conditions de l'expérience.

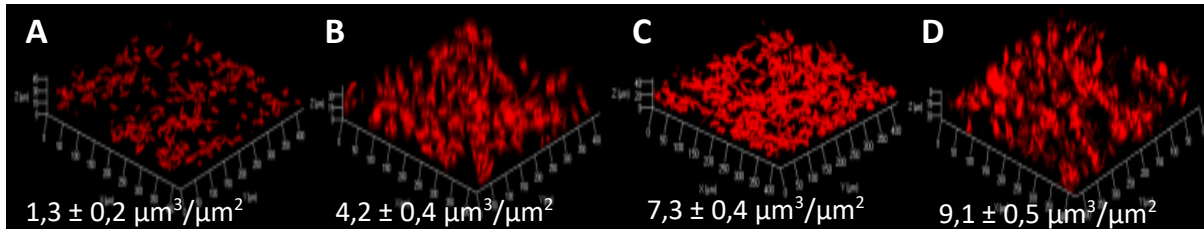


Figure III-17 : Observation en microscopie confocale à balayage laser de la formation de biofilm pour *C. closterium* pendant 120 heures à un débit de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ (A : 48 h, B : 72 h, C : 96 h, D : 120 h)

Pour *P. purpureum* (Figure III-16.B), un débit de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ induit également la formation d'un biofilm de plus forte densité cellulaire. A 120 heures, le biovolume est de 1,5 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ tandis qu'aux débits de 30 et 90 $\mu\text{L}/\text{min}$, les biovolumes à 120 heures sont compris entre 1 et 1,2 $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. En comparant les débits, à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, la densité cellulaire au bout de 120 heures est augmentée d'un peu moins de 30 %. Cependant, les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative à 120 heures entre les trois débits évalués (ANOVA, $p > 0.05$).

Les observations en MCBL présentées sur la Figure III-18, montre que le biofilm de *P. purpureum* obtenu est presque 7 fois moins dense que le biofilm de *C. closterium*. En raison de sa taille, la microalgue *P. purpureum* colonise la surface sur une faible épaisseur plutôt que de former une structure tridimensionnelle. Toutes les 24 heures, une augmentation du biovolume de 12 à 17 % est observée. Cette maturation n'est pas significative entre chacun des temps d'observation (ANOVA, $p > 0,05$).

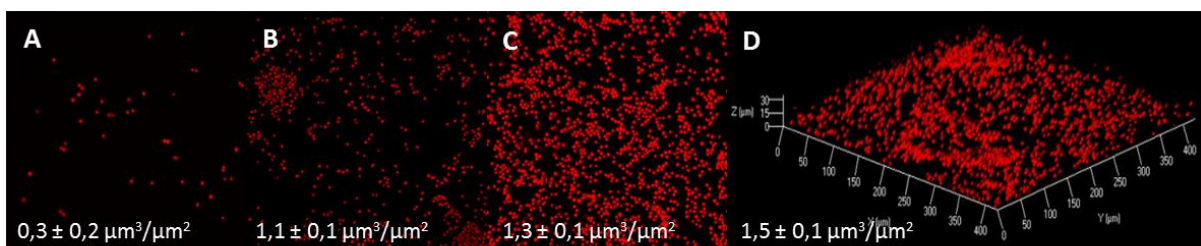


Figure III-18 : Observation en microscopie confocale à balayage laser de la formation de biofilm pour *P. purpureum* pendant 120 heures à un débit de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ (A : 48 h, B : 72 h, C : 96 h, D : 120 h)

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible de former un biofilm de microalgues en condition dynamique. Cependant, la structure du biofilm formé dépend de la taille et de la morphologie de la microalgue ensemencée. Le Tableau III-7 présente les épaisseurs moyennes des biofilms formés par *C.*

Closterium et *P. purpureum* au cours du temps. À 120 heures, le biofilm de *P. purpureum* est 4 fois plus fin que *C. closterium*.

Tableau III-7 : Épaisseurs moyennes des biofilms formés par *C. closterium* et *P. purpureum* à 48, 72, 96 et 120 heures en conditions dynamique (flux de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$), les \pm représentent les écarts-types

Temps (heures)	Épaisseur moyenne (μm)	
	<i>Cylindrotheca closterium</i>	<i>Porphyridium purpureum</i>
48	8,4 \pm 0,8	1,5 \pm 0,6
72	16,8 \pm 1,4	3,2 \pm 0,8
96	34,6 \pm 2,1	6,6 \pm 1,1
120	38,4 \pm 2,3	10,2 \pm 1,4

Très peu d'études ont développé la formation de biofilm de microalgues dans ces conditions. Les travaux de Harder *et al.*, se sont intéressés à l'impact d'un biofilm de diatomées sur l'adhésion de larves de polychètes. Toutefois, dans cette étude, les biofilms de diatomées sont réalisés en condition statique par formation d'un film au fond de flasques de culture cellulaire (Harder *et al.*, 2002).

Plus récemment, l'étude d'Irving et Allen a montré le développement d'un biofilm de microalgues en chambre à flux. Les espèces choisies étaient *Scenedesmus obliquus* et *Chlorella vulgaris*. La chambre à flux employée est plus grande (480 μL) que celle testée dans cette étude (250 μL). Le système est également stérilisé par un flux de javel pendant 30 minutes, puis les cellules sont injectées à 10^7 cellules/mL. Le biofilm est observé en microscopie confocale à balayage laser afin de traiter les biofilms formés (épaisseurs uniquement). Le pourcentage de cellules adhérentes et à l'état planctonique est déterminé en fonction de la nature de la surface (verre, polyéthylène, polyuréthane, polyméthacrylate de méthyle ou polytetrafluoroéthylène) a été déterminé. Les biofilms sont suivis pendant 7 jours. Les résultats n'ont pas montré d'écart significatif entre les surfaces. L'épaisseur moyenne des biofilms formés était de 25 μm (Irving & Allen., 2011).

II – C – Étude des forces d'attachement de deux microalgues en fonction du débit de milieu lors d'une adhésion sur du verre

Après avoir mis en évidence les paramètres favorisant l'adhésion des microalgues, les forces d'attachement de *C. closterium* et *P. purpureum* sont étudiées. Les forces d'attachement sont liées à la nature de la surface d'adhésion et dépendantes de la capacité d'adhésion de la microalgue. Elles sont mesurées en quantifiant le détachement en fonction du paramètre testé (flux de milieu, temps d'adhésion).

II – C – 1 – Impact du débit de milieu sur le détachement des microalgues

Dans cette étude, les microalgues sont injectées dans des chambres à flux à la concentration cellulaire de 10^5 cellules/mL. Après 24 heures d'adhésion sur une surface en verre, les cellules adhérentes sont dénombrées. Le flux de milieu nutritif est ensuite activé à plusieurs débits induisant différentes contraintes au sein de la chambre à flux. Le dénombrement après 30 minutes de flux permet de déterminer le pourcentage de cellules détachées.

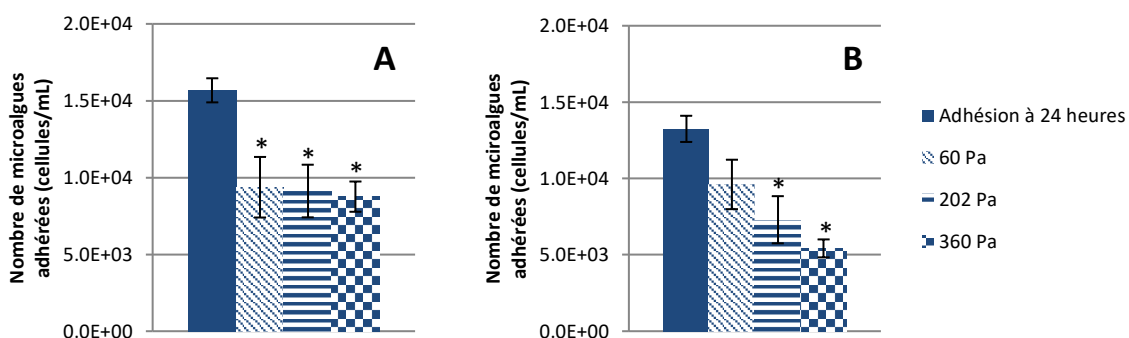


Figure III-19 : Dénombrement cellulaire dans la chambre à flux après 24 heures d'adhésion pour *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B), test ANOVA * $p < 0,01$, les barres représentent les écarts-types

La Figure III-19 présente le nombre de cellules adhérentes de *C. closterium* et *P. purpureum* à 24 heures puis après 30 minutes de flux à trois débits (150, 270 et 330 $\mu\text{L}/\text{min}$) induisant trois contraintes : 60, 202 et 360 Pa. À partir des dénombrements obtenus, les pourcentages de détachement sont calculés (Tableau III-8).

Tableau III-8 : Pourcentage de détachement obtenu en faisant varier la contrainte de cisaillement au sein de la chambre à flux

Contrainte de cisaillement (Pa)	Pourcentage de détachement (%)	
	<i>C. closterium</i>	<i>P. purpureum</i>
60	39	26
202	42	49
360	44	57

Les deux microalgues ne sont pas impactées de la même manière. Pour les deux microalgues, la contrainte de cisaillement induit un détachement significativement différent de l'adhésion à 24 heures (ANOVA, $p < 0,01$). Entre les trois contraintes testées, pour *C. closterium*, environ 40 % des cellules se détachent (pourcentages non significativement différents). Au contraire, pour *P. purpureum*, le détachement dépend de la contrainte exercée : plus la force exercée est importante plus le pourcentage de détachement augmente (ANOVA, $p < 0,01$).

Ces deux microalgues n'adhèrent probablement pas de la même façon en raison de leurs différences morphologiques : les forces d'attachement mises en jeu n'étant pas les mêmes. *C. closterium* semble

avoir des points d'ancrage sur l'ensemble du contour de la cellule renforçant son adhésion vis-à-vis de la surface. Ces points d'accroche sont visibles en microscopie électronique à balayage (Figure III-20). Ces observations n'ont pu être réalisées pour *P. purpureum* probablement en raison de la petite taille de cette microalgue (50 fois plus petite que *C. closterium*). Nous pouvons supposer que cette microalgue adhère par la production d'adhésifs et semble être plus sensible aux contraintes de cisaillement.

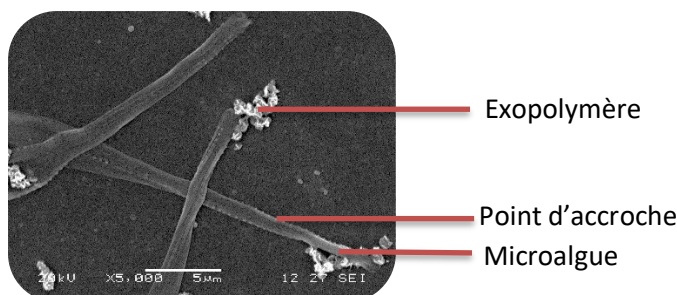


Figure III-20 : Observation en microscopie électronique à balayage des structures d'accroche chez *C. closterium*

En 2000, Schultz *et al* ont étudié les forces d'adhésion de microorganismes comme la diatomée *H. coffeaeformis*. Ils ont mis en évidence que la relation entre le temps d'adhésion et la force exercée suivait une sigmoïde. Dans les premières heures d'activation du flux (28,2 Pa), la diatomée ne se détache pas puis, progressivement, le pourcentage de détachement augmente jusqu'à devenir stable au bout de 10 heures. La résistance aux forces de détachement dépend des propriétés physiologiques de la diatomée. La production ou non d'EPS permet notamment de renforcer son adhésion (Schultz *et al.*, 2000). En comparant nos résultats avec cette étude, il est constaté qu'en augmentant le temps d'adhésion (24 heures dans notre cas par rapport aux 2 heures dans l'article), la contrainte à exercer pour détacher 50 % des microalgues adhérentes est 10 à 13 fois plus élevée.

II – C – 2 – Impact du temps d'adhésion sur le détachement des microalgues

La Figure III-21 présente les courbes de détachement des microalgues *C. closterium* et *P. purpureum* après des temps d'adhésion variables. Le taux de détachement est déterminé après l'activation du flux (330 µL/min).

Pour les deux microalgues, lorsque le temps d'adhésion est prolongé, le pourcentage de détachement est réduit. Pour *P. purpureum*, le pourcentage de détachement diminue de 56,7 % à 24 heures à 44,2 % à 72 heures. La réduction est plus importante pour *C. closterium* de 43,9 % (24 heures) à 24,1 % (72 heures). Pour les deux microalgues, l'écart entre 24 et 72 heures est significativement différent (ANOVA, $p < 0,01$). Ces résultats montrent que les deux microalgues augmentent leurs forces d'adhésion au cours du temps.

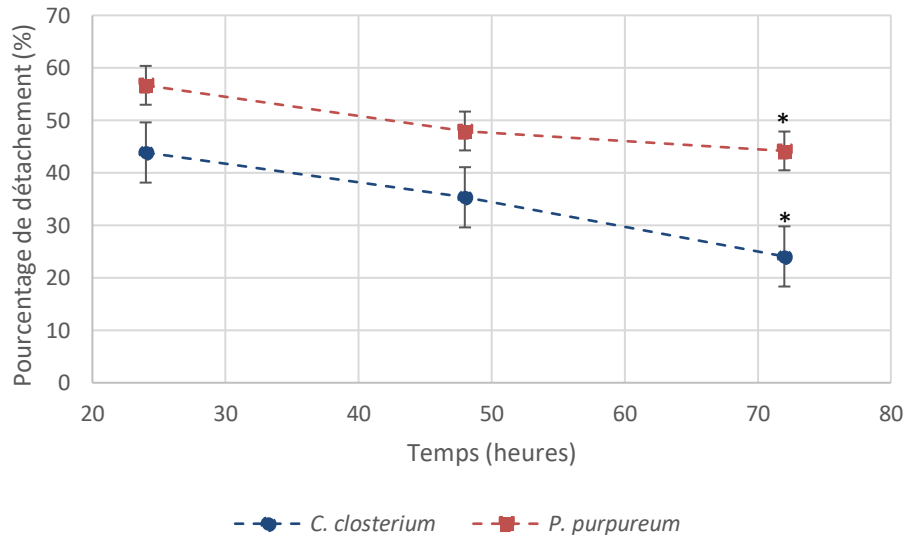


Figure III-21 : Courbes de détachement pour *C. closterium* et *P. purpureum* pendant 72 heures, test ANOVA (* $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types

Durant l'étape d'adhésion, la microalgue développe des mécanismes variés renforçant son adhésion. Les polymères sont excrétés au niveau du raphé par les diatomées ou par des pores de la paroi cellulaire. Ces polymères s'assemblent pour former des structures variées impliquées dans la mobilité comme les « trails » qui correspondent au matériel déposé sur la surface afin de permettre le déplacement des cellules (Harper & Harper., 1967). Cette structure est présentée sur la Figure III-22.

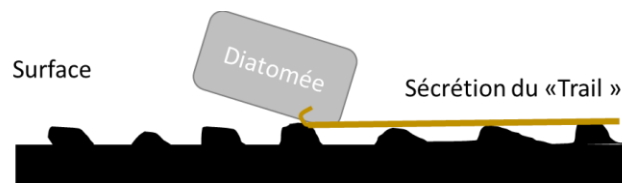


Figure III-22 : Schématisation du « Trail » formé par la sécrétion de polymère au niveau des pores de la diatomée

D'autres structures ont un rôle de protection comme les capsules ou le « sheath » (matrice associée étroitement à la membrane). Il existe également des structures dédiées à l'adhésion comme les « stalk » composés de trois parties : le « pad » (zone en contact avec la surface), le « collar » (base issue des pores de la cellule) et le « shaft » (polymère liant le pad au collar) (Hoagland *et al.*, 1993). Cette structure est schématisée sur la Figure III-23.

La prolongation de l'étape d'adhésion permet à la diatomée de développer ses structures d'attachement à la surface et ainsi résister aux contraintes du milieu.

De plus, la morphologie des diatomées est aussi importante dans la capacité à adhérer, à résister aux contraintes et à former des colonies. Plus la cellule est grande, plus les points d'accroche sont nombreux et mieux répartis (Huisman *et al.*, 2002).

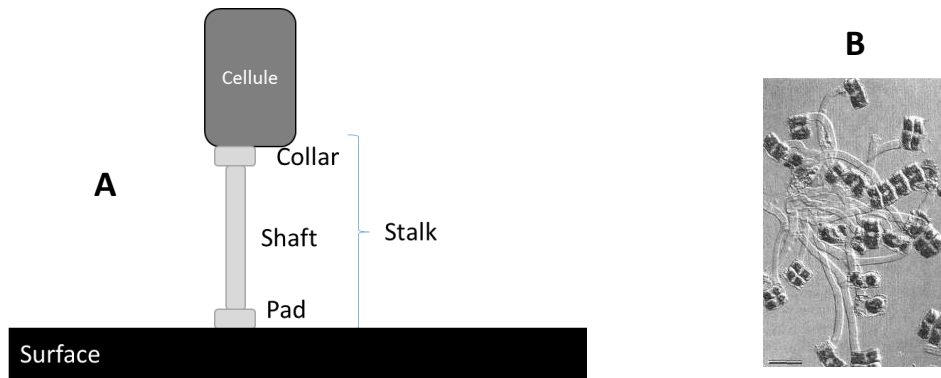


Figure III-23 : Schématisation de la structure d'adhésion identifiée chez les diatomées : le stalk (A), observation de la structure pour la diatomée *Achnantes longipes* (B) (Wustman et al., 1997)

Une étude sur la capacité d'adhésion de la diatomée *Halamphora* sp. a été réalisée par Finlay et al. À des contraintes de cisaillement faibles (2 à 10 Pa), les cellules se détachent plus facilement des surfaces hydrophiles en comparaison aux surfaces hydrophobes. La nature de la surface intervient également dans ces processus d'attachement (Finlay et al., 2002).

La littérature s'est intéressée uniquement aux procédés d'adhésion chez les diatomées. La deuxième microalgue étudiée, *P. purpureum* n'appartient pas au groupe des diatomées. Chez cette microalgue, les procédés d'adhésion sont probablement différents de ceux décrits chez les diatomées.

L'attachement des microalgues aux surfaces est contrôlée par de nombreux paramètres. Les procédés mis en place par la microalgue sont variés comme la production de polymères et/ou la mise en place de structures d'accroche. Ces mécanismes dépendent de la nature de la microalgue, de la surface et des conditions environnementales (temps, milieu...). Dans cette étude, la diatomée *C. closterium* adhère de façon plus résistante aux flux du milieu lorsque le temps d'adhésion est prolongé. Les observations en MEB ont montré l'apparition de points d'accroche au niveau des zones d'adhésion avec la surface. Pour *P. purpureum*, sa petite taille n'a pas permis de mettre en évidence des structures d'adhésion. Cette microalgue n'appartient pas au groupe des diatomées, il n'est donc pas certain que ces structures existent chez cette espèce.

II – D – Impact du DBHB sur la formation de biofilm de *Cylindrotheca closterium* et *Porphyridium purpureum*

La mise en place d'un protocole d'étude de l'adhésion et de la formation de biofilms de microalgues en condition dynamique permet l'évaluation de composés antimicroalgaux. Dans le chapitre II, le composé DBHB a montré des propriétés antibiofilm et anti quorum sensing intéressantes. Ainsi après avoir déterminé les propriétés biologiques de ce composé envers des bactéries, son activité envers des microalgues est étudiée.

II – D – 1 – Étude de l'activité du DBHB sur l'adhésion et la formation de biofilm de *Cylindrotheca closterium*

Tout d'abord l'activité de la molécule DBHB est évaluée sur *C. closterium*. Les impacts sur l'adhésion et la maturation du biofilm de cette diatomée sont présentés dans des parties séparées.

Impact du DBHB sur l'adhésion de *C. closterium*

La Figure III-24 présente la cinétique d'adhésion de *C. closterium* en absence et en présence de DBHB (10 et 50 µg/mL) pendant 24 heures. Une même tendance pour les trois conditions est observée. Cependant, plus la quantité en DBHB est élevée (50 µg/mL), moins les cellules adhèrent à la surface. Par exemple, à 24 heures d'adhésion, une concentration de 10 µg/mL de DBHB entraîne une diminution de 14 % du nombre de microalgues adhérentes. Pour une concentration de 50 µg/mL, le nombre de cellules adhérentes diminue de 40 %. L'écart entre la condition témoin et l'ajout de DBHB à 50 µg/mL à 24 heures est significativement différent (ANOVA, $p < 0,01$).

Le DBHB semble inhiber ou ralentir l'adhésion de la microalgue. Dans la partie II-B, le criblage avait montré que la concentration minimale inhibitrice de la croissance et de l'adhésion de *C. closterium* par le DBHB était de 50 µg/mL.

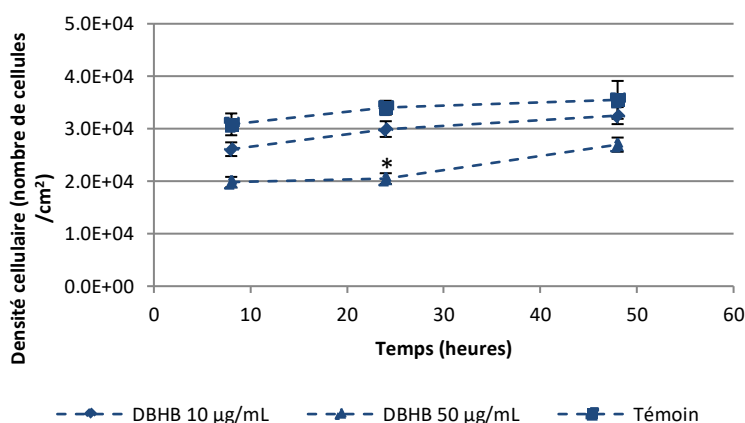


Figure III-24 : Cinétique d'adhésion *C. closterium* pendant 24 heures pour la condition témoin et lors de l'ajout de DBHB à 10 et 50 µg/mL lors de l'injection des microalgues dans la chambre à flux, test ANOVA (* $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types

Contrairement aux résultats obtenus en condition statique (en microplaque), la condition en dynamique (en chambre à flux) ne permet pas une inhibition totale de l'adhésion de la diatomée à 50 µg/mL. Les paramètres et résultats des deux méthodes sont présentés sur le Tableau III-9. En fonction de la méthode utilisée, la sensibilité de la microalgue vis-à-vis d'un composé varie. L'adhésion des organismes peut être impactée par plusieurs facteurs (nature de la surface d'adhésion, méthode de nettoyage). L'interprétation des résultats obtenus pour des substances AF nécessite donc bien connaître les conditions opératoires du test utilisé.

Tableau III-9 : Comparaison de l'adhésion de *C. closterium* en présence de 50 µg/mL de DBHB à l'aide de deux méthodes (microplaque et chambre à flux)

	Microplaque	Chambre à flux
Temps d'adhésion	5 jours	24 heures
Concentration cellulaire inoculée	10 ³ cellules/mL	10 ⁵ cellules/mL
Surface d'adhésion	Polystyrène	Verre
Pourcentage d'inhibition de l'adhésion	100 %	40 %

Impact du DBHB sur la formation de biofilm de *C. closterium*

Après avoir montré une légère inhibition de l'adhésion par le composé DBHB sur la diatomée *C. closterium*, l'impact sur la formation du biofilm est étudié (Figure III-25).

Les résultats obtenus montrent qu'après avoir activé le flux (150 µL/min) contenant le milieu supplémenté en nutriments et en DBHB (10 ou 50 µg/mL), les microalgues perdent leur viabilité. Cette mortalité est observée par un quenching de la fluorescence. Ces observations sont confirmées pour des concentrations plus faibles en DBHB (1 et 5 µg/mL). Pour une concentration en DBHB de 1 µg/mL, une légère fluorescence est visible pour certaines microalgues (Figure III-25.A). Ces observations montrent que le DBHB possède des propriétés toxiques envers *C. closterium* dans ces conditions.

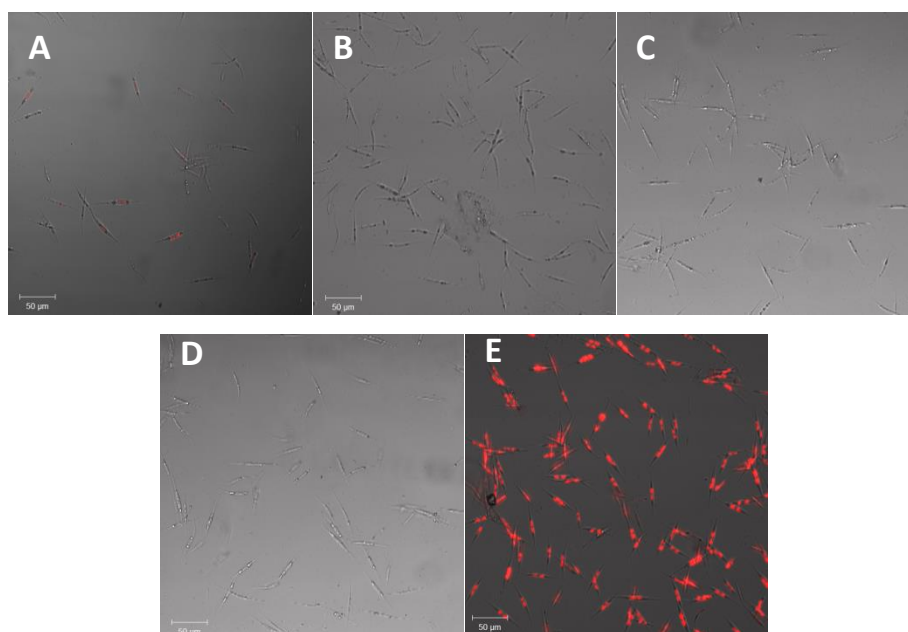


Figure III-25 : Observations en microscopie confocale à balayage laser de la formation de biofilm de *C. closterium* après 24 heures d'activation du flux de milieu à 150 µL/min (A : DBHB 1 µg/mL, B : 5 µg/mL, C : 10 µg/mL, D : 50 µg/mL, E : témoin)

Le DBHB ralentit donc l'adhésion de *C. closterium* à forte concentration (50 µg/mL), cependant l'activation d'un flux (150 µL/min) contenant 1 à 50 µg/mL de DBHB entraîne la mort des cellules adhérentes. Il est possible que l'augmentation de la durée d'exposition au DBHB induise cette mortalité.

Le criblage avait montré un effet algicide du DBHB à 50 µg/mL. Les résultats obtenus montrent ici une plus grande sensibilité de la microalgue en condition dynamique.

Afin de valider un effet toxique de la molécule sur *C. closterium*, des erlenmeyers de 100 mL d'eau de mer artificielle avec les nutriments nécessaires à la croissance des microalgues sont inoculés à une concentration cellulaire de 10^5 cellules/mL. Le DBHB est ajouté à 1, 10 ou 50 µg/mL. Pendant 15 jours, des dénombrements quotidiens sont réalisés par mesure de la fluorescence émise. La cinétique obtenue est présentée sur la Figure III-26.

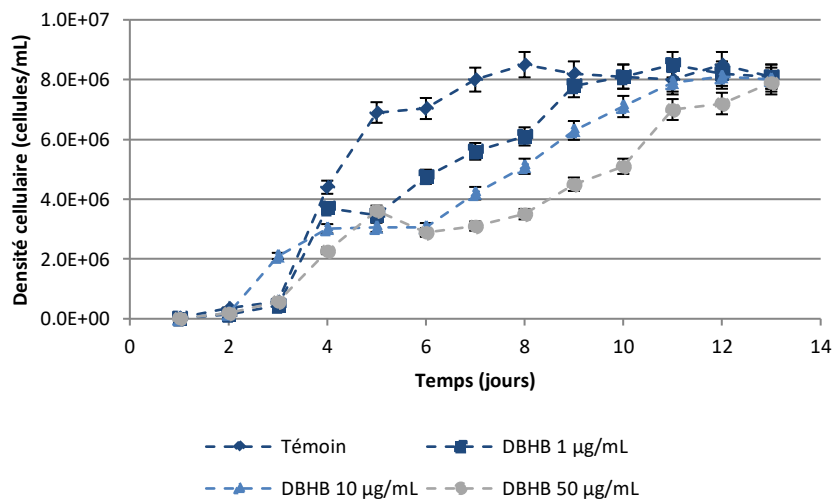


Figure III-26 : Cinétique de *C. closterium* dans un erlenmeyer de 100 mL avec ajout du DBHB à 1, 10 et 50 µg/mL, les barres représentent les écarts-types

Les courbes de croissance de *C. closterium* réalisées en présence de DBHB de 1 à 50 µg/mL indique un retard de croissance lors de l'augmentation de la concentration en DBHB. Pour les quatre concentrations, le début de la phase exponentielle est observée à partir du deuxième jour. Cependant, pour les cinétiques réalisées en présence de 10 et 50 µg/mL de DBHB, un déclin est observé à partir du quatrième jour, suivi d'une nouvelle phase de croissance.

Dans ces conditions, le DBHB n'empêche pas la division cellulaire mais la ralentit. Les microalgues adhèrent au fond du contenant et s'agglomèrent les unes aux autres par la production d'EPS. Ce comportement renforce leur résistance. Ce phénomène n'est pas observé en chambre à flux. En effet, les canaux ne contiennent qu'environ 250 µL et les cellules sont en contact direct avec la molécule. Le flux emporte les EPS non liés aux cellules ou à la surface. La formation de colonies et la production des EPS est alors une réelle protection pour *C. closterium* envers l'activité de composés antifouling.

Dans la littérature, le mode d'action supposé du DBHB repose sur une interaction avec les niveaux calciques intracellulaires (Ortlepp *et al.*, 2007). Il a déjà été publié que les ions Ca^{2+} étaient

probablement impliqués dans la mobilité, l'adhésion et la croissance des diatomées de la classe des Bacillariophyceae dont *C. closterium*. Le système faisant intervenir les filaments d'actine et de myosine nécessite la présence de Ca^{2+} . Chez divers organismes, le calcium, présent sous forme ionique (Ca^{2+}) est un messager intracellulaire. Il est décrit chez les diatomées comme impliqué dans la réponse au stress (Vardi *et al.*, 2006), dans le déplacement des chloroplastes (Makita & Shihira-Ishikawa., 1997) et dans les mécanismes de mobilité (Cohn & Disparti., 1994).

L'étude de McLachlan *et al.*, s'est intéressée au rôle de la libération de calcium chez la diatomée *Navicula perminuta*, appartenant à la classe des Bacillariophyceae. Les travaux ont permis de visualiser par marquages fluorescents (Calcium crimson) la répartition du Ca^{2+} dans la cellule. Le calcium a ainsi été majoritairement retrouvé au centre de la cellule. Dans ces travaux, les chercheurs ont ajouté un bloqueur des canaux calciques montrant ainsi l'inhibition de la mobilité de la diatomée (McLachlan *et al.*, 2012).

D'autre part, les résultats présentés par Geesey *et al.*, ont montré qu'à de faible teneur en Ca^{2+} , le métabolisme des diatomées est ralenti, inhibant alors leur croissance. Ces faibles concentrations en calcium favorisent l'état planctonique puisque les diatomées ne peuvent se déplacer et activer leurs systèmes d'adhésion (Geesey *et al.*, 2000). Si le composé DBHB est capable d'interagir sur les échanges de Ca^{2+} , cela permettrait d'expliquer les inhibitions de croissance obtenues pour la diatomée *C. closterium*.

II – D – 2 – Étude de l'activité du DBHB sur l'adhésion et la formation de biofilm de Porphyridium purpureum

L'impact du composé DBHB est également étudié sur la microalgue *P. purpureum*. De même que pour la diatomée *C. closterium*, l'effet de la molécule est étudié à la fois sur l'étape d'adhésion et sur la formation du biofilm.

Impact du DBHB sur l'adhésion de *P. purpureum*

En premier lieu, l'impact du DBHB est observé sur l'adhésion de *P. purpureum*. La cinétique d'adhésion obtenue est présentée sur la Figure III-27.

Les trois cinétiques étant identiques, la présence de DBHB dans la suspension bactérienne ne modifie par l'adhésion de la microalgue. De plus, une augmentation du nombre de cellules adhérentes est observée au cours du temps quelle que soit la concentration testée.

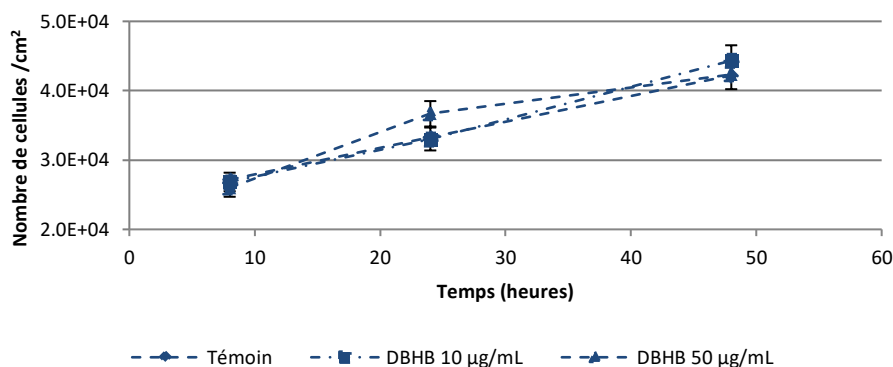


Figure III-27 : Cinétique d'adhésion de *P. purpureum* pendant 24 heures pour la condition témoin et lors de l'ajout de DBHB à 10 et 50 µg/mL lors de l'injection des microalgues dans la chambre à flux, les barres représentent les écarts-types

Après avoir confirmé l'absence d'activité de la molécule DBHB sur l'adhésion de *P. purpureum*, l'activité sur la formation du biofilm est étudiée.

Impact du DBHB sur la formation de biofilm de *P. purpureum*

Pour observer un effet de la molécule sur la formation de biofilm de *P. purpureum*, le DBHB est ajouté à 10 et 50 µg/mL dans le flux de milieu contenant également les nutriments. Le débit est réglé à 150 µL/min. Après 120 heures de suivi, les cinétiques de formation de biofilm sont présentées sur la Figure III-28.

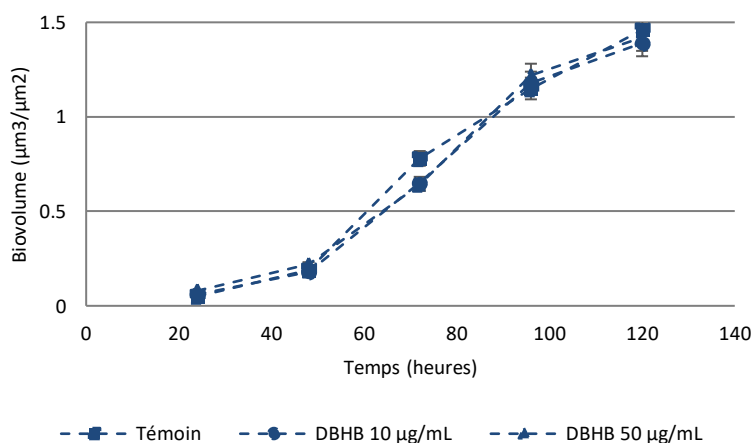


Figure III-28 : Cinétique de formation de biofilm pour *P. purpureum* pendant 120 heures pour la condition témoin et lors de l'ajout de DBHB à 10 et 50 µg/mL dans le flux de milieu nutritif, les barres représentent les écarts-types

Tout comme pour l'étape d'adhésion, l'ajout de DBHB à 10 et 50 µg/mL ne perturbe pas la formation de biofilm pour *P. purpureum*. Lors du test de criblage des composés de la famille des hemibastadines, le DBHB n'avait montré aucune inhibition de la croissance ou de l'adhésion de *P. purpureum* jusqu'à 50 µg/mL. L'absence d'inhibition obtenue en condition dynamique est cohérente avec les résultats précédemment obtenus dans des conditions statiques (microplaque).

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie montre que l'activité de la molécule DBHB est dépendante de la souche microalgale. Dans cette étude, *C. closterium* s'est avérée plus sensible au composé DBHB par comparaison à *P. purpureum*.

Il peut être supposé que cette microalgue est plus sensible à la présence de groupements bromés. Les travaux d'Ortlepp *et al.*, ont permis d'évaluer l'activité de dérivés polybromés d'éthers diphenyl sur la croissance et l'adhésion de microorganismes : bactéries et diatomées. Pour les tests sur la croissance et l'adhésion de diatomées, les expériences ont été menées contre la souche *H. coffeaeformis*. Les composés bromés présentaient des CMI et des EC₅₀ plus basses. Les diatomées semblent être sensibles aux composés bromés (Ortlepp *et al.*, 2008).

II – D – 3 – Impact du DBHB sur le détachement des microalgues

L'impact de la molécule DBHB (10 µg/mL) est étudié sur les forces d'attachement mises en place par *C. closterium* et *P. purpureum* (Figure III-29).

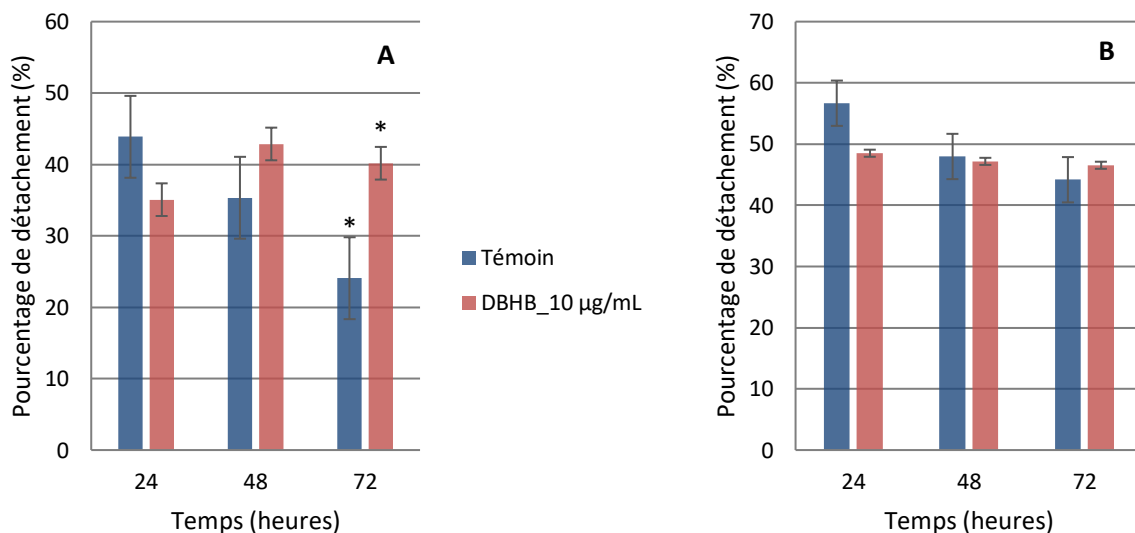


Figure III-29 : Suivi de détachement de *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B) en absence et en présence de DBHB à 10 µg/mL, ANOVA (* $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types

Pour *C. closterium*, l'ajout de DBHB à la suspension de microalgues injectée dans la chambre à flux augmente le pourcentage de détachement. Après 72 heures d'adhésion, l'activation du flux induit un détachement 1,7 fois plus important en présence de DBHB. Ce résultat est significativement différent de la condition témoin (ANOVA, $p < 0,01$). Pour *P. purpureum*, la présence de DBHB n'impacte pas le détachement à 72 heures.

Le DBHB semble réduire les forces d'attachement mises en place uniquement par *C. closterium*. Ces forces sont observées par mesure du détachement. Plus les forces d'attachement de la microalgue sont faibles, plus le pourcentage de détachement est élevé. À partir de ces résultats, il est possible

d'émettre les hypothèses suivantes : le DBHB peut i) perturber la production des EPS ou ii) modifier les mécanismes d'adhésion mis en place par ces espèces microalgales.

III – Étude des propriétés physico-chimiques des surfaces

Afin de mieux comprendre les capacités d'adhésion des microalgues, l'impact des propriétés de surface (rugosité et hydrophobie) est étudié. Des surfaces possédant des hydrophobies ou hydrophilies extrêmes se sont avérées inhospitalières pour certains microorganismes. Sur les surfaces hydrophobes, la mouillabilité est extrêmement faible.

Ce mouillage peut se mesurer par l'angle de contact obtenu entre une surface et une goutte de liquide, par exemple l'eau. Dans le cas des surfaces superhydrophobes, l'angle de contact avec l'eau est supérieur à 150° et seulement 2 à 5 % de la surface de la goutte d'eau est en contact avec le substrat.



Figure III-30 : Principe de la mesure d'angle de contact, A = forme d'une goutte sur une surface superhydrophobe ($> 150^\circ$), B = forme d'une goutte sur une surface hydrophobe ($> 90^\circ$) et C = forme d'une goutte sur une surface hydrophile ($< 90^\circ$)

Cet effet de superhydrophobie est causé par une rugosité nanométrique. Cet effet a été découvert pour la première fois en 1970 sur les feuilles de lotus (*Tropaeolum* sp.). Cependant, d'autres plantes comme les feuilles de chou, de taro ou de roseau possèdent également ces caractéristiques. La faible tension superficielle de ces surfaces fait que les gouttes d'eau prennent une forme sphérique et ruissellent sur la surface plutôt que de s'étaler. Ces surfaces possèdent des propriétés autonettoyantes intéressantes. Une illustration est présentée sur la Figure III-31 (Marmur., 2004 ; Koch *et al.*, 2009).

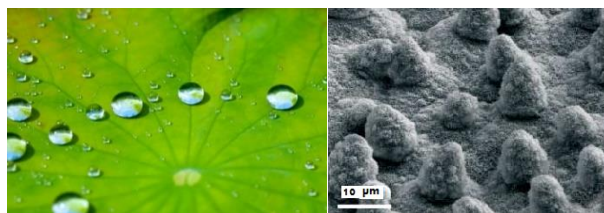


Figure III-31 : Image d'une feuille de lotus (A) et observation de la surface en microscopie électronique à balayage (B) (Yu *et al.*, 2007)

La peau du requin constitue également un exemple de ce type de surface. Chez cet organisme, la rugosité de la peau due à ses denticules, couplée à sa rapidité de déplacement et à la sécrétion d'un mucus inhibe l'installation d'organismes marins à sa surface. La Figure III-32 présente une observation microscopique de la peau de requin.

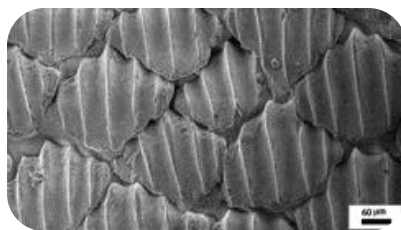


Figure III-32 : Observation en microscopie électronique à balayage de la peau du requin (Liu & Li., 2012)

Dans une étude de Liu et Li, les chercheurs se sont inspirés de cette surface naturelle afin de développer une surface mimant la morphologie de la peau du requin (Liu & Li., 2012). Une surface PDMS (polydiméthylsiloxane) micro et nano structurée a été proposée. Elle se révèle superhydrophobe (angle de contact $> 90^\circ$). La superhydrophobie provoque la formation d'une couche d'air, cette couche inhibe l'adhésion des organismes marins (Ferrari & Benedetti., 2015). Cet effet de superhydrophobie a déjà des applications dans les peintures de façade à base de silicone (Lotusan®), des tissus avec les mentions « self cleaning inspired by nature », des tuiles ou encore des laques pour voitures. A l'inverse, un exemple de surface superhydrophile concerne les PDSM greffés PEG (Poly(éthylène glycol)). L'association de ces polymères conduit à la formation d'une surface amphiphile de par la présence de domaines hydrophobes et hydrophiles. Dans l'étude de Hawkins *et al.*, l'utilisation de ces revêtements en laboratoire et dans le milieu marin (Océan atlantique) a montré une inhibition de l'adhésion de bactéries et de diatomées (Hawkins *et al.*, 2014). La mouillabilité des surfaces est donc un moyen intéressant de lutte contre l'adhésion des organismes marins.

Dans cette troisième partie, des études préliminaires s'intéressent à l'impact de la rugosité de surface sur l'adhésion de la diatomée *C. closterium*. Puis, des surfaces en polycarbonate sont fonctionnalisées par des traitements plasma afin d'étudier l'effet de la rugosité et de l'hydrophobie sur l'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum*.

III – A – Impact de la rugosité de surface

Dans le but d'observer l'effet de la rugosité de surface sur l'adhésion de *C. closterium*, deux types de surfaces sont étudiées, d'une part les surfaces dites lisses dont la rugosité est inférieure à $10\ \mu\text{m}$: le verre ($0,36\ \mu\text{m}$) et un polycarbonate ($5,34\ \mu\text{m}$). Les surfaces dites rugueuses ont des rugosités supérieures à $10\ \mu\text{m}$: l'acier inoxydable ($10,39\ \mu\text{m}$) et un autre polycarbonate ($22,5\ \mu\text{m}$). L'étude des propriétés de surfaces sur l'adhésion des microalgues est peu décrite dans la littérature, nous avons jugé intéressant de développer cet effet. Cette étude préliminaire est réalisée en condition statique par immersion des surfaces dans une boîte de Pétri contenant la suspension de microalgues. L'adhésion est observée en MEB. Sur les Figure III-33 et Figure III-34, les observations montrent une forte densité de cellules adhérentes (9.10^3 cellules/cm²) sur des surfaces dont la rugosité est inférieure à $10\ \mu\text{m}$. Une forte production d'exopolymères est également visible sur les contours des cellules et

sur la surface. De plus les images en MEB permettent, dans le plus fort grossissement (x 10 000), d'observer les points d'accroche de *C. closterium* vis-à-vis de la surface. Ces points d'accroche sont répartis de façon homogène sur le contour de la diatomée.

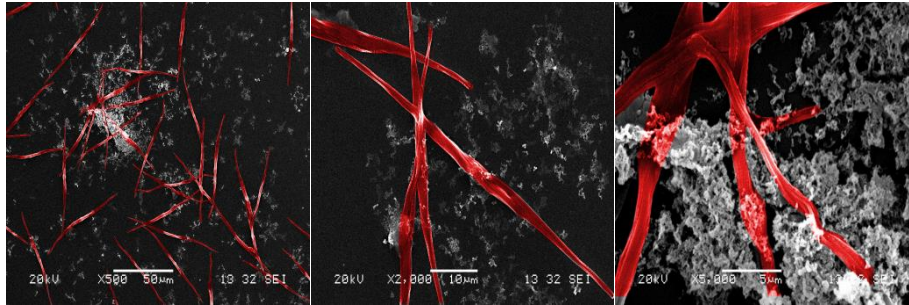


Figure III-33 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de *C. closterium* sur une surface lisse (< 10 μm) : le verre, les cellules de *C. closterium* ont été colorées en rouge informatiquement

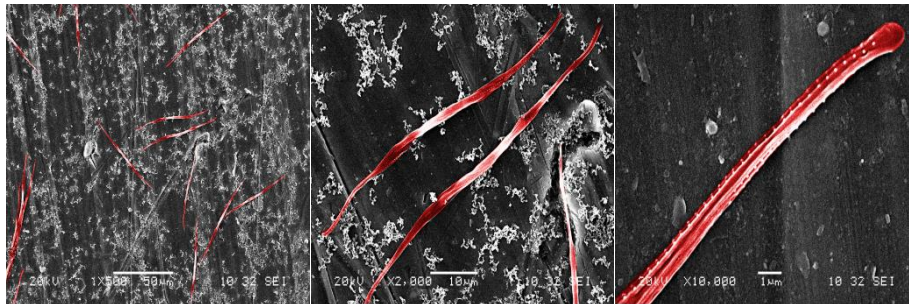


Figure III-34 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de *C. closterium* sur une surface lisse (< 10 μm) : le polycarbonate, les cellules de *C. closterium* ont été colorées en rouge informatiquement

Des observations en MEB sur d'autres cellules microalgales (*Craspedostauros australis* et *Pinnularia viridis*) ont permis d'illustrer les raphés et la production des adhésifs (Higgins *et al.*, 2003). Néanmoins, aucune étude ne présente ce genre de points d'accroche visibles chez *C. closterium*. La régularité de ces points est spécifique aux diatomées qui possèdent souvent des structures très symétriques (Mann., 1983).

La cinétique d'adhésion de la diatomée sur les deux surfaces testées pendant 48 heures est présentée sur la Figure III-35.

L'adhésion a une tendance linéaire en particulier sur la surface en verre. L'adhésion de *C. closterium* n'est significativement pas différente entre ces deux surfaces (ANOVA $p > 0,05$).

L'adhésion sur les surfaces dites rugueuses (> 10 μm) est comparée aux surfaces lisses (< 10 μm).

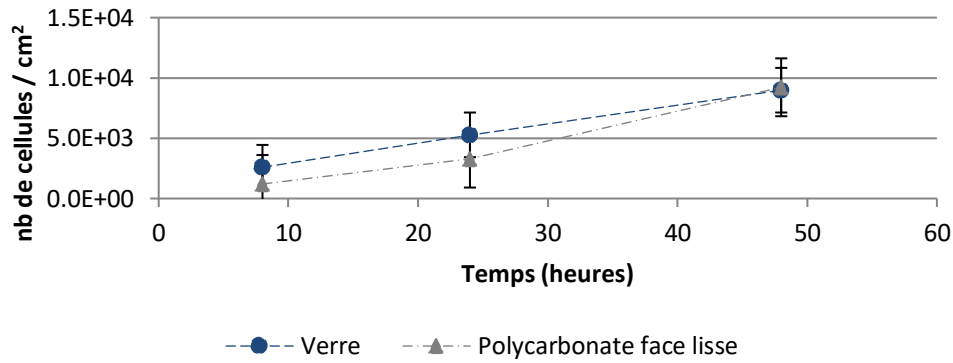


Figure III-35 : Cinétique d'adhésion de *C. closterium* sur les surfaces lisses (< 10 µm : verre et polycarbonate) à 8, 24 et 48 heures, les barres représentent les écarts-types

Les Figure III-36 et Figure III-37 montrent les observations en MEB de *C. closterium* adhérente à des surfaces rugueuses. Ces deux surfaces possèdent des topographies différentes avec la présence de stries régulières pour l'acier inoxydable et de rugosités hétérogènes pour le polycarbonate.

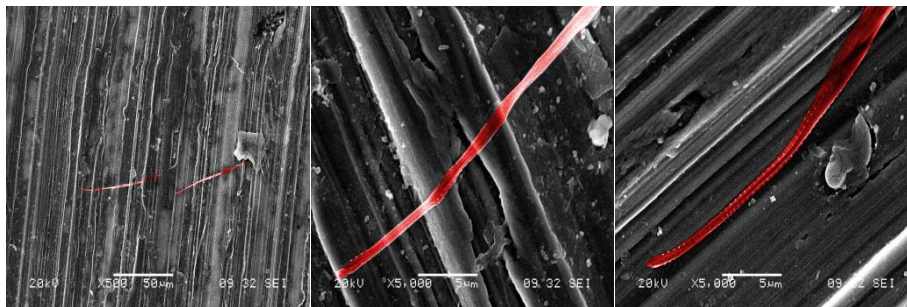


Figure III-36 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de *C. closterium* sur une surface rugueuse (> 10 µm) : l'acier inoxydable, les cellules de *C. closterium* ont été colorées en rouge informatiquement

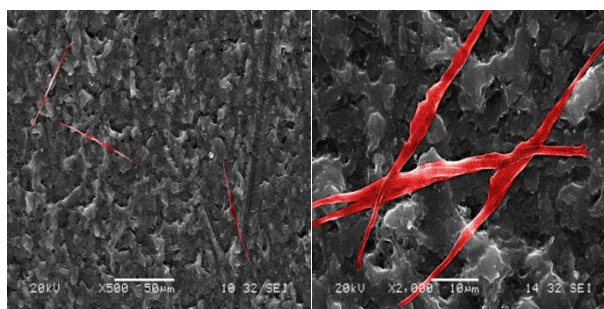


Figure III-37 : Observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésion de *C. closterium* sur une surface rugueuse (> 10 µm) : le polycarbonate, les cellules de *C. closterium* ont été colorées en rouge informatiquement

La rugosité diminue significativement l'adhésion des cellules de *C. closterium* à 48 heures d'un facteur 2 (ANOVA, $p < 0,01$). Dans le cas des surfaces lisses, 9.10^3 cellules/cm² étaient dénombrées à 48 heures tandis que sur les surfaces rugueuses environ 4.10^3 cellules/cm² sont quantifiées. De plus, la production d'exopolymères est restreinte.

Sur la surface en polycarbonate, très peu de cellules sont visibles. Les cellules adhérentes à ces surfaces se sont adaptées aux rugosités de la surface. Par exemple, dans le cas de l'acier inoxydable, la diatomée est adhérente soit dans le même sens que les stries ou de façon perpendiculaire. Dans le cas des cellules adhérentes perpendiculairement, les points d'accroche sont observés uniquement pour les zones en contact direct avec la surface, validant l'interaction entre la microalgue et la surface par ces structures. Sur les surfaces rugueuses, le nombre de points d'accroche étant plus faible, il est probable que la microalgue soit moins fortement adhérente et soit alors plus sensible aux forces de détachement.

Sur la Figure III-38, la cinétique d'adhésion aux surfaces rugueuses est comparée à la cinétique d'adhésion de *C. closterium* sur le verre. À 48 heures, il y a deux fois moins de cellules adhérentes sur les surfaces dont la rugosité est supérieure à 10 µm. Cette différence à 48 heures entre les surfaces lisses et rugueuses est significative (ANOVA, $p < 0,01$). Cette étude préliminaire a montré un impact de la rugosité de surface sur l'adhésion de *C. closterium*. Pour des rugosités d'environ 10 µm, l'adhésion est inhibée de 50 %. Pour des rugosités supérieures à 20 µm, l'adhésion est inhibée de 70 %.

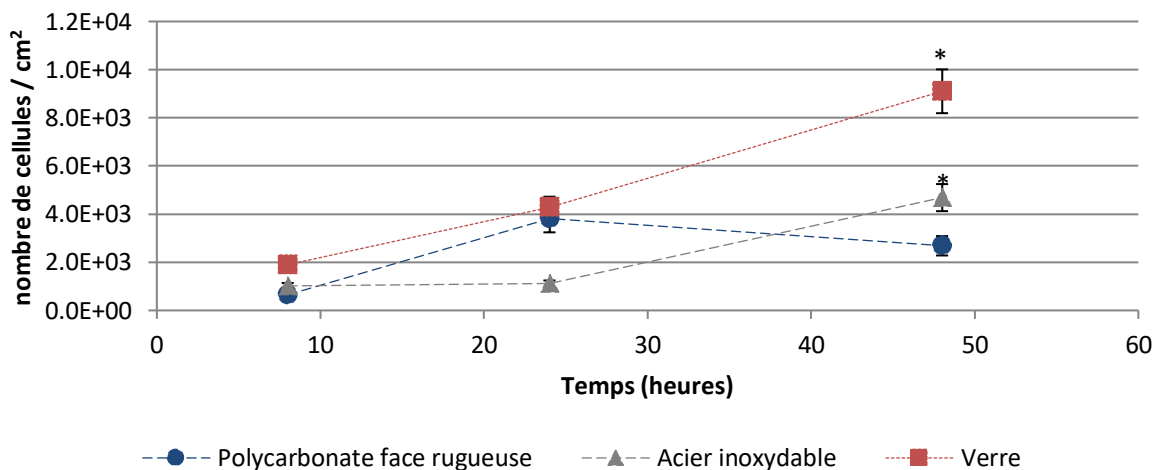


Figure III-38 : Cinétique d'adhésion de *C. closterium* sur les surfaces rugueuses (> 10 µm, acier inoxydable et polycarbonate) comparée au verre dont la rugosité est inférieure à 10 µm, les observations sont réalisées à 8, 24 et 48 heures, test ANOVA (*, $p < 0,01$), les barres représentent les écarts-types

Les rugosités perturbent l'adhésion de *C. closterium*. Certaines cellules ont pu s'adapter à la surface en s'étirant. Néanmoins, les forces d'adhésion sont probablement moins fortes que sur une surface lisse.

La Figure III-39 schématise l'adhésion d'une cellule sur des surfaces dont la rugosité varie. L'impact de la rugosité de surface sur l'adhésion est dépendant de la taille de la microalgue. En diminuant la zone de contact entre la microalgue et la surface, la force d'attachement mise en place par la cellule est réduite.

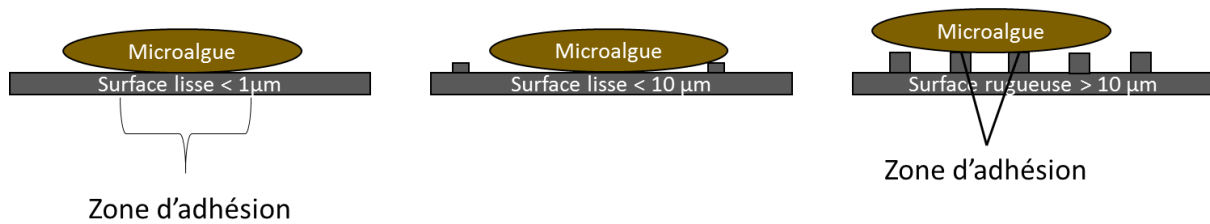


Figure III-39 : Schématisation de l'adhésion d'une cellule sur des surfaces dont les rugosités varient

Les travaux de Scardino *et al.*, ont développé l'impact de surfaces possédant des rugosités de 2 à 4 µm sur l'adhésion de quatre diatomées : *Fallacia carpentariae*, *Nitzschia paleacea*, *Amphora sp.* et *Navicula jeffreyi*. Les quatre souches étaient capables d'adhérer sur les surfaces évaluées. Cependant, le nombre de cellules étaient plus important sur les surfaces moins rugueuses où la zone d'adhésion était plus importante. Pour la plus petite des diatomées testées, *F. carpentariae*, aucune différence n'a été observée (Scardino *et al.*, 2006). Afin d'impacter l'adhésion, la rugosité de surface doit permettre de réduire le nombre et la taille des points de contact entre la cellule et la surface. Dans les travaux de Scardino *et al.*, les rugosités avaient un ordre de grandeur proche de la taille des diatomées (2 – 4 µm). Dans notre étude, une rugosité supérieure à 10 µm est nécessaire pour inhiber l'adhésion. Cette rugosité représente 1/6 de la taille de *C. closterium* (65 µm).

Pour inhiber les forces d'attachement liées à la zone d'adhésion, les rugosités doivent avoir une taille de l'ordre du rayon ou d'un demi-rayon de la cellule (Scardino *et al.*, 2006). Néanmoins, la biodiversité marine fait qu'il existe des microalgues possédant des tailles variables : de l'ordre du micromètre jusqu'à la centaine de micromètre. Il est donc difficile de développer des surfaces limitant l'adhésion de différentes classes de microalgues.

Dans l'étude de Sekar *et al.*, l'impact de l'hydrophobie de cinq surfaces a été étudié : le perspex (plaque d'acrylique), le verre, le cuivre, le titane et l'acier inoxydable. Trois diatomées ont été choisies pour ce test : *Chlorella vulgaris*, *Chroococcus minutus* et *Nitzschia amphibia*. Les cellules adhérentes étaient majoritaires sur les surfaces hydrophobes. L'hydrophobie de surface en plus de la rugosité semble avoir un réel impact sur l'adhésion des microalgues (Sekar *et al.*, 2004).

III – B – Impact de l'hydrophobie de la surface

Après avoir étudié l'effet de la rugosité de surface sur l'adhésion des microalgues, l'impact de l'hydrophobie de la surface est évalué en condition dynamique (chambre à flux).

Dans ce cadre, des surfaces de polycarbonate sont fonctionnalisées par un flux de plasma. Quatre flux sont étudiés : argon, argon-dioxygène, argon-diazote et argon-tétrafluore de carbone. Ces flux permettent de modifier la rugosité et l'hydrophobie des surfaces qui ont été caractérisées par analyses

physico-chimiques et chimique. L'impact de ces surfaces est étudié sur l'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum* dont les tailles sont différentes.

Validation de la méthode de nettoyage

Avant de réaliser l'étape d'adhésion, trois méthodes de nettoyage sont étudiées : javel, éthanol ou RBS®. La solution de nettoyage utilisée peut induire des modifications sur la surface en polycarbonate fonctionnalisée. Afin d'observer si la méthode de nettoyage modifie les paramètres physico-chimiques de la surface, des mesures de mouillabilité sont réalisées. Les angles de contact mesurés sur les surfaces nettoyées sont présentés dans le Tableau III-10.

Tableau III-10 : Mesure d'angles de contact sur les surfaces témoin nettoyées par l'éthanol, la javel ou le RBS

Méthode de nettoyage	Éthanol 95 %	Javel 1,5 %	RBS® 2 %
Moyenne des angles de contact (°)	89,3 ± 3	87,7 ± 2	86,5 ± 3

Les valeurs d'angle de contact ne montrent pas de différences significatives (ANOVA, $p > 0,05$) entre les trois méthodes de nettoyage testées. Les surfaces témoin étudiées sont globalement hydrophobes puisque l'angle de contact est proche de 90°.

Pour l'expérience, la stérilisation des surfaces sera donc effectuée par un flux de javel à 1,5 % pendant une heure suivi d'un rinçage à l'ASW stérile pendant deux heures. Une fois le système stérile, les microalgues sont injectées.

Propriétés physico-chimiques de la surface

Les résultats obtenus par le laboratoire IMMM pour les analyses de mouillabilité des surfaces (Tableau III-11) montrent que le film non traité est hydrophobe (angle de contact de 91°).

Tableau III-11 : Angles de contact et énergies de surface des films : témoin, traitements Ar, Ar/O₂, Ar/N₂ et Ar/CF₄

	Angle de contact (°)		Énergie de surface (mJ/m ²)		
	Eau	Diiodométhane	γ^{total}	γ^{D}	γ^{ND}
Témoin	91 ± 1	30 ± 1	45 ± 1	45 ± 1	0,4 ± 1
Ar	18 ± 2	47 ± 2	70 ± 1	25 ± 1	44 ± 1
Ar/O ₂	12 ± 2	41 ± 2	72 ± 1	28 ± 1	44 ± 1
Ar/N ₂	< 5 ± 2	36 ± 2	74 ± 2	31 ± 1	43 ± 1
Ar/CF ₄	22 ± 2	44 ± 2	68 ± 1	27 ± 1	41 ± 1

Le traitement par un flux de plasma argon rend plus polaire la surface, la composante polaire (γ^{ND}) est multipliée par un facteur de 10. Néanmoins, les modifications induites par un second gaz de

fonctionnalisation ne sont pas significativement différentes à la fonctionnalisation avec l'argon à l'égard des écart-types.

Cependant, la fonctionnalisation des surfaces par les gaz Ar, Ar/O₂, Ar/N₂ et Ar/CF₄ induit une diminution des angles de contact avec l'eau sur la surface, significativement différente du témoin (ANOVA, $p < 0,01$).

L'analyse chimique des surfaces par XPS a montré une majorité de carbone (82 %) et d'oxygène (16 %) pour le film témoin. Les proportions sont présentées sur le Tableau III-12.

Tableau III-12 : Composition élémentaire des surfaces de polycarbonate traitées, cette composition en pourcentage est déterminée par XPS

	C (%)	O (%)	N (%)	F (%)
Témoin	82 ± 4	16 ± 1	0	0
Ar	71 ± 4	24 ± 1	2 ± 1	0,5
Ar/O₂	77 ± 4	21 ± 1	1 ± 0,5	0
Ar/N₂	72 ± 4	23 ± 1	2 ± 0,1	0
Ar/CF₄	75 ± 4	20 ± 1	2 ± 1	3 ± 1

Le traitement Ar, induit d'une part une augmentation de l'oxygène (24 %) et l'apparition d'azote (2 %), rendant polaire la surface. L'azote provient sûrement d'une post-oxydation du substrat lors du traitement au plasma. L'apport d'un second gaz de fonctionnalisation (O₂, N₂ ou CF₄ à 12 %) modifie peu les propriétés de surface par rapport à la fonctionnalisation par l'argon seul. L'apport de dioxygène ou de diazote ne modifie pas significativement la composition élémentaire. Le tétrafluorure de carbone permet la formation significative de liaison carbone-fluor (3 %).

D'autre part, sur l'ensemble des spectres, des impuretés (Si, Na, Ca) sont observées (< 2 %), celles-ci sont probablement dues à des pollutions issues du traitement plasma.

Enfin, une observation par microscopie à force atomique a permis la détermination de la rugosité. Le Tableau III-13 présente les rugosités moyennes (Ra) ainsi que les écarts les plus importants entre le point le plus haut et le point le plus bas (Rms).

Le traitement par le flux plasma argon seul ne modifie pas la rugosité de surface. Les traitements avec des plasmas Ar/O₂, Ar/N₂ et Ar/CF₄ augmentent légèrement la rugosité des surfaces. Néanmoins, les rugosités apportées restent à l'échelle nanométrique et n'impactera probablement pas l'adhésion cellulaire des microalgues testées (5 et 65 µm).

Tableau III-13 : Mesure des rugosités de la surface en fonction du traitement plasma réalisé avec les gaz Ar, Ar/O₂, Ar/N₂ et Ar/CF₄ pour une proportion de 88/12 (Ra : moyenne, Rms : écart le plus important entre le point le plus bas et le point le plus haut)

	Témoin	Ar	Ar/O ₂	Ar/N ₂	Ar/CF ₄
Ra (nm)	0,8	0,8	3,7	2,0	1,2
Rms (nm)	3,1	2,7	5,3	7,2	2,6

En bilan, les traitements par un flux de plasma fonctionnalisant induisent des modifications de la mouillabilité de surface. L'impact de l'hydrophobie de surface sera étudié. Le témoin est hydrophobe, les surfaces Ar, Ar/O₂, et Ar/CF₄ sont hydrophiles et la surface Ar/N₂ est superhydrophile. L'étude chimique a montré une fonctionnalisation des surfaces, une augmentation des proportions en oxygène, azote et fluor sont visibles en fonction du gaz utilisé. Cependant, les pourcentages en azote et fluor à la surface restent faibles (inférieur à 3 %). La rugosité des surfaces est quant à elle négligeable au vu de la taille des microalgues étudiées (inférieure à 5 nm).

Évaluation de l'impact des surfaces sur l'adhésion des microalgues *C. closterium* et *P. purpureum*

La Figure III-40 présente les dénombrements cellulaires à 24 heures sur les différentes surfaces pour l'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum*.

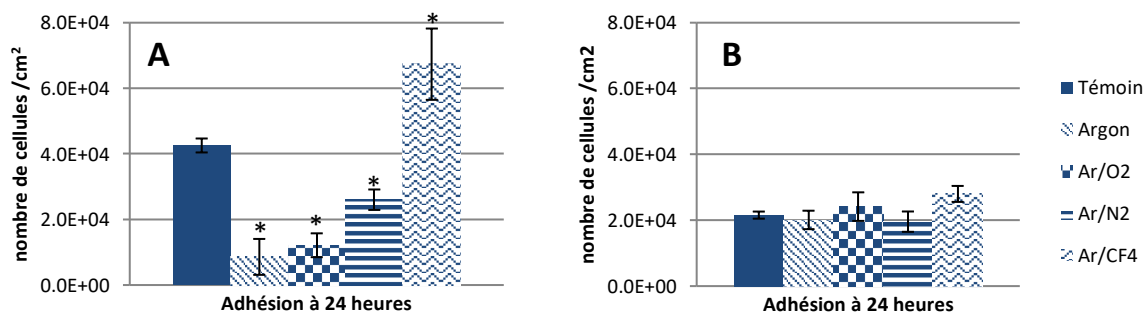


Figure III-40 : Dénombrement de l'adhésion à 24 heures de *C. closterium* (A) et *P. purpureum* (B) sur les surfaces traitées en réacteur à plasma, test ANOVA (* p < 0,01), les barres représentent les écarts-types

Pour *C. closterium*, des différences significatives sont observables entre l'adhésion sur la surface témoin et sur les surfaces fonctionnalisées (ANOVA, p < 0,01). La plus forte adhésion est observée sur la surface fonctionnalisée par un flux Ar/CF₄ où plus de 60 000 cellules sont adhérentes par cm². Sur les surfaces fonctionnalisées par des flux plasma Ar, Ar/O₂ et Ar/N₂, moins de 30 000 cellules adhérentes par cm² sont observées.

La rugosité n'est pas à l'origine de l'inhibition de l'adhésion puisqu'elle est inférieure à 5 nm. Dans la partie III-B, les résultats ont montré que la rugosité devait être supérieure à 10 µm pour induire une inhibition significative de l'adhésion de *C. closterium*.

La fonctionnalisation des surfaces par les différents gaz étudiés provoque une modification de l'hydrophobie de surface, induisant une augmentation ou une diminution du nombre de cellules adhérentes. Sur les surfaces hydrophiles (Ar, Ar/O₂ et Ar/N₂), pour lesquelles l'angle de contact est inférieur à 18°, l'adhésion est inhibée avec un nombre de cellules adhérentes compris entre 1.10⁴ et 2.10⁴ cellules/cm². Sur la surface hydrophobe (témoin, 90°), l'adhésion est plus importante avec 4.10⁴ cellules/cm². L'adhésion semble favorisée sur les surfaces hydrophobes. Cependant pour la surface fonctionnalisée par un flux de plasma Ar/CF₄, plus de 6.10⁴ cellules/cm² sont dénombrées or cette surface est hydrophile (angle de contact de 22°) avec 3 % de fluor en surface. L'ajout de groupement fluor favorise l'adhésion de *C. closterium* d'un facteur 3 à 6 par rapport à l'ajout de groupement oxygène ou azote. Il est surprenant pour cette surface fonctionnalisée par du fluor, d'obtenir un caractère hydrophile (Woo *et al.*, 2005). Il est probable que i) la quantité de tétrafluorure de carbone (12 %) est trop faible pour obtenir une surface apolaire, ii) la fonctionnalisation du polycarbonate par Ar/CF₄ n'est pas stable, iii) le fluor n'est pas réparti de façon homogène sur la surface ou iv) la production des EPS permet à *C. closterium* d'adhérer à des surfaces de nature physico-chimique différente.

Cette étude montre que le caractère hydrophile/hydrophobe intervient dans l'adhésion de *C. closterium*. Néanmoins, des manipulations complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'ensemble des résultats.

Pour *P. purpureum*, la fonctionnalisation des surfaces ne modifie pas l'adhésion en comparaison à la surface témoin (ANOVA, p > 0,05). Pour l'ensemble des paramètres testés, il y a environ 20 000 cellules adhérentes par cm². L'hydrophobie de surface n'impacte pas l'adhésion de *P. purpureum*. Sa petite taille, ses propriétés de surfaces ou sa production d'EPS lui permet peut-être de s'adapter à des surfaces d'hydrophobies différentes.

Les données d'adhésion sont comparées aux résultats obtenus lors de l'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum* sur une surface de verre.

Tableau III-14 : Comparaison de l'adhésion de *C. closterium* et *P. purpureum* entre une surface hydrophile connue (verre) et une surface fonctionnalisée (Ar/O₂)

	Angle de contact	<i>C. closterium</i>	<i>P. purpureum</i>
Verre	15 °	2,5.10 ⁴ cellules/mL	1,5.10 ⁴ cellules/mL
Ar/O ₂	18 °	1,8.10 ⁴ cellules/mL	2,0.10 ⁴ cellules/mL

Pour ces deux microalgues, le nombre de cellules adhérentes sur le verre est proche de l'adhésion dénombrée sur les surfaces fonctionnalisées hydrophiles comme Ar/O₂ (écart non significatif, ANOVA). Ces résultats permettent de valider la méthode sur des surfaces différentes.

Cette étude a montré un effet de l'hydrophobie de surface sur l'adhésion de *C. closterium* et non sur l'adhésion de *P. purpureum*. Dans la suite, il serait intéressant d'augmenter la proportion de chaque gaz (N₂, O₂ ou CF₄) dans le but d'accentuer la fonctionnalisation des surfaces. Les différences au niveau de la physico-chimie de la surface devrait être accentuées. Le temps d'exposition des surfaces au flux de plasma pourrait aussi être augmenté.

Dans la littérature, plusieurs études s'accordent à conclure que l'adhésion de microalgues est favorisée sur des surfaces hydrophobes. Une étude de Holland *et al.*, a présenté l'adhésion de trois diatomées (*Halamphora coffeaeformis*, *Craspedostauraos australis* et *Navicula perminuta*) sur des surfaces de type silicone et a démontré que les microalgues présenteraient une plus forte adhésion sur les surfaces hydrophobes de type PDMS plutôt que sur les surfaces hydrophiles comme le verre (Holland *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré des adhésions favorisées sur des surfaces hydrophobes pour les diatomées : *Navicula jeffreyi* (Klein *et al.*, 2014), *Nitzschia closterium* (Li *et al.*, 2010) ou encore *Halamphora* sp. (Finlay *et al.*, 2002). Chez cette dernière, l'adhésion inhibe le déplacement cellulaire. Chez les diatomées, les systèmes de mobilité et d'adhésion sont fortement liés. Dans le cas d'une adhésion sur des surfaces hydrophobes, la cellule oriente la production d'EPS en faveur de l'adhésion mais freine son système de mobilité impliquant l'actine et la myosine. La production d'EPS est probablement liée à la nature chimique de la surface. Pour adhérer sur des surfaces hydrophobes, les EPS sécrétés sont de nature hydrophobe essentiellement (Finlay *et al.*, 2002).

Modifier les paramètres physico-chimiques des surfaces pourrait donc être une alternative intéressante dans le but d'une application AF. La difficulté repose sur l'échelle de rugosité choisie, son impact est dépendant de la taille de la microalgue. L'hydrophobie de surface, notamment de nature hydrophile semblent inhiber l'adhésion des diatomées. Des tests supplémentaires sur diverses espèces devraient être menés afin de valider l'effet de ce paramètre sur des microalgues appartenant à des classes différentes.

Conclusion

Ce troisième chapitre s'est focalisé sur l'impact de molécules AF envers les microalgues. Quatre espèces sont caractérisées dans le but d'évaluer les composés de la famille des hemibastadines. La caractérisation des microalgues a également permis d'étudier l'influence de paramètres environnementaux sur leur adhésion. Dans le but de favoriser l'adhésion, les paramètres sélectionnés sont un pH de 7,5, une salinité de 30 g/L, la présence de nutriments et une densité cellulaire de 10^5 cellules/mL.

Dans ce chapitre III, un protocole est développé pour étudier l'adhésion et la formation de biofilm de diatomées en conditions dynamiques. Peu d'études s'intéressent uniquement à la formation de biofilm de diatomées or ces organismes participent tout autant que les bactéries dans les premières étapes de formation de biofilms marins. Ce protocole mis au point, l'activité du DBHB sur l'adhésion et sur la formation de biofilm de *C. closterium* et de *P. purpureum* a été évaluée. Les résultats montrent que ces deux souches ne répondent pas de la même manière à la molécule. Dans le cas de *P. purpureum*, aucun effet du DBHB n'a été mis en évidence (adhésion et maturation du biofilm). Pour *C. closterium*, la présence de 50 µg/mL de DBHB inhibe de 40 % l'adhésion cellulaire et inhibe totalement la maturation du biofilm.

À partir des études publiées, il s'avère que le DBHB pourrait être capable d'interagir sur les niveaux calciques intracellulaires. Or chez les diatomées, ce messenger intracellulaire (Ca^{2+}) est impliqué dans divers processus cellulaires : mobilité, réponse au stress, voies métaboliques, adhésion... Parmi les deux microalgues testées, seule *C. closterium* est une diatomée. Cette différence pourrait justifier l'absence d'activité du composé DBHB chez la microalgue *P. purpureum*.

Après avoir étudié l'adhésion des microalgues, les forces d'attachement de *C. closterium* et *P. purpureum* en fonction du débit de milieu, du temps d'adhésion et de la présence de DBHB ont été analysées. Les forces d'attachement mises en place par les microalgues sont dépendantes de la nature de la microalgue. *P. purpureum* est montrée comme plus sensible aux contraintes de cisaillement exercées par le débit. De plus, l'augmentation du temps d'adhésion renforce l'attachement des cellules à la surface. Ce temps supplémentaire permet probablement la mise en place de structures d'adhésion chez certaines diatomées. Le dernier paramètre étudié a montré que l'ajout de DBHB réduisait les forces d'attachement uniquement pour *C. closterium*. Sur l'ensemble des tests réalisés en présence de DBHB, seule *C. closterium* est impactée.

Avec l'ensemble des résultats obtenus dans le chapitre II et le chapitre III, le DBHB semble être un bon candidat comme agent AF puisqu'il est capable d'inhiber à la fois la formation de biofilm bactérien

mais également l'adhésion des diatomées. En inhibant le microfouling, l'adhésion des larves d'invertébrés et des spores d'algues peuvent être perturbées, induisant ainsi le ralentissement de la formation du macrofouling. L'ensemble des résultats obtenus est résumé sur le schéma présenté sur la Figure III-41.

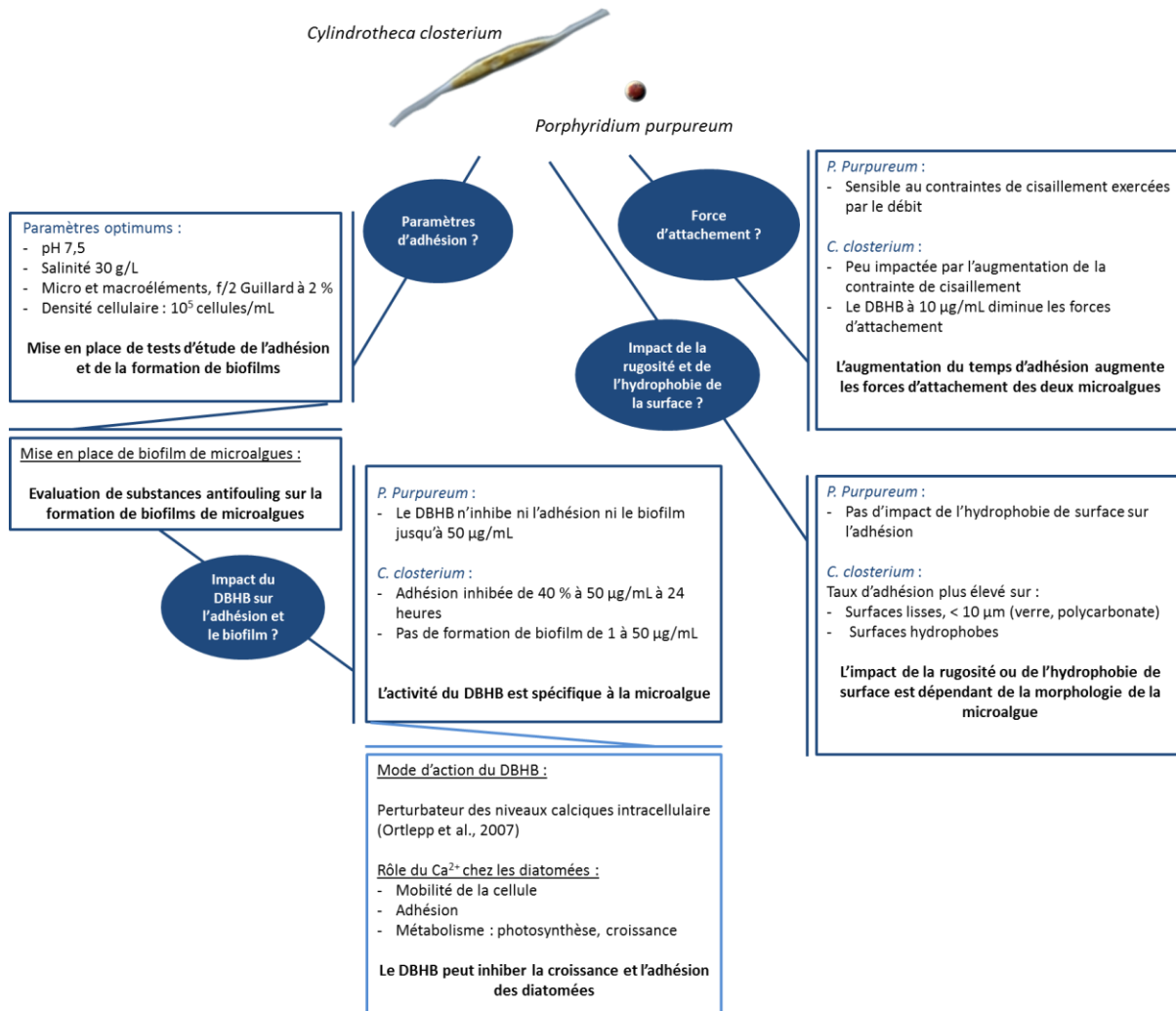


Figure III-41 : Schéma bilan de l'étude de l'adhésion et de la formation de biofilm chez les microalgues *C. closterium* et *P. purpureum*

La dernière partie de ce chapitre III s'est intéressée à l'impact des paramètres physico-chimiques des surfaces sur les capacités d'adhésion des microalgues. Les paramètres physico-chimiques de la surface impactent l'adhésion des microalgues mais cet effet est dépendant de la taille des organismes. Par exemple dans cette étude, il s'est avéré que *C. closterium*, la plus grande microalgue étudiée (65 µm), est sensible à des surfaces dont la rugosité est supérieure à 10 µm. Sur ces surfaces, cette diatomée ne peut pas adhérer aussi fortement. Il est possible que la rugosité perturbe la production des adhésifs (EPS) ou la mise en place de structures d'accroche. Dans une autre partie, l'impact de l'hydrophobie de surface a montré que cette même diatomée allait adhérer en plus grand nombre sur des surfaces

plus hydrophobes. En comprenant les paramètres d'adhésion des microalgues, il serait possible d'identifier de nouvelles stratégies afin de limiter leurs implications dans les problèmes liés au biofouling.

Bibliographie

- Aguila-Ramírez RN, Hernández-Guerrero CJ, González-Acosta B, Id-Daoud G, Hewitt S, Pope J, Hellio C. 2014. Antifouling activity of symbiotic bacteria from sponge *Aplysina Gerardogreeni*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 90:64–70.
- Alcoverro T, Conte E, Mazzella L. 2000. Production of Mucilage by the Adriatic Epipellic Diatom *Cylindrotheca Closterium* (bacillariophyceae) Under Nutrient Limitation. *Journal of Phycology*. 36:1087–1095.
- Andersen RA. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Academic Press.
- Arad S, Adda M, Cohen E. 1985. The potential of production of sulfated polysaccharides from *Porphyridium*. *Plant Soil*. 89:117–127.
- Aruoja V, Dubourguier H-C, Kasemets K, Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment*. 407:1461–1468.
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR. 2010. Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science*. 15:330–336.
- de Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z. 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng*. 44:636–641.
- Bellinger BJ, Abdullahi AS, Gretz MR, Underwood GJC. 2005. Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquat Microb Ecol*. 38:169–180.
- Bhosle NB, Sawant SS, Garg A, Wagh AB, Evans LV. 1996. Chemical characterization of exopolysaccharides from the marine fouling diatom *Amphora coffeaeformis*. *Biofouling*. 10:301–307.
- Chae MS, Schraft H. 2000. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 62:103–111.
- Chaichalerm S, Pokethitiyook P, Yuan W, Meetam M, Sritong K, Pugkaew W, Kungvansaichol K, Kruatrachue M, Damrongphol P. 2012. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. *Applied Energy*. 89:296–302.
- Cohn SA, Disparti NC. 1994. Environmental Factors Influencing Diatom Cell Motility. *Journal of Phycology*. 30:818–828.
- Cooksey KE, Cooksey B. 1986. Chapter 3 Adhesion of Fouling Diatoms to Surfaces: Some Biochemistry. *Studies in Environmental Science*. 28:41–53.
- Dade WB, Davis JD, Nichols PD, Nowell ARM, Thistle D, Trexler MB, White DC. 1990. Effects of bacterial exopolymer adhesion on the entrainment of sand. *Geomicrobiology Journal*. 8:1–16.
- DeLorenzo ME, Fleming J. 2008. Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch Environ Contam Toxicol*. 54:203–210.
- Djemai-Zoghache Y, Isambert A, Belhaneche-Bensemra N. 2011. Electrochemical behavior of the 316L steel type in a marine culture of microalgae (*Porphyridium purpureum*) under the 12/12 h photoperiod and effect of different working electrode exposure conditions on the biofilm–metal interface. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38:1969–1978.

- Druehl LD, Hsiao SIC. 1969. Axenic culture of Laminariales in defined media. *Phycologia*. 8:47–49.
- Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, Endoh YS, Goto K, Hirata K, Miyamoto K, Yoshimura H. 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere*. 57:1733–1738.
- Ferrari M, Benedetti A. 2015. Superhydrophobic surfaces for applications in seawater. *Advances in Colloid and Interface Science*. 222:291–304.
- Finlay JA, Callow ME, Ista LK, Lopez GP, Callow JA. 2002. The Influence of Surface Wettability on the Adhesion Strength of Settled Spores of the Green Alga *Enteromorpha* and the Diatom *Amphora*. *Integr Comp Biol*. 42:1116–1122.
- Forján E, Navarro F, Cuaresma M, Vaquero I, Ruíz-Domínguez MC, Gojkovic Ž, Vázquez M, Márquez M, Mogedas B, Bermejo E, et al. 2015. Microalgae: Fast-Growth Sustainable Green Factories. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 45:1705–1755.
- Franz S, Altenburger R, Heilmeier H, Schmitt-Jansen M. 2008. What contributes to the sensitivity of microalgae to triclosan? *Aquatic Toxicology*. 90:102–108.
- Garbayo I, Torronteras R, Forján E, Cuaresma M, Casal C, Mogedas B, Ruiz-Domínguez MC, Márquez C, Vaquero I, Fuentes-Cordero JL, et al. 2012. Identification and Physiological Aspects of a Novel Carotenoid-Enriched, Metal-Resistant Microalga Isolated from an Acidic River in Huelva (Spain). *Journal of Phycology*. 48:607–614.
- Geesey GG, Wigglesworth-Cooksey B, Cooksey KE. 2000. Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: A review. *Biofouling*. 15:195–205.
- Geresh S, Arad S. 1991. The extracellular polysaccharides of the red microalgae: Chemistry and rheology. *Bioresource Technology*. 38:195–201.
- Greg Mitchell B, Kiefer DA. 1988. Chlorophyll α specific absorption and fluorescence excitation spectra for light-limited phytoplankton. *Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers*. 35:639–663.
- Guillard RRL, Ryther JH. 1962. Studies of Marine Planktonic Diatoms: I. *Cyclotella Nana Hustedt*, and *Detonula Confervacea* (Cleve) Grun. *Can J Microbiol*. 8:229–239.
- Hanssen KØ, Cervin G, Trepos R, Petitbois J, Haug T, Hansen E, Andersen JH, Pavia H, Hellio C, Svenson J. 2014. The Bromotyrosine Derivative Ianthelline Isolated from the Arctic Marine Sponge *Stryphnus fortis* Inhibits Marine Micro- and Macrobiofouling. *Mar Biotechnol*. 16:684–694.
- Harder T, Lam C, Qian P. 2002. Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by marine biofilms: an investigation of monospecific diatom films as settlement cues. *Mar Ecol Prog Ser*. 229:105–112.
- Harper MA, Harper JF. 1967. Measurements of diatom adhesion and their relationship with movement. *British Phycological Bulletin*. 3:195–207.
- Hawkins ML, Faÿ F, Réhel K, Linossier I, Grunlan MA. 2014. Bacteria and diatom resistance of silicones modified with PEO-silane amphiphiles. *Biofouling*. 30:247–258.
- Hellio C, Berge JP, Beaupoil C, GAL YL, Bourgougnon N. 2002. Screening of Marine Algal Extracts for Anti-settlement Activities against Microalgae and Macroalgae. *Biofouling*. 18:205–215.

- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology*. 146:2395–2407.
- Higgins MJ, Molino P, Mulvaney P, Wetherbee R. 2003. The Structure and Nanomechanical Properties of the Adhesive Mucilage That Mediates Diatom-Substratum Adhesion and Motility. *Journal of Phycology*. 39:1181–1193.
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC. 1993. Diatom Extracellular Polymeric Substances: Function, Fine Structure, Chemistry, and Physiology. *Journal of Phycology*. 29:537–566.
- Holland R, Dugdale TM, Wetherbee R, Brennan AB, Finlay JA, Callow JA, Callow ME. 2004. Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. *Biofouling*. 20:323–329.
- Huisman J, Arrayás M, Ebert U, Sommeijer B. 2002. How Do Sinking Phytoplankton Species Manage to Persist? *The American Naturalist*. 159:245–254.
- Irving TE, Allen DG. 2011. Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 92:283–294.
- Jellali R, Campistron I, Pasetto P, Laguerre A, Gohier F, Hellio C, Pilard J-F, Mouget J-L. 2013. Antifouling activity of novel polyisoprene-based coatings made from photocurable natural rubber derived oligomers. *Progress in Organic Coatings*. 76:1203–1214.
- Klein GL, Pierre G, Bellon-Fontaine M-N, Zhao J-M, Breret M, Maugard T, Graber M. 2014. Marine diatom *Navicula jeffreyi* from biochemical composition and physico-chemical surface properties to understanding the first step of benthic biofilm formation. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 28:1739–1753.
- Koch K, Bhushan B, Jung YC, Barthlott W. 2009. Fabrication of artificial Lotus leaves and significance of hierarchical structure for superhydrophobicity and low adhesion. *Soft Matter*. 5:1386–1393.
- Li Y, Gao YH, Li XS, Yang JY, Que GH. 2010. Influence of surface free energy on the adhesion of marine benthic diatom *Nitzschia closterium* MMDL533. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 75:550–556.
- Liu Y, Li G. 2012. A new method for producing “Lotus Effect” on a biomimetic shark skin. *Journal of Colloid and Interface Science*. 388:235–242.
- Makita N, Shihira-Ishikawa I. 1997. Chloroplast assemblage by mechanical stimulation and its intercellular transmission in diatom cells. *Protoplasma*. 197:86–95.
- Mann DG. 1983. Symmetry and Cell Division in Raphid Diatoms. *Ann Bot*. 52:573–581.
- Marmur A. 2004. The Lotus Effect: Superhydrophobicity and Metastability. *Langmuir*. 20:3517–3519.
- McLachlan DH, Underwood GJC, Taylor AR, Brownlee C. 2012. Calcium Release from Intracellular Stores Is Necessary for the Photophobic Response in the Benthic Diatom *Navicula Perminuta* (bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 48:675–681.
- Niemann H, Lin W, Müller WEG, Kubbutat M, Lai D, Proksch P. 2013. Trimeric Hemibastadin Congener from the Marine Sponge *Ianthella basta*. *J Nat Prod*. 76:121–125.
- Ortlepp S, Pedpradap S, Dobretsov S, Proksch P. 2008. Antifouling activity of sponge-derived polybrominated diphenyl ethers and synthetic analogues. *Biofouling*. 24:201–208.

- Ortlepp S, Sjögren M, Dahlström M, Weber H, Ebel R, Edrada R, Thoms C, Schupp P, Bohlin L, Proksch P. 2007. Antifouling Activity of Bromotyrosine-Derived Sponge Metabolites and Synthetic Analogues. *Mar Biotechnol.* 9:776–785.
- Prakash S, Long TM, Selby JC, Moore JS, Shannon MA. 2007. “Click” Modification of Silica Surfaces and Glass Microfluidic Channels. *Anal Chem.* 79:1661–1667.
- Qiang H, Zarmi Y, Richmond A. 1998. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *European Journal of Phycology.* 33:165–171.
- Raposo MF de J, de Morais RMSC, Bernardo de Morais AMM. 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs.* 11:233–252.
- Rasmussen K, Østgaard K. 2001. Adhesion of the marine fouling diatom *Amphora coffeaeformis* to non-solid gel surfaces. *Biofouling.* 17:103–115.
- Reboloso-Fuentes MM, Navarro-Pérez A, García-Camacho F, Ramos-Miras JJ, Guil-Guerrero JL. 2001. Biomass Nutrient Profiles of the Microalgae *Nannochloropsis*. *J Agric Food Chem.* 49:2966–2972.
- Richmond A. 2008. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.* John Wiley & Sons.
- Rijstenbil JW. 2003. Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. *Mar Ecol Prog Ser.* 254:37–48.
- Scardino AJ, Harvey E, Nys RD. 2006. Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics. *Biofouling.* 22:55–60.
- Schultz MP, Finlay JA, Callow ME, Callow JA. 2000. A turbulent channel flow apparatus for the determination of the adhesion strength of microfouling organisms. *Biofouling.* 15:243–251.
- Sekar R, Venugopalan VP, Satpathy KK, Nair KVK, Rao VNR. 2004. Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates. *Hydrobiologia.* 512:109–116.
- Staats N, Stal LJ, Mur LR. 2000. Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 249:13–27.
- Staats N, Winder BD, Stal L, Mur L. 1999. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology.* 34:161–169.
- Steele DJ, Franklin DJ, Underwood GJC. 2014. Protection of cells from salinity stress by extracellular polymeric substances in diatom biofilms. *Biofouling.* 30:987–998.
- Tolker-Nielsen T, Sternberg C. 2014. Methods for Studying Biofilm Formation: Flow Cells and Confocal Laser Scanning Microscopy. In: Filloux A, Ramos J-L, editors. *Pseudomonas Methods and Protocols* Springer New York; p. 615–629.
- Trepos R, Cervin G, Hellio C, Pavia H, Stensen W, Stensvåg K, Svendsen J-S, Haug T, Svenson J. 2014. Antifouling Compounds from the Sub-Arctic Ascidian *Synoicum pulmonaria*: Synoxazolidinones A and C, Pulmonarins A and B, and Synthetic Analogues. *J Nat Prod.* 77:2105–2113.
- Vardi A, Formiggini F, Casotti R, Martino AD, Ribalet F, Miralto A, Bowler C. 2006. A Stress Surveillance System Based on Calcium and Nitric Oxide in Marine Diatoms. *PLOS Biology.* 4:e60.

Wetherbee R, Lind JL, Burke J, Quatrano RS. 1998. Minireview—the First Kiss: Establishment and Control of Initial Adhesion by Raphid Diatoms. *Journal of Phycology*. 34:9–15.

Woo SW, Song MY, Rho JS, Lee YS. 2005. The Effect of Oxyfluorination on the Surface Characteristics of Low-Density Polyethylene Films. *J Ind Eng Chem*. 11:55–61.

Wustman BA, Gretz MR, Hoagland KD. 1997. Extracellular Matrix Assembly in Diatoms (Bacillariophyceae) (I. A Model of Adhesives Based on Chemical Characterization and Localization of Polysaccharides from the Marine Diatom *Achnanthes longipes* and Other Diatoms). *Plant Physiol*. 113:1059–1069.

Yu Y, Zhao Z-H, Zheng Q-S. 2007. Mechanical and Superhydrophobic Stabilities of Two-Scale Surface Structure of Lotus Leaves. *Langmuir*. 23:8212–8216.

Chapitre IV

Étude de films antisalissures à base de composés naturels et de dérivés de synthèse

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	182
INTRODUCTION	184
MATERIELS ET METHODES.....	186
I – Évaluation de l’activité anti-microfouling de deux familles de composés (batatasins et hemibastadines) en conditions naturelles.....	186
I – A – Formulation	187
I – B – Immersion en conditions naturelles.....	187
II – Évaluation du DBHB en conditions contrôlées	188
II – A – Optimisation de la méthode	188
II – A – 1 – Méthode en circuit fermé : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue	190
II – A – 2 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue	191
II – A – 3 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, deux microalgues ...	191
II – B – Évaluation du DBHB.....	192
II – C – Étude de la toxicité des revêtements contenant le DBHB	192
III – Évaluation du DBHB sur le macrofouling	193
RESULTATS ET DISCUSSION	194
I – Évaluation de l’activité anti-microfouling de deux familles de composés (batatasins et hemibastadines) en conditions naturelles.....	194
I – A – Famille des batatasins	195
I – B – Famille des hemibastadines.....	197
II – Évaluation du DBHB en conditions contrôlées, impact sur un biofilm mixte.....	200
II – A – Développement de la méthode	200
II – A – 1 – Méthode en circuit fermé : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue	201
II – A – 2 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue	203

II – A – 3 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, deux microalgues ...	205
II – B – Évaluation du DBHB.....	209
II – B – 1 – Activité du revêtement contenant le DBHB par immersion en milieu contrôlé	209
II – B – 2 – Comparaison des deux méthodes d’immersion : milieu naturel et contrôlé	211
II – B – 3 – Étude de la toxicité des revêtements.....	212
III – Évaluation du DBHB sur le macrofouling	212
CONCLUSION.....	215
BIBLIOGRAPHIE.....	217

Table des illustrations

Liste des figures

Figure IV-1 : Observation des bactéries (vert) et des microalgues (rouge) par fluorescence en microscopie confocale à balayage laser.....	188
Figure IV-2 : Schématisation du système d'immersion en photobioréacteur (A : Enceinte, B : plaque d'acier inoxydable sur laquelle sont fixés les coupons en verre).....	189
Figure IV-3 : Photographie d'une boîte gélosée MB agar avec les colonies formées par <i>Paracoccus</i> sp. 4M6 : colonies rondes oranges, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6 : colonies rondes blanches et <i>Bacillus</i> sp. 4J6 : colonies étoilées blanches.....	190
Figure IV-4 : Suivi des conditions environnementales (température, pH, salinité et oxygène) pendant les deux périodes d'immersion entre juin et août 2015 et 2016.....	195
Figure IV-5 : Observations des vernis contenant les composés de la famille des batatasins aux jours 14, 21, 28 et 35 en conditions naturelles au port de Kernevel (Lorient) par microscopie confocale à balayage laser.....	195
Figure IV-6 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) des biofilms formés en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sur les vernis en phase organique contenant les composés de la famille des batatasins pendant les 35 jours d'immersion en conditions naturelles.....	196
Figure IV-7 : Observation d'une diatomée en microscopie électronique à balayage, les bactéries adhérentes à la diatomée sont colorées en vert.....	197
Figure IV-8 : Observations des vernis en phase organique contenant les composés de la famille des hemibastadines aux jours 14, 21, 28 et 35 après immersion en conditions naturelles en microscopie confocale à balayage laser.....	198
Figure IV-9 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) des biofilms formés en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sur les vernis en phase organique contenant les composés de la famille des hemibastadines au cours des 35 jours d'immersion en conditions naturelles.....	198
Figure IV-10 : Structures des composés baretin (A) et 8,9-dihydrobaretin (B).....	199
Figure IV-11 : suivi planctonique pour le circuit fermé : (A) cinétiques de croissance : logarithme de la densité optique à 600 nm pour les bactéries ou de la fluorescence pour les microalgues en fonction du temps, les barres représentent les écarts-types, (B) répartition bactérienne obtenue par dénombrement des colonies sur milieu gélosé pendant 14 jours.....	201
Figure IV-12 : Observations en MCBL des biofilms formés sur les coupons de verre immergés en conditions contrôlées, les bactéries sont visibles en vert (syto9®) et les microalgues en rouge (autofluorescence) pour la méthode en circuit fermé (grossissement x20).....	202
Figure IV-13 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) des biofilms formés en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sur les coupons de verre immergés en conditions contrôlées selon la méthode en circuit fermé en fonction du temps.....	202
Figure IV-14 : suivi planctonique pour le circuit ouvert (trois bactéries, une microalgue) : (A) densité cellulaire : logarithme de la densité optique à 600 nm pour les bactéries ou de la fluorescence pour les microalgues en fonction du temps, les barres représentent les écarts-types, (B) répartition bactérienne obtenue par dénombrement des colonies sur milieu gélosé pendant 21 jours.....	204
Figure IV-15 : Observations en MCBL (grossissement x20) des biofilms formés sur le verre immergé en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert (trois bactéries et une microalgue), les bactéries sont visibles en vert (syto9®) et les microalgues en rouge (autofluorescence).....	204
Figure IV-16 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ des biofilms formés sur le verre après immersion en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert : trois bactéries, une microalgue pendant 21 jours.....	205

Figure IV-17 : suivi planctonique pour le circuit ouvert (trois bactéries, deux microalgues) : (A) répartition bactérienne obtenue par dénombrement des colonies sur milieu gélosé pendant 21 jours, (B) répartition microalgale obtenue par dénombrement sur cellule de Malassez pendant les 21 jours, (C) densité cellulaire : logarithme de la densité optique à 600 nm pour les bactéries ou de la fluorescence pour les microalgues en fonction du temps.....	206
Figure IV-18 : Observations en MCBL (grossissement x20) des biofilms formés sur le verre immergé en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert (trois bactéries et deux microalgues) pendant 21 jours.....	207
Figure IV-19 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ des biofilms formés sur le verre après immersion en conditions contrôlées selon la méthode en circuit continu : trois bactéries, deux microalgues pendant 21 jours.....	207
Figure IV-20 : A : Observation d'un coupon immergé 2 jours dans le photobioréacteur en MCBL (grossissement x 20) afin de visualiser les deux microalgues inoculées : <i>Cylindrotheca closterium</i> et <i>Porphyridium purpureum</i> en rouge par leur autofluorescence, B : observation d'un amas de <i>P. purpureum</i> sur un coupon en verre immergé pendant 2 jours.....	208
Figure IV-21 : Observation en MCBL (grossissement x20) des filaments sur le coupon verre au 21ème jour d'immersion dans le cas de la méthode en circuit ouvert avec trois bactéries et deux microalgues.....	208
Figure IV-22 : Observation en MCBL du biofilm de <i>Bacillus</i> sp 4J6 à 48h en chambre à flux (chapitre II).....	208
Figure IV-23 : Observations en MCBL (grossissement x20) des biofilms formés sur le vernis avec ou sans DBHB à 0,02 % en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert (trois bactéries et une microalgue), les bactéries sont visibles en vert (syto9®) et les microalgues en rouge (autofluorescence).....	210
Figure IV-24 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ des biofilms formés sur le vernis avec ou sans DBHB à 0,02 % après immersion en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert : trois bactéries, une microalgue pendant 21 jours.....	210
Figure IV-25 : Photographies des vernis en phase organique contenant le DBHB immergés pendant trois mois en conditions naturelles.....	213
Figure IV-26 : Bilan des activités des substances formulées.....	215

Liste des tableaux

Tableau IV-1 : Comparaison des paramètres des méthodes d'immersions en conditions naturelles ou contrôlées.....	186
Tableau IV-2 : Paramètres de culture fixés pour la croissance en photobioréacteur.....	188
Tableau IV-3 : Paramètres variables sur les trois méthodes évaluées : renouvellement, temps et microorganismes inoculés.....	192
Tableau IV-4 : Facteur d'intensité (I) et facteur de gravité (G).....	193
Tableau IV-5 : Comparaison des biofilms formés sur les vernis avec ou sans DBHB immergés en milieu naturel ou contrôlé à 28 et 21 jours.....	211
Tableau IV-6 : Calcul des facteurs d'intensité, de gravité et d'efficacité pour le vernis avec ou sans DBHB à 0,02 %, (de juin à août 2017).....	213

Introduction

Ce dernier chapitre présente la formulation de revêtements contenant trois composés de la famille des batatasins (BAT III, BAT 47 et BAT 97) et trois composés de la famille des hemibastadins (Tyrosintyramide, NBHB et DBHB). Ces composés ont montré les activités les plus prometteuses comme inhibiteurs de l'adhésion des bactéries (chapitre II) et pour un des composés (DBHB) contre les microalgues (chapitre III). L'évaluation de ces revêtements est réalisée par des immersions en conditions naturelles au port de Kernevel à Lorient pendant un mois. L'ajout de composés dans les revêtements est réalisé à de faibles teneurs, contrairement aux molécules actuellement utilisées en AF où des concentrations 100 à 1000 fois plus importantes sont employées.

L'évaluation de composés en revêtement est une démarche peu employée. Néanmoins, c'est une étape essentielle dans l'objectif d'une application en AF. La formulation d'une substance peut réduire son activité, il est donc important de valider cette activité une fois la molécule incorporée dans un revêtement. Deux types d'évaluation des peintures AF sont classiquement rencontrés : en laboratoire, *via* des tests monospécifiques essentiellement et/ou par immersion en milieu naturel. Cette dernière évaluation étant considérée comme une étape de validation indispensable.

Lim *et al.*, ont présenté l'évaluation de l'activité AF d'une peinture. Les tests sont réalisés sur des espèces appartenant à différents niveaux trophiques : du micro au macrofouling. Les organismes les plus rencontrés sont les diatomées (*Amphora* sp., *Navicula* sp. ou *Nitzschia* sp.), les bactéries isolées du milieu marin et les organismes supérieurs tels que les larves de balanes (*Amphibalanus amphitrite*), les bryozoaires (*Bugula neritina*), les larves de moules (*Mytilus* sp.) ou les spores d'algue (*Ulva* sp.) (Lim *et al.*, 2014). Le test généralement employé avec ces organismes est un test d'adhésion en condition statique. En fonction de l'espèce testée, le temps d'adhésion évolue de quelques heures à quelques jours. Dans tous les cas, pour l'ensemble des organismes, des résultats sont obtenus en une semaine. Les expériences d'adhésion sont réalisées dans des conditions favorisant la colonisation des surfaces. En effet, les conditions testées sont favorables à la croissance des organismes. De plus, il n'y a pas de compétition pour la surface puisque les espèces sont évaluées séparément. Enfin, l'absence d'agitation ou de flux présents naturellement, favorise l'adhésion par le phénomène de sédimentation. Ces méthodes permettent souvent de comprendre l'activité des substances, d'identifier les organismes impactés mais ces résultats reflètent peu la complexité du milieu naturel.

Afin de compléter ces méthodes en laboratoire, il serait intéressant de développer une nouvelle méthode permettant l'évaluation de revêtements en condition dynamique et en incorporant

différentes espèces. Cette méthode permettrait d'évaluer les propriétés AF de revêtement sur des temps plus courts et de façon reproductible.

C'est ainsi qu'une méthode, en photobioréacteur a été mise en place au LBCM. Elle permet d'évaluer l'impact de surfaces sur la formation d'un biofilm mixte (bactéries et microalgues). Pour le développement de cette méthode, plusieurs paramètres sont étudiés comme l'impact du renouvellement de milieu ou le choix des microorganismes inoculés. La méthode établie a permis d'évaluer l'activité du revêtement contenant le DBHB. Les résultats en condition naturelle en mer et en condition contrôlée en photobioréacteur sont comparés afin de valider la méthode. Les travaux de Bressy *et al.*, ont souligné que des résultats obtenus par des tests en laboratoire n'apportaient pas assez d'information pour valider des activités applicables dans le domaine de l'AF (Bressy *et al.*, 2010) et de fait les essais en immersion étaient obligatoires pour valider l'efficacité AF d'un revêtement.

La deuxième approche pour étudier des peintures AF est l'immersion dans le milieu naturel. Cette évaluation permet de tester les revêtements sur une biodiversité naturelle souvent non cultivable en condition dynamique. Néanmoins, l'évaluation en condition naturelle est dépendante de la zone d'immersion où les paramètres environnementaux varient. Des immersions soit en océan Atlantique, océan Pacifique ou la mer Méditerranée apporteront par exemple, des résultats d'efficacité différents. Il est difficile de pouvoir obtenir des résultats reproductibles puisque d'une saison à l'autre, les conditions environnementales (température, pH, salinité, oxygénation) varient. En Europe, les tests ne peuvent être menés que sur la période comprise entre avril et octobre, époque correspondant à l'activité larvaire et la colonisation des spores entraînant une pression maximale de fouling.

L'évaluation peut être réalisée sur des temps court (< 1 mois), afin d'évaluer l'impact sur le microfouling par des observations microscopiques (microscopie confocale à balayage laser ou microscopie électronique à balayage), ou sur des temps plus longs (> 1 mois) (Faÿ *et al.*, 2011). L'activité est alors évaluée sur le macrofouling par des observations visuelles des revêtements. Ces observations permettent de déterminer le taux de recouvrement de la peinture et les types d'espèces présents (Lim *et al.*, 2014).

Sur des temps d'immersion plus longs (plusieurs mois), l'activité anti-macrofouling est évaluée selon un protocole préalablement validé. L'ensemble de ces approches a été mis en œuvre pour évaluer le DBHB.

Matériels et Méthodes

Après avoir étudié l'activité de composés provenant de la famille des batatasins et des hemibastadins sur des bactéries et des microalgues, les molécules d'intérêt sont incorporées dans un revêtement. Très peu d'études s'intéressent aux activités de substances dites AF au sein d'un revêtement. La majorité des composés présentés comme antifouling dans la littérature sont définis la plupart du temps selon des tests en laboratoire, en milieu liquide sous forme de solution ou de dispersion, envers un organisme et non de co-cultures.

I – Évaluation de l'activité anti-microfouling de deux familles de composés (batatasins et hemibastadins) en conditions naturelles

Dans le but d'évaluer l'activité de trois composés de la famille des batatasins (BAT 47, BAT 97 et BAT-III) et de trois composés de la famille des hemibastadins (tyrosintyramide, NBHB et DBHB), une formulation en phase organique est réalisée. Ces composés sont sélectionnés après les résultats obtenus envers les bactéries et microalgues, et en fonction des quantités disponibles.

L'activité des revêtements, préparés avec les composés de la famille des batatasins et des hemibastadins est évaluée par deux types d'immersion. Une immersion classique en conditions naturelles (port) et une immersion en conditions contrôlées (photobioréacteur). Les immersions en conditions naturelles sont réalisées d'avril à octobre. En dehors de cette période, l'activité biologique est restreinte. En conditions naturelles, les résultats sont peu reproductibles (dû aux variations environnementales) mais permettent de visualiser l'activité des surfaces dans les conditions réelles d'utilisation de peintures AF. Le développement des organismes permet d'étudier l'activité des revêtements sur le micro et le macrofouling. Afin de pallier aux contraintes saisonnières, une méthode d'immersion en laboratoire est développée. En photobioréacteur, le développement des organismes est connu, mais seul l'impact sur le microfouling peut être étudié. Les paramètres de suivi de chaque méthode sont présentés sur le Tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Comparaison des paramètres des méthodes d'immersions d'évaluation du microfouling en conditions naturelles ou contrôlées

	Conditions naturelles (port)	Conditions contrôlées (Photobioréacteur)
Croissance	Non contrôlée	Contrôlée, connaissance des organismes
Organismes	Microorganismes	Microorganismes cultivables
Temps	Un mois	De 14 à 21 jours
Reproductibilité	Non, une tendance	Oui
Biodiversité	+	-

I – A – Formulation

Un vernis est préparé à partir d'un polymère, le poly(ξ -caprolactone-co- δ -valerolactone), aussi appelé p(CL-VL) dans les proportions 80 : 20. Ce polymère est biodégradable et est synthétisé au laboratoire (Faÿ *et al.*, 2007).

Le polymère p(CL-VL) est solubilisé dans un solvant, le xylène, dans les proportions 50 : 50 (w/w). Les composés en solution dans le méthanol (1 M) sont ajoutés à une concentration de 0,1 mg/mL, soit un pourcentage massique de 0,02 % d'extrait sec. La concentration choisie est dix fois supérieure aux concentrations évaluées dans les chapitres précédents mais 100 à 1000 fois inférieures aux teneurs habituelles en biocides. Il n'a pas été possible de concentrer d'avantage les revêtements afin de se rapprocher des concentrations en biocides des peintures commerciales car peu de composés à tester étaient disponibles.

La solution est ensuite agitée au vortex pendant une minute puis trois fois quinze minutes aux ultrasons (à 20 °C). Cette procédure permet de disperser les molécules au sein de la solution.

Le vernis est appliqué à une épaisseur de 200 μ m humide à l'aide d'un applicateur (Sheen) sur un support de polycarbonate. Le revêtement est séché à température ambiante pendant 24 heures.

I – B – Immersion en conditions naturelles

L'évaluation des revêtements, est dans un premier temps, réalisée en conditions naturelles. Pour se faire, les vernis sont fixés sur des cadres immergés à un mètre de profondeur dans le port de Kernevel à Lorient (47°42'20.779" N, 3°23'0.679" O). Deux séries d'immersion sont réalisées, une première de mai à juillet 2015 et une seconde d'avril à août 2016.

Les revêtements immergés sont étudiés pendant 35 jours. Afin de suivre la formation du microfouling, un coupon de 2 x 5 cm² pour chaque formulation est fixé et immergé. Hebdomadairement, un coupon est prélevé et marqué avec un marqueur de fluorescence permettant d'observer les bactéries : le Syto9® ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 493 - 543 \text{ nm}$). Les microalgues sont, quant à elles, visualisées par autofluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 638 - 688 \text{ nm}$) (Rasmussen & Østgaard., 2000 ; Gião *et al.*, 2009). 100 μ L de marqueur à 5 μ M est déposé sur le coupon. Le marquage est effectué pendant cinq minutes à l'obscurité puis le coupon est rincé avec de l'eau de mer artificielle (ASW, 30 g/L). Le microfouling est visualisé par microscopie confocale à balayage laser (MCBL, LSM 710 Zeiss, grossissement x20) (Figure IV-1). Les images obtenues permettent de déterminer les biovolumes bactériens et microalgues par analyses avec le logiciel COMSTAT (matlab) (Heydorn *et al.*, 2000 ; Faÿ *et al.*, 2011). Trois observations sont réalisées par coupon. Les valeurs de biovolume permettent de suivre le développement du microfouling sur les coupons et d'observer si une inhibition est obtenue lors de l'ajout d'un composé dans la formulation. Cette inhibition est déterminée par comparaison au

verniss p(CL-VL) sans composé. L'activité d'un revêtement est validée après analyse des résultats par un test statistique (ANOVA, $p < 0,01$).

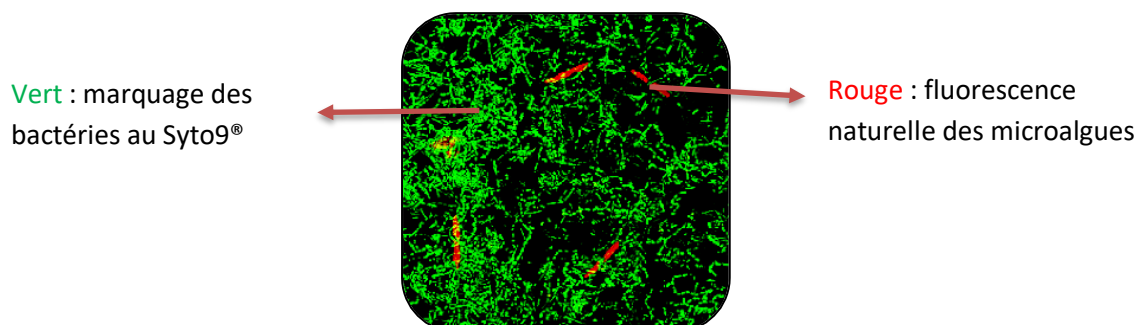


Figure IV-1 : Observation des bactéries (vert) et des microalgues (rouge) par fluorescence en microscopie confocale à balayage laser

II – Évaluation du DBHB en conditions contrôlées

Seuls, des revêtements contenant le DBHB sont évalués en conditions contrôlées. Le DBHB est la molécule ayant présenté les activités biologiques les plus intéressantes et étant disponible en quantité suffisante. Avant de tester les revêtements, une optimisation de la méthode est nécessaire.

II – A – Optimisation de la méthode

La méthode d'immersion de revêtement en conditions contrôlées est réalisée en photobioréacteur. Un photobioréacteur est une enceinte dans laquelle la croissance de microorganismes est possible. Le photobioréacteur permet de contrôler plusieurs paramètres tels que la température, le pH, l'oxygénation, l'agitation ou encore l'exposition à la lumière. Les paramètres sélectionnés pour l'expérience sont présentés dans le Tableau IV-2. Ces paramètres correspondent aux paramètres de croissance classiquement utilisés pour ces microorganismes (Grasland., 2002 ; Forján *et al.*, 2015).

Tableau IV-2 : Paramètres de culture fixés pour la croissance en photobioréacteur

Température	pH	Oxygénation	Agitation	Lumière
20 °C	7,5	50 %	150 rotation/min	250 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (12H : 12H)

Dans le but d'évaluer des revêtements AF, trois méthodes sont développées. Une méthode en circuit fermé, le milieu n'est pas réapprovisionné. Deux méthodes en circuit ouvert : au cours de l'expérience, le milieu est renouvelé afin d'apporter les éléments nécessaires à la croissance des microorganismes. La différence entre les deux méthodes en circuit ouvert repose sur l'apport d'une seconde microalgue afin de diversifier la population évaluée.

Pour ces trois méthodes, une plaque d'acier inoxydable est immergée au fond de la cuve du photobioréacteur. Sur cette plaque sont aimantés les coupons à tester. Afin de valider les méthodes étudiées, le développement du microfouling est suivi sur des coupons de verre. Pour prélever les coupons sans rompre la stérilité, ceux-ci sont attachés à un fil de nylon.

Le photobioréacteur ainsi que la plaque contenant les coupons sont schématisés sur la Figure IV-2.

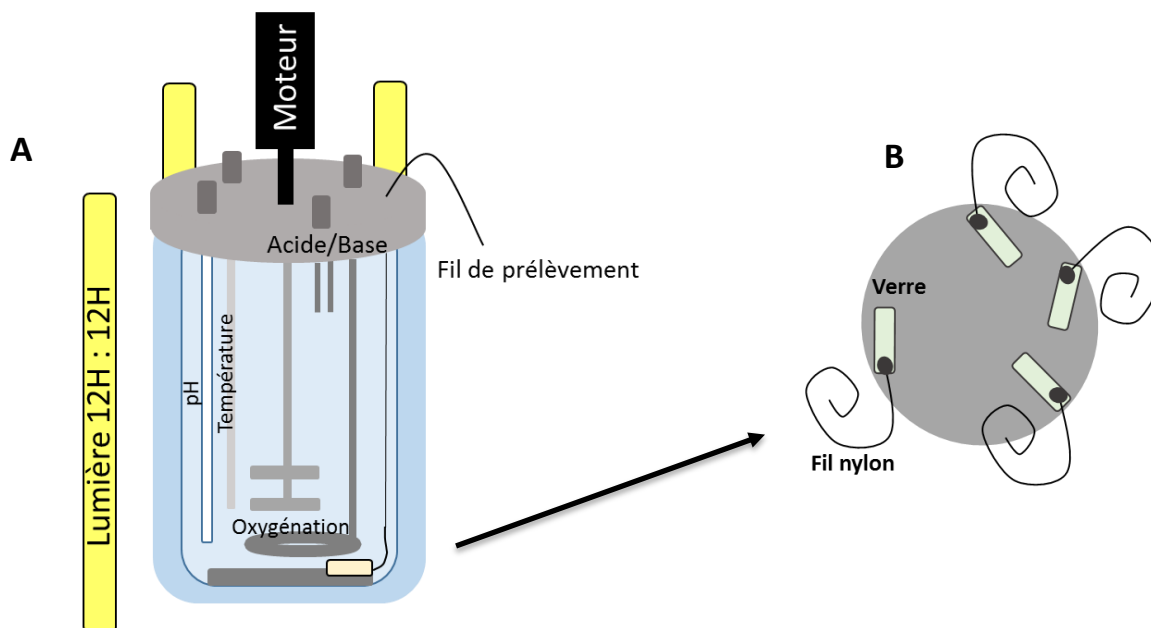


Figure IV-2 : Schématisation du système d'immersion en photobioréacteur (A : Enceinte, B : plaque d'acier inoxydable sur laquelle sont fixés les coupons en verre)

Le milieu de croissance est identique pour les trois méthodes d'immersion et est constitué d'eau de mer artificielle (ASW, 30 g/L) et de peptone de caséine (1 g/L). L'ensemble est autoclavé (Chapitre II) puis le f/2 Guillard à 2 % est ajouté stérilement. La composition de ce milieu de culture a été déterminé par Claudia Zea Obando (Obando., 2015).

Avant de démarrer l'expérience, le photobioréacteur est nettoyé et autoclavé. Après stérilisation de la cuve, la plaque contenant les coupons est ajoutée. La plaque et les fils de nylon sont au préalable stérilisés à l'éthanol absolu. Néanmoins les revêtements ne sont pas stérilisés : l'autoclavage, l'éthanol ou les UV dégraderaient les revêtements. Une fois les coupons en place, la cuve est remplie avec le milieu de croissance stérile par les pompes péristaltiques de l'automate.

Au cours de l'expérience, une mesure de la densité optique à 600 nm et une mesure de la fluorescence sont réalisées quotidiennement afin de suivre la densité cellulaire des bactéries et des microalgues (Iyapparaj *et al.*, 2014). Par ailleurs, des étalements sur MB agar (Marine Broth agar) sont également réalisés. Pour le milieu MB agar (peptone 5,0 g, extrait de levure 1,0 g, citrate de fer 0,1, chlorure de

sodium 19,45 g, chlorure de magnésium 3,24 g, sulfate de sodium 3,24 g, chlorure de calcium 1,8 g, chlorure de potassium 0,55 g, bicarbonate de sodium 0,16 g, bromure de potassium 0,08 g, chlorure de strontium 0,034 g, acide borique 0,022 g, silicate de sodium 0,004 g, fluorure de sodium 0,0024 g, nitrate d'ammonium 0,0016 g, phosphate disodique 0,0008 g) 37,4 g du MB et 15 g d'agar sont solubilisés dans un litre d'eau distillée. Les additifs proviennent de Fisher scientific.

Sur ce milieu gélosé, les trois bactéries forment des colonies différenciables. La bactérie *Paracoccus* sp. 4M6 forme des colonies rondes oranges, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 des colonies rondes blanches et *Bacillus* sp. 4J6 forme des colonies étoilées blanches (Figure IV-3). Les étalements sur MB agar (boîte de Petri, 90 mm) permettent de déterminer la répartition bactérienne au cours du temps.

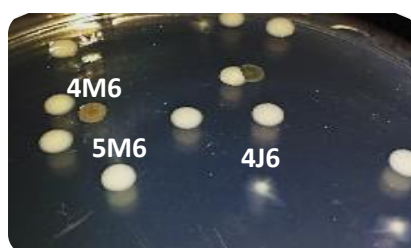


Figure IV-3 : Photographie d'une boîte gélosée MB agar avec les colonies formées par *Paracoccus* sp. 4M6 : colonies rondes oranges, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 : colonies rondes blanches et *Bacillus* sp. 4J6 : colonies étoilées blanches

Afin de suivre le microfouling, les coupons prélevés sont marqués comme dans la partie I-B, à l'aide de Syto9[®] permettant de visualiser les bactéries tandis que les microalgues sont visibles par autofluorescence en microscopie confocale à balayage laser (MCBL). Pour chaque coupon, trois observations sont réalisées. Chaque méthode est réalisée en *triplicata*. Les résultats présentent les biovolumes (déterminés par le programme COMSTAT, matlab), les densités cellulaires et les répartitions bactériennes. Un test statistique est réalisé afin de valider la significativité des résultats (ANOVA, $p < 0,01$).

II – A – 1 – Méthode en circuit fermé : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue

L'adhésion, la croissance et la formation de biofilm de quatre microorganismes sont suivies. Trois bactéries marines sont inoculées : *Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Paracoccus* sp. 4M6 et *Bacillus* sp. 4J6 ainsi que la diatomée *C. closterium*. Le photobioréacteur contient trois litres de milieu.

Quatre jours avant le début de l'expérience, des pré-cultures des trois bactéries sont préparées dans 10 mL de milieu Zobell (Chapitre II). Les pré-cultures sont incubées à 20 °C pendant 48 heures. Après incubation de la pré-culture, des cultures de 300 mL sont réalisées en milieu Zobell et incubées à 20 °C pendant 48 heures.

Deux jours avant le début de l'expérience, une culture de 14 jours de *C. closterium* est axénisée (chapitre III). La culture de microalgues est placée dans une armoire phytotronique thermostatée à 20 °C, et sous éclairage pendant douze heures à 250 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ suivies de douze heures d'obscurité. La diatomée est ensuite inoculée à 10^3 cellules/mL en photobioréacteur. Deux jours après, les trois bactéries sont inoculées à une densité cellulaire totale de 10^6 UFC/mL et ceci correspond au début de l'expérience. Pour cette méthode, le suivi du microfouling est réalisé pendant 14 jours. Un prélèvement est réalisé tous les deux jours.

Afin de prolonger le temps d'expérience, deux méthodes avec renouvellement de milieu sont évaluées.

II – A – 2 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue

Les mêmes microorganismes sont utilisés : trois bactéries marines (*Pseudoalteromonas* sp. 5M6, *Paracoccus* sp. 4M6 et *Bacillus* sp. 4J6) et une diatomée (*C. closterium*). La préparation est identique à la partie II-A-1, seul le volume de milieu dans la cuve est modifié. Il est de quatre litres afin de faciliter le renouvellement du milieu.

Une fois les bactéries inoculées, la pompe péristaltique de l'automate est activée à 0,5 mL/min. Cette pompe permet à la fois d'ajouter le milieu enrichi stérile et de prélever le milieu avec les microorganismes tout en conservant un volume total constant de quatre litres dans la cuve du photobioréacteur. Le suivi du microfouling est réalisé pendant 21 jours, les coupons sont prélevés aux jours 2, 7, 9, 14, 17 et 21.

II – A – 3 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, deux microalgues

Pour la troisième méthode évaluée, la mise en place est identique à la méthode présentée en partie II-A-2. La différence porte sur l'incorporation d'une microalgue supplémentaire : *Porphyridium purpureum*, sélectionnée en raison de sa capacité à adhérer aux surfaces (Raposo *et al.*, 2013). De plus cette microalgue est différente morphologiquement de *C. closterium*. Elle est ronde et dix fois plus petite. Le chapitre III a également montré que *P. purpureum* est moins sensible au DBHB que *C. closterium*.

Les conditions de renouvellement du milieu sont identiques à précédemment (0,5 mL/min). Le suivi du microfouling et de la densité cellulaire à l'état planctonique est réalisé pendant 21 jours. Les coupons sont prélevés aux jours 2, 7, 9, 14, 17 et 21.

En plus de la répartition bactérienne, réalisée par des dénombrements sur milieu MB agar, une répartition microalgale est réalisée pendant les 21 jours. Des dénombrements en cellule de Malassez permettent de différencier les cellules de *C. closterium* et de *P. purpureum*. Les paramètres variables des trois méthodes sont résumés dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Paramètres variables sur les trois méthodes évaluées : renouvellement, temps et microorganismes inoculés

	Temps	Bactéries	Microalgues
Circuit fermé	14 jours	<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	<i>Cylindrotheca closterium</i>
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6	
		<i>Bacillus</i> sp. 4J6	
Circuit ouvert 1	21 jours	<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	<i>Cylindrotheca closterium</i>
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6	
		<i>Bacillus</i> sp. 4J6	
Circuit ouvert 2	21 jours	<i>Paracoccus</i> sp. 4M6	<i>Cylindrotheca closterium</i>
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 5M6	
		<i>Bacillus</i> sp. 4J6	<i>Porphyridium purpureum</i>

II – B – Évaluation du DBHB

Les revêtements formulés avec le DBHB sont évalués pour les trois méthodes développées. Seuls les résultats obtenus pour la méthode en circuit ouvert 1 (avec renouvellement de milieu, trois bactéries et une microalgue) sont présentés dans la partie résultat. Les biovolumes formés sur les vernis avec DBHB sont comparés aux biovolumes obtenus sur un vernis sans DBHB servant de témoin. Un test statistique est réalisé afin de valider la significativité des inhibitions (ANOVA, $p < 0,01$).

II – C – Étude de la toxicité des revêtements contenant le DBHB

La toxicité des revêtements contenant le DBHB est évaluée sur trois bactéries marines (*Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 et *Bacillus* sp. 4J6) et sur deux microalgues (*Cylindrotheca closterium* et *Porphyridium purpureum*).

Pour se faire des milieux gélosés à 1,5 % en agar sont préparés (Zobell pour les bactéries et ASW additionné de f/2 Guillard à 2 % pour les microalgues). La préparation de ces milieux est présentée dans les chapitres II et III. Les bactéries et microalgues sont ajoutées à la gélose à 10^6 UFC/mL ou 10^5 cellules/mL, les géloses sont coulées dans des boîtes de Petri de diamètre 90 mm. Une fois sèche, une seconde couche de gélose sans microorganisme est coulée. Lorsque la seconde couche est sèche, des disques (diamètre de 2 cm) de revêtement sont déposés sur la géloses.

Pour les trois bactéries marines, les boîtes de Petri sont incubées à 20 °C pendant 48 heures. Pour les microalgues, les boîtes de Petri sont placées dans l'armoire phytotronique (20°C, cycle d'exposition à la lumière 12H : 12H) pendant 5 jours. Afin de quantifier le pourcentage d'inhibition induit par la présence de DBHB au sein du revêtement, les halos d'inhibition sont mesurés et comparés au revêtement sans DBHB. Six boîtes de Petri sont réalisées pour chaque microorganisme.

III – Évaluation du DBHB sur le macrofouling

Parmi les molécules testées, le DBHB est également évalué pour son activité envers le macrofouling. Des plaques de 50 cm² en PVC, sont recouvertes du revêtement (épaisseur de 200 µm humide). Après séchage, elles sont fixées à un cadre et immergées au port de Lorient. Les surfaces évaluées sont immergées en *triplicata*. Le développement du macrofouling est suivi sur deux surfaces : le revêtement contenant le DBHB à 0,02 % d'extrait sec et le revêtement sans molécule qui sert de témoin négatif. Pendant trois mois, hebdomadairement, les plaques sont photographiées afin de suivre le développement des organismes supérieurs. À partir des observations, il est possible de déterminer le facteur d'efficacité (N) du revêtement. Ce protocole d'évaluation a été mis en place par trois laboratoires (Laboratoire de Biotechnologie et chimie marines (LBCM), Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin (MAPIEM) et l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER)) (Bressy *et al.*, 2014). Ce facteur est déterminé à partir du pourcentage de recouvrement de la surface et du type d'organisme présent. Le facteur d'intensité (I) détermine le taux de colonisation de la surface et le facteur de gravité (G) représente les organismes adhérents. Le calcul de ces facteurs est défini sur les Tableau IV-4.

Tableau IV-4 : Facteur d'intensité (I) et facteur de gravité (G)

Pourcentage de recouvrement	Facteur d'intensité (I)	Type de salissure	Facteur de gravité (G)
Aucune salissure	0	Biofilm	1
0 < % < 10	1	Algues	3
10 < % < 20	2	Espèces non encroûtantes	4
20 < % < 40	3	Espèces encroûtantes	6
40 < % < 60	4		
60 < % < 100	5		

Plus le facteur d'efficacité est faible, plus la peinture est efficace. Le facteur d'efficacité est déterminé à partir de l'équation suivante :

$$N = \sum I \times G$$

Résultats et discussion

L'activité de six composés présentés dans les chapitre II et III est évaluée en revêtement. Trois composés de la famille des batatasins (BAT 47, BAT 97 et BAT III) et de trois molécules de la famille des hemibastadins (tyrosintyramide, NBHB et DBHB) sont formulés en phase organique à 0,02 %.

Une méthode d'immersion en laboratoire est développée pour évaluer l'activité de revêtements contenant des molécules actives sur la formation d'un biofilm mixte en photobioréacteur. L'activité du revêtement contenant le DBHB est également étudié sur le macrofouling *in situ*.

I – Évaluation de l'activité anti-microfouling de deux familles de composés (batatasins et hemibastadins) en conditions naturelles

Au cours des 35 jours de suivi, l'activité des revêtements est étudiée sur l'adhésion et la formation de biofilm de microorganismes tels que les bactéries et microalgues. Après 25 jours, les premières larves de crustacés ou spores d'algue peuvent parfois être observées (Railkin., 2003). Les méthodes d'immersion en conditions naturelles apportent des indications sur l'activité de surfaces AF envers une biodiversité très importante mais ces résultats sont dépendants de la zone d'immersion. En effet, dans les océans et mers qui recouvrent notre planète, le développement des organismes marins est variable.

Le suivi réalisé sur 35 jours permet de visualiser le potentiel anti-microfouling des composés sur les microorganismes marins se développant dans l'Océan Atlantique. Les immersions dans le milieu naturel sont réalisées sur deux périodes, une première de mai à juillet 2015 et une seconde d'avril à août 2016.

Les résultats obtenus indiquent des activités comparables pour les revêtements évalués dans les deux cas. Cependant, les conditions climatiques et environnementales ne permettent pas de répéter les conditions d'immersion. Sur la Figure IV-4, les valeurs de pH et d'oxygène varient peu entre les deux périodes d'immersion. Cependant, la température au mois de juin 2015 était plus basse avec un écart de 1,6 °C. Cette plus faible température a pu ralentir la croissance de certains microorganismes sensibles et donc modifier les valeurs de biovolume des biofilms formés sur les deux premières semaines d'immersion. Pour la conductivité, traduisant la salinité du milieu, les valeurs sont légèrement plus élevées en 2015.

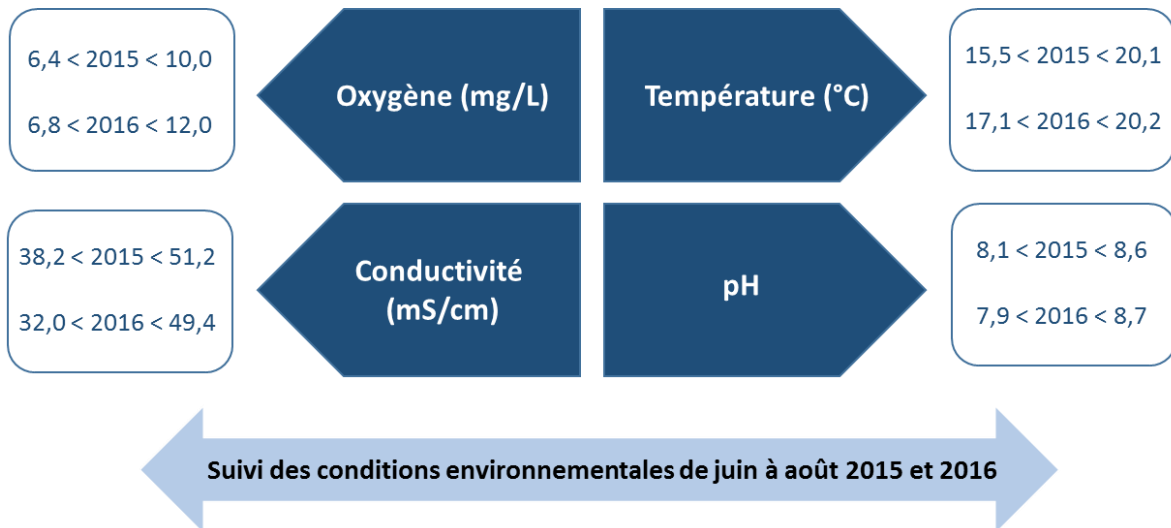


Figure IV-4 : Suivi des conditions environnementales (température, pH, salinité et oxygène) pendant les deux périodes d'immersion entre juin et août 2015 et 2016

Les résultats de la seconde immersion ayant eu lieu en 2016 sont présentés dans cette partie.

I – A – Famille des batatasins

Les observations en MCBL permettent de visualiser à la fois les bactéries en vert par le marquage au Syto9® et les microalgues en rouge par autofluorescence. La présence de bactéries sur les microalgues induit une fluorescence jaune. Les observations des coupons immergés pendant 35 jours sont présentées sur la Figure IV-5.

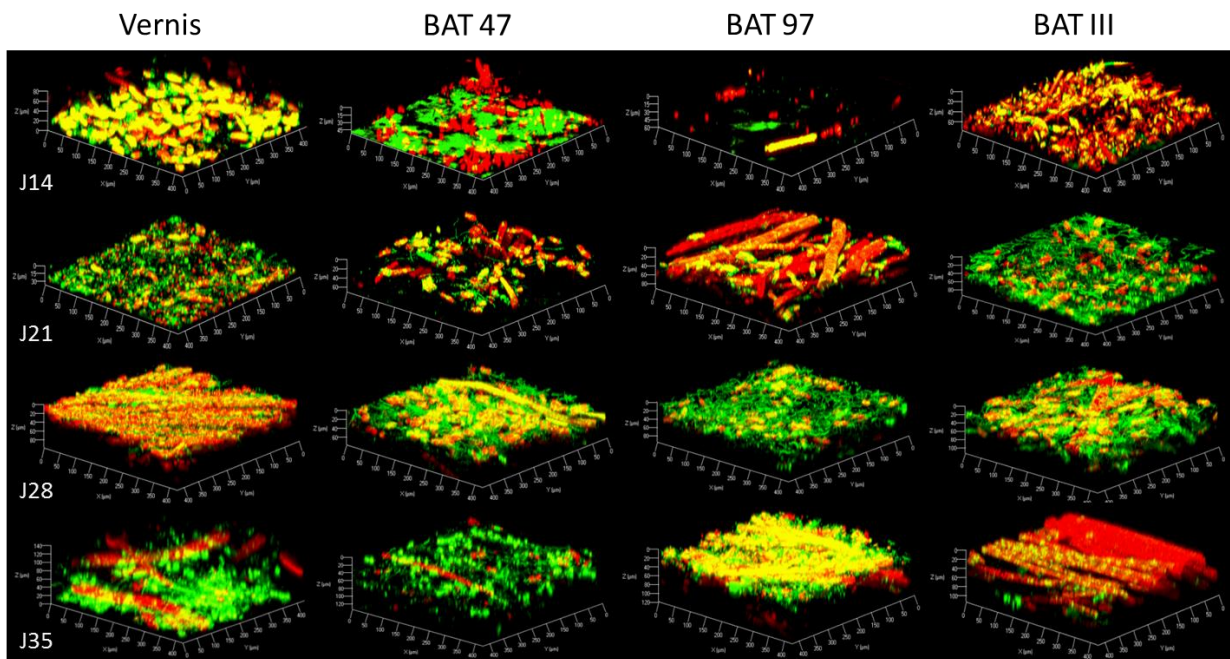


Figure IV-5 : Observations des vernis contenant les composés de la famille des batatasins aux jours 14, 21, 28 et 35 en conditions naturelles au port de Kernevel (Lorient) par microscopie confocale à balayage laser (grossissement x20), le microfouling formé est comparé au vernis sans composé (témoin négatif)

Pour l'ensemble des coupons, le développement du microfouling est observé et quantifié. À partir des observations microscopiques, les biovolumes bactériens et microalgaux sont déterminés par le programme COMSTAT. Au 14^{ème} jour, le revêtement contenant le composé BAT 97 présente une colonisation plus faible, inférieure à $1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$. Cependant cette activité est vite perdue. Au cours du temps, les microalgues s'assemblent et forment des chaînes visibles au 21^{ème} jour sur le coupon contenant le BAT 97 ou le BAT III à 35 jours. Les valeurs de biovolume sont présentées sur la Figure IV-6. Les différences de biovolume sont analysées par un traitement statistique (ANOVA, * $p < 0,01$).

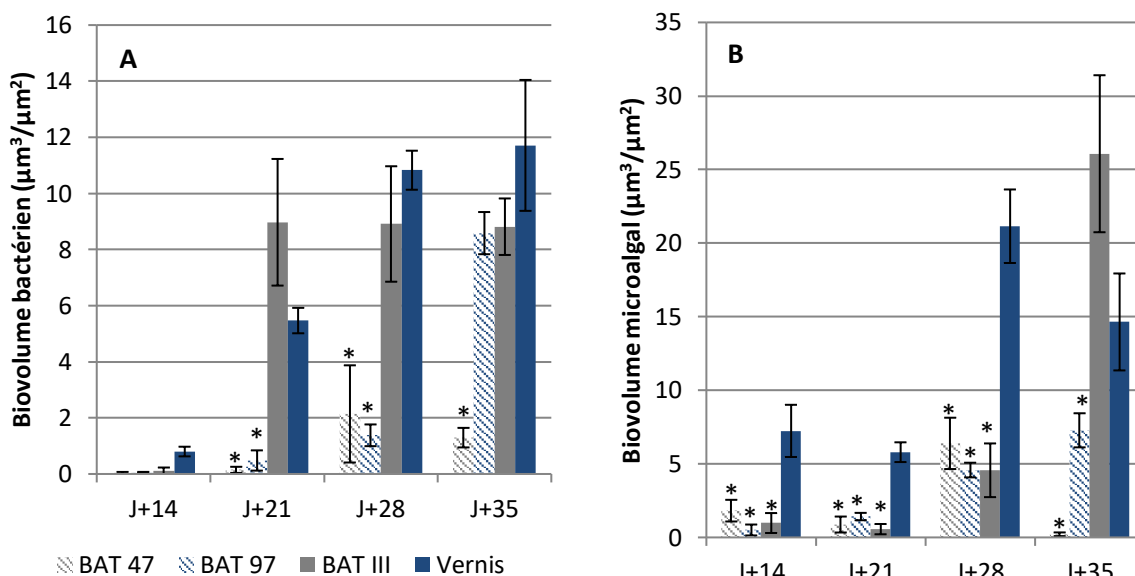


Figure IV-6 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) des biofilms formés en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sur les vernis en phase organique contenant les composés de la famille des batatasins pendant les 35 jours d'immersion en conditions naturelles (ANOVA, * $p < 0,01$, au cours du temps), les barres représentent les écarts-types

L'ajout de BAT 47 et de BAT 97 dans le vernis induit une inhibition significativement différente de la formation du biofilm bactérien pendant 28 jours en comparaison avec le témoin négatif (vernis sans composé). Cependant, au 35^{ème} jour, seule l'incorporation du BAT 47 induit une inhibition significative du biofilm bactérien sur l'ensemble de la période d'immersion.

Pour le suivi de la formation du biofilm de microalgues, pendant 28 jours, l'ajout des molécules (BAT 47, BAT 97 et BAT III) inhibe significativement le biofilm formé en comparaison au témoin négatif. Au jour 35, seuls les composés BAT 47 et BAT 97 induisent une inhibition significative du biofilm microalgal.

Dans les premiers jours, les bactéries quantifiées sont présentes sur la surface du vernis. Puis au cours du temps, les bactéries marquées adhèrent à la surface des microalgues. Une observation en microscopie électronique à balayage, présentée sur la Figure IV-7, montre des cellules bactériennes adhérentes sur la paroi cellulaire d'une diatomée.

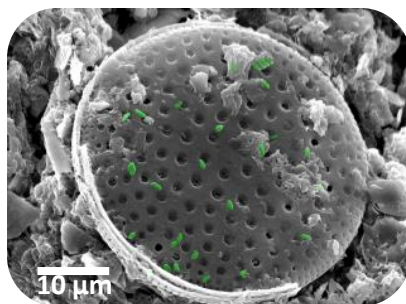


Figure IV-7 : Observation d'une diatomée en microscopie électronique à balayage, les bactéries adhérentes à la diatomée sont colorées en vert

Les relations entre les bactéries et les diatomées peuvent être des interactions positives ou négatives. La production des EPS par les microalgues favorise l'adhésion d'autres organismes marins comme les bactéries. Les EPS sont à la fois une source de nutriments et un moyen de protection pour les bactéries. Ces polymères sécrétés renforcent la cohésion du biofilm mixte (Bowman *et al.*, 1997 ; Underwood *et al.*, 2004). Dans le cas des bactéries hétérotrophes, la matière organique produite par les microalgues est un apport important pour la croissance. Une étude de Murray *et al.*, a montré que la bactérie *Vibrio proteolytica* pouvait se développer à partir des exsudats de la diatomée *Halamphora coffeaeformis* (Murray *et al.*, 1986). L'étude de Bruckner *et al.*, présente la relation entre les bactéries et les diatomées comme la mise en place d'un microenvironnement suffisant pour permettre le développement de chaque espèce (Bruckner *et al.*, 2008). Peu d'études montrent les effets bénéfiques de cette relation pour les diatomées. La présence de bactéries peut accroître ou inhiber la production d'EPS par les microalgues. Ces modifications dans la production des EPS peuvent ralentir la croissance des microalgues ou diminuer les forces d'adhésion vis-à-vis de la surface (Gawne *et al.*, 1998 ; Grossart 1999 ; Grossart *et al.*, 2006 ; Grossart & Simon., 2007).

Sur les trois composés de la famille des batatasins testés, l'impact sur le biofouling est variable. L'ajout du composé BAT 47 induit la plus forte inhibition du biofilm mixte bactéries-microalgues après immersion en conditions naturelles. Lors du criblage en microplaque dans le chapitre II contre les bactéries, le BAT 47 inhibait à 50 µg/mL la croissance et l'adhésion de deux bactéries marines (*Paracoccus* sp. 4M6 et *Pseudoalteromonas* sp. 5M6) et de la bactérie terrestre référente *P. aeruginosa* PAO1. Ce composé semble donc posséder des activités inhibitrices de la croissance bactérienne.

I – B – Famille des hemibastadins

Trois composés de la famille des hemibastadins (tyrosintyramide, NBHB et DBHB) sont testés. Le microfouling formé sur les revêtements immergés en milieu naturel est visualisé par MCBL sur la Figure IV-8.

Une forte colonisation par les microalgues est visible dès le 14^{ème} jour sur le vernis témoin ainsi que sur les vernis avec les composés tyrosintyramide et NBHB. À partir du 28^{ème} jour, des chaînes de microalgues sont visibles. Seul le DBHB présente une inhibition de l'adhésion des microalgues.

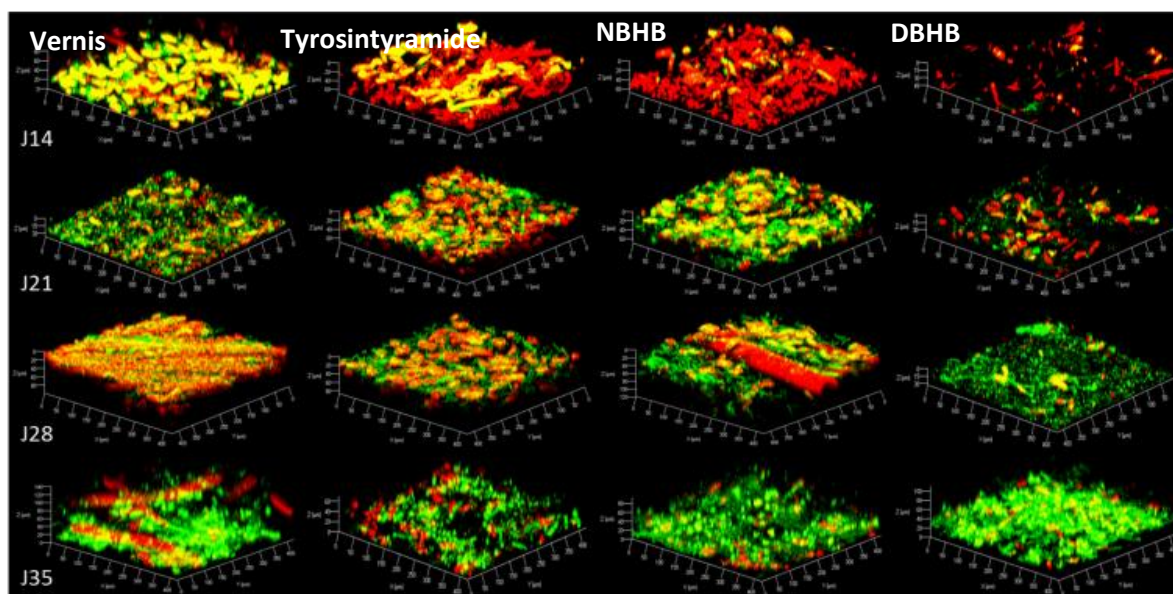


Figure IV-8 : Observations des vernis en phase organique contenant les composés de la famille des hemibastadins aux jours 14, 21, 28 et 35 après immersion en conditions naturelles en microscopie confocale à balayage laser (grossissement x20), le microfouling formé est comparé au vernis (témoin négatif)

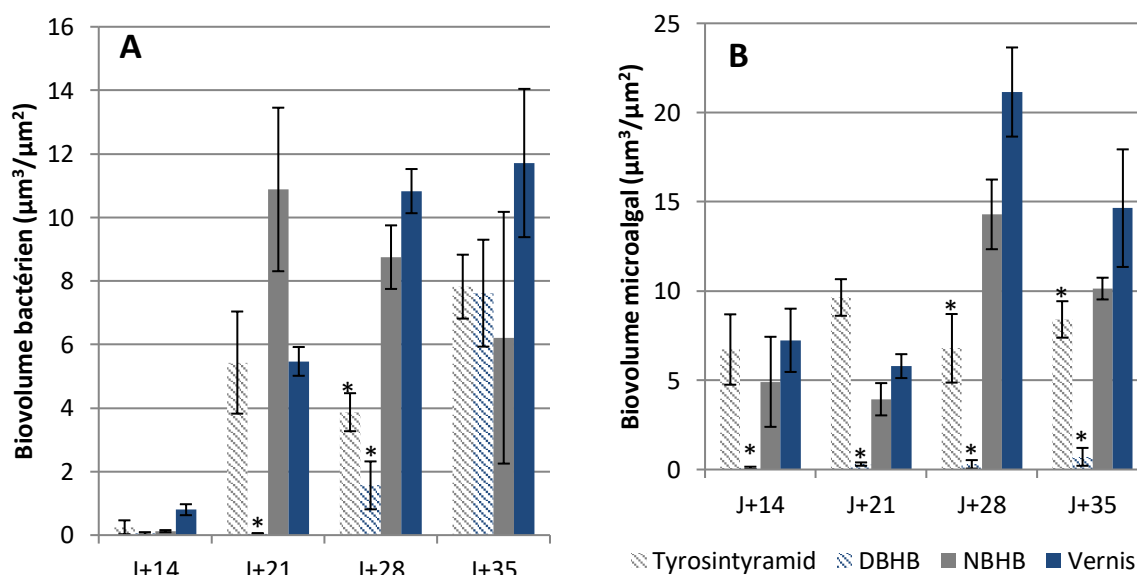


Figure IV-9 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) des biofilms formés en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sur les vernis en phase organique contenant les composés de la famille des hemibastadins au cours des 35 jours d'immersion en conditions naturelles (ANOVA * $p < 0,01$, au cours du temps), les barres représentent les écarts-types

Les valeurs sont présentées sur la Figure IV-9. Le vernis témoin est progressivement colonisé par les bactéries et les microalgues au cours du temps. Les valeurs de biovolume les plus importantes sont obtenues sur ce vernis, avec environ $11,8 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour les bactéries et $14,7 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour les

microalgues à 35 jours. L'ajout de Tyrosintyramid induit une inhibition significative du biofilm bactérien à 28 jours, le biovolume est réduit d'un facteur 2,5. Ce même composé inhibe le biofilm microalgal à 28 et 35 jours d'environ un facteur 2. Le NBHB n'induit pas d'inhibition du biofilm mixte bactéries-microalgues.

L'incorporation de DBHB dans le vernis induit une inhibition de la colonisation par les bactéries pendant 28 jours d'un facteur de 6. De plus, le DBHB inhibe presque totalement les microalgues pendant les 35 jours de suivi. A 35 jours en comparaison au vernis témoin, le biovolume microalgal est réduit d'un facteur 25.

Afin de confirmer ou non cette hypothèse, un relargage sur cinq semaines en eau distillée à 20 °C et sous agitation est réalisé. Le relargage du DBHB est suivi en LC-MS-MS. Le calibrage de l'appareil a permis de déterminer une limite de détection du DBHB à 20 µM. Dans le cas où la totalité de la molécule était libérée du revêtement, 50 µM de DBHB auraient dû être détectées dans le milieu. Néanmoins, au bout de cinq semaines d'immersion, aucune trace de DBHB n'a été observée. La concentration testée est en dessous de la limite de détection du DBHB. Il est donc supposé que la concentration de DBHB libérée du revêtement est inférieure à 20 µM, concentration inférieure à la CMI. La perte d'activité n'est donc pas liée au relargage de la molécule dans le milieu.

D'autres études antérieures présentent des immersions de revêtements en conditions naturelles. Les travaux de Sjögren *et al*, ont montré l'activité de deux cyclopeptides isolés de l'éponge *Geodia barretti*. Ces composés bromés sont le baretin et le 8,9-dihydrobaretin. Ces composés sont structurellement proches du DBHB.

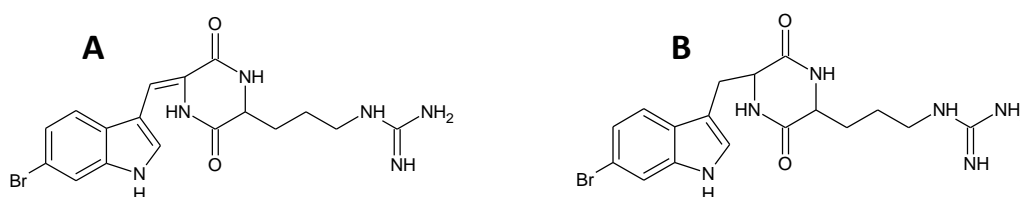


Figure IV-10 : Structures des composés baretin (A) et 8,9-dihydrobaretin (B)

Ces molécules sont incorporées à des peintures commerciales non toxiques à 0,1 et 0,01 %. Elles sont ensuite immergées pendant 8 semaines (Suède). Après l'immersion, le nombre d'individus de *Balanus improvus* et de *Mytilus edulis* est dénombré. Les deux composés formulés ont montré des inhibitions de l'adhésion des deux organismes. Cependant, l'activité est dépendante de la concentration évaluée. De plus les résultats, confirment les activités décrites par les tests en laboratoire. À la concentration de 0,01 % qui est deux fois plus faible que celle du DBHB évaluée dans cette étude, la peinture SPF (peinture auto-polissante) contenant le baretin induit une réduction de la colonisation par *B. improvus*

de 67 % et de *M. edulis* de 83 %. Ces deux composés proches du DBHB sont des candidats prometteurs comme agent antifouling non toxique (Sjögren *et al.*, 2004).

Sur les trois composés de la famille des hemibastadins évalués, la molécule DBHB montre la plus forte réduction du biofilm mixte bactéries-microalgues. Cette molécule avait déjà montré des propriétés antibiofilm et anti-quorum sensing dans le chapitre II envers les bactéries. Les résultats d'inhibition des microalgues corroborent les données présentées dans le chapitre III. Le DBHB avait montré une activité antimicroalgale à de faible concentration 1 µg/mL envers la diatomée *Cylindrotheca closterium*. L'incorporation de ce composé dans un revêtement n'inhibe pas son activité puisque le microfouling est réduit. Il agit sur l'adhésion à différents niveaux trophiques (bactéries, microalgues, larves de balanes, moules) et son activité a été confirmée contre le microfouling après incorporation dans un revêtement. Le DBHB est donc un composé AF prometteur.

II – Évaluation du DBHB en conditions contrôlées, impact sur un biofilm mixte

Dans l'objectif de pouvoir évaluer l'activité anti-microfouling d'un revêtement tout au long de l'année et de façon rapide, reproductible et répétable, une méthode d'immersion en conditions contrôlées est mise en place.

II – A – Développement de la méthode

La littérature correspondante à ce type de tests est très peu abondante. Avendano-herrera et Riquelme se sont intéressés à la mise en place d'un biofilm constitué de bactéries et de la diatomée *Navicula veneta*. Toutefois, l'objectif de leur étude était tout autre. Il s'agissait de favoriser la formation de biofilm par *N. veneta* en vue de produire à plus grande échelle des aliments pour l'aquaculture (Avendaño-Herrera & Riquelme., 2007). D'autres études réalisées en bioréacteur ont principalement pour but de produire de la biomasse visant des applications dans les biocarburants, l'aquaculture ou l'agroalimentaire (Doiron., 2011). Peu d'études publiées ne présentent de tests en conditions dynamiques impliquant des biofilms mixtes (bactéries/microalgues) pour évaluer des revêtements AF. Seuls, quelques tests statiques déterminent des effets sur l'adhésion de bactéries, de spores d'algues ou de larves de balanes.

Dans l'étude de Burgess *et al*, des substances antifouling ont été extraits de la bactérie *Pseudomonas* sp. NUDMB50-11. Les extraits ont été incorporés dans une peinture (Harlaw chemical company LTD). Les composés sont incorporés à 20 mg/mL dans la peinture soit une concentration 200 fois supérieure à celle évaluée dans ce chapitre. L'activité de ces peintures a été testée sur l'adhésion des larves de balanes et des spores d'algues. Sur les cinq peintures formulées, deux peintures ont montré des inhibitions significativement différentes du contrôle sur l'adhésion des larves de balanes et une sur

l'adhésion des spores d'algue. Classiquement les extraits ou composés sont testés seuls et non en formulation. Or la formulation peut modifier l'activité de la substance (Burgess *et al.*, 2003).

II – A – 1 – Méthode en circuit fermé : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue

Pendant les 14 jours d'immersion, les bactéries et microalgues sont présents à l'état planctonique. Les densités cellulaires ainsi que la répartition bactérienne au cours des 14 jours de suivi sont présentés sur la Figure IV-11. Il peut être remarqué que durant les 14 jours d'expérience, la présence de microalgues et bactéries est vérifiée. La densité bactérienne reste stable alors qu'une multiplication cellulaire de *C. closterium* est observée pendant 7 jours (Figure IV-11.A).

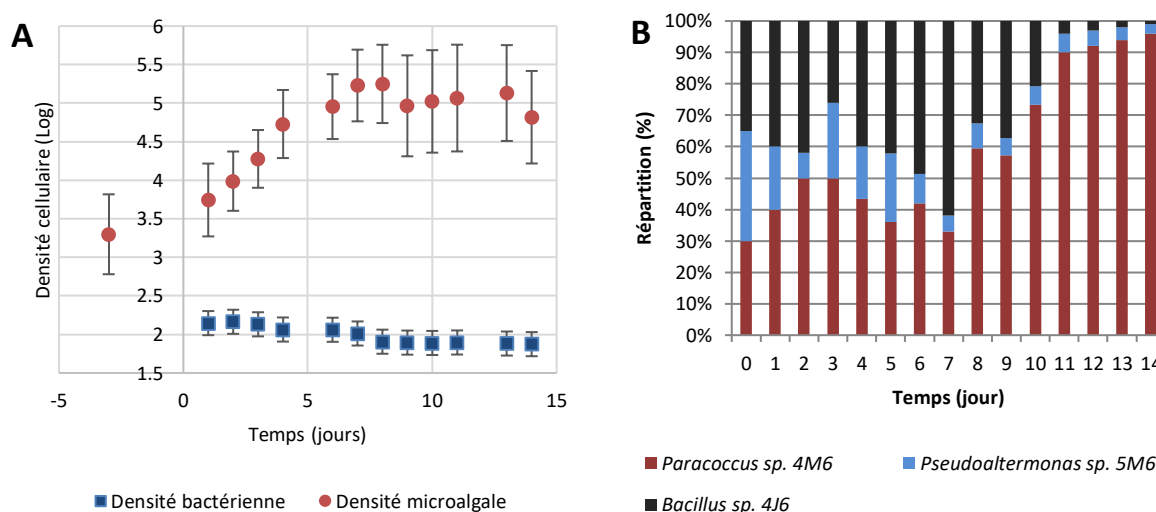


Figure IV-11 : suivi planctonique pour le circuit fermé : (A) cinétiques de croissance : logarithme de la densité optique à 600 nm pour les bactéries ou de la fluorescence pour les microalgues en fonction du temps, les barres représentent les écarts-types, (B) répartition bactérienne obtenue par dénombrement des colonies sur milieu gélosé pendant 14 jours

De plus, la répartition bactérienne (Figure IV-11.B) montre une évolution au cours du temps. La bactérie *Paracoccus sp. 4M6* est majoritaire à partir du 9^{ème} jour, alors que la bactérie *Pseudoaltermonas sp. 5M6* disparaît : seulement 10 % de la population est dénombré au deuxième jour. La présence de la bactérie *Bacillus sp. 4J6* diminue également au cours du temps. Après 10 jours : 92 % de la culture planctonique est constituée de *Paracoccus sp. 4M6*.

Des études de biofilms bactériens mixtes ont déjà été réalisées en chambre à flux. Dans les travaux de Yang *et al.*, la formation d'un biofilm constitué des bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* a montré que la présence de la bactéries sauvage *P. aeruginosa* favorisait la formation de colonies par *S. aureus* (Yang *et al.*, 2011). Néanmoins, les interactions de plusieurs organismes au sein d'une co-culture sont complexes à interpréter.

Les observations des biofilms et les biovolumes calculés à partir de ces observations en MCBL sont présentés sur les Figure IV-12 et Figure IV-13. Les valeurs de biovolume bactérien visible en vert

correspondent à la somme des trois bactéries, il n'est pas possible de les différencier par fluorescence. La microalgue est, quant à elle, visible en rouge.

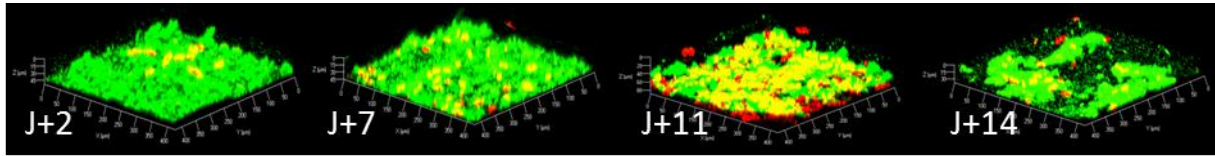


Figure IV-12 : Observations en MCBL des biofilms formés sur les coupons de verre immergés en conditions contrôlées, les bactéries sont visibles en vert (syto9®) et les microalgues en rouge (autofluorescence) pour la méthode en circuit fermé (grossissement x20)

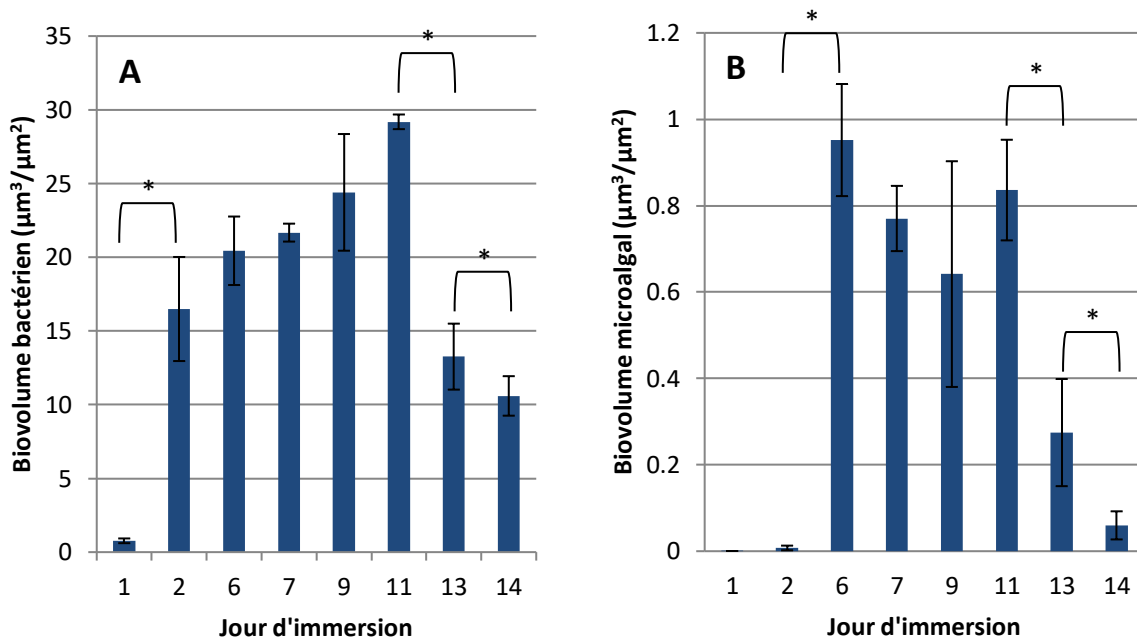


Figure IV-13 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) des biofilms formés en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ sur les coupons de verre immergés en conditions contrôlées selon la méthode en circuit fermé en fonction du temps (ANOVA, * $p < 0,01$, au cours du temps), les barres représentent les écarts-types

Les observations microscopiques, par l'intermédiaire d'un double marquage, montrent la formation d'un biofilm mixte composé de bactéries et de microalgues. Au cours du temps, le biovolume de ce biofilm mixte croit aussi bien pour les bactéries que pour les microalgues. Dans le cas du biofilm bactérien, l'augmentation du biovolume est significative dès le deuxième jour avec un facteur de 16. Pour le développement des microalgues, le biofilm est plus dense au sixième jour où il croit d'un facteur 100. Le biofilm reste constant pour les microalgues et augmente légèrement pour les bactéries pendant 5 jours. Après le 11^{ème} jour, le biofilm est réduit. Les valeurs de biovolumes diminuent d'un facteur 3 pour les bactéries et d'un facteur 10 pour les microalgues. Ce détachement du biofilm est probablement dû au ralentissement de la croissance liée au manque de nutriments.

Cette première méthode valide le développement d'un biofilm mixte en conditions contrôlées. De plus la méthode est reproductible, les écarts-types sur l'ensemble des réplicats sont acceptables. Le suivi de trois bioréacteurs pendant 14 jours a montré la reproductibilité des résultats. Cependant, le manque de renouvellement de milieu limite la croissance et le développement du biofilm après 11 jours d'expérience.

II – A – 2 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, une microalgue

Afin d'optimiser la diversité microbienne au cours du temps et optimiser les conditions de culture, il a été choisi de travailler en renouvelant le milieu au sein du photobioréacteur. Cette seconde méthode permet de mettre en évidence l'effet des nutriments sur le développement du biofilm mixte en favorisant la croissance des quatre organismes étudiés.

Le suivi des densités cellulaires montre un développement plus important avec cette méthode en comparaison au circuit fermé. Sur la Figure IV-14.A, la densité cellulaire des bactéries est augmentée de 0,7 log lorsque le milieu est renouvelé. Cette densité reste constante dans le temps contrairement à la méthode précédente où une diminution était observée dès le 6^{ème} jour.

Pour la densité microalgale, le développement est également augmenté d'une unité de log. La croissance est stable jusqu'au 16^{ème} jour, où une légère diminution est observée. De plus il a été constaté que les diatomées adhéraient sur le contour de la cuve en verre. Il est possible que les microalgues favorisent leur adhésion sur le contour de la cuve de façon à être mieux exposées à la lumière. Ce suivi de la densité cellulaire ne permet pas de quantifier les espèces adhérentes sur le contour de la cuve mais uniquement celles à l'état planctonique. Le renouvellement réalisé par l'ajout et le prélèvement d'un volume de 0,5 mL toutes les minutes peut induire une perte de cellules au sein du photobioréacteur.

En comparant l'évolution de la répartition bactérienne au cours du temps entre les méthodes avec et sans renouvellement de milieu, il est constaté que la bactérie, *Paracoccus* sp. 4M6 est toujours dominante. Au 14^{ème} jour, le pourcentage des bactéries *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 et *Bacillus* sp. 4J6 est inférieur à 10 %. Le renouvellement de milieu favorise la croissance de *Paracoccus* sp. 4M6 au détriment des deux autres bactéries qui ne sont plus dénombrées. À la fin de l'expérience, le pourcentage de ces deux bactéries est inférieur à 2 %. L'étude de Gao *et al* a montré que *Paracoccus* sp. était dominante sur d'autres espèces bactériennes lorsque la concentration en dioxygène dissous était inférieure à 2 mg/L (Gao *et al.*, 2011). Il est possible que les conditions testées en photobioréacteur favorisent le développement de *Paracoccus* sp. 4M6.

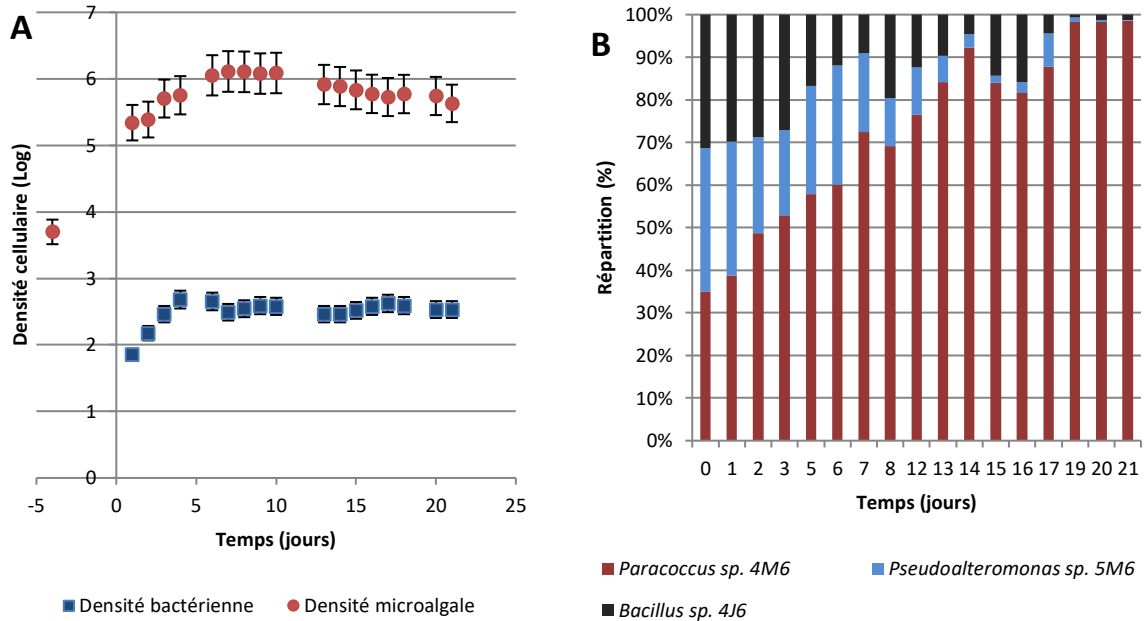


Figure IV-14 : suivi planctonique pour le circuit ouvert (trois bactéries, une microalgue) : (A) densité cellulaire : logarithme de la densité optique à 600 nm pour les bactéries ou de la fluorescence pour les microalgues en fonction du temps, les barres représentent les écarts-types, (B) répartition bactérienne obtenue par dénombrement des colonies sur milieu gélosé pendant 21 jours

Les Figure IV-15 et Figure IV-16 présentent les observations en MCBL et les biovolumes associés. Pour cette seconde méthode, un biofilm mixte est également observé. Comme précédemment, la surface est plus rapidement colonisée par les bactéries, les microalgues se développant après 6 jours. Après le 12^{ème} jour, les biovolumes bactériens et microalgaux diminuent au cours du temps mais se stabilisent au 16^{ème} jour. Il est probable qu'à partir d'une certaine épaisseur, le flux créé par l'agitation induit un détachement du biofilm. De plus l'épaisseur du biofilm formé rend difficile l'observation de la base du biofilm.

De plus, les observations réalisées au cours des 21 jours montrent une difficulté à détecter l'intégralité de l'épaisseur du biofilm : une perte de fluorescence est observée à la base du biofilm. Ce biais entraîne donc une sous-estimation des biovolumes à partir du 17^{ème} jour. Les biofilms atteignent des épaisseurs maximales de 100 µm.

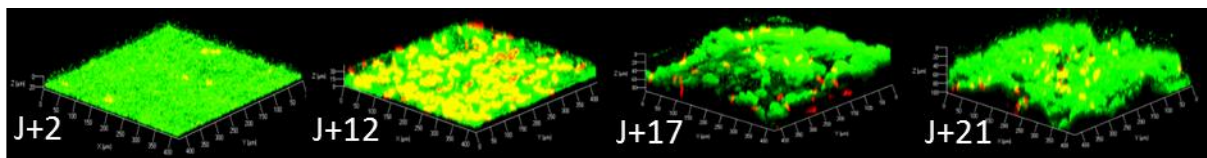


Figure IV-15 : Observations en MCBL (grossissement x20) des biofilms formés sur le verre immergé en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert (trois bactéries et une microalgue), les bactéries sont visibles en vert (syto9®) et les microalgues en rouge (autofluorescence)

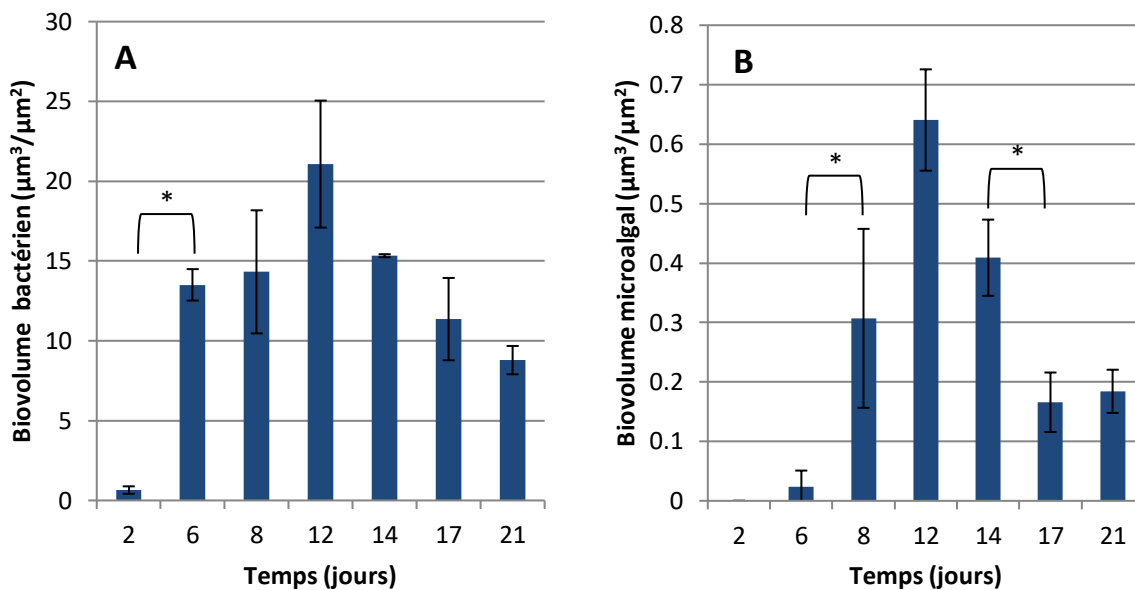


Figure IV-16 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ des biofilms formés sur le verre après immersion en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert : trois bactéries, une microalgue pendant 21 jours (ANOVA, $p < 0,01$ *, au cours du temps), les barres représentent les écarts-types

Par comparaison à la méthode sans renouvellement de milieu, les adhésions bactériennes et microalgales sont globalement semblables. Les valeurs de biovolumes bactériens pour les deux méthodes sont d'environ $20 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ à la moitié de l'expérience (7^{ème} jour pour le circuit fermé et 12^{ème} jour pour le circuit ouvert). Les biovolumes bactériens et microalgaux observés augmentent jusqu'à atteindre un maximum (environ $20 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour les bactéries et $0,7 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour les microalgues) puis une diminution significative des biovolumes est observée.

Cette seconde méthode permet également la formation d'un biofilm mixte reproductible. Le renouvellement du milieu permet de prolonger l'expérience. Dans le cas de la première méthode, les nutriments étant limitant, une réduction du biofilm sur un revêtement pouvait être liée au ralentissement de la densité cellulaire. Pour cette seconde méthode, les nutriments ne sont pas limitant, la croissance de microorganismes est donc favorisée.

II – A – 3 – Méthode en circuit ouvert : suivi du développement de trois bactéries, deux microalgues

Cette dernière méthode est semblable à la méthode précédente excepté qu'une seconde microalgue, *P. purpureum* est ajoutée. L'apport d'une espèce supplémentaire permet d'évaluer les revêtements sur des organismes possédant des morphologies et des sensibilités différentes. Pour les densités cellulaires à l'état planctonique présentées sur la Figure IV-17.C, les deux types de microorganismes se développent jusqu'à atteindre une phase stationnaire après le 2^{ème} jour pour les microalgues et après le 6^{ème} jour pour les bactéries. La phase stationnaire pour les microalgues est légèrement plus faible (0,5 log) en comparaison à la méthode avec renouvellement de milieu précédente (II-A-2). Pour la

densité bactérienne, la phase stationnaire est presque identique à la partie II-A-2 avec une valeur d'environ 2,5 log. La densité cellulaire reste stable jusqu'à la fin de l'expérience pour les deux groupes d'organismes.

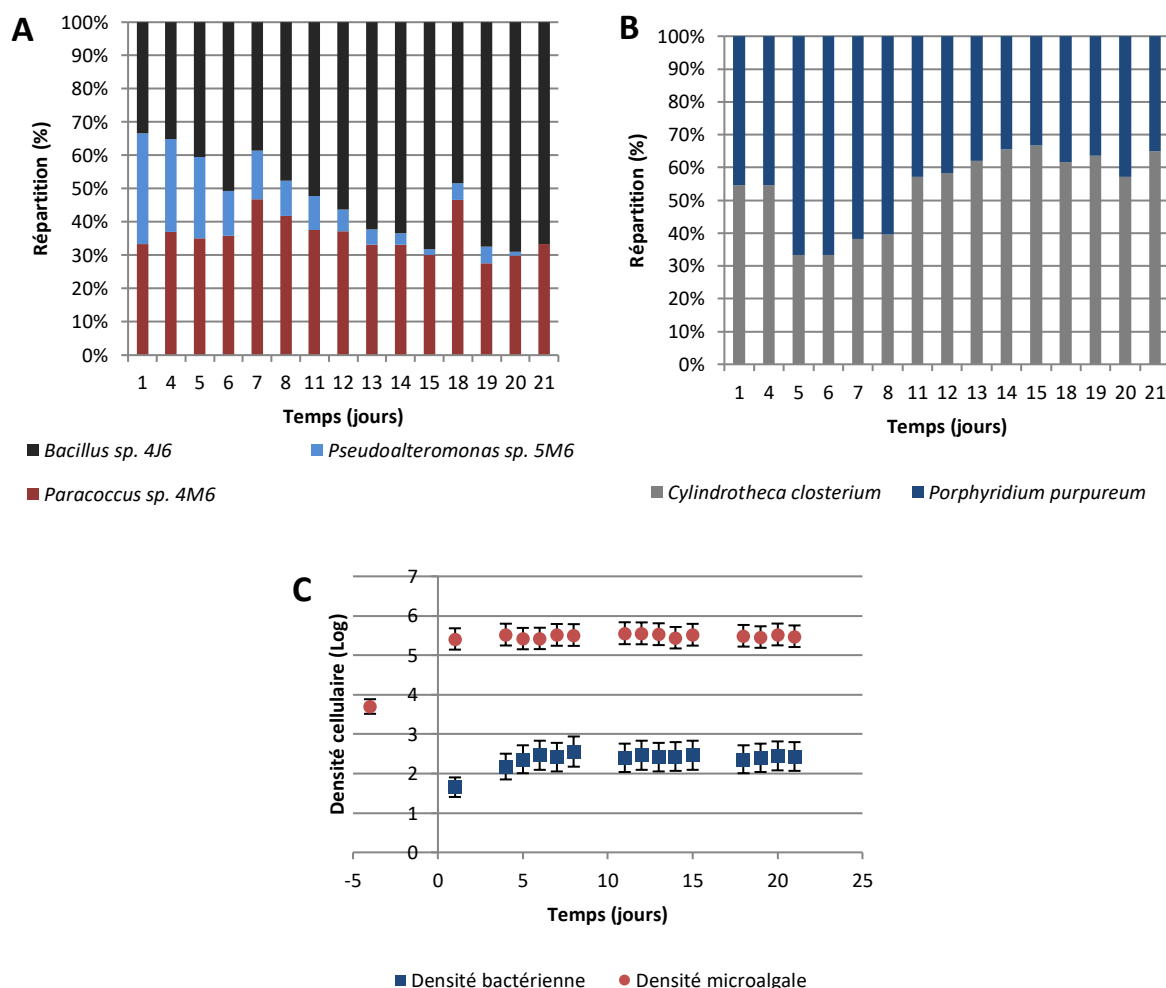


Figure IV-17: Suivi planctonique pour le circuit ouvert (trois bactéries, deux microalgues) : (A) répartition bactérienne obtenue par dénombrement des colonies sur milieu gélosé pendant 21 jours, (B) répartition microalgale obtenue par dénombrement sur cellule de *Malassez* pendant les 21 jours, (C) densité cellulaire : logarithme de la densité optique à 600 nm pour les bactéries ou de la fluorescence pour les microalgues en fonction du temps, les barres représentent les écarts-types

La répartition entre les deux microalgues présentée sur la Figure IV-17.B montre que la proportion entre les deux microalgues à l'état planctonique est relativement équilibrée. Environ 40 % de *P. purpureum* et 60 % de *C. closterium* sont dénombrés au cours de l'expérience. La répartition bactérienne est différente des méthodes précédentes. La Figure IV-17.A montre qu'après le 6^{ème} jour, le pourcentage de *Pseudoalteromonas sp. 5M6* diminue au cours du temps, tandis que la proportion de *Bacillus sp. 4J6* devient majoritaire et représente un peu moins de 70 % à la fin de l'expérience. Cette méthode permet de maintenir quatre organismes : les deux bactéries *Bacillus sp. 4J6*, *Paracoccus sp. 4M6* et les deux microalgues (*C. closterium* et *P. purpureum*) pendant les 21 jours.

Les Figure IV-18 et Figure IV-19 présentent les observations microscopiques réalisées sur les coupons de verre immergés dans le photobioréacteur et les biovolumes obtenus à partir de ces observations par le programme COMSTAT.

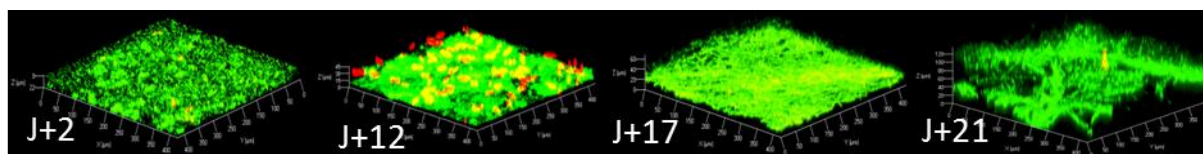


Figure IV-18 : Observations en MCBL (grossissement x20) des biofilms formés sur le verre immergé en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert (trois bactéries et deux microalgues) pendant 21 jours

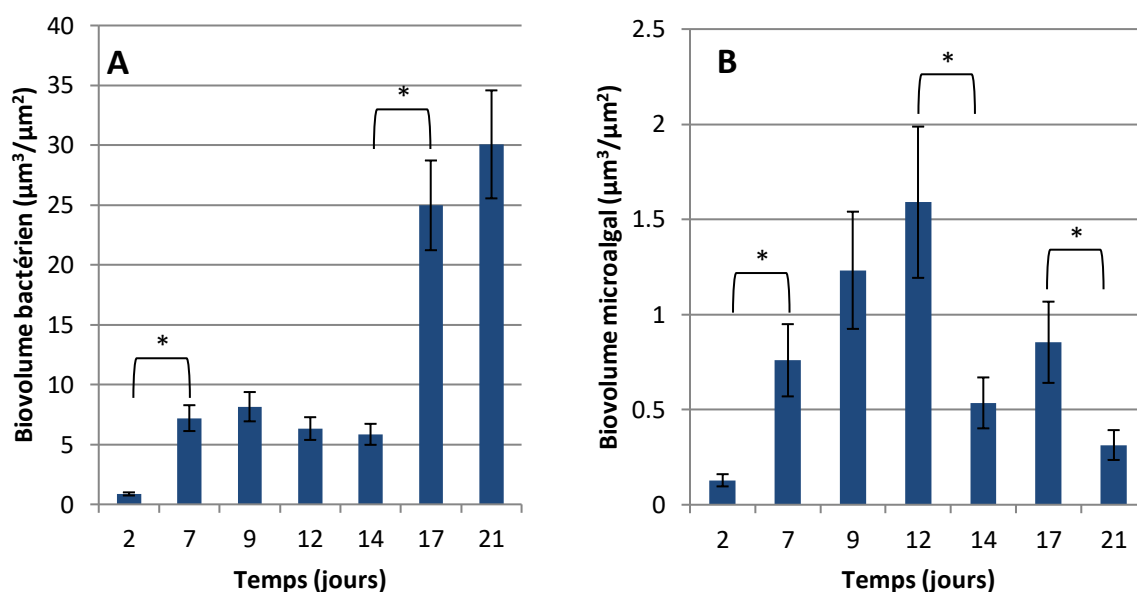


Figure IV-19 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ des biofilms formés sur le verre après immersion en conditions contrôlées selon la méthode en circuit continu : trois bactéries, deux microalgues pendant 21 jours (ANOVA, $p < 0,01$, *), les barres représentent les écarts-types

Dans cette troisième méthode, le biovolume microalgal (Figure IV-19.B) est plus important que précédemment ($0,7 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$). L'ajout de la seconde microalgue modifie considérablement le développement du biofilm. Toutefois, les observations réalisées en MCBL montrent que l'adhésion des microalgues n'était pas homogène. La Figure IV-20.A montre une observation après deux jours d'immersion. Sur cette image, les deux microalgues sont observables, *P. purpureum* étant majoritaire (60 %). *P. purpureum* a tendance à adhérer par groupe contrairement à *C. closterium* (Figure IV-20.B).

Des agrégats visibles à l'œil sont présents également dans l'enceinte du photobioréacteur et sur les coupons prélevés. Il est possible que *P. purpureum* induise la production d'un EPS en quantité plus importante que *C. closterium* dans les conditions testées conduisant à cette agrégation.

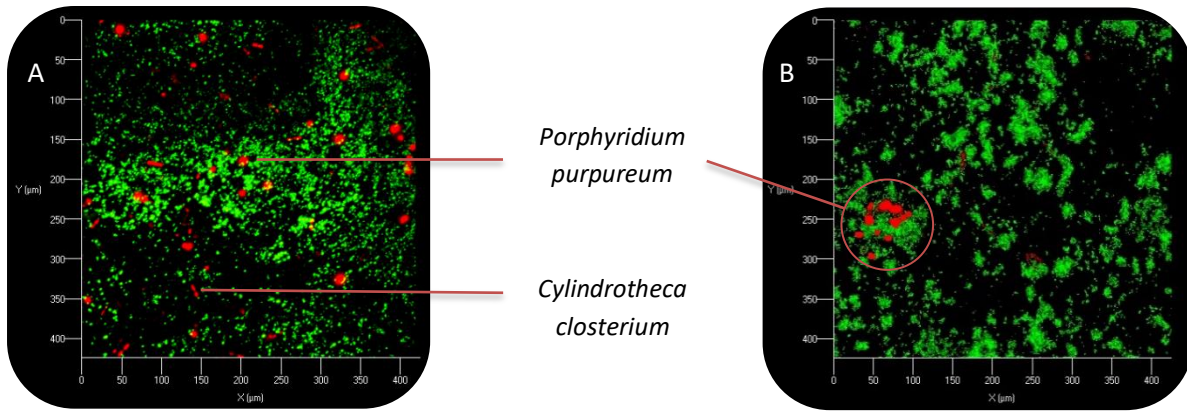


Figure IV-20 : A : Observation d'un coupon immergé 2 jours dans le photobioréacteur en MCBL (grossissement x 20) afin de visualiser les deux microalgues inoculées : *Cylandrotheca closterium* et *Porphyridium purpureum* en rouge par leur autofluorescence, B : observation d'un amas de *P. purpureum* sur un coupon en verre immergé pendant 2 jours

Les observations microscopiques couplées aux valeurs de biovolumes calculés montrent que le biovolume bactérien croît dès 2 jours, et se stabilise vers $8 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ jusqu'au 14^{ème} jour. Ensuite, le biovolume augmente d'un facteur de 3,5 et reste stable jusqu'à la fin de l'expérience. Cette augmentation du biofilm bactérien est corrélée aux observations microscopiques qui montrent que la bactérie forme des filaments. Ces bactéries filamenteuses sont observées sur la Figure IV-21. Ce phénomène a été observé sur les trois réplicats.

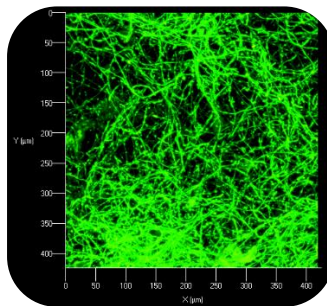


Figure IV-21 : Observation en MCBL (grossissement x20) des filaments sur le coupon verre au 21^{ème} jour d'immersion dans le cas de la méthode en circuit ouvert avec trois bactéries et deux microalgues

Cette observation corrobore avec celles obtenues en chambre à flux par la bactérie *Bacillus* sp. 4J6 (Figure IV-22).

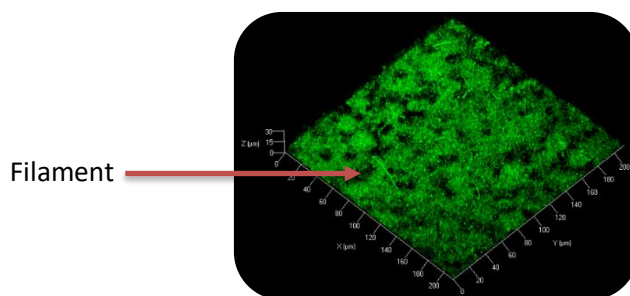


Figure IV-22 : Observation en MCBL du biofilm de *Bacillus* sp 4J6 à 48h en chambre à flux (chapitre II)

Il est possible que l'apparition de ces filaments sur les coupons dans le photobioréacteur résulte de la forte densité cellulaire de *Bacillus* sp. 4J6. La formation de filaments par les bactéries a déjà été observée dans la littérature.

Une étude de Pfeffer *et al.*, a montré qu'au niveau des sédiments marins, l'oxygène consommé par les microorganismes rendait anoxique l'environnement. Ces changements environnementaux induisent des stress auxquels les bactéries doivent s'adapter. Des bactéries de la famille des desulfobulbaceae se sont avérées capable de former des filaments, appelés micro-câbles. Ces filaments permettent le transport d'éléments nécessaires à la croissance comme l'oxygène (Pfeffer *et al.*, 2012).

Mais ce mode de vie en filament chez les bactéries est très peu décrit. Quelques études se sont intéressées à la composition de ces filaments bactériens. Ces filaments semblent favoriser les transports d'électrons et les réactions d'oxydation (Risgaard-Petersen *et al.*, 2015). Il est probable qu'au sein du photobioréacteur, la forte densité cellulaire après 14 jours d'expérience induise le passage à ce mode de vie filamenteux.

Pour les deux méthodes en circuit ouvert, en comparaison avec la méthode en circuit fermé, le renouvellement du milieu au sein du photobioréacteur permet d'obtenir des densités cellulaires plus importantes. Les microorganismes ne sont pas dans des conditions stressantes comme pour la méthode en circuit fermé. L'ajout d'une deuxième microalgue permet de maintenir une population plus diversifiée, en effet, jusqu'au 21^{ème} jour, quatre organismes sont dénombrés (deux bactéries et deux microalgues). Cependant, pour cette méthode, la formation d'agrégats sur les coupons, probablement dû à la production d'un EPS, ne permet pas d'obtenir une colonisation homogène. La méthode avec renouvellement de milieu où trois bactéries et une microalgue sont inoculées semble plus simple pour évaluer un revêtement.

II – B – Évaluation du DBHB

II – B – 1 – Activité du revêtement contenant le DBHB par immersion en milieu contrôlé

L'activité du DBHB est évaluée par la méthode avec renouvellement de milieu où trois bactéries et une microalgue sont inoculées. Cette méthode est choisie car la densité cellulaire n'est pas restreinte par le manque de nutriments et l'adhésion microalgale est plus homogène lorsqu'une seule microalgue est utilisée. De plus, pour cette méthode, la bactérie *Bacillus* sp. 4J6 ne filamente pas, permettant des observations microscopiques plus aisées.

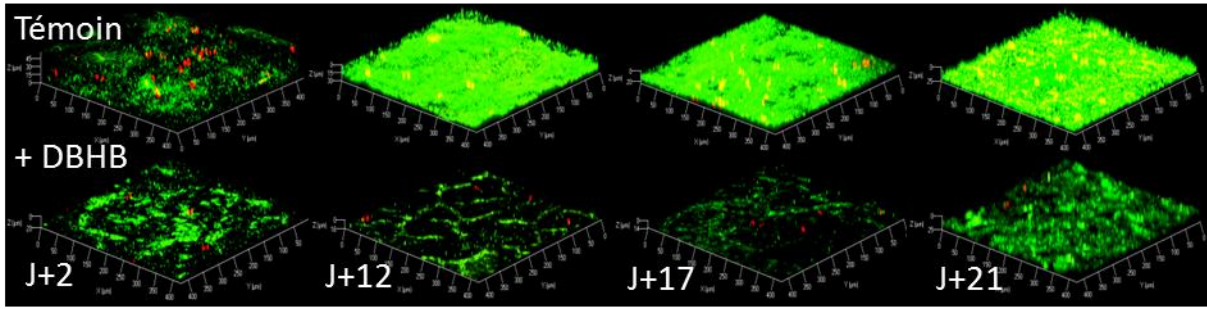


Figure IV-23 : Observations en MCBL (grossissement x20) des biofilms formés sur le vernis avec ou sans DBHB à 0,02 % en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert (trois bactéries et une microalgue), les bactéries sont visibles en vert (syto9®) et les microalgues en rouge (autofluorescence)

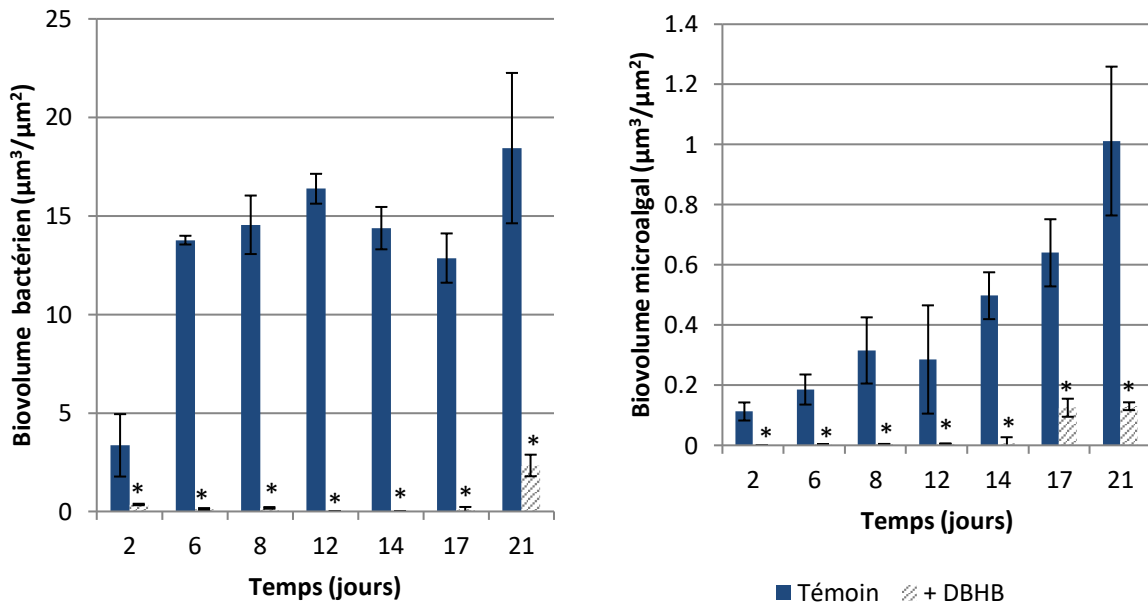


Figure IV-24 : Biovolumes bactériens (A) et microalgaux (B) en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ des biofilms formés sur le vernis avec ou sans DBHB à 0,02 % après immersion en conditions contrôlées selon la méthode en circuit ouvert : trois bactéries, une microalgue pendant 21 jours (ANOVA, $p < 0,01$, *), les barres représentent les écarts-types

Les observations microscopiques des coupons immergés dans le photobioréacteur ainsi que les biovolumes déterminés à partir des observations sont présentés sur les Figure IV-23 et Figure IV-24. Le développement du biofilm mixte (bactéries/microalgue) est validé sur le revêtement témoin. Le biovolume bactérien atteint environ $14 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ après 6 jours et reste stable pendant la durée de l'expérience. Le biofilm de microalgues croît avec le temps pour atteindre $1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ à la fin de l'expérience. La densité microalgale est significativement plus faible que celle des bactéries. Néanmoins, le revêtement semble plus propice à l'adhésion des cellules de *C. closterium* comparativement aux résultats obtenus sur le verre (partie II-A-1). Le biovolume atteignait un maximum après 6 jours d'expérience puis un détachement cellulaire était observé.

En comparaison au vernis témoin, les observations du biofilm montrent que l'ajout du DBHB à 0,02 % dans le vernis induit une réduction du biofilm mixte formé (88 % de réduction).

II – B – 2 – Comparaison des deux méthodes d'immersion : milieu naturel et contrôlé

Les résultats obtenus pour la méthode contrôlée confirment les résultats obtenus en milieu naturel. Le DBHB inhibe significativement le microfouling. Les deux méthodes sont comparées, les valeurs de biovolumes bactériens et microalgaux ainsi que les pourcentages d'inhibition sont présentés dans le Tableau IV-5.

Tableau IV-5 : Comparaison des biofilms formés sur les vernis avec ou sans DBHB immergés en milieu naturel ou contrôlé à 28 et 21 jours

		Milieu naturel (28 ^{ème} jour)	Milieu contrôlé (21 ^{ème} jour)
Biovolume bactérien ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	Témoin	10,8 ± 0,7	18,4 ± 3,8
	+ DBHB	1,6 ± 0,8	2,3 ± 0,5
	Pourcentage d'inhibition (%)	85,2	87,5
Biovolume microalgal ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$)	Témoin	21,1 ± 2,5	1,1 ± 0,2
	+ DBHB	0,3 ± 0,2	0,13 ± 0,03
	Pourcentage d'inhibition (%)	98,6	88,2

En comparant les deux méthodes d'immersion, les biovolumes bactériens sont 1,5 fois plus importants en milieu contrôlé. Cette différence est significative (ANOVA, $p < 0,01$). Pour les biovolumes microalgaux, l'écart est encore plus important puisqu'en milieu contrôlé il y a 20 fois moins de microalgues. Ces écarts peuvent être expliqués par les densités cellulaires ainsi que la diversité au niveau des espèces qui sont très largement différentes entre les milieux évalués.

Cependant l'ajout du DBHB dans les revêtements, induit des pourcentages d'inhibition semblables. Dans le cas des bactéries, les inhibitions ne sont pas significativement différentes entre les deux méthodes ($p > 0,05$). Pour les microalgues, une différence d'inhibition de 10 % est observée, cet écart est significatif ($p < 0,01$). Néanmoins, cette différence est causée par une densité microalgale 20 fois plus faible en milieu contrôlé. La diversité microalgale rencontrée dans ces deux conditions est très différente.

Les méthodes d'immersion en milieu naturel ou contrôlé sont différentes mais montrent une activité semblable des revêtements contenant le DBHB. Ces résultats valident l'activité du DBHB formulé sur le microfouling.

II – B – 3 – Étude de la toxicité des revêtements

Les revêtements avec ou sans DBHB n'ont montré aucun halo d'inhibition sur boîte de Petri ni envers les trois bactéries marines : *Paracoccus* sp. 4M6, *Pseudoalteromonas* sp. 5M6 et *Bacillus* sp. 4J6, ni envers les deux microalgues *C. closterium* et *P. purpureum*.

L'ajout de DBHB dans le revêtement n'induit pas de toxicité envers les organismes testés. Cette absence de toxicité est importante en vue d'une application dans le domaine de l'AF.

Malgré l'absence d'une toxicité, le composé formulé dans un revêtement est capable d'inhiber la formation d'un biofilm mixte. Le mécanisme cellulaire impliquant le DBHB n'est pas lié à la viabilité des cellules mais à leurs propriétés de colonisation des surfaces ou de formation de colonies.

L'utilisation de composés nocifs dans le passé a conduit à un durcissement de la législation dans la validation de substances dites AF. Les composés et peintures doivent démontrer une absence de toxicité envers des organismes référents. La réglementation des produits biocides (BPR) demande à ce que les composés dit AF soient dégradables, de faible toxicité et de haute activité.

Par exemple, le DCOIT, principe actif du seanine®, a été évalué sur différentes espèces : bactéries, microalgues, macroalgues, oursins, coraux, mollusques et crustacés. Les résultats obtenus permettent de valider l'absence de toxicité du DCOIT envers des organismes du milieu marin (Jacobson & Willingham., 2000).

III – Évaluation du DBHB sur le macrofouling

Après avoir validé l'activité du DBHB contre le microfouling en phase organique, l'activité de la molécule est étudiée sur le macrofouling. Les vernis contenant ou non le DBHB sont appliqués et immergés afin de suivre le développement du fouling pendant trois mois. Des plaques d'une superficie de 50 cm² sont photographiées toutes les semaines. Deux supports sont comparés : le vernis sans composé (témoin négatif) et le vernis avec la molécule DBHB. Les images obtenues sont présentées sur la Figure IV-25 et les facteurs d'intensité, de gravité et d'efficacité dans le Tableau IV-6.

Sur le témoin négatif, il est observé le développement d'algues brunes et vertes, ainsi que des espèces non encroûtantes comme les ascidies ou des hydraires. Les mêmes observations sont obtenues pour le vernis et le vernis contenant le DBHB.

Les observations et le calcul de l'indice d'efficacité pour les trois surfaces ne montrent pas d'inhibition du macrofouling lors de l'ajout de DBHB dans le revêtement.



Tableau IV-6 : Calcul des facteurs d'intensité, de gravité et d'efficacité pour le vernis avec ou sans DBHB à 0,02 %, (de juin à août 2017)

	Vernis	DBHB
Intensité	5	5
Gravité	4	4
Efficacité	20	20

Figure IV-25 : Photographies des vernis en phase organique contenant le DBHB immergés pendant trois mois en conditions naturelles

Des peintures commerciales, contenant des biocides, immergées dans la mer Méditerranée ou l’océan Atlantique, pendant 12 mois donnent des facteurs d’efficacité de 5 (Bressy *et al.*, 2014).

Différentes hypothèses peuvent être émises : i) les quantités utilisées sont insuffisantes pour des immersions aussi longues, ii) le DBHB ne possède pas d’activité contre les macroorganismes, iii) la formulation est simple, iiiii) le DBHB est rapidement libéré.

Pour répondre à ces hypothèses, des résultats publiés prouvent que la molécule est active sur le macrofouling. Le DBHB a déjà montré des propriétés inhibitrices sur des larves d’organismes supérieurs : larves de balanes et sur une enzyme intervenant dans les mécanismes d’adhésion de la moule (Ortlepp *et al.*, 2007 ; Niemann *et al.*, 2015). Néanmoins, il est possible que l’incorporation du DBHB au sein du revêtement inhibe son activité. Pour des immersions plus longues, la formulation nécessiterait d’être plus élaborée. Par exemple en incorporant des charges afin d’améliorer sa résistance. D’autre part, le suivi de la libération du DBHB hors du revêtement n’a pas montré de libération importante ne permettant pas d’expliquer la perte d’activité.

Le DBHB possède des propriétés d’inhibition du microfouling en formulation. L’incorporation du DBHB au sein d’un polymère biodégradable induit une inhibition significative du biofilm pendant 35 jours d’immersion. Cependant aucune inhibition du macrofouling n’est observée pendant les trois d’immersion. Il est possible que la formulation ne soit pas adaptée à des tests d’immersion aussi longs.

Par comparaison avec la littérature, des composés naturels ont montré des propriétés inhibitrices du macrofouling. Dans la littérature, Bellotti *et al* ont formulé des peintures à base de tanins. Les tanins sont des polyphénols produits par des plantes, inhibant l'adhésion des larves de balanes. Les peintures à base de tanins ont été immergées en milieu naturel (Argentine). Le développement des macroorganismes a été suivi sur ces peintures. En fonction des organismes adhérents, ils ont mis au point une échelle de degré de colonisation. Pour une des trois formulations testées, l'incorporation des tanins induit une efficacité de 80 % jusqu'à 10 mois d'immersion. Pour les deux autres formulations, après 4 mois d'immersions, le pourcentage d'efficacité était nul.

Dans cette étude, la formulation du tanin avec un liant à base de colophane et d'acide oléique a permis d'obtenir la meilleure efficacité. De plus l'ajout d'oxyde de zinc à la formulation augmente la durée de vie de la peinture. Pour les deux peintures moins efficaces, l'oxyde de zinc était remplacé par le tannate de zinc ou le dioxyde de titane (Bellotti *et al.*, 2012).

Tester le DBHB avec une formulation plus complexe comme celle présentée dans cette étude pourrait donc permettre de mieux évaluer ses propriétés sur le macrofouling.

Conclusion

Ce dernier chapitre présente la formulation de trois composés de la famille des batatasins (BAT III, BAT 47 et BAT 97) ainsi que trois composés de la famille des hemibastadins (Tyrosintyramid, NBHB et DBHB). Ces composés sont formulés dans un revêtement de p(CL-VL) à 0,02 % d'extrait sec. Le bilan des résultats de ce chapitre est présenté sur la Figure IV-26.

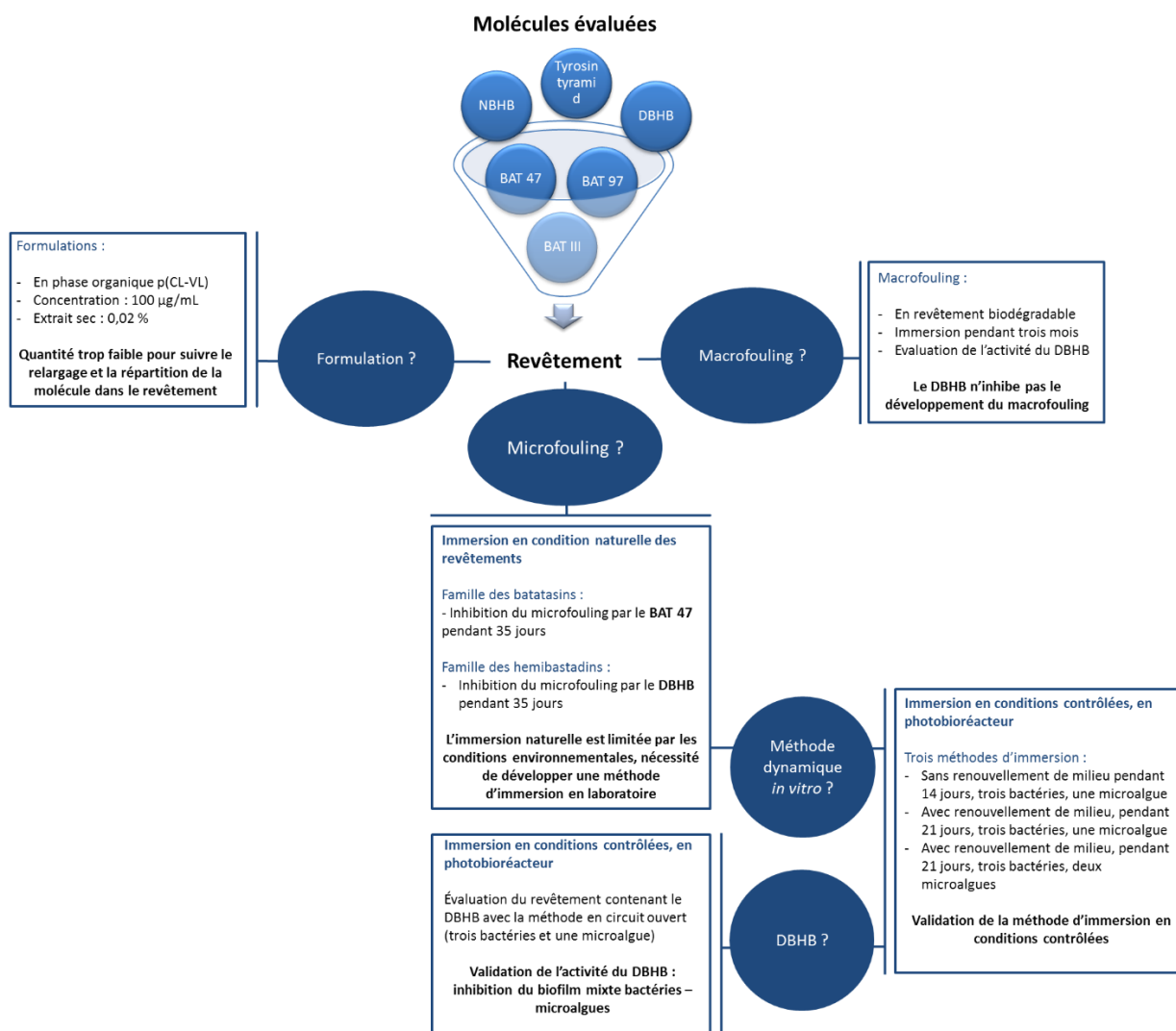


Figure IV-26 : Bilan des activités des substances formulées

L'activité de l'ensemble des revêtements est testée sur le microfouling naturel. Pour cette évaluation, les revêtements sont immergés en milieu naturel, au port de Kernevel à Lorient pendant un mois. Les observations hebdomadaires en microscopie confocale à balayage laser ont montré de plus fortes activités d'inhibition du microfouling pour les revêtements contenant le BAT 47 et le DBHB. Les contraintes d'immersion en milieu naturel ont conduit à la mise en place d'une méthode d'immersion

en laboratoire. Cette méthode permet de réaliser des tests toute l'année et de façon reproductible. La méthode développée permet la formation d'un biofilm mixte bactéries-microalgues en photobioréacteur. Le suivi est réalisé pendant 21 jours mais pourrait être prolongé.

Trois méthodes sont mises au point afin de déterminer les conditions les plus adaptées à l'évaluation de revêtements. Une des trois méthodes est utilisée pour évaluer les propriétés du revêtement contenant le DBHB. Cette immersion en milieu contrôlé à valider les propriétés AF de la molécule qui inhibe la colonisation de la surface par les bactéries et les microalgues.

Le revêtement contenant le DBHB a également été évalué sur le macrofouling. Les observations des vernis immergés pendant trois mois n'ont montré aucune inhibition du macrofouling pour ces revêtements. Le DBHB mériterait d'être formulé dans une peinture plus complexe afin de conserver plus longtemps ses propriétés AF. De par les tests menés, la molécule répond à de nombreux critères en vue d'une application AF. Le DBHB ne montre pas de toxicité vis-à-vis d'espèces référentes comme les artémias (Ortlepp *et al.*, 2007). La molécule est capable de perturber la communication bactérienne, la formation de biofilm (Chapitre II) et son activité est conservée dans un revêtement à une concentration faible. Dans le but d'évaluer la libération et la toxicité des produits de dégradation, des revêtements plus concentrés devraient être préparés mais les quantités disponibles n'étaient pas suffisantes. Les premiers résultats obtenus dans cette thèse font de la molécule DBHB un composé AF prometteur.

Bibliographie

- Avendaño-Herrera RE, Riquelme CE. 2007. Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications. *Aquacultural Engineering*. 36:97–104.
- Bellotti N, del Amo B, Romagnoli R. 2012. Tara tannin a natural product with antifouling coating application. *Progress in Organic Coatings*. 74:411–417.
- Bowman JP, McCammon SA, Brown MV, Nichols DS, McMeekin TA. 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol*. 63:3068–3078.
- Bressy C, Briand J-F, Compère C, Réhel K. 2014. Efficacy testing of biocides and biocidal coatings. In: Dobretsov S, Thomason JC, Williams DN, editors. *Biofouling Methods* p. 332–345.
- Bressy C, Hellio C, Maréchal JP, Tanguy B, Margailan A. 2010. Bioassays and field immersion tests: a comparison of the antifouling activity of copper-free poly(methacrylic)-based coatings containing tertiary amines and ammonium salt groups. *Biofouling*. 26:769–777.
- Bruckner CG, Bahulikar R, Rahalkar M, Schink B, Kroth PG. 2008. Bacteria Associated with Benthic Diatoms from Lake Constance: Phylogeny and Influences on Diatom Growth and Secretion of Extracellular Polymeric Substances. *Appl Environ Microbiol*. 74:7740–7749.
- Burgess JG, Boyd KG, Armstrong E, Jiang Z, Yan L, Berggren M, May U, Pisacane T, Granmo Å, Adams DR. 2003. The Development of a Marine Natural Product-based Antifouling Paint. *Biofouling*. 19:197–205.
- Doiron K. 2011. Approches dynamiques et fondamentales de la formation des biofilms marins mono et multi espèces. Doctoral dissertation, Université européenne de Bretagne.
- Faÿ F, Carteau D, Linossier I, Vallée-Réhel K. 2011. Evaluation of anti-microfouling activity of marine paints by microscopical techniques. *Progress in Organic Coatings*. 72:579–585.
- Faÿ F, Renard E, Langlois V, Linossier I, Vallée-Rehel K. 2007. Development of poly(ϵ -caprolactone-co-l-lactide) and poly(ϵ -caprolactone-co- δ -valerolactone) as new degradable binder used for antifouling paint. *European Polymer Journal*. 43:4800–4813.
- Forján E, Navarro F, Cuaresma M, Vaquero I, Ruíz-Domínguez MC, Gojkovic Ž, Vázquez M, Márquez M, Mogedas B, Bermejo E, et al. 2015. Microalgae: Fast-Growth Sustainable Green Factories. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 45:1705–1755.
- Gao D, Fu Y, Tao Y, Li X, Xing M, Gao X, Ren N. 2011. Linking microbial community structure to membrane biofouling associated with varying dissolved oxygen concentrations. *Bioresource Technology*. 102:5626–5633.
- Gawne B, Wang Y, Hoagland KD, Gretz MR. 1998. Role of bacteria and bacterial exopolymer in the attachment of *Achnanthes longipes* (Bacillariophyceae). *Biofouling*. 13:137–156.
- Gião MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. 2009. Validation of SYTO 9/Propidium Iodide Uptake for Rapid Detection of Viable but Noncultivable *Legionella pneumophila*. *Microb Ecol*. 58:56.
- Grasland B. 2002. Étude du rôle des interactions énergétiques et des communications intercellulaires dans la formation de biofilms bactériens en milieu marin. Doctoral dissertation, Lorient.
- Grossart H. 1999. Interactions between marine bacteria and axenic diatoms (*Cylindrotheca fusiformis*, *Nitzschia laevis*, and *Thalassiosira weissflogii*) incubated under various conditions in the lab. *Aquat Microb Ecol*. 19:1–11.

- Grossart H, Simon M. 2007. Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquat Microb Ecol.* 47:163–176.
- Grossart H-P, Czub G, Simon M. 2006. Algae–bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea. *Environmental Microbiology.* 8:1074–1084.
- Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology.* 146:2395–2407.
- Iyapparaj P, Revathi P, Ramasubburayan R, Prakash S, Palavesam A, Immanuel G, Anantharaman P, Sautreau A, Hellio C. 2014. Antifouling and toxic properties of the bioactive metabolites from the seagrasses *Syringodium isoetifolium* and *Cymodocea serrulata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 103:54–60.
- Jacobson AH, Willingham GL. 2000. Sea-nine antifoulant: an environmentally acceptable alternative to organotin antifoulants. *Science of The Total Environment.* 258:103–110.
- Lim CS, Lee SSC, Leong W, Xian YN, Teo SLM. 2014. A Short Review of Laboratory and Field Testing of Environmentally Benign Antifouling Coatings. *IJMS Vol43(11).*
- Murray RE, Cooksey KE, Priscu JC. 1986. Stimulation of Bacterial DNA Synthesis by Algal Exudates in Attached Algal-Bacterial Consortia. *Appl Environ Microbiol.* 52:1177–1182.
- Niemann H, Hagenow J, Chung M-Y, Hellio C, Weber H, Proksch P. 2015. SAR of Sponge-Inspired Hemibastadin Congeners Inhibiting Blue Mussel PhenolOxidase. *Marine Drugs.* 13:3061–3071.
- Obando Z. 2015. Caractérisation et valorisation de microalgues tropicales. Doctoral dissertation, Lorient.
- Ortlepp S, Sjögren M, Dahlström M, Weber H, Ebel R, Edrada R, Thoms C, Schupp P, Bohlin L, Proksch P. 2007. Antifouling Activity of Bromotyrosine-Derived Sponge Metabolites and Synthetic Analogues. *Mar Biotechnol.* 9:776–785.
- Pfeffer C, Larsen S, Song J, Dong M, Besenbacher F, Meyer RL, Kjeldsen KU, Schreiber L, Gorby YA, El-Naggar MY, et al. 2012. Filamentous bacteria transport electrons over centimetre distances. *Nature.* 491:218–221.
- Railkin A. I. 2003. *Marine Biofouling: Colonization Processes and Defenses.* CRC Press.
- Raposo MF de J, de Morais RMSC, Bernardo de Morais AMM. 2013. Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs.* 11:233–252.
- Rasmussen K, Østgaard K. 2000. In situ autofluorescence detection of a fouling marine diatom on different surfaces. *Biofouling.* 15:275–286.
- Risgaard-Petersen N, Kristiansen M, Frederiksen RB, Dittmer AL, Bjerg JT, Trojan D, Schreiber L, Damgaard LR, Schramm A, Nielsen LP. 2015. Cable Bacteria in Freshwater Sediments. *Appl Environ Microbiol.* 81:6003–6011.
- Sjögren M, Dahlström M, Göransson U, Jonsson PR, Bohlin L. 2004. Recruitment in the field of *Balanus improvisus* and *Mytilus edulis* in response to the antifouling cyclopeptides baretin and 8,9-dihydrobaretin from the marine sponge *Geodia barretti*. *Biofouling.* 20:291–297.
- Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA, Waldron K. 2004. Environmental Effects on Exopolymer Production by Marine Benthic Diatoms: Dynamics, Changes in Composition, and Pathways of Production1. *Journal of Phycology.* 40:293–304.

Yang L, Liu Y, Markussen T, Høiby N, Tolker-Nielsen T, Molin S. 2011. Pattern differentiation in co-culture biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Immunol Med Microbiol. 62:339–347.

Conclusions générales et perspectives

La recherche de composés antifouling respectueux de l'environnement est une thématique importante dans les études sur le biofouling. Cependant, la validation et mise sur le marché de ces composés sont complexes de par les problèmes environnementaux survenus dans le passé. Les molécules doivent démontrer une efficacité AF ciblée et ne pas induire d'effets secondaires sur les organismes marins non-ciblés. Généralement, l'activité de composés AF est décrite par des tests en laboratoire sur des organismes modèles impliqués dans le micro et/ou le macrofouling. Il est fréquemment retrouvé des bactéries marines, des microalgues (*C. closterium*, *Nitzschia* sp., *Halamphora* sp.), des invertébrés (*M. edulis*, *B. amphitrite*) ou des algues (*Ulva* sp.). Mais peu d'études s'intéressent aux activités de ces substances une fois formulées en revêtement. Pourtant la formulation peut parfois inhiber l'activité d'un composé en bloquant le site actif au sein du polymère formant le film. Une stratégie intéressante dans la recherche de composés antifouling respectueux de l'environnement est l'emploi de composés naturels ou d'analogues de synthèse. Ces composés sont présents naturellement dans le milieu, inhibant le biofouling à la surface des organismes et n'empêchent pas le développement des autres espèces marines.

Au cours de ce doctorat, l'activité de deux familles de composés naturels et d'analogues de synthèse (batatasins et hemibastadins) est étudiée sur deux types d'organismes impliqués dans le microfouling : les bactéries et les microalgues. Le criblage réalisé a permis de sélectionner les composés présentant soit une activité antibactérienne ou antimicroalgale ciblée ou à large spectre ou une absence de toxicité. Suite à ce criblage, les propriétés biologiques de huit composés appartenant aux deux familles sont étudiées sur la communication bactérienne, l'adhésion et la formation de biofilm bactérien. Ces tests n'ont pu être menés pour l'ensemble des composés car toutes les molécules n'étaient pas disponibles en quantité suffisante. Il s'agit d'un problème récurrent dans l'évaluation de composés naturels ou d'analogues de synthèse dont les quantités disponibles restent limitées pour une évaluation approfondie. Néanmoins, les expériences réalisées ont permis de mettre en évidence l'efficacité du composé DBHB, dérivé de bastadins naturels, isolés chez des éponges. Ce composé a montré des activités antibiofilm (10 µg/mL) et anti-quorum sensing (10 µg/mL). Le DBHB était déjà décrit dans la littérature comme un composé AF. En effet, cette molécule inhibe l'adhésion des larves de balane et de la moule.

Il n'a pas été possible de cibler précisément le mode d'action du DBHB au niveau bactérien. Des activités biologiques sont montrées, cependant nous n'avons pu mettre en évidence de lien direct avec le quorum sensing ou d'autres voies impliquées dans le quorum sensing et dans la formation de biofilm

(voies de phosphorylation par exemple). En perspective à ces travaux, il serait intéressant de réaliser une étude transcriptomique afin de cibler un ou plusieurs gènes dont l'expression pourrait être réprimée par l'ajout de cette molécule.

Suite à ces résultats envers les bactéries, le DBHB est étudié sur les microalgues (adhésion et formation de biofilm). Peu de travaux se sont intéressés à ces microorganismes, or ils participent fortement au biofouling. Il a été nécessaire de développer un test permettant l'étude de l'adhésion et de la formation de biofilm de microalgues en conditions dynamiques. Sur les deux microalgues évaluées, seule *C. closterium* est sensible au DBHB. L'adhésion de la diatomée est inhibée à 50 µg/mL et la formation du biofilm dès 1 µg/mL. Les microalgues semblent être des organismes plus sensibles que les bactéries aux composés des deux familles évaluées. La littérature suppose que le DBHB interagit sur les niveaux calciques intracellulaires. Chez les diatomées, le Ca²⁺ est décrit comme un messenger régulant de nombreux processus cellulaires : réponse au stress, division cellulaire, mobilité et mécanisme d'adhésion. Si le DBHB inhibe certaines de ces voies cellulaires, la colonisation des surfaces par les diatomées s'en trouve freinée. Cette inhibition de biofilms microalgaux a été observée uniquement chez une diatomée (*C. closterium*). Il serait important de valider cette activité envers plusieurs diatomées et microalgues afin de confirmer si l'activité du DBHB est spécifique aux diatomées. Un marquage par fluorescence du calcium pourrait être réalisé sur des cellules de *C. closterium* adhérees en présence et en absence de DBHB. Il serait possible de quantifier le calcium et d'observer sa répartition au sein de la cellule.

En inhibant à la fois la formation de biofilms bactériens et microalgaux, le DBHB semble être un candidat AF prometteur. Pour confirmer ses aptitudes AF, le composé a été formulé au sein d'un revêtement afin de tester son activité sur le microfouling naturel. Deux immersions au port de Kernevel de Lorient, en 2015 et en 2016, ont montré que l'ajout de DBHB à 0,02 % à un revêtement inhibait pendant 35 jours le microfouling naturel. Il aurait été intéressant de préparer des revêtements plus concentrés afin de prolonger éventuellement l'activité. Les conditions environnementales limitent le nombre d'immersion. En effet, entre octobre et avril, la température du milieu étant plus basse, la croissance des organismes est ralentie. De plus, les résultats en terme d'organismes adhéres ne sont pas reproductibles. Afin de s'affranchir de ces contraintes, une méthode d'immersion en conditions contrôlées, au sein d'un photobioréacteur est mise en place. Une méthode avec renouvellement de milieu a permis de valider l'activité anti-microfouling du revêtement contenant le DBHB pendant 21 jours. Actuellement, la méthode développée permet l'évaluation des surfaces sur la formation d'un biofilm mixte (bactéries et microalgues) mais il serait intéressant d'enrichir cette méthode en introduisant d'autres espèces : des larves de balanes, des spores d'algues, des cellules d'éponge...

Toutefois, l'identification de paramètres convenables (milieu, pH, température, exposition à la lumière, agitation, oxygénation...) permettant la croissance de plusieurs organismes est complexe.

Des immersions plus longues sur le site naturel ont également été réalisées afin de tester l'impact des revêtements de DBHB sur le macrofouling. Mais au-delà d'un mois d'immersion, les revêtements avec et sans DBHB sont fortement colonisés. La formulation testée au cours de ce doctorat est simple, l'élaboration d'une formulation plus complexe avec des charges ou des liants permettrait de prolonger peut-être la durée de vie du revêtement. Des tests de relargage et de répartition de la molécule au sien du film ont été testés mais les revêtements ne contenaient que peu de DBHB (0,02 %) ce qui n'a pas permis d'atteindre la limite de détection. La préparation de revêtements plus concentrés permettrait d'obtenir ces informations.

L'ensemble des travaux réalisés ont permis de mettre en avant le DBHB. Les résultats obtenus montrent que le DBHB possède des propriétés antibiofilm et anti-quorum sensing. De plus, la formulation de ce composé n'inhibe pas son activité. Des tests d'écotoxicologie ont montré dans la littérature que le DBHB ne possédait pas de toxicité envers certains indicateurs comme les artémias ou les larves de balanes et ces travaux n'ont pas montré de toxicité envers les bactéries et microalgues. En conclusion, le DBHB est un composé AF prometteur et respectueux de l'environnement.

Une autre partie des travaux de recherche s'est intéressée aux mécanismes d'adhésion chez les microalgues. Une étude préliminaire a montré que la topographie de surface impactait la capacité d'adhésion de la diatomée *Cylindrotheca closterium*. Son adhésion est inhibée lorsque la rugosité est supérieure à 10 µm. Suite à ces résultats, le projet bioadhésion étudiant l'effet de l'hydrophobie de surface sur l'adhésion de plusieurs organismes marins dont les microalgues a été mis en place. Les résultats ont montré que les microalgues n'allaient pas être impactées de la même manière. L'effet de la surface est fonction de la taille et de la morphologie de l'organisme étudié. Dans le but de comprendre ces différences de sensibilité entre les microalgues *C. closterium* et *P. purpureum*, il serait intéressant d'étudier les propriétés physico-chimiques des cellules : hydrophobie, affinité... Mais également, d'identifier le type d'EPS produits au cours des 24 heures d'adhésion. Ces EPS étant impliqués dans les mécanismes d'adhésion, il est probable qu'ils permettent l'adaptation des cellules aux paramètres physico-chimiques des surfaces.

Annexes

Annexe 1 : Code source du programme JAVA pour les pourcentages de recouvrement, mis au point par Claudia Zea Obando :

```

Package claudia ;
Import java.awt.Color ;
Import java.awt.image.BufferedImage ;
Import java.io.File ;
Import java.io.IOException ;
Import java.util.ArrayList ;
Import javax.imageio.ImageIO ;
Import jxl.write.WriteException ;
Public class TraitementImage{
    //listes utilisées pour stocker les noms des fichiers et
    //repertoires de l'arborescence
    Static ArrayList<String> mic = new ArrayList<String>();
    Static ArrayList<String> bact = new ArrayList<String>();
    Static ArrayList<String> trait = new ArrayList<String>();
    Static ArrayList<String> photo = new ArrayList<String>();

    //compteurs (1 pour chaque couleur primaire, plus le noir
    // et les valeurs négligées)
    Static ArrayList<Float> rouge1 = new ArrayList<Float>();
    Static ArrayList<Float> vert1 = new ArrayList<Float>();
    Static ArrayList<Float> bleu1 = new ArrayList<Float>();
    Static ArrayList<Float> noir1 = new ArrayList<Float>();
    Static ArrayList<Float> neglige1 = new ArrayList<Float>();

    //Parcours les dossiers contenus dans la racine
    Public static void parcourirDossier (String Racine){
        File repRacine = new File (Racine) ;
        File [] lesDossiers = repRacine.listFiles() ;
        For (int i=0 ; i<lesDossiers.length;i++){
            System.out.println(« analyse des images du dossier » +lesDossiers
            [i].getName()+ « en cours... ») ;
            parcourirDossierNiv1(lesDossiers[i]) ;
        }
    }
    // parcours les dossiers du niveau 1
    Private static void parcourirDossierNiv1(File file){
        File[] lesDossiers = file.listFiles() ;
        For (int i=0 ; i<lesDossiers.length;i++)
            parcourirDossierNiv2(lesDossiers[i]);
    }
    //parcours les dossiers du Niveau 2
    Private static void parcourirDossierNiv2(File file){
        File[] lesDossiers = file.listFiles() ;

```

```

        For (int i=0 ; i<lesDossiers.length;i++)
            parcourirDossierNiv3(lesDossiers[i]);
    }
    //parcours les fichiers images du niveau 3
    Private static void parcourirDossierNiv3(File file) {
File[] lesFichiers = file.listFiles() ;
        For (int i=0 ; i<lesFichiers.length;i++)
            If (lesFichiers[i].getName().contains("Snapshot")&&
                !lesFichiers[i].getName().contains("tif")){
                    //stockage du chemin de l'image dans l'arborescence
                    Mic.add(file.getParentFile().getParentFile().getName());
                    Bact.add(file.getParentFile().getName());
                    Trait.add(file.getName());
                    Int i1 = lesFichiers[i].getName().indexOf("Snap");
                    Int i2 = lesFichiers[i].getName().length()-4;
                    Photo.add(lesFichiers[i].getName().substring(i1,i2));
                    // lance le traitement sur une image
                    getHistogramme(lesFichiers[i]) ;
            }
        }
    }
    // traitement d'une image
    Public static void getHistogramme(File fichier){
        BufferedImage image=null;
        Try {
            Image = ImageIO.read(fichier);
        } Catch (IOException e) {
            e.printStackTrace();
        }
        If (image == null) return;

        // calcul du nombre total de pixels
        Int h =image.getHeight() ;
        Int w = image.getWidth();
        Float totale = h*w;
        Float mult = 100/totale;

        //recuperation des valeurs RGB des pixels de l'image dans la variable tab
        Int[] tab = new int [w*h]
        Image.getRGB(0, 0, w, h, tab, 0, w);

        // initialisation des compteurs
        Int vert = 0 ;
        Int rouge = 0 ;
        Int bleu = 0 ;
        Int noir = 0 ;
        Int neglige = 0 ;

        //comparaison des valeurs R, G et B d'un pixel
        For (int i=0 ; i<w*h ;i++){
            Color c = new Color(tab[i]);
            If (c.getBlue()>10 &&c.getBlue()>c.getGreen()&&c.getBlue()>c.get.Red())

```

```

        Bleu++; //couleur bleue dominante
    Else
        If(c.getGreen()>10&& c.getGreen()>c.getBlue()&&c.getGreen()>c.getRed())
        Vert++; // couleur verte dominante
    Else
        If (c.getRed()>10 &&c.getRed()>c.getBlue()&&c.getRed()>c.get.Green())
            rouge++; //couleur rouge dominante
        else
            // si RGB < 10, pixel considéré comme noir
            If ((c.getBlue()<10&&c.getGreen()<10&&c.getRed()<10 | |
            (c.getBlue()==c.getRed() | |c.getRed()==c.getGreen()))
                Noir++;
            Else{
                Neglige++; // on néglige le reste
    C=null;
        }
        Rouge1.add(rouge*mult) ;
    Vert1.add(vert*mult);
    Bleu1.add(vert*mult);
    Noir1.add(noir*mult) ;
    Neglige1.add(neglige*mult) ;
    }

    //fonction principale (lance le traitement des images) void traiter (String racine){
    parcourirDossier(racine) ;
    System.out.println(« creation fichier excel... ») ;

    //création du fichier Excel en utilisant JExcel comme
    //API (Application Programming Interface
    // voir http : //jexcelapi.sourceforge.net
    WriteExcel test = new WriteExcel();
    Test.setOutputFile("out.xls");
    Try{
        //appel d'une fonction non décrite dans ce document, créée
        // pour remplir le fichier excel avec les données trouvées
        Test.write(mic, bact, trait, photo, rouge1, vert1, bleu1, noir1, neglige1) ;
    } catch (WriteException|IOException e){
        //TODO Auto-generated catch block
    e.printStackTrace();
    }
    }
}

```

Annexe 2 : Diffusion scientifique

Communications orales

Congrès nationaux

Tiffany LE NORCY, Karine REHEL, Isabelle LINOSSIER, Claire HELLIO and Fabienne FAY. Study on the adhesion of microalgae, Les 9^{èmes} journées scientifiques de l'université de Toulon, Biofouling & Antifouling IV. Toulon, France, Avril 2015.

Tiffany LE NORCY, Claudia ZEA, Isabelle LINOSSIER, Karine REHEL and Fabienne FAY. Parameters and mechanisms adhesion in two microalgae strains, journées phycologiques de France. Vannes, France, Septembre 2015.

Tiffany LE NORCY, Claire HELLIO, Isabelle LINOSSIER, Karine REHEL, Fabienne FAY. Impact de deux dérivés d'hémibastadins sur l'adhésion et la formation de biofilm chez deux espèces bactériennes *Paracoccus* sp. 4M6 et *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Réseau National Biofilm. Toulouse, France, Décembre 2015.

Congrès internationaux

Tiffany LE NORCY, Hendrik NIEMANN, Peter PROKSCH, Claire HELLIO, Isabelle LINOSSIER, Karine REHEL and Fabienne FAY. Impact of a hemibastadin derivative on microfouling settlement. International Congress on Marine Corrosion and Fouling. Toulon, France, Juin 2016.

Tiffany LE NORCY, Karine REHEL, Isabelle LINOSSIER, Claire HELLIO, Fabienne FAY. Microalgae biofilm formation for the study of antifouling molecules. 11th Central European Diatom Meeting. Prague, République tchèque, Mars 2017. [Deuxième prix pour la meilleure présentation.](#)

Tiffany LE NORCY, Cyrille DECHANCE, Valentin FOULON, Karine REHEL, Isabelle LINOSSIER, Fabienne PONCIN-EPAILLARD, Claire HELLIO, Fabienne FAY. Impact of the roughness and surface hydrophobicity on marine organisms adhesion: focus on microalgae. International society for applied phycology 2017. Nantes, France, Juin 2017.

Posters

Congrès national

Claudia ZEA, Tiffany LE NORCY, Karine REHEL, Fabienne FAY and Isabelle LINOSSIER. Développement d'un biofilm mixte en photobioréacteur pour l'évaluation des revêtements marins. Journées phycologiques de France. Vannes, France, Septembre 2015.

Congrès international

Tiffany LE NORCY, Karine REHEL, Isabelle LINOSSIER, Claire HELLIO and Fabienne FAY. Ability of microalgae to form biofilm, International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Toulon, France, Juin 2016.

Tiffany LE NORCY, Claudia ZEA OBANDO, Isabelle LINOSSIER, Karine REHEL, Fabienne FAY and Claire HELLIO. Development of bacteria and microalgae biofilm in photobioreactor to evaluate antifouling surfaces. International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Toulon, France, Juin 2016.

Tiffany LE NORCY, Hendrik NIEMANN, Peter PROKSCH, Isabelle LINOSSIER, Karine REHEL, Claire HELLIO and Fabienne FAY. Sponge inspired two hemibastadins derivatives to prevent and to disrupt bacterial biofilms. Eurobiofilm, 5th European congress on microbial biofilms, Amsterdam, Pays-Bas, Septembre 2017.

Articles

T. Le Norcy, H. Niemann, P. Proksch, K. Tait, I. Linossier, K. Réhel, C. Hellio and F. Faÿ. 2017. Sponge-inspired Dibromohemibastadin prevents and disrupts bacterial biofilms without toxicity. *Mar. drugs* 15 :222.

T. Le Norcy, H. Niemann, P. Proksch, I. Linossier, K. Vallée-Réhel, C. Hellio and F. Faÿ. 2017. Anti-biofilm effect of biodegradable coatings based on hemibastadin derivative in marine environment. *Int. J. Mol. Sci* 18 :1520.

Résumé :

Le développement de salissures marines (ou biofouling) est à l'origine de nombreux problèmes économiques et écologiques. Ces salissures marines sont constituées de microorganismes (bactéries, microalgues...) formant le microfouling sur lequel se développe le macrofouling constitué de macroorganismes tels que les algues, coquillages et éponges. La formation de ces salissures induit un ralentissement des navires provoquant une surconsommation de carburant. De plus, l'utilisation de revêtements antisalissures ou peintures antifouling à base de métaux lourds et de biocides dans le passé a conduit à des problèmes environnementaux. L'objectif de la thèse est de rechercher une alternative aux composés actuellement utilisés (cuivre) en respectant le milieu marin. L'environnement est une source d'inspiration, une approche biomimétique pourrait être une stratégie de lutte efficace contre le biofouling.

Dans une première partie, un criblage d'une centaine de composés est réalisé contre des souches bactériennes. Huit composés issus des deux familles : les batatasins et les hemibastadines sont étudiées en vue de comprendre leurs modes d'action. Parmi les composés sélectionnés, la famille des hemibastadines comprenant le DiBromoHemiBastadine (DBHB) a montré des propriétés antifouling prometteuses. En effet, cette molécule est capable d'inhiber 50 % la formation du biofilm avec une CI_{50} = 6,44 μ g/mL pour la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 et une CI_{50} = 12,8 μ g/mL pour la bactérie marine *Paracoccus* sp. 4M6. Afin de comprendre le mode d'action de cette molécule, son impact sur la communication bactérienne, le quorum sensing est étudié et le composé DBHB est capable de l'inhiber.

Dans une seconde partie, un autre groupe d'organismes participant au microfouling est étudié : les microalgues. Afin d'évaluer l'impact de composés de la famille des hemibastadines et notamment du DBHB, l'adhésion et la formation de biofilm de microalgues sont étudiées. Le DBHB montre des inhibitions de l'adhésion et de la formation du biofilm uniquement envers la diatomée *Cylindrotheca closterium*.

Une dernière partie, s'est intéressée à l'évaluation de revêtements contenant six composés de la famille des batatasins et des hemibastadines sur le microfouling naturel. Une méthode d'immersion de revêtements en conditions contrôlées (photobioréacteur) est mise au point afin de pallier aux contraintes environnementales.

L'ensemble de cette étude a permis de mettre en évidence les propriétés antifouling du DBHB et de caractériser son mode d'action. Ce composé offre d'intéressantes voies d'étude dans la lutte contre le biofouling. De plus, l'approfondissement des connaissances sur les procédés d'adhésion et de formation de biofilm de microalgues permet de définir de nouvelles stratégies de lutte.

Mots clés : analogue, antibiofilm, anti-quorum sensing, biofouling, bioadhésion et composés naturels

Abstract:

Biofouling induces important economic and ecological problems. This phenomenon includes microorganisms (bacteria, microalgae...) giving the microfouling which allows the macrofouling development with algae, invertebrates and sponges. These organisms colonize every immersed surface as boat hull. The colonization induces reduced speed of ships and fuel overconsumption. In the past, the utilization of AF coatings with heavy metals or pesticides caused environmental problems. The purpose of the study is to find an alternative to AF compounds (copper) respecting the marine medium. The marine environment is an inspiration; a biomimetic approach could be an interesting strategy to inhibit biofouling.

In a first part, a screening of one hundred compounds is realized against marine and terrestrial bacteria. Eight molecules from two families (batatasins and hemibastadins) are studied to understand the way of action. Among selected compounds, Dibromohemibastadin (DBHB) from hemibastadin family shows promising AF activities. This molecule is able to inhibit the biofilm formation with an IC_{50} of 6,44 μ g/mL against the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and 12,8 μ g/mL for the marine bacterium *Paracoccus* sp. 4M6. To identify the way of action of DBHB, the impact on the bacterial communication named quorum sensing is investigated. The molecule shows an anti-quorum sensing property.

In a second part, another group participating at microfouling is studied: microalgae. In order to evaluate the impact of hemibastadin family in particular DBHB, microalgae adhesion and biofilm formation are characterized. DBHB induces inhibition only on the adhesion and the biofilm formation of the diatom *Cylindrotheca closterium*.

The last part presents the formulation of coatings containing six compounds from the batatasin and hemibastadin families. These coatings have been immersed in a harbor to evaluate the impact on natural microfouling. Furthermore, a new method for the evaluation of AF coatings is developed in controlled conditions, in a photobioreactor. This method allows the evaluation of coatings on the formation of a mixed biofilm (bacteria and microalgae). This method has been established to avoid environmental constraints by immersion in natural condition.

This study allows the characterization of the AF property of DBHB. This compound provides promising research path to limit biofouling. Moreover, the development of a test allowing adhesion and microalgae biofilm formation in dynamic condition improves the characterization of compounds activities.

Key words: antibiofilm, anti-quorum sensing, biofouling, bioadhesion, derivative, natural compounds