



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Irina RANDRIANJATOVO-GBALOU

le jeudi 4 février 2016

Titre :

Substances Exopolymériques de biofilms bactériens : Quantification in situ et Etude de leur rôle dans la cohésion de la matrice extracellulaire.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

Unité de recherche :

Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE, EA 4565)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Elisabeth GIRBAL-NEUHAUSER, Professeur, Université de Toulouse III

Claire-Emmanuelle MARCATO-ROMAIN, Maître de Conférence, Université de Toulouse III

Jury :

Romain BRIANDET - Directeur de Recherche INRA, Institut MICALIS
Jean-Claude BLOCK - Professeur Émérite, Université de Lorraine
Emmanuelle DE - Professeur, INP Université de Rouen
Damien SEYER - Maître de Conférence, Université de Cergy-Pontoise
Eric PINELLI - Professeur, INP-ENSAT

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

Au terme de la rédaction de ce manuscrit, je suis à présent convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais pas pu aller au bout de cette aventure doctorale sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de mon travail de recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti chercheur ».

En premier lieu, je tiens à remercier mes Directrices de Thèse, Elisabeth NEUHAUSER et Claire-Emmanuelle ROMAIN pour la confiance qu'elles m'ont témoignée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral et pour toutes les heures qu'elles ont consacrées à diriger cette recherche. Par leurs compétences complémentaires, j'ai pu bénéficier de conseils avisés et constructifs. Enfin, je tenais à leur dire que j'ai été extrêmement sensible aux qualités humaines d'écoute et de compréhension qu'elles m'ont témoignée tout au long de ce travail doctoral.

Mes remerciements vont également à Messieurs Romain BRIANDET et Jean-Claude BLOCK pour avoir manifesté un grand d'enthousiasme pour d'examiner mon travail de recherche en tant que rapporteurs.

De même, je suis particulièrement reconnaissante envers Monsieur Damien SEYER de l'intérêt qu'il a manifesté à l'égard de ma recherche et de sa disponibilité lors de mon initiation à la Microscopie confocale et à la spectroscopie infrarouge au sein du Laboratoire ERRMECe. Je tenais à le remercier également pour sa sympathie et surtout pour les conseils pertinents qui ont en grande partie orienté mes travaux. Par la même occasion, j'adresse mes vifs remerciements à Monsieur Patrick DiMARTINO, pour son accueil au sein du Laboratoire mais également pour les discussions très constructives que nous avons pu avoir au sujet de ma recherche.

Je souhaite aussi adresser ma gratitude à Eric PINELLI, Jérôme SILVESTRE et Laurent VERNEUIL pour leur générosité et leur accueil toujours chaleureux au sein de l'équipe ECSECO du Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement.

Je suis également honorée que Madame Emmanuelle DE ait accepté de faire partie de mon jury de soutenance.

Je pense également à Christine ROQUES, Yolaine BESSIERES, Etienne PAUL, Cathy FAUCHER et Bruno GABRIEL qui ont redoublé d'enthousiasme et d'un grand intérêt pour m'accompagner dans mon avancement en jouant leur rôle d'observateur lors des comités de Thèse. Vos conseils pertinents m'ont permis de préciser petit à petit mon sujet de recherche et ont enrichi ma stratégie expérimentale.

Je tiens à exprimer tout particulièrement ma reconnaissance et ma sympathie à :

- à tous les membres du LBAE : Dominique LEFEBVRE, Valérie LETISSE, Valérie GABRIEL, Hervé ROBERT, qui ont été tout d'abord des professeurs formidables, je n'oublierai jamais mes deux années passées à l'IUT avec vous, puis des collègues au top. Merci pour votre bonne humeur qui a su me redonner le sourire quand le moral n'y était pas.
- à l'équipe technique, Philippe RABIER, Eliane AURET, Isabelle RIBERA et Laurent BESSE, pour tout le support logistique, mais bien au-delà de ça, pour leur gentillesse et leur générosité.
- à la grande équipe pédagogique de l'IUT d'Auch, qui m'a aussi initiée à l'enseignement supérieur.
- aux jeunes stagiaires qui ont apporté un peu de dynamisme dans mon train-train quotidien. Tout d'abord stagiaires.... et à présent de bons amis. Petit clin d'œil à mon petit Louis, Célia, Mélissa, Pauline et Florie. Mention spéciale pour Maritxu, l'aventure commence pour toi !
- à nos voisins, l'équipe de choc du CESBIO ; merci pour votre soutien, vos éclats de rire depuis la salle de pause, votre humour. Je vous promets de m'accorder au moins une pause-café par jour à l'avenir...
- à Coralie, actuellement en Post-Doc au LBAE, je suis contente d'avoir fait ta connaissance. Je te remercie pour tes conseils et ton expérience de « doctorante » qui ont su me rassurer dans les périodes les plus dures.

Je clôture à présent mes remerciements en m'adressant à ceux qui ont assuré le soutien affectif de ce travail acharné : mes parents, mon frère et ma soeur ainsi que la famille GBALOU.

Tout ce que j'ai pu accomplir aujourd'hui est possible en grande partie grâce à ma Maman, mon Exemple de courage et de persévérance.

Enfin...infiniment un grand Merci à mon cher Mari qui a fait preuve de patience, d'attention et de compréhension. Tout ce que j'ai pu accomplir ces trois dernières années reposait sur son soutien moral et affectif sans faille.

RESUME

Les biofilms représentent une contrainte technologique dans le secteur industriel et sont à l'origine de nombreux cas d'infections chroniques dans le domaine médical. De ce fait, la compréhension des processus biologiques qui s'opèrent au sein de ces communautés microbiennes est un défi permanent. Des méthodes spécifiques, sensibles et diversifiées s'avèrent essentielles pour apporter une connaissance approfondie de l'organisation des biofilms en réponse à des facteurs environnementaux. La matrice extracellulaire qui englobe les microorganismes constitue un réseau complexe, et la description de sa composition et de sa structure constitue un enjeu majeur.

Des outils de caractérisation *in situ* et non-destructifs des Substances Exopolymériques (SEP) ont pu être proposés lors de ce travail de thèse : des méthodes de quantification ciblant spécifiquement chaque composant majeur de la matrice extracellulaire ont ainsi été développées et validées sur des biofilms modèles. Ces biofilms, choisis pour leur diversité en terme de matrice extracellulaire sont formés par les souches *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus licheniformis* CIP 110824 et *Weissella confusa* LBAE-UPS C39-2.

Des critères communs ont été retenus pour guider le choix des marqueurs retenus pour développer les dosages : spécificité pour la détection de toutes les formes moléculaires d'une même famille biochimique, sensibilité pour la détection de faibles quantités de polymères dans des biofilms en microplaque, et possibilité d'observation en microscopie basée sur la détection de fluorescence.

Une stratégie commune a été adoptée pour la quantification des exoprotéines (ePN), exopolysaccharides (ePS) et fibres amyloïdes (FA) de la matrice et a consisté à : (i) définir une molécule standard pour calibrer le test ; (ii) analyser d'éventuelles interférences en solution ; (iii) valider la faisabilité et la fiabilité du test *in situ* par la méthode des ajouts dosés réalisée sur chacun des biofilms modèles.

Un composé naturel pro-fluorescent, l'épicoconone, a été retenu pour la quantification des exoprotéines. Le test a montré une limite de détection de 0,2 µg par puits, sans aucune interférence significative des autres composants majeurs du biofilms (ePS, ADNe, cellules). D'autre part, les protéines sous forme amyloïdes ont pu être détectées avec la même sensibilité que les non amyloïdes par ce marqueur. Par la suite, les exopolysaccharides ont été dosés en exploitant la réaction de Schiff, et la méthode a permis d'obtenir une limite de détection de 0,3 µg par puits.

Les protéines amyloïdes bactériennes (FA) ont également été quantifiées au moyen du marqueur Thioflavine T. La κ-caséine a été utilisée comme étalon, après fibrillation de la protéine native *in vitro*. Deux types de dosages ont été développés : le dosage *ex situ* de FA extraites de biofilms bactériens et le dosage *in situ* des protéines amyloïdes au cœur des biofilms. Enfin l'ADN extracellulaire (ADNe) a également été quantifié à partir du PicoGreen® tout en contrôlant le temps d'exposition du marqueur avec les biofilms afin de ne marquer que l'ADN extracellulaire. Un profil quantitatif des SEP a ainsi pu être établi pour les trois souches modèles.

Le second objectif du travail s'est focalisé sur la compréhension du rôle des SEP dans les propriétés d'adhérence et de cohésion du biofilm de *Bacillus licheniformis*, responsable de la colonisation de surfaces dans l'industrie papetière. Les outils ainsi développés ont permis d'étudier la contribution de chaque composé matriciel (ePN, ePS, FA, ADNe) dans le comportement du biofilm, en réponse à des actions enzymatiques. La combinaison de ces dosages à des observations en microscopie confocale et à des mesures de perméabilité du biofilm a alors permis de proposer une interaction possible entre les fibres amyloïdes et l'ADN extracellulaire. Ce complexe stable pourrait agir comme facteur d'adhérence et d'agrégation intercellulaire pour assurer la stabilité et la structure tridimensionnelle du biofilm.

MOTS-CLES : *Bacillus licheniformis*, quantification, in situ, adhérence, cohésion, amyloïdes, ADNe

ABSTRACT

Biofilms are detrimental in many industrial and medical areas and understanding of biofilms processes has been a challenge for decades. Specific, sensitive and rapid methods for monitoring biofilm formation are essential for a deep knowledge of biofilm organization and response to environmental factors. In such complex network that constitutes the biofilm matrix, it has become a major issue to succeed in describing its composition and local structure to determine the interactions that govern the biofilm formation.

Non-destructive and in situ methods for Exopolymeric Substances (EPS) characterization were proposed along this PhD work. The first aim of the study was to propose some quantitative tools that would specifically target each major compound of the biofilm matrix. Some performance criteria were commonly established to guide the choice of each dye and to validate each step of the analytical development. These requirements can be displayed in terms of biochemical specificity, sensitivity and applicability on fluorescence-based microscopy. A common experimental strategy was carried out to quantify the exoproteins (ePN), exopolysaccharides (ePS) and amyloid fibrils (AF) and aimed at (i) choosing a calibration standard; (ii) analyzing in vitro interferences; (iii) validating the practicability and the reliability of each proposed method for an in situ implementation on biofilms. This last criteria was verified by implementing the Standard Addition Method (SAM).

For that purpose, a first method was developed to take advantage of a natural pro-fluorescent dye, called epicocconone, to quantify the ePN of three model bacterial biofilms formed by the strains *Bacillus licheniformis* CIP 110824, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and *Weissella confusa* LBAE-UPS C39.2. The three bacterial models were chosen because of their contrasted EPS matrix composition. This method showed a detection limit of about 0.2 μ g per well and no significant interference were revealed. Moreover the epicocconone assay was able to quantify the AF with the same sensitivity as the other proteins. Subsequently, exopolysaccharides from the same strains were assayed by applying the Periodic acid-Schiff reaction in a microplate format. This chemical reaction targets the majority of the hydroxyl groups of carbohydrate and allows to give an exhaustive estimation of the sugar content of the matrix with a detection limit of 0.3 μ g per well. Bacterial amyloids were also specifically quantified by the using of the benzothiazole dye Thioflavine T (ThT). An amyloidogenic protein, the κ -casein, was used as standard after an in vitro fibrillation of the native form. Two types of assay were performed with, firstly, an ex situ quantification of the extracted AF and secondly, an in situ assay directly implemented on intact biofilms. The eDNA was assayed by using the PicoGreen[®] and the dye exposure-time was monitored to ensure the specificity for the extracellular DNA. These tools led to establish a quantitative EPS profile of each model biofilm.

In a second part of the work, the study aimed at bringing some contribution to the understanding of the implication of the EPS in the adherence and cohesiveness properties of a *Bacillus licheniformis* biofilms, an agent of the paper industry surfaces colonization. The previously developed tools were useful to assess the level of contribution of each matrix component in the biofilm structural behavior in response to enzymatic actions. The combination of multiparametric analyses allowed to conclude about the possible interaction between functional amyloids and extracellular DNA as a strong complex that acts as an aggregative and adhesive factors to ensure biofilm stability and tridimensional structure.

KEYWORDS: *Bacillus licheniformis*, in situ quantification, adherence, cohesiveness, amyloids, eDNA.

Table des matières

Production scientifique.....	12
Publications dans des revues internationales	12
Communications orales.....	13
Posters.....	13
Introduction générale	14
PARTIE A – Etude bibliographique.....	19
I. Les Biofilms : universalité et diversité	20
I.1. Processus de formation des Biofilms.....	20
I.1.1 Biofilms adhérents aux surfaces	20
I.1.2 Biofilms sous-forme de colonies à l’interface air-solide	22
I.1.3 Pellicules à l’interface air-liquide.....	24
I.1.4 Communication intercellulaire : Quorum-Sensing	26
I.2. Structure et composition de la Matrice Extracellulaire	30
I.2.1 Matrices Extracellulaires de biofilms modèles fréquemment étudiés.....	30
I.2.2 Exemples de matrice Extracellulaires de biofilms multi-espèces.....	38
I.2.3 Influence des facteurs environnementaux.....	40
II. Les Substances Polymériques Extracellulaires : éléments d’architecture et de stabilité du biofilm.....	45
II.1 Les Exopolysaccharides matriciels.....	45
II.1.1 Les exopolysaccharides impliqués dans l’agrégation.....	46
II.1.2 Les polysaccharides de protection	48
II.1.3 Les polysaccharides de charpente	51
II.1.4 Les polysaccharides capsulaires	53
II.2 L’ADN extracellulaire	54
II.2.1 Origine et structure	55
II.2.2 ADN impliqué dans l’adhésion cellulaire.....	57
II.2.3 ADN impliqué dans l’agrégation des SEP et l’intégrité structurale du biofilm....	59
II.3 Les Exoprotéines matricielles	60
II.3.1 Les protéines de surface.....	61

II.3.2	Les protéines amyloïdes : structures-clés pour l'intégrité des biofilms	66
II.3.3	Les protéines liées aux exopolysaccharides.....	73
II.3.4	Les protéines liées à l'ADN.....	75
II.3.5	Les hydrolases.....	77
II.3.6	Récapitulatif des principales exoprotéines.....	79
II.4	Méthodes d'altération de la matrice extracellulaire.....	82
II.4.1	Stratégie antimicrobienne	83
II.4.2	Actions physico-chimiques.....	84
II.4.3	Traitements biologiques.....	86
III.	Méthodes d'analyse des Substances exopolymériques de biofilms.....	89
III.1.	Approches qualitatives.....	89
III.1.1.	Organisation tridimensionnelle par microscopie.....	89
III.1.2.	Analyse des propriétés biochimiques	93
III.1.3.	Analyse des propriétés physico-chimiques.....	107
III.2.	Approches quantitatives.....	110
III.2.1	Quantification <i>ex situ</i>	110
III.2.2	Dosages des SEP	117
III.2.3	Evaluation de la viabilité et quantification du biofilm total.....	124
III.2.4	Éléments de conclusion sur les méthodes d'analyse ex situ des SEP.....	126
III.2.5	Quantification <i>in situ</i>	129
	Conclusion de l'étude bibliographique.....	131
	Partie B – Modèles d'étude et Stratégie expérimentale	136
I.	Présentation des souches à l'étude.....	137
I.1.	Description générale des souches.....	137
I.1.1.	Une souche de référence multi-résistante : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 15442™	137
I.1.2.	Une souche à Gram positif sporogène : <i>Bacillus licheniformis</i> CIP 110824.....	138
I.1.3.	Une souche de bactérie lactique : <i>Weissella confusa</i> LBAE C39-2.....	140
I.2.	Caractérisation globale et comparaison des matrices des biofilms modèles	141
I.2.1.	Matériel et méthodes.....	141
I.2.2.	Morphologie et propriétés chimiques des macro-colonies développées sur membrane.....	144

Conclusion sur le choix des modèles d'étude.....	149
II. Stratégie expérimentale et formation de biofilms.....	151
II.1 Démarche générale pour répondre à l'objectif 1.....	151
II.2 Démarche générale pour répondre à l'objectif 2.....	154
II.2.1. Formation des biofilms dans le cadre de l'étude.....	154
PARTIE C – RESULTATS.....	156
Chapitre I : Dosage <i>in situ</i> des exoprotéines et des exopolysaccharides de biofilms bactériens modèles.....	157
I. Dosage <i>in situ</i> des protéines extracellulaires (ePN) de biofilms bactériens.....	160
I.1. Résultats préliminaires et choix de l'Épicoconone	161
I.2. Présentation de l'Article 1 : développement et validation d'une méthode de dosage <i>in situ</i> des ePN	162
Article 1: "Épicoconone, a sensitive and specific fluorescent dye for <i>in situ</i> quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms."	164
I.3. Résultats complémentaires : détection des fibres amyloïdes par l'épicoconone... ..	175
II. Quantification <i>in situ</i> des exopolysaccharides (ePS).....	176
II.1 Etude préliminaire : caractérisation des ePS des biofilms modèles au moyen de lectines et choix d'un étalon.....	177
II.2 Présentation de l'article 2 : développement et validation d'une méthode de dosage <i>in situ</i> des ePS	182
Article 2 : "Quantification of biofilm exopolysaccharides using an <i>in situ</i> assay with Periodic Acid Schiff reagent"	185
II.3 Résultats complémentaires	192
II.3.1 Application du PAS pour l'observation des ePS en microscopie à épifluorescence	192
II.3.2 Comparaison des approches quantitatives <i>in situ</i> développées dans l'étude à des approches qualitatives microscopiques	193
CHAPITRE II : Caractérisation et quantification <i>in situ</i> des fibres amyloïdes de biofilms modèles.....	196
I. Production de fibres de κ -caséine.....	199
I.1. La κ -caséine, une protéine amyloïdogène.....	199
I.2. Fibrillation de la κ -caséine.....	199
II. Dosage <i>ex situ</i> des fibres amyloïdes.....	202

Article 3 : "Quantification of Amyloid Fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection"	207
III. Dosage <i>in situ</i> des fibres amyloïdes au sein de biofilms bactériens modèles.....	211
Chapitre III : Etude de l'implication des SEP dans les mécanismes d'adhérence et de cohésion du biofilm de <i>Bacillus licheniformis</i>	226
I. Etude préliminaire.....	228
I.1. Dosage in situ de l'ADN extracellulaire.....	228
I.1.1 Matériel et méthodes.....	228
I.1.2 Résultats et discussion	228
I.2. Bilan et composition en SEP majoritaires des biofilms des 3 souches modèles.....	230
II. Etude de l'implication des fibres amyloïdes et de l'ADN extracellulaire dans l'adhérence et la cohésion des biofilms de <i>Bacillus licheniformis</i>	232
II.1 Présentation de l'article 4.....	232
Extracellular Amyloid-DNA Complexes Contribute to Adherence and Cohesiveness of <i>Bacillus licheniformis</i> Biofilms	234
II.2 Résultats complémentaires: Proposition d'un modèle d'architecture du biofilm de <i>B.licheniformis</i>	261
Conclusion générale et perspectives	263
Références bibliographiques.....	272
Liste des abréviations.....	298

Table des illustrations

Partie A : Introduction bibliographique

Figures

FIGURE A-1. Les biofilms adhérents aux surfaces.....	21
FIGURE A-2 Etapes de formation d'un biofilm.....	22
FIGURE A-3. Exemple d'espèces bactériennes présentant un phénotype de colonies ridées	23
FIGURE A-4. Localisation des cellules mortes à l'origine de la formation des colonies ridées de biofilms matures de <i>B. subtilis</i>	24
FIGURE A-5. Exemple d'espèces bactériennes formant des pellicules aux interfaces air-liquide.....	26
FIGURE A- 6. Régulation de la formation du biofilm par le QS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
FIGURE A-7. Schéma des mécanismes de quorum sensing chez a) les Gram négatifs, b) les gram positifs et c) chez la bactérie pathogène <i>Vibrio harveyi</i> , possédant deux systèmes de signalisation intra et inter-espèces : AI-1 et AI-2	30
FIGURE A-8. Biofilms de <i>B.subtilis</i> cultivés en laboratoire.....	31
FIGURE A-9. Organisation des SEP de la matrice du biofilm de <i>Bacillus subtilis</i>	34
FIGURE A-10. Mécanisme de formation du biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et composés majoritaires de la matrice	35
FIGURE A- 12. Structure des exopolysaccharides produits par les LABs. a) Dextrane, b) Mutane, c) reutéran, d) inuline, e) Levane.....	37
FIGURE A-13.Viabilité cellulaire des biofilms (.) et des cellules planctoniques en phase stationnaire (.) et en phase exponentielle(o) de <i>Lb. plantarum</i> JCM1149.....	38
FIGURE A-14. Détection des adhésines amyloïdes dans des boues activées par marquage à l'aide d'un anticorps anti-WO1 (a) ou le marqueur thioflavine T (ThT) (b), tous deux spécifiques des fibres amyloïdes et couplés à l'iodure de propidium (en rouge).....	39
FIGURE A-15.Observation en microscopie confocale de granules aérobies	40
FIGURE A-16. Modèle structural des granules aérobies, proposé par Caudan et al. (2014)	40
FIGURE A-16. Structure chimique des polysaccharides impliqués dans la formation des biofilms.....	47
FIGURE A-17. Structure développée du dextrane, un homopolymère de glucose produit par les souches de bactéries lactiques, notamment <i>W.confusa</i>	51
FIGURE A- 18. Structure du PNAG	52
FIGURE A-19. Organisation spatiale de la capsule de la souche <i>K. pneumoniae</i> K218 en présence, en absence, et en cas de surproduction de fimbriae de type III.....	54
FIGURE A-20. Représentation schématique des mécanismes de relargage de l'ADN extracellulaire par lyse cellulaire chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif.	56
FIGURE A-21. Représentation schématique des interactions opérées par l'ADN extracellulaire avec les polymères, les métabolites, les cellules et la surface, permettant l'initiation de la formation des biofilms.....	59

FIGURE A-22. (A) Modèle structural du réseau formé par l'ADN extracellulaire et les protéines IHF pour stabiliser le réseau matriciel du biofilm de la bactérie <i>Haemophilus influenzae</i>	60
FIGURE A-23. Similitudes structurales entre les protéines Bap de <i>S.aureus</i> (V329) et Esp d' <i>E. faecalis</i> (souche MMH594).....	62
FIGURE A-24. Analyse <i>in situ</i> de la localisation de la protéine BslA au sein d'un biofilm de <i>B. subtilis</i>	65
FIGURE A-25. Structure cristalline de BslA.....	66
FIGURE A-26. Illustration du processus de repliement des monomères protéiques pour aboutir à la formation de fibres amyloïdes.....	68
FIGURE A-27. Mise en évidence des fibres amyloïdes de TasA de <i>B.subtilis</i>	71
FIGURE A-28. Représentation schématique de l'opéron <i>fapA-F</i> et mécanisme d'assemblage des sous-unités protéiques pour la formation de la fibre de FapC.....	72
FIGURE A-29. Micrographe électronique d'un biofilm de la souche <i>H. influenzae</i> 1128 formé sur des cellules oropharyngées humaines.....	75
FIGURE A-30. Structures cristallines des protéines de la famille DNABII.....	76
FIGURE A-31. Images de colonies formées par la souche sauvage de la bactérie <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> produisant la Dispersine B et de la souche mutante.....	77
FIGURE A-32. Agencement des chaînes de muréine dans la paroi bactérienne.....	78
FIGURE A-33. Stratégies anti-biofilms engagées à chaque étape du développement visant à prévenir ou à dissoudre le biofilm.....	83
FIGURE A-34. La D-tyrosine entraîne le relargage des fibres de TasA.....	85
FIGURE A-35. Implication de l'ADNe dans l'adhésion des cellules à la surface et pontage des différents biopolymères mis en évidence par l'action de la DNase I sur la matrice.....	87
FIGURE A-36. Modèle structural de la matrice extracellulaire de la bactérie <i>Haemophilus influenzae</i> composée principalement d'ADNe et de protéines IHF formant un réseau en grillage autour des cellules.....	87
FIGURE A-37. Cinétique de formation d'un biofilm papetier produit à l'échelle pilote, sans traitement ou après application en spray d'un mélange de thymol-carvacrol à 1mM sur la surface pendant 1 jour ou 6 jours.....	88
FIGURE A-38. Comparaison d'images obtenues par CLSM et par MEB conventionnelles d'un biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
FIGURE A-39. Biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> observés par SEM, Cryo-SEM et de E-SEM.....	91
FIGURE A-40. Différents mode de liaison des marqueurs fluorescents aux acides nucléiques.....	94
FIGURE A-41. Comparaison des marqueurs d'acides nucléiques pour la visualisation de l'ADN extracellulaire de biofilms de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	96
FIGURE A-42. Triple marquage des ePS d'un biofilm de rivière.....	98
FIGURE A-43. Biofilms de <i>Pseudomonas syringae</i> de 9-10 jours dont les ePS sont marqués par la ConA-FITC ou avec une lectine de <i>Naja mossambica</i> conjuguée au fluorochrome Alexa-488.....	98
FIGURE A-44. Image de microscopie à épifluorescence à champ large de cellules individuelles de <i>Xylella fastidiosa</i> marqué au PAS et mettant en évidence de polysaccharides capsulaires.....	99
FIGURE A-45. Détection des exoprotéines dans les biofilms de <i>Staphylococcus epidermidis</i> (C) et de <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	100
FIGURE A-46. Formule semi-développée du SYPRO® Ruby.....	100

FIGURE A-47. Mécanisme de fixation de l'épicoconone sur les protéines proposé par Coghlan et al. (2005).	101
FIGURE A-48. Techniques de caractérisation des fibres amyloïdes selon les trois critères établis par Nilsson (2004)	102
FIGURE A-49. Molécule de thioflavine T	103
FIGURE A-50. Détection des adhésines amyloïdes (verte) dans des boues activées par marquage à l'aide d'un anticorps anti-WO1 ou de la thioflavine T (ThT) couplés à l'iodure de propidium (rouge) pour le marquage des cellules.	103
FIGURE A-51. Images de CLSM obtenues par projection maximale de l'intensité de fluorescence de biofilms formés au sein d'un réacteur à rotation annulaire	104
FIGURE A-52. Suivi par ATR-FTIR de l'évolution des composants de biofilms formés sur une membrane de nanofiltration pendant 7, 80, 475 et 717 jours.	106
FIGURE A-53. Analyse des régions AMIDE I' de la thransthyrétine native et fibrillaire par FTIR.	107
FIGURE A-54. Réaction de Schiff.	123
FIGURE A-55 Structure biochimique de la résazurine et de la résorufine	126
FIGURE A-56. Résumé non exhaustif des procédures d'extraction des SEP majoritaires	128

Tableaux

TABLEAU A-1. Protéines de la famille Bap impliquées dans les processus d'adhésion aux surfaces et la formation de biofilm retrouvées dans différentes espèces bactériennes	64
TABLEAU A-2. Vue d'ensemble des protéines amyloïdes fonctionnelles de bactéries	73
TABLEAU A-3. Synthèse des principales protéines matricielles et établissement d'une relation structure-fonction dans la formation d'un biofilm	80
TABLEAU A-4. Techniques de microscopie pour l'étude des biofilms : avantages et inconvénients	92
TABLEAU A-5. Exemples de lectines et de leur cibles de liaison préférentielles	97
TABLEAU A-6. Exemples de méthodes d'extraction (seules ou séquentielles) et principaux résultats obtenus	112
TABLEAU A-7. Liste des extractants et leurs propriétés et fonctions pour sélectionner la méthode d'extraction de l'ADNe la plus efficace au sein des biofilms	116
TABLEAU A-8. Méthodes spectrophotométriques de dosage des protéines totales en milieux aqueux.	119
TABLEAU A-9 Synthèse des principales méthodes de quantification des protéines en solution utilisant des fluorochromes (compatible en microplaque)	121

Partie B – Modèles d'études et Stratégie expérimentale

Figures

FIGURE B-1 Suspensions bactériennes de 18h et macro-colonies de 48h sur membrane de polycarbonate de <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. licheniformis</i> et <i>W. confusa</i>	144
FIGURE B-2. Spectres d'absorption infrarouge des biofilms des trois souches et d'une membrane d'acétate de cellulose vierge	146
FIGURE B-3. Images de microscopie confocale des biofilms de 48h (<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. licheniformis</i>) et du biofilm de 5 jours de <i>W. confusa</i>), formés sur coupons en polycarbonate	147
FIGURE B-4. Biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formé sur lamelle de verre, non fixé et co-marqué avec le DAPI et le TOTO-1	148
FIGURE B-5. Biofilm <i>Bacillus licheniformis</i> formé sur lamelle de verre, non fixé et co-marqué avec le DAPI et le TOTO-1	149
FIGURE B-6. Type de biofilms développés en fonction des objectifs expérimentaux et des contraintes analytiques	154

Tableaux

TABLEAU B-1. Récapitulatif des caractéristiques connues des trois souches modèles à l'étude	150
---	-----

Partie C – Résultats

Figures

FIGURE C-1. Quantification de solution de κ CN sous formes native et fibrillaire par le dosage à l'épicocconone..	175
FIGURE C-2. Biofilms de 48h de <i>Bacillus licheniformis</i> marqués par différents couples de lectines : WGA-PNA, ConA-BS-I, LEA-UEA-I. Les cellules sont marquées au DAPI.....	178
FIGURE C-3. Biofilms de 48h de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> marqués par différents couples de lectines : WGA-PNA, ConA-BS-I, LEA-UEA-I. Les cellules sont marquées au DAPI	179
FIGURE C-4. Biofilms de 5jours de <i>Weissella confusa</i> marqués par différents couples de lectines : WGA-PNA, ConA-BS-I, LEA-UEA-I. Les cellules sont marquées au DAPI.....	180
FIGURE C- 5. Biofilms de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et de <i>Bacillus licheniformis</i> , formés sur lamelle de verre pendant 24h en milieu TSB.....	193
FIGURE C-6. Production et purification de κ -CN fibrillaire pour la quantification des fibres amyloïdes de biofilms bactériens	200
FIGURE C-7. Cinétique de fibrillation de la κ -CN en conditions réductrices.....	201
FIGURE C-8. Détection des fibres de k-CN par coloration au Rouge Congo 100 μ M.	202
FIGURE C-9. Schéma récapitulatif des étapes de calibration de la quantification des fibres amyloïdes par HPSEC205	

FIGURE C-10. Teneur en ADNe dosés <i>in situ</i> avec le PicoGreen® pour les biofilms de 24 et 48 h des trois souches modèles, <i>B. licheniformis</i> (BL), <i>P. aeruginosa</i> (PA) et <i>W. confusa</i> (WC).....	229
FIGURE C-11. Profil en SEP majoritaires des trois biofilms modèles établis à 24h et 48h.....	231
FIGURE C-12. Modèle proposé pour décrire l'architecture d'un biofilm de 24 heures de <i>Bacillus licheniformis</i> et les effets de la DNase I et de la protéinase K.....	262

Tableaux

TABLEAU C-1. Lectines utilisées, fluorochromes conjugués et cibles biochimiques.....	178
TABLEAU C-2. Résidus glycosidiques reconnus par les lectines sur les trois biofilms modèles.....	182
TABLEAU C-3 : Profil de SEP des Trois biofilms à 24 et 48h.....	193

Production scientifique

Publications dans des revues internationales

1. **Randrianjatovo-Gbalou I.**, Rouquette P., Lefèbvre D., Girbal-Neuhauser E., Marcato-Romain C-E.

Extracellular amyloids-DNA complexes contribute to the adherence and the cohesiveness of a *Bacillus licheniformis* biofilm
2. **Randrianjatovo-Gbalou I.**, Girbal-Neuhauser E., Marcato-Romain C-E. (Accepté au Journal Analytical Biochemistry).

Quantification of biofilm exopolysaccharides using an in situ assay with Periodic Acid Schiff reagent. Accepté avec revisions dans le journal Analytical Biochemistry.
3. **Randrianjatovo-Gbalou I.**, Marcato-Romain C-E., Girbal-Neuhauser E. (2015).

Quantification of amyloid fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection. Analytical Biochemistry, 488, 19–21.
4. **Randrianjatovo I.**, Girbal-Neuhauser E., Marcato-Romain C-E. (2015)

Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. Applied Microbiology and Biotechnology, 99(11), 4835-4844.
5. Verneuil L., Silvestre J., **Randrianjatovo I.**, Marcato-Romain C.E., Girbal-Neuhauser E., Mouchet F., Flahaut E., Gauthier L., Pinelli E. (2015).

Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: an adhesive response for an adaptive issue. Carbon, 88, 113-125.
6. Marchal F, Robert H, Seyer D., Merbahi N., **Randrianjatovo I.**, Fontagné-Faucher C., Di Martino P., Yousfi M., Neuhauser E.

Atmospheric cold plasmas for biofilm inactivation: does biofilm extracellular matrix limit the bactericidal process? Journal of Engineering and Technology Research. Page no. 123-135

Communications orales

1. **Randrianjatovo-Gbalou I.**, Rouquette P., Lefebvre D., Girbal-Neuhauser E., Marcato-Romain C-E.
Amyloids-DNA complexes mediate adherence and cohesiveness of bacterial biofilms. 7e Colloque du Réseau National Biofilm, 2-3 Décembre 2015, Toulouse
2. **Randrianjatovo-Gbalou I.**, Rouquette P., Lefebvre D., Girbal-Neuhauser E., Marcato-Romain C-E.
Amyloids-DNA complexes mediate adherence and cohesiveness of bacterial biofilms. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. 28-30 October 2015, Barcelona, Spain.
3. **Randrianjatovo I.**, Marcato-Romain C-E., Girbal-Neuhauser E. (2013).
Vers une quantification in situ des substances exopolymériques de biofilms bactériens. Journées thématiques du Réseau National Biofilm ; Biofilms : Remue-ménage aux interfaces, 19-21 novembre 2013, Pau, France.

Posters

1. Randrianjatovo I., Marcato-Romain C-E., Girbal-Neuhauser E., 2014.
Towards an in situ quantification of extracellular polymeric substances of bacterial biofilms.
IWA Biocluster conference: The Perfect Slime – Nature, Properties, Regulation and Dynamics of EPS. 10-12 Sept. 2014, Essen, Germany. **Poster award (1st price)**.
2. Randrianjatovo I. (2014).
Etude des mécanismes impliqués dans la formation et le maintien des biofilms bactériens en vue de leur réduction. Les Doctoriales® Midi-Pyrénées. **1^{er} Prix de la communication scientifique**

Introduction générale

Les biofilms bactériens résultent de l'association de cellules initialement adhérentes à une surface solide ou liquide et engluées au sein d'une matrice composée de substances exopolymériques auto-produites. Cette matrice d'exopolymères comprend majoritairement les exoprotéines, les exopolysaccharides, et les acides nucléiques et constitue le « ciment » qui permet de consolider et protéger le consortium cellulaire. Elle a également pour fonction d'emprisonner la matière organique et minérale pour permettre le maintien et la croissance des cellules (échange de nutriments, sécrétions moléculaires, rétention d'eau). L'ensemble forme alors un système dynamique en synergie complexe et dont le mécanisme est au centre de nombreuses études. Cette complexité nécessite de combiner des études à diverses échelles depuis l'analyse du biofilm dans sa globalité face à l'environnement qui l'entoure, l'étude des réponses microbiennes des espèces rencontrées, mais aussi jusqu'à la caractérisation et l'identification des composantes moléculaires qui jouent un rôle essentiel dans sa formation et son développement. Au-delà de sa fonction essentielle de barrière protectrice contre les agressions externes, la matrice extracellulaire revêt une dimension structurale, voire architecturale à travers l'assemblage des divers exopolymères qui la composent. L'organisation tri dimensionnelle, la stratification et les mécanismes d'agrégation des SEP existant au cœur de cette matrice sont autant de questions auxquelles il convient de répondre afin de mieux comprendre la formation des biofilms bactériens.

Le phénotype biofilm constitue véritablement un exemple d'adaptation biologique bénéfique pour les cellules mais parfois contraignant pour l'environnement dans lequel ils se développent. En effet, les biofilms sont à l'origine de nombreuses contraintes technologiques dans le domaine industriel. Dans l'industrie papetière, des dépôts de films sont fréquemment rencontrés à la surface des équipements et l'espèce bactérienne *Deinococcus geothermalis* est la plus souvent isolée à l'issue des prélèvements. Cette bactérie est capable de former des biofilms en « patchs » sur des surfaces inertes (acier...) et est particulièrement résistante à des traitements drastiques tels que des conditions de pH extrêmes, la dessiccation, ou l'ajout de biocides. Les biofilms bactériens déposés sur les équipements industriels sont aussi à l'origine de la contamination du lait et de ses co-produits et peuvent engendrer de sérieux problèmes de santé publique. Ces biofilms laitiers sont généralement mono-espèce (*Streptococcus sp.* ou *Bacillus sp.*) et leur matrice extracellulaire contient des Substances Exopolymériques (SEP) bactériennes ainsi que des résidus de lait, généralement des protéines et des phosphates de calcium.

Dans le domaine médical, de nombreux cas d'infections chroniques ont été attribués à la persistance de microorganismes organisés en biofilms. Les infections des voies respiratoires par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose, les contaminations de dispositifs médicaux par les Staphylocoques sont difficilement remédiables du fait d'une résistance accrue des bactéries aux traitements antibiotiques.

De nombreux travaux de recherche se sont développés au cours des dernières années afin d'apporter les progrès technologiques et scientifiques qui permettront une meilleure connaissance du mode de fonctionnement et d'adaptation des biofilms bactériens. Néanmoins et, encore récemment, la matrice extracellulaire, en majeure partie responsable de l'intégrité des biofilms, continue à être qualifiée de « matière noire » (Flemming 2011) et ceci pour plusieurs raisons. D'une part, les techniques d'isolement des constituants des biofilms définissent en grande partie les résultats obtenus ; par exemple, ce sont les SEP solubles qui sont le plus souvent analysées au détriment de celles qui sont insolubles ou complexes à extraire, comme la cellulose ou les fibres amyloïdes. D'autre part, dans les biofilms environnementaux composés de multiples espèces, il est difficile de définir le lien entre les espèces et les polymères présents et en particulier de connaître quelle(s) espèce(s) gouverne(nt) la régulation des facteurs déclenchant ou inhibant la formation de biofilms. Même lorsqu'on essaie de simplifier les modèles, en étudiant des biofilms mono-espèce, on constate que la composition biochimique de la matrice est très variable selon les espèces et les conditions de cultures mises en jeu. Toute cette complexité fonctionnelle et structurale amène à ce jour de multiples verrous scientifiques à lever : Comment définir la composition en SEP de la matrice ? Quelle est leur fonction dans l'établissement du biofilm ? Quels sont les mécanismes à l'origine de leur régulation ?

A l'échelle du laboratoire, les mécanismes de formation de biofilms sont le plus souvent étudiés sur des espèces bactériennes modèles, à partir desquelles de nombreuses méthodes analytiques ont pu être développées pour apporter des connaissances de plus en plus approfondies sur la distribution, la régulation et la structure tridimensionnelle de la matrice extracellulaire. D'une part, les SEP peuvent être extraites et analysées *in vitro* par des techniques adaptées à la nature de l'échantillon (biofilms adhérents, floes et pellicules, granules, macro-colonies), à la finalité de l'étude (analyses moléculaires ou physico-chimiques) et à la quantité ou la disponibilité de l'échantillon. D'autre part, des méthodes de caractérisation *in situ* ont pu être développées grâce aux performances de la microscopie confocale et à la disponibilité d'un grand

nombre de marqueurs fluorescents, ouvrant ainsi la voie à la caractérisation tridimensionnelle et *in situ* de la structure des biofilms. A ce jour, des technologies avancées ont permis de mettre en lumière l'organisation complexe de la matrice extracellulaire et l'apport des techniques de biologie moléculaire ont permis également de décrire un grand nombre de processus biologiques qui régulent la formation des biofilms. Toutes ces approches qualitatives du biofilm et de ses constituants ont permis de proposer de nombreuses représentation des biofilms chez les espèces telles que *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ou encore *Staphylococcus aureus*.

En ce qui concerne l'approche quantitative de l'analyse des biofilms, elle s'est souvent heurtée à de nombreuses difficultés, notamment l'abondance des souches non cultivables ainsi que la complexité et la non-universalité des techniques d'extraction des SEP. De plus, souvent souche-dépendante, les techniques d'extraction nécessitent une grande quantité de matériel biologique. Lorsque des méthodes de quantification telles que les dosages biochimiques classiques basés sur des mesures spectrométriques d'absorbance, sont mises en œuvre sur des extraits de biofilms, les risques d'interférences engendrés par les solvants d'extraction peuvent survenir. Des lyses cellulaires survenues au cours des étapes d'extraction des polymères matriciels peuvent également induire le relargage de contenu intracellulaire et ainsi surestimer les quantités de ces composés.

Parmi tous les travaux effectués ces dernières années, beaucoup ont porté sur la réduction de biofilms indésirables, avec en particulier un effort récent pour proposer des méthodes de développement durable. Dans ce contexte, le Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE, EA 4565) de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, étudie l'action de traitements par voie enzymatique (Marcato-Romain et al. 2012) ou par jet de plasma (Marchal et al. 2012) sur des biofilms multi-espèces ou mono-espèces formés à partir de prélèvements industriels papetiers ou alimentaires. Les premières études diagnostiques réalisées sur des biofilms multi-espèces (Marcato-Romain et al. 2012) et mono-espèces (Marchal et al. 2012) ont révélé l'efficacité de ces traitements en termes de réduction du biofilm, mais les éléments de compréhension des mécanismes d'altération mis en jeu restent à découvrir. En effet, seules des techniques permettant d'évaluer le détachement global du biofilm sont actuellement disponibles et la volonté demeure de mieux quantifier ces actions sur les divers composants de la matrice extracellulaire.

Dans ce contexte, et compte-tenu des difficultés liées à l'extraction des SEP de biofilms modèles, il a été choisi de développer des outils de quantification *in situ* des SEP. Ces outils pourront être validés sur les diverses souches bactériennes isolées des échantillons environnementaux ou alimentaires qui ont démontré une capacité à produire des biofilms diversifiés en termes de morphologie et propriétés physico-chimiques. Ces outils seront ensuite utilisés pour appréhender une problématique d'intérêt, tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué, et qui concerne l'étude du rôle des SEP dans la cohésion et la stabilité de la matrice extracellulaire des biofilms bactériens.

Le travail ainsi mené sera rapporté en quatre parties :

La première partie de ce manuscrit propose une revue bibliographique permettant de situer le contexte de l'étude. Les différents types de biofilms bactériens et leur formation seront décrits avant d'aborder la composition, la diversité ainsi que les fonctions de la matrice extracellulaire. Enfin, les connaissances sur les SEP impliquées dans l'architecture et la stabilité seront abordées puis les différentes stratégies d'analyse des SEP seront résumées. Lors de ce travail de synthèse, il s'agira de mettre en lumière les connaissances actuelles mais aussi celles manquantes pour appréhender la diversité et la complexité de la matrice extracellulaire. A l'issue de cette introduction bibliographique, les principaux objectifs de l'étude seront précisés en tenant compte de l'état de l'art et des perspectives d'orientation thématique du LBAE. Dans une seconde partie, les trois souches bactériennes modèles étudiées seront présentées ainsi que la stratégie expérimentale qui a été suivie tout au long de l'étude. Une troisième partie découpée en trois chapitres I, II et III présentera les principaux résultats sous la forme de quatre articles. Pour chaque chapitre, une présentation de l'article sera faite, et les résultats complémentaires non publiés dans l'article seront également communiqués afin d'étayer les données obtenues. Enfin, une conclusion générale permettra de discuter sur le travail accompli et de poser les principales perspectives à moyen et à long termes de cette étude.

Par ailleurs, au cours de cette thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à une étude menée par un autre doctorant, Laurent Verneuil, au sein du Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement (EcoLab, ENSAT, INP, UPS, UMR CNRS 5245, Castanet-Tolosan) de l'Université Toulouse III. Cette étude visait à analyser de la réponse d'un biofilm modèle de diatomée benthique, *Nitzschia palea*, exposé à des nanotubes de carbone. Un article où je suis co-auteur, a

ainsi été publié dans le journal Carbon, (Verneuil et al. 2015). Cet article est présenté en Annexe 1 de ce manuscrit.

De plus, une collaboration entre le LBAE, le Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie (LAPLACE, Université Paul Sabatier Toulouse III), ainsi que le laboratoire ERRMECe (EA 1391, Université Cergy-Pontoise) m'a permis de mettre en application les outils de quantification que j'ai développés pour apporter une approche quantitative à l'analyse de l'efficacité du traitement au jet de plasma atmosphérique sur des biofilms bactériens. Une publication également présentée en Annexe 2, a permis de valoriser cette collaboration (Marchal et al. 2013).

PARTIE A – Etude bibliographique

I. Les Biofilms : universalité et diversité

I.1. Processus de formation des Biofilms

Les biofilms sont le plus souvent définis comme étant une communauté de microorganismes, attachés à une surface biotique ou abiotique, qui subit de profonds changements durant la transition entre l'état planctonique et l'état biofilm. Ils peuvent mettre en jeu un seul type d'espèce microbienne ou un ensemble complexe d'espèces différentes. Ils sont le reflet d'interactions qui s'opèrent entre les différents constituants du biofilm aboutissant à des structures physiques organisées s'établissant aux interfaces air-solide, air-liquide ou liquide-liquide (Costerton et al. 1999). Cette structuration en biofilm s'opère en réponse aux conditions environnementales et s'accompagne de changements phénotypiques régulés par des processus génétiques et moléculaires impliqués à chaque étape de la formation du biofilm.

Divers processus sont proposés dans la littérature (Chmielewski and Frank 2003) pour décrire la formation des biofilms. Les mécanismes employés par les différentes espèces bactériennes varient selon les conditions environnementales ainsi que les propriétés spécifiques de chaque bactérie (López et al. 2010). Cependant, certaines caractéristiques universelles sont décrites pour l'ensemble des biofilms bactériens (Simões et al. 2010) telles que l'établissement d'interactions cellules-cellules, la production d'une matrice extracellulaire entourant les cellules, une phase de maturation du biofilm avant sa dispersion et le retour à la l'état planctonique.

I.1.1 Biofilms adhérents aux surfaces

Les biofilms de surfaces sont retrouvés dans des environnements très variés comme en témoigne la FIGURE A-1 qui présente des biofilms naturels ou industriels retrouvés sur différentes surfaces. Ces biofilms peuvent être multi-espèces (A, C, F) comme ceux présents dans les rivières ou mono-espèces tels que ceux formés par *Staphylococcus* (B) contaminant les surfaces de dispositifs médicaux, *Bacillus cereus* dans l'industrie laitière (D) ou par *Pseudomonas aeruginosa* (E) sur les membranes de de filtration.

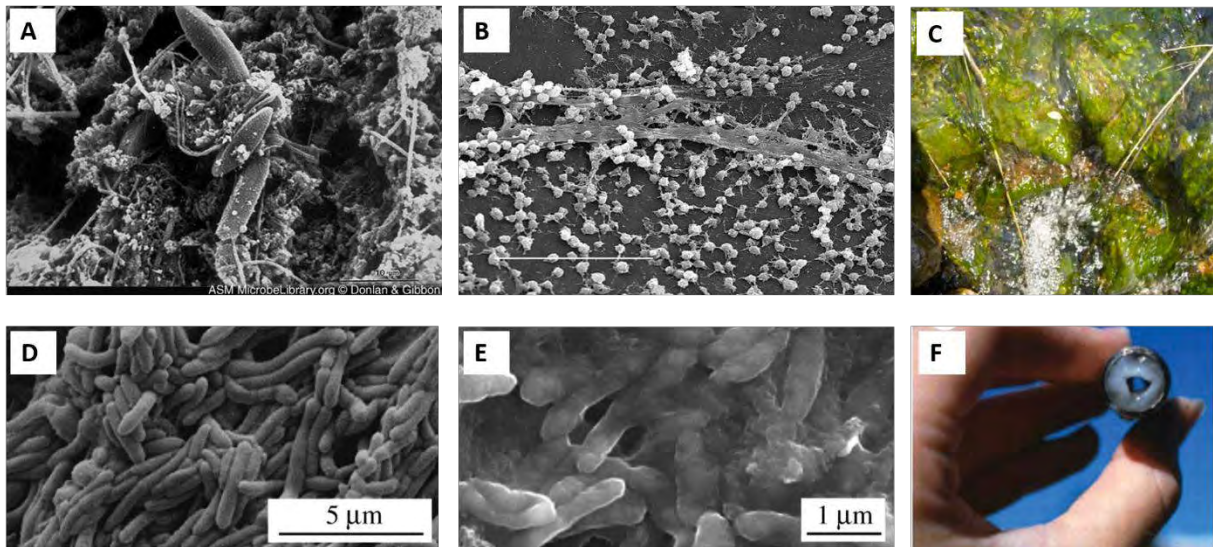


FIGURE A-1. Les biofilms adhérents aux surfaces. [A] Image en MEB d'un biofilm natif qui s'est développé sur une surface en acier pendant 8 semaines dans un système industriel de circulation d'eau. [B] Image en MEB d'un biofilm de *Staphylococcus sp.* Adhérent à la surface interne d'un dispositif médical, barre d'échelle=20µm, (Donlan 2002)[C] Image d'un biofilm naturel adhérent à une roche traversée par une cours d'eau, Tim Sandle (Sandle 2013). [D] Biofilm de *Bacillus cereus* sur une surface en acier d'une industrie laitière,(Simões et al. 2010). [E] Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* formé sur une membrane de filtration par d'osmose inverse (Herzberg and Elimelech 2007). [F] Accumulation d'un biofilm dans un tube en acier, (Bixler and Bhushan 2012)

Le processus de formation de ces biofilms implique plusieurs étapes illustrées sur la FIGURE A-2 et qui peuvent se résumer de la façon suivante :

- [1] *Pré-conditionnement de la surface* d'adhésion ; accumulation de molécules du milieu ambiant. Ce pré-conditionnement peut aussi être le résultat d'une sécrétion active de polymères par les bactéries ou encore obtenu par un recouvrement (coating) de la surface (Haase et al. 2006);
- [2] *Migration des cellules planctoniques* du milieu jusqu'à la surface du support : plusieurs cellules produisent des appendices extracellulaires filamenteux. Ces derniers jouent un rôle dans le processus d'attachement au support, tels que les flagelles qui sont responsables de la motilité des cellules et peuvent aussi permettre une liaison adhésive au support ;
- [3] *Adsorption des cellules à la surface* : Les *pili* ou les *fimbriae* sont de fins filaments protéiques de 4-35nm de large et de quelques micromètres de long (Simões et al. 2010). Ces structures ne sont pas impliquées dans la motilité et sont généralement plus rigides. Elles sont connues pour rendre la surface cellulaire plus adhésive, ce qui permet une adhésion cellule-cellule et/ou cellule-support inorganique plus forte ;

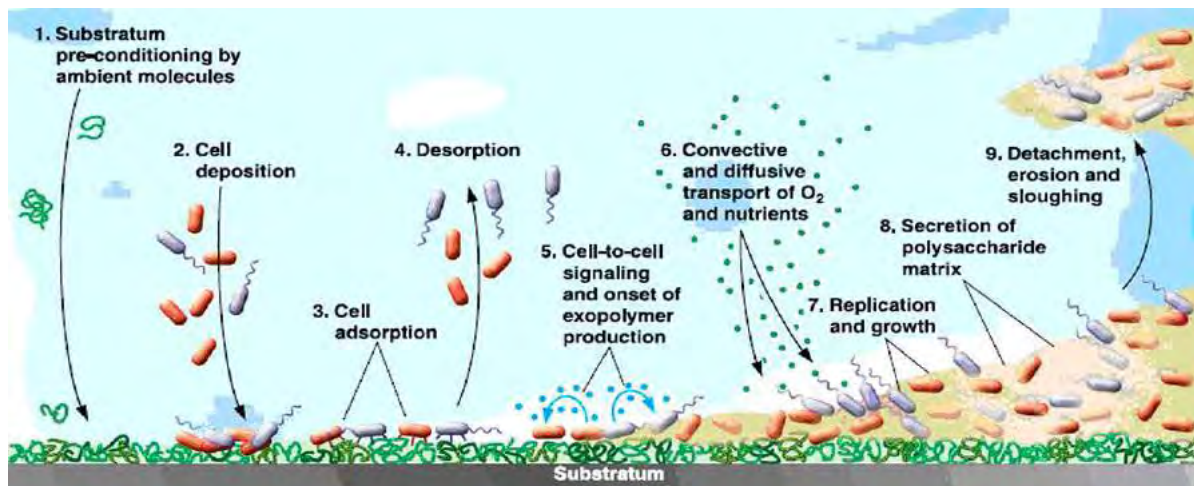


FIGURE A-2 Etapes de formation d'un biofilm. (Breyers & Ratner, 2004)

[4] *Désorption réversible de certaines cellules ;*

[5] *Adsorption irréversible* des cellules : début de la signalisation intercellulaire pour la production de substances exopolymériques (SEP). Ces SEP sont responsables de la cohésion de l'ensemble du matériel qui compose le biofilm (cellules et molécules) mais participe aussi à l'adhésion de toute la structure (Sutherland 2001b).

[6] *Etape de maturation* : un gradient de nutriments et d'oxygène s'opère vers la profondeur du biofilm, s'accompagnant des processus de réplication et de division cellulaire [7] ainsi que de la production des SEP pour former la matrice extracellulaire [8]. Cette matrice, par la présence de polysaccharides et de protéines (éléments structuraux), offre une protection aux cellules, mais aussi une barrière où la diffusion des molécules au sein du biofilm l'emporte sur les mouvements de convection (Sutherland 2001b). [9] *Détachement et dispersion* : cette étape est induite par la présence d'enzymes qui, d'une part, vont induire une lyse des molécules de la matrice et vont conduire à la formation de pores par lesquelles vont s'échapper les cellules, et, d'autre part, vont induire un changement phénotypique sur les cellules afin qu'elles retrouvent leur état planctonique (Sauer et al. 2004).

I.1.2 Biofilms sous-forme de colonies à l'interface air-solide

Les biofilms sont le résultat de l'organisation de multiples cellules adoptant des structures physiques qui sont le reflet des différentes interactions qui s'opèrent entre les différents

constituants. Ces interactions peuvent se faire aux interfaces air-solide, air-liquide, liquide-liquide et peuvent mettre en jeu un seul type d'espèce microbienne ou un ensemble complexe d'espèces différentes. L'étude des biofilms en laboratoire s'est intéressée à la cinétique de croissance, l'acquisition de la perte de motilité, l'acquisition du signal de mort cellulaire, le mode de production de la matrice extracellulaire, mais également la régulation des mécanismes de résistance de ces biofilms. Les colonies formées en milieu solide, comme l'agar, présentent des propriétés similaires aux communautés de biofilms et sont peu à peu devenues des modèles d'étude (Hausler and Fuqua 2013). Tout comme les biofilms adhérents aux surfaces, les colonies présentent une hétérogénéité cellulaire d'un point de physiologique, des cellules mortes coexistent avec des cellules viables et semblent induire une ségrégation spatiale à l'origine des colonies ridées largement étudiées. Plusieurs espèces bactériennes possèdent cette particularité, notamment *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio fischeri*, ou encore *Pseudomonas fluorescens* FIGURE A-3.



FIGURE A-3. Exemple d'espèces bactériennes présentant un phénotype de colonies ridées (*wrinkle* en anglais). De gauche à droite respectivement *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio fischeri* et *Pseudomonas fluorescens*. (Hausler and Fuqua 2013)

L'origine de cette morphologie particulière des colonies a suscité de nombreuses investigations et Asally et al. ont démontré la localisation des cellules mortes à l'endroit où ces structures ridées prennent forme (FIGURE A-4) chez *Bacillus subtilis* (Asally et al. 2012). Ces cellules mortes induisent des forces mécaniques qui modifieraient l'organisation tridimensionnelle des colonies et initieraient l'apparition des rides en surface. La délétion des gènes impliqués dans la formation du biofilm chez cette espèce indique que la production de la matrice extracellulaire est liée au déclenchement de la mort cellulaire. Parallèlement, les mesures mécaniques de la rigidité et des mouvements autour des cellules mortes chez les souches sauvage et mutée indiquent que les cellules mortes provoquent des forces latérales compressives, à l'origine des rides.

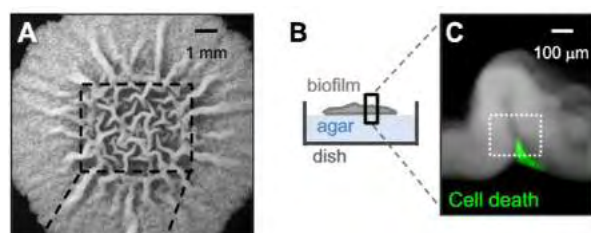


FIGURE A-4. Localisation des cellules mortes à l'origine de la formation des colonies ridées de biofilms matures de *B. subtilis*. A-Biofilm de 3 jours. B-Schéma de la coupe du biofilm observé au microscope à fluorescence et en lumière blanche. C-Coupe transversale d'une colonie ridée de 30h. Les cellules mortes sont marquées par le SYTOX Green (en vert) et le biofilm exprime la protéine fluorescente rapporteur *Pftz-AZ-CFP* pseudo-colorée en gris (Asally et al. 2012).

Chez *Bacillus subtilis*, l'analyse des mécanismes impliqués dans la formation des colonies a ainsi permis de relier leur formation avec la production des exopolymères. Notamment, les propriétés rhéologiques de la protéine TasA, plutôt rigide d'une part, et celle de l'exopolysaccharide majeur de la matrice, plus élastique d'autre part, semblent moduler la morphologie des colonies formées (Seminara et al. 2012).

La même observation a été rapportée chez l'espèce *Burkholderia thailandensis* qui forme des colonies rugueuses. Il a été suggéré que la formation d'exopolysaccharides était contrôlée par les signaux du quorum-sensing et serait également lié à l'acquisition de la morphologie des colonies (Chandler et al. 2009; Haussler and Fuqua 2013).

I.1.3 Pellicules à l'interface air-liquide

Une pellicule est un biofilm formé à l'interface air-liquide d'une culture bactérienne statique. L'espèce *Bacillus subtilis*, espèce modèle des bactéries à Gram positif, a été largement étudiée pour sa capacité à former des pellicules (Branda et al. 2006; Vlamakis et al. 2013b). A l'échelle macroscopique, le développement de la pellicule chez cette bactérie se fait en trois étapes :

- Formation d'une première couche fine de pellicule
- Epaissement de la pellicule naissante
- Apparition de rides à la surface, qui s'accroissent au fur et à mesure que la pellicule mature (FIGURE A-5A).

De nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif sont également capables de former ce type de biofilm et des particularités communes ont été décelées quant à l'origine et le développement des pellicules (Armitano et al. 2014) :

- Premièrement, la formation des pellicules est déclenchée par l'abondance d'oxygène, si bien qu'elles se forment aux interfaces air-liquide de nombreux milieux (naturels ou artificiels) où les cellules tirent parti des conditions aérobies environnantes. Un gradient d'oxygène s'établit depuis la surface de la pellicule avec une croissance des cellules à deux vitesses. Celles qui sont en surface et au contact de l'air poussent plus vite que celles qui sont au contact du liquide ou c'est l'inverse???
- Deuxièmement, la motilité flagellaire est également utile pour l'initiation de la formation des pellicules.
- Troisièmement, la matrice extracellulaire des pellicules est riche en polysaccharides, et chez les bactéries à Gram négatif, la cellulose est le sucre le plus représentatif. .

A titre d'exemple, chez *Pseudomonas aeruginosa*, les exopolysaccharides (ePS) Pel et Psl sont impliqués dans la formation des pellicules à la surface des suspensions bactériennes (Friedman and Kolter 2003; Colvin et al. 2012) et sont respectivement riches en glucose et en mannose. *Pseudomonas alkylphenolia* produit un ePS composé de fucose, de glucose et de mannose. *Vibrio cholerae* El Tor produit une pellicule dont la matrice est composée d'ePS riche en glucose, galactose, N-acétyl-glucosamine et de mannose. La bactérie *Shewanella oneidensis* (FIGURE A-5G) produit des ePS riches en mannose tandis qu'*Acinetobacter baumannii* (FIGURE A-5E) produit une matrice riche en glucose et en rhamnose (Armitano et al. 2014).

Par ailleurs, il a également été rapporté que les pellicules formées par *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou les espèces du genre *Salmonella* contiennent des fibres amyloïdes. Chez *Escherichia coli* la formation de ces pellicules est dépendante de la production des protéines amyloïdes CsgA qui s'assemblent en curli (Zhou et al. 2012). Chez *Bacillus subtilis*, la matrice extracellulaire des pellicules est principalement composée d'un exopolysaccharide, et des protéines TasA qui s'assemblent pour former des fibres amyloïdes et de BslA qui va former une couche hydrophobe à la surface des pellicules (Branda et al. 2006; Romero et al. 2010; Ostrowski et al. 2011; Kobayashi and Iwano 2012).

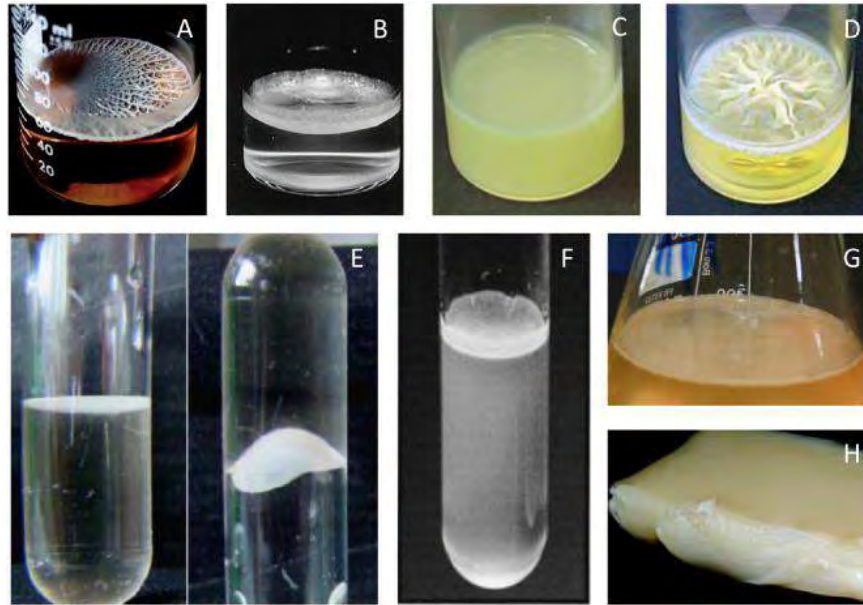


FIGURE A-5. Exemple d'espèces bactériennes formant des pellicules aux interfaces air-liquide. [A] Pellicule de *Bacillus subtilis* formée pendant 5 jours dans du milieu MSgg. [B] *Pseudomonas fluorescens* SBW25, 7 jours. [C et D] Différentes pellicules de *Pseudomonas sp.* formées pendant 3 jours à 18-22°C. [E] *Acinetobacter baumannii* après 5 jours à 25°C dans du milieu MHB. Le tube mis à l'envers montre la force et la cohésion de la pellicule. [F] *Salmonella enteridis* formées pendant 4 jours en milieu LB. [G] *Shewanella oneidensis* formée pendant 3 jours en milieu LB. [H] Pellicule gélifiée formée par *Gluconacetobacter xylinus* après 2 semaines d'incubation à 30°C dans du milieu HS. (Armitano et al. 2014)

I.1.4 Communication intercellulaire : Quorum-Sensing

Le Quorum sensing (QS) est défini comme un mode de communication bactérienne qui repose sur la production de molécules médiatrices appelées « autoinducteurs » (assimilable à des « hormones » bactériennes). Lorsque le seuil de concentration de ces autoinducteurs est atteint, une interaction avec un régulateur transcriptionnel s'opère, permettant ainsi l'expression spécifique d'un groupe de gènes et engendrant des modifications sur les processus génétiques fondamentaux (réplication, conjugaison), la synthèse d'exoenzymes, le comportement des communautés bactériennes (« swarming »), l'expression de facteurs de virulence, de résistance, de sporulation mais également la production de biofilms. La notion d'autoinduction a été introduite pour la première fois par Nealson et *al.* (Kaplan and Greenberg 1985) en 1970 pour décrire le mécanisme de régulation transcriptionnelle de la bioluminescence chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* et dont la réponse est induite par des composés extracellulaires sécrétés par les microorganismes. Ce n'est que plus tard que la notion de QS a été introduite, en 1994 par Fuqua et Winans (Fuqua et al. 1994). Depuis cette notion a été étendue à plusieurs genres bactériens à

Gram- (Parker and Sperandio 2009) telles que *Agrobacterium*, *Brucella*, *Bukholderia*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Vibrio*, *Yersinia*, et Gram+ comme *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*. Tous ces microorganismes sont soumis à une médiation par le QS et deux types de systèmes de QS sont communément décrits : Le système LuxI/LuxR chez les Gram négatifs, où les enzymes de la familles Lux sont responsables de la production de dérivés d'acides gras (acyl-homosérine-lactone) d'une part, et, d'autre part les systèmes reliant des oligopeptides signal à des facteurs de régulation transcriptionnelle chez les Gram positif.

1.1.4.1 Acyl-homoserine lactone : un modèle de signalisation du QS chez Pseudomonas aeruginosa

L'auto-inducteur le plus étudié est la N-acyl-homosérine lactone (Acyl-HSL) chez les Gram- (Parsek and Greenberg 2000), dont la synthèse est à l'origine de la régulation de divers systèmes de QS (Turovskiy et al. 2007). Le système de QS appelé LuxI/R et associé à l'acyl-HSL (QS-acyl-HSL) chez le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* constitue un modèle d'étude de la signalisation intercellulaire chez les bactéries à Gram négatif, et a permis d'établir une relation entre la pathogénicité et le comportement communautaire des bactéries (FIGURE A-7a). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le QS-acyl-HSL est requis pour permettre la maturation des biofilms ainsi que l'expression des facteurs de virulence (Parsek and Greenberg 2000). Le QS-acyl-HSL a pour fonction de contrôler les gènes spécifiques en réponse à la densité cellulaire (Fuqua et al. 1994). Produites par l'enzyme acyl-HSL synthase, ces petites molécules sont détectées par les récepteurs spécifiques et vont engendrer un mécanisme qui permettra de maîtriser la population bactérienne. Le développement en biofilm est également programmé par le QS une fois que les étapes d'attachement initiales (pili de type IV) ont été entamées. Les cellules se multiplient pour former une multicouche constituée par les micro-colonies qui vont par la suite se différencier en un biofilm mature avec une architecture en champignons (« mushroom »). La maturation du biofilm de *P. aeruginosa* est en grande partie régulée par le QS. Il a été montré (Davies et al. 1998) qu'une souche déficiente (*système LasR-I et/ou système RhlR-I*) pour la production d'un auto-inducteur du QS formait un biofilm plus fin () et non différencié (pas de structure en « mushroom ») comparée à la souche sauvage (WT). Ces résultats montrent l'importance du système *lasI* dans la maturation et la différenciation des biofilms.

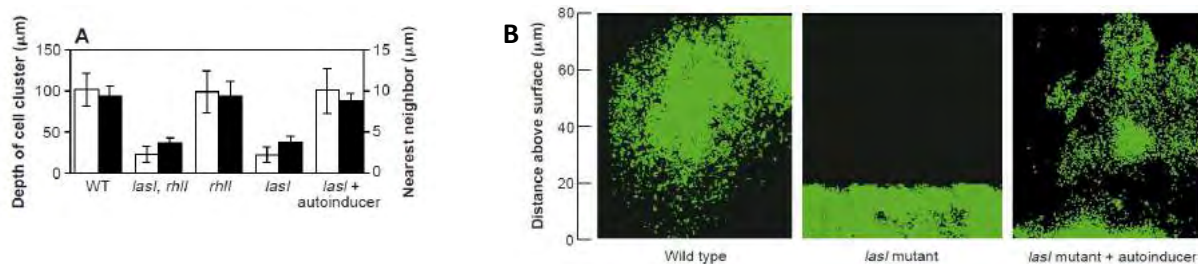


FIGURE A- 6. Régulation de la formation du biofilm par le QS chez *Pseudomonas aeruginosa*. (A) Mesure de la profondeur (barres blanches) et mesure de l'autoagrégation (barres noires) de biofilms de *P. aeruginosa*. La souche sauvage WT (PAO1) est comparée aux mutants déficients pour la production de molécules signal du quorum sensing soit par le système LasR-I soit par le système RhIR-I, soit les deux mutations: (*lasI/rhlI* mutant PAO-JP2 ; *rhlI*, mutant PDO100 ; *lasI*, mutant PAO-JP1) et une souche *lasI* mutante supplémentée par l'ajout d'un autoinducteur. (B) Image de microscopie confocale en vue sagittale mesurant l'épaisseur et la morphologie des biofilms formés dans les trois conditions : souche sauvage, mutant *lasI* et mutant *lasI* + autoinducteur (3OC₁₂-HSL). Les cellules produisent la Green fluorescent protein (GFP) dont la fluorescence est corrélée à la densité cellulaire. (Davies et al. 1998)

Kievit et al. (De Kievit et al. 2001) ont également étudié le rôle des systèmes *las* et *rhl* durant les phases initiales d'adhésion et la phase de maturation pendant laquelle une différenciation s'opère. Leur étude a révélé une différence dans la formation de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (sauvage et mutant) lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone au lieu du citrate. Lors du développement des biofilms pendant 8 jours, suivi en temps réel et dans l'espace, par mesure de la fluorescence de la GFP, il a été montré que l'expression de *lasI* diminue progressivement au cours du temps tandis que celle de *rhlI* demeure stable malgré un plus faible pourcentage de cellules. L'exploration spatiale des biofilms a également révélé que l'expression de ces deux systèmes était au maximum au sein des cellules situées au contact de la surface et qu'elle décroît avec la hauteur du biofilm.

1.1.4.2 Quorum-sensing et bactéries à Gram positif

A l'inverse des Gram négatifs, deux systèmes de QS ont été identifiés chez les Gram positifs (Kleerebezem et al. 1997; Li and Tian 2012). Le premier système est basé sur la synergie de deux composés : un peptide-signal (= peptide auto-inducteur, AIP) et un système de transduction du signal (two-component signal transduction system, TCSTS) qui détecte spécifiquement le peptide-signal d'une part, et d'autre part induit la réponse (FIGURE A-7b). Contrairement aux Gram négatifs, la membrane cellulaire n'est pas perméable aux AIP et la diffusion des auto-

inducteurs, constitués de 5 à 25 acides aminés contenant des chaînes latérales non usuelles (Claverys et al. 2006), se fait par l'intermédiaire des transporteurs ABC vers le milieu extracellulaire (Dunny 1997).

Le deuxième système du QS, récemment découvert chez les espèces de *Streptococcus* (Fontaine et al. 2010; Mashburn-Warren et al. 2010), est appelé ComRS et est basé sur la production d'un petit peptide signal composé de deux tryptophanes qui, une fois détecté par un transporteur ABC, est internalisé au sein de la cellule pour interagir avec un régulateur transcriptionnel, ComR. Ce régulateur va alors induire l'activation du gène *sigX* qui va coder pour un facteur sigma alternatif SigX (ou ComX) et engendrer l'activation des gènes de compétence.

1.1.4.3 Système de quorum sensing hybride : signalisation inter-espèces

En plus des systèmes décrits précédemment chez les Gram négatifs (LuxI/R) et les Gram positifs (oligopeptides signal), il existe un troisième type de système retrouvé à la fois chez les Gram négatifs et chez les Gram positifs. Il s'agit de l'auto-inducteur de type 2 (AI-2). Alors que la communication *via* les systèmes précédents semble n'utiliser qu'un langage intra-espèce, le système AI-2 (FIGURE A-7c) permet une signalisation croisée entre espèces différentes, y compris avec des cellules eucaryotes, à travers un « langage universel ». Cette découverte a été observée pour la première fois chez la bactérie Gram négative *Vibrio harveyi* (Federle and Bassler 2003) chez laquelle deux systèmes fonctionnent parallèlement, un pour la communication intra-espèce (Acyl-HSL produite par l'enzyme LuxM) et un autre pour la communication inter-espèce (AI-2 constitué par un diester de furanosylborate produit par l'enzyme LuxS). Ce système AI-2/LuxS régule la formation de biofilm chez de nombreuses espèces telles que *Salmonella typhi*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*. Chez d'autres espèces, en revanche, ce système régule l'expression de la virulence, notamment chez *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* et la production de toxines chez *Clostridium perfringens* (Federle and Bassler 2003).

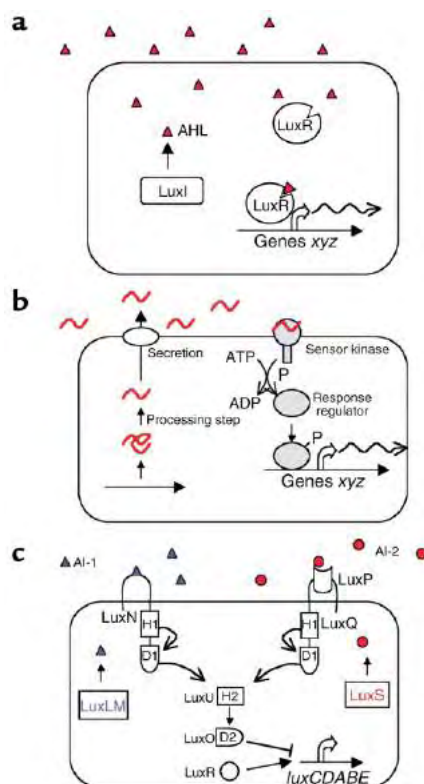


FIGURE A-7. Schéma des mécanismes de quorum sensing chez a) les Gram négatifs, b) les gram positifs et c) chez la bactérie pathogène *Vibrio harveyi*, possédant deux systèmes de signalisation intra et inter-espèces : AI-1 et AI-2. (Federle and Bassler 2003)

I.2. Structure et composition de la Matrice Extracellulaire

I.2.1 Matrices Extracellulaires de biofilms modèles fréquemment étudiés

I.2.1.1 Matrice de l'espèce *Bacillus subtilis*

La bactérie *Vibrio subtilis* a été la première à être décrite en 1835 par Ehrenberg. Celle-ci a été renommée *Bacillus subtilis* et fait partie de la famille des *Bacillaceae* qui se distingue par sa capacité à former des endospores de forme ovale ou cylindriques. Ces spores ont été décrites pour la première fois par Cohn (1872) chez *Bacillus subtilis* puis par Koch chez *Bacillus anthracis*, et sont connues pour leur résistance à la chaleur. Le genre *Bacillus* réunit les bactéries formant des endospores avec un type respiratoire aérobie facultatif ou strict, ayant une forme en bâtonnet et produisant la catalase (Slepecky and Hemphill).

Bacillus subtilis est une espèce ubiquitaire, présente dans presque tous les écosystèmes et les SEP sécrétées par cet organisme représentent un enjeu écologique majeur (Marvasi et al. 2010). De ce

fait, *B.subtilis* a longtemps été considérée comme un modèle d'espèce pour l'étude de la formation de biofilms.

Le cycle de vie d'un biofilm de *B.subtilis*, depuis l'initiation jusqu'à la dispersion des cellules peut être décrit comme suit : les cellules mobiles, avec leur ciliature, souvent péritriche, viennent coloniser la surface, et l'expression des gènes responsables de la production de la matrice extracellulaire est enclenchée en même temps que les cellules se différencient et perdent peu à peu leur motilité. Les cellules sont organisées en chaînes de bâtonnets superposés recouvertes de substances exopolymériques. En plus de la présence de cette matrice, des cellules ainsi sessiles cohabitent avec des spores au sein du biofilm. La différenciation cellulaire permet ainsi une organisation spatiale de manière à retrouver les cellules plus ou moins mobiles à la surface du biofilm, puis les cellules sessiles et produisant la matrice et enfin les spores au fond du biofilm. Lorsque le stade de la maturation est atteint, de petites molécules (polyamines, acides D-aminés), dont la production est régulée par le QS, sont sécrétées pour induire une déstructuration de la matrice et permettre la dispersion des cellules (Vlamakis et al. 2013b).

Le biofilm de *Bacillus subtilis* peut se présenter sous trois formes différentes :

- colonies à l'interface agar-air, lorsque cultivées en milieu gélosé présentant un aspect ridé attribué à la présence de cellules mortes et de matrice extracellulaire. et biofilm flottant à l'interface liquide-air dont l'aspect est proche de celui des colonies précédentes.
- biofilm immergé fixé à une surface (solide-liquide) (Vlamakis et al, 2013).



FIGURE A-8. Biofilms de *B.subtilis* cultivés en laboratoire. Gauche: colonie formée sur un milieu MSgg pendant 7 jours. Droite : Pellicule formée après 5 jours. (Vlamakis et al. 2013a)

La matrice du biofilm de *B.subtilis* est constituée majoritairement d'exopolysaccharides et de protéines, et indique une topographie de surface rugueuse à caractère hydrophobe, qui confère

ainsi une imperméabilité aux solutions aqueuses et aux solvants organiques et polaires (Vlamakis et al. 2013a).

Les SEP produites par les souches de laboratoire de *B. subtilis* présentent des masses moléculaires allant de 0,57 à 128kDa. La composition des groupes fonctionnels qui constituent les SEP dépend de la phase de croissance de la population bactérienne, avec notamment une prédominance de SEP libres en phase stationnaire (Marvasi et al. 2010). Les exoprotéines et les exopolysaccharides sont les SEP majoritaires en masse et la teneur en ePN en tant que SEP libres augmente entre la phase stationnaire et la phase exponentielle. Flemming a classé les SEP de biofilms en 7 catégories (Flemming et al. 2007) seulement 4 d'entre elles sont retrouvées chez *B. subtilis* :

- les SEP structurales qui comprennent les ePS neutres et qui servent d'éléments d'architecture, mais également de rétention d'eau et de protection cellulaire. Les lévanes de type I (polymère de β -2,6-D-fructose) et de type II (polymère de fructose lié à un résidu glucose à l'extrémité de la chaîne) sont produits par la lévane-saccharase (Abdel-Fattah et al. 2005). D'autres ePS ont été rapportés chez des souches de *B. subtilis* mais leur rôle n'a pas été élucidé clairement. Il semblerait qu'ils soient composés de glucose, de galactose, de fucose, d'acide glucuronique et de groupements O-acétylés, à des ratios approximatifs de 2 : 2 : 1 : 1 : 1,5 (Marvasi et al. 2010).

- les SEP de sorption (ou d'adhésion) dont le γ -polyglutamate (γ -PGA), une substance exopolymériques caractéristique des biofilms à *Bacillus* produite en grande quantité chez certaines souches de *B. subtilis* et peut améliorer la formation de biofilm fixé. Ce polymère visqueux, anionique, non-toxique et biodégradable de D- et de L-glutamate a une masse moléculaire de 10000 kDa. Le γ -PGA de *B. subtilis* est composé de 50 à 80% de D-glutamate et de 20 à 50% de L-glutamate (Morikawa et al. 2006). Ce polymère est produit pour favoriser les interactions cellules-cellules par des ponts salins (Ca^{2+} et Mg^{2+}) entre les molécules chargées négativement (Marvasi et al. 2010). La présence d'ADN extracellulaire a été rapportée chez les espèces de *Bacillus* (Vilain et al. 2009) et semblerait être nécessaire pour l'adhésion initiale et la formation de biofilms.

- les SEP de surface regroupent les lipopeptides tels que la surfactine, une des molécules les plus étudiées chez *B. subtilis*. Ces lipopeptides sont classés selon 3 groupes :

- o le groupe des surfactines
- o le groupe des iturines
- o le groupe des plipastatines-fengycines.

Ces molécules interviennent dans la solubilisation de substrats difficilement dégradables par les bactéries (Sutherland 2001a). Les surfactines sont également impliquées dans la formation de structures aériennes chargées de favoriser la dispersion des spores (Branda et al. 2001). L'iturine A semblerait être produite par toutes les souches de *B. subtilis* étudiées mais des analyses plus approfondies sont nécessaires pour comprendre leur rôle dans la formation de biofilms (Marvasi et al. 2010).

- les SEP actives sont majoritairement représentées par la composante protéique de la matrice. Au moins 200 protéines composent le sécrétome de *B. subtilis*, incluant celles responsables de la sécrétion d'enzymes extracellulaires. Les exoenzymes, notamment celles qui sont actives sur les ePS comme la lévane-saccharase sont produites dans le milieu extracellulaire. La synthèse de cette enzyme est fortement induite par la présence de saccharose. Les exoenzymes actives sur les protéines sont également décrites et, au moins 7 exoprotéases, dont 2 majoritaires (les subtilisines et les métalloprotéases neutres) et 5 minoritaires (les bacillopeptidases F, Mpr, Epr, Npr et Vpr) ont été rapportées chez *B. subtilis*. Ces protéases digèrent les protéines présentes dans l'environnement lorsque la teneur en azote disponible est faible (Marvasi et al. 2010). D'autres ePN actives sont également sécrétées pour dégrader des lipides, les acides phytiques et des acides nucléiques extracellulaires pour pallier à cette carence en azote.

Parmi les exoprotéines actives identifiées, la *TasA* est impliquée dans la stabilité structurale de la matrice et résulte de l'assemblage des monomères en fibres amyloïdes. Elle est responsable de l'adhésion intercellulaire au sein des biofilms. La *TasA* est en interaction avec la *TapA* qui ancre les fibres à la paroi cellulaire. L'association *TasA-TapA* est essentielle à la formation de pellicules et de colonies mais non indispensables aux biofilms immergés (Romero et al, 2011; Vlamakis et al, 2013). La deuxième protéine est la *BslA* (anciennement appelée *YuaB*) qui joue un rôle important dans l'hydrophobicité de la surface du biofilm et assure la formation de la pellicule (Hobley et al, 2013).

L'organisation et le rôle des SEP de la matrice du biofilm de *Bacillus subtilis* est ainsi résumée sur la FIGURE A-9.

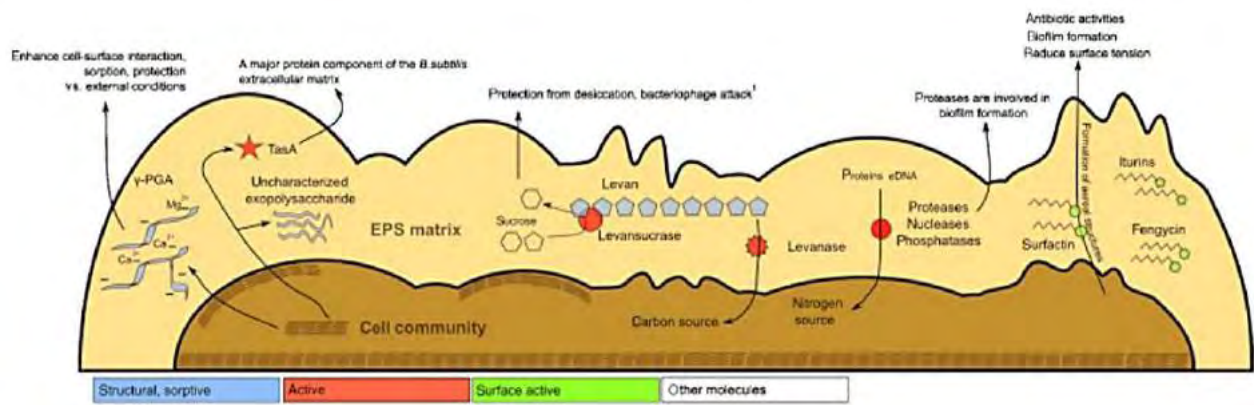


FIGURE A-9. Organisation des SEP de la matrice du biofilm de *Bacillus subtilis*. (Marvasi et al. 2010)

1.2.1.2 Matrice de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont longtemps été un modèle d'étude *in vitro* des biofilms bactériens. Les *Pseudomonadaceae* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts, de quelques micromètres de longs. Les cellules sont mobiles grâce à une ciliature polaire. Ce sont des organismes ubiquitaires occupant diverses niches biologiques dans l'environnement. Leur capacité à former des biofilms en surface leur confère un intérêt pour les microbiologistes du fait de leur enjeu dans le domaine médical (Donlan, 2002; Hall-Stoodley, 2004), et environnemental (Dechesne et al, 2010).

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* appartient à la classe des *Gammaprotéobactéries* et se trouve de manière générale dans les sols et les sources aquatiques naturelles. Ces bactéries peuvent aussi coloniser la surface des cellules animales et des plantes, avec des effets pathogènes avérés pour ces dernières (Todar 2012). Elles sont aussi reconnues comme étant des pathogènes opportunistes humains ; par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* est la 4^{ème} souche la plus isolée parmi les responsables d'infections nosocomiales, représentant 10% des infections contractées en milieu hospitalier, et montrant une résistance accrue aux antibiotiques.

Dans la nature, cet organisme est organisé sous-forme de biofilm, adsorbé aux surfaces, ou sous-forme de cellules planctoniques activement mobiles. Les souches modèles isolées de *Pseudomonas aeruginosa* peuvent produire trois types de colonies : les isolats naturels forment des petites colonies rugueuses, les isolats cliniques sont généralement plus lisses et plus larges et enfin les souches isolées d'infections de tractus urinaire ou pulmonaire possèdent une apparence mucoïde dont l'origine est attribuée la production de film d'alginate. Les appendices protéiques que sont le flagelle et les pili de type IV (Klausen et al, 2003) peuvent être considérés comme les premiers éléments constituant la matrice extracellulaire. Ils sont en effet exprimés à la surface des

cellules lors de l'étape d'adhésion. La phase de transition du phénotype planctonique vers un phénotype sessile s'opère par la perte progressive du flagelle (Ma et al, 2009).

Puis, les cellules immobilisées synthétisent des SEP permettant alors d'encapsuler tout le système et de l'immobiliser de façon irréversible sous l'aspect de micro-colonies structurées en forme de champignons.

Suite à cette conformation en micro-colonies, lorsqu'une déficience nutritionnelle survient, les cellules bactériennes opèrent un changement de phénotype et des gènes responsables de la production de protéines flagellaires sont réactivés et des enzymes comme l'alginate lyase sont produites pour engendrer une déstructuration de la matrice extracellulaire. Par ce phénomène, les cellules ainsi remobilisées pourront se détacher et coloniser d'autres surfaces.

L'évolution de l'architecture des biofilms de l'espèce *Pseudomonas* dépend des composés qui constituent la matrice telles que les polysaccharides comme le Pel, le Psl qui est un exopolysaccharide capsulaire qui s'enroule hélicoïdalement à la surface des cellules (FIGURE A-10), ou encore l'alginate pour les souches mucoïdes, l'ADN extracellulaire ou les exoprotéines comprenant les fimbriae Cup A, CupB et CupC. Ces SEP retardent la diffusion des antibiotiques le gradient d'oxygène qui s'installe progressivement entre le cœur et la surface du biofilm induit l'apparition de sous-populations bactériennes qui présentent une résistance variable aux antibiotiques. L'ADN extracellulaire est libéré dans le milieu extracellulaire par un mécanisme d'autolyse régulé par le QS.

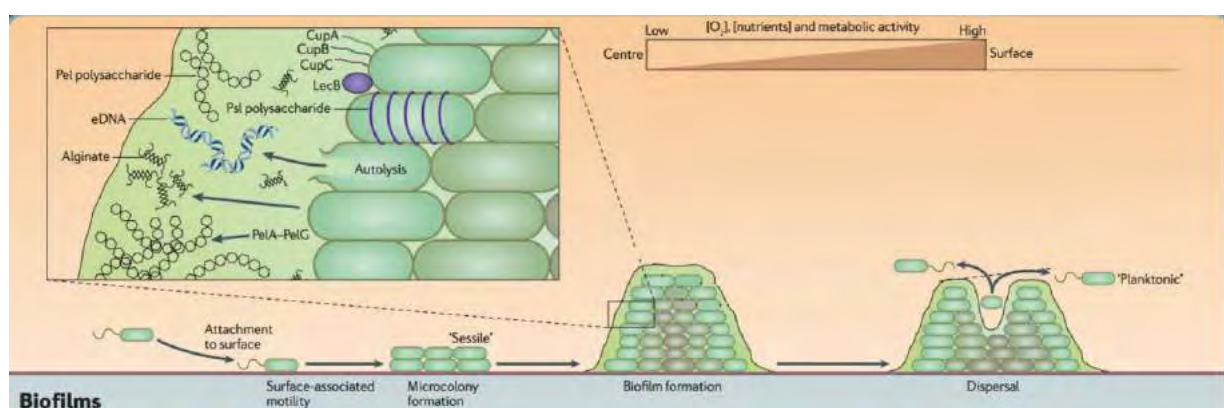


FIGURE A-10. Mécanisme de formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et composés majoritaires de la matrice (Alan Hauser and Egon A. Ozer 2011)

Par ailleurs, les propriétés mécaniques de la matrice de *Pseudomonas aeruginosa* ont été analysées en l'assimilant à une matrice artificielle reconstituée à partir de polysaccharides

(alginate...) et de protéines amyloïdes bactériennes (FapC). Ainsi, les mesures rhéologiques ont ainsi démontré une propriété viscoélastique de la matrice en réponse à une contrainte de cisaillement. La présence de fibres amyloïdes ne semble pas empêcher la gélification de la matrice artificielle mais influence la déformation et modifie ses propriétés élastiques sous une contrainte de cisaillement. La production de fibres amyloïdes dans les biofilms pourraient ainsi constituer une forme d'adaptation aux changements environnementaux (Lembré et al. 2014a).

1.2.1.3 Biofilms de bactéries lactiques

Les bactéries lactiques désignent des espèces à Gram positif, non sporogènes, généralement anaérobies et catalases négatives. Il existe trois types de métabolismes fermentaires : les bactéries homofermentaires strictes, qui synthétisent quasi-exclusivement de l'acide lactique à partir des hexoses, les hétérofermentaires strictes qui vont produire en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'éthanol et du CO₂, et les hétérofermentaires facultatives, capables d'adapter leur métabolisme aux conditions environnementales.

Même si plusieurs genres de bactéries produisent l'acide lactique comme métabolite primaire ou secondaire à l'issue de la fermentation du glucose, le terme « Bactérie Lactique » est réservé de manière conventionnelle aux bactéries de la famille des *Lactobacillaceae*, qui regroupe les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, mais aussi les *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et enfin *Weissella*.

Les LAB constituent le groupe de microorganismes le plus exploité dans l'industrie alimentaire dans les processus de fermentation. Elles confèrent le goût et la texture des produits fermentés (yaourt, fromage, beurre, vin, viande et charcuteries) et inhibent la croissance des bactéries responsables de la dégradation des aliments en produisant des substances inhibitrices et une grande quantité d'acide lactique.

Les souches de LAB produisant des oligo- ou homopolysaccharides, tels que les membres des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weissella*, suscitent une attention particulière pour leur potentiel texturant et prébiotique dans l'industrie agroalimentaire. Les exopolysaccharides (ePS) produits par les LAB diffèrent selon leur organisation moléculaire, leur composition chimique, leur structure et leurs déterminants génétiques, et cette diversité est assurée par leurs activités extracellulaires Glucane-saccharase et glycosyl-transferase (GTF). La structure, la composition et la viscosité des ePS est fonction de la nature de la souche productrice, de la composition du milieu

de culture, des sels minéraux présents et des conditions de fermentation (pH, Température). C'est ainsi grâce à leurs propriétés diverses et variées que les exopolysaccharides sont considérés comme étant de bio-épaississants et/ou des hydrocolloïdes (Palomba et al, 2012) largement utilisés dans l'agroalimentaire. Ces ePS affectent les propriétés viscoélastiques et stabilisent la rhéologie des levains lors de leur stockage à froid, ce qui permet de garantir leur qualité avant usage.

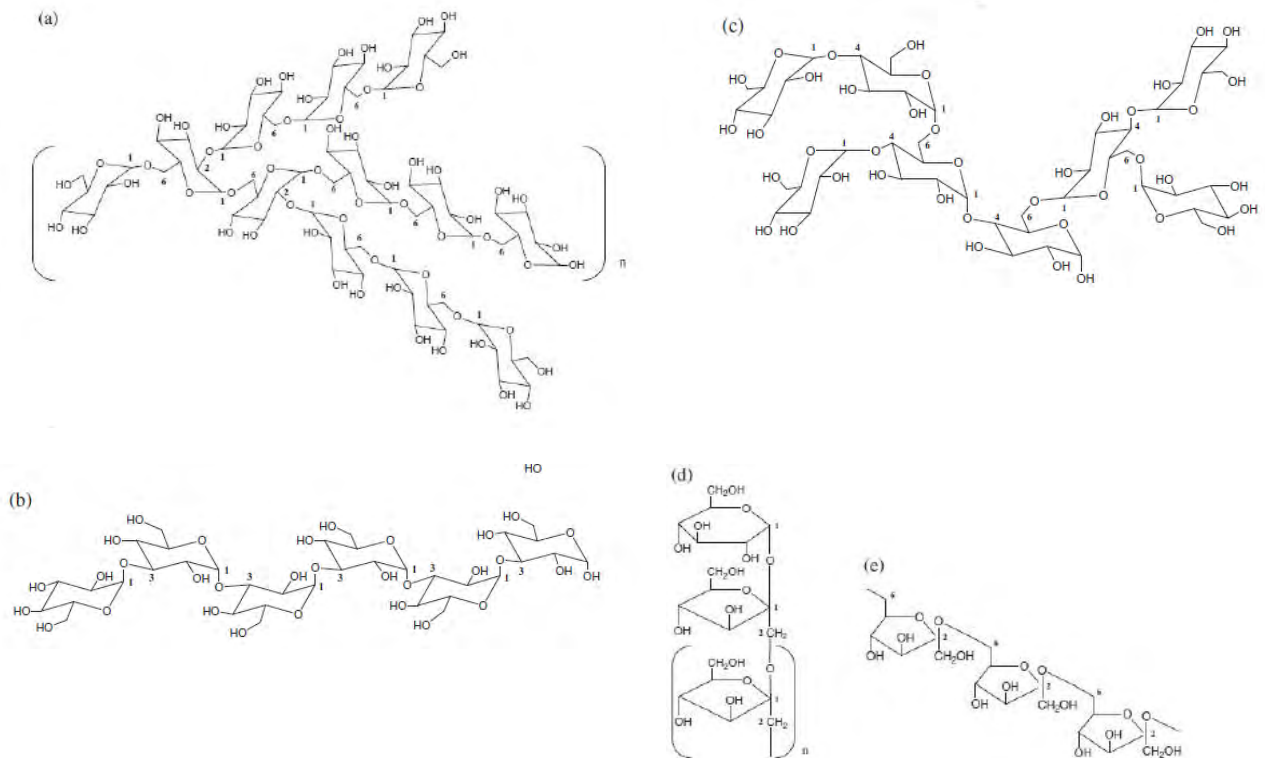


FIGURE A- 11. Structure des exopolysaccharides produits par les LABs. a) Dextrane, b) Mutane, c) reutérane, d) inuline, e) Levane. **(Badel et al. 2011)**

Par ailleurs, bien que les bactéries lactiques soient considérées comme bénéfiques dans l'industrie alimentaire, leur capacité à développer une résistance aux stress environnementaux (traitements biocides, pH acides,...) peut causer de sérieux problèmes technologiques. La formation de biofilm est principalement mise en cause et pourrait expliquer cette résistance ; en effet la viabilité cellulaire (FIGURE A-12) est nettement supérieure pour une population de *Lb. plantarum* organisée en biofilm comparée à celle de cellules planctoniques face à l'action de différents agents organiques (Acides acétique, citrique, lactique et malique, éthanol et hypochlorite de sodium) (Kubota et al, 2008).

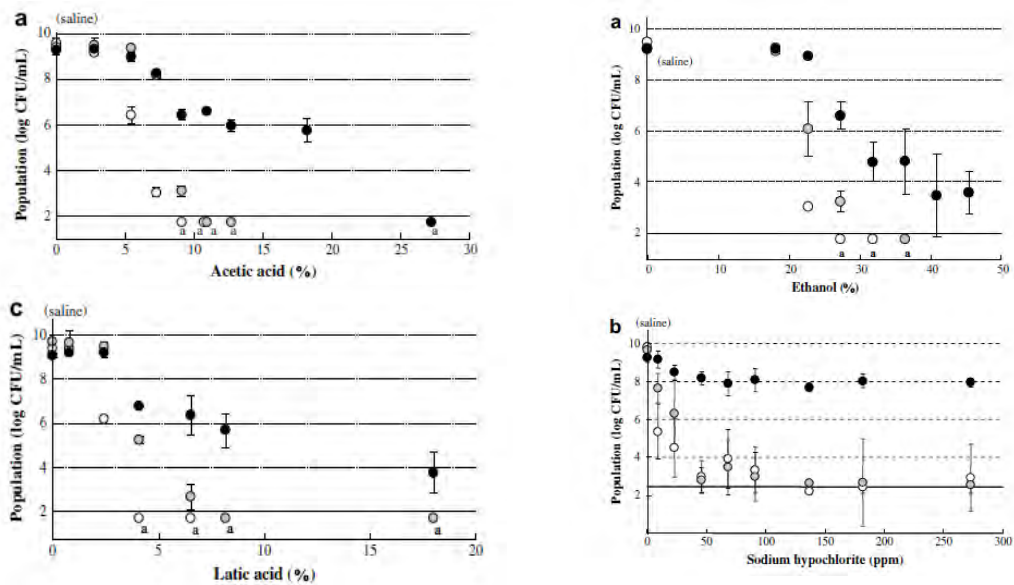


FIGURE A-12. Viabilité cellulaire des biofilms (.) et des cellules planctoniques en phase stationnaire (o) et en phase exponentielle (o) de *Lb. plantarum* JCM1149. (Kubota et al. 2009)

Certaines espèces de *Leuconostoc* sont également capables de produire des biofilms qui peuvent être néfastes dans les raffineries de sucres. Elles produisent du dextrane et relarguent du fructose ce qui induit un encrassement des filtres et une inhibition de la cristallisation du sucre. Cette production de dextrane s'accompagnant du développement du biofilm a été observée chez *Leuconostoc citreum* souche NRRL B-1355 (Leathers & Bischoff, 2011).

Les ePS semblent favoriser l'adhésion des cellules aux surfaces biotiques et abiotiques chez *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus sakei* (Badel et al, 2011) : ils limitent la dessiccation par un taux élevé d'hydratation et protègent ainsi les cellules dans des conditions environnementales difficiles, et, enfin, ils permettent de contourner les actions antimicrobiennes des phages et des antibiotiques (Palomba et al, 2012).

1.2.2 Exemples de matrice Extracellulaires de biofilms multi-espèces

Les biofilms naturels retrouvés dans les milieux aquatiques ou marins ainsi que dans le milieu industriel sont le plus souvent composés de communautés microbiennes multi-espèces ; la composition de la matrice extracellulaire est donc aussi variable que les espèces sont nombreuses. De même, les propriétés physico-chimiques ainsi que les interactions moléculaires sont plus variables et complexes que dans un système modèle mono-souche.

Fang et al. (2014) ont comparé la composition en SEP de trois biofilms phototrophes d'eau douce provenant d'un lac, d'une station de potabilisation et d'une station d'épuration. Leurs résultats

ont montré que les SEP étroitement associées aux cellules étaient dominantes, avec une prépondérance des polysaccharides dans les biofilms de lac tandis que les protéines étaient majoritaires dans les biofilms issus des stations de traitement de l'eau. Les substances humiques ne représentaient jamais plus de 15% des SEP dosées. Dans des boues de station d'épuration, la fraction protéique a été étudiée par (Larsen et al. 2008a) qui ont montré qu'elle était constituée, pour partie, de fibres amyloïdes occupant entre 19 et 40% du biovolume de dix boues différentes (FIGURE A-13).

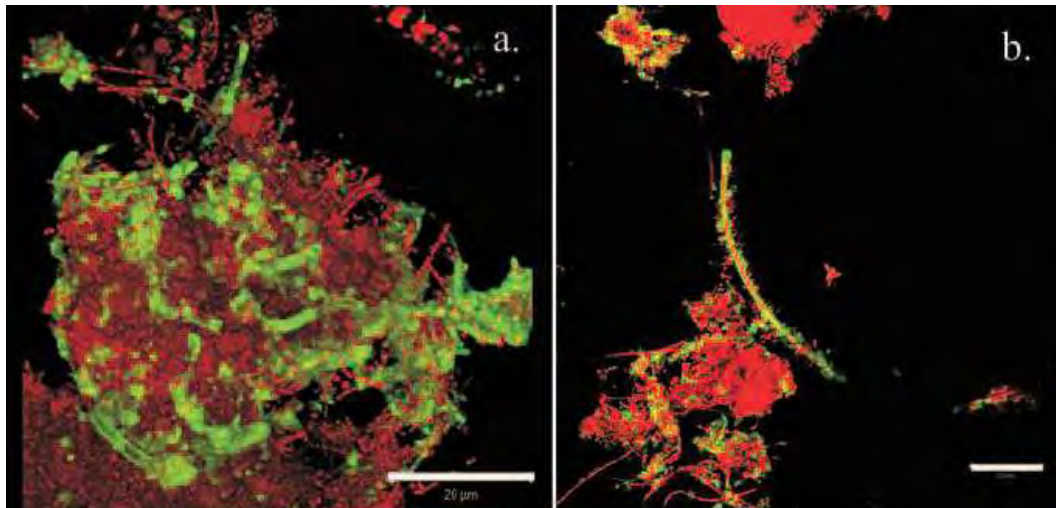


FIGURE A-13. Détection des adhésines amyloïdes dans des boues activées par marquage à l'aide d'un anticorps anti-WO1 (a) ou le marqueur thioflavine T (ThT) (b), tous deux spécifiques des fibres amyloïdes et couplés à l'iodure de propidium (en rouge). (Larsen et al. 2008a)

Au cours de sa thèse, Cédric Caudan (LBAE, 2008-2012) a par ailleurs montré une répartition spatiale des différentes SEP au sein de granules bactériens produits en réacteur pilote et impliqués dans un procédé aérobie de transformation de l'azote. Après marquage des protéines et des glucanes par des sondes fluorescentes, l'observation en microscopie confocale révèle une matrice extracellulaire très organisée. En effet, les alpha-glucanes sont préférentiellement distribués en guangues polysaccharidiques entourant les bactéries, elles-mêmes enchassées dans un réseau protéique dense (FIGURE A-14 et 16).

Une double approche, basée d'une part sur l'analyse des propriétés chimiques des biopolymères extracellulaires extraits de granules, et d'autre part sur des mesures de cohésion réalisées sur les granules après digestion enzymatique ou altération chimique a permis de conforter l'implication des protéines à caractère fortement anionique dans l'agrégation de la matrice (Caudan et al. 2014).

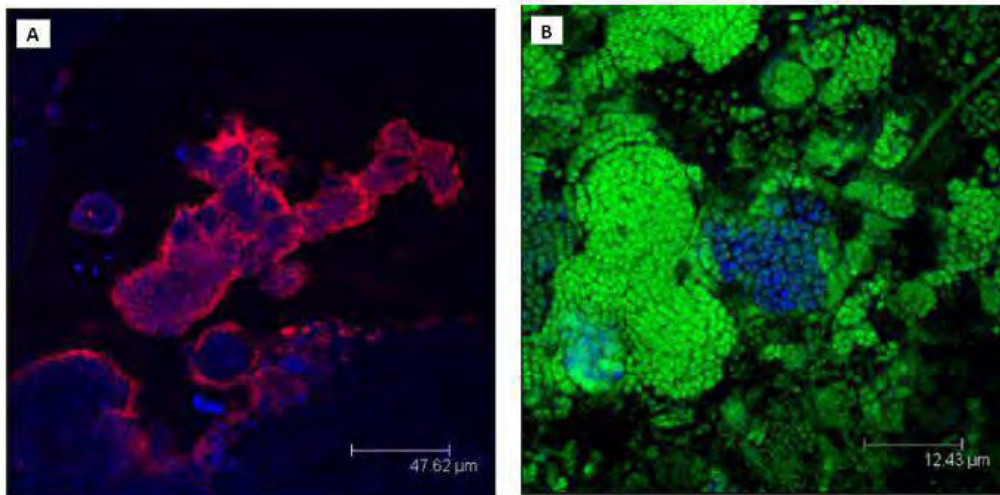


FIGURE A-14. Observation en microscopie confocale de granules aérobies : polysaccharides marqués en rouge par une lectine ciblant les résidus glucose et mannose (A) et protéines marquées en vert (B). (Caudan et al. 2014)

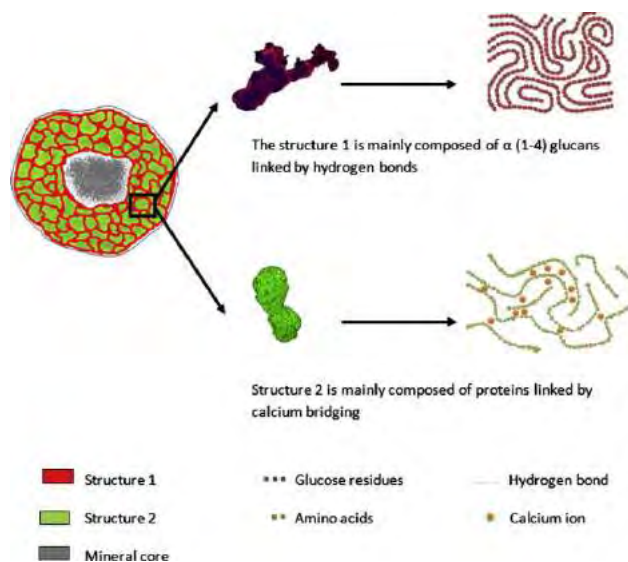


FIGURE A-15. Modèle structural des granules aérobies, proposé par Caudan et al. (2014)

I.2.3 Influence des facteurs environnementaux

Le développement de biofilm est le résultat d'un ensemble de phénomènes engendrés par l'interaction de plusieurs facteurs physiques, chimiques, et biologiques (Characklis 1981). La présence des biofilms est notamment gouvernée par les conditions environnementales (température, pH, flux de nutriments...), mais aussi par la nature du support sur lequel vont s'accumuler les cellules, ou encore les conditions hydrodynamiques qui peuvent renforcer ou non l'adhésion et la cohésion du système.

La quantité et l'origine des nutriments ont un effet significatif sur la composition et le taux de production des SEP (Sheng et al. 2010). Ainsi les SEP produites au sein de boues activées et extraites par résine échangeuse de cations sont riches en protéines et pauvres en polysaccharides lorsque le ratio carbone/azote est de 5, et lorsque ce ratio augmente à 40, le taux de protéines diminue drastiquement tandis que les sucres augmentent (Durmaz and Sanin 2001). Ras et al. (Ras et al. 2011) ont étudié l'influence des conditions environnementales sur la diversité des SEP produites par des biofilms matures et multi-espèces, formés en réacteur pilote pour l'élimination de pollutions carbonées et azotées. La composition du milieu d'alimentation, plus ou moins riche en sources carbonée et azotée a eu une influence sur le développement de la flore microbienne et sur les propriétés physiques des biofilms. Les biofilms formés en présence d'un excès d'azote sont plus fins et plus denses que ceux obtenus avec la même concentration en carbone mais en limitant la source azotée. D'autre part, la distribution des SEP, ainsi que leur masse moléculaire ont été analysées afin de corréliser les caractéristiques spécifiques des SEP aux conditions de croissance. Malgré des alimentations très différentes avec des rapports Carbone / Azote de 4 ou 73 g/g, les SEP extraites des divers biofilms ont montré des rapports protéines/polysaccharides identiques et très en faveur des protéines (ratio entre 2,9 et 3,7) confortant ainsi l'idée de la prépondérance des protéines dans les matrices de biofilms pluri espèces. L'analyse des profils de taille des SEP extraites indique que certaines ePN sont retrouvées spécifiquement dans les biofilms à activités autotrophes (ratio C/N faible) ; ces protéines pourraient ainsi participer à la diversité de structure des biofilms obtenus.

Dans l'industrie papetière, les conditions de nutriments à la surface des machines sont très particulières du fait de la forte concentration en carbone et d'une faible proportion d'azote et de phosphore (Rochex and Lebeault 2007). Ces conditions dépendent de la composition de la matière première (pulpe de papier contenant de la cellulose, des lignines, des oses simples et divers additifs chimiques, ...). Marcato-Romain et al. (2012) ont ainsi montré une variabilité importante de la composition relative en polysaccharides et protéines tout au long d'une ligne de production de papier, les protéines étant toujours majoritaires.

Dans le domaine médical, les bactéries responsables de caries, et *Streptococcus mutans* en particulier, sont très largement étudiées. Ainsi, Shumi et al. (2013) ont montré que l'ajout de saccharose dans le milieu conduisait à former des agrégats 2,5 à 5 fois plus résistants à une contrainte hydrodynamique, grâce à la production d'un exopolysaccharide.

Outre les sources de carbone et d'azote, la force ionique, les métaux et les minéraux ont également un effet sur la formation du biofilm et la production de SEP (Sheng et al. 2010). Ainsi, dès 1997, Higgins and Novak (1997) ont montré que la concentration en cations Ca^{2+} ou en Mg^{2+} modulait la production et l'agrégation de protéines dans les boues. Ces éléments peuvent également faciliter l'adhésion des cellules aux surfaces en réduisant les répulsions électrostatiques (Renner and Weibel 2011).

De la même façon, la présence de composés toxiques ou exogènes dans le milieu influence sur la formation du biofilm (Sheng et al. 2010). L'exposition d'un biofilm modèle de *Pseudomonas putida* à du chrome a ainsi montré l'augmentation des protéines, de l'ADN et des sucres extracellulaires (Priester et al. 2006). Le chrome, le cuivre, le cadmium et le 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) ont également stimulé la production de SEP, et en particulier des protéines (Sheng et al. 2005). Le même type de phénomène a pu être observé pour des composés exogènes : récemment, Verneuil et al. (2015) ont montré que l'exposition d'un biofilm modèle de la diatomée *Nitzschia palea* à des nanotubes de carbone se traduisait par une augmentation de la production des protéines extracellulaires, et en particulier des protéines présentant des propriétés hydrophobes.

Le pH et la température du milieu sont d'autres facteurs du milieu intervenant sur les biofilms. (Flemming et al. 2013) rapporte des travaux réalisés dans l'industrie papetière et montrant que l'augmentation du pH de 5.5 à 7.0 était corrélée à une augmentation de la production de biofilm. Récemment, (Pellicer-Nàcher and Smets 2014) ont également montré sur des biofilms de réacteurs à membrane que l'augmentation de la teneur en oxygène conduisait à des biofilms plus cohésifs en lien avec la quantité de SEP au sein du biofilm : les biofilms les plus cohésifs étaient les plus riches en protéines et les moins riches en polysaccharides.

Outre les propriétés du milieu, et afin de comprendre les mécanismes d'adhésion des bactéries aux supports solides et la composition de la matrice extracellulaire, il est important d'examiner et de connaître les propriétés de ces surfaces ainsi que celles de la cellule.

Il est possible de trouver des supports très hydrophobes, comme le Teflon (cathéters,...), le plastique, le latex ou le silicone, ou, à l'inverse, hydrophiles et chargés tels que le verre et les surfaces métalliques. En ce qui concerne la texture, certains matériaux peuvent être rugueux (tuyau de canalisation, surfaces environnementales telles que les rochers,...) ou plutôt lisses (silicone, teflon). Toutes ces caractéristiques ont un effet considérable sur la capacité d'adhésion des microorganismes (Donlan 2001). Généralement, plus ces surfaces seront rugueuses et

hydrophobes plus les biofilms se développeront rapidement. *A fortiori*, lorsque ces surfaces sont au contact d'un flux de liquide (sources d'eau, tractus urinaire, système sanguin, conduit de machine industrielle, ...) elles accumulent du matériel protéique faisant office de film conditionnant qui pourrait masquer les propriétés intrinsèques de la surface. De ce fait, l'attachement des cellules est favorisé par cette « pré-couche » de polymères.

Parallèlement à cela, les caractéristiques de la surface des cellules sont impliquées dans le processus. En effet, la présence de flagelles, de pili, de fimbriae impacte beaucoup le taux d'adhésion. Ces éléments permettent aux cellules de pallier aux forces de répulsion induites par le matériau. De plus, ces appendices maintiennent la fixation des cellules jusqu'à la phase d'adhésion irréversible. L'hydrophobicité de la surface des cellules a été montrée comme étant importante pour l'attachement des cellules.

Enfin, l'impact des facteurs hydrodynamiques sur la formation des biofilms est l'un des paramètres les plus étudiés. Stoodley et al. (2002) ont montré l'effet du régime d'écoulement hydrodynamique sur la morphologie d'un biofilm modèle de *Pseudomonas aeruginosa*. Les biofilms cultivés sous une forte contrainte de cisaillement tendaient à former des « comètes » filamenteuses tandis que ceux cultivés sous faible contrainte se développaient sous forme de micro-colonies en forme de monticules. De plus, ces travaux suggéraient que la force d'attachement à la surface et la cohésion des biofilms augmentaient avec la contrainte de cisaillement.

Les facteurs hydrodynamiques sont particulièrement étudiés dans le domaine du traitement de l'eau. En effet, le dépôt de film sur la paroi interne des canalisations de distribution d'eau potable est un problème majeur puisque ce phénomène peut altérer la qualité de l'eau, en particulier si ces biofilms se retrouvent décrochés et re-suspendus dans l'eau par la contrainte hydraulique du flux. De plus, les biofilms peuvent créer des problèmes de colmatage des systèmes d'épuration, ou au contraire, les agrégats sont eux-mêmes le dispositif d'épuration (flocs, granules, biofilms...). Ainsi, Celmer et al. (2008) ont étudié l'effet du cisaillement hydraulique dû à l'agitation sur la structure d'un biofilm dénitrifiant et ont montré que l'épaisseur du biofilm diminuait lorsque la contrainte augmentait. La concentration en SEP était alors moins importante.

D'autre part, Douterelo et al (2013), ont montré que les différents régimes hydrauliques affectent la composition des communautés bactériennes avec une forte tendance à la diversification des espèces présentes pour un régime hydraulique à débit très variable. Enfin, l'essai de

décrochement mécanique réalisé dans cette même étude n'a pas permis d'éradiquer les biofilms présents pour des conditions de fortes contraintes hydrauliques , car dans ces conditions, des biofilms plus compacts et plus adhésifs sont générés. Ainsi les espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *Zooglea* et *Janthinobacterium* pourraient développer une capacité à produire des SEP qui leur permettrait d'adhérer aux surfaces et de s'autoagréger.

II. Les Substances Polymériques Extracellulaires : éléments d'architecture et de stabilité du biofilm

Quel que soit le biofilm bactérien étudié, la matrice extracellulaire des biofilms est un système biologique complexe dont les composants majoritaires restent les exoprotéines (ePN), les exopolysaccharides (ePS), et l'ADN extracellulaire (eDNA). Chacun d'eux participe à l'émergence d'une matrice extracellulaire dont la composition, la structure et les propriétés physico-chimiques restent étroitement liées aux conditions antérieures de formation du biofilm, incluant le type de microorganismes présents et les conditions environnementales qui les ont poussés à évoluer vers ce mode de croissance.

Comme exposé dans la première partie du chapitre précédent (I.1, Processus général de formation des biofilms), de nombreuses données sont disponibles sur certains constituants extracellulaires et ceci principalement grâce à des études menées sur des souches bactériennes modèles. L'échelle d'analyse et de caractérisation des molécules étudiées reste le plus souvent celle de la molécule, voire de la cellule et il est alors difficile d'appréhender leur contribution à l'échelle de la matrice globale. De plus, les fonctions biologiques des protéines ou polysaccharides ciblés sont souvent très diversifiées et peuvent toucher aussi bien le métabolisme cellulaire, la communication entre cellules que les mécanismes de virulence.

L'objectif de ce chapitre est de proposer une revue des données disponibles sur les SEP en se focalisant sur la fonction de protection et de maintien du biofilm. Une classification des divers constituants de la matrice a été réalisée en grandes « familles fonctionnelles ». Pour chacune de ces familles, nous tenterons de dégager les caractéristiques physico-chimiques communes susceptibles de participer à la stabilité et à la cohésion de la matrice. En lien avec leurs propriétés physico-chimiques, divers mécanismes d'agrégation des SEP au sein de la matrice seront évoqués.

II.1 Les Exopolysaccharides matriciels

Les sucres confèrent des propriétés adhésives, protectrices et structurales à la matrice extracellulaire. Ils interagissent entre eux ou avec les autres composants matriciels afin de former

une colle (Flemming 2011; Limoli et al. 2015) permettant aux cellules de rester solidaires entre elles mais également d'adhérer aux surfaces. La composition en ePS varie énormément d'une espèce à une autre, beaucoup sont polyanioniques, d'autres neutres ou polycationiques. Dans les différentes études réalisées sur les ePS, les polymères de sucres sont décrits sous-forme de longues chaînes avec des masses allant de 0.5 à 2.10^6 Da (Limoli et al. 2015), et ils sont souvent associés au processus infectieux et à la résistance de bactéries pathogènes de type Gram- (*Pseudomonas*) ou Gram+ (*Enterobacteriaceae*, *Salmonelles*).

II.1.1 Les exopolysaccharides impliqués dans l'agrégation

Ces ePS interviennent à toutes les étapes de la formation et du développement du biofilm.

II.1.1.1 Les polysaccharides d'adhésion intercellulaire

Les Polysaccharides d'Adhésion Intercellulaire ou PIA sont les ePS qui interviennent dans la formation de biofilms de bactéries à Gram + telles que *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Arciola et al. 2015), bactéries à l'origine de nombreuses infections (endocardites, ostéomyélites,...). Il s'agit d'une poly- β (1-6)-N-acetylglucosamine (PNAG), partiellement acétylée et chargée positivement. Les différents PIA des espèces coagulase-négative de *Staphylococcus* peuvent varier selon leur degré de N-acétylation ou d'O-succinylation ou même selon leur masse molaire (FIGURE A-16A). Les PIA sont synthétisés par le locus *icaADBC*, lui-même régulé négativement par le système LuxS du quorum sensing de *S. epidermidis* (Xu et al. 2006) : un mutant *luxS* aura un biofilm plus volumineux et plus virulent par rapport à la souche sauvage. L'opéron *ica* peut être modulé *in vitro* en réponse à des conditions environnementales telles que la concentration en NaCl, en glucose, la température, l'apport en éthanol, ou encore l'anaérobiose (Limoli et al. 2015). Des gènes orthologues ont été identifiés chez d'autres espèces pathogènes telles que *E.coli* (Wang et al. 2004), *Yersinia pestis* (Bobrov et al. 2008), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kaplan et al. 2004), ou encore *Acinetobacter baumannii* (Choi et al. 2009).

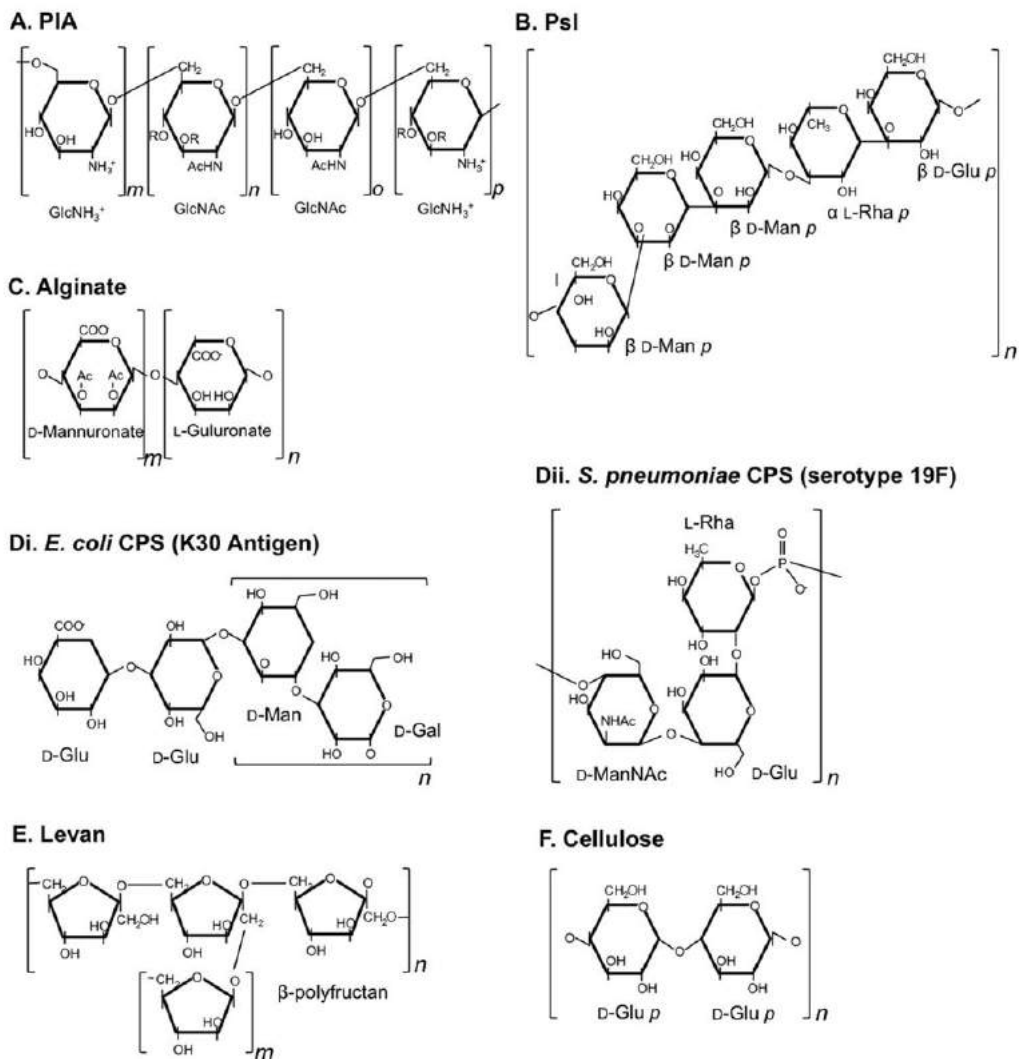


FIGURE A-16. Structure chimique des polysaccharides impliqués dans la formation des biofilms. (Limoli et al. 2015)

II.1.1.2 Les polysaccharides Psl et Pel de *Pseudomonas aeruginosa*

Chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, les exopolysaccharides Pel et Psl constituent des composants structuraux de la matrice des biofilms. Le nom Pel dérive de la pellicule fine formée à l'interface air-liquide par les souches qui surexpriment l'opéron *pel*. Ce n'est que très récemment que la structure biochimique du Pel a été élucidée. Le Pel est un ePS chargé positivement, constitué de résidus N-acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine liés par des liaisons 1→4. Par cette propriété cationique, le Pel est capable d'interagir avec l'ADN extracellulaire situé à la base des biofilms en cours de développement *via* des liaisons ioniques (Jennings et al. 2015), mais il pourrait également permettre l'interaction avec d'autres composants anioniques tels que le

dextrane-sulfate, le hyaluronane (principal composant de la surface des cellules-hôte) ou encore la mucine (constituant du mucus). *In vitro*, lorsque le Pel est mis en présence avec ces composés, des agrégats se forment et semblent conforter les hypothèses des auteurs. Notamment, le Pel pourrait ainsi participer à l'adhésion primaire aux surfaces des cellules-hôte mais également favoriser l'agrégation des cellules bactériennes entre elles.

Matsukawa and Greenberg (2004), ont identifié un locus alternatif chez une souche de *P.aeruginosa* PAO1, nommé *psl* (*polysaccharide synthesis locus*) qui produit le Psl (FIGURE A-16B), qui est un polymère de pentasaccharides dont les résidus sont le D-mannose, le D-glucose, et le L-rhamnose (Franklin et al. 2011). Ce polysaccharide est primordial pour l'adhésion initiale de ces cellules aux surfaces abiotiques et biotiques (Ma et al. 2009). Lorsque le Psl se trouve en grande quantité au sein du biofilm, il accentue la protection du biofilm contre les effecteurs immunitaires et les neutrophiles, ce qui pourrait expliquer la persistance des infections à *Pseudomonas aeruginosa* sur les plaies (Mishra et al. 2012). L'expression du Pel est étroitement corrélée à la formation de pellicules à l'interface air-liquide et au phénomène d'adhésion aux parois des tubes de culture chez la souche *Pseudomonas aeruginosa* PA14, qui est incapable de produire le Psl (Limoli et al. 2015). D'autre part, il semblerait qu'elle soit régulée par la quantité intracellulaire du second messager c-di-GMP (Lee et al. 2007). Dans l'étude réalisée par Mann & Wozniak en 2012, des souches de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sauvages et mutées ont été cultivées en tubes à essais dans un milieu supplémenté avec le colorant Rouge Congo. Lorsque le Psl est surexprimé, un phénomène important d'agrégation est observé dans les tubes. A l'inverse, les souches sauvages ou les souches mutantes déficientes en Psl ne montrent pas ou très peu d'agrégation. Cette étude menée sur l'effet individuel de l'expression de Psl ou de Pel semble indiquer que la surexpression des polysaccharides, et particulièrement Psl, résulte de l'augmentation de l'agrégation des cellules et de la formation de biofilm (Mann and Wozniak 2012).

II.1.2 Les polysaccharides de protection

La stratégie de protection des bactéries contre la réponse de l'hôte et/ou les facteurs environnementaux est le phénomène le plus étudié et le plus souvent attribué aux propriétés des biofilms lors d'infections graves liées à la persistance des communautés. Il a tout d'abord été proposé que les ePS jouaient un rôle de barrière protectrice limitant la diffusion des agents antimicrobiens (Costerton et al. 1999). Par la suite, un autre rôle des ePS a progressivement été

élargi notamment en ce qui concerne la protection contre la phagocytose, l'hydratation du réseau matriciel (prévention de la dessiccation) (Sutherland 2001b).

- **L'alginate**

L'alginate a été le premier ePS décrit chez *P. aeruginosa* du fait de sa prévalence dans les cas d'infection à fibrose kystique pulmonaire, où 90% des isolats cliniques produisaient ce polysaccharide (Limoli et al. 2015) et ont été qualifiés de souches mucoïdes (Govan 1990; Govan and Deretic 1996). La plupart des études menées sur l'alginate portent sur sa production par *P. aeruginosa*, mais d'autres bactéries du genre *Pseudomonas* ainsi que la bactérie *Azotobacter vinelandii* (Clementi 1997; Mann and Wozniak 2012) produisent aussi cet ePS. La structure de l'alginate (FIGURE A-16C) se traduit par une chaîne linéaire acétylée, composée de résidus d'acide β -D-mannuronique et de son épimère en C5, l'acide α -L-guluronique, liés par une liaison 1,4 (Franklin and Ohman 1993). Le polymère acétylé, hautement hygroscopique, confère une fluidité ainsi qu'une résistance à la dessiccation au biofilm (Sutherland 2001b). L'alginate a tout d'abord été décrit comme étant essentiel à l'établissement des biofilms (Hoyle et al. 1993; Davies et al. 1993; Davies and Geesey 1995) puis ce paradigme a été remis en cause par des études plus récentes qui ont plutôt démontré l'importance du Pel et du Psl dans le processus d'attachement aux surfaces aussi bien chez les souches mucoïdes que non-mucoïdes. L'acétylation de l'alginate influence fortement l'architecture des biofilms de souches mucoïdes en favorisant l'adhésion intercellulaire (Nivens et al. 2001; Wozniak et al. 2003). Par ailleurs, la nature anionique des molécules d'alginate leur confère la capacité de chélater les cations, préférentiellement les ions calcium. Cette chélation induirait en fait une sécrétion d'effecteurs qui apporterait une protection supplémentaire contre les réponses immunitaires (Horsman et al. 2012). Il a également été démontré que les souches mucoïdes étaient beaucoup plus résistantes aux traitements à la DNase et produisaient des biofilms avec une proportion de cellules viables plus importante que les non-mucoïdes (Ghafoor et al. 2011). De plus, cette architecture des biofilms mucoïdes, combinée aux propriétés de l'alginate, permet une protection accrue contre les agents antimicrobiens. La sensibilisation d'une souche mucoïde de *P.aeruginosa*, initialement résistante à $64\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicine, après traitement avec une alginate-lyase a permis de prouver cette observation (Alkawash et al. 2006).

- **Les homopolymères neutres : exemple du lévane et du dextrane**

Le lévane est un homopolymère neutre de haut poids moléculaire composé de β -F-fructane avec des ramifications larges (FIGURE A-16E). La production de lévane engendre l'apparition d'un phénotype mucoïde chez les bactéries pathogènes des plantes telles que *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* et *Bacillus subtilis*, mais également chez les bactéries responsables de biofilms dentaires comme *Streptococcus mutans* (Limoli et al. 2015). La synthèse de lévane est catalysée par la lévane-saccharase qui elle-même est activée par la présence de saccharose et régulée par un système senseur-kinase à deux composantes (LadS chez *P.syringae*, SacX/SacY et DegS/DegU chez *B. subtilis*, RscC/RscB, GacS/GacR et EnvZ/OmpR chez *E. amylovora* et CovS/CovR chez *S. mutans*). Le lévane est alors sécrété à travers la cellule par la voie SecA.

Le rôle général supposé du lévane dans les biofilms est relatif à sa capacité de protection face à la dessiccation et aux bactériophages ; la molécule peut également constituer une source de nutriments et un facteur de virulence. A titre d'exemple, dans les biofilms dentaires formés par *S. mutans*, une exposition au saccharose des plaques dentaires entraîne l'accumulation de lévane, qui est ensuite catabolisé en acide organique lorsque la teneur en sucres est critique (Limoli et al. 2015). Le lévane s'est avéré non essentiel à la formation de biofilm, toutefois la supplémentation en saccharose du milieu aboutit à la formation de biofilms plus épais et plus résistants aux contraintes de cisaillement (Sutherland 2001b; Dogsa et al. 2013; Limoli et al. 2015).

Le dextrane

Chez les espèces de *Weissella*, la production de polymères de glucose à partir de saccharose est catalysée par des enzymes extracellulaires, les glucane-saccharases (EC 2.4.1.5). Parmi ces enzymes, la dextrane-saccharase est à l'origine de la production de dextrane, un homopolymère de glucose avec des liaisons linéaires $\alpha(1-6)$ et des ramifications en $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ et $\alpha(1-4)$. Les espèces *Weissella cibaria* et *Weissella confusa*, des bactéries hétérofermentaires strictes, ont été isolées de plusieurs produits fermentés d'origine végétale, et en particulier de levain de panification (Robert et al. 2009; Bounaix et al. 2010) et présentent un fort potentiel de production de dextrane faiblement ramifié.

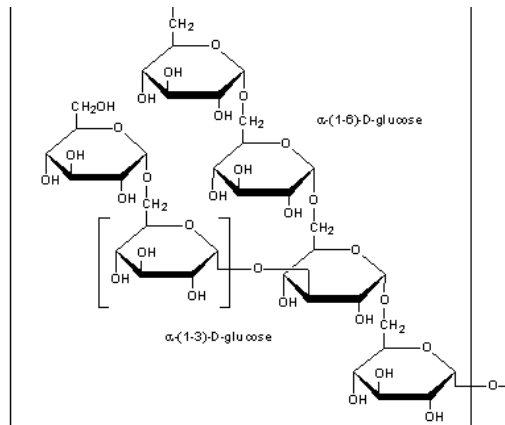


FIGURE A-17. Structure développée du dextrane, un homopolymère de glucose produit par les souches de bactéries lactiques, notamment *W.confusa*

La formation de biofilm pourrait expliquer la résistance de ces bactéries; en effet la viabilité cellulaire est nettement supérieure pour une population de *Lb. plantarum* organisée en biofilm comparée aux cellules planctoniques face à l'action de différents agents organiques (acides acétique, citrique, lactique, malique, éthanol et hypochlorite de sodium). Certaines espèces de *Leuconostoc* sont également capables de produire des biofilms qui peuvent être néfastes dans les raffineries de sucres. Elles produisent du dextrane et relarguent du fructose, ce qui induit un encrassement des filtres et une inhibition de la cristallisation du sucre. Cette production de dextrane s'accompagnant du développement du biofilm a été observée chez *Leuconostoc citreum* souche NRRL B-1355 (Leathers and Bischoff 2011).

Marchal et al. (2012) ont observé que la souche *Weissella confusa* LBAE C39.2, capable de produire du dextrane en présence de saccharose, présentait une bonne résistance à un jet de plasma froid. L'épaisseur de la matrice extracellulaire était plus importante en présence de saccharose, du fait de la surproduction de dextrane, et conférait ainsi une barrière au jet de plasma, si bien qu'un temps d'exposition plus long était nécessaire pour réduire le biofilm.

II.1.3 Les polysaccharides de charpente

II.1.3.1 La cellulose

De par sa capacité à former des réseaux rigides et structurés, la cellulose peut participer à l'architecture et la stabilité de la matrice des biofilms. La structure de la cellulose consiste en une chaîne de résidus de D-glucose liés en β -1,4 qui forme une fibre de 1 à 25nm de largeur et de 1 à

9µm de longueur. Ces fibres sont assemblées dans le milieu extracellulaire et peuvent s'empiler pour former des feuillets. La cellulose confère à la fois une structure et une protection aux cellules organisées en biofilm. Elle est, le plus souvent, associée aux curli chez plusieurs espèces d'*Enterobacteriaceae* telles que *E. coli*, *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhimurium*, et *Klebsiella pneumoniae*, pour favoriser le développement de la matrice extracellulaire mais aussi l'apparition du phénotype *rdar* (*rough, dry, and red*) chez les colonies (Zogaj et al. 2001; Römling 2002). La cellulose peut aussi être à l'origine de la formation de pellicules chez plusieurs espèces de *Pseudomonas* (Ude et al. 2006).

II.1.3.2 L'EPS de *B. subtilis*

B. subtilis produit plusieurs types de polysaccharides au sein de sa matrice extracellulaire, mais le plus important et le plus décrit est l'EPS. L'opéron *epsA-O* composé de 15 gènes est responsable de sa production et il a été reporté que des mutants déficients au *epsH* ou *epsG* étaient incapables de former des pellicules structurées (Branda et al. 2001). Cependant, bien que la nature biochimique de cet EPS n'ait jamais été décrite à ce jour, il semblerait qu'il soit essentiel pour l'agrégation des cellules et la formation de pellicules, mais également pour moduler la structure de la surface des colonies de *B. subtilis*. Un mutant $\Delta epsH$ (répression de *epsH*) va former peu de pellicules et des colonies lisses (« smooth »), et à l'inverse, la souche sauvage développe des pellicules robustes et des colonies rugueuses (« rough ») (Kearns et al. 2002).

Ce n'est que très récemment que 4 gènes de cet opéron, *epsH*, *I*, *J* et *K* ont été identifiés comme étant responsables de la synthèse de polysaccharides de type PNAG (Poly-N-Acétyl-Glucosamine), également retrouvés chez les espèces telles que *Staphylococcus aureus* ou *E.coli*. Ce PNAG (FIGURE A- 18) présente les mêmes fonctions, dans la formation et la structure du biofilm, que l'EPS longtemps cité qui caractérise la matrice de *B. subtilis* (Roux et al. 2015).

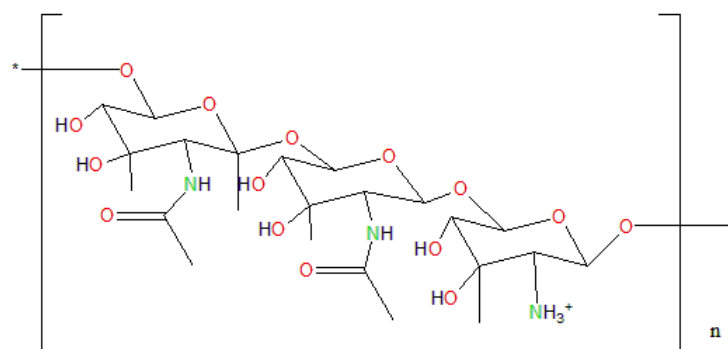


FIGURE A- 18. Structure du PNAG (Lembre et al. 2012).

II.1.4 Les polysaccharides capsulaires

Les ePS capsulaires bactériens sont le plus souvent retrouvés fermement associés à la surface des cellules chez plusieurs espèces. Cette association est assurée par des liaisons covalentes aux phospholipides. Ce sont des polymères hautement hydratés qui diffèrent selon la composition et la nature des résidus monosaccharidiques, leur liaison glycosidique, leur ramification, mais également selon la nature du substituant non glycosidique sur la chaîne. Cette diversité ouvre ainsi le champ à une multitude de structures possibles retrouvées chez les différentes espèces bactériennes. Par exemple, au moins 80 ePS capsulaires ont été identifiés chez *E.coli*, appelés antigènes K (FIGURE A-16Di), et 93 chez *Streptococcus pneumoniae* (sérotypes, FIGURE A-16D-ii) (Limoli et al. 2015).

La production d'ePS capsulaires inhiberait la formation de biofilms et l'adhérence bactérienne. En effet, les mutants déficients en ePS capsulaires chez *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, et *S. aureus* ont décrit une augmentation significative de la capacité d'adhérence aux cellules épithéliales ainsi qu'aux surfaces et produisent des biofilms plus robustes (Yi et al. 2004; Tuchscher et al. 2005; Qin et al. 2013). L'expression de ces ePS est, par conséquent, régulée négativement lors de la formation de biofilm. D'autres études ont apporté l'hypothèse d'un rôle déterminant de ces ePS capsulaires chez les biofilms matures, notamment dans la phase de dispersion ainsi que dans le maintien du volume du biofilm. Chez la bactérie *Vibrio vulnificans*, les ePS capsulaires sont sécrétés après la maturation du biofilm pour conserver un seuil de densité cellulaire (Limoli et al. 2015).

Enfin chez la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, les ePS capsulaires accrochés à la surface des cellules sont en association avec des fimbriae de type III qui permettraient le maintien de la fluidité de la capsule polysaccharidique. Cette fluidité est essentielle pour l'adhésion optimale des cellules aux surfaces car en absence de ces fimbriae, la capsule devient plus rigide et la formation de biofilm se trouve limitée (Wang et al. 2015a).

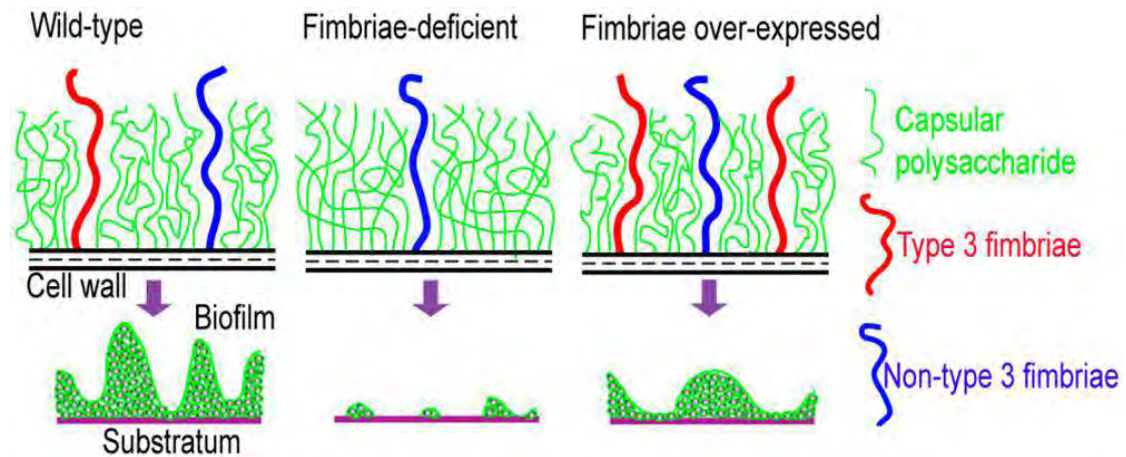


FIGURE A-19. Organisation spatiale de la capsule de la souche *K. pneumoniae* K218 en présence, en absence, et en cas de surproduction de fimbriae de type III. (Wang et al. 2015b)

II.2 L'ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) est un des composants qui persiste longtemps dans les environnements aquatiques et dans le sol, suite à sa libération dans le milieu soit après la lyse cellulaire des communautés microbiennes présentes (bactéries, fungi), soit par la sécrétion active par les cellules vivantes. Dans les extraits organiques issus de boues activées, une quantité considérable d'ADNe, de l'ordre de 20 à 300mg d'ADNe par g de matière organique, a été détectée (Dominiak et al. 2011). Dans les cultures de *Pseudomonas aeruginosa* produites en laboratoire, jusqu'à 25µg d'ADNe par mL ont été quantifiés au sein de cultures planctoniques de 3 jours (Das and Manfield 2012). L'ADNe fait partie des composants majeurs de la matrice et plusieurs études ont mis en évidence son rôle critique dans l'établissement et le maintien des biofilms microbiens (Whitchurch et al. 2002; Jakubovics et al. 2013).

Par ailleurs, l'ADNe joue diverses fonctions au sein du biofilm incluant la dissémination de l'information génétique dans le milieu ; il peut également constituer une réserve de nutriments et contribuer à la structuration de la matrice extracellulaire. La première mise en évidence du rôle de l'ADNe dans la structure du biofilm a été réalisée lors de l'étude de la matrice d'exopolysaccharides de *P. aeruginosa* durant laquelle Whitchurch et al. (2002) ont décrit que l'exposition des biofilms à la désoxyribonucléase I (DNase I) engendre l'élimination quasi-totale des cellules de la surface.

II.2.1 Origine et structure

Le mécanisme le plus fréquent de relargage de l'ADN dans l'environnement est la lyse cellulaire. Des mécanismes actifs de régulation de la lyse ont été décrits comme par exemple, la lyse par fratricide qui semble constituer une réponse à un signal du quorum sensing.

II.2.1.1. Mécanismes de libération de l'ADNe

- Relargage de l'ADNe par lyse cellulaire chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, le relargage de l'ADNe a largement été étudié (Allesen-Holm et al. 2006), et il est régulé à la fois par les voies de signalisation du quorum sensing (QS) mais aussi par des mécanismes indépendants du QS. Lorsque la lyse est programmée par le QS, les facteurs tels que les AHL et PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) sont responsables de la production de prophages et de phénazines qui vont déclencher la lyse cellulaire et donc la libération d'ADN extracellulaire. Les phénazines sont en fait à l'origine de la production de dérivés réactifs de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui va dégrader les membranes cellulaires en formant des radicaux (Das and Manefield 2012) et finalement libérer l'ADN chromosomique. Chez la bactérie *Neisseria meningitidis*, la libération de l'ADNe est permise par l'activité des enzymes N-acetylmuramyl-L-alanine amidase et d'une glucosidase qui vont hydrolyser la paroi bactérienne. Chez *Shewanella oneidensis* ce sont les prophages LambdaSo, MuSo1 et MuSo2 qui induisent une lyse cellulaire et donc la libération d'ADNe.

- Relargage de l'ADNe par lyse cellulaire chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, la lyse cellulaire se manifeste par la production de facteurs protéiques, communément appelés autolysines, par une partie de la population bactérienne. Ce processus de lyse a été décrit chez plusieurs bactéries à Gram positif, notamment chez *Staphylococcus epidermidis*, et les autolysines déclenchent la production de protéines, d'enzymes et encore de peptides directement impliquées dans le processus de lyse (FIGURE A-20). Un autre exemple est retrouvé chez les espèces d'*Enterococcus faecalis* : la production de peptide lactone (FsrD) induit la libération d'enzymes lytiques comme la gélatinase (GeIE), de protéases à sérine (SprE), ou d'autres protéases, pour provoquer le relargage de l'ADNe.

D'autres mécanismes ont été décrits comme celui existant chez les espèces *Streptococcus intermedius* et *mutans* pour lesquels la molécule CSP (Competence stimulating peptide) déclenche la lyse cellulaire. Chez *Str. Pneumoniae et sanguinis*, des bactéries qui colonisent la cavité orale et qui sont à l'origine des plaques dentaires, le relargage de l'ADNe est provoqué par la production de H₂O₂ ou de bactériophages, et non par des protéines de type autolysines (Yamada et al. 2009; Das et al. 2013).

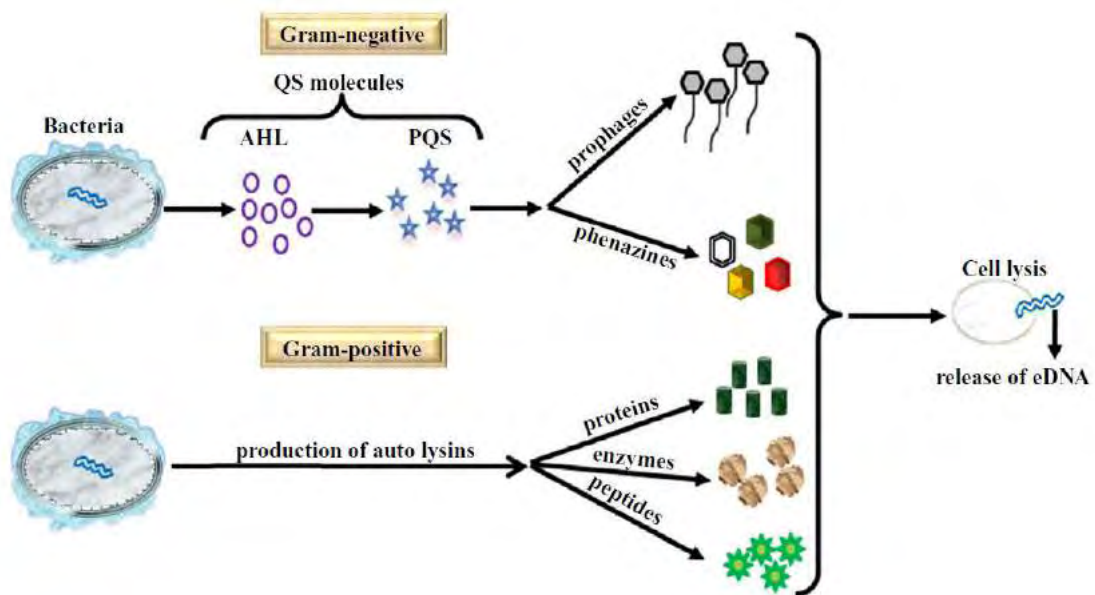


FIGURE A-20. Représentation schématique des mécanismes de relargage de l'ADN extracellulaire par lyse cellulaire chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (Das et al. 2013)

- Libération d'ADNe par des mécanismes actifs indépendants du QS

Le relargage de l'ADN extracellulaire peut également se faire par des mécanismes dits « actifs » d'excrétion qui sont l'externalisation de vésicules membranaires contenant une partie du matériel génétique (Schooling et al. 2009), ou l'excrétion d'ADN représentant le génome entier. D'autre part, il a été montré chez la bactérie *Bacillus subtilis* que la sécrétion d'ADN avait lieu pendant une courte période lors de la phase exponentielle de croissance des cellules planctoniques et que ces fragments ne comportaient pas de mutations dans la séquence génomique (Vilain et al. 2009). Chez l'espèce *Neisseria gonorrhoea*, l'ADNe est libéré par un système particulier de sécrétion de type IV (T4SS), homologue à celui des protéines. Cette sécrétion est supposée être à l'origine de la propagation de l'information génétique favorisant la résistance aux antibiotiques (Hamilton et al. 2005).

II.2.1.2. Structure et composition de l'ADNe

Chez plusieurs espèces, la structure en double hélice et la séquence primaire de l'ADNe libéré ne présentent pas ou peu de différence par rapport à l'ADN chromosomique, notamment chez *B. subtilis* (Zafra et al. 2012), *P. aeruginosa*, et *S. epidermidis* (Qin et al. 2007). Ceci n'est pas le cas pour toutes les espèces car chez *Neisseria gonorrhoea*, l'ADNe est retrouvé sous-forme d'un fragment simple brin dont la séquence est protégée de la digestion des exonucléases en 5'->3' par l'interaction avec une protéine à l'extrémité 5' (Jakubovics et al. 2013).

Chez *Staphylococcus aureus*, l'ADNe est retrouvé dans le milieu extracellulaire associé avec une enzyme (β -toxin) pour laquelle il assure la formation d'un complexe stable, appelé nucléoprotéine, et favorise un repliement de la protéine la rendant ainsi plus résistante aux détergents. Cet ADNe semble également favoriser l'établissement d'un squelette stable assurant ainsi la formation des biofilms (Huseby et al. 2010).

L'ADNe peut également se lier aux polysaccharides et favoriser l'adhésion bactérienne comme c'est le cas chez *Listeria monocytogenes*, où l'ADNe est associé à la N-acétylglucosamine (Harmsen et al. 2010).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, il a récemment été démontré que l'ADNe se fixait également à des métabolites non polymériques tels que la pyocyanine (pigment sidérophore) afin de faciliter sa liaison à la surface de la bactérie. Ce complexe ADNe-pyocyanine semble augmenter la stabilité de la matrice extracellulaire et l'agrégation cellulaire.

II.2.2 ADNe impliqué dans l'adhésion cellulaire

De nombreuses études ont démontré l'importance de l'ADNe dans les premières étapes de formation des biofilms sur les surfaces abiotiques. L'interaction de l'ADNe avec les surfaces abiotiques est gouvernée par des interactions électrostatiques ou acido-basiques et en conditions de faible force ionique, l'ADN devient plus adhésif (Tang et al. 2013). A titre d'exemple, la présence d'ADNe est essentielle lors de la phase initiale de formation des biofilms chez *S. aureus* notamment pour assurer la phase d'adhésion aux surfaces (Das et al. 2013).

L'ADNe a également un impact considérable sur les propriétés de surface des cellules et un rôle critique dans le développement des biofilms. Chez de nombreuses espèces bactériennes, l'absence d'ADNe (notamment après un traitement à la DNase I) a un impact considérable sur l'hydrophobicité de la surface des bactéries. Chez *Pseudomonas aeruginosa PA14*, l'élimination de l'ADNe réduit fortement la valeur de l'angle de contact de la surface des bactéries et donc l'hydrophobicité des cellules. Chez *Bacillus cereus*, les cellules planctoniques en pleine phase exponentielle de croissance produisent de l'ADNe contrairement à celles en phase stationnaire de croissance. Lorsqu'une lame de verre est exposée à cette suspension planctonique, la surface est rapidement recouverte de cellules adhérentes entourées d'ADNe. Ceci indiquerait que l'ADN extracellulaire est fortement associé à la surface des cellules et constitue un film conditionnant à la surface du verre pour initier leur attachement. Par ailleurs, lorsque les gènes responsables de la biosynthèse des purines *purA*, *purC* et *purL*, composantes indispensables de l'ADN, sont mutés, la cinétique de croissance des mutants est quasi-identique à celle de la souche sauvage mais la capacité à former des biofilms épais et robustes sur des surfaces de verre est fortement diminuée (Vilain et al. 2009).

Afin de mieux comprendre les facteurs qui favorisent l'interaction de l'ADNe avec les autres polymères, les métabolites, les surfaces abiotiques et également les cellules, Das et al. se sont basés sur la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) pour apporter une explication physico-chimique de l'adhésion engendrée par l'ADNe (Das et al. 2010; Das et al. 2011). Ils ont ainsi proposé que l'adhésion aux surfaces, ainsi que l'agrégation intercellulaire, était possible grâce à des interactions Liftiz-Van der Waals et des interactions acides-bases attractives au détriment des phénomènes de répulsion électrostatique. Lorsque les molécules sont à une distance de l'ordre du nanomètre, les interactions acido-basiques s'opèrent entre donneurs et accepteurs d'électrons, c'est-à-dire entre respectivement l'ADNe et les cellules ou la surface (FIGURE A-21).

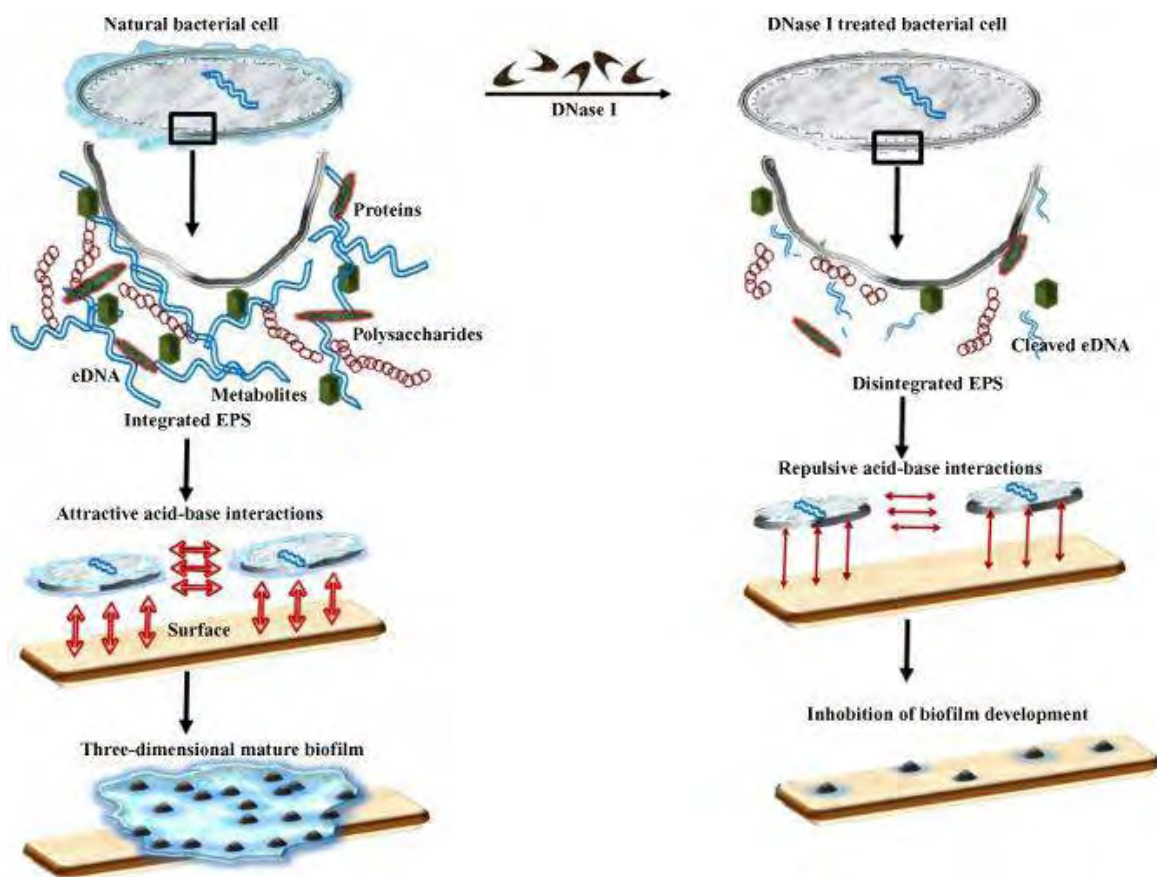


FIGURE A-21. Représentation schématique des interactions opérées par l'ADN extracellulaire avec les polymères, les métabolites, les cellules et la surface, permettant l'initiation de la formation des biofilms. (Das et al. 2011)

II.2.3 ADN impliqué dans l'agrégation des SEP et l'intégrité structurale du biofilm

L'action de la DNase et l'observation de l'efficacité de dispersion des biofilms est l'outil le plus répandu pour démontrer le rôle central de l'ADNe dans la formation de biofilms chez plusieurs espèces (Jakubovics et al. 2013; Okshevsky et al. 2015). Chez 41 souches de *Listeria monocytogenes* testées (Harmsen et al. 2010), l'ADNe semble jouer un rôle central à la fois durant la phase initiale d'attachement mais également durant la phase de formation de biofilm. Le traitement des biofilms avec la DNase I entraîne la dispersion des biofilms formés en mode statique (microplaques) mais également en mode dynamique (flow-cell).

Par ailleurs, les protéines de type histones (HU ou IHF) produites par les bactéries et appartenant à la famille des protéines DNABII sont connues pour se lier à l'ADN double brin. Il a récemment été proposé chez certaines espèces bactériennes que l'ADNe formait un réseau structuré prenant la forme d'une grille (*lattice-like or mesh-like network*) emprisonnant les bactéries. Ce réseau est

consolidé par un membre de la famille des DNABII, la protéine IHF (*Integration Host Factor*), qui vient se positionner au sommet de chaque jonction de chaque brin d'ADN (FIGURE A-22). Les deux composés confèrent ainsi une stabilité structurale au réseau (Jurcisek and Bakaletz 2007; Goodman et al. 2011; Brockson et al. 2014). Ce réseau en grillage formé par l'ADN extracellulaire a également pu être observé chez plusieurs espèces produisant des protéines de la famille DNABII comme *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus mutans*.

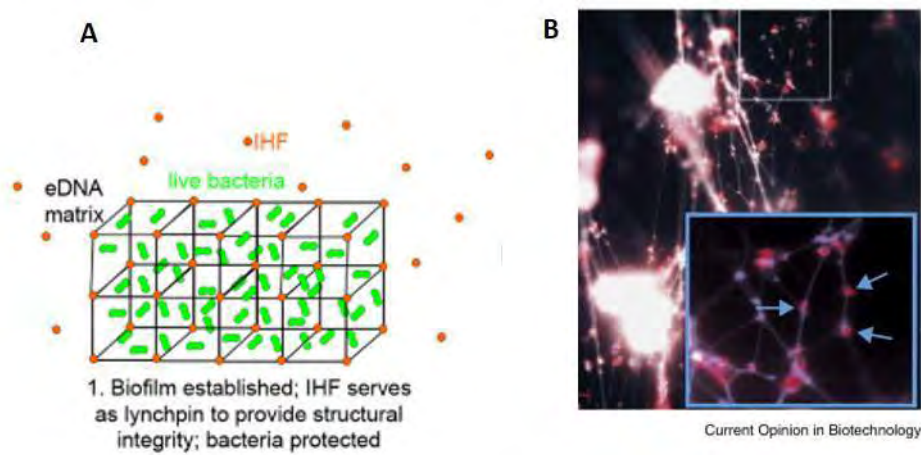


FIGURE A-22. (A) Modèle structural du réseau formé par l'ADN extracellulaire et les protéines IHF pour stabiliser le réseau matriciel du biofilm de la bactérie *Haemophilus influenzae*. Brockson et al. 2015. (B) Marquage immunohistochimique d'un biofilm de *H.influenzae* formé *in vivo*, dirigé contre une protéine IHF. L'intensité importante de la fluorescence à chaque point d'intersection des brins d'ADN est indiquée par les flèches bleues. **Goodmann et al, 2011**

II.3 Les Exoprotéines matricielles

Ces dix dernières années, les exoprotéines se sont progressivement placées au centre de plusieurs investigations (Latasa et al. 2006; Toyofuku et al. 2012) et se sont révélées non seulement quantitativement majoritaires (Molobela et al. 2010) mais occupant également diverses fonctions essentielles pour l'initiation, le développement et la stabilité des biofilms (Borlee et al. 2010; Fong and Yildiz 2015). Bien que présentant des spécificités d'espèces, diverses grandes familles d'exoprotéines peuvent néanmoins être différenciées sur la base de leur capacité à établir des interactions moléculaires avec les autres constituants du biofilm que sont les cellules, les

polysaccharides et les acides nucléiques. Du fait de leur rôle central dans l'intégrité et le maintien de la matrice extracellulaire, les exoprotéines sont devenues une des premières cibles des traitements anti-biofilms émergents dont l'efficacité a déjà été prouvée. Dans certains cas, les exoprotéines sont à l'origine, voire conditionnent, la production d'autres composants de la matrice comme les expolysaccharides (cas des enzymes de synthèse) ; elles assurent aussi l'équilibre des réseaux d'ADNe, également composants majeurs de la matrice des biofilms.

Les protéines extracellulaires déploient ainsi des fonctions aussi diverses que leur structure biochimique au sein des biofilms microbiens. Tous ces mécanismes de modulation structurale sont conditionnés par les propriétés physico-chimiques des sous-unités protéiques, telles que leur hydrophobicité qui confère des propriétés de surface à la matrice, ou encore leurs structures secondaire (feuilletts β , hélices α) et tertiaire (empilement de fibrilles, site actif enzymatique) qui favorisent la rigidité et l'organisation des biofilms.

II.3.1 Les protéines de surface

Ces protéines ont pour caractéristique commune d'être ancrées dans la paroi ou la membrane bactérienne via une région d'ancrage alors que la majeure partie de la chaîne polypeptidique située à l'extérieur de la cellule, participe à la phase initiale d'adhésion de la cellule sur un support abiotique. Elles sont relativement hydrophobes et favorisent donc l'attachement des cellules à des surfaces hydrophobes ou recouvertes d'une première couche de polymères.

II.3.1.1 La famille "Bap"

Une famille de protéines dénommée « Bap » pour « *Biofilm-associated proteins* » représente l'un des groupes de protéines matricielles les plus étudiés. Ce groupe rassemble des protéines qui partagent des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes (Lasa and Penadés 2006), comme, notamment :

- leur présence à la surface des cellules bactériennes
- leur haut poids moléculaire
- leur implication dans l'adhésion aux surfaces et la formation des biofilms
- leur implication dans les processus infectieux.

La caractéristique la plus commune que partagent les protéines Bap est la présence de répétitions multiples d'acides aminés identiques ou proches au niveau d'une région centrale.

- La protéine Bap de *Staphylococcus aureus*

Les protéines de la famille Bap ont été décrites pour la première fois chez *S. aureus* lors du criblage d'une librairie de mutants de la souche V329 à l'origine de la mammite bovine (Cucarella et al. 2001). D'autres protéines ont été retrouvées par la suite chez d'autres espèces bactériennes comme *Enterococcus faecalis* (Toledo-Arana et al. 2001; Tendolkar et al. 2004), *Pseudomonas fluorescens* et *putida* (Hinsa et al. 2003; Gjermansen et al. 2010), ou encore chez *Salmonella enterica* (Latasa et al. 2005).

La FIGURE A-23 compare la séquence de la protéine Bap de *S. aureus* avec une protéine de la famille du même nom, Esp, de la bactérie *E. faecalis*. Bap est composée de 2276 acides aminés constituant un multidomaine N-terminal pouvant être divisé en deux régions : la région A qui contient de courtes répétitions de 32 acides aminés, et la région B (361-819) qui décrit des répétitions significativement similaires à la séquence de la protéine Esp.

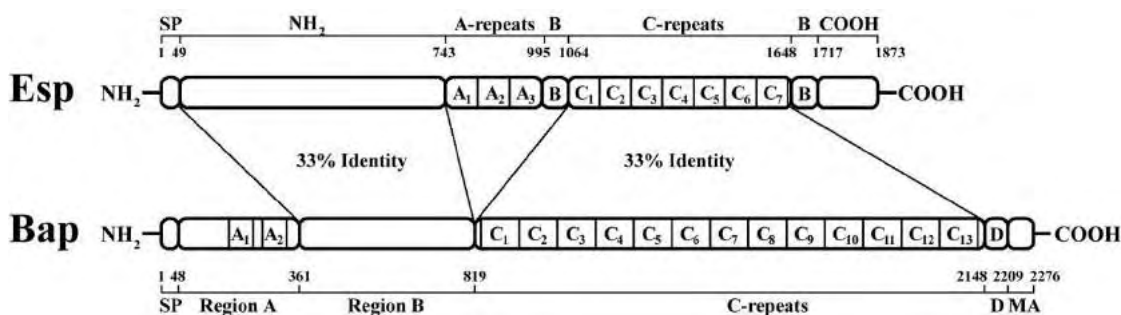


FIGURE A-23. Similitudes structurales entre les protéines Bap de *S.aureus* (V329) et Esp d'*E. faecalis* (souche MMH594). (SP) région du Peptide signal ; (MA) : Région d'ancrage à la membrane (Membrane anchor) ; les régions D, A et C correspondent aux régions de répétitions multiples. La région N-terminale de la protéine Esp et la région B de Bap montrent 33% d'identité. De même, les régions C (répétitions multiples caractéristiques de la famille Bap) indiquent 33% d'identité (Toledo-Arana et al. 2001).

La protéine Bap est essentielle à la formation de biofilm chez *S. aureus* notamment dans la phase d'adhésion initiale aux surfaces abiotiques et, plus tard, dans la cohésion intercellulaire. En effet une délétion du gène *bap* entraîne une forte diminution de la sécrétion d'une adhésine, PIA (Polysaccharide intercellular adhesin, aussi connue sous le terme Poly-N-acetyl- β -(1,6)-glucosamine) et qui représente le polysaccharide le plus abondant dans la matrice de *S. aureus*.

Cette observation faite par Cucarella et al. (2001) démontre la co-expression de Bap A avec certains exopolymères impliqués dans la formation de la matrice.

- La protéine Esp de la bactérie *Enterococcus faecalis*

La protéine de surface Esp est une molécule de haut poids moléculaire (1873 acides aminés) dont le niveau de sécrétion est croissant durant les phases d'infection par la bactérie *E. faecalis* (FIGURE A-23). D'autre part, une étude épidémiologique (Toledo-Arana et al. 2001) a mis en évidence la relation entre la présence de cette protéine et l'aptitude de la souche à former des biofilms. En effet, une similitude structurale a été montrée entre la protéine Bap de *S.aureus* et Esp, et 93,5% des isolats de *E.faecalis* *esp*-positives ont été capables de former un biofilm sur une surface en polystyrène tandis qu'aucun isolat dont le gène *esp* était déficient n'a pu former de biofilm. Le domaine C-terminal de Esp contient une région d'ancrage transmembranaire hydrophobe et un motif LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) comme toutes les protéines associées à la paroi des bactéries Gram + (Lasa and Penadés 2006).

- La protéine LapA des *Pseudomonas* sp.

La protéine LapA, pour Large adhesion protein A, a une taille estimée à environ 900kDa avec 8682 acides aminés dans sa séquence. Elle est faiblement associée à la paroi cellulaire et est également détectée dans les surnageants de culture de certaines espèces de *Pseudomonas* environnementales comme *P. putida* KT2440 et *P. fluorescens* (souches Pf01 et WCS365). La comparaison, par vidéomicroscopie, de la cinétique de formation de biofilm chez la souche sauvage de *P.fluorescens* WCS365 et des transposons dont le gène *lap* est déficient a permis de démontrer l'importance du gène et donc de la sécrétion de la protéine LapA dans la transition entre l'étape initiale d'attachement réversible vers l'étape d'adhésion irréversible des cellules sur des surfaces abiotiques hydrophobe (plastique) comme hydrophile (verre).

En se basant sur les similitudes de séquence et leur organisation structurale, il a été possible de regrouper les protéines de surface au sein d'une même et grande famille, les Bap. Ces protéines sont nombreuses et sont aussi indispensables que les autres pour la formation de biofilms aussi bien chez les bactéries Gram+ que les Gram-. L'analyse de séquence par BlastP a révélé l'existence de plus d'une centaine de protéines bactériennes homologues présentant une similitude significative, ce qui confirme que la famille des Bap est bien représentée chez les bactéries. Le

TABLEAU A-1 liste les quelques protéines de la famille Bap également étudiées pour leur fonction dans la formation des biofilms et non détaillées dans ce paragraphe.

TABLEAU A-1. Protéines de la famille Bap impliquées dans les processus d'adhésion aux surfaces et la formation de biofilm retrouvées dans différentes espèces bactériennes. (Lasa and Penadés 2006)

Protéines	Espèces bactériennes		Fonction
	Gram+	Gram-	
R28	<i>Streptococcus pyogenes</i>		Adhérence aux cellules humaines
Mus20 (LapA)		<i>Pseudomonas putida</i>	Adhérence aux plantes
Bap	<i>Staphylococcus aureus</i>		Formation des biofilms
Esp	<i>Enterococcus faecalis</i>		Formation des biofilms
Bap		<i>Burkholderia cepacia</i>	Formation des biofilms
LapA		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Formation des biofilms
Esp _{fm}	<i>Enterococcus faecium</i>		Adhérence aux cellules eucaryotes
Lsp	<i>Lactobacillus reuteri</i>		Adhérence à l'épithélium gastrique
YeeJ		<i>Escherichia coli</i>	Formation des biofilms
BapA		<i>Salmonella enterica sv. typhimurium</i>	Formation des biofilms
Bap	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		Formation des biofilms
Bhp	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		Formation des biofilms

II.3.1.2 La protéine de surface BslA de *Bacillus subtilis*

La matrice d'un biofilm de *B. subtilis* est essentiellement composée de la protéine amyloïde extracellulaire TasA, d'un exopolysaccharide appelé eps et de la protéine de surface BslA (Biofilm surface layer A). Cette dernière est une protéine amphiphile (anciennement annotée YuaB) et a été décrite comme étant l'élément majeur qui confère la rugosité aux colonies ainsi que la capacité de répulsion des composés organiques (biocides, solvants organiques, eau...) à la surface cellulaire. Cette propriété explique la survie de la bactérie dans le sol face à plusieurs types de micropolluants toxiques qui peuvent s'y trouver comme les métaux lourds ou les agents antimicrobiens (Kobayashi and Iwano 2012).

Une étude de localisation *in situ* par immunofluorescence de la protéine BslA (FIGURE A-24) a permis de montrer qu'elle est localisée à la surface de la colonie mais également à la base (interface agar-colonie). Elle est détectée à 0,4µm au-dessus de la première couche cellulaire et forme une surcouche de 4 µm d'épaisseur environ. Elle est également retrouvée entre l'espace intercellulaire de cellules et recouvre 25% de la base des pellicules. Les auteurs ont montré que sa détection à la surface des biofilms n'était pas due à la présence à cet endroit d'un site-spécifique

de sa transcription, mais uniquement à sa migration vers l'interface air-liquide par un mécanisme encore inconnu à ce jour (Hobley et al. 2013).

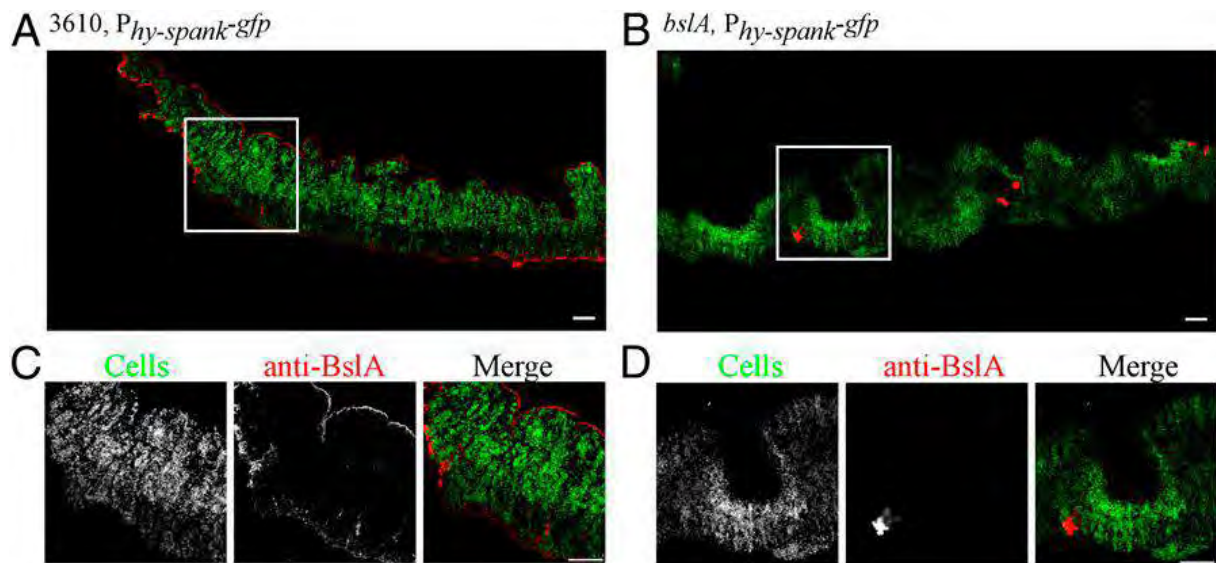


FIGURE A-24. Analyse *in situ* de la localisation de la protéine BslA au sein d'un biofilm de *B. subtilis*. Les images correspondent à des coupes transversales des colonies formées par la souche sauvage 3610, *sacA::phy-spa*nk-GFP;NRS1473 (images A et C) ou mutantes 3610, *bslA::cat*, *sacA::P_{hy-spa}nk-GFP*; NRS381). Les cellules sont représentées par la fluorescence de la GFP (vert) et la protéine BslA a été immunomarkée par le DyLight594 (en rouge). Bar d'échelle = 50µm. (Hobley et al. 2013)

Il a été par ailleurs décrit que BslA fonctionne en synergie avec la protéine TasA et l'exopolysaccharide majoritaire eps de la matrice (Ostrowski et al. 2011). D'une part, les souches déficientes dans la production de BslA forment des colonies et des pellicules moins rugueuses, avec une surface ayant une microstructure altérée. D'autre part, une surproduction de la protéine TasA ou de l'exopolysaccharide eps ne suffit pas à compenser l'absence de BslA. La protéine BslA apparaît ainsi avec une fonction « hydrophobine » et une fonction structurante de l'architecture de la matrice (Kobayashi and Iwano 2012).

La structure cristalline de BslA (FIGURE A-25) permet de lui attribuer des propriétés adhésives avec la présence d'une tête hydrophobe et des structures secondaires composées de feuillets β . D'autres structures (hélices α et autres feuillets β) sont également présentes chez BslA et la région hydrophobe de BslA est très proche de celle d'une hydrophobine HFBII d'origine fongique, de l'espèce *Trichoderma reesei*. Ces hydrophobines sont connues pour leur forte activité de surface et démontrent la présence d'acides aminés hydrophobes exposés et qui occupent 12% de la surface de la protéine.

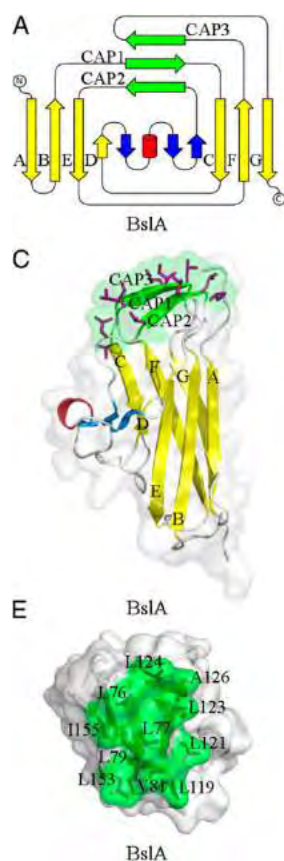


FIGURE A-25. Structure cristalline de BsIA. Représentation topologique de BsIA (A, C, E) construite à partir du programme TopDraw. Les feuillets β (en jaune) et la capsule hydrophobe (en vert) représentent les régions conservées (A, C). Au niveau de la capsule hydrophobe, les acides aminés exposés à la surface, la leucine, l'isoleucine et valine sont représentés en magenta. (Hobley et al. 2013)

II.3.2 Les protéines amyloïdes : structures-clés pour l'intégrité des biofilms

II.3.2.1 Généralité sur les fibres amyloïdes

En 1854, Rudolph Virchow (Otzen and Nielsen 2008) a découvert que les corps amyloïdes (*corpora amyloacea*) des tissus cérébraux prenaient une coloration bleue pâle lorsqu'ils étaient traités à l'iode, et une couleur mauve lorsqu'ils étaient traités à l'acide sulfurique. Virchow a ainsi conclu que les structures qui les composaient et qui sont responsables de cette coloration étaient constituées de cellulose ou d'amidon et les a alors appelées *amyloïdes* (du latin « *amyllum* », ou du grec « *amylon* »). Ce n'est que cinq ans plus tard que Carl Friedrich et August Kekule ont pu démontrer que la composante majeure de ces amyloïdes était protéique. Malgré cette découverte le terme *amyloïde* a été conservé pour désigner ces structures (Kisilevsky and Snow 1988).

II.3.2.2 Structure biochimique

Les fibres amyloïdes sont des structures constituées d'agrégats protéiques arrangés selon un empilement stable de feuillets β au sein duquel les polypeptides se replient de manière remarquablement régulière pour former une succession de fibrilles disposées perpendiculairement à l'axe de la fibre ainsi formée. Cette structure en feuillet β a, en fait, été observée pour la première fois en 1969 par une analyse de diffraction en rayons X. Le repliement des fibres est caractérisé d'une part par une réflexion méridionale intense à 4.7 – 4.8Å qui est due à la séparation des liaisons hydrogènes reliant les feuillets β arrangés perpendiculairement à l'axe de la fibre, et d'autre part, à une réflexion de moindre intensité à 10Å provenant de l'espacement de feuillets β (Sunde et al. 1997). Lorsqu'elles sont observées au microscope électronique (MET ou MEB) ou au microscope à force atomique (AFM), les fibres amyloïdes semblent être formées par des filaments longs entremêlés, ayant une longueur indéterminée et une largeur allant de 7 à 20 nm selon la morphologie de la fibre. Une protéine native donnée n'est pas restreinte à une morphologie unique. Il s'est avéré par exemple que la protéine amyloïde β' ($A\beta$), normalement produite par les neurones, présente plusieurs voies d'agrégation à partir des monomères présents (Schnabel 2011). La première voie (FIGURE A-26A) mène vers la formation de plaques insolubles constituées de fibres et caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. La deuxième voie conduit quant à elle à la formation d'oligomères solubles et suffisamment petits pour diffuser à travers les synapses. D'autre part, selon les techniques expérimentales utilisées, le mécanisme de repliement des filaments de l' $A\beta$ peut suivre une symétrie double (Tycko 2004) (FIGURE A-26B) ou une symétrie triple (Paravastu et al. 2008) résultant d'une conformation de plus faible énergie (FIGURE A-26C).

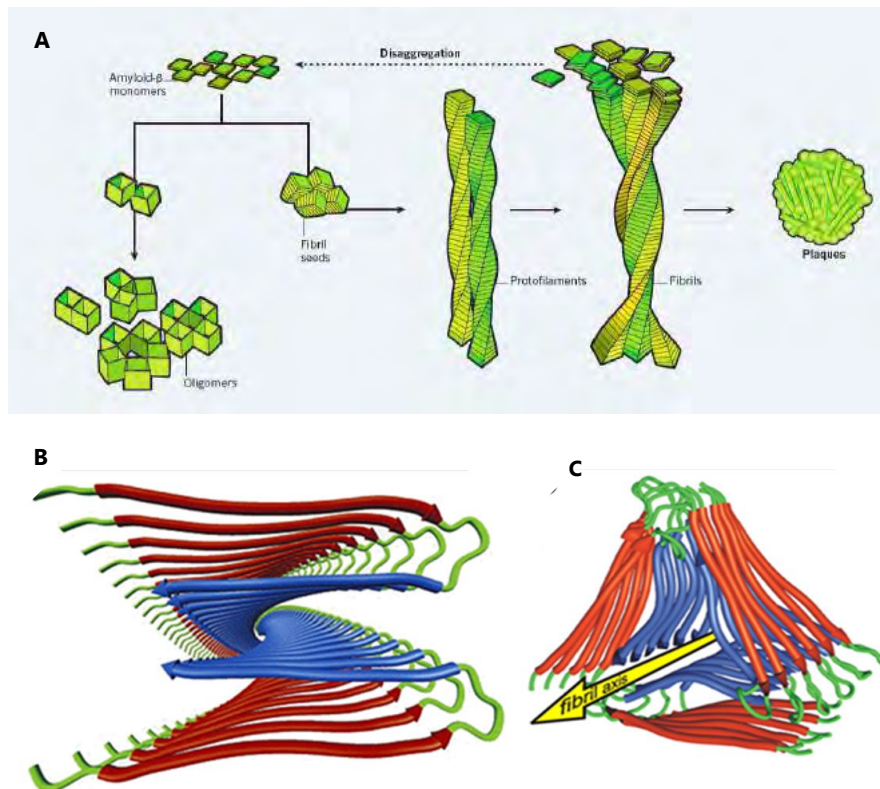


FIGURE A-26. Illustration du processus de repliement des monomères protéiques pour aboutir à la formation de fibres amyloïdes. (A) Schéma résumant les deux voies de d'agrégation des peptides précurseurs de l'amyloïde β ($A\beta$) : une première voie qui mène à la formation d'oligomères solubles et une autre à la formation de fibres amyloïdes, à l'origine des plaques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (**Schnabel 2011**). (B) Diagramme en rubans des résidus 9 à 40 de la protéine amyloïde formée par $A\beta_{1-40}$ et montrant deux brins en feuillets β par fibrille eux-mêmes parallèlement symétriques à une autre fibrille, l'axe de la fibre l'allongeant perpendiculairement au plan ; ce modèle structural (selon les données RMN en phase solide, diffraction Rayons X et analyses biochimiques) a été proposée par R. Tycko (**Tycko 2004**). (C) Représentation en ruban de la même protéine $A\beta_{1-40}$ selon un modèle de plus faible énergie et dont le repliement indique une symétrie triple (données RMN en phase solide et MET), proposé par A.K. Paravastu (**Paravastu et al. 2008**)

Les feuillets β , tous comme les hélices α , ont toujours été décrits comme étant une propriété physico-chimique du squelette protéique. Depuis qu'il a été montré que les empilements de feuillets β étaient une caractéristique commune des fibres amyloïdes, il semblait logique de supposer que la propension à former des fibres ne se limitait pas aux protéines impliquées dans les pathologies neurodégénératives. Un grand nombre de protéines aux fonctions physiologiques ou chimiques variées ont démontré leur capacité à former des fibres amyloïdes. C'est notamment le cas de la κ -caséine (κ CN). L'étude de la protéine purifiée indique une forme monomérique sphérique d'un poids moléculaire de 19 000 Da mais se présente sous sa forme agrégée dans le lait avec un poids moléculaire pouvant atteindre 1,18 millions Da. L'observation en microscopie électronique de la morphologie des agrégats formés a permis de mettre en évidence des structures fibrillaires d'une longueur d'environ 600 nm. De plus, la prédiction 3D de la présence d'un motif répété « feuillet-boucle-feuillet », riche en tyrosine, montre la possibilité d'un

empilement des structures pour former une fibre ainsi que la fixation effective de la Thioflavine T (ThT), un marqueur fluorescent spécifique des fibres amyloïdes (Farrell et al. 2003; Leonil et al. 2008). Des études similaires ont ainsi permis de dresser une longue liste de protéines biologiques qui présentent cette capacité de former des fibres amyloïdes dans des conditions données ; c'est le cas notamment du lysozyme et de l'insuline (Nielsen et al. 2001; Wetzel 2006; Zou et al. 2014).

II.3.2.3 Les protéines amyloïdes fonctionnelles (AF) chez les microorganismes

Les fibres amyloïdes font partie intégrante de la physiologie cellulaire des microorganismes où elles sont ancrées à la surface des cellules et régulent les interactions cellule-cellule ou cellule-hôte. Les AF bactériennes sont très abondantes dans la nature et l'analyse de biofilms environnementaux issus d'habitats différents, allant des réservoirs d'eau de consommation et des milieux marins jusqu'aux boues activées, a permis déterminer que 5 à 40% de l'ensemble des bactéries de ces communautés étaient des productrices d'AF (Larsen et al. 2007; Larsen et al. 2008a). La présence de structures AF a été décrite dans plusieurs phylums bactériens tels que les *Protéobactéries*, les *Bactériodètes*, les *Chloroflexi*, ou les *Actinobactéries* (Larsen et al. 2008a). L'abondance des AF selon une large distribution phylogénétique au sein de biofilms environnementaux indiquent que ces structures jouent un rôle important dans le cycle de vie des microorganismes qui les produisent. La bactérie *E.coli* est de loin la plus étudiée en ce qui concerne la production de fibres amyloïdes depuis l'identification en 1980 de la protéine CsgA, qui constitue la sous-unité protéique des curli. Depuis, de nombreuses autres AF ont été identifiées et caractérisées au sein d'espèces bactériennes modèles aussi diverses que leur fonctions respectives (TABLEAU A-2). Certaines d'entre elles sont impliquées dans l'agrégation des cellules à l'origine des « clusters » ainsi que de la formation de biofilms.

Une fonction essentielle portée par les AF est l'agrégation des cellules à l'origine des colonies et de la formation de biofilms. On peut citer les curli qui confèrent la capacité à former des biofilms chez *E.coli* et *Salmonella sp.*, en permettant l'adhésion des cellules aux surfaces aussi bien hydrophobes qu'hydrophiles. Ils participent également à l'auto-agrégation sous-forme de floccs et à la maturation de la matrice extracellulaire (Kikuchi et al. 2005).

La protéine Fap du genre *Pseudomonas* joue un rôle similaire. Ceci a été mis en évidence par l'expression hétérologue de l'opéron *fapA-F* d'une souche de *P.fluorescens* chez la souche de *E.coli* BL21 (DE3), déficiente en curli. Le résultat a été la production d'une fimbriae Fap qui a

permis le rétablissement de l'aptitude des cellules à s'autoagréger et à former des biofilms en microplaque (Dueholm et al. 2010).

La bactérie *Bacillus subtilis* produit également une protéine amyloïde, TasA, qui est fortement impliquée dans la stabilité structurale des biofilms qu'elle forme (Romero et al. 2010).

- Cas particulier 1 : Tas A, la fibre amyloïde du genre *Bacillus*

Initialement, une étude chez *Bacillus subtilis* a montré que TasA était sécrétée en même temps que la production de spores et qu'elle possédait une activité antimicrobienne à large spectre, appelée TasA, pour *translocation-dependent antimicrobial spore component* (Stöver and Driks 1999).

La première mise en évidence de la caractéristique amyloïde de TasA a été réalisée par une coloration au Rouge Congo des colonies sauvages alors que les colonies mutantes ne pouvaient fixer ce colorant spécifique des structures amyloïdes (FIGURE A-27A). Observées au microscope électronique, les cellules de *B. subtilis* sont reliées les unes aux autres par de longues fibres qui s'avèrent absentes chez la souche mutante (FIGURE A-27B). La caractérisation biochimique de la protéine TasA purifiée a permis de confirmer sa nature amyloïde par la fixation du marqueur spécifique Thioflavine T (ThT) et sa capacité à polymériser *in vitro* comme *in vivo* (Romero et al. 2010; Chai et al. 2013). La protéine TasA joue ainsi un rôle de « squelette » pour la matrice. Elle permet la connexion intercellulaire et intervient dans l'organisation des autres composés matriciels pendant la formation de biofilm (Romero et al. 2010).

Le mécanisme de polymérisation passe, semble-t-il, par différentes étapes d'agrégation donnant lieu à des structures intermédiaires morphologiquement différentes, qui sont ensuite transportées à l'extérieur de la cellule tout en restant ancrées à la paroi, et à partir desquelles l'assemblage en fibres s'opère (FIGURE A-27D). Cette fibrillation requiert l'implication de facteurs auxiliaires comme la protéine TapA codée par le même opéron que TasA. Cette protéine aide à l'assemblage des monomères de TasA en s'incorporant à la fibre en formation et module l'ancrage à la paroi cellulaire (Branda et al. 2006). D'autres études ont mis en évidence un autre rôle de la protéine TapA en tant que facteur de nucléation pour favoriser l'efficacité de la polymérisation de TasA en fibres amyloïdes (Romero et al. 2011). Enfin, une troisième protéine, qui est en fait une peptidase signal, va permettre leur exportation hors de la cellule.

Des gènes homologues de *tasA* ont également été identifiés chez d'autres membres du genre *Bacillus*, notamment chez *B. licheniformis* où le gène est également présent en une copie unique (Pasvolsky et al. 2014).

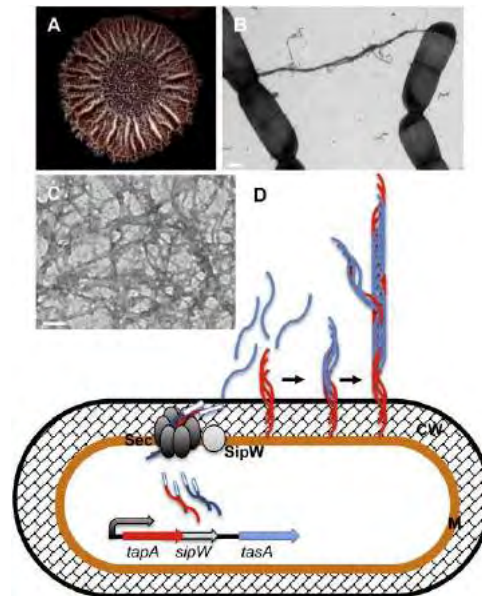


FIGURE A-27. Mise en évidence des fibres amyloïdes de TasA de *B.subtilis*. A) Image d'une colonie sauvage capable de fixer le colorant Rouge congo. B) Image obtenue en MET d'un biofilm de la souche sauvage, les longues fibres de TasA sont présentes entre les cellules (échelle 100nm). C) Observation en microscopie électronique de fibres purifiées de TasA (échelle 500nm). D) Modèle de synthèse et sécrétion de la protéine TasA à partir de l'opéron *tapA-sipW-tasA*. (Romero 2013)

- Cas particulier 2 : FapC, la protéine amyloïde du genre *Pseudomonas*

En 2010, Dueholm et *al.* (2010) rapportent la découverte d'une nouvelle protéine amyloïde fonctionnelle produite par une souche de *P.fluorescens* UK4. La protéine a été purifiée et sa structure amyloïde a été vérifiée par différentes techniques complémentaires. D'autre part, le séquençage de son génome a permis d'identifier le gène, appelé *fapC*, qui est conservé chez plusieurs espèces de *Pseudomonas* notamment les souches *P.aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens* Pf-5 et *P. putida* F1 (Dueholm et al. 2013b). Ce gène fait partie d'un opéron de 6 gènes, *fapA-F* codant chacun une protéine Fap ayant un rôle respectif dans le mécanisme d'assemblage de la fibre (FIGURE A-28A).

La protéine FapC contient trois motifs répétés (R1, R2, R3) espacés par des linkers (L1-3) et qui semblent différents des curlis décrits chez d'autres espèces. La comparaison chez 18 souches de séquences des régions répétées R1 et R2 de FapC a indiqué une conservation à 100% des acides aminés Asparagine, Glycine et Glutamine (FIGURE A-28A et B) et 90% de conservation des

propriétés chimiques des résidus. Les séquences de la protéine FapB montrent une version tronquée, plus courte, de celle de FapC, dans lesquelles les motifs répétés sont retrouvés.

Ces régions répétées semblent constituer les feuillets β qui s'empileraient perpendiculairement à l'axe de la fibre selon le modèle proposé par Dueholm et al. (2013). L'emplacement des résidus Glycine ainsi que leur conservation le long de la séquence pourraient expliquer le repliement de la protéine et donc la formation de ces feuillets β (FIGURE A-28C).

Toutes les protéines Fap sont sécrétées à travers la membrane interne de la bactérie par un mécanisme de translocation Sec-dépendante. FapB, FapC et FapE sont relarguées à travers la membrane externe *via* la protéine FapF, qui joue le rôle de pore membranaire. La protéine FapB, qui constitue la sous-unité mineure de la fibre en formation, va jouer le rôle de nucléateur, et va donc permettre l'initiation de la fibrillation des monomères de FapC. FapD est une protéase qui intervient lors de la protéolyse de FapC et FapA joue le rôle de protéine chaperonne pour les monomères de FapB et FapC.

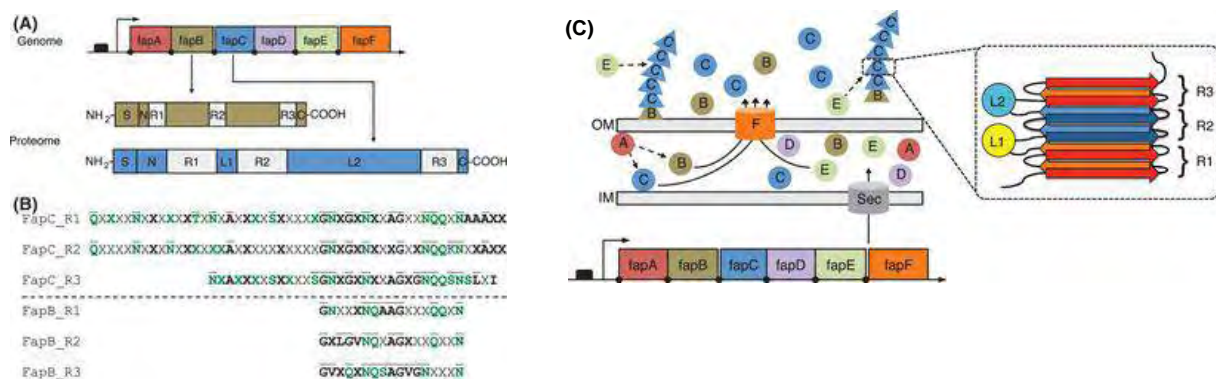


FIGURE A-28. Représentation schématique de l'opéron *fapA-F* et mécanisme d'assemblage des sous-unités protéiques pour la formation de la fibre de FapC. A) Opéron de six gènes *fapA-F* codant pour les protéines FapB et FapC indiquant pour les deux séquences protéiques trois motifs répétés (R1, R2, R3), le peptide signal S, la région N-terminale, le linker L, et la région C-terminale C. B) Comparaison des séquences des régions consensus répétées de FapC et FapB, les résidus surlignés indiquent une conservation à 100%, les résidus en gras indiquent plus de 90% de conservation des propriétés chimiques (en noir : apolaire ; en vert : polaire, en bleu : chargés). (C) Modèle conceptuel du mécanisme de fibrillation de FapB/FapC. (Dueholm et al. 2013b)

La protéine FapC semblerait être impliquée dans la modulation de la morphologie des colonies matures en stabilisant leur structure. La protéine FapC purifiée a également montré une forte adhésion aux surfaces abiotiques (plastique et verre), ce qui pourrait laisser penser qu'elle joue également le rôle d'adhésine. Au-delà de son rôle structural, une autre étude a prouvé que la surexpression de *fap* engendre l'apparition d'un phénotype mucoïde chez la souche PAO1 par le déclenchement de la cascade de synthèse d'alginate et de pyoverdine (Herbst et al. 2014).

TABLEAU A-2. Vue d'ensemble des protéines amyloïdes fonctionnelles de bactéries (confirmées et putatives). (Dueholm et al. 2013a)

Espèces	Protéines amyloïdes	Fonctions
<i>Escherichia coli</i>	CsgA	Formation des biofilms, facteur de virulence
<i>Pseudomonas</i>	FapC	Formation de biofilm
<i>Streptomyces coelicolor</i>	ChpA-H	Hydrophobicité de la surface des hyphes aériens et revêtement des spores
<i>Neurospora crassa (fungi)</i>	EAS (hydrophobins)	
<i>Xanthomonas spp.</i> <i>et autres pathogènes de plantes</i>	HpaG (harpins)	Facteurs de virulence provoquant une réponse hypersensible des plantes et à la mort cellulaire.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Microcin E492	Cytotoxine
<i>Gordonia amarae</i>	-	Composant de l'enveloppe cellulaire
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTP	Pili adhésifs impliqués dans l'invasion des cellules-hôtes.
<i>Bacillus subtilis</i>	TasA	Constituant de la matrice de biofilms
<i>Escherichia coli</i>	Ag43 α	Formation de biofilms, facteur de virulence

II.3.3 Les protéines liées aux exopolysaccharides

II.3.3.1 La protéine CdrA de *Pseudomonas aeruginosa* se lie au Psl

Certaines protéines exprimées à la surface cellulaire et/ou au cœur de la matrice cellulaire ont été caractérisées pour leur capacité à établir des liaisons avec les exopolysaccharides. En effet, plusieurs études (Simm et al. 2004; Tischler and Camilli 2004; Thormann et al. 2006) ont révélé que la formation de biofilm par des bactéries à Gram- était régulée par l'action du messenger secondaire, la di-guanylate cyclique (c-di-GMP). Chez *P.aeruginosa* PAO1, Borlee et al. (2010b) ont montré que la production de matrice extracellulaire, était modulée positivement par ce messenger secondaire et que sa surproduction induisait l'expression d'un gène codant pour une adhésine, la CdrA ; le niveau d'expression du gène *cdrA* au sein d'un biofilm de 24h est 10 fois plus élevé que celle de la phase planctonique cultivée pendant 24h. Cette protéine est capable de reconnaître les résidus mannose constituant le Psl, un des polysaccharides majoritaires qui composent la matrice extracellulaire du biofilm et dont le squelette carboné est riche en résidus mannose. Cette interaction CdrA-Psl a été mise en évidence par co-immunoprécipitation des surnageants de culture. Une mutation du gène *cdrA* entraîne une diminution de la quantité de Psl dans la matrice.

Ainsi, tous ces résultats suggèrent que la CdrA contribue fortement à l'intégrité structurale des biofilms en stabilisant la quantité de Psl dans la matrice, et assure ainsi l'auto-agrégation des cellules du biofilm (Borlee et al. 2010). Le rôle structural du Psl dans le développement des biofilms a, par ailleurs, été déjà décrit et rejoint cette conclusion (Ma et al. 2009; Franklin et al. 2011; Colvin et al. 2012).

II.3.3.2 La MSHA (Mannose-Sensitive Hemagglutinin A) de *Vibrio cholerae*

La MSHA, une hémagglutinine sensible au D-mannose permet l'adhésion du pathogène *Vibrio cholerae* aux surfaces chitineuses et cellulosiques (Dalisay et al. 2006). C'est plus tard, en 2011 qu'une analyse du protéome de *V.cholerae* a permis de confirmer que la protéine MSHA était sécrétée dans la matrice extracellulaire des biofilms (Absalon et al. 2011) et confirme donc cette découverte fonctionnelle.

Par ailleurs, les études environnementales introduisent l'implication de la MSHA dans l'adhésion aux surfaces abiotiques. Ces deux observations semblent donc indiquer deux voies différentes d'adhésion selon la nature de la surface. Le gène *mshA* code pour une piline, sous-unité protéique de la MSHA qui est un pili de type IV et un facteur potentiel de colonisation de surface. Une hémagglutinine similaire a également été identifiée chez la bactérie marine *Pseudoalteromonas tunicata* et induit l'attachement des cellules à la surface d'une algue verte *Ulva australis* dont la surface est constituée de cellulose (Dalisay et al. 2006). La production de cette MSHA homologue est aussi régulée par une augmentation de la teneur en cellulose ainsi qu'en cellobiose (monomère constitutif de la cellulose).

II.3.3.3 La lectine galactophile de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa produit deux lectines « intracellulaires » LecA et LecB. LecA est une protéine tétramérique dont chaque sous-unité possède une masse moléculaire de 12,75 kDa et se lie au D-galactose et aux dérivés thiogalactosidiques hydrophobes, avec une meilleure affinité et spécificité pour ces derniers (Blanchard et al. 2014). LecA est principalement localisée dans le cytoplasme des cellules en culture planctoniques et est détectée dans la matrice extracellulaire de biofilms dans des conditions nutritives riches (Diggle et al. 2006). Cette protéine joue le rôle d'adhésine en étant impliquée dans le développement de biofilms. LecB quant à elle montre une

forte affinité pour le L-fucose, et pour le D-mannose dans une moindre mesure. Ces deux molécules sont régulées par le système RhIR/C4-HSL du quorum sensing (**Page 26**).

II.3.4 Les protéines liées à l'ADN

En 2007, Jurcisek et *al.* (2007a) observent pour la première fois chez la bactérie *Haemophilus influenzae* la coexistence d'une protéine, une piline de type IV, et d'une quantité considérable d'ADN extracellulaire au sein des biofilms formés *in vivo*, dans l'espace d'une oreille interne infectée par une otite, mais également lors d'expériences *in vitro* (FIGURE A-29).



FIGURE A-29. Micrographe électronique d'un biofilm de la souche *H. influenzae* 1128 formé sur des cellules oro-pharyngées humaines. Des structures fibrillaires apparaissent et semblent créer des ponts intercellulaires. (**Jurcisek and Bakaletz 2007**)

Ce n'est qu'un peu plus tard, en 2011, que Goodman et al identifient ces pilines comme étant des protéines de type Histone-Like appartenant à la famille des protéines DNABII. La formation de ce réseau entre l'ADN et les protéines DNABII a été évoquée au paragraphe II.2. Les protéines de la famille DNABII sont divisées en deux sous-familles, les HU (histones) et les IHF (Integration host factor). Les HU sont ubiquitaires chez les Eubactéries et se lient faiblement à l'ADN double brin pour le replier sans avoir la nécessité d'une séquence consensus de fixation spécifique. A l'inverse, les IHF sont uniquement produites chez les α - et γ -protéobactéries. Elles se fixent puis compactent l'ADN double brin avec une préférence également pour les fragments pré-repliés qui possèdent une séquence consensus du type **WATCAANNNTTR** (W : A ou T, N : peut être n'importe quelle base, R : une base purique).

Swinger et al (2004) ont proposé une structure cristalline résultant de la co-cristallisation d'un fragment d'ADN et des protéines HU (FIGURE A-30). Les bras se lient au sillon mineur de l'ADN et un

résidu proline hautement conservé induit et stabilise le repliement de l'ADN en s'intercalant entre les paires de bases. L'ADN peut également interagir avec les régions chargées positivement des bras de la protéine.

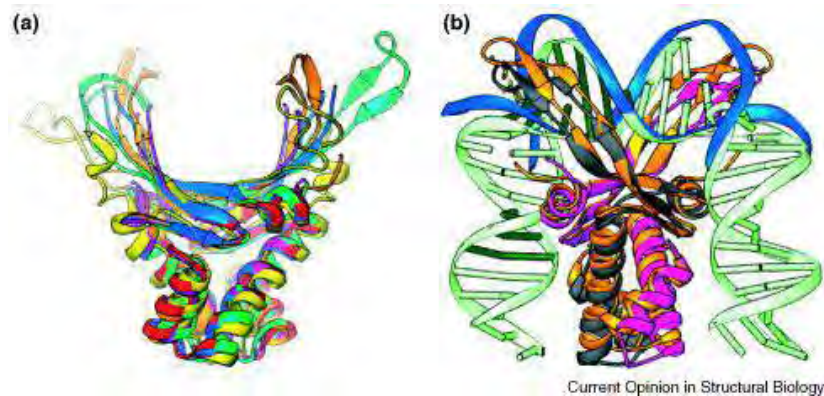


FIGURE A-30. Structures cristallines des protéines de la famille DNABII. (a) Structure résultant des de la superposition de toutes les protéines HU connues. Toutes les protéines HU sont composées de deux bras en rubans β qui sont plus flexibles que le corps central. (b) Structures résultant de la co-cristallisation d'un fragment d'ADN et des protéines HU. Les bras se lient au sillon mineur de l'ADN et un résidu proline hautement conservé induit et stabilise le repliement de l'ADN en s'intercalant entre les paires de bases. L'ADN peut également interagir avec les régions chargées positivement des bras de la protéine. (Swinger and Rice 2004)

Un marquage par immunofluorescence des biofilms de *H. influenzae* par un anticorps anti-IHF a révélé une colocalisation importante d'une protéine à chaque point de croisement des brins d'ADN du réseau (FIGURE A-22). Les protéines IHF semblent ainsi moduler la construction du réseau de brin d'ADN au sein de la matrice du biofilm, et confirme l'hypothèse de « pont intrabactérien » avancée auparavant par Jurcisek et al., qui consolide les jonctions du maillage d'ADN et donc assure la stabilité du biofilm. Pour renforcer cette découverte, le traitement de différentes espèces bactériennes pathogènes (*Moraxella catarrhalis*; *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*) par l'anticorps anti-IHF a démontré une perte de la structure des biofilms formés, se traduisant par une réduction considérable de la biomasse (Goodman et al. 2011; Novotny et al. 2015). L'organisation en réseau ainsi que la quantité d'ADN extracellulaire produit par les cellules de *H. influenzae* varie considérablement au cours de la croissance du biofilm : avec le temps, l'ADN est accumulé à la surface de la matrice si bien qu'une compartimentation s'opère par rapport à la teneur observée dans la profondeur du biofilm (Webster et al. 2006).

Les protéines DNABII sont les rares, voire les seules, protéines se liant à l'ADN qui ont été également détectées en dehors des cellules bactériennes qui les produisent. Chez les biofilms de

Streptococcus intermedius (Nur et al. 2013), l'évidence d'une colocalisation d'une protéine « histone-like » extracellulaire (HLPe) avec l'ADNe a également été prouvée. De même, chez les souches uropathogéniques de *E.coli* (Devaraj et al. 2015), les protéines de la famille DNABII, aussi bien les HU que les IHF sont non seulement essentielles pour la structuration de la matrice mais également limitantes pour la formation de biofilms.

II.3.5 Les hydrolases

II.3.5.1 Dégradation des composés de la matrice de biofilms

Certaines protéines bactériennes présentent des activités enzymatiques qui ciblent les SEP afin de provoquer une réorganisation, une dégradation ou encore la dispersion des cellules du biofilm. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, une bactérie à l'origine d'infections dentaires, synthétise une β -hexosaminidase, la Dispersine B, qui hydrolyse les exopolysaccharides, notamment le PNAG, du biofilm pour libérer les bactéries (Kaplan et al. 2003b).

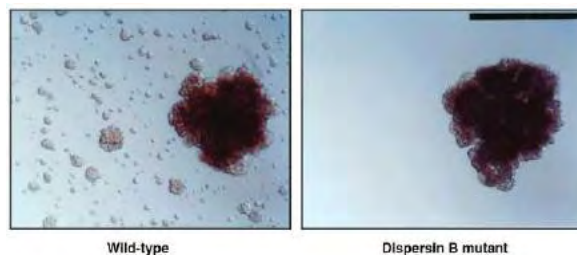


FIGURE A-31. Images de colonies formées par la souche sauvage de la bactérie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* produisant la Dispersine B et de la souche mutante. La souche mutante forme des colonies identiques à la souche sauvage mais n'est pas capable de libérer une partie des cellules dans le milieu extracellulaire. (Kaplan et al. 2004)

Chez *Staphylococcus aureus*, la protéine AltA a initialement été décrite pour son activité dans l'autolyse (autolysine) d'une sous-population de bactéries à l'origine de la libération de l'ADN génomique dans le milieu extracellulaire initiant la formation de biofilms (Rice et al. 2007). D'autres études ont permis de préciser que AltA était une pro-protéine de 137,5 kDa (1257 aa) qui pouvait subir un clivage protéolytique et aboutir à la formation d'une séquence signal de 3,1kDa, d'un propeptide de 17,6 kDa (fonction inconnue) et de deux enzymes actives : une amidase (AM, 63,3 kDa) et une glucosaminidase (GL, 53,6 kDa). AM a une activité N-acétylmuramyl-L-alanine amidase et clive la liaison amide entre l'acide N-Acétyl-muramique (NAM) et l'alanine du pont

peptidique du peptidoglycane (ou muréine, FIGURE A-32). L'amidase AM est responsable de l'acquisition du phénotype en « cluster », résultant de l'agrégation des cellules, sur les biofilms observés. GL va hydrolyser la liaison entre le NAM et le NAG (N-acétyl-glucosamine) par son activité endo- β -N-glucosaminidase. Ainsi, la muréine-hydrolase AltA est une enzyme bifonctionnelle dont l'action de GL et AM est essentielle à la formation de biofilms lors de la phase d'adhésion initiale (Bose et al. 2012).

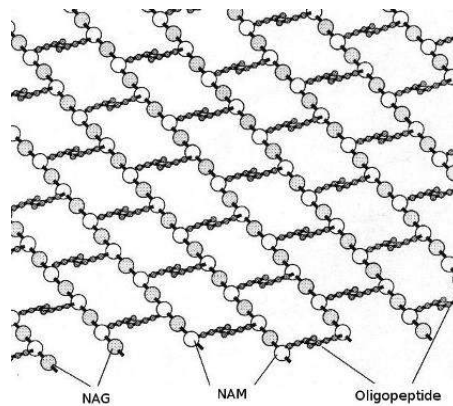


FIGURE A-32. Agencement des chaînes de muréine dans la paroi bactérienne.

Des protéases peuvent également être sécrétées par les cellules pour contrôler la formation des biofilms. Quatre protéases majeures sont sécrétées chez *Staphylococcus aureus* : une sérine-protéase SspA, deux cystéine-protéases SspB et Scp (encore appelée Staphopain) et une métalloprotéase Aur (aureolysin). Elles sont toutes sécrétées sous-forme de pro-enzymes qui subissent par la suite un clivage protéolytique avant la formation d'enzyme mature. L'enzyme Aur dégrade les protéines Bap (**page 61**) et inhibe ainsi la formation de biofilms (Martí et al. 2010).

Les souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* produisent l'alginate-lyase pour dégrader l'alginate et permettre le détachement des cellules. D'autres espèces produisent des polysaccharides-lyases pour remplir cette fonction, notamment *P. fluorescens* et *P. syringae*. La bactérie pathogène de plantes *Xanthomonas campestris* produit une endo- β -1,4-mannanase pour déclencher la dispersion des cellules. Enfin chez *P. putida* la protéase LapG va cliver la protéine périplasmique LapA (**page 61**) pour dégrader la matrice et ainsi détacher les cellules du substrat (Kaplan 2010).

II.3.5.2 Dégradation des composants du support

Les cellules bactériennes organisées en biofilms peuvent également produire des enzymes hydrolytiques afin de dégrader les molécules du support sur lequel elles sont adhérentes. *Streptococcus intermedius* produit une hyaluronidase qui dégrade l'acide hyaluronique (glycosaminoglycane) qui compose la matrice extracellulaire (MEC) des tissus de l'hôte. L'hydrolyse est déclenchée pour apporter des nutriments aux bactéries ou encore pour permettre la pénétration des bactéries ou des toxines plus en profondeur dans les tissus. Chez *Vibrio cholerae*, la synthèse d'une Zn-métalloprotéase, une hémagglutinine-protéase (HAP), induit la digestion des récepteurs des cellules épithéliales pour permettre la libération des bactéries adhérentes. Certaines espèces de bactéries marines *Pseudoalteromonas* libèrent la chitinase pour dégrader la chitine et permettre la dispersion des biofilms (Kaplan 2010).

II.3.6 Récapitulatif des principales exoprotéines

Les principales protéines matricielles dont la structure et la fonction ont été élucidées sont listées dans le TABLEAU A-3 (liste non exhaustive). Elles interviennent à chaque étape de la formation des biofilms. Durant la phase initiale d'attachement aux surfaces, le premier contact à la surface se fait par des processus d'exploration de l'environnement (« sensing »), et est généralement attribué aux appendices membranaires (pili, fimbriae, curli). Une fois l'adhésion établie, l'agrégation des cellules s'opère pour former des clusters. Enfin, de nombreuses protéines sont impliquées dans la stabilisation de la structure et dans l'élaboration de l'architecture tridimensionnelle du biofilms.

TABLEAU A-3. Synthèse des principales protéines matricielles et établissement d'une relation structure-fonction dans la formation d'un biofilm

Protéine	Espèce microbienne	Données structurales	Fonctions	Références
RmbA	<i>Vibrio cholerae</i>	Protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire et localisée autour des cellules. Dimère de 49kDa, constitué de deux domaines fibronectine de type III (FnIII), largement retrouvé dans la structure des protéines, notamment les protéines se liant aux sucres. Les deux domaines formant un sillon chargé positivement permettent la liaison avec des ligands chargés négativement (sucres de la paroi cellulaire, LPS...)	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison multivalente et spécifique aux saccharides (acide sialique, fucose, galactose, GalNAc). - Adhésion intercellulaire et interaction avec la matrice - Développement de biofilms matures - Flexibilité de contact du domaine FnIII confère une élasticité au réseau matriciel et assure une meilleure résistance au cisaillement et une stabilité de l'architecture des biofilms 	(Fong et al. 2006; Berk et al. 2012)
GbpA	<i>Vibrio cholerae</i>	Protéine composée de quatre domaines (D1 à D4), les domaines D1 et D4 possèdent des similitudes de séquence avec celle du domaine de liaison à la chitine (polymère de GlcNAc) de la chitinase B (<i>Serratia marcescens</i>). Les domaines D2 et D3 semblent être essentielles pour les interactions cellules-surface; particulièrement le domaine D1 est impliqué dans la liaison à la mucine.	<ul style="list-style-type: none"> - Favorise l'adhésion des cellules à l'exosquelette chitineuse des organismes marins du zooplacton et du phytoplancton. - Facteur de virulence et rôle d'adhésine dans l'attachement des cellules sur la muqueuse intestinale des mammifères (liaison à la mucine, constituée de GlcNAc). 	(Kirn et al. 2005; Wong et al. 2012)
MSHA	<i>Vibrio cholerae</i>		<ul style="list-style-type: none"> - Facteur de colonisation des surfaces abiotiques et chitineuses 	(Watnick et al. 1999)
LecA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)	Lectine (51kDa) liant spécifiquement le galactose, le GlcNAc, et le glucose. Protéine tétramérique (4 sous-unités de 12.8kDa), possédant un site de fixation du galactose et un site de fixation du calcium.	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de biofilms sur les surfaces en acier et polystyrène. 	(Diggle et al. 2006; Blanchard et al. 2014)
LecB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)	Protéine tétramérique (47kDa) composée de 4 sous-unités de 11.7kDa chacune arrangée en feuillet β antiparallèle. Elle est ancrée à la membrane externe et possède une forte affinité pour le L-fucose La fixation du ligand au sein du site actif est dépendante de la liaison de deux ions calcium.	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de biofilms sur les surfaces en verre - Interaction avec le Psl un exopolysaccharide de la matrice de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 	(Tielker et al. 2005)
CdrA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1)	La structure secondaire prédite de CdrA est décrite comme composée majoritairement de feuillets β , et la structure tertiaire indique une structure allongée avec un motif en hélice β . Protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire et se fixant au Psl (interaction démontrée par co-immunoprécipitation de la protéine CdrA avec Psl).	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de biofilm sur des surfaces abiotiques - Une surproduction de CdrA engendre une augmentation de l'auto-agrégation des cellules en milieu liquide dont le mécanisme est dépendant du Psl. 	(Borlee et al. 2010)
Bap	<i>Staphylococcus aureus</i>	Première protéine associée au biofilm (Bap) découverte dans les biofilms du genre <i>Staphylococcus</i> . Les protéines de la famille Bap sont sécrétées dans la matrice extracellulaire et ont généralement un haut poids moléculaire (plusieurs centaines de kDa). Séquence « amyloid-like » identifiée dans la région C des protéines de la famille Bap. La régulation post-traductionnelle de Bap est calcium-dépendante. La présence de calcium inhibe formation de biofilms.	<ul style="list-style-type: none"> - Agrégation des cellules (adhésion intercellulaire) - Formation de biofilm sur les surfaces abiotiques. - Facteur de virulence 	(Cucarella et al. 2001; Valle et al. 2012; Shukla and Rao 2013)

Protéine	Espèce microbienne	Données structurales	Fonctions	Références
TasA	<i>Bacillus subtilis</i>	Protéine localisée dans la matrice extracellulaire, ancrée aux cellules à partir desquelles elle enclenche une polymérisation en condition hydrophobe (surface). La sécrétion de TasA dépend de l'activité de la SipW peptidase. Protéines « Amyloid-like » (liaison spécifique aux anticorps anti-amyloïdes)	<ul style="list-style-type: none"> - Attachement des cellules lors de la phase initiale de contact - Formation de cluster cellulaire (co-agrégation) - Confère la rugosité et l'hydrophobicité des pellicules à l'interface air-liquide et également des colonies. 	(Branda et al. 2006; Romero et al. 2010; Cairns et al. 2014)
BslA	<i>Bacillus subtilis</i>	Protéine amphiphile, sécrétée dans la matrice extracellulaire et qui s'auto-polymérise à l'interface air-liquide pour former une couche hydrophobe. La structure cristalline de BslA démontre une conformation similaire à une immunoglobuline avec une capsule hydrophobe	<ul style="list-style-type: none"> - Propriété adhésive favorisant l'adhésion cellule-cellule - Confère la rugosité de la surface des biofilms - Rôle synergétique avec la protéine TasA et les ePS dans la formation d'une couche hydrophobe à la surface des biofilms. - Favorise la résistance des biofilms contre les polluants toxiques (métaux lourds agents antimicrobiens) pouvant se trouver dans le sol 	(Ostrowski et al. 2011; Kobayashi and Iwano 2012; Hobley et al. 2013)
Protéines DNABII	<i>Pseudomonas aeruginosa (PAO1)</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenza</i> <i>Bulkholderia cenocepacia</i>	Membre de la superfamille des protéines associées au nucléoïde et jouant un rôle dans le surenroulement et la compaction de l'ADN génomique. Deux catégories : les HU (histone-like protéines) et les IHF (integration host factor). Egalement localisées dans la matrice extracellulaire à l'issue de la lyse cellulaire et en association avec l'ADN extracellulaire	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilité du biofilm - Peu d'information sur leur rôle exact 	(Toyofuku et al. 2012; Novotny et al. 2013)
Vésicules de la membrane externe (OMVs)	<i>Bactéries GRAM-</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Helicobacter pylori</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio fischeri</i>	Structures sphériques produites par les cellules 10 – 300nm de diamètre Contenant des molécules péri- ou cytoplasmiques : <ul style="list-style-type: none"> - Protéases, phosphatase alcaline, lipase, toxines, protéines membranaires - Lipopolysaccharides 	<ul style="list-style-type: none"> - Interviennent dans les processus biologiques tels que la formation du biofilm, signalisation intercellulaire par quorum sensing, pathogénicité 	(Whitchurch et al. 2002; Schooling et al. 2009; Bielig et al. 2011)

II.4 Méthodes d'altération de la matrice extracellulaire

Les biofilms bactériens sont particulièrement récalcitrants aux traitements antibiotiques dans le domaine médical et à certains biocides dans la lutte contre les contaminations de surfaces industrielles. Cela s'explique, d'une part, par la transmission accrue des marqueurs de résistance au sein de la communauté bactérienne, et d'autre part, par les problèmes de diffusion posés par la présence d'une matrice extracellulaire. Cette matrice peut induire une inactivation des agents antibiotiques à cause de l'accumulation d'ions métalliques, du pH plutôt faible du milieu environnant, on encore de la présence d'une couche des cellules persistantes inactives et résistantes aux agressions (Costerton et al. 1999; Donlan and Costerton 2002; Lewis 2005). Toutes réunies, ces propriétés font des biofilms des communautés jusqu'à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques que les cellules planctoniques (Hoiby et al. 2010). Ainsi, le besoin de développer des stratégies plus efficaces pour altérer le biofilm devient indispensable afin de lutter contre les infections chroniques et afin de pallier aux contraintes technologiques industrielles qu'ils engendrent.

Par ailleurs, comme rapporté au paragraphe précédent, les polymères qui constituent la matrice sont mutuellement en interactions intermoléculaires et la stabilité de la matrice est assurée par des liaisons ioniques et électrostatiques, des ponts hydrogènes, des interactions hydrophobes et des liaisons de Van der Waals (Flemming 2011; Pierre Lembre 2012). Des méthodes adaptées doivent alors être employées pour cibler et rompre ces interactions et la littérature regorge de stratégies prometteuses combinant un panel considérable de traitements physiques, chimiques ou enzymatiques, de façon à adapter la méthode au système microbien, mais également à l'état physiologique et structural du biofilm. Kostakioti et al. (2013) ont proposé de résumer les différentes stratégies anti-biofilms existantes qui ont démontré leur efficacité à chaque stade de développement du biofilm (FIGURE A-33). A l'étape initiale d'adhésion, ce sont les agents inhibiteurs de facteurs d'adhésion qui sont utilisés pour empêcher l'attachement des cellules aux surfaces. L'assemblage des curli et des pili est ciblé ainsi que la communication intercellulaire. Lors de l'agrégation des cellules en micro-colonies, les phages lytiques, les nanoparticules d'argent ou encore les enzymes hydrolytiques et les agents chélatants se sont avérés efficaces pour déstructurer les biofilms établis.

D'autre part, la dispersion des biofilms peut aussi être enclenchée par l'activation de signalisation des messagers secondaires de la di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) ou encore par l'usage d'agents dispersants tels que les acides D-aminés (D-tyrosine, chez *Bacillus subtilis*).

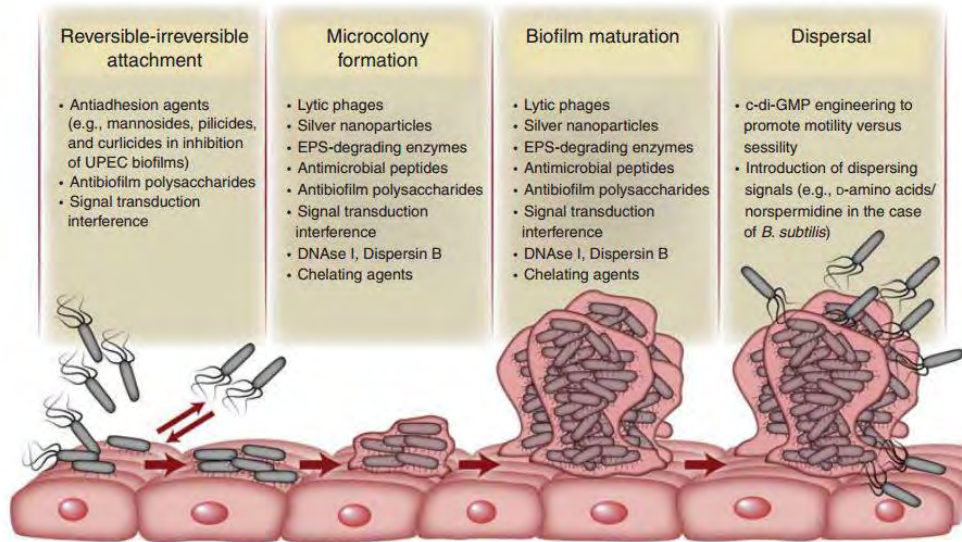


FIGURE A-33. Stratégies anti-biofilms engagées à chaque étape du développement visant à prévenir ou à dissoudre le biofilm. (Kostakioti et al. 2013)

II.4.1 Stratégie antimicrobienne

II.4.1.1 Nanoparticules d'argent

L'usage de l'argent a été pratiqué depuis longtemps pour désinfecter les plaies, notamment durant la Première Guerre Mondiale. La charge positive des ions argent facilite l'attraction électrostatique entre le métal et les charges négatives des membranes cellulaires. La létalité de l'argent est due surtout aux réactions chimiques qui inactivent l'activité des enzymes bactériennes. Ceci a pour conséquence l'inhibition en cascade de la réplication de l'ADN, l'expression des protéines ribosomiques et l'induction des interférences avec la chaîne de transport des électrons. Les nanoparticules d'argents ont démontré une inhibition des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus epidermidis* de plus de 95% (Kostakioti et al. 2013). Couplées à un ammonium quaternaire (diméthacrylate d'ammonium), les nanoparticules d'argent ont également prouvé leur efficacité pour l'inhibition de la formation de biofilm dentaire et l'apparition de caries (Cheng et al. 2012).

II.4.1.2 Thérapie phagique

Cette stratégie tire avantage des bactériophages lytiques qui n'incorporent pas l'information génétique des bactéries sous forme de prophages et permettent d'éviter le transfert de facteurs de virulence. Ces phages induisent une lyse rapide des bactéries et produisent des enzymes hydrolytiques qui digèrent les parois bactériennes (endolysines ou lysines) ainsi que les SEP (dépolymérase). De très nombreuses études ont ainsi démontré l'efficacité des bactériophages pour inhiber la formation de biofilms et rapportent l'intérêt grandissant de cette stratégie (K. Chan et al. 2015).

Lu et al. ont synthétisé un bactériophage qui exprime également une enzyme hydrolytique, la dispersine B (DspB) afin de provoquer une attaque simultanée des cellules par la voie lytique et de la matrice par la voie enzymatique. L'efficacité de cette attaque a été considérablement supérieure à celle d'un bactériophage seul. Les résultats obtenus ont ainsi montré une réduction logarithmique de la densité cellulaire de 4,5 soit 99,997% de réduction du biofilm. Cette étude a ainsi démontré la faisabilité et l'efficacité d'un bactériophage synthétique pouvant répondre aux problèmes médicaux et industriels que peuvent engendrer les biofilms récalcitrants (Lu and Collins 2007).

II.4.2 Actions physico-chimiques

La déstructuration des biofilms ne peut être efficace que si les interactions physico-chimiques ne sont rompues. Pour cela plusieurs méthodes physiques, telles que l'ultrasonication suivie d'une centrifugation ou le chauffage permettent de libérer les SEP faiblement liées et les SEP solubles. En revanche, pour cibler les SEP fortement liées, des méthodes plus drastiques, et le plus souvent chimiques, sont employées pour les dissocier des cellules. L'ajout d'EDTA, l'utilisation de résine échangeuse de cations (CER), ou de formaldéhyde et/ou de NaOH ont permis notamment de libérer les SEP liées par des ponts calcium (Ras et al. 2008a; Liang et al. 2010; Pan et al. 2010).

Par ailleurs, Pechaud et al. (2012) ont rapporté la nécessité de combiner les traitements enzymatiques avec une action hydrodynamique (contrainte de cisaillement) pour assurer le détachement des biofilms formés au sein d'un réacteur Couette-Taylor. De même, le couplage de l'action de l'EDTA, avec des traitements enzymatiques a été proposé. En effet, le chélateur de cations va venir rompre les ponts calcium qui maintiennent les structures protéiques, et les

enzymes, telles que la DNase I vont digérer l'ADN extracellulaire ; l'action synergique des deux agents a ainsi permis de déstabiliser la matrice extracellulaire des biofilms de *Haemophilus influenza* et a participé à la sensibilisation des cellules à l'action d'antibiotiques telles que la ciprofloxacine et l'ampicilline (Cavaliere et al. 2014).

Lors de la première phase d'adhésion aux surfaces, l'inhibition de l'assemblage des résidus protéiques des facteurs d'adhésion, tels que les pili ou les curli, a abouti au screening de nombreux composés dits pilicides ou curlicides. Andersson et al. ont synthétisé et criblé une centaine de dérivés de la 2-pyridone et ont indiqué que ces molécules pouvaient moduler l'assemblage en fibres de la sous-unité protéique CsgA (curli) chez *E.coli* (Andersson and Chapman 2013). Ces molécules semblaient également cibler les facteurs de virulence des bactéries (Aberg and Almqvist 2007).

D'autres molécules telles que les acides D-aminés peuvent également inhiber et disperser les pellicules formées par *Bacillus subtilis*. En particulier, la D-Tyrosine a démontré sa capacité à désancrer les fibres de TasA des cellules de *B.subtilis* (Kolodkin-Gal et al. 2010).

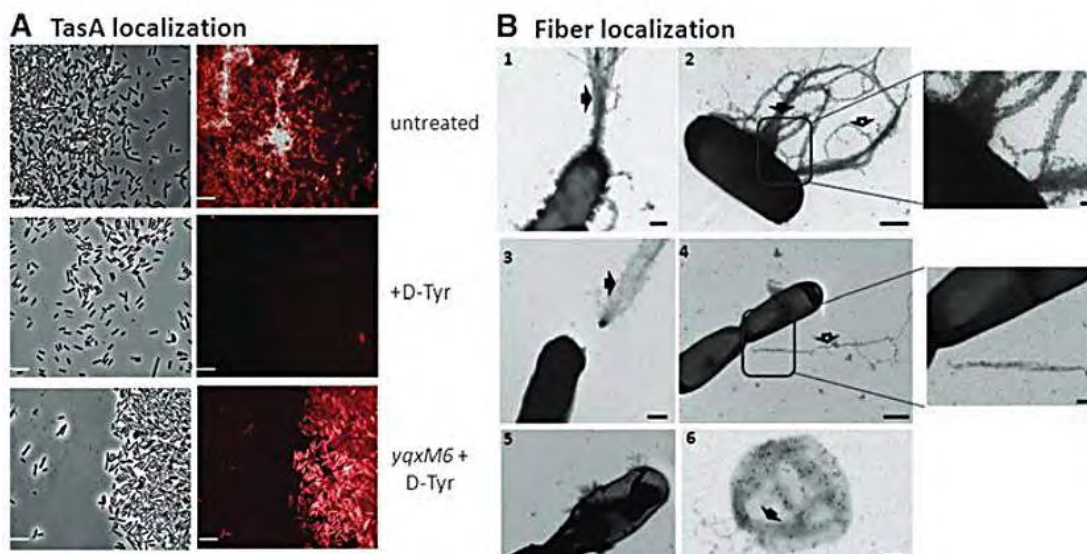


FIGURE A-34. La D-tyrosine entraîne le relargage des fibres de TasA. [A] Images en microscopie à épifluorescence de clusters de la souche sauvage ou mutante résistante à la D-tyrosine (*yqxM6*) de *B. subtilis* exprimant la protéine fluorescente de fusion mCherry couplée à la TasA (TasA-mCherry). Les biofilms ont été formés en absence (untreated) ou en présence de D-tyrosine (6 μ M), barre d'échelle :4 μ m. [B] Micrographe obtenu par MET de cultures de 24h réincubées sans (1 et 2) ou avec de la D-tyrosine (0.1mM) pendant 12h supplémentaires ; TasA a été immunomarkuée à l'or colloïdal après fixation d'un anticorps anti-TasA ; barre d'échelle pour les images 1 à 3 :500nm et les images 4 à 6 : 100nm. Les suspensions non traitées indiquent des fibres abondantes et attachées aux cellules tandis que les images 3, 4 et 6 montrent des fibres détachées des cellules. (Kolodkin-Gal et al. 2010)

II.4.3 Traitements biologiques

II.4.3.1 Méthodes enzymatiques de réduction des biofilms

L'usage des enzymes comme agents anti-biofilms est de plus en plus courant, notamment en milieu industriel où la réduction de l'impact environnemental des biocides d'origine chimique est devenue une priorité (Torres et al. 2011). De nombreuses enzymes ou préparations enzymatiques commerciales ont démontré leur efficacité dans la réduction significative des biofilms sur les surfaces industrielles, notamment dans l'industrie du papier (Blanco et al. 1996; Torres et al. 2011; Marcato-Romain et al. 2012) ou sur les espèces isolées des contaminations dans l'industrie agroalimentaire (Lequette et al. 2010). Ces enzymes ont également pu être utilisées pour réduire les biofilms formés par une bactérie marine *Pseudoalteromonas* sp. D41. à l'origine du biofouling marin, et parmi ces solutions commerciales, une subtilisine (protéase à sérine), la Savinase®, s'est avérée être la plus efficace (Leroy et al. 2008).

Pour les études de réduction ou de caractérisation de la matrice extracellulaire de biofilms, les enzymes les plus utilisées sont la protéinase K, d'origine végétale, et la DNase I d'origine animale. Chez les biofilms dentaires formés par *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*, ces deux enzymes ont eu un très faible effet sur le détachement du biofilm mais ont permis néanmoins de déterminer les proportions relatives en protéines, en polysaccharides et en ADNe de la matrice (Mohammed et al. 2013).

L'efficacité de la DNase I et d'autres endonucléases dans la dispersion de nombreux biofilms issus de différentes espèces a permis de mettre en lumière le rôle central de l'ADN extracellulaire et fait de cette enzyme un outil de choix dans le développement de stratégies anti-biofilms, et plus précisément « anti-matrice ». La DNase permet d'éliminer les biofilms relativement jeunes et accentue la sensibilité des biofilms aux biocides (Okshevsky et al. 2015). La perspective de la prévention de la formation de biofilm a amené au développement de stratégies plus prometteuses. Plus récemment, du fait de l'interaction de l'ADNe avec les autres composants de la matrice, d'autres stratégies visent à rompre les liaisons qui assurent ces interactions pour optimiser la déstructuration de la matrice. Une première étude a proposé un revêtement permettant d'immobiliser de façon covalente la DNase I à la surface d'un support en Polyméthylméthacrylate (PMMA). Ce revêtement a ainsi réduit l'adhésion des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus*, respectivement de 99 et 95% par rapport à

une surface contenant de la DNase I inactivée thermiquement. Cette très faible adhésion a pu être maintenue pendant 14h (Swartjes et al. 2013).

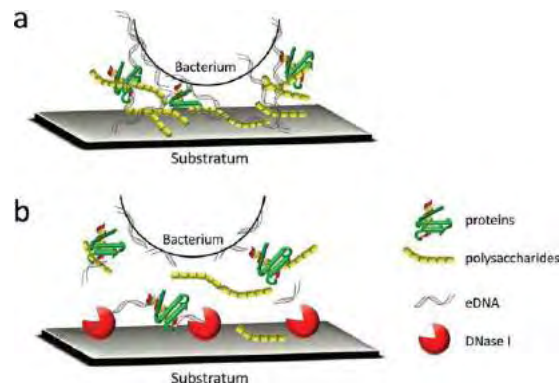


FIGURE A-35. Implication de l'ADNe dans l'adhésion des cellules à la surface et pontage des différents biopolymères mis en évidence par l'action de la DNase I sur la matrice. (Swartjes et al. 2013)

II.4.3.2 Anticorps spécifiques des composants de la matrice

Comme décrit dans le **paragraphe II.2.3**, l'ADN extracellulaire est à l'origine de la structure en réseau de la matrice de *Haemophilus influenzae* dont la stabilité est assurée par la fixation des protéines de type histone IHF. Brockson et al. (2014) ont ainsi proposé l'action d'un anticorps anti-IHF pour déstabiliser la matrice extracellulaire de ce biofilm (FIGURE A-36). Les anticorps anti-IHF ayant une forte affinité, capturent les protéines IHF et induisent un déplacement de l'équilibre de dissociation, la conséquence est que la matrice se trouve déstabilisée et s'effondre sur les cellules. L'ajout d'antibiotique sur le biofilm déstructuré entraîne la mort d'une partie de la population cellulaire.

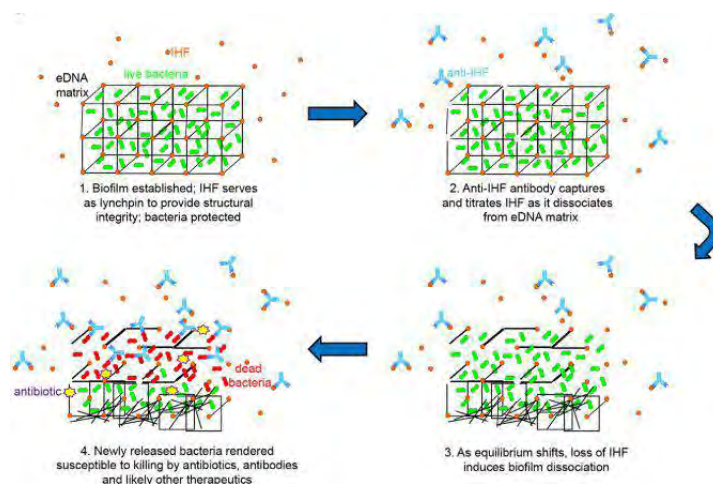


FIGURE A-36. Modèle structural de la matrice extracellulaire de la bactérie *Haemophilus influenzae* composée principalement d'ADNe et de protéines IHF formant un réseau en grillage autour des cellules. Conséquences de l'ajout d'anticorps anti-IHF puis d'antibiotiques (Brockson et al. 2014)

II.4.3.3 Usage de molécules d'origine naturelles

Toujours dans un souci d'un usage de molécules respectueuses de l'environnement, Neyret et al. (2014) ont proposé l'application d'huiles essentielles d'origine végétale généralement reconnues comme inoffensives (GRAS, *Generally Recognized As Safe*) et hautement volatiles, afin de prévenir la formation de biofilms dans l'industrie papetière. Parmi les molécules criblées, le thymol, le carvacrol et l'eugénol ont été les plus efficaces. Une injection de carvacrol à 10mM seul a permis de retarder la formation de biofilms pendant 10 jours. L'application d'un mélange de thymol et de carvacrol à 1mM a permis la réduction de 67% du biofilm (échelle pilote) après une incubation et un traitement de 11 jours.

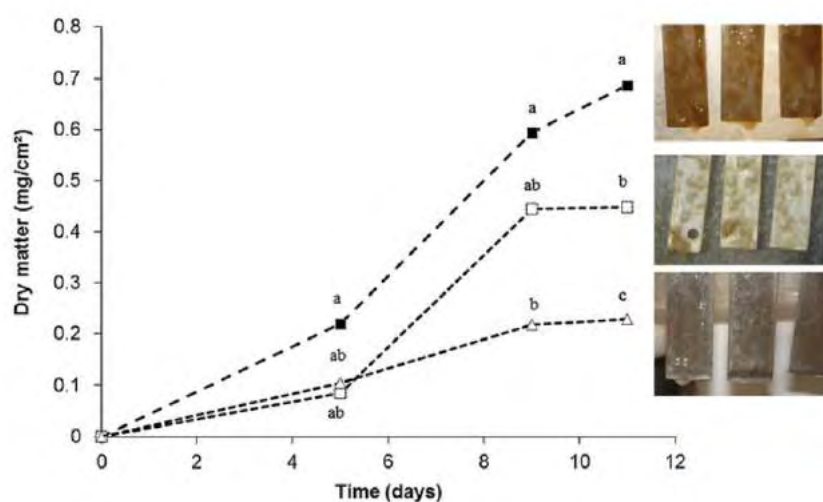


FIGURE A-37. Cinétique de formation d'un biofilm papetier produit à l'échelle pilote, sans traitement (carrés noirs) ou après application en spray d'un mélange de thymol-carvacrol à 1mM sur la surface pendant 1 jour (carrés blancs) ou 6 jours (triangles blancs). (Neyret et al. 2014)

III. Méthodes d'analyse des Substances exopolymériques de biofilms

III.1. Approches qualitatives

III.1.1. Organisation tridimensionnelle par microscopie

Au cours des dernières années, la microscopie optique à épifluorescence a été beaucoup utilisée en microbiologie et a satisfaisait les microbiologistes dès lors que l'échantillon à analyser était suffisamment fin pour être observé entre lame et lamelle. Depuis l'émergence du paradigme de la complexité tridimensionnelle des biofilms, la microscopie confocale (CLSM) s'est imposée comme technique d'analyse par excellence pour l'étude de leur architecture, de leur composition en SEP mais également de leur diversité microbienne. La principale avancée apportée par la CLSM par rapport à la microscopie à épifluorescence est qu'elle permet de pallier à la perte de résolution due à l'émission de fluorescence « défocalisée » qui se superpose à l'image du plan focal (Claxton et al. 1979; Paddock 1999; Paddock 2000). En effet, l'ajout d'un « pinhole » sur le chemin optique de la lumière émise par l'échantillon permet de la focaliser et limite donc ce phénomène. Cette avancée technologique a permis d'avoir une résolution submicronique à l'échelle d'une cellule bactérienne retrouvée au sein d'un biofilm.

En pratique, le principe de la CLSM est de pratiquer des coupes optiques virtuelles dans l'échantillon et de ne collecter que l'image de la fluorescence émise dans le plan focal. La superposition de plusieurs plans focaux dans l'axe vertical (z) permet de reconstituer une image en 3D de l'échantillon. Deux dimensions supplémentaires peuvent être acquises aux images obtenues en CLSM, notamment la dimension temporelle (t) pour une analyse dynamique de l'efficacité d'un agent antimicrobien par exemple, ou encore la dimension longueur d'onde (λ) pour une analyse spectrale. D'autre part, la CLSM offre la possibilité d'observer les échantillons sans avoir à les fixer au préalable. De plus, la CLSM permet l'analyse des échantillons dans leur état naturel d'hydratation et préserve ainsi l'intégrité structurale et l'information spatiale du biofilm.

La CLSM a ainsi permis d'importantes avancées dans l'étude des biofilms en donnant la possibilité d'apprécier leur architecture 3D (Bridier et al. 2013), la topographie des surfaces et la morphologie des communautés microbiennes. Par une large gamme de marqueurs fluorescents, la CLSM donne également accès à l'évaluation de la distribution des SEP de la matrice selon la

nature des exopolymères et leur proportion respective dans le biovolume (Chen et al. 2007). Les techniques émergentes de détection qui découlent de la CLSM ont également permis de comprendre la dynamique physico-chimique des biofilms mais aussi les phénomènes de compétition inter-espèces dans les biofilms complexes.

Cependant, la CLSM présente quelques limites par rapport à d'autres techniques de microscopie telles que la microscopie électronique (EM). En effet, la microscopie électronique offre une très haute résolution d'image (FIGURE A-38) et permet de visualiser l'ultrastructure des biofilms (Alhede et al. 2012). Toutefois une préparation fastidieuse des échantillons (déshydratation, fixation, adsorption à un support métallique, métallisation, ...) est nécessaire avant l'observation, et les étapes de déshydratation des échantillons peuvent entraîner jusqu'à 98% de perte de masse du biofilm par rapport à un biofilm observé *in vivo*. Les sections (ou coupes) appliquées aux échantillons peuvent également engendrer des artéfacts sur les images obtenues (Quintas et al. 2014).

Par ailleurs, les marqueurs fluorescents utilisés pour la CLSM peuvent rencontrer des problèmes de diffusion dans la profondeur des biofilms épais mais peuvent également être sujets à des risques de photoblanchiment. De ce fait, la CLSM requiert le contrôle de l'intensité des lasers appliqués aux échantillons pour trouver le compromis entre un bon signal de fluorescence et une décoloration (fading)» limitée des fluorochromes.

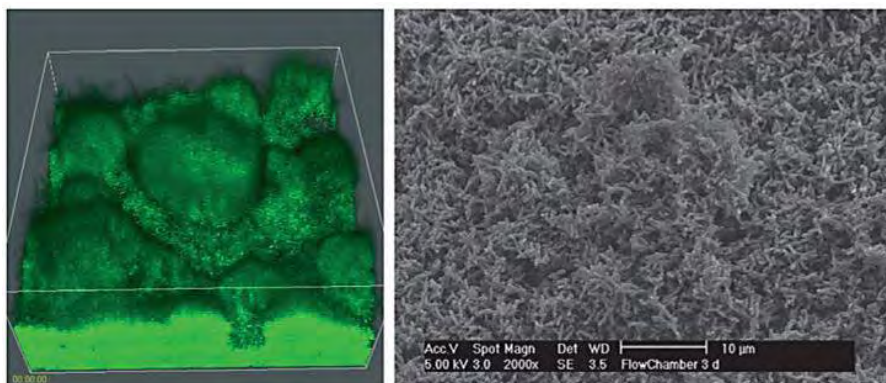


FIGURE A-38. Comparaison d'images obtenues par CLSM et par MEB conventionnelles d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* (Alhede et al. 2012)

D'autres techniques de microscopie peuvent être appliquées pour l'analyse de l'architecture des biofilm, notamment la microscopie à force atomique (AFM) qui permet d'obtenir des informations spatiales sur la rugosité et la topographie de la surface des biofilms, mais également sur les forces d'interaction qui peuvent s'y opérer (Dufrêne 2015).

Différentes techniques de microscopie électronique (Cryo-SEM, FIB-SEM, E-SEM) ont également été développées et présentent chacune leurs avantages et inconvénients tels que présentés dans le TABLEAU A-4.

Les techniques de Cryo-SEM et de E-SEM (Environmental Scanning Electron Microscopy) présentent l'avantage de ne pas recourir à une étape de déshydratation des échantillons, permettant ainsi de préserver la structure des biofilms, et notamment de la matrice extracellulaire. Néanmoins, elles donnent des images beaucoup moins résolutive qu'une SEM conventionnelle, ce qui peut être expliqué par la faible conductivité du faisceau d'électrons à travers l'échantillon (Alhede et al. 2012; Bar-Zeev et al. 2014). Cependant, dans le cas de la SEM, les cellules ne semblent pas être enrobées d'une matrice (FIGURE A-39). Par ailleurs, la Cryo-SEM nécessite le maintien de l'échantillon congelé (azote liquide à -210°C, sublimation en chambre de cryo-préparation à -95°C pendant 3min puis maintien à -125°C) dans une chambre durant toute l'acquisition, mais donne une représentation tout à fait correcte du biofilm.

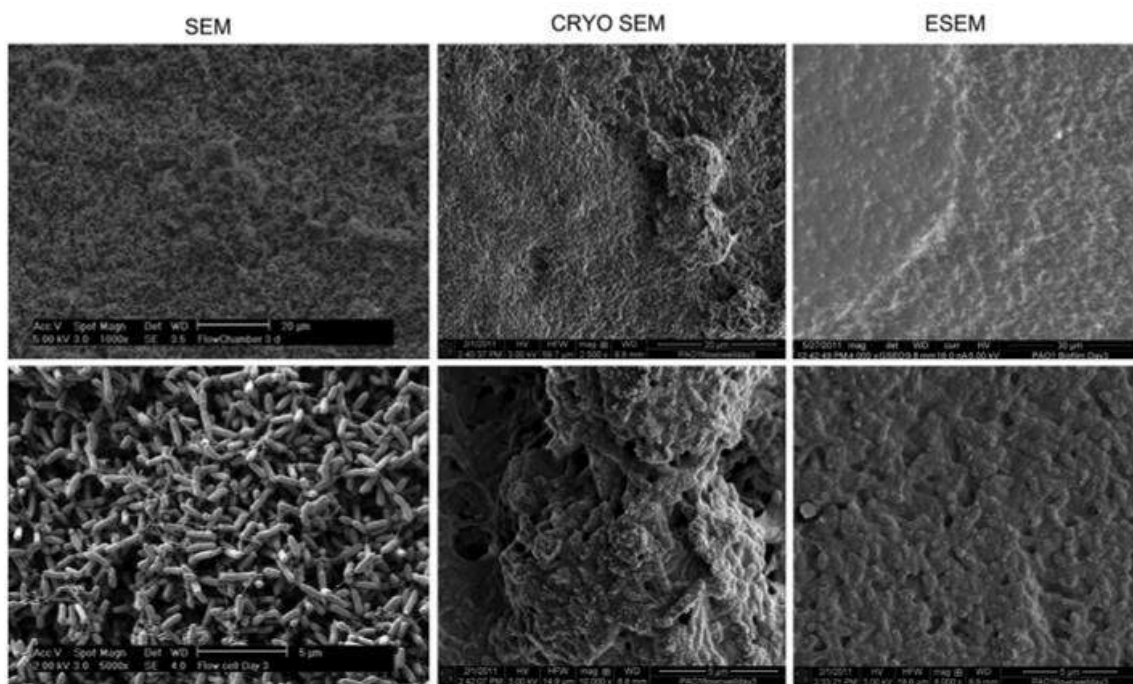


FIGURE A-39. Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* observés par SEM, Cryo-SEM et de E-SEM. (Alhede et al. 2012)

TABLEAU A-4. Techniques de microscopie pour l'étude des biofilms : avantages et inconvénients

Technique de microscopie	Avantages	Inconvénients	Références
Microscopie en lumière blanche	⇒ Evaluation du taux de recouvrement sur un substrat transparent	⇒ Echantillon uniquement sur substrat transparent	(Bar-Zeev et al. 2014)
Microscopie à épifluorescence	⇒ Evaluation du taux de recouvrement sur substrat opaque ou transparent ⇒ Marqueurs fluorescents spécifiques permettant de différencier les différents constituants de l'échantillon	⇒ Uniquement images en 2D	(Bar-Zeev et al. 2014)
Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)	⇒ Préservation de l'état naturel d'hydratation des échantillons ⇒ Pas de fixation nécessaire ⇒ Images en 3D ⇒ Analyse quantitative possible	⇒ Grossissement restreint ⇒ Diffusion des marqueurs limitée dans la profondeur de biofilms épais ⇒ Photoblanchiment, nécessité de contrôler l'intensité des lasers ⇒ Manque de technique de quantification standardisée	(Alhede et al. 2012) (Quintas et al. 2014) (Chen et al. 2007) (Bar-Zeev et al. 2014)
Microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM)	⇒ Haute résolution d'image, fort grossissement	⇒ Préparation fastidieuse des échantillons ⇒ Risque de rétraction du volume due à la déshydratation (perte de 73 à 98% de la biomasse initiale du biofilm) ⇒ Artefact possible dû aux cryo-sections ⇒ Observation de la matrice moins détaillée	(Alhede et al. 2012) (Quintas et al. 2014)
Cryo-SEM	⇒ Pas de déshydratation nécessaire des échantillons ⇒ Permet de visualiser la matrice extracellulaire (aspect en gel)	⇒ Nécessité de maintenir l'échantillon congelé dans une chambre pendant l'acquisition ⇒ Faible résolution d'image par rapport à une SEM conventionnelle	(Alhede et al. 2012)
E-SEM (Environmental SEM)	⇒ Observation d'échantillons hydratés et non-conducteurs dans leur état naturel ⇒ Pas de préparation préalable	⇒ Plus faible résolution d'image par rapport à une SEM conventionnelle ⇒ Faible conductivité sur échantillon humide ⇒ A un grossissement supérieur à x10000 le faisceau d'électrons semble détruire la structure en 3D	(Alhede et al. 2012)
FIB-SEM (Focused Ion Beam-SEM)	⇒ Alternative aux sections par ultra-microtomes ⇒ Reconstruction 3D du spécimen possible grâce à un « slice-and-view » : le faisceau d'ions focalisé (FIB) peut se déplacer (en z) depuis la surface d'un support en résine sur laquelle l'échantillon est fixé, et enregistrer séquentiellement une image toutes les 10nm.	⇒ Technologie en cours de développement et très coûteuse ⇒ La reconstruction en 3D n'est pas encore automatisée (les composés de la matrice doivent être marqués manuellement à chaque image) ⇒ Images peu résolues	(Alhede et al. 2012) (Dobretsov et al. 2014)
Microscopie à Force Atomique (AFM)	⇒ Evaluation de la rugosité de la surface des biofilms ⇒ Mesure des forces d'interactions qui s'y opèrent	⇒ Analyse limitée à une très petite surface (échelle du nanomètre)	(Bar-Zeev et al. 2014) (Dobretsov et al. 2014)

III.1.2. Analyse des propriétés biochimiques

L'organisation complexe des biofilms, gouvernée par les cellules qui produisent différents types de SEP, nécessite l'utilisation combinée de techniques de visualisation et d'identification de la nature biochimique de chacune des SEP. La microscopie confocale et les propriétés de nombreux marqueurs fluorescents apparaissent comme des outils de choix pour l'analyse qualitative des biofilms (Neu and Lawrence 2014). Par ailleurs, l'affinité des enzymes pour un substrat donné se présente également comme une stratégie intéressante pour l'étude des biofilms et a permis d'identifier certaines propriétés biochimiques des SEP au sein d'un biofilm (Adav et al. 2010). Dans le cadre de l'étude, ces deux aspects de l'analyse qualitative des biofilms seront développés.

III.1.2.1 Visualisation des composants de la matrice par marquage fluorescent

La généralisation des outils de microscopie en fluorescence s'est accompagnée du développement de nombreux marqueurs spécifiques à chacun des composants de la matrice extracellulaire. Neu & Lawrence (2015) ont proposé récemment une classification de ces marqueurs en trois familles :

- Les marqueurs structuraux : ces marqueurs sont les plus utilisés car ils permettent l'étude de l'ensemble du biofilm, en ciblant la partie cellulaire ou matricielle.

- Les marqueurs chimiques :
 - o certains fluorochromes présentent une sensibilité au pH qui est exploitée pour mesurer les variations qui peuvent survenir au sein du micro-environnement d'un biofilm (Martinez et al. 2012).
 - o D'autres fluorochromes peuvent être utilisés pour détecter la présence d'ions métalliques tels que Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , ou Hg^{2+} (Hao et al. 2013) avec lesquels ils peuvent avoir une réaction chimique qui modifie leur propriété de fluorescence.

- Les marqueurs de diffusion : ces marqueurs (sondes ou billes par exemple) permettent de mesurer la porosité ou le coefficient de diffusion du réseau d'exopolymères (Guiot et al. 2007) (Lacroix-Gueu et al. 2005; Briandet et al. 2008).

Seuls les marqueurs structuraux permettant la détection des acides nucléiques, de l'ADN extracellulaire, des exopolysaccharides et des exoprotéines, dont les fibres amyloïdes, seront présentés ci-après.

- **Marqueurs d'acides nucléiques**

Les marqueurs d'acides nucléiques peuvent être classés en trois catégories selon leur mode de liaison à la molécule d'ADN ou ARN (FIGURE A-40).

On distingue :

- Les agents intercalants (Propidium Iodide, Bromure d'éthidium, cyanines...)
- Les agents qui se fixent au sillon mineur (DAPI, Hoechst,...)
- Les autres agents qui vont soit se fixer au sillon majeur, soit se fixer sur l'extérieur du brin (Acridine orange, quelques cyanines ...).

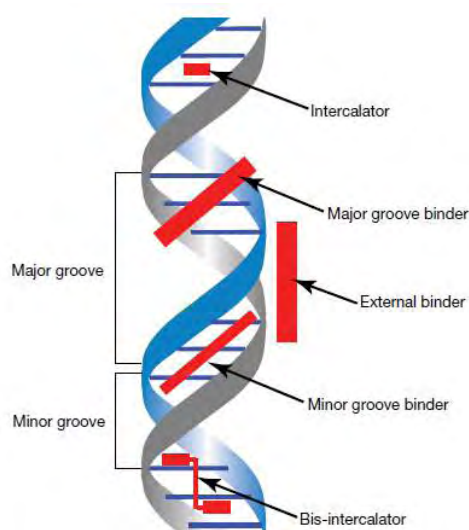


FIGURE A-40. Différents mode de liaison des marqueurs fluorescents aux acides nucléiques (**The Molecular Probes Handbook**).

⇒ Les cyanines regroupent des marqueurs qui se lient à l'ADN selon deux mécanismes : soit par une bis-intercalation de chaque monomère entre les bases, lorsque le ratio paire de base/marqueur est faible, soit par une liaison externe (external binder) le long du brin d'ADN lorsque le ratio est élevé. La famille des cyanines comprend les **cyanines primaires** ultrasensibles comme le PicoGreen® (ADN) ou le RiboGreen® (ARN) qui sont utilisées pour la détection sur gel

ou la quantification en solution des acides nucléiques. Des **dimères de cyanines**, dont la famille des TOTO (dimères symétriques) et leurs dérivés (YOYO, BOBO, JOJO, LOLO) et les **monomères de cyanines** (TO-PRO, ...) présentent une exceptionnelle affinité pour les acides nucléiques et sont imperméants aux cellules. Une autre famille de marqueurs synthétiques, les SYTOX® (SYTOX® Green, SYTOX® Blue, ...) sont des cyanines imperméantes et ne marquent que les acides nucléiques des cellules dont la membrane est endommagée. Ils sont pro-fluorescents, c'est-à-dire qu'ils ne fluorescent que lorsqu'ils sont liés à l'ADN, et ne nécessitent donc pas d'étape de rinçage. Ces marqueurs peuvent être appliqués pour quantifier l'ADN extracellulaire (Okshevsky and Meyer 2014; Neu and Lawrence 2014).

Le contenu intracellulaire est plus souvent marqué par des cyanines perméantes qui diffusent passivement à travers les cellules (famille des SYTO® : SYTO®9, SYTO®60...) et chaque dérivés présentent une affinité variable pour l'ADN et l'ARN.

⇒ Les phénanthridines ou les acridines sont des agents intercalants classiques et imperméants. Parmi ceux-ci on distingue le propidium iodide (PI) et le Bromure d'éthidium (BET). Ces deux composés se lient aussi bien à l'ARN qu'à l'ADN, si bien qu'un traitement spécifique avec une nucléase est nécessaire pour distinguer l'ADN de l'ARN.

⇒ Les dérivés contenant des groupements Indole et Imidazole sont également perméants aux membranes cellulaires. Le composé bis-benzimide Hoechst et le DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) se fixent à l'ADN au niveau du sillon mineur (minor-groove binder). Plus précisément, le DAPI se fixe sur les régions riches en bases A-T ; c'est le composé le plus couramment utilisé pour marquer l'ADN intracellulaire et localiser les cellules (Neu and Lawrence 2014).

⇒ Les indicateurs d'activités métaboliques tels que les dérivés de calcéines (CellTrace, CellTracker...) qui sont des fluorochromes perméants métabolisés par les estérases intracellulaires en composés fluorescents (Neu and Lawrence 2015). Ces marqueurs peuvent ainsi être des indicateurs de viabilité ou de l'intégrité cellulaire lorsqu'ils sont combinés avec des marqueurs imperméants à une membrane intacte (Propidium Iodide dans les kits LIVE/DEAD®) ou avec des marqueurs membranaires lipophiles (Séries des FilmTracer™ : FM®1-43...).

○ Marquage de l'ADNe dans les biofilms

La visualisation de l'ADNe peut être réalisée par plusieurs marqueurs parmi lesquels les plus couramment utilisés sont l'iodure de propidium (PI), le PicoGreen® (PG) qui est hautement fluorescent, le SYTOX®Green et enfin le DDAO (7-hydroxy-9H-1,3-dichloro-9,9diméthylacridin-2-one) utilisé par Allensen-Holm (Allesen-Holm et al. 2006). Très récemment, Okshevsky et al. ont mis en lumière les performances du TOTO-1 pour la visualisation de l'ADNe lorsque le SYTO®60 est utilisé en contre-marquage des cellules. En effet, comparé aux marqueurs sus-cités (PicoGreen®, SYTOX®Green, DDAO, PI) et à d'autres marqueurs moins couramment utilisés tels que le TO-PRO-3, le TOTO-1 est celui qui a montré à la fois une intense fluorescence mais également une forte stabilité (FIGURE A-41a). Le PicoGreen® (FIGURE A-41b) et le SYTOX®Green (FIGURE A-41c) montrent également une très forte intensité de fluorescence et offrent un bon recouvrement de l'ADNe (Okshevsky and Meyer 2014). A noter que le PicoGreen® semble diffuser à travers les cellules au cours du temps, mais une étude a montré la possibilité d'utiliser le PicoGreen® pour marquer l'ADNe avec un protocole de marquage de courte durée (< 5min) afin de limiter sa diffusion (Tang et al. 2013).

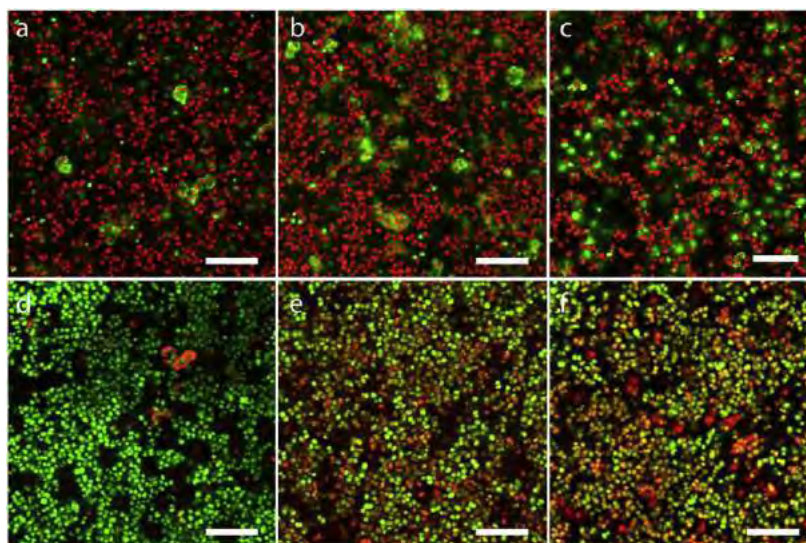


FIGURE A-41. Comparaison des marqueurs d'acides nucléiques pour la visualisation de l'ADN extracellulaire de biofilms de *Staphylococcus epidermidis*. a) TOTO-1 (vert) + SYTO®60 (rouge); b) PicoGreen® (vert) + SYTO®60 (rouge); c) SYTOX®Green (vert) + SYTO®60 (rouge); d) Iodure de Propidium (rouge, pour l'ADNe) et SYTO®9 (vert, pour les cellules); e) DDAO (rouge, pour l'ADNe) et SYTO®9 (vert, pour les cellules) et f) TO-PRO3 (rouge pour l'ADNe) et SYTO®9 (vert pour les cellules). Barre d'échelle = 10µm (Okshevsky and Meyer 2014).

○ **Marquage des exopolysaccharides**

Les ePS ont longtemps été caractérisés par les lectines conjuguées à un fluorochrome (FITC, TRITC, série des Alexa-fluor, les cyanines CY5-, ...). Les lectines sont des protéines qui présentent une forte affinité pour certains résidus de sucres et constituent un outil intéressant pour marquer de manière spécifique les exopolysaccharides des biofilms. Elles sont classées selon cinq groupes en fonction du résidu osidique pour lequel elles ont une affinité : mannose (Man), galactose (Gal/GalNAc), N-acetylGlucosamine (GlcNAc), Fucose (Fuc) et Acide Neuraminique (NeuAc).

TABLEAU A-5. Exemples de lectines et de leur cibles de liaison préférentielles (Zippel and Neu 2011)

Lectine	Origine	Spécificité
AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuc
ACL	<i>Amaranthus caudatus</i>	α -Gal, β -GalNAc
AMA	<i>Arum maculatum</i>	Man
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	α -GalNAc
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	α -Gal, β -Gal, β -GlcNAc
EcorA	<i>Erythrina corallodendron</i>	LacNAc
HMA	<i>Homarus americanus</i>	Acide sialique
HPA	<i>Helix pomatia</i>	α -GalNAc
IAA	<i>Iberis amara</i>	GlcNAc
LcH	<i>Lens culinaris</i>	α -Man, α -Glc, α -GlcNAc
LEA	<i>Lycopersicon esculentum</i>	β -GlcNAc, (GlcNAc) ₃
PA-I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gal
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	α -Gal, β -GalNAc
SBA	<i>Glycine max</i>	α -GalNAc, β -GalNAc
VVA	<i>Vicia villosa</i>	α -GalNAc
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	β -GlcNAc, acide sialique

Du fait de cette spécificité étroite pour un résidu osidique donné, leur utilisation a pu démontrer une hétérogénéité spatiale au sein de la matrice (Neu et al. 2001) de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* selon la lectine utilisée (Strathmann et al. 2002). Pour pallier à cette limite due à la spécificité des lectines, et apprécier la matrice polysaccharidique dans son ensemble, il est possible d'effectuer un co-marquage avec plusieurs lectines, chacune étant conjuguée à un fluorochrome fluoresçant à une longueur d'onde différente (Neu et al. 2001; Baird et al. 2012).

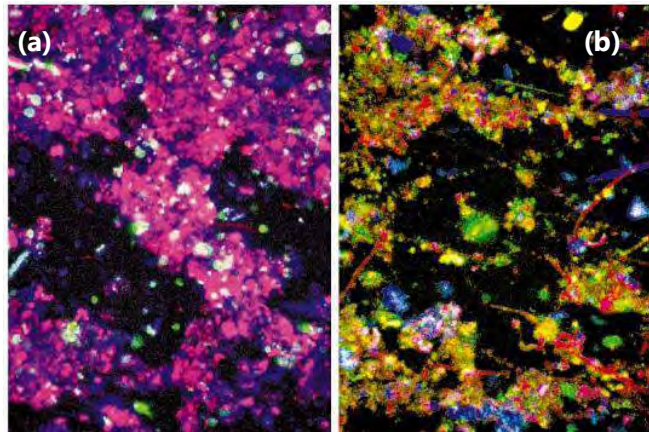


FIGURE A-42. Triple marquage des ePS d'un biofilm de rivière. (a) *L. polyphemus*-FITC (vert), *U. europaeus*-TRITC (rouge) et *A. hypogaea*-CY5 (bleu). Le marquage simultané par deux lectines se traduit soit par une couleur rose soit par une couleur bleu brillant. (b) *U. europaeus*-FITC (vert), *Tri. vulgaris*-TRITC (rouge) and *A. hypogaea*-CY5 (bleu). La superposition des couleurs indique un marquage simultané d'un même polymère par les différentes lectines. La barre représente une distance de 25 μm . (Neu et al. 2001)

Plus récemment, Neu et *al.* préconisent d'appliquer la technique FLBA (Fluorescence lectin-binding analysis), qui consiste en une étude préliminaire pour sélectionner la lectine la mieux adaptée pour l'analyse d'un échantillon de biofilm inconnu (Neu and Lawrence 2015).

Une autre solution pour apprécier la matrice polysaccharidique dans son ensemble est d'utiliser des lectines dont la/les cible(s) est/sont moins spécifique(s) et retrouvée(s) dans un grand nombre de polysaccharides, permettant ainsi de marquer la majorité des ePS. La plus couramment utilisée est la Concanavaline A (ConA) dont la spécificité est dirigée vers les résidus αD -glucose et αD -mannose. Cette lectine a également permis de marquer des polymères de fructose, tels que le lévane de *Pseudomonas syringae* (Laue et al. 2006) (FIGURE A-43).

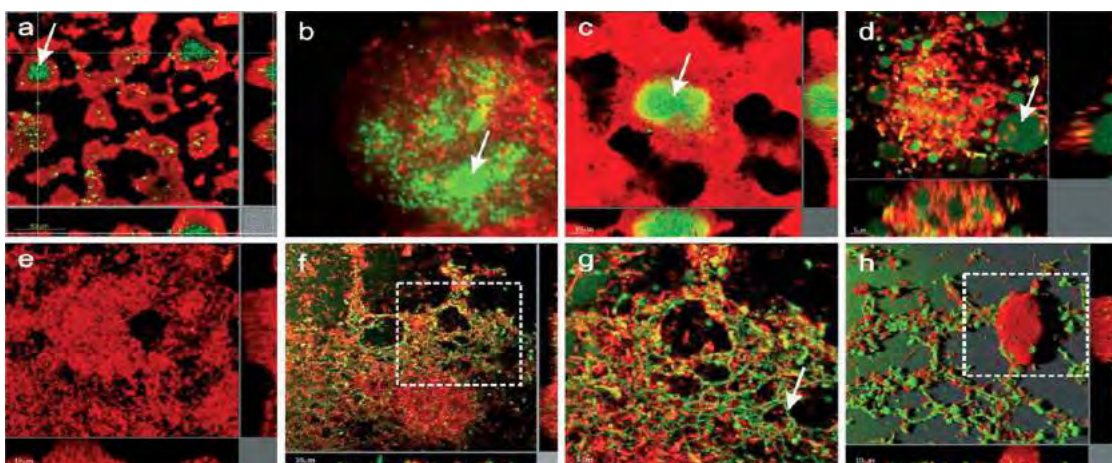


FIGURE A-43. Biofilms de *Pseudomonas syringae* de 9-10 jours dont les ePS sont marqués par la ConA-FITC (en vert, images a-d) ou avec une lectine de *Naja mossambica* conjuguée au fluorochrome Alexa-488 (en vert, images f, g, et h) et les cellules sont marquées au SYTO[®]62 (en rouge). (e) Biofilm cultivé dans un milieu sans saccharose et donc sans production de lévane, la ConA ne s'est pas fixée sur la matrice. Les flèches indiquent la présence de lévane. (Laue et al. 2006)

Parmi les colorants à large spectre des polysaccharides, le réactif de Schiff a été utilisé depuis de nombreuses années en microscopie optique pour l'observation de coupes histologiques. Ce marquage consiste en une oxydation des groupements hydroxyles vicinaux des sucres par l'acide périodique puis la révélation des groupements aldéhydes formés par la fuschine (réactif de Schiff). Très récemment, Janissen et al. (2015) ont exploité la propriété à fluorescer de ce réactif (excitation 561 nm et émission à 650 nm) pour marquer des biofilms de *Xylella fastidiosa* (FIGURE A-44). Percival et al. (2012) ont également utilisé cette technique pour la mise en évidence de la présence de biofilms dans les plaies.

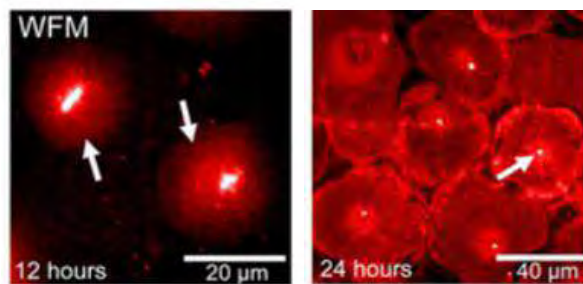


FIGURE A-44. Image de microscopie à épifluorescence à champ large de cellules individuelles de *Xylella fastidiosa* marqué au PAS (Periodic acid-Schiff) et mettant en évidence de polysaccharides capsulaires qui s'accroissent autour des cellules au cours du temps. (Janissen et al. 2015)

- **Marquage des exoprotéines**

Les fluorophores permettant de marquer les protéines peuvent être classés en deux catégories selon qu'ils se lient aux régions hydrophobes (NanoOrange® par exemple) ou aux amines primaires (Fluorescamine, o-Phthaldialdehyde, SYPRO®Ruby, SYPRO®Red, SYPRO®Orange, Epicocconone, FITC, etc), ces derniers étant les plus couramment utilisés.

Parmi eux, le Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) a permis le marquage et l'observation des protéines totales de divers agrégats (McSwain et al. 2005; Chen et al. 2007; Villena et al. 2010; Caudan et al. 2014). Le FITC décrit une affinité pour les protéines et les sucres aminés ce pourquoi il a également été utilisé comme marqueur de la matrice totale (Larsen et al. 2008b) pour estimer le taux de recouvrement du biofilm.

Par ailleurs, le FilmTracer™ SYPRO®Ruby présente de nombreux avantages pour le marquage des protéines notamment chez *Pseudomonas aeruginosa* (Sanchez et al. 2013), chez

Clostridium difficile (Đapa et al. 2013) ou encore des espèces de *Staphylococcus* (FIGURE A-45); il très utilisé pour l'analyse des biofilms.

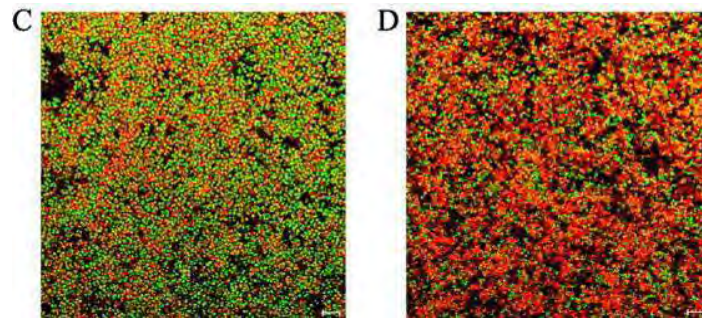


FIGURE A-45. Détection des exoprotéines dans les biofilms de *Staphylococcus epidermidis* (C) et de *Staphylococcus lugdunensis*. Les protéines sont marquées au SYPRO®Ruby et les cellules au SYTO®9. (Frank and Patel 2007)

Le SYPRO®Ruby est une sonde fluorescente (excitation à 280 nm, émission à 450 nm) initialement développée pour marquer les protéines migrées sur gel d'électrophorèse de manière non-covalente, permettant ainsi l'analyse ultérieure par spectrométrie de masse. La molécule se caractérise par un complexe bathophénantroline de ruthénium, un sel de terre rare (FIGURE A-46) qui interagit de façon non covalente avec les groupements basiques des protéines grâce à ces groupements sulfonates (Berggren et al. 1999). Le SYPRO®Ruby permet de détecter la plupart des classes de protéines retrouvées dans la matrice extracellulaire, notamment, les glycoprotéines, les phosphoprotéines, les lipoprotéines, les protéines liant le calcium mais aussi les protéines fibrillaires (Đapa et al. 2013). Il a été démontré par ailleurs que ce marqueur offre une meilleure sensibilité que le nitrate d'argent ou le Bleu de Coomassie (Berggren et al. 1999; Steinberg et al. 2000; Lopez et al. 2000), ce pourquoi il est actuellement le marqueur de référence des gels d'électrophorèse. De plus, le SYPRO®Ruby est déjà utilisé pour la détection de protéines dans les agrégats bactériens (Frank and Patel 2007; Di Poto et al. 2009; Tremblay et al. 2013; Brancatisano et al. 2014).

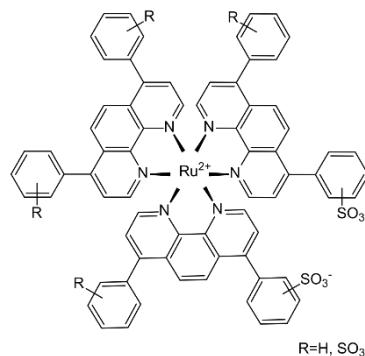


FIGURE A-46. Formule semi-développée du SYPRO®Ruby (Thèse Philippe Peixoto, 2009)

Certains marqueurs retrouvés dans les kits de quantification de protéines en solution, comme le NanoOrange[®] ou le 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldéhyde (CBQCA), ont également permis de marquer spécifiquement les exoprotéines et ont fait l'objet d'une méthode de quantification *in situ* des protéines par CLSM (Larsen et al. 2008b).

Parmi les marqueurs impliqués dans les kits de quantification en solution, il convient de présenter l'épicoconone, un composé naturel isolé d'un champignon *Epicoccum nigrum* en 2003 (Bell and Karuso 2003), et qui constitue le fluorochrome de plusieurs kits commerciaux (Fluoroprofile[®], LavaPurple[®]). Bien que n'ayant jamais été utilisé sur des biofilms bactériens à notre connaissance, l'épicoconone présente une très bonne sensibilité, une large gamme de linéarité et une rapidité d'utilisation qui en font un marqueur de choix pour les gels d'électrophorèse (Wöhlbrand et al. 2013; Moritz et al. 2013). De plus, cette molécule a la propriété d'être pro-fluorescente, c'est-à-dire qu'elle ne fluoresce qu'en présence de sa cible, qui est le plus souvent un groupement amine primaire (-NH₂) retrouvé dans les protéines. La liaison de l'épicoconone aux protéines engendre la formation d'une énamine elle-même stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire (FIGURE A-47). Ce composé émet une fluorescence dans le proche infrarouge (610 nm) lorsqu'il est excité par un rayonnement UV à 395 ou dans le visible à 520 nm (Bell and Karuso 2003; Coghlan et al. 2005).

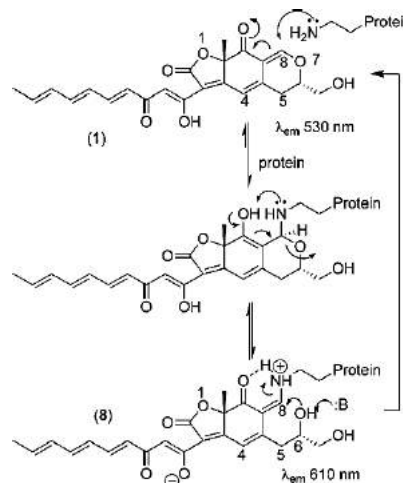


FIGURE A-47. Mécanisme de fixation de l'épicoconone sur les protéines proposé par **Coghlan et al. (2005)**.

○ **Marquage des fibres amyloïdes**

Les fibres amyloïdes sont des protéines qui présentent une particularité structurale qui les différencie des autres protéines de la matrice. Plusieurs critères ont été établis pour définir si une protéine est de type amyloïde ou non (Nilsson 2004):

- L'apparition d'une biréfringence verte après coloration au Rouge Congo, un marqueur histologique utilisé pour colorer les composés celluloses. Cette biréfringence peut être caractérisée par microscopie en lumière polarisée ;
- La mise en évidence d'une structure fibrillaire, le plus souvent par observation au microscope électronique à transmission ;
- La mise en évidence d'une structure secondaire en feuillets β par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ou par la détermination de la diffraction des rayons X.

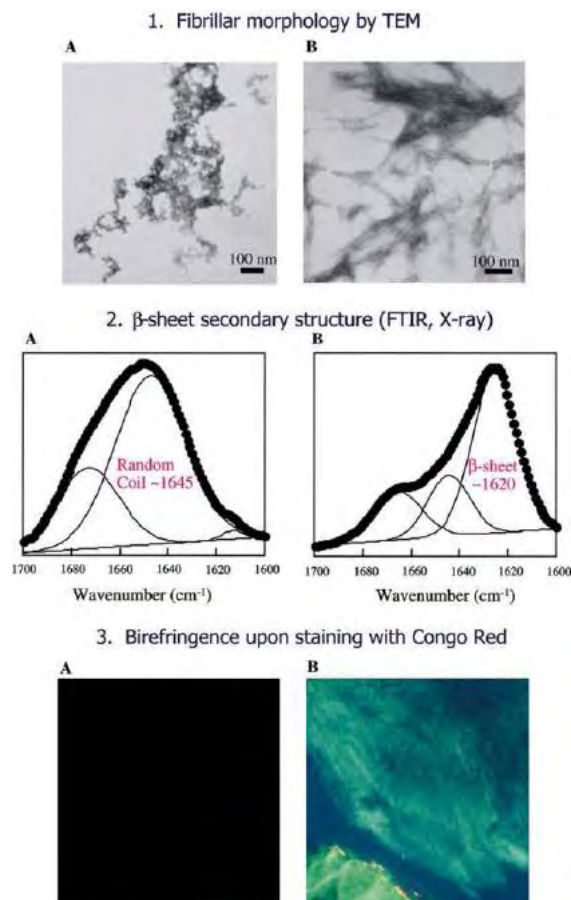


FIGURE A-48. Techniques de caractérisation des fibres amyloïdes selon les trois critères établis par **Nilsson (2004)**

En plus des techniques énumérées précédemment, la fixation d'un marqueur fluorescent, la thioflavine T (ThT) fait également partie des techniques utilisées de manière systématique depuis sa découverte (LeVine 1995). En effet, la ThT est un marqueur fluorescent de la famille des benzothiazoles qui émet une fluorescence intense à 480nm lorsque celui-ci est excité à 450nm en présence de fibres amyloïdes, notamment sur les structures en feuillet β .

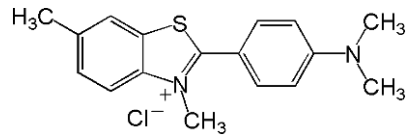


FIGURE A-49. Molécule de thioflavine T

Dans les biofilms naturels, les fibres amyloïdes ont pu être visualisées soit par marquage à la ThT soit par des anticorps à spécificité de conformation. Ces anticorps, nommés WO1 et WO2, se fixent au peptide précurseur de l'amyloïdogénèse dans son état de fibre amyloïde et non lorsqu'il est sous-forme native et soluble (O'Nuallain and Wetzel 2002). Ces anticorps ont démontré leur spécificité sur différentes protéines amyloïdogènes humaines (peptide A β (1-40) dans la maladie d'Alzheimer, transthyrétine dans les cardiomyopathies, β_2 -microglobuline) mais également sur des fibres amyloïdes produites par des agrégats microbiens (flocs, boues activées, biofilms) retrouvés dans les milieux aquatiques. Toutes ces protéines ont en commun la conformation en β -feuillet (FIGURE A-50).

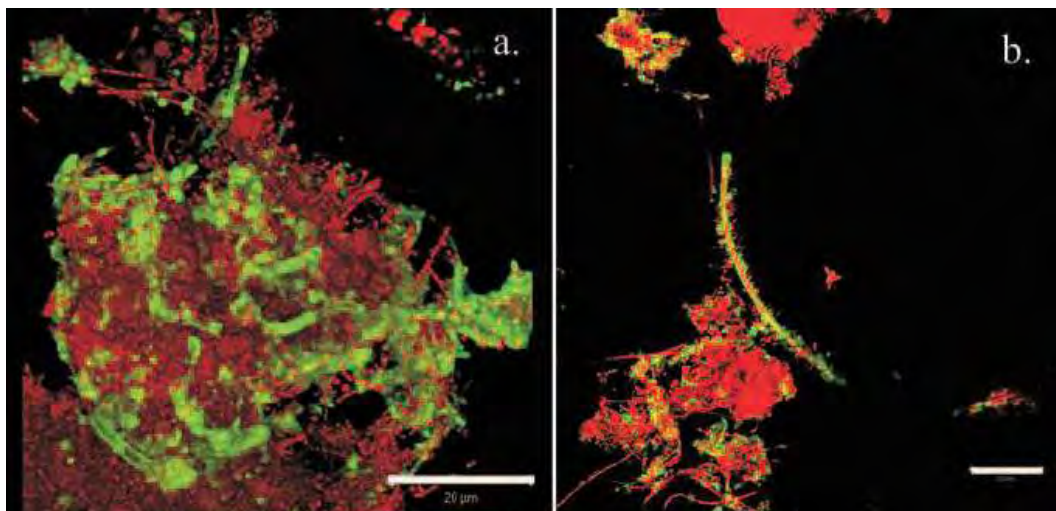


FIGURE A-50. Détection des adhésines amyloïdes (verte) dans des boues activées par marquage à l'aide d'un anticorps anti-WO1 (a) ou de la thioflavine T (ThT) (b), couplés à l'iodure de propidium (rouge) pour le marquage des cellules. (Larsen et al. 2008a)

○ Co-marquage des SEP

Les marqueurs fluorescents spécifiques de chaque composant des biofilms permettent de détecter et d'identifier les familles biochimiques des molécules qui les composent. En appliquant simultanément ou en séquence ces marqueurs sur un même biofilm il est alors possible de mettre en évidence les différents exopolymères qui composent la matrice d'un biofilm (FIGURE A-51).

Plusieurs travaux ont été menés de façon à maximiser le nombre de marquages simultanés et d'obtenir la vue la plus complète possible d'un agrégat bactérien. A titre d'exemple, (Chen et al. 2007) ont réussi à combiner 7 fluorochromes marquant les protéines, les β -polysaccharides, les α -polysaccharides, les protéines glycosylées, les lipides, les cellules totales et les cellules mortes.

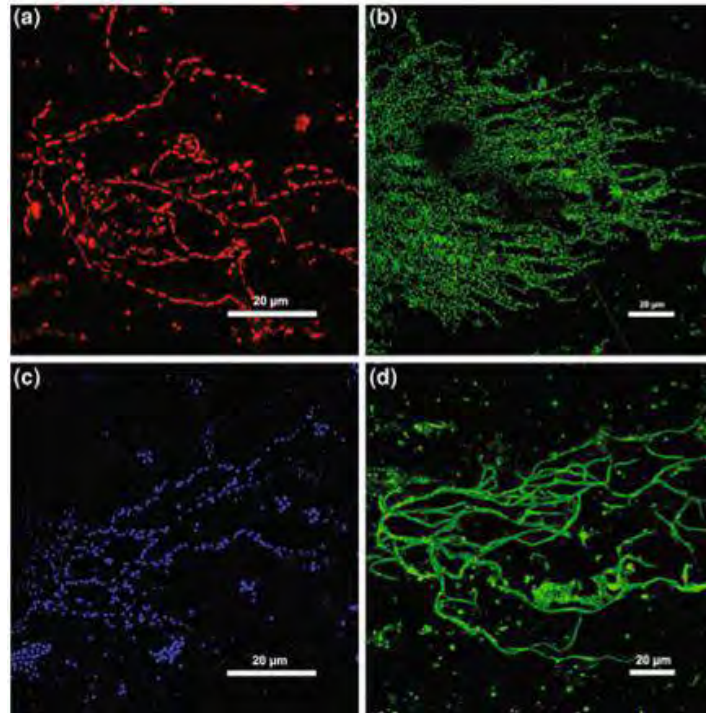


FIGURE A-51. Images de CLSM obtenues par projection maximale de l'intensité de fluorescence de biofilms formés au sein d'un réacteur à rotation annulaire. (a) Marquage au SYPRORed, (b) Acridine Orange, (c) DAPI, (d) lectine WGA-FITC. (Neu and Lawrence 2014)

III.1.2.2 Ciblage enzymatique

Les enzymes hydrolytiques, qui sont capables de dégrader spécifiquement certains composants de la matrice des biofilms, constituent un outil stratégique pour la caractérisation des exopolymères. Appliquées sur des agrégats en formation ou déjà établis, elles permettent de faire des attaques ciblées des SEP en présence, d'identifier leur famille biochimique et d'appréhender leur rôle dans le développement et le maintien de biofilms.

Ainsi, Caudan et al. (2014) ont récemment incubé des granules aérobies en présence d' α -amylase, d'une protéase (Savinase[®]) et d'EDTA afin d'évaluer la nature biochimique et les interactions entre les SEP susceptibles de contribuer à leurs propriétés cohésives et structurales. Le traitement à l' α -amylase a engendré le relargage de macro-particules tandis que le traitement à la Savinase[®] a

libéré des micro-particules. Ces observations ont permis de conclure que les composés $\alpha(1-4)$ glucanes et les protéines étaient les polymères clés impliqués dans la cohésion des granules.

L'utilisation d'endonucléases comme la DNase a permis la mise en évidence de la présence et du rôle de l'ADN extracellulaire au sein de biofilms (Whitchurch et al. 2002; Gloag et al. 2013; Jakubovics et al. 2013; Tang et al. 2013; Okshevsky et al. 2015). Nguyen et Burrows ont montré que l'ajout de DNase pendant la formation du biofilm de *Listeria monocytogenes* réduit l'attachement aux surfaces en polystyrène, et le traitement de biofilms établis de 72h a provoqué la dispersion quasi-complète du biofilm (<25% de biofilm résiduel). L'application de la protéinase K, une protéase à sérine, a inhibé complètement la formation de biofilm et entraîné également la dispersion complète d'un biofilm établi. Les résultats obtenus ont indiqué que les exoprotéines et l'ADN extracellulaire sont nécessaires pour le développement et le maintien des biofilms de *Listeria monocytogenes* (Nguyen and Burrows 2014). Par ailleurs, la DNase I inhibe la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* et non pas celui de *Staphylococcus epidermidis* (Izano et al. 2008), montrant ainsi que la composition en SEP varie selon les souches ou les espèces, mais également selon les conditions de croissance.

L'action de protéases a démontré un effet sur différents biofilms mono-espèces, notamment de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* ou encore de *Bacillus cereus*, mais également de biofilms complexes (Marcato-Romain et al. 2012). A chaque fois, une complète dispersion a été observée sans provoquer une lyse cellulaire. Cela confirme le rôle des protéines dans l'étape d'adhésion (Lequette et al. 2010; Kumar Shukla and Rao 2013).

III.1.2.3 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infra-rouge permet de déterminer la présence de groupements fonctionnels au sein de molécules. En effet, dans les molécules, les liaisons vibrent à une fréquence bien déterminée qui dépend des atomes de la liaison mais aussi de l'environnement de la liaison. Pour une fréquence donnée, ces liaisons rentrent en résonance : l'énergie apportée est alors consommée, et les variations de transmission d'énergie peuvent être suivies.

Depuis son application à la microbiologie par D. C White (Université de Knoxville), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode Réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) a permis d'établir des empreintes spectrales de nombreux isolats bactériens. Contrairement à la FTIR en mode transmission, le mode ATR permet l'analyse *in situ*, non-destructive et en temps

réel des biofilms puisqu'il est désormais possible de traiter directement les échantillons sur leur support d'origine, telle qu'une membrane de nanofiltration (Schmitt and Flemming 1998).

Houari et al. (2013) ont notamment combiné l'ATR-FTIR avec la microscopie confocale pour suivre les changements des signaux liés à la bande AMIDE I et II, respectivement situés à 1650 et 1550 cm^{-1} ainsi que la zone correspondant aux polysaccharides (1040 cm^{-1}) pendant le développement de biofilms formés sur membrane de nanofiltration pendant plusieurs jours (FIGURE A-52). Une variation dans la diversité des polysaccharides a été détectée au cours du développement des biofilms, et les signaux d'absorption mesurés augmentaient avec le biovolume (déterminé par microscopie confocale) au cours du temps : l'ATR-FTIR a permis ainsi une approche qualitative mais également semi-quantitative des composants des biofilms.

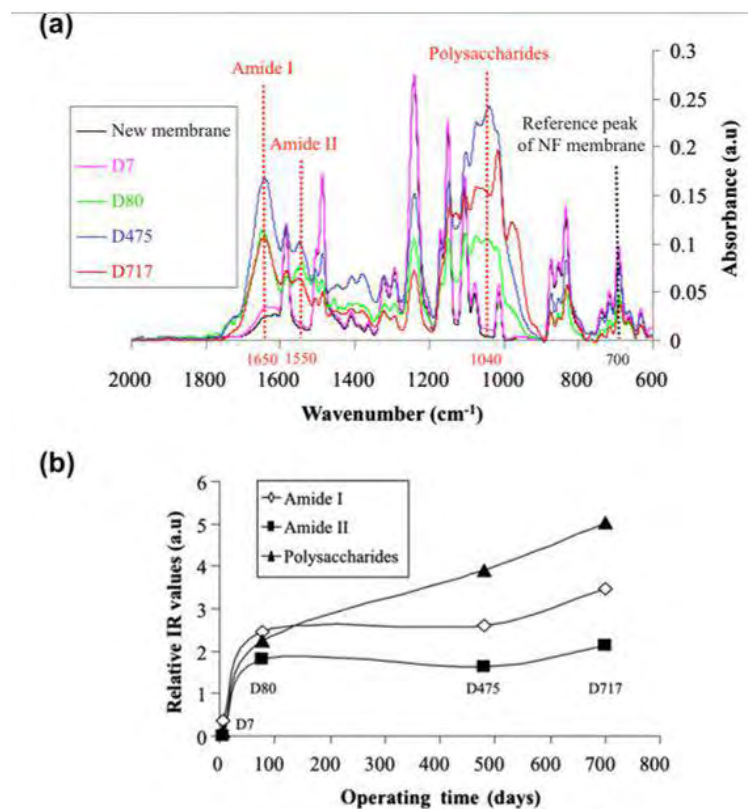


FIGURE A-52. Suivi par ATR-FTIR de l'évolution des composants de biofilms formés sur une membrane de nanofiltration pendant 7, 80, 475 et 717 jours. (A) Moyenne de 15 spectres mesurés à différents endroits de chaque membrane. (B) Evolution semi-quantitative des composés des biofilms au cours du temps. (Houari et al. 2013)

Quilès et al. (2010) ont également utilisé l'ATR-FTIR pour établir des empreintes de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* entre la transition de l'état planctonique à la phase initiale d'adhésion et de formation des biofilms et identifier les SEP impliquées dans ce processus.

Par ailleurs, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) s'est également révélée très utile pour l'identification des fibres amyloïdes. En effet, une comparaison entre les spectres IR de protéines globulaires possédant des feuillets β et des structures amyloïdes a montré respectivement l'apparition, dans la bande AMIDE I, d'un maximum d'absorbance à 1630-1643 cm^{-1} et un shift de ce maximum à 1611-1630 cm^{-1} . Cette caractéristique particulière est due à la présence de liaisons hydrogènes remarquablement stables dans les structures amyloïdes (Zandomeneghi et al. 2004). La

FIGURE A-53 illustre cette comparaison dans le cas de la transthyréline (TTR). Il s'agit d'une protéine naturellement « β -plissée » et qui présente une forte propension à former des dépôts amyloïdes.

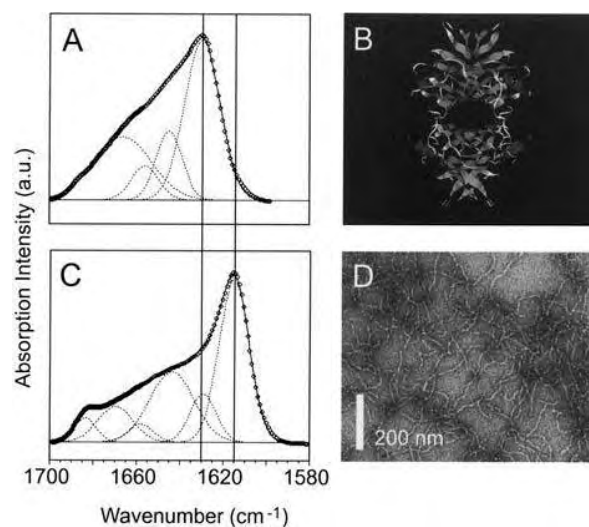


FIGURE A-53. Analyse des régions AMIDE I' de la transthyréline native et fibrillaire par FTIR. Les données infrarouges obtenues expérimentalement sont représentées sur les courbes par des losanges pour la transthyréline native (A) et fibrillaire (C). La somme des composantes individuelles de la courbe de régression (en pointillés) coïncident parfaitement avec les données expérimentales. (B) Représentation en ruban de la TTR native (hélices en gris foncé, feuillets β en gris clair et boucles α en blanc). (D) Image observée en microscopie électronique des fibres de TTR. (Zandomeneghi et al. 2004)

III.1.3. Analyse des propriétés physico-chimiques

III.1.2.1 Analyses chromatographiques

Les techniques chromatographiques sont largement utilisées, d'une part pour fractionner les différentes SEP selon leurs propriétés chimiques, et d'autre part, pour permettre une approche qualitative. Les SEP obtenues après extraction (**page 110**) sont le plus souvent sous-forme liquide

puis reprises dans un solvant adapté, ce qui permet par la suite une analyse par chromatographie liquide. La technique chromatographique peut reposer sur différents types de séparations, notamment par la taille des macromolécules dans le cas de la chromatographie haute performance par exclusion de taille (HPSEC) (Garnier et al. 2005; Ras et al. 2013), mais également par échange d'anions dans le cas de la chromatographie ionique avec détecteur par ampérométrie pulsée (HPAEC-PAD) (Talaga et al. 2002; Kives et al. 2006) ou UV (Caudan et al. 2012). Cette dernière technique est basée sur un échange d'ions sur résine et permet la séparation des acides carboxyliques, des sucres et des ions inorganiques pour la caractérisation notamment des polysaccharides de la matrice. La HPSEC, quant à elle, a permis de caractériser la distribution en taille des protéines au sein d'agrégats biologiques (Ras et al. 2011) lorsqu'elle est couplée à une détection UV à une longueur d'onde de 280nm ou une détection fluorimétrique (Bourven et al. 2012). Cette dernière peut également permettre l'analyse de la distribution en taille des polysaccharides lorsqu'elle est couplée à une détection réfractométrique (Denkhaus et al. 2007). De nombreuses études ont été développées afin d'optimiser l'analyse par HPSEC des SEP, notamment en proposant une détection fluorimétrique plus spécifique des protéines (Bhatia et al. 2013; Bourven et al. 2014) mais aussi en sélectionnant les meilleures conditions de séparation selon la force ionique et la polarité de la phase mobile (Simon et al. 2009; Villain et al. 2010).

La chromatographie liquide peut aussi être couplée à la spectrométrie de masse par électro-nébulisation (HLPC-ESI-MS); cette technique a permis d'identifier les enzymes capables de dégrader le PNAG, principal composant polysaccharidique des biofilms de *Staphylococcus epidermidis* (Gökçen et al. 2013).

Denkhaus et al. (2007) ont réalisé une étude comparative assez exhaustive des différentes méthodes de caractérisation des biofilms, incluant les techniques chromatographiques les plus utilisées. Les techniques de chromatographies en phase gazeuse (GC-MS, GC-MS-MS) sont également couramment utilisées pour établir le profil en monosaccharides des sucres, mais également en acide aminés des protéines après une étape préalable d'hydrolyse (Sheng et al. 2010). Garnier et al. (2005) ont proposé une combinaison de la HPSEC à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) afin d'établir simultanément une distribution en taille et une identification des familles de molécules (polysaccharides, protéines, lipides,...) présentes dans les boues activées.

III.1.2.2 Etude des propriétés rhéologiques et mesures de cohésion

Puisque la force de cohésion d'un biofilm est un facteur déterminant dans la transition entre son détachement et son développement, il est important de pouvoir la quantifier, la prédire et la modéliser. L'AFM peut être un outil intéressant pour mesurer *in situ* les forces, et donc les niveaux d'énergie qui assurent la cohésion des biofilms. Ahimou et al. (2007b) ont trouvé que l'énergie de cohésion d'un biofilm multi-espèces issu d'une station de traitement de l'eau, était reliée à la profondeur du biofilm étudié. Cette énergie augmentait également suite à l'ajout de calcium (10 mM) dans le milieu de culture. L'AFM a également permis de mesurer le taux de cisaillement nécessaire (100 kPa) pour provoquer le détachement des clusters de biofilms formés sur des coupons en verre (réseau d'eau potable) pendant 4, 8 et 12 semaines (Abe et al. 2012).

Par ailleurs, un viscosimètre plan-plan peut aussi être utilisé pour mesurer *in situ* les propriétés rhéologiques de biofilms. (Pavlovsky et al. 2013) ont par exemple mesuré la visco-élasticité d'un biofilm de *Staphylococcus epidermidis* développé dans un bioréacteur alimenté en continu et connecté au viscosimètre. Ces auteurs ont montré que la concentration en NaCl ou des températures extrêmes (5 à 60°C) modifiaient les propriétés viscoélastiques du biofilm, en mesurant ses modules de conservation (G') et de perte (G'') qui traduisent respectivement la capacité du biofilm à stocker de l'énergie et son élasticité, et la dissipation de l'énergie et sa viscosité. Dans les conditions de cette étude, les biofilms de *S. epidermidis* étaient considérés comme des matériaux rhéologiquement complexes qui peuvent être caractérisés par un module visqueux faible (-10 Pa), un temps de relaxation faible (10^{-3} secondes) et un seuil élastique de 20 Pa.

A une autre échelle, la cohésion et les propriétés rhéologiques peuvent être évaluées par mesure de la convection d'un fluide à travers un biofilm formé sur une membrane de filtration. Cela peut par exemple permettre de déterminer dans quelle mesure la présence de matrice extracellulaire gouverne les propriétés physiques (perméabilité, cohésion) du biofilm. C'est le cas de l'étude de Izano et al. (2009) qui ont pu montrer par mesure de la perméabilité que les adhésines protéiques et l'ADN extracellulaire contribuaient à la cohésion de biofilms de *Haemophilus influenzae*.

III.2. Approches quantitatives

La quantification des SEP, et plus particulièrement des protéines, des sucres et de l'ADN, est généralement réalisée par dosages biochimiques *ex situ*, après extraction. Une telle analyse permet alors d'apprécier des ratios protéines/polysaccharides par exemple (Caudan et al. 2012), ou encore d'établir une corrélation entre la quantité d'un exopolymère et son rôle dans le développement du biofilm (Tang et al. 2013). Cette approche de quantification *ex situ* a été particulièrement développée en se basant sur l'étude d'agrégats de l'épuration (flocs, granules, biofilms) ou de biofilms environnementaux, disponibles en quantité non limitante.

III.2.1 Quantification *ex situ*

III.2.1.1 Extractions des SEP

- Extractions globales des SEP

Les polymères qui constituent la matrice sont en interactions intermoléculaires dont la stabilité est assurée par des liaisons ioniques et électrostatiques, des ponts hydrogènes, des interactions hydrophobes et les forces de Van der Waals (Flemming 2011; Pierre Lembre 2012). Des méthodes adaptées doivent alors être employées pour cibler et rompre ces interactions cellules-SEP et SEP-SEP et la littérature a rapporté un panel considérable de traitements physiques, chimiques ou enzymatiques (Sheng et al. 2010; Pellicer-Nàcher et al. 2013). Les SEP faiblement liées et les SEP solubles peuvent être par exemple libérées par centrifugation et ultrasonication tandis que les SEP fortement liées nécessitent des méthodes chimiques plus drastiques pour les dissocier des cellules. Par exemple, les SEP liées par des ponts calcium pourront être relarguées par l'ajout d'EDTA, par l'utilisation de résine échangeuse de cations (CER) ou encore par l'ajout de formaldéhyde et/ou de NaOH (Ras et al. 2008a; Liang et al. 2010; Pan et al. 2010). C'est la raison pour laquelle différentes procédures d'extractions séquentielles, comprenant des étapes de traitement physique et chimique, ont été développées sur des agrégats variés (TABLEAU A-6). Ainsi, Comte et al. (2007) ont montré que la combinaison de méthodes peut augmenter le rendement d'extraction d'un facteur 4. De plus, connaissant la sélectivité de certaines méthodes d'extraction par rapport à la nature des SEP, une stratégie combinatoire peut également augmenter la diversité des SEP représentatives de l'échantillon.

Toutes ces méthodes ont été développées afin d'extraire les substances exopolymériques de la façon la plus exhaustive possible, en tenant compte de différents paramètres tels que :

- La nature même du système biologique, que ce soient des granules, des floccs, des biofilms adhérents à une surface, des macro-colonies ou des boues activées ;
- La variabilité des SEP produites selon les espèces productrices (Flemming 2011)
- La variabilité des SEP produites selon les conditions environnementales (pH, température, milieu naturel ou contrôlé, nutriments, etc).
- L'obtention d'un bon compromis entre un haut rendement d'extraction des SEP et un faible taux de lyse cellulaire, qui doit être vérifié.
- La technique analytique utilisée ultérieurement (contraintes d'utilisation, interférences).

TABLEAU A-6. Exemples de méthodes d'extraction (seules ou séquentielles) et principaux résultats obtenus

Références	Agrégat	Traitement physique	Traitement chimique	Conclusion
Comte et al. 2007	Boues activées			<ul style="list-style-type: none"> - Traitements chimiques affectent les résultats HPSEC - Traitements physiques influencent la distribution de taille
D'Abzac et al., 2009	Granules anaérobies	Ultra-sons Température CER CER + Ultra-sons	EDTA Ethanol Formaldéhyde NaOH	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de lyse cellulaire pour toutes les méthodes - Traitements chimiques : meilleur rendement d'extraction des SEP. - Composition en SEP, dans chaque famille biochimique varie selon la nature de l'agrégat et de la technique d'extraction - CER → meilleure rendement en protéines
Chen et al. 2013	Boues et biofilm	CER Ultra-sons Température « Steaming »		<ul style="list-style-type: none"> - CER : technique la plus efficace et adaptée parmi les 4 techniques - CER → faible lyse cellulaire - ePN > ePS > acide humiques
Liang et al. 2010	Biofilms autotrophes nitrifiants	Ultra-sons CER	EDTA NaOH	<ul style="list-style-type: none"> - US et EDTA plus efficaces - US et NaOH génèrent de la lyse cellulaire - $4 < ePN/ePS < 7$
Marcato-Romain et al., 2012	Biofilm papetier modèle	Ultra-sons (US)	Tween EDTA	<ul style="list-style-type: none"> - ePN > ePS : $1,3 < \text{ratio } ePN/ePS < 8,6$ - ePN retrouvée dans les extraits US et EDTA - TWEEN : < 30% des protéines
Pan et al., 2010	Biofilm de rivière (algues et bactéries)	Centrifugation Ultra-sons	EDTA Formaldéhyde Formaldéhyde + NaOH	<ul style="list-style-type: none"> - Prétraitement US double le rendement d'extraction des SEP - Traitements chimiques : faible teneur en ePN

Pierre et al., 2012	Biofilm microphytobenthique	Résines échangeuses d'ions Ultra-sons	Eau de mer	<ul style="list-style-type: none"> - 3 fractions principales : SEP colloïdales, SEP liées, SEP résiduelles. - SEP colloïdales et liées : très faibles teneur en protéines et composés sulfatés - SEP résiduelles : Composés sulfatés détectés - Composition variable en ePS dans chaque fraction.
Ras et al., 2011	Biofilms	Ultra-sons (US)	Tween EDTA	<ul style="list-style-type: none"> - Tween et US donnent la plus grande diversité de taille des SEP - La diversité de taille des SEP dépend des fonctions métaboliques du biofilm - Des SEP hydrophobes semblent être associés à la stabilité mécanique du biofilm
Takahashi et al., 2009	Biofilms de diatomées benthiques	Résines échangeuses d'ions	Eau de mer artificielle Eau distillée	<ul style="list-style-type: none"> - 5 techniques d'extraction comparées, pas de lyse cellulaire - Résine échangeuse d'ions : meilleur rendement , SEP extraits riches en sucres « désoxydés ».
Singh et al., 2011	Biofilm fongique	Vortex (eau)		<ul style="list-style-type: none"> - Pas de lyse cellulaire (G6PDH) - Extraits composés d'aminosucres (~hexosamine 95%, N-acétyl-hexosamine 5%) - Présence d'aminosucres interfère avec le dosage au phénol-acide sulfurique.
Sun 2012	Flocs de <i>Bacillus megaterium</i>	Température Ultra-sons (US)	EDTA Formaldéhyde+NaOH H ₂ SO ₄	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité d'extraction basée sur le rendement d'extraction des SEP, la dégradation des SEP et la lyse cellulaire. Dans l'ordre les 5 méthodes : EDTA > Formaldéhyde-NaOH > Chauffage > US > H₂SO₄ > control

D'autres études se sont attachées au contraire à isoler de façon plus spécifique une famille biochimique : polysaccharides, ADN ou protéines dont les fibres amyloïdes (FIGURE A-56). Ces extractions spécifiques permettent en effet d'aller jusqu'à l'étude structurale de polymères particuliers et jusqu'à la compréhension de mécanismes de formation et de cohésion des agrégats, et en particulier des biofilms.

II.2.2.1 Extractions spécifiques

a. Exoprotéines

Lorsque l'étude de la matrice se focalise sur une approche protéomique, une étape de purification des protéines extraites par une procédure générale est mise en œuvre. Il s'agit en général d'une précipitation au moyen d'éthanol absolu (Toyofuku et al. 2012) ou d'acide trichloroacétique (Oosthuizen et al. 2002) qui peut s'accompagner d'une élimination des résidus glycosidiques par l'ajout de phénol ou de rinçages à l'éthanol à 70%. Les extraits purifiés peuvent être ensuite analysés par différentes techniques telles que le western-blot, la chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) ou encore l'électrophorèse.

b. Fibres amyloïdes

Les fibres amyloïdes représentent une fraction des protéines extracellulaires qui suscitent un engouement grandissant dans les récentes études sur les biofilms (Larsen et al. 2007; Romero et al. 2010; Chai et al. 2013). Cependant, elles montrent une exceptionnelle stabilité (Claessen et al. 2003; Nilsson 2004; Sawyer et al. 2012; Blanco et al. 2012) face aux facteurs environnementaux tels que la chaleur, les pH extrêmes, mais aussi les digestions enzymatiques ou encore les agents dénaturants les plus couramment utilisés en biochimie. De ce fait, leur extraction, qui nécessite souvent une dépolymérisation, doit passer par des traitements drastiques tel que l'utilisation de l'acide formique fortement concentré (90-100%), d'une mise à ébullition en présence de SDS pour dénaturer toutes les autres protéines suivie d'une extraction à l'acide trifluoroacétique (TFA) (Claessen et al. 2003; Dueholm et al. 2013b).

A noter que la protéine TasA, retrouvée chez les espèces de *Bacillus*, semble nécessiter une extraction par précipitation au sulfate d'ammonium. La protéine FapC, résistante à un certain nombre de dénaturants, et isolée pour la première fois chez *Pseudomonas fluorescens* (Dueholm

et al. 2013b), est extraite à la suite de digestions enzymatiques successives (Ribonucléase, Désoxyribonucléase, lysozyme).

Les fibres amyloïdes extraites doivent ensuite être dépolymérisées par l'acide formique pour être analysées par électrophorèse. En effet, lorsqu'elles sont dans leur état polymérisé, des fibres telles que les curli, Tafi et FapC ne sont pas solubilisées par le SDS et, par conséquent, ne migrent pas à travers le gel de polyacrylamide lors d'une électrophorèse. Elles restent au-dessus du gel tandis que les autres protéines contaminantes continuent leur migration, ce qui constitue aussi un moyen pour les isoler.

Il est important de souligner que l'extraction des fibres amyloïdes s'accompagne le plus souvent d'une rupture de la paroi bactérienne (lysozyme, congélation-décongélation, sonication) puisque celles-ci sont ancrées de manière forte aux cellules qui les produisent à la suite d'un mécanisme de polymérisation linéaire depuis leur surface.

c. ADNe

L'étude *in vitro* de l'ADNe se heurte à la problématique de la contamination des fractions par l'ADN génomique libéré à la suite de la lyse cellulaire qui se produit le plus souvent aux étapes d'extraction. Wu et al. ont cherché à comparer différentes méthodes d'extraction des SEP afin d'obtenir la fraction la plus pure en ADNe à partir de différents biofilms de *Acinetobacter sp* (TABLEAU A-7). L'ADN extrait a été analysé par spectrophotométrie (Nanodrop) et le ratio d'absorbance A_{260nm}/A_{280nm} a permis d'évaluer la pureté de l'extrait. Le taux de lyse de chaque étape a été estimé par mesure de l'activité de la G6PDH et par observation en microscopie (kit de viabilité LIVE/DEAD[®], Invitrogen). Les résultats ont montré que le SDS et la soude induisaient une forte lyse cellulaire et que les traitements enzymatiques (pas de lyse cellulaire) s'avéraient être la meilleure méthode pour extraire l'ADN extracellulaire, en multipliant jusqu'à 60 fois la quantité d'ADN extrait par rapport au contrôle. Afin de tester et d'optimiser cette extraction enzymatique de l'ADNe, des biofilms de *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E.coli* ont été traités dans les mêmes conditions. L'utilisation en séquence de la N-glycanase puis de la Protéinase K a permis d'extraire le plus d'ADN pour ces trois biofilms, tandis que pour *Acinetobacter baylyi*, l'extraction était optimale avec la séquence Dispersine B + Protéinase K. Les quantités d'ADN extraites étaient les plus importantes chez *A. baylyi*, puis *S. aureus*, *E.coli* et enfin *P. aeruginosa* (Wu and Xi 2009).

TABLEAU A-7. Liste des extractants et leurs propriétés et fonctions pour sélectionner la méthode d'extraction de l'ADNe la plus efficace au sein des biofilms. (Wu and Xi 2009)

Extractant	Propriétés	Fonctions
CER 1%	Echange d'ions	Élimination des cations
EDTA 2%	Agent chélatant	Séquestration les ions métalliques di- et trivalents
SDS, 0,01%	Surfactant anionique	Dénaturation des protéines
NaOH, pH11	Base forte, pH fortement alcalin	Ionisation des groupements chargés des protéines et polysaccharides
N-Glycanase 10µg/ml	Peptide N ⁴ -(acétyl-β-glucosaminy)- asparagine amidase	Libération de groupements glycanes N-liés issus des glycopeptides, et des glycoprotéines
Dispersin B 20µg/ml	Glycosyl-hydrolase	Hydrolyse des groupements N-acétylglucosamine β-substitués
Protéinase K 5µg/ml	Dégradation des protéines	Sérine-protéase (famille des subtilisines) non spécifique avec un large spectre d'activité.

d. Exopolysaccharides

Kives et al. (2006) ont utilisé deux méthodes de digestion pour optimiser l'isolement et l'analyse des polysaccharides des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* B52. Les biofilms formés sur des plaques en verre ou en acier inoxydable ont tout d'abord été grattés puis remis en suspension dans de l'eau physiologique (NaCl 0,9%), puis les suspensions ont été homogénéisées à l'aide d'un blender avant d'être centrifugées. Les surnageants ont ensuite été dialysés contre un volume d'eau. Par la suite, l'analyse de la fraction polysaccharidique est effectuée par deux méthodes de digestion avant une chromatographie haute performance d'anions (HPAEC-PAD). La première méthode consistait à ajouter de l'acide trifluoroacétique 10N (TFA) à l'échantillon et laisser digérer 2h à 121°C. Le TFA est ensuite mis à évaporation sous azote et les résidus secs sont repris dans de l'eau bidistillée. Cette méthode s'est avérée efficace pour libérer les sucres aminés dans une précédente étude (Talaga et al. 2002) des polysaccharides capsulaires de *Streptococcus pneumoniae*. La deuxième méthode consistait à entraîner une méthanolyse de la fraction (Méthanol anhydre + HCl 2N) durant 24h à 80°C avant de digérer le résidu préalablement séché dans du TFA durant 2h à 121°C, puis le reprendre dans de l'eau bidistillée. Deux types de colonnes différentes ont alors été utilisés pour séparer d'une part, les sucres neutres et les aminosucres à la suite d'une détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD), et d'autre part les acides uroniques avec une détection de la conductivité. Le rendement de digestion du matériel analysable a atteint 90% de la matière sèche. Les monomères majoritaires extraits sont le glucose, le ribose, le rhamnose et le glucosamine. La méthode de digestion 2, plus agressive que la méthode 1, a permis de libérer deux fois plus d'acides uroniques, notamment une forte majorité d'acide glucuronique, guluronique et peu d'acide mannuronique.

Une autre méthode de purification des sucres consiste à traiter les biofilms avec une solution d'EDTA (1,5%, 5°C, 3h) puis à appliquer une dialyse contre de l'eau et à précipiter les protéines par ajustement de pH et ajout de TCA 20%. Avec cette méthode, 97% des protéines ont pu être éliminées de l'extrait final. C'est la procédure proposée par Oliveira et al. (1999) pour doser les polysaccharides de biofilms de *Pseudomonas fluorescens* par la méthode phénol-acide sulfurique (DuBois et al. 1956).

Maina et al. (2008) ont proposé une méthode d'extraction des exopolysaccharides, composés en majorité de dextrane, chez les bactéries lactiques *Leuconostoc citreum* E497, *Leuconostoc mesenteroides* B512F et *Weissella confusa* E392 afin de les analyser par spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) et par chromatographie gazeuse. Cette méthode consistait à collecter les colonies formées sur une gélose MRS supplémentée par 2% de saccharose, à les remettre en suspension dans du PBS et réaliser deux séries de centrifugation-décantation avant une précipitation des polysaccharides à l'éthanol pendant 48h. Le culot était ensuite déshydraté (SpeedVac) avant d'être pré-traité pour la chromatographie gazeuse ou la RMN. Cette dernière technique a permis de déterminer la composition en monosaccharides des trois souches et d'observer que la souche *W.confusa* E392 était celle qui produisait le plus de dextrane, dont la structure était plus linéaire que celui des deux autres souches.

III.2.2 Dosages des SEP

Les méthodes de quantification des protéines totales comprennent des méthodes traditionnelles telles que la mesure d'absorbance à 280 nm, la méthode utilisant l'acide Bicinchoninique (BCA) et la méthode de Bradford, de même que les méthodes alternatives telles que la méthode de Lowry ou de nouvelles techniques développées par les différents fournisseurs. Généralement les distributeurs fournissent des kits conçus pour des applications en spectroscopie de fluorescence connues pour leur meilleure sensibilité par rapport aux méthodes traditionnelles.

II.2.2.2 Dosage des exoprotéines totales

a. Dosages spectrophotométriques de référence

Le TABLEAU A-8 regroupe l'ensemble des techniques de dosage des protéines totales communément utilisées. Il est essentiel d'évaluer la compatibilité de chaque méthode avec le type d'échantillon étudié, les solvants, les limites de dosage ainsi que le volume d'échantillon.

La mesure d'absorbance à 280 nm est la méthode la plus rapide mais peut être sujette à l'erreur. Les acides aminés aromatiques tyrosine, tryptophane et la phénylalanine donnent aux protéines la capacité d'absorber dans l'ultraviolet à 280 nm, propriété qui est généralement utilisée pour estimer la concentration en protéines. Cette méthode est simple et ne requiert qu'un très petit volume d'échantillons. Cependant, l'échantillon de protéines doit être pur et ne doit pas contenir de composants non protéiques présentant le même spectre d'absorbance, tels que les acides nucléiques.

La méthode au BCA et la méthode de Lowry sont toutes les deux basées sur la conversion des ions Cu^{2+} en Cu^+ à pH alcalin. Cette conversion est appelée réaction de Biuret. Pour la méthode au BCA, la quantité de Cu^{2+} réduite est proportionnelle à la concentration en protéines et est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre par coloration de l'échantillon en violet, qui absorbe à 562 nm. L'absorbance est directement proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution et peut être estimée par comparaison avec une protéine standard telle que l'albumine bovine sérique (BSA). Cette méthode est plus tolérante à une gamme de détergents ioniques et non-ioniques tels que le Triton X-100 et aux agents dénaturants tels que l'urée, qui ont tendance à interférer avec d'autres méthodes de quantification de protéines colorimétriques telle que la méthode de Lowry.

La méthode de Bradford (Bradford 1976) est une des méthodes les plus connues pour déterminer la concentration de protéines. Elle dépend de la formation d'un complexe entre le bleu de Coomassie G-250 et les protéines en solution. Le colorant existe sous quatre formes ioniques ; la forme la plus anionique bleue se lie aux protéines et présente une absorbance à 590 nm. La concentration de protéines peut être évaluée en mesurant la quantité de la forme bleue ionique du colorant et en mesurant l'absorbance de la solution à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le colorant se lie surtout aux résidus arginine, tryptophane, tyrosine, histidine, et phénylalanine des protéines. La BSA est souvent utilisée comme protéine standard car elle est peu coûteuse et facilement disponible mais n'est pas toujours adaptée. Celle-ci présente une forte réponse au colorant qui peut entraîner une sous-estimation de la quantité de protéines. L'immunoglobuline G (IgG) ou le lysozyme, ou d'autres protéines standards peuvent être choisies en fonction du type d'échantillon de protéines.

Les autres méthodes de dosage présentent également des variabilités de réponse inter-protéines si bien qu'il est judicieux de choisir la protéine ayant la structure la plus proche de l'échantillon à doser, si celle-ci est connue.

Au-delà des avantages et des inconvénients que présentent ces dosages, ils ont longtemps été utilisés pour le dosage des protéines suite à leur extraction au sein de biofilms, notamment, les méthodes de Lowry (Waterborg and Matthews 1984; Ahimou et al. 2007a), de Bradford (Hammond and Kruger 1988; Bridier et al. 2011) ou celle de l'acide bicinchoninique (Walker 1994; Ras et al. 2008b; Lequette et al. 2010) sont les plus couramment utilisées pour estimer la teneur en protéines des extraits de biofilms (Berges et al. 1993; Sheng et al. 2010; Pellicer-Nàcher et al. 2013). La mesure de l'absorbance à 280 nm est quant à elle utilisée pour estimer la concentration en protéine sur des extraits purs et dont le coefficient d'extinction molaire est connu (Thorn et al. 2005).

TABLEAU A-8. Méthodes spectrophotométriques de dosage des protéines totales en milieux aqueux. (Johnson 2015)

Méthode	Détection	Mécanisme	Gamme de linéarité	Avantages	Limites
Absorption UV	280 nm	Absorption tyrosine et tryptophane	0.1-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Petit volume Rapide Peu coûteux	Incompatible avec les détergents et les agents dénaturants, très variable
Acide Bicinchoninique (BCA)	562 nm	Réduction du cuivre (Cu^{2+} Cu^+), réaction du BCA avec Cu^+	20-2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Compatible avec les détergents et agents dénaturants, faible variabilité	Incompatible avec les agents réducteurs
Bradford ou bleu de Coomassie	470 nm	Formation d'un complexe entre le bleu de Coomassie et les protéines	20-2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Compatible avec les agents réducteurs, rapide	Incompatible avec les détergents
Lowry	750 nm	Réduction du cuivre par les protéines, réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par le complexe cuivre-protéines	10-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Très sensible et précis	Incompatible avec les détergents et agents réducteur, procédure longue

b. Marqueurs fluorescents destinés à la quantification des protéines en solutions

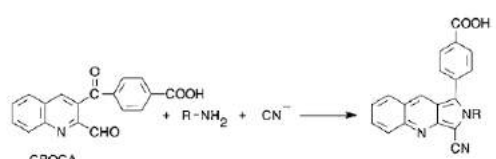
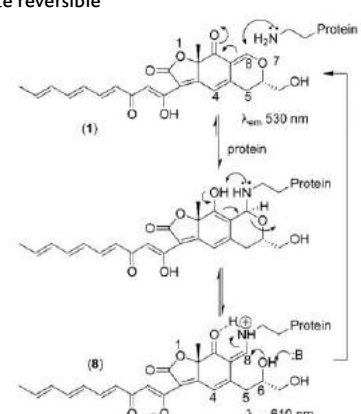
La plupart des méthodes spectrophotométriques classiques présentent des incompatibilités avec des agents réducteurs (DTT), des agents dénaturants (urée, ...) ou encore des chélateurs d'ions (EDTA). Ainsi, des méthodes basées sur la fluorescence de marqueurs spécifiques des protéines ont démontré une meilleure sensibilité et un bruit de fond plus faible que les méthodes sus-citées.

Le TABLEAU A- 9 présente quatre des méthodes de dosage des protéines qui ont des applications dans l'étude des biofilms. Parmi ces méthodes, des composés amino-réactifs comme la fluorescamine (Chung 1997), la 3-(4-carboxybenzoyl)-quinoline-2-carboxaldéhyde (CBCQA) ou

encore l'*o*-phthalaldéhyde (OPA) ont été utilisés pour marquer spécifiquement les protéines en milieu aqueux (Mackintosh et al. 2005).

Cependant, ces méthodes présentent l'inconvénient d'être incompatibles avec tous les tampons contenant des groupements aminés (tampon TRIS ou Glycine). Par ailleurs, un composé naturel, isolé du champignon *Epicoccum nigrum* (Bell and Karuso 2003), constitue la molécule pro-fluorescente du kit FluoroProfile® développé pour quantifier également les protéines en solution (Mackintosh et al. 2005). L'épicocconone est une molécule amino-réactive, de la famille des azaphilones, qui ne fluoresce qu'en présence de protéine et semble être le seul fluorophore qui présente un nombre d'interférents limité, qui est l'EDTA, par rapport aux autres méthodes. Ce composé se lie aux protéines et particulièrement aux amines primaires par une liaison covalente réversible, si bien qu'il est compatible à une analyse par spectrométrie de masse. En effet, son mécanisme de fixation aux amines vient de son noyau dihydropyranique qui conduit à la formation d'une énamine hautement fluorescente suivant une ouverture réversible. L'équipe de Bell et Karuso a également démontré que cette molécule n'était pas toxique pour les cellules contrairement aux autres membres de la famille des azaphilones (FIGURE A-47**Error! Reference source not found.**). Enfin, parmi les différentes méthodes fluorescentes décrites, le kit FluoroProfile® est celui qui présente la plus large gamme de linéarité avec une sensibilité correcte (40 ng.mL^{-1}) (Mackintosh et al. 2005).

TABLEAU A- 9 Synthèse des principales méthodes de quantification des protéines en solution utilisant des fluorochromes (compatible en microplaque)

Marqueurs	Mode de liaison	Gamme de linéarité	Avantages	Limites et Interférences	Référence
Fluorophores se liant directement aux détergents associés aux protéines/ Intrinsèquement non-fluorescents					
NanoOrange™	Non covalente Se fixe sur les protéines en présence de détergents	0.01-10 µg.mL ⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> Détecte les protéines de très petite taille (aprotinine, insuline) et les peptides Compatibilité : sels, solvants, β-mercaptoéthanol, acides aminés et ADN Variation inter-protéines 2-5% 	<ul style="list-style-type: none"> Dénaturation préalable des protéines pour réduire le 90°C pour minimiser les variabilités protéines-protéines Sensible aux détergents et à la présence de sels Incompatible avec les détergents 	(Noble and Bailey 2009) (Jones et al. 2003)
Quant-iT™	Se lie aux détergents associés aux protéines et aux régions hydrophobes	2.5-20 µg.mL ⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> Extrêmement rapide Variation inter-protéine (12%) Compatibilité : sels, β-mercaptoéthanol, acides aminés et ADN 	<ul style="list-style-type: none"> Incompatible avec les détergents 	(Noble and Bailey 2009)
Fluorophores se liant aux acides aminés ou résidus aminés / Intrinsèquement non-fluorescents					
CBQCA™	Amines primaires en présence de thiols ou de groupement cyanure (cyanure de potassium, KCN) 	0.01-150 µg.mL ⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> N'interfère pas avec les détergents ni les lipides Permet la quantification des lipoprotéines. 	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilité dépend de la quantité d'acides aminés accessibles présents ; dépend du pH Incompatible avec les tampons contenant des amines primaires ou des dérivés thiols (TRIS ou glycine) ions ammonium, ni les tampons acides 	(Noble and Bailey 2009) (You et al. 1997)
FluoroProfile®	Réaction avec les amines primaires des protéines, fixation covalente réversible 	0.04-200 µg.mL ⁻¹	<ul style="list-style-type: none"> Pas de traitement préalable Large gamme de linéarité Peu sensible à la lumière blanche N'interfère pas avec l'ADN ni les détergents Variation inter-protéine : 16% Indépendant des modifications post-transcriptionnelles des protéines, ni du degré de O- et N-glycosylation 	<ul style="list-style-type: none"> Sensible à l'EDTA 	(Mackintosh et al. 2005) (Coghlan et al. 2005)

II.2.2.1 Dosage des fibres amyloïdes

A l'inverse des protéines totales, il n'existe pas de solution commerciale pour le dosage des fibres amyloïdes, ni pour l'achat d'une fibre de référence. Par ailleurs, le plus souvent, les fibres amyloïdes extraites sont sous leur forme dépolymérisée après solubilisation avec de l'acide formique. Aussi, la mise en présence de ThT avec l'extrait permet de suivre la cinétique de re-polymérisation en fibres par spectrophotométrie de fluorescence (Dueholm et al. 2011; Romero 2013; Seviour et al. 2015), et les résultats sont exprimés de façon relative, ou en réponse fluorescente (RFU).

De plus, la ThT peut également être envisagée pour la quantification de fibres amyloïdes. Bourhim et al. (2007) ont ainsi développé une méthode de quantification de la fibre impliquée dans la maladie d'Alzheimer et formée à partir du peptide amyloïde β (A β 1–40). Pour ce faire, ils ont optimisé le marquage de la fibre par la ThT en ajustant le volume de base (NaOH) nécessaire à la solubilisation du peptide à la quantité de ce dernier. Cet ajustement a permis d'obtenir une corrélation linéaire entre la fluorescence de la ThT et la quantité initiale de peptide amyloïde A- β . Ce dosage a ensuite été utilisé pour montrer une dépolymérisation possible du peptide amyloïde A- β par la colostrinine, un peptide riche en proline.

II.2.2.2 Dosage des exopolysaccharides

Les exopolysaccharides totaux sont couramment dosés par la méthode de Dubois (Dubois et al. 1956; Lequette et al. 2010; Bridier et al. 2011). Cette méthode est basée sur la transformation des sucres en dérivés du furfural (réaction en milieu acide et à chaud) et sur la combinaison de ce dérivé avec le phénol, donnant ainsi une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxyfurfural).

La méthode à l'Anthrone (Raunkjær et al. 1994; Jahn 1998) est également une technique de dosage de référence pour les polysaccharides. Une récente étude a permis de proposer une modification de cette méthode permettant la quantification simultanée des acides uroniques et des sucres neutres, et ce même en présence de protéines (Rondel et al. 2013).

Par ailleurs, Kilcoyne et al. ont proposé une méthode de dosage basée sur la réaction entre l'acide periodique et le réactif de Schiff (PAS) pour doser en solution et en microplaque des résidus osidiques, des polysaccharides, ou encore des glycoprotéines. La réaction consiste en une

première étape d'oxydation des groupements hydroxyles vicinaux des sucres par l'acide périodique. Cette oxydation conduit à la formation de groupements aldéhydes qui seront ensuite colorés puis révélés par l'ajout du réactif de Schiff (Fuchsine basique). La combinaison du réactif de Schiff avec les groupements aldéhydes donne lieu à la formation d'un composé de couleur rouge-magenta dont l'intensité peut être mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 540nm. (Kilcoyne et al. 2011). La réponse est proportionnelle à la concentration de chaque sucre dosé mais est également variable selon la nature du sucre (FIGURE A-54).

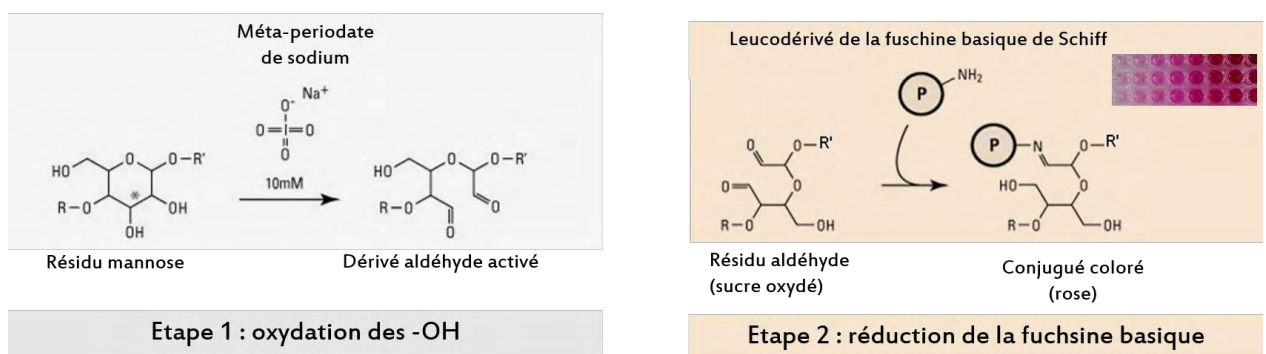


FIGURE A-54. Réaction de Schiff.

II.2.2.3 Dosage de l'ADN extracellulaire

L'ADN présent dans des extraits est classiquement évalué par une double mesure d'absorbance à 260 nm permettant de quantifier les bases azotées, et à 280 nm pour évaluer les interférences dues aux protéines (absorption des UV par les acides aminés aromatiques) (Wu and Xi 2009).

Récemment, plusieurs méthodes commerciales de quantification de l'ADN en solution ont été proposées, utilisant des fluorochromes, tels que le PicoGreen[®], le OliGreen[®] ou encore le Hoechst 33258.

Le PicoGreen[®] a par exemple été utilisé par Allesen-Holm et al. (2006) pour quantifier l'ADN extracellulaire libéré par une culture de *P. aeruginosa*, ou par Lappann et al. (2010) sur des cultures de *Neisseria meningitidis* afin d'étudier le rôle de l'ADN dans la formation de son biofilm.

III.2.3 Evaluation de la viabilité et quantification du biofilm total

III.2.3.1 Lyse cellulaire

Pellicer-Nàcher et al. (2013) ont recensé et critiqué trois méthodes d'évaluation de la lyse cellulaire générée par des procédures d'extraction des SEP : le dosage de l'ADN, le dosage de l'enzyme intracellulaire Glucose-6-phosphate-deshydrogénase (Ras et al. 2008b; Sheng et al. 2010; Caudan et al. 2012) (G6PDH) et le dosage de la 2-céto-3-désoxyoctonate (KDO).

Les études les plus anciennes utilisaient le dosage de l'ADN comme témoin de lyse cellulaire, mais depuis la découverte de la présence non-négligeable d'acides nucléiques extracellulaires (**page 55**) au sein de la matrice, cette méthode a perdu sa légitimité (Pellicer-Nàcher et al. 2013). Le dosage de l'activité de l'enzyme intracellulaire Glucose-6-phosphate-deshydrogénase (G6PDH), jusqu'ici beaucoup utilisé comme témoin de lyse (Ras et al. 2008b; Sheng et al. 2010; Caudan et al. 2012), présente des limites d'utilisation : l'activité de l'enzyme dans les étalons standards tend à diminuer d'au moins 100 fois lorsque le pH est inférieur à 7,5. Il est donc important que tous les échantillons (extraits et étalons) ainsi comparés soient au même pH. Cette méthode se heurte également à la grande variabilité de la quantité initiale de G6PDH au sein d'une cellule selon les conditions de culture et la conservation des échantillons peut entraîner une dégradation partielle des enzymes cellulaires. Toutes ces limitations peuvent ainsi induire une sous-estimation de la lyse si les contrôles ne sont pas effectués (Pellicer-Nàcher et al. 2013).

Le 2-céto-3-désoxyoctonate (KDO) est un lipopolysaccharide présent dans la membrane cellulaire des bactéries Gram-. Son dosage est un moyen de mesurer le taux de lyse à la suite d'un protocole d'extraction adapté aux cultures pures, mais non recommandé pour des systèmes complexes du fait de la présence de débris cellulaires dans le milieu qui peut conduire à une surestimation de la quantité de KDO même chez le contrôle (Adav and Lee 2008).

III.2.3.2 Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules d'un biofilm est classiquement étudiée par dénombrement, le résultat étant exprimé en unités formant colonie (UFC) (Quintas et al. 2014). Cependant, cette méthode demande à ce que le biofilm soit détaché de son support par un moyen mécanique tels que le grattage ou les ultra-sons qui peuvent influencer considérablement sur le résultat. De plus, cette

technique peut conduire à une sous-estimation du nombre de cellules viables en ne permettant pas la culture des cellules en carence ou soumises à un stress. Enfin, cette technique est chronophage et difficilement applicable aux échantillons multi-espèces.

Dans le cadre des études de biofilms *in situ*, le crystal violet a été parfois utilisé pour quantifier la viabilité d'un biofilm. Ainsi, Leriche et al. (2000) ont établi une corrélation entre l'absorbance à 560 nm et le nombre de UFC par cm² pour des biofilms de 10 souches bactériennes formés en microplaque. Cependant, dans la majorité des études, le crystal violet a été utilisé pour marquer le biofilm total (cellules et SEP) et les résultats ont été exprimés de façon relative, en comparaison à un témoin (Haase et al. 2006; Lequette et al. 2010; Marcato-Romain et al. 2012).

Plus récemment, des marqueurs fluorescents ont été utilisés sur des biofilms *in situ*, avec une recherche permanente de l'optimisation des protocoles. Ainsi, des marqueurs fluorescents de l'ADN ont été développés pour différencier les cellules selon l'intégrité de leur membrane : la plupart des marqueurs ne peuvent pas pénétrer dans les cellules intactes mais y entrent passivement et rapidement quand les membranes sont endommagées. La combinaison de fluorochromes de couleurs différentes permet ainsi de différencier les cellules viables ou non. Le kit commercial LIVE/DEAD[®] BacLight repose sur ce principe en combinant le SYTO[®]9 qui fluoresce en vert que les cellules soient intactes ou non (cellules totales) et l'iodure de propidium qui pénètre seulement dans les cellules dont la membrane est endommagée (cellules non viables). Cette méthode a été validée pour l'observation en microscopie, en revanche, elle peut présenter des limites pour une approche quantitative. En effet, comme pour le dénombrement, la quantification passe par un détachement mécanique du biofilm et exige la calibration à partir d'une suspension de concentration spécifique à chaque espèce. Enfin, cette quantification ne peut être conduite que sur une faible gamme de concentrations, et il n'est pas possible d'observer une réduction de viabilité supérieure à 2 log.

Des méthodes basées sur une fonction cellulaire, généralement enzymatique, ont donc été développées. Ces marqueurs ne sont pas toxiques pour les cellules et sont généralement pro-fluorescents : ils ne fluorescent qu'une fois hydrolysés par l'enzyme. Ces propriétés permettent de les ajouter directement sur le biofilm et d'éviter les étapes de détachement mécanique et de rinçage. L'intensité de fluorescence du produit libéré peut alors être corrélée à un nombre de cellules actives, après établissement d'une gamme de calibration, spécifique à chaque espèce.

Parmi les marqueurs les plus fréquemment utilisés, la résazurine a connu une utilisation grandissante ces dernières années. La résazurine (RZ) est réduite par les diaphorases

intracellulaires en un composé intensément fluorescent, la résorufine (FIGURE A-55). Cette dernière est formée au sein de la cellule puis relarguée dans le milieu extracellulaire ; ce qui permet un dosage spectrophotométrique (560-570nm) ou fluorimétrique avec une excitation à 560nm et un maximum d'émission à 590nm.

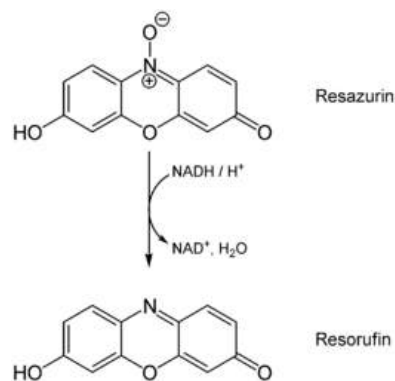


FIGURE A-55 Structure biochimique de la résazurine et de la résorufine

Cette méthode présente elle aussi des limites, essentiellement liées au fait que la réponse est fonction de l'état physiologique des cellules (Sandberg et al. 2009). En revanche, les travaux de (Van den Driessche et al. 2014) ont permis de fortement augmenter la gamme de concentration analysable en proposant un suivi cinétique d'apparition de la fluorescence.

III.2.4 Éléments de conclusion sur les méthodes d'analyse ex situ des SEP

Finalement, il existe autant de procédures d'extraction des SEP développées que de systèmes microbiens et d'objectifs (FIGURE A-56), conduisant à des résultats souvent contradictoires même lorsque des échantillons similaires sont analysés dans les mêmes conditions opératoires. C'est la raison pour laquelle, ces dernières années, plusieurs comparaisons des techniques d'extraction des SEP ont été recensées. La comparaison des teneurs en SEP trouvées dans la littérature est ainsi difficile à effectuer du fait d'une grande variabilité des résultats qui peut être attribuée à plusieurs paramètres :

- les unités d'expression des résultats ne sont pas standardisées : il n'existe pas d'étalon unique et surtout, les quantités de SEP peuvent être exprimées par rapport à une masse humide ou une masse sèche d'échantillon, une masse de carbone organique total, une masse totale de SEP, etc.
- Les extraits obtenus ne sont pas toujours vérifiés en termes de lyse cellulaire et peuvent donc être contaminés par des molécules intracellulaires.

- Les méthodes d'extraction employées sont différentes d'une étude à l'autre.
- L'interférence des techniques d'extraction (en particulier chimiques) envers les méthodes de quantification des SEP, qui n'est pas toujours vérifiée.
- La variabilité des agrégats étudiés (boues, granules, biofilms) et des conditions environnementales de formation (procédé, alimentation).

En ce qui concerne les biofilms, d'autres éléments de variabilité sont ajoutés du fait qu'ils sont adhérents à un support solide (membrane, lamelle en verre, puits de microplaque, picots, coupons) ou semi-solide (macrocolonies sur gélose). La première étape d'extraction consiste donc à les détacher par des moyens mécaniques. Les techniques les plus utilisées sont l'application d'ultrasons et les procédés de raclage. Des précautions doivent être prises dès cette étape afin de limiter le plus possible la lyse cellulaire et donc d'éviter le relargage du contenu intracellulaire afin d'éviter ou limiter une surestimation des SEP (Pellicier-Nàcher et al. 2013). Pour cela, la puissance délivrée par la sonde à ultrasons doit être rigoureusement contrôlée et son potentiel de lyse cellulaire devra être préalablement testé par des essais de viabilité fiables (Wu and Xi 2009; Pellicier-Nàcher et al. 2013). De la même façon, il est également important de vérifier la reproductibilité des procédures de raclage afin d'éviter une trop grande variabilité entre les échantillons.

Par ailleurs, les différentes études ont également montré que les méthodes elles-mêmes peuvent varier selon plusieurs facteurs, notamment les conditions de culture des biofilms, la nature des interactions intermoléculaires au sein de la matrice, les propriétés physico-chimiques des polymères à extraire, ce qui rend très difficile la standardisation des méthodes d'extraction des SEP.

En conclusion, cette revue bibliographique, non exhaustive, permet de montrer l'importance d'adapter les techniques d'extractions (sélectives ou séquentielles) aux finalités de l'étude, mais également la nécessité de comparer différentes méthodes sur une même matrice pour sélectionner la plus adéquate, tout en respectant le compromis rendement d'extraction-lyse cellulaire limitée.

Face à toutes ces sources de variabilité et à l'ampleur de la tâche en termes de répétitions et de durée, quelques auteurs ont cherché récemment à développer des méthodes de quantification *in situ*.

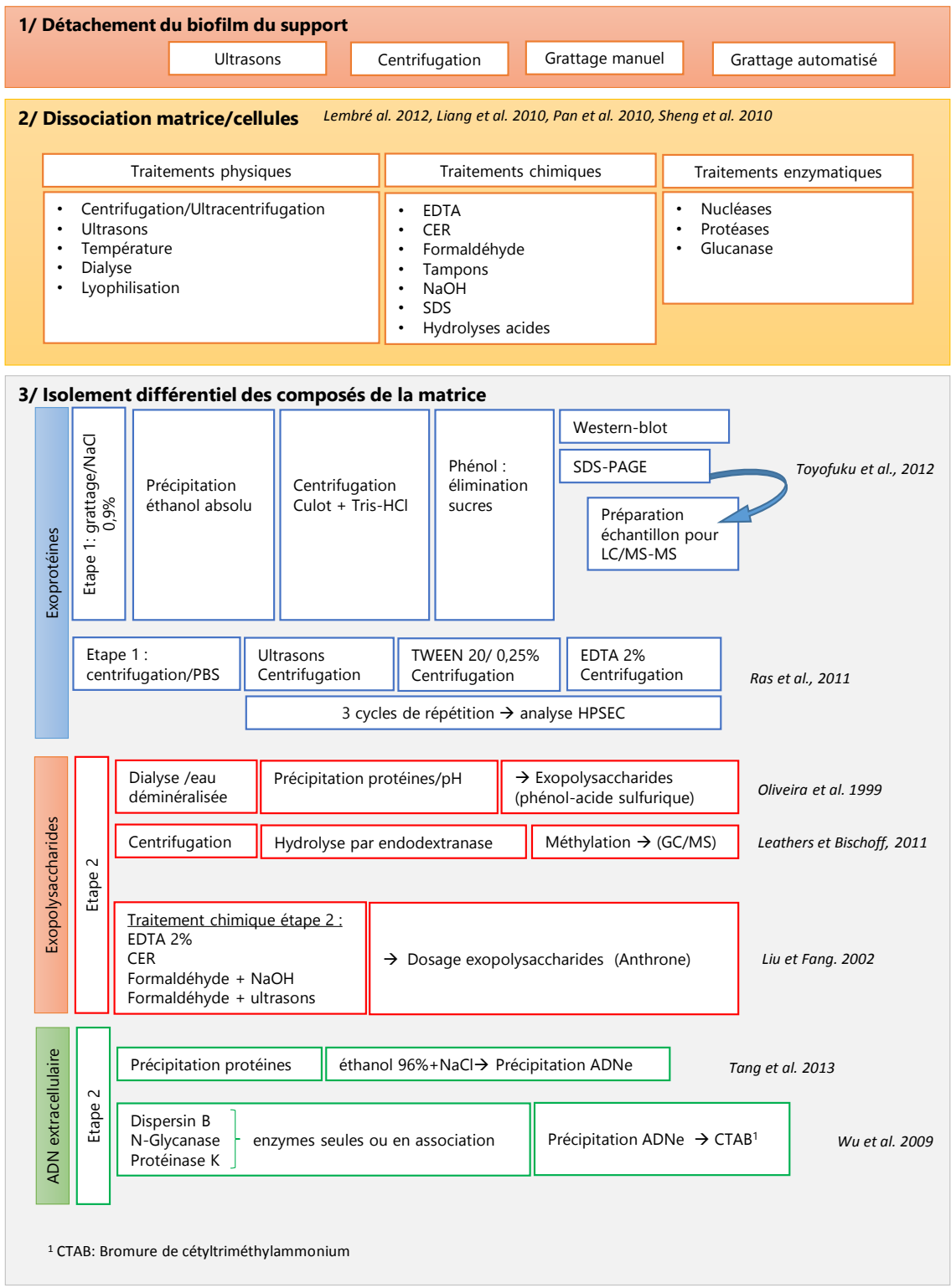


FIGURE A-56. Résumé non exhaustif des procédures d'extraction des SEP majoritaires

III.2.5 Quantification *in situ*

III.2.5.1 Dosage des exoprotéines totales

Parmi les marqueurs pro-fluorescents utilisés pour la quantification des protéines en solution, la CBCQA a été exploitée par Larsen et al. (2008b) pour proposer une méthode de quantification des protéines au sein de la matrice extracellulaire de biofilm par microscopie (Larsen et al. 2008b). Dans cette étude, le marqueur NanoOrange® a également été appliqué sur biofilm pour une approche quantitative des protéines extracellulaires.

Ces deux marqueurs ont été utilisés par les auteurs du fait de l'absence de fluorescence lorsqu'ils ne sont pas en présence de protéines, ce qui en fait un avantage majeur et permet de s'affranchir des étapes de rinçage.

III.2.5.1 Dosage des exopolysaccharides

La réaction de Schiff a été exploitée par Haase et al. pour comparer, *in situ* et en microplaque, les exopolysaccharides des biofilms formés par la bactérie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sous différentes conditions environnementales (pH, force ionique, ...) (Haase et al. 2006). Sans aller jusqu'à une quantification et l'expression des résultats en quantité de sucre, cette étude a permis une approche relative, basée sur la comparaison d'absorbance à 490 nm de la coloration obtenue pour les différents biofilms .

Par ailleurs, une méthode de dosage *in situ* basée sur des enzymes liées à des lectines (ELLA, *Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay*) a été développée pour quantifier les résidus polysaccharidiques produits au sein de biofilms formés en microplaque par 10 souches bactériennes. La spécificité des lectines ConA et WGA, conjuguées par une peroxydase, a été utilisée pour identifier les résidus saccharidiques les plus fréquemment rencontrés au sein de la matrice de biofilms (D-glucose et D-Mannose pour la ConA, et N-Acétyl-D-Glucosamine et l'acide N-Acétylneuramique pour la WGA). La méthode ELLA a ainsi pu être appliquée en microplaque sur différentes matrices extracellulaires. La méthode a démontré son utilité non seulement pour déterminer et démontrer la diversité en résidus polysaccharidiques des matrices mais également pour évaluer les variations de la proportion en ePS au cours du temps (1 et 4 jours) au sein d'un même biofilm (Leriche et al. 2000). Dans cette étude à nouveau, les résultats ont été exprimés de façon relative.

III.2.5.2 Dosage de l'ADN extracellulaire

Comme cela a été présenté (**page 115**), le rendement d'extraction de l'ADN extracellulaire est souche dépendante (Wu and Xi 2009). Tang et al. (2013) ont donc cherché à développer une méthode pour quantifier en microplaque l'ADNe chez quatre souches environnementales (*Serratia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Microbacterium sp.*, *Rheinheimera sp.*) afin d'établir une corrélation entre le stade de développement des biofilms et la production d'ADNe.

Le choix du PicoGreen® par les auteurs a été guidé par le fait qu'il présente une très forte affinité pour l'ADN double brin et donne une réponse linéaire et ultrasensible en solution avec une limite de quantification (LOQ) pouvant atteindre 25 pg.mL⁻¹ contre 10 ng.mL⁻¹ avec le marqueur Hoechst 33258, un bis-benzimide. De plus, d'autres marqueurs utilisés pour marquer *in situ* l'ADNe engendraient une mésestimation de la quantité d'ADN, soit parce que le marqueur diffusait à l'intérieur des cellules pour marquer l'ADN intracellulaire (DDAO, 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)), soit parce qu'il n'était pas assez sensible (Iodure de propidium). La pénétration du PicoGreen® à travers les cellules a été vérifiée par microscopie à épifluorescence et s'est avérée très faible dans les conditions de mise en œuvre de l'étude. En effet, 2 à 4 min après l'ajout du marqueur les mesures de fluorescence ont été effectuées. En respectant ce temps d'incubation, les auteurs ont alors pu observer l'ADNe formant des nuages autour des cellules ou alors des filaments entre les colonies selon la souche bactérienne étudiée.

Grâce à ce dosage *in situ*, les auteurs ont pu montrer que l'ADNe était impliqué dans l'attachement initial des 4 souches ; en revanche, l'accumulation d'ADNe dans les cultures utilisées pour la formation des biofilms ne semblait pas liée à leur développement ultérieur.

Conclusion de l'étude bibliographique

Cette introduction bibliographique a permis de mettre en lumière la complexité et la dynamique des différents constituants de la matrice des biofilms et justifie ainsi la force et la capacité d'adaptation qu'elle procure aux microorganismes qu'elle abrite.

Le premier volet de cette analyse bibliographique s'est attaché à décrire l'universalité des biofilms par la capacité d'adaptation des différents microorganismes aux conditions environnementales. D'une part, cette faculté s'est traduite par leur capacité à communiquer *via* un système complexe et ubiquitaire appelé Quorum sensing. Ce système est notamment à l'origine des mécanismes d'autolyse qui engendrent la libération d'ADN extracellulaire. D'autre part, les microorganismes organisés en biofilm ont également démontré leur capacité à se stratifier biologiquement (apparition de sous-populations métaboliquement différentes entre la surface et la profondeur du biofilm) et chimiquement. Dans ce dernier cas, la coexistence d'une couche hydrophobe et rigide avec une couche fluide et hydratée est le résultat de la production d'exopolymères de nature et de propriétés biochimiques variées. De plus, la présence de composés protéiques fibreux et de structure biochimique commune (pili, curli, fibres amyloïdes fonctionnelles) chez une grande majorité d'espèces bactériennes a permis de confirmer le caractère universel de l'organisation en biofilm. Ainsi, du fait de la complexité des processus responsables de cette structuration des biofilms, il apparaît indispensable qu'une approche *in situ* soit conduite pour les caractériser.

Cette universalité s'oppose paradoxalement à la grande diversité de mécanismes et de compositions biochimiques constatées au sein des biofilms. De manière globale, cette diversité se traduit physiquement à travers les formes que peuvent prendre les biofilms (pellicules aux interfaces air-liquide, communautés adhérees aux surfaces, macro-colonies), mais aussi à travers leur comportement mécanique (rigidité, cohésion, épaisseur, résistance aux forces de cisaillement...). La diversité biologique (mécanismes Gram+ opposés à ceux des Gram-, état physiologique) et chimique (nature des SEP, messagers du QS, minéraux,...) des biofilms bactériens est également avérée.

Toutes ces observations ont alors amené au choix raisonné de certaines études à se focaliser sur la caractérisation de biofilms modèles dont les conditions de croissance sont contrôlées. Ainsi, les mécanismes de base de formation, de maturation et de résistance ont peu à peu été décrits sur la base de ces modèles. Il n'est pas à écarter que des diversités persistent au sein de souches de la même espèce modèle. En effet, même si la matrice extracellulaire d'un biofilm modèle est moins

diversifiée en termes de molécules, son architecture va varier en fonction de facteurs environnementaux : les grandes familles de SEP (exopolysaccharides, exoprotéines, acides nucléiques) pourront être soit quantitativement différentes, soit organisées différemment dans l'espace, et vont même présenter des mécanismes de cohésion variables. En effet, selon la nature de la surface (hydrophobicité, film conditionnant) ou la présence de liquide dans l'environnement (interfaces air-liquide, solide-liquide, solide-air), une espèce bactérienne va pouvoir adapter son mode de croissance (perte de mobilité, attachement aux surfaces, production de SEP), comme c'est le cas des espèces de *Bacillus* qui sont retrouvées sous-forme de pellicules flottantes, de macro-colonies cohésives sur gélose, ou encore de biofilm adhérents. Par ailleurs, l'analyse de biofilms multi-espèces, a montré une prépondérance des protéines dans la matrice de la plupart des études

Dans le deuxième volet de cette analyse bibliographique, les grandes familles biochimiques de SEP ont été décrites selon leur(s) fonction(s) au sein des biofilms. La variété des mécanismes d'interactions qui s'opèrent entre les différents composés de la matrice est importante. Certaines de ces interactions ont été mises en évidence chez des espèces bactériennes modèles largement étudiées. Ainsi, pour les espèces pathogènes, les protéines semblent être les garants de la stabilité structurale de la matrice. Parmi les protéines matricielles, les protéines de la surface (protéines de la famille BAP) sont fortement associées aux cellules et leur confèrent une capacité d'adhésion. D'autres protéines fonctionnelles vont s'associer à l'ADN extracellulaire, comme le font les protéines bactériennes de la famille DNABII, et vont verrouiller l'architecture de la matrice (*Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cenocepacia*, ...). Enfin l'ADN extracellulaire peut aussi se trouver au cœur des interactions de la matrice en s'associant à des exopolysaccharides (Pel chez *Pseudomonas aeruginosa*,...). De même, les exopolysaccharides comme le Psl vont s'associer à la surface des cellules et les enrober pour former une sorte de capsule protectrice.

Quelle que soit la nature de l'exopolymère, et plus particulièrement les protéines, un turn-over qualitatif semble s'opérer selon les étapes de formation du biofilm. En effet, durant la phase initiale d'attachement aux surfaces, le premier contact à la surface se fait par des processus d'exploration de l'environnement (« sensing »), et est généralement attribué aux appendices membranaires (pili, fimbriae, curli). Une fois l'adhésion établie, l'agrégation des cellules s'opère pour former des clusters. Enfin, de nombreuses protéines sont impliquées dans la stabilisation de la structure et à l'élaboration de l'architecture tridimensionnelle du biofilms. Alors que les techniques de Biologie Moléculaire ont permis d'identifier certaines ePN fonctionnelles (délétion

de gènes chez des bactéries modèles), il est difficile de mesurer les quantités exprimées de toutes ces protéines à un instant donné. En ce qui concerne les protéines impliquées dans l'élaboration de l'architecture et la cohésion du biofilm, ce sont plutôt des éléments de structure secondaire et/ou structure tertiaire des polymères qui semblent impliqués dans les mécanismes d'interactions avec les SEP et cellules ; à titre d'exemple, les feuillets beta (structure secondaire) s'empilent entre eux pour former des polymères fibreux (structure tertiaire) de type amyloïde qui confèrent une grande stabilité aux matrices riches en protéines. Ces fibres amyloïdes, parfois ancrées aux cellules et ayant une partie extracellulaire, vont participer à la cohésion intercellulaire et à la stabilité structurale de la matrice. C'est notamment le cas de la protéine amyloïde Tas A de *Bacillus subtilis*. Mais ces fibres amyloïdes ne sont pas toutes ancrées aux cellules, elles peuvent également être sécrétées dans le milieu extracellulaire après leur synthèse (protéines FapC des espèces *Pseudomonas aeruginosa*). D'autres protéines, non nécessairement amyloïdes, vont conférer une hydrophobicité à la surface de la matrice. C'est notamment le cas de la BslA, initialement ancrée à la paroi bactérienne de *Bacillus subtilis*, qui est relarguée dans le milieu extracellulaire puis migre à l'interface air-liquide pour former une couche hydrophobe et semi-imperméable à la surface des pellicules formées.

Enfin, dans le troisième volet de cette analyse bibliographique, une revue de méthodes d'analyse des SEP de la matrice a été établie. Les avancées technologiques associées aux performances de la microscopie confocale ont permis d'apporter une description précise des biofilms. Les études visant à cibler les meilleures stratégies de réduction des biofilms privilégient la technique de la coloration au Crystal violet pour sa rapidité de mise en œuvre, et sa capacité à considérer le biofilm dans sa globalité. Ainsi, un traitement anti-biofilm efficace aura pour conséquence une coloration considérablement diminuée et traduira une réduction relativement importante de l'ensemble des composants du biofilm (cellules et matrice extracellulaire). Des marqueurs plus spécifiques ciblant une famille biochimique de la matrice ont également fait leur preuve. Par exemple les lectines couplées à des fluorophores ont permis d'étudier particulièrement les exopolysaccharides, un des composants majoritaires de la matrice, et ont même abouti à la mise en œuvre de méthodes de quantification *in situ*. Leur haute spécificité pour une liaison, ou un type de résidu glycosidique donné, en fait à la fois un avantage et une limite pour la caractérisation des biofilms selon l'objectif final de l'étude. En effet, pour avoir une caractérisation globale des exopolysaccharides d'une matrice donnée, une combinaison de

lectines judicieusement choisie, est nécessaire, ce qui complexifie l'étude des exopolysaccharides des biofilms.

En ce qui concerne l'analyse des exoprotéines, celle-ci s'est longtemps appliquée à élucider leur rôle fonctionnel dans l'établissement des biofilms. Les techniques *in vitro* qui consistent à les extraire et à les identifier, soit par des outils de biologie moléculaire soit par des outils biochimiques, ont largement été utilisées. Par ces approches, de nombreuses protéines fonctionnelles ont pu être élucidées ce qui a permis d'apporter une meilleure description de la machinerie des biofilms. Pour apporter une approche quantitative à l'étude de cette famille biochimique, des dosages *in vitro* ont pu être appliqués pour doser les protéines extraites. Néanmoins, bien que ces dosages soient relativement sensibles, ils sont parfois sujets à des interférences avec les composés chimiques utilisés pour l'extraction. D'autre part, il a été démontré que le rendement d'extraction en SEP dépendait non seulement des méthodes d'extraction, mais également de l'espèce bactérienne étudiée ou de la nature du biofilm étudié.

La caractérisation des fibres amyloïdes a pris également son importance depuis la mise en évidence de leur abondance au sein de biofilms naturels de milieux aquatiques. Depuis, une combinaison de techniques comprenant la spectroscopie infrarouge, la fixation de marqueurs structurellement spécifiques (feuilletés β) comme la ThT ou des anticorps, la microscopie électronique, ou encore la mesure de diffraction rayons X, s'est avérée nécessaire pour les identifier.

Cette étude bibliographique a ainsi permis de mettre en avant les questions qui restent à traiter pour optimiser l'étude des biofilms. En effet, il apparaît clairement qu'il persiste un manque d'outils de quantification *in situ* des différents composés de la matrice extracellulaire. Des méthodes de quantification des exopolysaccharides et des protéines devront être mises en œuvre pour répondre à ce besoin. Ces méthodes devront être sensibles pour permettre leur détection dès la formation du biofilm, spécifiques de la famille biochimique d'intérêt et universelle afin qu'elles puissent être appliquées à un grand nombre de type de matrice. De plus, la diversité des interactions intermoléculaires au sein de la matrice étant due à l'implication de tous les composés présents, il apparaît plus que nécessaire de pouvoir disposer d'outils de caractérisation permettant de cibler distinctement chacun des acteurs. Ainsi, il sera possible d'estimer leur niveau de contribution dans la structure des biofilms.

Le Laboratoire de Biotechnologies Alimentaire et Environnementales s'intéresse à l'étude de biofilms indésirables en envisageant leur réduction par l'utilisation de moyens de lutte les plus respectueux possibles de l'environnement. Les premières études diagnostiques réalisées sur des

biofilms multi-espèces (Marcato-Romain et al. 2012) et mono-espèces (Marchal et al. 2012) ont révélé l'efficacité de ces traitements en terme de réduction du biofilm, mais les éléments de compréhension des mécanismes en jeu restent à découvrir.

Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à répondre à deux enjeux principaux :

- **Objectif 1** : Développer et valider des outils de quantification *in situ* des Substances ExoPolymériques (SEP) des biofilms ; l'étude portera sur le dosage des protéines, dont les fibres amyloïdes, des polysaccharides et de l'ADN extracellulaires.
- **Objectif 2** : Comprendre le rôle des SEP dans la structuration d'un biofilm d'une souche de *Bacillus licheniformis* impliquée dans des biofilms papetiers indésirables.

Le travail mené pour répondre à ces objectifs devrait apporter des connaissances supplémentaires sur la distribution en substances exopolymériques de la matrice afin de faciliter l'étude de leurs interactions.

Partie B – Modèles d'étude et Stratégie expérimentale

Trois souches bactériennes ont été choisies comme modèles de biofilm dans le cadre de cette étude. Le choix de ces souches a été orienté par la nature de leur paroi et le type de polymères extracellulaires produits. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif très largement étudiée pour sa capacité à produire des biofilms robustes et résistants. La souche de *Bacillus licheniformis* CIP 110824 a été isolée au sein du laboratoire à partir d'eaux blanches d'industrie papetière; de précédents travaux ont montré la prépondérance des protéines dans le biofilm formé par cette bactérie à Gram positif. Elle a été peu étudiée hors du laboratoire, mais les espèces bactériennes qui lui sont proches, comme *Bacillus subtilis*, présentent des caractéristiques structurales intéressantes, confortant le choix de ce modèle d'étude. Enfin, *Weissella confusa* LBAE C39.2 est une souche à Gram positif de la collection de Bactéries Lactiques du laboratoire référencée à la World Federation for Culture Collection (WDCM1016). Elle a été décrite pour sa capacité à surproduire un homopolymère de glucose, le dextrane, qui engluie les cellules lorsqu'elles sont cultivées en présence de saccharose.

I. Présentation des souches à l'étude

I.1. Description générale des souches

I.1.1. Une souche de référence multi-résistante : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™

Pseudomonas aeruginosa est un petit bacille droit aérobique à Gram négatif, asporulé, ubiquitaire et mobile grâce à son flagelle simple. La souche ATCC® 15442™ (également retrouvée dans les autres collections internationales sous la référence CIP 103467 (ou NCIB 10421 ou PCI 812) est une souche environnementale, isolée pour la première fois dans une eau d'abreuvement animal (traduction de « animal room water bottle »). Cette souche présente un phénotype non invasif et non cytotoxique bien qu'elle ait démontré une capacité à dégrader la mucine produite par les tissus cornéens pour prévenir la fixation de microorganismes pathogènes aux cellules épithéliales. Cette capacité à dégrader la mucine est reliée à la production synergique par la souche de protéases et de glycosidases. Le génome de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ a été récemment séquencé et fait 6 770 586 paires de bases représentées en 200 contigs de plus de 100pb. Un pourcentage de 66.2% de bases G+C a été déterminé. Contrairement aux souches PAO1 et PA14, aucune séquence complète de gènes codant pour la production de sidérophores,

notamment de la pyocyanine, n'a été trouvée. En revanche, la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™ produit de la pyoverdine, un sidérophore fluorescent et oligopeptide antibiotique pouvant agir comme capteur de cations métallique ou comme facteur de virulence. Le génome de la souche a été déposé à la DDBJ/EMBL/Genbank sous le numéro d'accèsion AYUC00000000 (Wang et al. 2014).

La souche de *P. aeruginosa* ATCC® 15442 est recommandée comme souche de référence pour la mise en œuvre des tests d'évaluation des activités biocides d'agents désinfectants ou antiseptiques selon la Norme Européenne AFNOR NF EN 1040 (2006) sur des suspensions bactériennes.

Cette souche est capable de former des biofilms, et l'évaluation de l'effet-dose des expositions aux UV a également permis de corrélérer la production de pyoverdine et la formation de ce biofilm. Ainsi, une dose élevée d'UV induit une diminution de la production de pyoverdine et une augmentation de la production de biofilm (Saidi et al. 2011). D'autre part, la souche ATCC® 15442™ a démontré une adaptation à l'exposition à un dérivé d'ammonium quaternaire, le bromure de didécylméthylammonium (DDAB), associée à un changement de la composition en acides gras de la membrane (Méchin et al. 1999). La structure tridimensionnelle d'un biofilm de 24h formé par la souche a été caractérisée dans une étude comparative de soixante souches pathogènes par microscopie confocale haut débit. Les biofilms ont montré une architecture en forme de champignons (« mushroom-like ») et ayant une épaisseur plus élevée ainsi qu'une rugosité importante comparée aux autres espèces étudiées (Bridier et al. 2010).

I.1.2. Une souche à Gram positif sporogène : *Bacillus licheniformis* CIP 110824

Bacillus licheniformis est un bacille à Gram positif, sporulé, qui se trouve communément dans les sols. A la différence des autres espèces appartenant au genre *Bacillus*, *B. licheniformis* est anaérobie facultative et est capable de se développer sur une large gamme de température (15 à 55°C). Elle est étroitement liée à la bactérie *Bacillus subtilis* et est généralement retrouvée dans les sols sous forme de spores. Elle est surtout connue, dans le milieu industriel, pour la production, par fermentation, d'enzymes (α -amylase, protéases,...), d'antibiotiques (bacitracine) et d'autres molécules d'intérêt (détergents, floculant) (Madslie et al. 2012). Cette bactérie est aussi connue pour les contaminations des produits laitiers ainsi que des viandes et des conserves, sur lesquels elle se retrouve sous forme de spores thermolabiles et résistantes à des traitements tels que la pasteurisation, les pH extrêmes, les basses températures et même l'irradiation et la dessiccation.

Lorsque *B. licheniformis* (souche CCRC 12826) est cultivée en aérobie, dans un milieu contenant de l'acide citrique, de l'acide glutamique et du glycérol comme sources de carbone, elle est capable de produire en grande quantité un biopolymère floculant extrêmement visqueux ; ce biofloculant extracellulaire est un homopolymère d'acide glutamique (PGA) qui permet la floculation de suspensions organiques et inorganiques. De plus, l'addition de cations Ca^{2+} , Fe^{3+} et Al^{3+} stimule le processus de floculation, et la viscosité du milieu augmente au fur et à mesure que le biofloculant est produit (jusqu'à 16 cp pour 14 g/L de PGA produit) (Shih et al. 2001). Cette propriété représente un atout majeur pour les industries du traitement de l'eau. Plusieurs souches ont été totalement ou partiellement séquencées et on peut citer en exemple les souches *B. licheniformis* 9945A et WX-02 ainsi que la souche ATCC 14580.

Par ailleurs, une souche de *B. licheniformis* (D50141) a été isolée d'eaux blanches d'industries papetières après avoir colonisé des biofilms pré-établis par des espèces primaires telles que *Deinococcus geothermalis* (Kolari et al. 2001). Une forme d'antagonisme a été observée sur les co-cultures de *B. licheniformis* et *D. geothermalis* entraînant ainsi une réduction du biofilm de $88 \pm 2\%$ par rapport à un biofilm de référence de *D. geothermalis* seule (Kolari et al. 2001).

D'autres études relatent l'abondance des espèces de *Bacillus* lors de la production de papier destiné à l'emballage alimentaire, où le risque de contamination des aliments pose un problème (Väisänen et al. 1994; Blanco et al. 1996; Desjardins and Beaulieu 2003; Torres et al. 2011). Outre leur résistance aux conditions extrêmes telles que la dessiccation, les hautes températures, les pH extrêmes, ou encore aux agents biocides, les espèces de *Bacillus* produisent des enzymes amylolytiques et protéolytiques pouvant dégrader la qualité des produits.

- Isolement de la souche dans les eaux blanches de l'industrie papetière : *B. licheniformis* CIP 110824

La souche *B. licheniformis* CIP 110824 a été isolée d'eaux blanches d'une industrie papetière dans le cadre d'une étude visant à réduire les biofilms papetiers multi-espèces par des procédés à faible impact environnemental. Cette étude a été menée dans le cadre du projet ANR BioFIME (Maîtrise intégrée des BIOfilms papetiers par actions combinées à Faible IMPact Environnemental) (Marcato-Romain et al. 2012). La souche ainsi isolée a été identifiée par une combinaison de méthodes biochimiques rapides à l'aide de galerie API 20E et API 50CH (BioMérieux), et de l'identification des séquences de l'ARN ribosomique 16s. A l'issue de cette identification, la souche a été déposée à la Collection de l'Institut Pasteur (Octobre 2014) et enregistrée sous le numéro CIP 110824.

I.1.3. Une souche de bactérie lactique : *Weissella confusa* LBAE C39-2

Le profil phylogénétique des bactéries appartenant au genre *Weissella* a été établi à partir de leur séquence des ARNr 16s et 23s par Marcia-Martinez et Collins en 1990. En effet, ils ont montré que les espèces *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc paramesenteroides* sont distinctes et que cette dernière présentait plus de similitudes avec cinq autres espèces hétérofermentaires de *Lactobacillus* désormais regroupées au sein du genre *Weissella* (Björkroth et al. 2002). Actuellement, le genre *Weissella* regroupe huit espèces : *Weissella confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis* et *W. viridescens*. *W. confusa* est un court bacille à Gram positif, asporulé, aérobie-anaérobie, hétérofermentaire strict, dont la température optimale de croissance se situe entre 20 et 30°C. Ces bactéries produisent des exopolysaccharides à partir du saccharose.

Les souches de *Weissella* semblent provenir d'une grande variété de sources : *W. paramesenteroides* est l'espèce dominante isolée des légumes frais et semble jouer un rôle déterminant dans les premières étapes d'ensilage. Les espèces *W. halotolerans*, *W. hellenica* et *W. viridescens* sont le plus souvent isolées de la viande et de ses coproduits fermentés. *W. confusa* est retrouvée dans la canne à sucre, le jus de carotte, le lait, les eaux usées, et certaines souches peuvent être isolées de fécès humains, ou même responsables d'infections à otites chez les chiens (Björkroth et al. 2002).

La souche *Weissella confusa* LBAE C39.2, appartenant à la Collection du Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale-Université Paul Sabatier (LBAE-UPS), a été isolée d'un levain de panification et présente la caractéristique de ne produire que du dextrane en présence de saccharose. Le génome de la souche a été séquencé et contient 2,284,024 paires de base avec 71 contigs (>100pb) dont 57 contigs ayant plus de 1000pb et 45% de bases G+C (Amari et al. 2012).

Marchal et al. ont choisi cette souche, pour évaluer l'efficacité anti-biofilm d'un traitement physique par le biais d'un jet de plasma froid (Marchal et al. 2012). En effet, lorsque le dextrane est produit, l'épaisseur de la matrice extracellulaire est plus importante du fait de la présence d'une couche de polymère supplémentaire, conférant ainsi une barrière au jet de plasma, et semble influencer l'effet du traitement, si bien qu'un temps d'exposition plus long est nécessaire par rapport à un biofilm formé sans saccharose.

I.2. Caractérisation globale et comparaison des matrices des biofilms modèles

Les trois modèles d'études ainsi choisis présentent des morphologies et des caractéristiques cellulaires contrastées qui s'avèrent intéressantes dans un objectif de comparaison de la composition de la matrice extracellulaire mais également de validation de méthodes de caractérisation des biofilms.

Une étude préliminaire a donc été menée afin de caractériser de manière globale l'aspect et la morphologie des agrégats formés par les trois souches modèles en combinant des techniques allant de la simple observation macroscopique des macro-colonies à l'observation des composés majoritaires de la matrice par microscopie à épifluorescence ou confocale, en passant par la spectroscopie infrarouge.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe BCMI (Biofilms et Comportements Microbiens aux Interfaces) du Laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule), EA 1391 de l'Université de Cergy-Pontoise pour la microscopie confocale et la spectroscopie infra-rouge, et l'équipe ECSECO (Écotoxicologie et Sante des Écosystèmes) du laboratoire EcoLab (Université de Toulouse Midi-Pyrénées) pour la microscopie en épifluorescence. Lors de cette première caractérisation, 3 échelles de travail ont été retenues pour décrire les souches d'étude :

- Suspension bactérienne après culture de 18 heures en milieu liquide ;
- Macro-colonie sur membrane en acétate de cellulose après culture de 48 heures sur gélose ;
- Biofilm sur coupon en polycarbonate immergé pendant 48 heures (*B. licheniformis* et *P. aeruginosa*) ou 5 jours (*W. confusa*)

Ces diverses conditions de production permettront de développer des biofilms à l'interface air/solide (biofilm sur membrane) ou au contraire à l'interface solide/liquide (biofilm immergé sur coupon). Elles répondent aussi à certaines contraintes relatives aux techniques d'analyses utilisées (nature du support).

I.2.1. Matériel et méthodes

- Formation des biofilms

Des cultures de chaque souche sont préparées par un ensemencement à partir de 1 ml de stock glycérol (20%) dans 19 ml de milieu frais (TSB pour *B. licheniformis* et *P. aeruginosa* et MRS pour *W. confusa*) puis incubées à 37°C, pour les souches de *B. licheniformis* et *P. aeruginosa*, et à 30°C pour *W. confusa*. Dans la suite, le terme inoculum se référera à des dilutions de ces cultures, obtenues par ajustement de la DO₅₉₅ à 0,1 avec du milieu frais (TSB pour *B. licheniformis* et *P. aeruginosa* et MRS pour *W. confusa*).

Pour former des macro-colonies, 50µL de pré-culture sont déposés sur une membrane en polycarbonate (12mm, Millipore) elle-même déposée sur une gélose TS ou MRS+4% de saccharose. Les membranes sont ensuite mises à incuber pendant 48h à l'étuve à 37 ou 30°C.

Les biofilms formés sur membrane en acétate de cellulose ont été utilisés pour réaliser des empreintes en spectroscopie infra-rouge au moyen d'un spectromètre BRUKER de la gamme ALPHA. Pour cela, à l'issue des 48 heures d'incubation, les membranes ont été déshydratées dans une étuve à 40°C pendant 24h. Chaque empreinte a été obtenue entre 600 et 2000 cm⁻¹ en moyennant 5 mesures (de 32 scans chacune) prises sur des zones différentes de chaque membrane.

Les biofilms sur coupons de polycarbonate (Biosurfaces Technologies, Bozeman, USA) et lamelles de verre ont été obtenus par immersion des coupons dans des puits d'une microplaque 12-puits contenant 500µL de chaque inoculum et incubés pendant 48h à 37°C pour les souches *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa*, et pendant 5 jours à 30°C pour la souche *Weissella confusa*.

Avant d'être marqués pour observation en microscopie, les coupons de polycarbonate et les lamelles de verre ont été rincés deux fois avec du PBS. Pour la microscopie confocale, les biofilms ont été fixés par ajout de 500µL de formaldéhyde à 3,7% dans chaque puit. Les microplaques ont ensuite été placées dans un dispositif hermétique à atmosphère humide pendant 24 heures au minimum et jusqu'à l'analyse.

➤ Observation en microscopie confocale des biofilms sur coupons de polycarbonate

Pour l'observation en microscopie confocale des cellules, des protéines et polysaccharides extracellulaires, les coupons fixés au formaldéhyde ont été rincés trois fois avec du PBS avant de

procéder à l'étape de marquage. Après un screening par couple de lectines, la WGA-FITC (Wheat Germ Agglutinin, de *Triticum vulgare*, couplée au fluorochrome FITC Sigma) a finalement été choisie pour marquer les exopolysaccharides. A l'abri de l'obscurité, 500µL de la solution de lectine à 100µg.ml⁻¹ dans de l'eau distillée sont ajoutés de manière à recouvrir les coupons dans les puits, et incubés pendant 20 minutes. Puis chaque coupon est rincé trois fois avec du PBS, et le même volume de Sypro® Ruby (solution commerciale conditionnée dans du DMSO, Molecular Probes) est ajouté pour marquer les exoprotéines des biofilms avec un temps de contact de 20 minutes. Enfin, après trois rinçages au PBS, les cellules sont marquées au DAPI 0,1µg.ml⁻¹ (Sigma Aldrich) pendant 10 minutes.

Avant l'observation, 20µL de solution de montage Mowiol (4-88, Sigma Aldrich) sont déposés délicatement au centre de chaque coupon en veillant à ne pas faire de bulles, puis une lamelle de verre ronde (diamètre 13mm) est déposée par-dessus. Les coupons sont mis à l'obscurité pendant une nuit avant l'observation.

Les échantillons ont été observés à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser inversé ZEISS LSM 510 AxioObserver (Plateforme de l'Institut des Matériaux I-Mat, ERRMECe EA 1391, Université Cergy Pontoise). Le DAPI a été excité avec une diode laser à 405nm (émission 443nm), le WGA-FITC avec un laser Argon à 488nm (émission 528nm), et le Sypro® Ruby à l'aide d'un laser DPSS à 561nm (émission 655nm). Les échantillons ont été observés avec l'objectif 63x à immersion à huile plan-Apochromat avec une ouverture numérique à 1,4. Puis les images (2D et 3D) ont été acquises avec le logiciel ZEN 2012.

➤ Observation en microscopie à épifluorescence des biofilms sur lamelles de verre

Afin de compléter les observations précédentes sur les biofilms de *P. aeruginosa* et *B. licheniformis*, l'ADN extracellulaire a été marqué conjointement aux cellules.

Après rinçage des lamelles au PBS, 100µL d'une solution de TOTO-1 à 2µM dans de l'eau distillée ont été déposés sur la lamelle de manière à recouvrir toute la surface. Les lamelles ont été placées à l'obscurité pendant 20 minutes. Puis les lamelles ont été rincées avec du PBS avant d'être marquées avec du DAPI à 1µg.ml⁻¹ (eau distillée) pendant 10 minutes à l'obscurité. Après rinçage au PBS, les lamelles ont ensuite été déposées sur une lame, et afin d'éviter l'écrasement des biofilms, un espaceur en silicone (Secure-Seal™, diamètre 13mm, Molecular Probes) a été collé sur la lame. 10µL de Mowiol (1µM) ont ensuite été déposés sur l'échantillon lui-même recouvert

par une lamelle carrée (22x22mm). Les lames sont ensuite placées à l'obscurité à 4°C pendant au minimum une nuit avant analyse. Les observations ont été réalisées au moyen d'un microscope droit OLYMPUS B41 avec un objectif 40x.

I.2.2. Morphologie et propriétés chimiques des macro-colonies développées sur membrane

Les cultures de 18h de *P. aeruginosa* et *B. licheniformis* montrent des pellicules formées à l'interface air-liquide qui semblent adhérer aux parois des cuves en polystyrène. Les cultures bactériennes de *P. aeruginosa* et *W. confusa* sont plus homogènes et plus troubles que celles de *B. licheniformis* dans lesquelles des floccs sont présents en suspension dans le liquide.

Les macro-colonies des trois souches présentent des morphologies très différentes également. Chez *P. aeruginosa*, la colonie est lisse et régulière et semble être plus dense au point de dépôt de la goutte d'inoculum puis une substance plus gélatineuse entoure la colonie. La macro-colonie de *B. licheniformis* montre un aspect fripé et rugueux avec une surface sèche et hydrophobe. Enfin, à l'inverse la macro-colonie de *W. confusa* est fortement hydratée avec une grande quantité de substances extracellulaires gélifiées (FIGURE B-1).

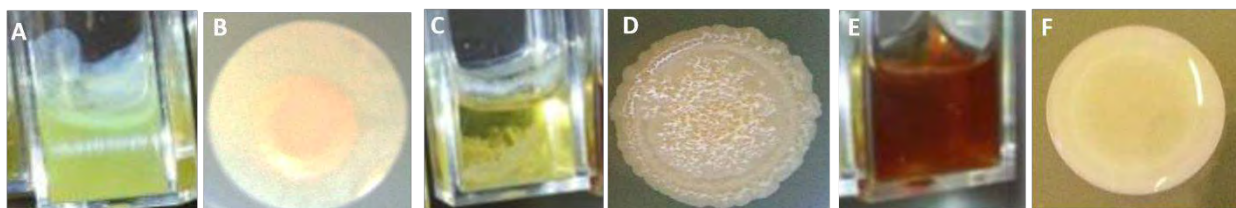


FIGURE B-1 Suspensions bactériennes de 18h et macro-colonies de 48h sur membrane de polycarbonate de *P. aeruginosa* (A, B), *B. licheniformis* (C, D) et *W. confusa* (E, F)

➤ Spectroscopie infrarouge (ATR-FTIR)

Une première empreinte biochimique des trois biofilms modèles a été obtenue en spectroscopie infra-rouge et comparée à celle de la membrane vierge (FIGURE B-2).

Les spectres obtenus peuvent se décomposer en 5 zones principales au sein desquelles les signaux ont été identifiés à partir des travaux de Quilès et collaborateurs (Quilès et al. 2010) :

- **1500 à 1700 cm⁻¹** : zone caractéristique des protéines (amide I et amide II)
 - Une bande autour de 1640 cm⁻¹ due à l'élongation des liaisons C=O des amides couplée à la déformation des liaisons N-H (amide I) ;
 - Une bande à environ 1540 cm⁻¹ due à la déformation des liaisons N-H et à l'élongation des liaisons C-N (amide II) ; cette bande est absente du profil de la membrane vierge.

- **1350 à 1500 cm⁻¹** : zone caractéristiques des lipides et des composés aliphatiques
 - Une bande à environ 1460 cm⁻¹ attribué à l'élongation des liaisons C-H ;
 - Une bande d'intensité moyenne à environ 1400 cm⁻¹, caractéristiques de l'élongation des groupes COO⁻ ;

- **1200 à 1350 cm⁻¹** :
 - Une bande à 1275 cm⁻¹ due à l'élongation des liaisons esters (C-O-C) qui est donc de forte intensité pour la membrane, mais faible pour les biofilms, et qui peut être utilisée comme indicateur de recouvrement de la membrane.
 - Une bande de faible intensité à environ 1235 cm⁻¹ attribuée à l'élongation des liaisons P-O (phosphodiesteres, phospholipides) ;

- **950 à 1200 cm⁻¹** : zone caractéristique des polysaccharides et des acides nucléiques
 - Un épaulement à 1120 cm⁻¹ attribué à l'élongation des liaisons C-C (ADN, ARN) ;
 - Une bande constituée de 3 pics principaux entre 1030 cm⁻¹ et 1060 cm⁻¹ qui peuvent être dus à la vibration des cycles et/ou à l'élongation des liaisons O-H couplée à la déformation des liaisons C-O (polysaccharides) ;
 - Une bande vers 990-1000 cm⁻¹ pouvant être attribuée à l'ARN

- **600 à 950 cm⁻¹** : trois bandes aigües à 830, 750 et 685 cm⁻¹ caractéristiques de la membrane vierge ; ils peuvent ainsi être utilisés pour évaluer le recouvrement de la membrane par les biofilms.

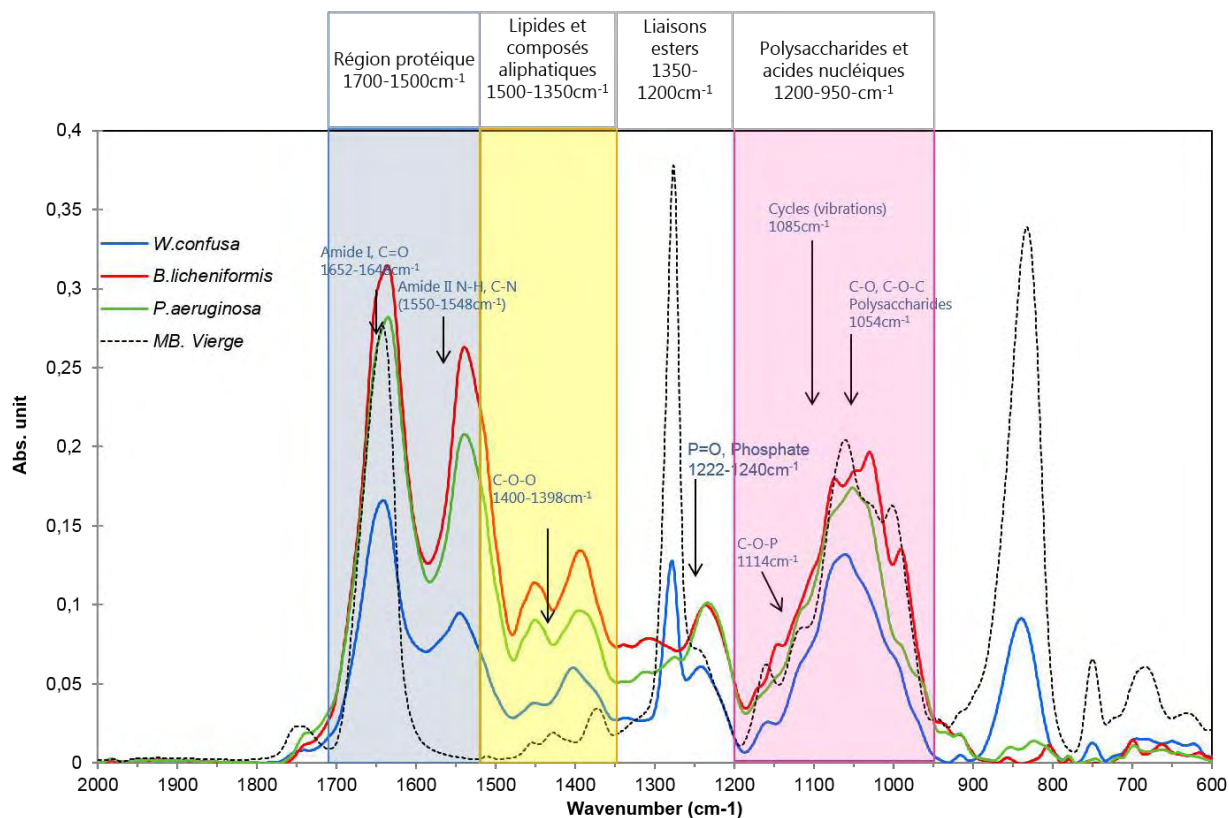


FIGURE B-2. Spectres d'absorption infrarouge des biofilms des trois souches et d'une membrane d'acétate de cellulose vierge (pointillés noirs) : *B. licheniformis* (rouge), *P. aeruginosa* (vert), *W. confusa* (bleu).

Les spectres obtenus pour *B. licheniformis* et *P. aeruginosa* sont proches : les pics caractéristiques de la membrane disparaissent, indiquant qu'elle est totalement recouverte par les biofilms, et la zone caractéristique des protéines est plus marquée que celle des polysaccharides. Ces profils sont également proches de ceux présentés par Quilès et ses collaborateurs (Quilès et al. 2010) pour des biofilms de *Pseudomonas fluorescens*. Pour *W. confusa*, le recouvrement est partiel, indiquant une moindre colonisation de la membrane, et limitant l'exploitation du profil obtenu.

➤ Observation microscopique et tridimensionnelle de la matrice des biofilms modèles

L'observation de la structure dans l'espace de biofilms de 48 heures pour *P. aeruginosa* et *B. licheniformis* et de 5 jours pour *W. confusa* a été réalisée par un scan en z en microscopie confocale. Les images G, H et I de la FIGURE B-3 présentent les images en obtenues par marquage des exopolysaccharides (vert), des exoprotéines (rouge) et des cellules (bleu). Les cadres α et β représentent respectivement les projections verticales du biofilm selon l'axe (xz) et (yz). Les sections ont été réalisées selon les lignes vertes et rouges représentées sur l'image centrale en 2D (xy).

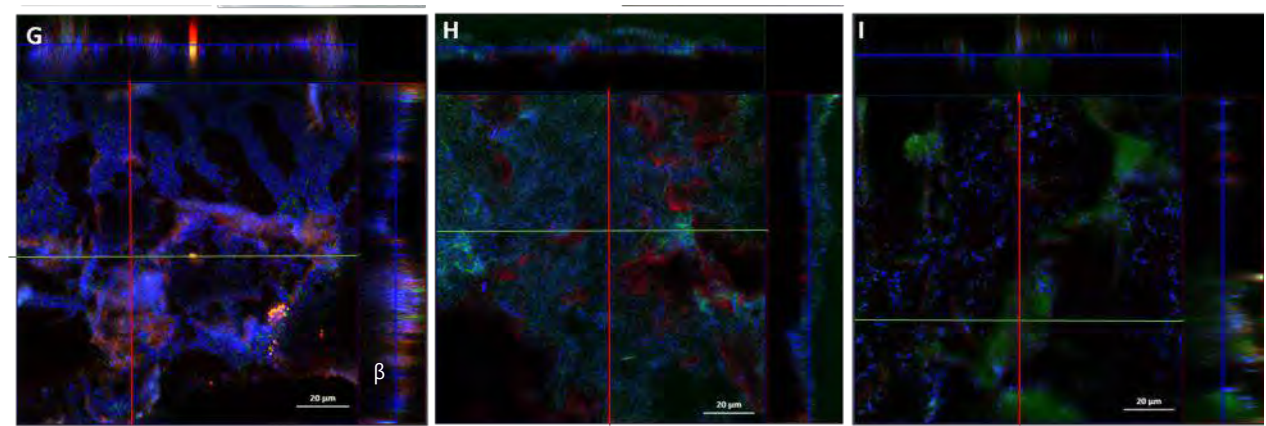


FIGURE B-3. Images de microscopie confocale des biofilms de 48h (*P. aeruginosa* G, *B. licheniformis* H) et du biofilm de 5 jours de *W. confusa* I), formés sur coupons en polycarbonate ; les cellules ont été marquées au DAPI (bleu), les exopolysaccharides avec la lectine WGA-FITC (vert) et les protéines avec le marqueur SYPRO®Ruby (rouge). Objectif 63x à immersion à eau, Microscope ZEISS LSM 510 (Laboratoire ERRMECE, Cergy-Pontoise).

En terme d'épaisseur, les trois biofilms ont atteint une valeur maximale de 24, 29 et 30 μm respectivement pour *P. aeruginosa*, *B. licheniformis* et *W. confusa* ; cette dernière forme un biofilm relativement épais mais le biovolume semble être occupé majoritairement par les polysaccharides de la matrice au détriment des cellules qui forme une couche fine à la surface du coupon. A l'inverse, les cellules des biofilms de *P. aeruginosa* et *B. licheniformis* occupent autant de biovolume que les SEP de la matrice. Les trois biofilms diffèrent considérablement dans leur composition relative en exopolysaccharides et en exoprotéines. La lectine WGA, qui a une affinité pour les résidus N-acétyl glucosamine ((glcNAc)₂) et pour un dérivé d'acide sialique, le N-acétylneuraminique (NeuNAc), a été choisie pour marquer les polysaccharides des trois biofilms. Ce marquage a permis de montrer que les trois biofilms possèdent des polysaccharides de structures différentes ; ceci peut se traduire par la différence d'affinité de la lectine pour les composants de leur matrice. D'autre part, les souches de *B. licheniformis* et *W. confusa* semblent

démontrer une forte composante polysaccharidique dans leur matrice par rapport à *P. aeruginosa*. Les exopolysaccharides de la souche *W.confusa* décrivent des îlots diffus qui surplombent les cellules mais ne recouvrent pas la totalité du biofilm. A l'inverse, dans le biofilm de *B. licheniformis*, les exoprotéines sont localisées à la base du biofilm tandis que les exopolysaccharides en partie supérieure. Dans le biofilm de *P. aeruginosa*, les exoprotéines, qui sont le composant matriciel majoritaire marqué ici, sont présentes sur tout le profil du biofilm.

Afin de compléter ces éléments, les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus licheniformis* ont ensuite été co-marqués avec le DAPI (bleu) et le TOTO[®]-1 (vert) de façon à différencier les ADN intra et extracellulaires (FIGURE B-4 et FIGURE B-5). Les marquages du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* permettent de mettre en évidence la présence d'ADN extracellulaire caractérisé par des filaments plus ou moins diffus qui relient les cellules à la surface (TOTO[®]-1, canal vert.). Ainsi, si lors de l'observation précédente il est apparu que la matrice du biofilm de *P.aeruginosa* était pauvre en polysaccharides, il apparaît ici que l'ADN extracellulaire y est abondant et occupe un volume important.

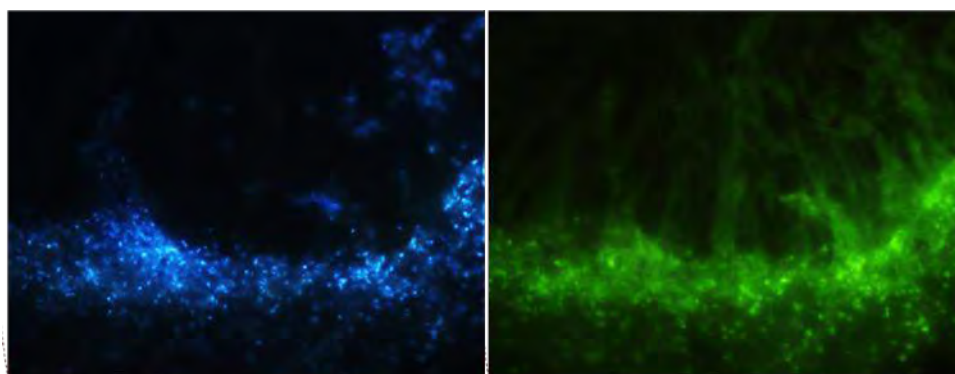


FIGURE B-4. Biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* formé sur lamelle de verre, non fixé et co-marqué avec DAPI (1 μ g/ml) et TOTO-1 (2 μ M). Microscopie à épifluorescence, grossissement 400x, OLYMPUS BX41, Laboratoire ECOLAB.

De même, la FIGURE B-5 présente un agrégat de *Bacillus licheniformis* co-marqué avec les deux marqueurs d'acides nucléiques : le TOTO[®]-1 permet de clairement dessiner les contours des bacilles tandis que le DAPI marque l'ADN intracellulaire, plus localisé.

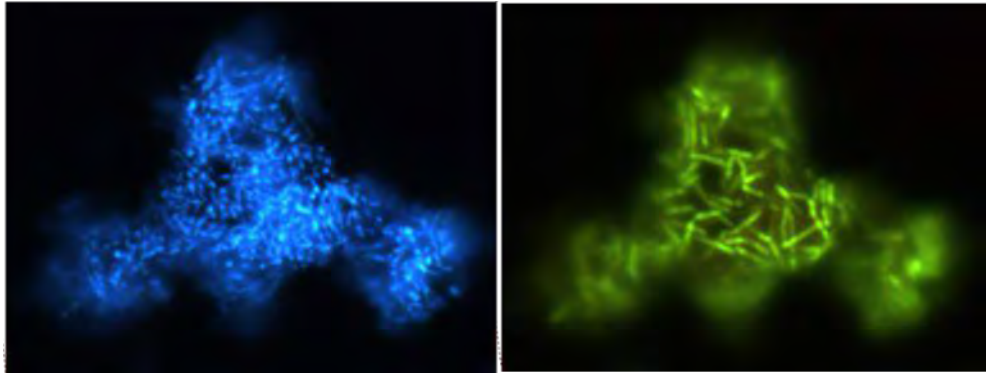


FIGURE B-5. Biofilm *Bacillus licheniformis* formé sur lamelle de verre, non fixé et co-marqué avec DAPI (1 μ g/ml) et TOTO-1 (2 μ M). Images de microscopie à épifluorescence, grossissement 400x, OLYMPUS BX41, Laboratoire ECOLAB.

D'après ces observations en microscopie, le biofilm de *B.licheniformis* présente des exoprotéines situées à la base de la matrice, de l'ADN extracellulaire qui semble étroitement lié aux cellules, et des polysaccharides sur la partie supérieure du biofilm.

Conclusion sur le choix des modèles d'étude

Cette étude préliminaire multi-échelle sur les trois souches modèles choisies d'après la bibliographie a permis de confirmer leur diversité en termes de composition et de structuration de leur matrice extracellulaire. Le TABLEAU B-1 résume les caractéristiques établies pour chacune d'entre elles.

Ce trio permettra donc de disposer de trois matrices contrastées permettant de prendre en compte la diversité des matrices bactériennes, dans un objectif de développement d'outils applicables au plus grand nombre de biofilms pour la quantification des substances exopolymériques.

TABLEAU B-1. Récapitulatif des caractéristiques connues des trois souches modèles à l'étude (*observations expérimentales).

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®15442™	<i>Bacillus licheniformis</i> CIP 110 824	<i>Weissella confusa</i> LBAE C39.2
Origine	Eau d'abreuvement	Eaux blanches d'industrie papetière (Marcato-Romain et al. 2012)	Levain de panification (Robert et al. 2009)
Génome séquencé	Oui (Wang et al. 2014)	Non Souches de la même espèce (Yangtse et al. 2012; Dhakal et al. 2014)	Oui (Amari et al. 2012)
Paroi/ morphologie	Bacille gram négatif	Bacille gram positif Sporogène	Bacille gram positif
Conditions de culture dans l'étude	Température : 37°C Milieu : Trypticase Caséine soja	Température : 37°C Milieu : Trypticase Caséine soja	Température : 30°C Milieu MRS + 4% saccharose
Éléments d'architecture des biofilms	Mushroom-like (Bridier et al. 2010)	Macrocolonies fripées Pellicules à l'interface air-liquide* Biofilm : Structure en faisceau (« bundles ») (Bridier et al. 2013)	Macrocolonies engluées dans un gel de dextrane*
SEP identifiés de la matrice	Cup fimbriae (Wei and Ma 2013), FapC, Pili type IV (Dueholm et al. 2013b) Levane, Pel, Psl (Mann and Wozniak 2012) Pyoverdine*	BsIA (Kobayashi and Iwano 2012; Hobley et al. 2013), Tas A (Romero et al. 2010; Pasvolsky et al. 2014) Levane (Dogsa et al. 2013; Vlamakis et al. 2013b) Exopolysaccharide <i>eps</i> (Chai et al. 2012) ADNe (Vilain et al. 2009; Zafra et al. 2012)	Dextrane (Marchal et al. 2012)
Résistance aux agents antimicrobiens	Chlorure de Benzalkonium (Bridier et al. 2011) Acide peracétique (Bridier et al. 2011) CSA-13 (Nagant et al. 2013) DDAB (Méchin et al. 1999)		Jet de plasma atmosphérique (Marchal et al. 2012)

II. Stratégie expérimentale et formation de biofilms

L'étude bibliographique des données actuelles disponibles pour l'analyse et la compréhension du rôle des SEP dans la formation des biofilm (**Partie A**) a permis de dégager deux enjeux principaux auxquels il conviendrait de répondre dans ce travail de thèse :

- Le développement d'outils de quantification *in situ* des Substances ExoPolymériques (SEP) des biofilms ;
- La compréhension du rôle des SEP dans la cohésion d'un biofilm d'une souche de *Bacillus licheniformis* impliquée dans des biofilms papetiers indésirables.

Pour chacun de ces objectifs, une démarche générale a été adoptée puis appliquée sur les 3 souches modèles, en ce qui concerne l'objectif 1, et sur *Bacillus licheniformis* pour l'objectif 2.

II.1 Démarche générale pour répondre à l'objectif 1

Afin de répondre au premier objectif, l'étude s'est concentrée sur le dosage des protéines extracellulaires, dont les fibres amyloïdes, et sur celui des polysaccharides. Jusqu'à présent, la quantification des SEP a été réalisée sur des solutions obtenues par application de procédures d'extraction. Cependant, ces méthodes présentent plusieurs limites : elles conduisent à la déstructuration du biofilm sans pour autant garantir un rendement d'extraction maximum, tandis que les traitements physiques et/ou chimiques appliqués peuvent conduire à la modification des polymères extraits. En ce qui concerne les dosages des exopolymères, des interférences sont souvent relevées lors des dosages colorimétriques usuels (BCA, Lowry, Dubois, etc). De plus, ces méthodes de quantification *ex situ* nécessitent le plus souvent de grandes quantités d'échantillon afin d'obtenir des extraits suffisamment concentrés pour être dosés. Seul le dosage au crystal violet est proposé comme technique *in situ* mais il englobe la quantification de la composante cellulaire et extracellulaire.

Cette partie du travail vise donc à développer des méthodes de dosage des protéines totales, des fibres amyloïdes et des polysaccharides applicables sur les biofilms sans traitement préalable, *in situ*. Pour cela, un cahier des charges a été établi de façon à définir les critères que devront remplir les dosages proposés pour pallier aux limites des techniques existantes :

- **Critère de spécificité** : les marqueurs retenus doivent être spécifiques à une famille biochimique d'exopolymères (ePN, FA, ePS ou ADNe) sans interférer avec les cellules et les autres composés majoritaires de la matrice ;
- **Critère d'exhaustivité** : les marqueurs doivent être de « large spectre » au sein de la famille d'exopolymères ciblée et permettre la détection de toutes les formes moléculaires en s'appuyant sur une caractéristique biochimique commune.
- **Critère de sensibilité** : les dosages retenus doivent permettre la détection de faibles quantités de SEP de façon à pouvoir être appliqués sur des biofilms développés en microplaque et/ou à différents stades de développement du biofilm ;
- **Critère de changement d'échelle**: les dosages retenus doivent présenter une gamme large de concentrations dosables afin d'être appliqués sur des biofilms de matrices contrastées ou à différents stades de développement ;
- **Critère de « transposabilité »** : les marqueurs retenus doivent offrir la possibilité de transposer le marquage pour des observations en microscopie à épifluorescence ou confocale et permettre ainsi de combiner des éléments qualitatifs et des données quantitatives.

Une fois le(s) marqueur(s) ou réactif(s) retenu(s) à partir d'un travail bibliographique, le développement analytique se fera en 4 étapes successives qui sont détaillées ci-après: le choix d'un étalon et la calibration du dosage en solution, la vérification de l'absence d'interférences en solution, l'application du dosage sur biofilm et la vérification de l'absence d'interférences sur biofilm.

1. Choix d'une molécule étalon et calibration du dosage en solution

Dans un premier temps, plusieurs polymères de chaque famille seront testés en analysant la réponse des gammes étalons correspondantes au dosage proposé. Cette première étape permettra d'optimiser les protocoles de dosage en solution ainsi que de retenir une molécule étalon pour la suite des essais en fonction de la sensibilité et de la linéarité de sa réponse.

2. Vérification de l'absence d'interférence liée aux autres composants du biofilm

Les exopolymères à doser doivent pouvoir être quantifiés de manière spécifique et sensible par distinction avec les cellules et les composés majoritaires de la matrice (protéines totales,

polysaccharides ou ADN extracellulaires). Ainsi, pour chaque dosage, les réponses des gammes de concentrations des exopolymères non ciblés ainsi que celles des cellules des 3 souches modèles seront mesurées de façon à déterminer d'éventuelles interférences et définir des plages de validité du dosage.

3. Application du dosage sur biofilms et validation par la méthode des ajouts dosés

Chaque dosage sera appliqué à des biofilms formés par les 3 souches modèles choisies entre autre pour leurs matrices de composition variée. Cette application permettra de vérifier l'adéquation de chaque dosage et de sa plage de mesure à des biofilms contenant peu ou au contraire beaucoup de chacun des exopolymères à doser.

Pour valider le dosage réalisé *in situ* sur les biofilms, une méthode par ajout dosé est retenue (Zuriaga-Agustí et al. 2013). Cette méthode consiste à déposer une gamme du polymère de calibration, en quantités connues sur plusieurs répétitions d'un biofilm, de façon à obtenir une droite dite d'ajout. Lorsque la droite d'ajout est parallèle à la droite étalon, il peut être conclu qu'il n'existe pas d'interférence de la matrice du biofilm sur le dosage. Cette vérification est effectuée statiquement à l'aide du logiciel PRISM.

4. Transposition du marqueur en microscopie à épifluorescence ou confocale

Enfin, afin d'envisager la combinaison de données qualitatives aux données quantitatives, les marqueurs sélectionnés et ayant montré leur adéquation pour un dosage quantitatif seront testés sur des biofilms développés sur coupons ou lamelles et observés en microscopie à épifluorescence ou confocale. Cette vérification sera réalisée dans le cadre du travail effectué pour répondre à l'objectif n°2 (**page 232**), sur un biofilm de *Bacillus licheniformis*.

II.2 Démarche générale pour répondre à l'objectif 2

Afin d'appréhender le rôle des différents exopolymères dans la cohésion d'un biofilm modèle de *B.licheniformis*, le deuxième volet du travail proposera d'effectuer des attaques enzymatiques ciblées vers les exoprotéines ou l'ADN extracellulaire et de caractériser l'effet de ces traitements par une analyse multiparamétrique combinant :

- une approche biochimique par l'utilisation des outils de quantification des SEP majoritaires, développés pour répondre à l'objectif 1 quantification
- une approche physique permettant d'appréhender l'évolution de la perméabilité du biofilm
- une approche microscopique afin d'appréhender la structure tridimensionnelle du biofilm

II.2.1. Formation des biofilms dans le cadre de l'étude

Pour atteindre les objectifs de l'étude, différents biofilms modèles seront développés à partir des trois souches de façon à répondre aux exigences des techniques analytiques employées (FIGURE B-6). Ainsi, 4 modes de production de biofilms seront utilisés au cours de l'étude et détaillés ci-après :

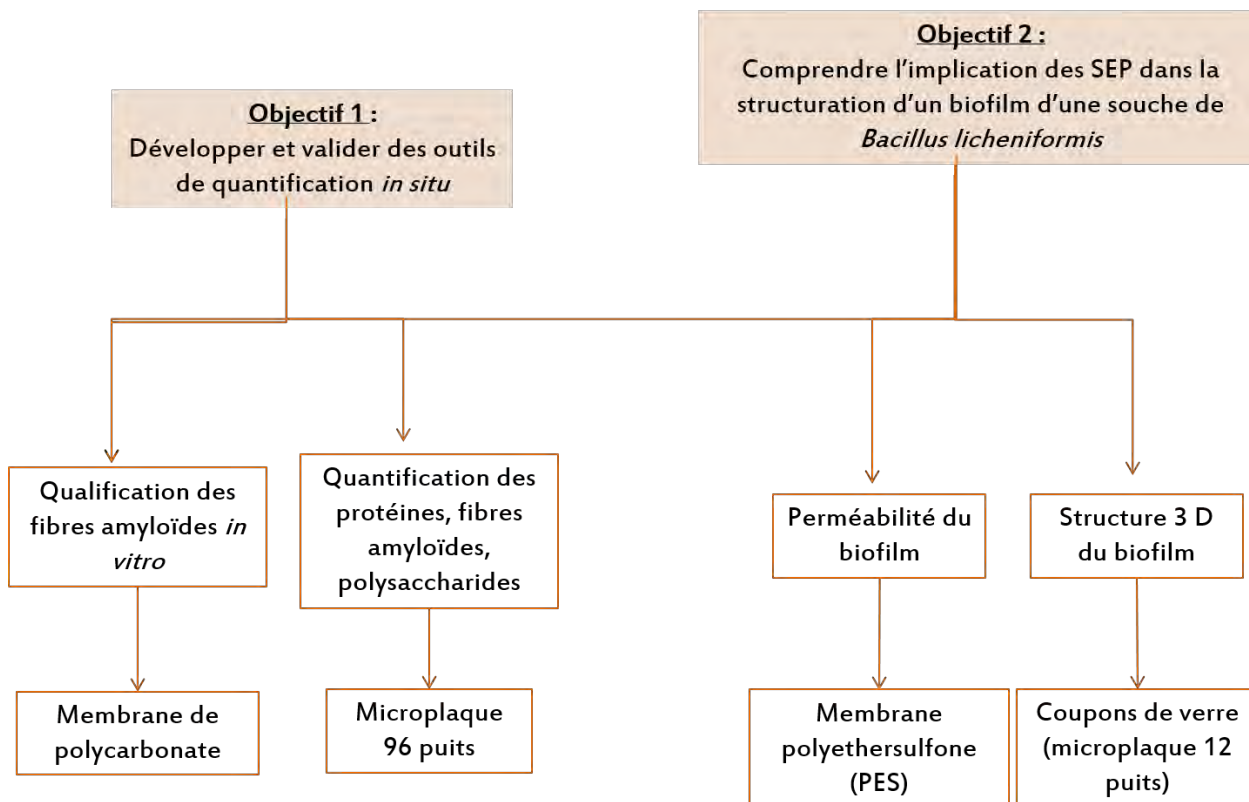


FIGURE B-6. Type de biofilms développés en fonction des objectifs expérimentaux et des contraintes analytiques

Quel que soit le mode de production des biofilms, ceux-ci sont systématiquement rincés deux fois avec du PBS avant analyse.

II.2.1.1. Formation des biofilms en microplaque

Pour tous les essais en microplaque, l'inoculation des puits est réalisée en déposant un volume d'inoculum de 200µL ou de 500µL pour les microplaques de 96 puits (GREINER, F-bottom) ou de 12 puits (NUNC), respectivement. Les microplaques sont ensuite placées dans une étuve à 37°C (*B. licheniformis* et *P. aeruginosa*) ou 30°C (*W. confusa*) sans agitation et sans renouvellement de milieu pendant 24 ou 48h. A l'issue de l'incubation, les cellules planctoniques sont éliminées par pipetage, puis les cellules adhérentes sont rincées avec deux volumes de PBS avant d'être analysées.

II.2.1.2. Formation de biofilms sur membrane de polyethersulfone (PES)

Pour l'évaluation de la perméabilité des biofilms, ceux-ci sont développés dans des dispositifs de filtration (MCWO~10000, Nanosep® Omega™, Pall Corporation) en introduisant 500 µL d'inoculum dans la partie supérieure du dispositif, au contact direct de la membrane de PES. Les tubes sont ensuite incubés en mode statique à 37°C pendant 24 heures.

II.2.1.3. Formation de biofilms sur lamelles de verre

Des lamelles de verre rondes (diamètre 12mm, dégraissées et autoclavées) sont immergées dans les puits d'une microplaque 12-puits (1 lamelle par puit) contenant 500µL d'inoculum. Les microplaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

PARTIE C – RESULTATS

Chapitre I: Dosage *in situ* des exoprotéines et des exopolysaccharides de biofilms bactériens modèles.

Les exoprotéines sont souvent retrouvées de façon majoritaire au sein de biofilms tels que ceux de *Pseudomonas fluorescens* (Molobela et al. 2010) ou encore chez des biofilms complexes issus du milieu industriel ou marin (Leroy et al. 2008; Marcato-Romain et al. 2012). Dans cette étude, le terme ePN considère toutes les protéines (Fong and Yildiz 2015) sécrétées dans le milieu extracellulaire, celles-ci pouvant être associées aux autres composants matriciels (exopolysaccharides, acides nucléiques) ou encore aux cellules (protéines BAP) (Latasa et al. 2005; Lasa and Penadés 2006). Les appendices à forte composante protéique ou exclusivement constitués d'un assemblage de monomère protéique, comme les curli, les pili ou les fimbriae, peuvent également être ancrés à la surface des cellules et avoir une partie exposée dans le milieu extracellulaire. Outre leur abondance, les ePN présentent des fonctions déterminantes pour l'établissement et le maintien de la structure de nombreux biofilms bactériens. En effet, elles interviennent à chaque étape de la formation des biofilms, de la phase initiale d'attachement aux surfaces, jusqu'à la stabilisation de la structure et à l'élaboration de l'architecture tridimensionnelle du biofilm.

Les exopolysaccharides (ePS) sont les substances exopolymériques les plus décrites dans l'étude des biofilms. Il est possible de trouver des ePS chargés (polyanioniques ou polycationiques) comme l'alginate qui est composé de résidus d'acides L-gulonique et D-mannuronique, ou encore des ePS neutres à haut poids moléculaire comme le dextrane. Ils confèrent des propriétés adhésives, protectives ou encore nutritives à la matrice extracellulaire. La composition en ePS de chaque matrice varie énormément selon les espèces bactériennes étudiées, selon le stade de développement du biofilm ou encore selon les conditions environnementales.

Ce premier chapitre présente les différentes étapes du développement analytique des outils qui permettront de quantifier et de caractériser les exoprotéines et exopolysaccharides totaux de la matrice de biofilms bactériens. Pour chacun des dosages développés, la stratégie expérimentale en quatre étapes sera détaillée : calibration en solutions, évaluation des interférences en solution, application *in situ* sur biofilms et transposition en microscopie.

Le **paragraphe I** présente le développement d'une analyse *in situ* des protéines extracellulaires (ePN). Ce paragraphe comprend une partie de résultats préliminaires correspondant au choix du marqueur, puis le développement analytique d'un dosage *in situ* des ePN par l'epicoconone est détaillé sous la forme d'un article publié dans le journal Applied Microbiology and Biotechnology.

Le **paragraphe II** s'intéresse aux exopolysaccharides. Comme cela été développé précédemment, les lectines ont longtemps été l'outil le plus utilisé pour détecter et visualiser la distribution des ePS d'un biofilm si bien que des méthodes de mise en œuvre ont pu être développées et optimisées (Neu et al. 2001; Strathmann et al. 2002). Ce paragraphe comprend ainsi une partie de résultats préliminaires correspondant à une analyse critique de l'utilisation des lectines sur les biofilms des trois souches modèles de l'étude. Le développement analytique d'un dosage *in situ*, basé sur la réaction de Schiff est ensuite détaillé dans une publication au format « Note and Tips » acceptée avec révisions mineures dans le journal Analytical Biochemistry.

I. Dosage *in situ* des protéines extracellulaires (ePN) de biofilms bactériens

La revue bibliographique a permis d'identifier deux molécules réunissant plusieurs critères du cahier des charges et dont l'utilisation *in situ* pour le marquage des ePN totales de biofilms bactériens peut être envisagée : le SYPRO® Ruby et l'épicoconone.

En effet, le SYPRO® Ruby réunit les critères de spécificité et d'exhaustivité (liaison aux amines primaires de protéines), de sensibilité (1 à 2 ng par bande en électrophorèse) et de transposabilité (émission de fluorescence à 620 nm après excitation à 485 nm) énoncés dans la démarche générale (**page 151**).

Cependant, cette sonde fluoresce de façon intrinsèque et son spectre d'émission présente un maximum à 610 nm lorsqu'elle est excitée dans l'ultraviolet à 302 nm ou dans le visible à 470 nm. Cette fluorescence inhérente peut présenter une limite et nécessite un lavage préalable du gel après marquage pour réduire le bruit de fond non-spécifique.

En ce qui concerne l'épicoconone, il existe déjà une méthode *in vitro* de dosage des protéines qui exploite ses propriétés pro-fluorescentes (Mackintosh et al. 2005) : la molécule fluoresce à 610 nm lorsqu'elle est excitée à 520 nm.

L'épicoconone réunit donc l'ensemble des critères recherchés pour le développement d'une méthode de quantification *in situ* des ePN : spécificité et exhaustivité (liaison aux amines primaires de protéines), sensibilité, large gamme de dosage (40 ng.mL⁻¹ à 200 µg.mL⁻¹) et transposabilité à des observations en microscopie. De plus, la propriété pro-fluorescente permet la mise en œuvre d'un dosage sans étape de rinçage qui est souvent à l'origine d'une mésestimation de la teneur en protéines des biofilms.

I.1. Résultats préliminaires et choix de l'Epicocconone

Pour la calibration en solution du dosage des protéines par le SYPRO®Ruby, la BSA a été choisie comme étalon (0 à 1000 mg.mL⁻¹). La méthode a été développée en deux temps :

- du fait de la fluorescence intrinsèque du marqueur, l'augmentation du signal suite à la liaison du marqueur aux protéines a été évaluée sur la gamme de BSA.
- la même gamme de BSA a ensuite été immobilisée dans un gel de polyacrylamide dans l'optique de produire des complexes de gel-BSA calibrés, pouvant être rincés de façon à éliminer le marqueur non lié aux protéines. Ce format de « gel-étalon » présentait de plus l'avantage de se rapprocher des propriétés physiques de la matrice des biofilms.

Ces essais préliminaires ont confirmé la présence d'un bruit de fond non-négligeable dans le cas d'une calibration en solution et l'augmentation proportionnelle de la fluorescence par rapport à la concentration en protéines pour des concentrations supérieures à 100 mg.mL⁻¹. Ce dosage a donc présenté une limite de quantification élevée, incompatible avec la nécessité de pouvoir doser des quantités de protéines faibles d'une part, mais également des variations de la teneur en protéines dans des biofilms jeunes ou après un traitement.

A l'inverse, la mise en œuvre d'une calibration sur gel de polyacrylamide incluant une étape de rinçage a permis de diviser par trois ce bruit de fond bien que restant toujours important. Cependant, dans les conditions expérimentales de l'étude, aucune corrélation n'a pu être établie entre la concentration en protéines et la fluorescence.

L'étude préliminaire qui consistait à développer une méthode de dosage *in situ* des ePN par le SYPRO®Ruby a ainsi confirmé les limites du marqueur pourtant largement utilisé en microscopie confocale. Dans cette étude, le bruit de fond provoqué par la fluorescence intrinsèque du marqueur a été le principal obstacle malgré le développement d'une calibration en gel. La stratégie expérimentale n'a donc pas pu être poursuivie avec le SYPRO®Ruby, mais elle a été renouvelée avec l'autre marqueur identifié par l'étude bibliographique : l'épicocconone.

I.2. Présentation de l'Article 1 : développement et validation d'une méthode de dosage *in situ* des ePN

L'objectif de l'étude présentée dans l'article 1, intitulé « ***Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms*** » est de proposer un outil de quantification *in situ* des ePN.

Selon la stratégie définie au chapitre précédent (**page 151**) pour la validation des dosages de SEP *in situ*, la première phase de développement du dosage a été de choisir l'étalon le plus adapté pour la calibration de l'essai. En effet, la matrice de biofilms est constituée de plusieurs familles de protéines et d'une souche à une autre, la composition protéique varie considérablement. C'est pourquoi, un panel de six protéines standards et commercialisées sous-formes purifiées ont été mises en présence de l'épicocconone afin de comparer le signal de fluorescence émis sachant que ces protéines varient selon leur structure primaire, leur taille et leur teneur en lysine (acide aminé portant une amine primaire). Ce panel comprend la BSA, la gélatine, la conalbumine, la ribonucléase A, l'aldolase et la thyroglobuline. La BSA a finalement été retenue pour la suite de l'étude en tant qu'étalon du dosage des ePN. La corrélation entre la teneur en lysine de chaque protéine et l'intensité de fluorescence du marqueur n'a pas pu être confirmée, ce qui laisse à supposer que l'affinité de l'épicocconone ne dépend pas uniquement de l'abondance en amine primaire mais sans doute aussi de l'accessibilité de ces groupements au sein de la protéine. Ceci peut expliquer la réponse plus faible des protéines de haut poids moléculaire. La BSA est la protéine qui présente une masse moléculaire intermédiaire (67 kDa) et une réponse en fluorescence aussi élevée que la plus petite protéine du panel, la Ribonucléase (13 kDa). Elle a ainsi été retenue comme référence pour estimer la quantité de protéines dans le milieu complexe qu'est la matrice.

Par la suite, le réactif de dosage a été concentré en épicocconone par rapport au protocole commercial de manière à élargir la gamme de linéarité de la BSA, allant de 0 à 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Dans ces conditions, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) du dosage sont respectivement de 0,2 μg et 0,7 μg de protéines lorsque les concentrations sont ramenées au puit de la microplaque.

Comme exposé dans la stratégie retenue, plusieurs essais ont été effectués en solution afin d'écartier tout risque d'interférence par les autres composés potentiellement présents au sein

d'une matrice complexe. Parmi ces essais, l'effet de la présence de sucres a été déterminé en comparant la réponse de la gamme de BSA avec celle de BSA mélangée à différentes doses de sucres. Les sucres qui ont été testés sont le glucose, résidu glycosidique le plus communément rencontré en biochimie et dans les systèmes biologiques ; l'alginate, un polymère anionique composé d'acide guluronique et d'acide mannuronique ; et enfin le dextrane, un homopolymère de glucose, produit majoritairement par la souche *Weissella confusa*. L'absence d'interférence a été évaluée suite à une régression multiple permettant d'obtenir l'équation des droites étalons de chaque mélange BSA-sucres elle-même comparée à celle de la gamme de BSA seule. Un test statistique de Student a ainsi permis d'écarter une éventuelle interférence des sucres quant au dosage des protéines en milieu soluble. La même démarche a été effectuée afin d'évaluer l'interférence apportée par la présence d'acide nucléique (solution d'ADN lambda). L'issue de ces essais préliminaires a permis de valider la méthode et de passer ainsi à la seconde phase de développement qui est celle de l'application du dosage aux biofilms.

Comme évoqué dans la présentation de la stratégie générale (**page 153**), la méthode des ajouts dosés (SAM) proposée dans la littérature (Zuriaga-Agustí et al. 2013) et pouvant être assimilée à la méthode de l'étalon interne, a été appliquée aux biofilms afin d'écarter tout « effet matrice ».

Ainsi, pour la première fois, il a été possible de développer une méthode de dosage *in situ* réalisée directement en microplaque sur des biofilms de 48h des trois souches modèles de l'étude présentant des matrices contrastées. *B. licheniformis* est la souche qui possède la matrice la plus riche en protéines avec $38,3 \pm 7,1 \mu\text{g}_{\text{eq BSA}}$, suivie de *P. aeruginosa* avec une teneur en protéines égale à $22,1 \pm 3,1 \mu\text{g}_{\text{eq BSA}}$ et enfin, de la souche de *W. confusa* avec $0,3 \pm 0,1 \mu\text{g}_{\text{eq BSA}}$. Pour cette dernière souche, la teneur en protéines se trouve en-dessous de la limite de quantification, mais la méthode des ajouts dosés a permis de dépasser cette limite et de quantifier les protéines de ce biofilm.

Article 1: "Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms."

*I. Randrianjatovo, E. Girbal-Neuhauser, C-E Marcato-Romain**

Université de Toulouse, Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale, EA 4565 (LBAE), Institut Universitaire de Technologie, Université Paul Sabatier. 24 Rue d'Embaquès F-32000, Auch, France

Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Jun; 99(11):4835-44. doi: 10.1007/s00253-015-6570-9.

**Corresponding author*

Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms

I. Randrianjatovo¹ · E. Girbal-Neuhauser¹ · C-E. Marcato-Romain¹

Received: 22 October 2014 / Revised: 17 March 2015 / Accepted: 24 March 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Biofilms are ecosystems of closely associated bacteria encapsulated in an extracellular matrix mainly composed of polysaccharides and proteins. A novel approach was developed for in situ quantification of extracellular proteins (ePNs) in various bacterial biofilms using epicocconone, a natural, fluorescent compound that binds amine residues of proteins. Six commercial proteins were tested for their reaction with epicocconone, and bovine serum albumin (BSA) was selected for assay optimization. The optimized protocol, performed as a microassay, allowed protein amounts as low as 0.7 µg to as high as 50 µg per well to be detected. Addition of monosaccharides or polysaccharides (glucose, dextran or alginate) to the standard BSA solutions (0 to 250 µg ml⁻¹) showed little or no sugar interference up to 2000 µg ml⁻¹, thus providing an assessment of the specificity of epicocconone for proteins. The optimized protocol was then applied to three different biofilms, and in situ quantification of ePN showed contrasted protein amounts of 22.1±3.1, 38.3±7.1 and 0.3±0.1 µg equivalent BSA of proteins for 48-h biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis* and *Weissella confusa*, respectively. Possible interference due to global matrix compounds on the in situ quantification of proteins was also investigated by applying the standard addition method (SAM). Low error percentages were obtained, indicating a correct quantification of both the ePN and the added proteins. For the first time, a specific and

sensitive assay has been developed for in situ determination of ePN produced by bacterial cells. This advance should lead to an accurate, rapid tool for further protein labelling and microscopic observation of the extracellular matrix of biofilms.

Keywords Extracellular proteins · Epicocconone · Biofilm · In situ · Quantification · Standard addition method

Introduction

Bacterial biofilms are a mucilaginous matrix of exopolymeric substances (EPS) in which a wide variety of bacterial communities are embedded. EPS are mostly composed of exopolysaccharides (ePS), extracellular proteins (ePNs) and DNA (Donlan 2002; Wingender and Flemming 2010).

Polysaccharides are often described as the main component of the matrix (Flemming 2011) and have been widely studied for this reason. Depending on the bacterial populations involved in biofilm formation, various neutral and anionic polysaccharides have been described, such as alginate-like polyuronic sugars in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms (Strathmann et al. 2002) and glucans with α-(1,6)-linked glucose (dextran) secreted by *Weissella confusa* (Bounaix et al. 2009).

Proteins have been reported for their implication in biofilm adhesion and cohesion, and various studies have demonstrated that proteolytic enzymes lead to a considerable release of attached bacteria, providing proof of their in initial attachment in the biofilm (Donlan 2002). Amyloid proteins that are able to form strong fibres are considered as key components for the structural integrity and stability of the extracellular matrix of many bacterial biofilms (Otzen and Nielsen 2008). Among them, *Bacillus* species are bacteria that produce large amounts

✉ C-E. Marcato-Romain
claire-emmanuelle.romain@iut-tlse3.fr

¹ Université de Toulouse, Laboratoire de Biotechnologies Alimentaire et Environnementale, EA 4565 (LBAE), Institut Universitaire de Technologie, Université Paul Sabatier, 24 rue d'Embaquès, F-32000 Auch, France

of amyloids, and TasA, an amyloid precursor purified from *Bacillus subtilis*, was recently demonstrated to be essential for the formation and integrity of *B. subtilis* biofilms (Romero et al. 2010). However, in vitro extraction and characterization of these amyloid proteins remain difficult due to their low solubility and aggregating properties. EPS extraction often constitutes the first step for ePN characterization, but the physical or chemical extraction procedures used differ widely, leading to a variety of EPS compositions for the extracts obtained (Ras et al. 2011; Sheng et al. 2010). Furthermore, quantification may be biased by the fact that it is not possible to extract all the biopolymers (Zuriaga-Agusti et al. 2013) and also because some chemicals, such as EDTA, may interfere with the classic biochemical colorimetric methods for protein assay (Bourven et al. 2012). Finally, in addition to being time-consuming, in vitro extraction of the EPS components leads to possible denaturation of ePN and to the alteration of their functional structure. In situ characterization methods thus appear to be a valuable alternative for total quantification and analysis of native extracellular polymers.

With the success of confocal microscopy, numerous fluorescent dyes have been used to obtain more details on the biofilms organization (Bridier et al. 2013; Neu and Lawrence 2014). Targeting both the cellular and extracellular components, the relative distribution of EPS and cells can be visualized, but precise quantification of proteins or polysaccharides appears rather difficult. Nevertheless, Larsen et al. (2008) have quantified the biovolume occupied by the amyloid components in several bacterial biofilms by using fluorescence microscopy and digital image analysis. Quantitative determination of polysaccharides has also been developed by staining biofilms with the wheat germ agglutinin lectin conjugated with Alexa Fluor 488 (Burton et al. 2007). The fluorescence of labelled biofilms was directly measured in a microplate reader, and the results were compared to classical colorimetric assays such as Crystal Violet staining. However, the selectivity of lectins towards specific sugars does not seem favourable for a global quantification of polysaccharides. Moreover, the protocols generally used require washing steps, which increase the risk of removing components from the extracellular matrix. Therefore, one selection criterion for the dye is its ability to fluoresce only after binding to its specific target molecules. This is the case of epicocconone, a natural dye isolated from the fungus *Epicoccum nigrum*, that has been reported for its ability to bind primary amine group and to form a strong fluorescent enamine group (Coghlan et al. 2005). The long Stokes shift of epicocconone (>100 nm) prevents self-quenching and allows it to be multiplexed with the most common fluorescent dyes (Bell and Karuso 2003). Using this compound, a sensitive fluorescent assay has already been developed in solution with a low background signal and a linear response between

40 ng ml⁻¹ and 200 µg ml⁻¹ of proteins (Mackintosh et al. 2005). Interestingly, a better sensitivity than those of standard spectrophotometric assays, such as Bradford and Lowry methods, and a greater dynamic range and sensitivity than those of other fluorescent assays were observed for soluble protein quantification with epicocconone.

The purpose of the present study was to develop a sensitive fluorescent method for global quantification of ePN produced in complex biofilm matrices. The assay was performed with epicocconone, a natural dye previously described for its ability to establish covalent binding with proteins. The sensitivity and specificity of the epicocconone assay were first established with soluble standard proteins before its implementation on biofilms. The quantification method was then applied to three different bacterial biofilms, allowing comparison of the amount of ePN secreted by each population after 48 h. Possible interferences of the matrix components on the analytical method were assessed using the previously described standard addition method (SAM) (Zuriaga-Agusti et al. 2013).

Material and methods

Bacterial strains and cultures

P. aeruginosa (CIP 103467), a reference strain classically used for testing the efficiency of disinfectants under standard NF EN 1040 (AFNOR 2006), was used for biofilm development. In addition, biofilms were developed with two strains isolated and characterized in the laboratory: *W. confusa* LBAE C39-2 strain (culture collection WDCM 1016), a heterofermentative lactic acid bacterium isolated from a traditional French wheat sourdough (Robert et al. 2009), and a *Bacillus licheniformis* strain (CIP110824) isolated from process white water of a paper mill (Marcato-Romain et al. 2012).

Bacterial stock cultures were kept at -20 °C in trypticase soy broth (TSB, Fluka, France) containing 20 % (v/v) glycerol for *P. aeruginosa* and *B. licheniformis* strains and in Man, Rogosa and Sharp (MRS) broth (Fisher Scientific) and 20 % glycerol for *W. confusa*. Prior to each experiment, frozen cultures of *P. aeruginosa* and *B. licheniformis* were subcultured in TSB at 37 °C and *W. confusa* in MRS at 30 °C.

Biofilm formation

The absorbance at 595 nm of each overnight subculture was adjusted to 0.1 by adding fresh culture medium (TSB or MRS broth supplemented with sucrose at 4 %, w/v). Two hundred microliters of each suspension were deposited in six wells of a black 96-well microplate (BD Falcon), and biofilms were grown for 48 h in static conditions at the appropriate temperature.

Protocol optimization for protein quantitation in solution

A commercial kit (FluoroProfile™, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was used for the assay. The protocol was slightly modified compared to the commercial instructions, in order to avoid signal saturation and to widen the linear range of the calibration curve. Briefly, in the working solution, the FluoroProfile™ reagent containing epicocconone (6S,9aS)-6-(hydroxymethyl)-3-[1Z,4E,6E,8E]-1-hydroxy-3-oxodeca-1,4,6,8-tetraen-1-yl]-9a-methyl-5,6-dihydro-2H-furo[3,2-g]isochromene-2,9(9aH)-dione) was concentrated twice with respect to the commercial instructions. More precisely, in all the experiments performed, the FluoroProfile™ reagent was diluted according to the volume ratio of 8:1:1 corresponding to pure water, the FluoroProfile™ reagent and the commercial provided buffer. The initial content of epicocconone in the commercial kit is not provided by the supplier.

A panel of six commercial proteins including bovine serum albumin and gelatin type B from bovine skin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and conalbumin, ribonuclease A, aldolase and thyroglobulin (GE Healthcare) was used to assess the sensitivity and specificity of the epicocconone reagent. Proteins were all prepared in sterile PBS 1× (10 mM (HPO₄⁻, H₂PO₄), pH 7.4, 2.7 mM KCl and 137 mM NaCl). Calibration curves were obtained by adding an equal volume (100 µl) of protein solutions (0 to 500 µg ml⁻¹) and epicocconone working solution in flat-bottomed, 96-well microplates. Plates were incubated in the dark at room temperature in a microplate reader (FluoSTAR, BMG Labtech). Fluorescence intensity was measured after 30 min, at an excitation/emission wavelength pair of 544/620 nm. All experiments were carried out in triplicate.

In order to reduce the test duration, bovine serum albumin (BSA) standards were also assayed after 2, 15, 30 and 100 min, and calibration curves were determined at each time. The slope and offset values were analyzed by the least square method, and the detection limit (limit of detection, LOD) and the quantification limit (limit of quantification, LOQ) were calculated and expressed in microgram equivalent BSA (µg eq BSA).

Detection and quantification limits were calculated as described by Shrivastava and Gupta (2011) and in agreement with the International Conference on Harmonization (ICH):

For a calibration equation: $Y=a+bx$

$$\text{LOD} = (3.3\text{SD}_a)/b$$

$$\text{LOQ} = (10\text{SD}_a)/b$$

where b is the slope of the calibration curve expressed as relative fluorescent units (RFU) per microgram and a is the offset (or y -intercept) with SD_a its standard deviation value.

Analysis of sugar and DNA interferences on protein quantitation

Glucose, sodium alginate salt from brown algae and dextran from *Leuconostoc* sp. (Mr ~40.000) were purchased from Sigma-Aldrich; stock solutions were prepared at 20 g l⁻¹ in PBS and stored at -20 °C until use. Lambda DNA (λDNA) was purchased from Invitrogen, Molecular Probes; stock solution was prepared at 2000 ng l⁻¹ in PBS. Binary solutions were prepared by adding concentrated sugar or λDNA stock solutions to BSA calibrated solutions. An equal volume of binary solutions (100 µl) was incubated for 30 min with the working solution containing epicocconone, and fluorescence was measured (544/620 nm).

A multiple regression analysis was performed to obtain an equation expressing the resulting fluorescence value as a function of the added component and BSA amounts:

$$\text{RFU}_{620 \text{ nm}} = a [\text{Component}] + b [\text{BSA}] + \text{offset}$$

The slope and offset were evaluated at a confidence interval of 95 % after calculation of their respective standard deviation values found in the Fisher test. The F-Snedecor parameter represents the ratio between the variance explained by the model and the residual variance. A Student's t test was performed to decide whether the model coefficients were significant. The t ratio was the ratio of the linear regression coefficients (a and b) to the standard error.

Quantification of ePN in biofilms

Quantification of proteins in bacterial biofilms produced in microtitre plates

After 48 h of biofilm formation with the three bacterial strains, each well was cleared out to remove planktonic cells. The cells adhering to the well surface were delicately rinsed once with 200 µl of sterile PBS before air-drying. Then, 100 µl of PBS and an equal volume of epicocconone working solution were added to each well. Fluorescence measurements (544/620 nm) were performed every 2 min for 100 min.

SAM for evaluation of matrix interference on ePN quantitation

The standard addition method (SAM) proposed by Zuriaga-Agusti et al. (2013) was used to evaluate possible interferences due to extracellular matrix components during the epicocconone protocol. One hundred microliters of BSA calibrated solutions was added to each 48-h biofilm, and 100 µL of epicocconone working solution was added and incubated

for 30 min as described in the optimized protocol. The parallelism between the calibration curves obtained from BSA assayed alone and from each biofilm after BSA addition was checked graphically.

Results

Quantification of proteins in solution with epicocconone reagent

The biofilm matrix is potentially composed of a wide diversity of proteins that may differ in the distribution and accessibility of the amino groups targeted by epicocconone. Six proteins with differences in terms of size, primary structure and lysine content were therefore tested for their reaction with epicocconone. Standard curves were generated by plotting fluorescence intensity against protein amount (Fig. 1). Ribonuclease A, the smallest protein (13 kDa), showed the greatest fluorescence signal for a similar protein range, from 1 to 50 μg . High-molecular-weight proteins such as aldolase (158 kDa) and thyroglobulin (669 kDa) showed low affinity for epicocconone. Thereafter, because of its intermediate size (67 kDa) and its affinity with epicocconone, BSA was chosen as the reference protein. Calibration experiments were carried out with BSA solutions, and further results were given as microgram equivalent BSA to express the protein amount in each sample.

In order to validate the assay on a protein concentration range up to 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1 to 50 μg per microplate well), the kinetics of epicocconone/BSA binding were monitored (Fig. 2). Whatever the BSA concentration, the kinetic curves showed a linear response of the fluorescence intensity with

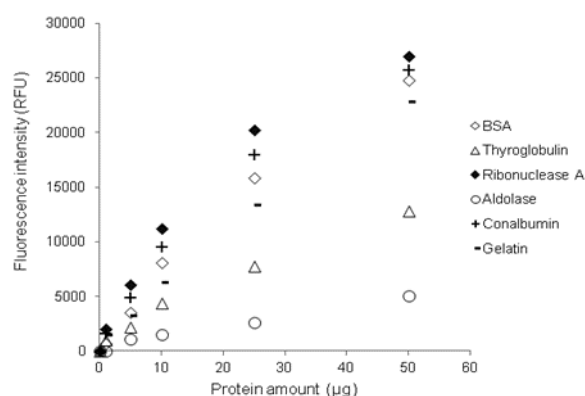


Fig. 1 Comparison of the fluorescence response of epicocconone towards six different commercial proteins. Proteins were dissolved in PBS and incubated for 30 min with an equal volume of the epicocconone reagent. Fluorescence intensity was measured at an excitation/emission wavelength pair of 544/620 nm

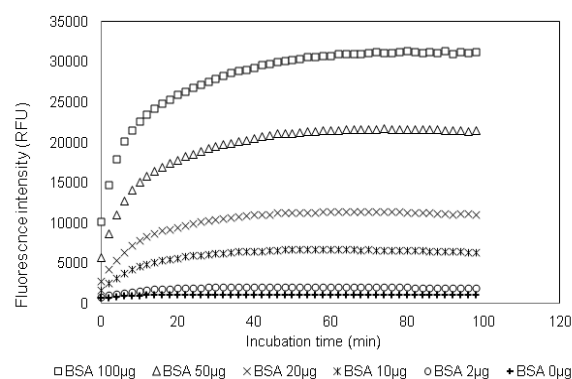


Fig. 2 Kinetics of epicocconone binding towards soluble BSA. BSA solutions were prepared in PBS and incubated with epicocconone at different final concentrations ranging from 0 to 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0 to 50 μg per well)

time during the first binding phase (0 to 10 min). After 15 min, a phase of decreased velocity was observed before the curves flattened out after 40 min and the kinetics remained stable up to 100 min. Thus, it can be concluded that epicocconone binds rapidly to proteins and is not limiting for BSA measurement in the experimental conditions used. Linear regression parameters were calculated for incubation times of 2, 15, 30 and 100 min to select the best incubation time for BSA quantification. A correct linear response between fluorescence signal and BSA amount was obtained for all the incubation times tested, and the values of the least squares linear regression parameters R^2 were all greater than 0.91 (Table 1). However, the slope values were higher when the fluorescence values were measured after 30 and 100 min (537 and 524 $\text{RFU } \mu\text{g}^{-1}$, respectively) with low LOQ values (0.71 and 0.86 μg , respectively), indicating a good sensitivity of the assay for long incubation times.

A 30-min incubation appeared to give a good compromise between a high sensitivity (higher slope, lower LOD and LOQ) and a short delay of the assay response. This assay duration was thus selected for later quantification of soluble or aggregated proteins.

Table 1 Linear regression parameters of epicocconone fluorescence intensity versus BSA amounts (0 to 50 μg per well) obtained for 2, 15, 30 and 100 min

Incubation time (min)	R^2	Slope ($\text{RFU } \mu\text{g}^{-1}$)	LOD (μg)	LOQ (μg)
2	0.994	282.3	0.4	1.2
15	0.964	476.2	0.3	0.8
30	0.958	537.4	0.2	0.7
100	0.914	523.6	0.3	0.9

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated using the calibration curve equation in the linear range defined between 0 and 50 μg of BSA

Evaluation of polysaccharide and DNA interferences on protein quantification in solution

In order to validate the implementation of the quantitation method on a complex biofilm matrix that may contain a great variety of polysaccharides, eventual interferences of carbohydrates on the epicocconone assay were investigated. Dextran, a neutral polymer of glucose produced in large quantities by *Weissella* sp. (Bounaix et al. 2009), and alginate, a capsular polymer of α -D-mannuronic and α -L-guluronic acids secreted by *Pseudomonas* sp. (Strathmann et al. 2002), were selected to investigate their possible interferences on the binding between the epicocconone and proteins. Because of its high occurrence among bacterial polysaccharides, glucose was also tested. Extracellular DNA (eDNA) is also described as one major component of biofilms. Bacterial strains as *P. aeruginosa* secrete eDNA which plays a critical role in biofilm formation and structure (Allesen-Holm et al. 2006). The assessment of the abundance and the structural role of eDNA was described in other bacteria, including *B. licheniformis* (Jakubovics et al. 2013). Following these observations, possible interference of DNA on protein quantification with epicocconone was analyzed.

Epicocconone binding was measured after 30 min in binary solutions containing both standardized concentrations of BSA (0 to 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and increasing concentrations of carbohydrates (0 to 4000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or of λ DNA (0 to 1000 ng ml^{-1}). Figure 3 illustrates the correlation plots obtained between fluorescence intensity of binary BSA-sugar or BSA- λ DNA solutions versus pure BSA solutions. The correlation curves were linear whatever the saccharide nature and for all the tested amounts (R^2 values were above 0.97). A correct protein quantification was observed when carbohydrate concentration in the binary solutions was lower than 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (i.e. 200 μg per well) whereas a weak deviation of the correlation slopes was observed for all the saccharides when their concentration reached 4000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in the BSA-sugar solutions. This result indicates a slight overestimation of the protein content in the presence of large amounts of sugar (between 200 and 400 μg per well). The correlation curves obtained for BSA- λ DNA binary solutions described the same tendency as pure BSA solutions and this, whatever the DNA tested concentration between 0 and 1000 ng ml^{-1} .

An in-depth study was carried out on statistical parameters corresponding to the multiple linear regression including BSA from 0 to 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (i.e. 0 to 25 μg per well), sugar addition from 0 to 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (i.e. 0 to 200 μg per well) and λ DNA addition from 0 to 1000 ng ml^{-1} (i.e. 0 to 100 ng per well). This statistical approach confirmed the absence of interference due to these potential matrix components. Deviation was nonsignificant for sugar amounts lower than 200 μg per well and for all the tested λ DNA amounts (Table 2). BSA contributions ("a" slope values in Table 2) were, respectively, 1340 times,

477 times, 205 times and 204 times higher than the slopes relative to glucose, dextran, alginate and λ DNA contributions (slopes "b" in Table 2). In addition, the Student's *t* test used in this study showed that the *t* ratios relative to BSA were all significant (*p* value 0.05) with values of 50.7, 59.7, 47.3 and 29.3 for glucose-BSA, dextran-BSA, alginate-BSA and λ DNA-BSA mixture, respectively. In contrast, *t* ratios relative to sugar and λ DNA contributions were nonsignificant, validating the absence of matrix component interferences.

The binary solutions containing the different sugars at 4000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (i.e. 400 μg of carbohydrates per well) were also tested using this multiple linear regression model: *t* ratios relative to sugar contributions were always higher than 2.00, revealing an interference due to each one of the sugars at high concentration (results not shown).

These assessments demonstrated that the presence of a large amount of glucose, neutral dextran or anionic alginate, up to eight times the protein amount, did not interfere with the epicocconone quantification method. The optimized protocol was thus validated.

In situ quantification of ePNs within bacterial biofilms

Three bacterial strains exhibiting morphological differences and contrasting extracellular matrix compositions were cultured on microplates for 48 h: (i) *P. aeruginosa*, a gram-negative strain producing complex ePS such as alginate, Psl and Pel (Strathmann et al. 2002) or amyloid fibres (Dueholm et al. 2010), (ii) *B. licheniformis*, a gram-positive strain isolated from the paper industry, and (iii) *W. confusa*, a gram-positive lactic acid bacterium producing dextran (Bounaix et al. 2009; Katina et al. 2009). The *B. licheniformis* used in this study was selected because of its marked ability to form robust biofilms with a very thick matrix.

The ePS evaluated on the three 48-h biofilms with the periodic acid-Schiff reaction (Kilcoyne et al. 2011) showed concentrations much lower than the interference limit established in the first part of this study. Carbohydrate amounts of 12.6 ± 2.1 , 13.5 ± 1.5 and 10.4 ± 0.7 $\mu\text{g eq}$ dextran per well were measured for biofilms *B. licheniformis*, *P. aeruginosa* and *W. confusa*, respectively. In addition, the extracellular DNA (eDNA) was assessed in the three biofilms using the PicoGreen® fluorescent staining kit (Quant-It™ PicoGreen® dsDNA assay kit, Invitrogen) as described by Tang et al. (2013). A calibration curve was obtained with λ DNA solutions in the range of 0 to 1000 ng ml^{-1} . eDNA amounts of 10.7 ± 1.2 , 11.0 ± 0.9 and 2.7 ± 0.6 ng per well were then obtained for *B. licheniformis*, *P. aeruginosa* and *W. confusa* biofilms, respectively. Finally, the absence of interference of cell wall proteins on ePN quantification was checked by applying the epicocconone assay on PBS-washed overnight cultures of each strain. The fluorescent response was not significantly different from the blank for cell densities lower than $1.4 \cdot 10^7$ CFU ml^{-1} ,

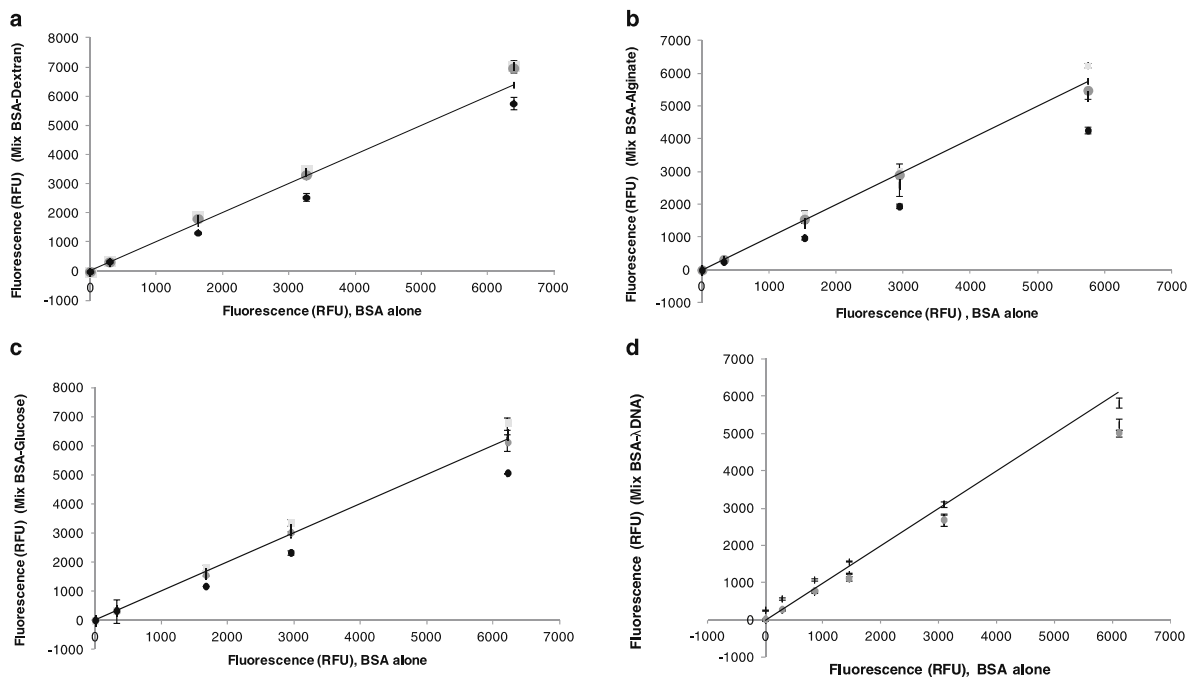


Fig. 3 Correlation plots of epicocconone fluorescence signal obtained with the BSA-dextran (a), BSA-alginate (b), BSA-glucose (c) and BSA- λ DNA (d) binary solutions compared to the solutions with BSA alone. BSA-containing samples (0 to 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ or 0 to 25 μg per well) were incubated for 30 min with epicocconone reagent and various sugar concentrations: BSA alone (white diamonds), BSA-sugar 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (light-grey squares), BSA-sugar 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (light-grey diamonds),

BSA-sugar 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (grey circles), BSA-sugar 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (dark stars) and BSA-sugar 4000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (dark circles). BSA- λ DNA binary solution responses (d) were obtained with BSA- λ DNA 10 ng ml^{-1} (dark stars), BSA- λ DNA 100 ng ml^{-1} (light-grey circles) and BSA- λ DNA 1000 ng ml^{-1} (dark diamonds). Standard deviations were obtained from three replicates

6.9 10^6 CFU ml^{-1} and 1.2 10^6 CFU ml^{-1} , respectively, for *P. aeruginosa*, *B. licheniformis* and *W. confusa*.

ePNs produced by the three strains could thus be quantified according to the optimized protocol with BSA as the protein standard: the fluorescence values were collected after 30 min, and no significant variation was detected up to 100 min (not shown).

The protein contents determined in each of the biofilms were somewhat different (Fig. 4), with a higher production for *B. licheniformis* and *P. aeruginosa* and a very low production for *W. confusa* biofilms. Amounts of ePN in *B. licheniformis* and *P. aeruginosa* reached 38.3 ± 7.1 and 22.1 ± 3.1 $\mu\text{g eq BSA}$,

respectively, whereas the protein amount in the *W. confusa* biofilm was estimated at 0.3 ± 0.1 $\mu\text{g eq BSA}$, which is lower than the LOQ determined previously for the quantification of soluble proteins (Fig. 4a). In order to consider possible limitations due to dye diffusion and/or accessibility of aggregated proteins, such in situ ePN quantification performed directly on the three biofilm matrices was validated using the SAM. The aim of the experiments was to obtain correct calibration curves (standard addition curves) after addition of three different, known quantities of standard BSA (10, 5 and 1 μg) to biofilm replicates. After addition of BSA to the biofilm samples, the epicocconone assay was performed, showing that the total ePN increased according

Table 2 Statistical analysis of sugar or DNA interferences on epicocconone/BSA binding with sugar-BSA mixtures (glucose, dextran and alginate, 0 to 200 μg per well) or DNA-BSA mixtures (λ DNA, 0 to 100 ng per well) with BSA amounts from 0 to 25 μg per well

Component added	a^a [BSA]	b^a [component]	Offset ^a	R^2	t ratio [BSA]	$^b t$ ratio [component]
Glucose	254.8	0.2	415.4	0.982	50.69	0.30
Dextran	272.1	0.7	475.4	0.987	59.69	0.98
Alginate	223.6	-1.1	614.6	0.979	47.25	-1.79
λ DNA	218.9	1.1	510.5	0.976	29.31	0.70

^a Determined with multiple linear regression model with two parameters: $\text{RFU} = a[\text{BSA}] + b[\text{component}] + \text{offset}$

^b t ratio values were obtained after Student's t test (with a p value of 0.05)

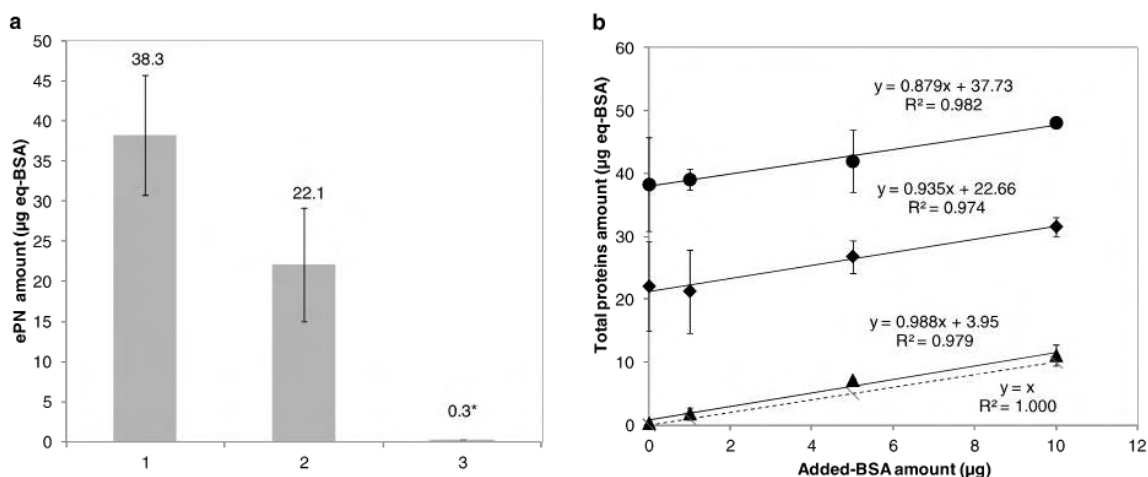


Fig. 4 In situ quantification of ePNs within bacterial biofilms. **a** ePN amounts measured in 48-h bacterial biofilms (1: *Bacillus licheniformis*; 2: *Pseudomonas aeruginosa*; 3: *Weissella confusa*) with the epicocconone assay calibrated with BSA standard curve. Standard deviations were obtained from six replicates. *Asterisk* indicates that the value is under the limit of quantification. **b** Standard addition curves for

the three 48-h-old biofilms (light-grey circles: *B. licheniformis*, dark-grey diamonds: *P. aeruginosa*, light-grey triangles: *W. confusa*) after addition of 10, 5 and 1 µg of BSA in comparison to theoretical standard calibration curve (dashed line with crosses). Standard deviations were obtained from three replicates

to the amounts of BSA added (Fig. 4b). Indeed, the standard curve (BSA alone) and the standard addition curves were tightly parallel, demonstrating a correct quantification of both the ePN and the added BSA within the three biofilms. Comparison of the slopes of the three standard addition curves with that of the theoretical standard curve (slope equal to 1) revealed low percentages of error for the three biofilm strains. Errors were, respectively, 3.24 and 1.64 % for *P. aeruginosa* and *W. confusa* while biofilms of *B. licheniformis* showed a slightly higher percentage of error (9.93 %). Such results confirmed that global matrix effects were not significant for an in situ application of the epicocconone method.

Discussion

In this study, a new method for in situ quantification of ePN within bacterial biofilms has been proposed. Epicocconone, a natural azaphilone dye that binds to primary amino groups of proteins, was used for the quantitative fluorimetric assay (Bell and Karuso 2003; Coghlan et al. 2005). The pro-fluorescent character of this molecule is of great interest because an intense response is observed only when epicocconone is bound to proteins and transformed into a highly fluorescent enamine, thus avoiding a rinsing step and leaching of the targeted proteins.

In order to establish the performance of the method for ePN quantification, an analytical development was performed at different levels. The specificity and sensitivity of the proposed protocol for protein quantification by epicocconone were first

validated in vitro on soluble proteins before implementation on biofilm matrices for the quantification of aggregated ePN.

Quantification of soluble proteins by epicocconone

Considering the functional and chemical diversity of proteins expressed in biological matrices, one important point concerns the ability of epicocconone to react with a wide range of proteins. This point was confirmed by the positive detection of six different proteins by epicocconone with a linear function over the same range of concentrations from 10 to 500 µg ml⁻¹ or from 1 to 50 µg per well. The proteins were all incubated in their soluble and native conformation, but their fluorescence response appeared different in terms of fluorescence intensity per microgram of proteins. The analysis of the lysine contents that were displayed between 3 % (thyroglobulin) and 10 % (BSA) did not fully explain the variation in epicocconone-specific response: for example, aldolase, a 158 kDa protein, showed very low affinity for epicocconone in spite of a lysine ratio of 7 %, while ribonuclease A exhibited a fourfold higher affinity with similar lysine content but smaller in size (13.7 kDa). Considering the six proteins tested, the high-molecular-weight proteins (thyroglobulin, aldolase) presented lower affinity for the reagent, suggesting a possible negative influence of size on epicocconone binding. This may be explained by a stronger conformation of long polypeptides preventing the accessibility of some lysine residues bearing the primary amines targeted by epicocconone (Panda et al. 2007). The protein-to-protein variation observed here is higher than the one reported by Mackintosh et al. (2005), who tested

epicoconone on 13 proteins and found a coefficient of variation of 16 %. This may be explained by the fact that these authors compared the specific response of 13 proteins that were all different from the six tested here. Interestingly, they observed that proteins with a very low isoelectric point (pI less than 5.2) exhibited a slightly reduced fluorescence intensity compared to BSA, while those with pI above 6.7 presented a higher affinity for epicoconone. With an intermediate pI value of 5.6 and because of its intermediate size and high lysine content of 10 %, BSA was chosen as the reference and protein amounts in the samples were expressed in microgram equivalent BSA.

Further analytical development was performed in order to determine the experimental conditions of the assay and the sensitivity and specificity of the epicoconone test for protein quantification. The kinetic of the epicoconone assay in a 96-well microplate revealed that a steady state was reached after 30 min for all the tested BSA amounts (from 1 up to 50 μg per well). Thus, after only 30 min of reaction, epicoconone provided quantification for soluble proteins with concentrations ranging from 10 to 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Furthermore, linear regression analysis revealed that the LOQ of the test was 0.7 μg with the reference protein BSA. The linearity of the commercial assay kit previously evaluated by Mackintosh et al. (2005) extended from 0.04 to 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The slight difference found with the linear range proposed in this study may be explained by the fact that epicoconone reagent was concentrated two times in order to avoid limitation and to widen the linear range of the calibration curve for further utilization on biofilm matrices. In addition, the fact that the fluorescence signal was stable and maintained for at least 100 min corroborates a covalent binding of epicoconone with proteins. As polysaccharides are major components of many bacterial biofilms, the epicoconone assay was performed in the presence of different types of carbohydrates in order to estimate their interference with protein quantification. Glucose, neutral dextran or anionic alginate were added separately to the BSA standard solutions, and no significant effect was detected for carbohydrate concentrations up to eight times higher than the protein concentration, i.e. reaching 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$. A slight overestimation of protein amounts (8 to 15 %) occurred only when the carbohydrate concentration reached 4000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, i.e. 400 μg per well. Mackintosh et al. (2005) tested a large panel of chemicals in protein solutions and determined the maximum thresholds beyond which protein measurement might be affected. As an example, the acceptable maximum level of sucrose was equal to 500 mM (171 mg ml^{-1}) that is 40 times higher than the sugar amounts tested in this study. Alginate and dextran solutions are known to become viscous at high concentrations in an aqueous medium (Lee and Mooney 2001; Tirtaatmadja et al. 2001). Modification of the biophysical properties of the binary solutions could explain such interference on the epicoconone-BSA reaction, which

was dependent on the viscosity and polarity of the microenvironment (Chatterjee et al. 2011; Panda et al. 2007). No interference was observed on protein quantification in the tested range of DNA concentrations (up to 1000 ng ml^{-1}) which is in agreement with the findings of Mackintosh et al. (2005) who found acceptable maximum level of 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for double-strand and single-strand DNAs.

The accurate quantification of proteins with the proposed epicoconone assay thus requires a previous quantitation of the total amount of sugar contained in the sample, which must be lower than 200 μg per well.

Quantification of ePNs by epicoconone in contrasted bacterial biofilms

ePNs of biofilms are of increasing interest, and various fluorochromes such as fluorescein isothiocyanate (FITC) and SYPRO Ruby™ have been developed to study these components, mainly by microscopy. As an example, Villena et al. (2010) used FITC to stain *Aspergillus niger* biofilms and found that the dye binds intensively to cell wall proteins. Previous internal experiments performed with SYPRO Ruby both on protein solutions and 48-h biofilms of *P. aeruginosa* revealed better performances for epicoconone than SYPRO Ruby (data not shown). This last stain showed a lower linearity of the response for soluble proteins, a lower sensitivity to detect small protein amounts and a lower compatibility towards a panel of chemicals. This is in agreement with previous studies that have proposed epicoconone to obtain an ultra-sensitive response for protein detection in gel electrophoresis (Mackintosh et al. 2003). In the same way, an accurate response was observed for protein quantification in solutions contaminated with high levels of chemicals and corresponding to quite complex matrices such as yeast extract (Mackintosh et al. 2005).

ePNs produced by the three strains were quantified with the epicoconone assay according to the optimized protocol, with soluble BSA as the protein standard. Possible interference due to physical and/or chemical limitation of epicoconone binding was tested directly on the 48-h-old biofilms developed in a 96-well microplate by addition of BSA standard solutions. This assay was carried out according to the standard addition method (SAM) proposed by Zuriaga-Agusti et al. (2013) for the quantification of proteins and carbohydrates in complex biological samples. Correct quantification of both secreted ePNs and added BSA was obtained for the three biofilms, indicating no significant limitations for in situ application of the epicoconone method up to 50 $\mu\text{g eq BSA}$ per well.

The ePN amounts quantified in *B. licheniformis* and *P. aeruginosa* reached 38.3 ± 7.1 and 22.1 ± 3.1 $\mu\text{g eq BSA}$, respectively. For *W. confusa*, direct application of the epicoconone protocol could not give accurate quantification of ePNs that were below the detection limit of the assay.

However, the addition of standardized BSA amounts to the biofilm matrix overcame this limitation, suggesting that SAM may be chosen for in situ quantification of protein density below 0.7 μg per well. This additional step can be systematically included in the protocol because of its simplicity and also because ePN quantification is calculated with a standard addition curve including three independent BSA additions on biofilm replicates.

Because of their higher protein density, quantification of ePNs in the two other biofilms could be performed with a negligible error using either the direct or the SAM method, as both gave similar results. Concerning *P. aeruginosa* biofilms, the amount of 22.1 μg of eq BSA per well obtained in situ is lower than the value of 52 μg eq BSA per well obtained in vitro by Bridier et al. (2011), who quantified EPS from the same *P. aeruginosa* strain ATCC 15442 after scraping 24-h biofilms formed in 96-well microplates. EPS were then collected after mechanical disruption of the biofilm matrix, and extracted proteins were measured using the Bradford assay with BSA as the standard. Both these data proved the presence of quantifiable ePNs in *P. aeruginosa* biofilms, which appear to be composed not only of alginate-like polymers. This is in agreement with an analysis of the matrix proteome associated with *P. aeruginosa* PAO1 biofilm, showing that at least 178 different proteins were present in the extracellular matrix (Toyofuku et al. 2012); in that study, the proteins were identified by the proteomic approach, but their quantitative representation within the matrix remained unknown.

B. licheniformis displayed a relatively large amount of proteins (39.3 μg eq BSA/well), and from one point of view, this assessment could be related to the presence of gamma polyglutamate (γ -PGA), a polymer of glutamate synthesized by many *Bacillus* sp. including *B. licheniformis* (Candela and Fouet 2006). Assays of PGA solutions with epicocconone were performed as supplementary experiments, and no fluorescence response was detected, confirming that only primary amines are targeted by the reagent. A more likely explanation is that the extracellular matrix of the *B. licheniformis* biofilm studied here contained amyloid fibres as described for the model organism *B. subtilis* (Romero et al. 2010). In agreement with this hypothesis, the involvement of the amyloid TasA protein in biofilm architecture has recently been extended to other *Bacillus* members including *B. licheniformis* (Pasvolsky et al. 2014). Voigt et al. (2009) showed that flagellin protein Hag was the main protein secreted by *B. licheniformis* in response to glucose and nitrogen starvation. Moreover, Larsen et al. (2007) isolated a *B. licheniformis* strain in a biofilm sampled from a thermophilic digester that was characterized as an amyloid producer. The epicocconone method proposed here may constitute a good alternative for the quantification of total proteins including strongly aggregated amyloid fibres.

In summary, this study demonstrates the feasibility of ePN quantification by epicocconone in biofilm matrices containing

contrasting EPS that differ in their distribution and biochemical composition. However, due to the fact that quantification is performed with reference to a single protein, care should be taken when comparing ePN in different biofilms. A molecule bearing the elementary amine residue might constitute a more convenient reference, and previous experiments performed with epicocconone and butylamine have confirmed the feasibility of this strategy (Chatterjee et al. 2011; Coghlan et al. 2005). Another analytical development may concern the use of epicocconone for microscopic analysis of the 3-D biofilm structure.

In conclusion, an epicocconone-based assay for ePN quantification in biofilm matrices was developed in this study. The purpose was to quantify ePN while avoiding extraction procedures in order to achieve accurate evaluation of ePN density. A great sensitivity was achieved, and the dynamic range of the calibration curve, obtained with a BSA standard, showed a linear correlation. Neither carbohydrates nor eDNA appeared to have effect on the quantitative analysis of soluble proteins by epicocconone for concentrations lower than 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 1000 ng ml^{-1} , respectively. This method is applicable to biofilms developed with different bacterial strains and displaying different sugar/protein ratios. Although the proposed assay did not allow absolute determination of ePN amounts, it nevertheless gives interesting information on the quantitative distribution of ePN in a biofilm matrix. For example, ePN distribution is very low in *W. confusa* compared to *B. licheniformis* or *P. aeruginosa* matrix. This tool may be of great interest for quantitative analysis of the kinetics of ePN production or degradation in response to environmental conditions. Since ePS may be the other major components of bacterial biofilms, the concomitant measurement of both ePN and ePS would give a quantitative fingerprint of the biofilm composition. In addition, these results open up the field of microscopy and suggest promising applications in real-time imaging turned towards the understanding of some bacterial mechanisms. The pro-fluorescent character, the small size and, above all, the sensitivity of epicocconone towards protein will be precious for this purpose.

Acknowledgments This research was supported by a grant from the Midi-Pyrénées Regional Council and funding from Toulouse University, France. The authors are grateful to L. Besse, I. Ribera, E. Auret and L. Labadie for their technical help. This study is dedicated to this last contributor who left us too soon.

References

- AFNOR (2006) NF EN 1040 (2006-04-01). Chemical disinfectants and antiseptics—quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics—test method and requirements (phase 1). AFNOR, Paris
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms.

- Mol Microbiol 59:1114–1128. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x
- Bell PJJ, Karuso P (2003) Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. J Am Chem Soc 125:9304–9305. doi:10.1021/ja035496+
- Bounaix M-S, Gabriel V, Morel S, Robert H, Rabier P, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C (2009) Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. J Agric Food Chem 57:10889–10897. doi:10.1021/jf902068t
- Bourven I, Costa G, Guibaud G (2012) Qualitative characterization of the protein fraction of exopolymeric substances (EPS) extracted with EDTA from sludge. Bioresour Technol 104:486–496. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.033
- Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Greub G, Thomas V, Briandet R (2011) Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 55:2648–2654. doi:10.1128/AAC.01760-10
- Bridier A, Meylheuc T, Briandet R (2013) Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). Micron 48:65–69. doi:10.1016/j.micron.2013.02.013
- Burton E, Yakandawala N, LoVetri K, Madhyastha MS (2007) A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. J Ind Microbiol Biotechnol 34:1–4. doi:10.1007/s10295-006-0086-3
- Candela T, Fouet A (2006) Poly- γ -glutamate in bacteria. Mol Microbiol 60:1091–1098. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x
- Chatterjee S, Burai TN, Karuso P, Datta A (2011) Ultrafast dynamics of epicocconone, a second generation fluorescent protein stain. J Phys Chem A 115:10154–10158. doi:10.1021/jp205634g
- Coghlan DR, Mackintosh JA, Karuso P (2005) Mechanism of reversible fluorescent staining of protein with epicocconone. Org Lett 7:2401–2404. doi:10.1021/ol050665b
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 8:881–890. doi:10.3201/eid0809.020063
- Dueholm MS, Petersen SV, Sønderkær M, Larsen P, Christiansen G, Hein KL, Enghild JJ, Nielsen JL, Nielsen KL, Nielsen PH, Otzen DE (2010) Functional amyloid in *Pseudomonas*. Mol Microbiol 77:1009–1020. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07269.x
- Flemming HC (2011) The perfect slime. Colloids Surf B: Biointerfaces 86:251–259. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.04.025
- Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG (2013) Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. Lett Appl Microbiol 57:467–475. doi:10.1111/lam.12134
- Katina K, Maina NH, Juvonen R, Flander L, Johansson L, Virkki L, Tenkanen M, Laitila A (2009) In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. Food Microbiol 26:734–743. doi:10.1016/j.fm.2009.07.008
- Kilcoyne M, Gerlach JQ, Farrell MP, Bhavanandan VP, Joshi L (2011) Periodic acid–Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format. Anal Biochem 416:18–26. doi:10.1016/j.ab.2011.05.006
- Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH (2007) Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. Environ Microbiol 9:3077–3090. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01418.x
- Larsen P, Olesen BH, Nielsen PH, Nielsen JL (2008) Quantification of lipids and protein in thin biofilms by fluorescence staining. Biofouling 24:241–250. doi:10.1080/08927010802040255
- Lee KY, Mooney DJ (2001) Hydrogels for tissue engineering. Chem Rev 101:1869–1880
- Mackintosh JA, Choi HY, Bae SH, Veal DA, Bell PJ, Ferrari BC, Van Dyk DD, Verrills NM, Paik YK, Karuso P (2003) A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics 3:2273–2288. doi:10.1002/pmic.200300578
- Mackintosh JA, Veal DA, Karuso P (2005) Fluoroprofile, a fluorescence-based assay for rapid and sensitive quantitation of proteins in solution. Proteomics 5:4673–4677. doi:10.1002/pmic.200500095
- Marcato-Romain CE, Pechaud Y, Paul E, Girbal-Neuhauser E, Dossat-Létisse V (2012) Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. Biofouling 28:305–314. doi:10.1080/08927014.2012.673122
- Neu TR, Lawrence JR (2014) Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. Adv Biochem Eng Biotechnol. doi:10.1007/10_2014_272
- Otzen D, Nielsen PH (2008) We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. Cell Mol Life Sci 65:910–927. doi:10.1007/s00018-007-7404-4
- Panda D, Khatua S, Datta A (2007) Enhanced fluorescence of epicocconone in surfactant assemblies as a consequence of depth-dependent microviscosity. J Phys Chem B 111:1648–1656
- Pasvolsky R, Zakin V, Ostrova I, Shemesh M (2014) Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus species*. Int J Food Microbiol 181:19–27. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.013
- Ras M, Lefeuvre D, Derlon N, Paul E, Girbal-Neuhauser E (2011) Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. Water Res 45:1529–1538. doi:10.1016/j.watres.2010.11.021
- Robert H, Gabriel V, Fontagné-Faucher C (2009) Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. Int J Food Microbiol 135:53–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R (2010) Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. Proc Natl Acad Sci 107:2230–2234
- Sheng G-P, Yu H-Q, Li X-Y (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. Biotechnol Adv 28:882–894. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.001
- Shrivastava A, Gupta V (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chronicles Young Sci 2:21. doi:10.4103/2229-5186.79345
- Strathmann M, Wingender J, Flemming H-C (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbiol Methods 50:237–248. doi:10.1016/S0167-7012(02)00032-5
- Tang L, Schramm A, Neu TR, Revsbech NP, Meyer RL (2013) Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. FEMS Microbiol Ecol 86:394–403. doi:10.1111/1574-6941.12168
- Tirtaatmadja V, Dunstan DE, Boger DV (2001) Rheology of dextran solutions. J Non-Newtonian Fluid Mech 97:295–301. doi:10.1016/S0377-0257(00)00226-3
- Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L (2012) Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. J Proteome Res 11:4906–4915. doi:10.1021/pr300395j
- Villena GK, Fujikawa T, Tsuyumu S, Gutiérrez-Correa M (2010) Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. Bioresour Technol 101:1920–1926. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.036
- Voigt B, Antelmann H, Albrecht D, Ehrenreich A, Maurer K-H, Evers S, Gottschalk G, van Dijk JM, Schweder T, Hecker M (2009) Cell physiology and protein secretion of *Bacillus licheniformis* compared to *Bacillus subtilis*. J Mol Microbiol Biotechnol 16:53–68. doi:10.1159/000142894
- Wingender J, Flemming HC (2010) The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 8:623–633. doi:10.1038/nrmicro2415
- Zuriaga-Agustí E, Bes-Piá A, Mendoza-Roca JA, Alonso-Molina JL (2013) Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR activated sludge flocs in view of improving EPS determination. Sep Purif Technol 112:1–10. doi:10.1016/j.seppur.2013.03.048

I.3. Résultats complémentaires : détection des fibres amyloïdes par l'épicoconone

A l'issue de ce développement analytique, une analyse complémentaire a été réalisée afin de vérifier que le dosage à l'épicoconone permettait de quantifier les fibres amyloïdes en tant qu'entité protéique.

Pour ce faire, le dosage a été appliqué sur une protéine capable de constituer des fibres amyloïdes, la kappa-caséine (κ CN). Deux gammes de κ CN (0 à 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ont été préparées :

- Une gamme de κ CN dite native a été réalisée en tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7.5) ;
- Une gamme de κ CN dite fibrillaire a été réalisée dans du tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7.5) contenant 20 mM de dithiothreitol (DTT), 2 mM d'EDTA afin de permettre la fibrillation de la protéine (voir détails expérimentaux à la **page 199**).

Les résultats obtenus confirment que la réponse en fluorescence du dosage épicoconone est proportionnelle à la concentration en κ -CN, qu'elle soit sous forme native ou fibrillaire (FIGURE C-1). De plus, la différence entre les pentes des deux droites de calibration a été évaluée en déterminant la statistique de Fisher (F) grâce au logiciel de statistiques GraphPad PRISM 5.00. Cette analyse statistique a montré que la différence entre les deux pentes n'est pas significative ($\alpha = 0,05$), confirmant que le marqueur épicoconone permet la quantification des protéines totales, fibres amyloïdes incluses.

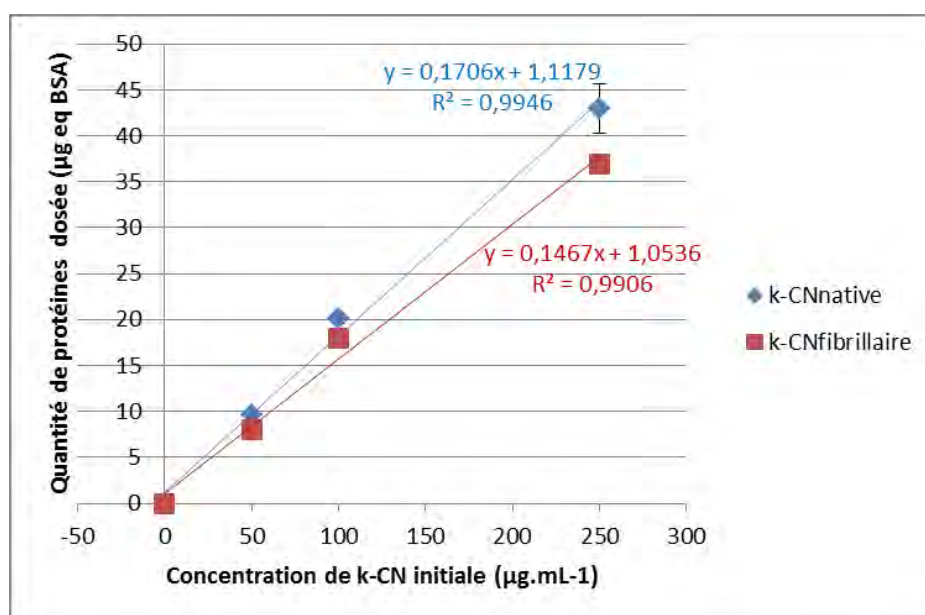


FIGURE C-1. Quantification de solution de κ CN sous formes native et fibrillaire par le dosage à l'épicoconone

II. Quantification *in situ* des exopolysaccharides (ePS)

La revue bibliographique a permis de confirmer que les lectines sont les marqueurs fluorescents les plus couramment utilisés pour détecter et localiser, par microscopie confocale ou à épifluorescence, les exopolysaccharides au sein de biofilms bactériens.

Les lectines sont des protéines qui présentent une forte affinité pour des résidus de sucres déterminés et permettent donc de détecter certains des exopolysaccharides présents dans la matrice des biofilms. Comme la composition exacte en polysaccharides des biofilms modèles retenus n'est pas encore élucidée et, dans l'objectif d'une quantification la plus exhaustive possible des ePS des biofilms, les lectines constituent un bon outil pour identifier les résidus de sucres majoritaires de chaque matrice. De plus, les lectines présentent une forte sensibilité et permettent le marquage de sucres même présents en faible quantité. En effet, Leriche et *al.* (Leriche et al. 2000) ont caractérisé les polysaccharides de 10 souches bactériennes en microplaque en utilisant la technique ELLA (enzyme-linked lectinsorbent assay) développée par Thomas et al. (1997). Dans leur étude, le marquage des biofilms par la lectine Concanavaleine A (α -D-glucose et α -D-mannose) ou la Wheat-Agglutinin A (glcNAc₂ et NeuNAc) conjuguées à une peroxydase a permis de quantifier la production d'exopolysaccharides chez des biofilms de 1 jour et de 4 jours mais également d'identifier les sucres majoritaires présents dans chacune des matrices. Les lectines réunissent donc les critères de spécificité, de sensibilité et de transposabilité recherchés dans le cadre de cette étude. Cependant, il semble difficile de remplir le critère d'exhaustivité qui s'oppose, dans le cas des lectines, à celui de leur spécificité pour des résidus de sucres définis. Les lectines ne seront de ce fait pas envisagées pour le développement d'une méthode de dosage *in situ*.

En revanche, une étude préliminaire s'est attachée à analyser le marquage des biofilms formés par les trois souches modèles de l'étude (**paragraphe II.1**) au moyen de différentes lectines de façon à préciser la nature des sucres présents dans les matrices et à orienter le choix d'un étalon le plus pertinent possible pour le développement du dosage *in situ* des polysaccharides dans la suite du travail.

Outre l'emploi des lectines, la littérature mentionne l'utilisation du réactif de Schiff (PAS) pour la détection *in situ* des polysaccharides de biofilms en microscopie à lumière blanche ou à épifluorescence et microscopie confocale (Haase et al. 2006; Percival et al. 2012; Janissen et al. 2015). De plus, Kilcoyne et al. (2011) ont développé une méthode de quantification *ex situ* en microplaque permettant un dosage d'un grand nombre de sucres et de polymères glycosylés tels

que des glycoprotéines. De faibles quantités de sucres ont ainsi pu être dosées (environ 2 µg par puits) et la méthode n'a pas été limitée par les risques d'interférences possiblement dues aux protéines. Le réactif de Schiff répond donc à l'ensemble des critères du cahier des charges : spécificité, sensibilité, exhaustivité, changement d'échelle et transposabilité. La stratégie expérimentale a donc été appliquée avec ce réactif et est présentée dans le **paragraphe II.2 et l'article 2**.

II.1 Etude préliminaire : caractérisation des ePS des biofilms modèles au moyen de lectines et choix d'un étalon

Cette étude préliminaire a été conduite afin de déterminer quel(s) type(s) de sucres est/sont majoritaire(s) dans les matrices des biofilms des 3 souches modèles, et si il existe un dénominateur commun permettant de trouver l'étalon le mieux adapté pour le dosage des exopolysaccharides développé par la suite. Cette caractérisation des ePS présents dans les matrices a été faite grâce au co-marquage des biofilms modèles par des couples de lectines.

Les biofilms de *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Weissella confusa* ont été formés sur des coupons en polycarbonate pendant 48h selon le protocole décrit dans la **partie B** du manuscrit (**page 141**). Ensuite, les biofilms ont été marqués en couplant des lectines, choisies par rapport à leur(s) cible(s) glycosidique(s) respectives (TABLEAU C-1). Ainsi, les couples de lectines ont été formés de manière à couvrir, à chaque fois, différents types de sucres. Les solutions de lectines (Sigma Aldrich) ont été mélangées deux par deux à une concentration finale de 100 µg.mL⁻¹, puis 100µL de chaque solution-mix de lectines ont été déposés sur le coupon qui a été placé à l'obscurité pendant 20 minutes. Par la suite les coupons ont été rincés trois fois avec du PBS avant d'être marqués avec une solution de DAPI à 0,1 µg.mL⁻¹ pendant 10 minutes. Les échantillons ont été observés au microscope confocal à balayage dans les conditions décrites dans la **partie B, (page 141)** avec l'objectif 63x à immersion à huile plan-Apochromat avec une ouverture numérique à 1,4.

TABLEAU C-1. Lectines utilisées, fluorochromes conjugués et cibles biochimiques.

Lectines	Fluorochrome conjugué	Cible	Couplage possible
PNA (Peanut Agglutinin de <i>Arachis hypogea</i>)	TRITC	β -gal(1 \rightarrow 3)galNAc	PNA-WGA, PNA-LEA
WGA (Wheat Germ Agglutinin de <i>Triticum vulgare</i>)	FITC	(glcNAc) ₂ , NeuNAc	PNA-WGA
BS-I (<i>Bandeiraea simplicifolia</i>)	TRITC	α -gal, α -galNAc	BSI-ConA
ConA (Concanavalin A)	FITC	α -man, α -glc	BSI-ConA
UEA-I (<i>Ulex europaeus</i>)	TRITC	α -L-fucose	UEA-LEA
LEA (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	FITC	(glcNAc) ₃	UEA-LEA, PNA-LEA

Il existe des différences notables de marquage des biofilms de *Bacillus licheniformis* selon le couple de lectines utilisé (FIGURE C-2). La lectine WGA qui a une forte affinité pour les groupements (glcNAc)₂ et NeuNAc semble être celle qui marque le mieux les exopolysaccharides de la souche avec un signal de fluorescence intense. A l'inverse, les lectines PNA, UEA et LEA ne sont pas adaptées pour la visualisation de la matrice extracellulaire de *B. licheniformis*. Les lectines ConA et BS-I ont également permis de marquer les ePS de la matrice avec des taux de recouvrement intermédiaires et une intensité plus faible comparé à WGA. Il est donc possible de supposer que les ePS de la souche de *B. licheniformis* sont majoritairement composés de (glcNAc)₂, NeuNAc, α -mannose ou α -glucose.

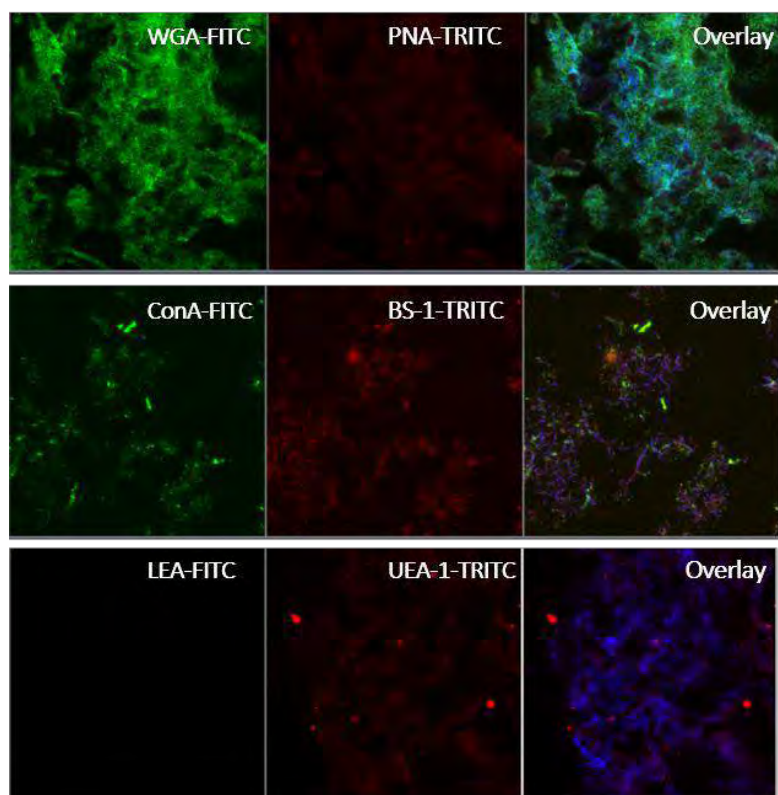


FIGURE C-2. Biofilms de 48h de *Bacillus licheniformis* marqués par différents couples de lectines (en ligne) : WGA-PNA, ConA-BS-I, LEA-UEA-I. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu)

En ce qui concerne les ePS de la souche *Pseudomonas aeruginosa*, les lectines WGA, PNA et UEA semblent marquer les mêmes structures au sein du biofilms tandis que la lectine ConA marque les ePS qui sont étroitement liés aux cellules avec une forte intensité (FIGURE C-3). Les ePS de la souche *P. aeruginosa* seraient ainsi constitués des groupements β -gal(1 \rightarrow 3)galNA, (glcNAc)₂, NeuNAc et de α -L-fucose.

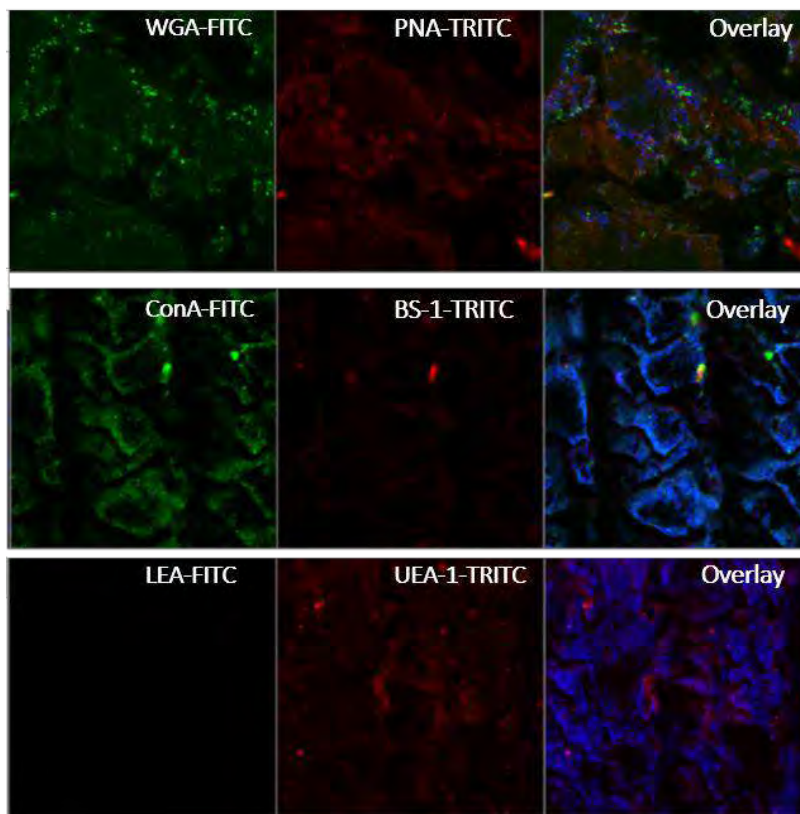


FIGURE C-3. Biofilms de 48h de *Pseudomonas aeruginosa* marqués par différents couples de lectines (en ligne) : WGA-PNA, ConA-BS-I, LEA-UEA-I. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu)

Enfin, pour la souche *Weissella confusa*, toutes les lectines semblent marquer de manière homogène tous les ePS de la matrice (FIGURE C-4). Seule la PNA présente un faible taux de recouvrement du coupon et une faible intensité.

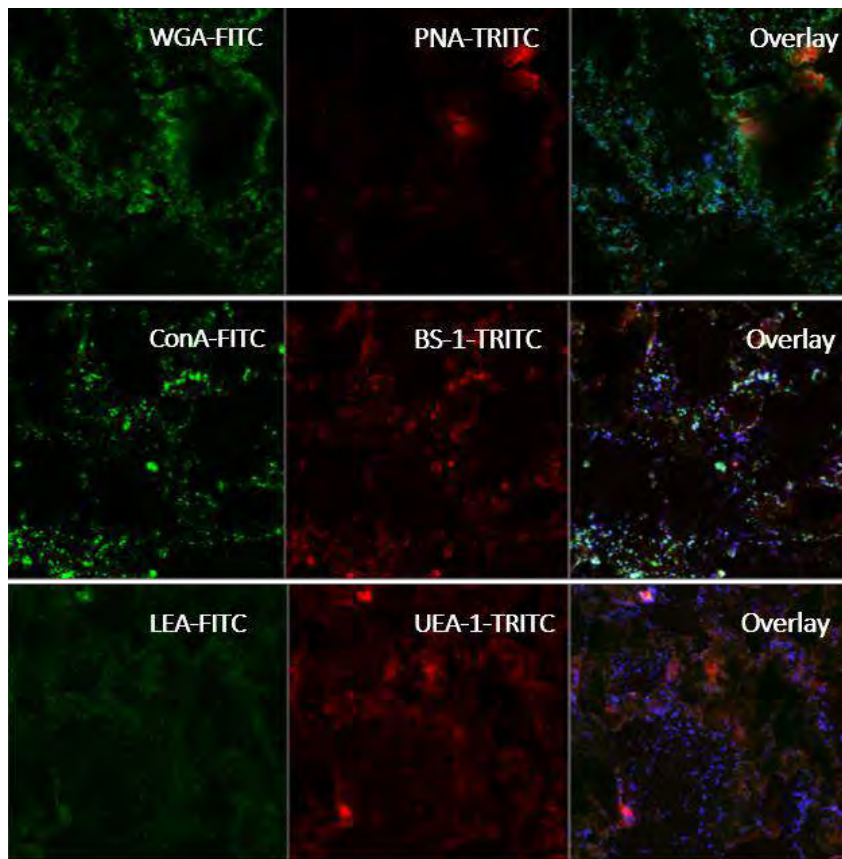


FIGURE C-4. Biofilms de 5 jours de *Weissella confusa* marqués par différents couples de lectines (en ligne) : WGA-PNA, ConA-BS-I, LEA-UEA-I. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu)

Dans le cadre de l'étude, le biofilm de *W. confusa* a été formé en présence de saccharose (4% m/v) durant la croissance. Des études précédentes (Bounaix et al. 2010; Marchal et al. 2012) ont mis en évidence que ces conditions de croissance engendraient la formation de biofilms produisant majoritairement du dextrane, un homopolymère de glucose. Bien que cela soit en concordance avec la forte réponse de la ConA qui se lie aux résidus α -D-glc, les réponses, non-négligeables des autres lectines, semblent indiquer que cette spécificité peut être sujette à des affinités croisées liées notamment au fait que leurs cibles sont souvent retrouvées au niveau des surfaces cellulaires (Imberty et al. 2004; Blanchard et al. 2014).

En effet, la spécificité dite primaire des lectines est celle qui permet de les classer selon le résidu monosaccharidique pour lequel elles ont la plus forte affinité (Lis and Sharon 1998). Ainsi une grande parties des lectines sont classées selon cinq groupes : celles qui ont une affinité forte pour le Mannose (Man), ou le Galactose (Gal/GalNAc), ou le N-acetylGlucosamine (GlcNAc), ou le Fucose et enfin l'Acide Neuraminique (NeuAc). Ces monosaccharides et leurs dérivés sont souvent ceux qui sont retrouvés au niveau des surfaces cellulaires. Il arrive que les similarités structurales

entre monosaccharides soient déterminantes pour la spécificité des lectines. A titre d'exemple, la plupart des lectines qui reconnaissent le Galactose se lient aussi au GalNAc mais également les lectines bactériennes telles PA-IIIIL (anciennement LecB de *Pseudomonas aeruginosa*) peuvent reconnaître le mannose et le fucose (Imberty et al. 2004; Blanchard et al. 2014). A l'inverse certaines lectines peuvent présenter une spécificité anomérique très étroite et distinguer la configuration α de la β du carbone C1 des monosaccharides. Ainsi, la spécificité des lectines est très variable et, malgré leur capacité à marquer spécifiquement tout ou partie des ePS d'un biofilm, dans le cadre d'une étude globale de la matrice où l'objectif est de considérer l'ensemble des ePS du biofilm, il est nécessaire d'utiliser une autre méthode pour éviter de sous-estimer la proportion d'ePS au sein de la matrice.

Enfin, la taille relativement importante de ces protéines (à titre d'exemple la ConA est retrouvée sous-forme d'un homotétramère de 106kDa dont chaque monomère peut lier un résidu mannose ou glucose) peut entraîner des limitations diffusionnelles de ces lectines au cœur de la matrice.

La caractérisation des biofilms des trois souches modèles par ce panel de lectines confirme que l'utilisation d'une seule lectine ne suffit pas à décrire la composition ni la teneur en polysaccharides d'une matrice de biofilm bactérien, en accord avec les précédents travaux de Leriche et al. (Leriche et al. 2000). Le critère d'exhaustivité ne peut donc pas être rempli par une lectine, et il conviendrait de procéder à des co-marquages pour avoir une vue la plus globale possible de la composition de la matrice en ePS.

Par ailleurs, ces résultats ont permis d'identifier les sucres communs aux trois matrices (TABLEAU C-2) : la N-acétyl-glucosamine (glcNAc) qui est un des composants des parois bactériennes, l'acide neuraminique (NeuAc) - un acide sialique souvent associé aux glycoprotéines, ainsi que le mannose et le glucose. Ainsi, dans le cadre du développement d'un dosage *in situ* des ePS, il sera intéressant de choisir un étalon dont la structure biochimique comprendra un ou plusieurs des résidus communs aux matrices des trois souches modèles.

Une autre alternative serait d'utiliser une méthode permettant le marquage de toutes les classes de sucres pour éviter de mésestimer la proportion d'ePS au sein des matrices complexes de biofilms; c'est ce qui est développé dans le paragraphe qui suit.

TABLEAU C-2. Résidus glycosidiques reconnus par les lectines sur les trois biofilms modèles

	WGA	PNA	BS-I	ConA	UEA	LEA
<i>B. licheniformis</i>	(glcNAc) ₂ NeuAc		α-gal α-galNAc	α-glc α-man		
<i>P. aeruginosa</i>		Bgal(1→3)galNAc			α-L-fucose	
<i>W.confusa</i>			α-gal α-galNAc			(glcNAc) ₃

II.2 Présentation de l'article 2 : développement et validation d'une méthode de dosage *in situ* des ePS

Le travail de développement d'un dosage *in situ* des exopolysaccharides de biofilms modèles est présenté dans l'article 2, intitulé "**Quantification of biofilm exopolysaccharides using an *in situ* assay with Periodic Acid Schiff reagent**".

Suite à l'étude préliminaire, et afin de pouvoir réaliser une quantification la plus exhaustive possible des ePS des biofilms des trois souches modèles, la stratégie expérimentale a été déployée en utilisant le réactif de Schiff. Ce réactif a été choisi en alternative à l'emploi des lectines car il réunit l'ensemble des critères du cahier des charges (**page 151**).

La première étape du développement analytique, effectué sous un format microplaque 96 puits, a été de comparer les réponses de deux polysaccharides susceptibles de constituer un calibrant de dosage : l'alginate et le dextrane. A partir de solutions étalons préparées dans de l'eau ultra-pure, la réaction de Schiff a été déclenchée par un ajout d'acide périodique à 0,5% (m/v) dilué dans une solution d'acide acétique à 5%. Cette première étape d'oxydation a duré 30 minutes à température ambiante. Par la suite, le réactif de Schiff a été ajouté et la cinétique d'apparition de la coloration a été suivie par mesure d'absorbance pendant 2 heures. Le signal ainsi obtenu a été comparé pour les deux solutions de sucres testées. Le dextrane, un homopolymère de glucose, est celui qui a démontré la cinétique d'oxydation la plus rapide : quelle que soit la concentration, le signal s'est stabilisé au bout de deux heures tandis que le plateau n'était pas atteint après quatre heures pour la concentration la plus forte d'alginate. De plus, d'après les résultats de l'étude préliminaire réalisée avec les lectines, le glucose est un des sucres communs aux matrices des trois souches modèles, si bien que le dextrane a été choisi comme étalon pour la suite du développement. Par ce choix, et en rapportant la quantité équivalente de dextrane au nombre de résidus glucose (plus exactement, α-D-glucopyranosyl), il sera également possible de comparer

les performances du dosage développé avec les méthodes classiques qui utilisent le glucose comme étalon.

L'absence d'interférence venant des autres composés du biofilm tels que les protéines, les cellules et l'ADN a été vérifiée. Les tests statistiques appliqués aux essais d'interférences ont permis d'écarter la contribution des protéines ($p\text{-value}=0,1639$), et des acides nucléiques ($p\text{-value}=0,2926$). Le même protocole a également été testé sur des suspensions bactériennes des trois souches et les résultats ont permis de déterminer les valeurs seuils en-dessous desquelles le dosage n'est pas biaisé par la réponse des cellules. Ainsi, il est possible d'appliquer le dosage PAS en étant sûr de s'affranchir de la réponse des cellules pour des densités cellulaires inférieures à 10^7 CFU.mL⁻¹ ($p\text{-value}=0,1390$) pour *P. aeruginosa* et 10^5 CFU.mL⁻¹ pour *B. licheniformis* et *W. confusa* ($p\text{-value}$ de 0,6964 et 0,6711 respectivement). Enfin, pour vérifier l'absence d'un effet de la matrice dans sa globalité, la méthode des ajouts dosés (Zuriaga-Agustí et al. 2013) a été appliquée en ajoutant des quantités connues de dextrane sur les biofilms avant de procéder au dosage *in situ*. Les pentes des droites d'ajouts (biofilms + dextrane) ont été comparées à celle de la droite de calibration en solution et aucune différence significative n'a été détectée après un test statistique ($p\text{-value}=0,1079$).

Ces séries de tests ont finalement permis d'écarter tout risque d'interférence du dosage des exopolysaccharides des trois biofilms et ainsi de valider son application au dosage *in situ* aux échantillons sans étape préalable d'extraction. Cette méthode a ainsi permis de quantifier les ePS de la matrice et d'apprécier l'évolution de la production d'ePS pour des biofilms de 24 et 48 heures. En effet, à 24h, le biofilm de *B. licheniformis* a présenté la plus faible teneur en sucres (rapportée au puit) avec $4,39 \pm 1,54 \mu\text{g}_{\text{-eqDextrane}}$ contre $5,62 \pm 0,75 \mu\text{g}_{\text{-eqDextrane}}$ pour *W. confusa* et $7,14 \pm 1,68 \mu\text{g}_{\text{-eqDextrane}}$ pour *P. aeruginosa*. Au bout de 48h, une diminution significative a été observée chez *W. confusa* ($2,50 \pm 0,33 \mu\text{g}_{\text{-eqDextrane}}$) tandis que la quantité d'ePS a augmenté considérablement chez *P. aeruginosa* ($10,42 \pm 0,48 \mu\text{g}_{\text{-eqDextrane}}$). Chez *Bacillus licheniformis*, la quantité de sucres est restée stable.

Ainsi, la méthode de dosage par la réaction de PAS constitue un outil rapide et fiable pour la quantification des exopolysaccharides sur des biofilms miniaturisés relativement jeunes (24-48h). Cette technique a permis de cibler une large gamme de sucres sans nécessiter une spécificité de liaison mais en requérant uniquement la présence de groupements hydroxyles vicinaux, généralement retrouvés chez tous les sucres. Enfin, la méthode PAS a l'avantage de pouvoir être

transposée pour des applications en microscopie confocale ou à épifluorescence puisqu'il a été récemment utilisé pour visualiser les ePS de biofilms (Percival et al. 2012; Janissen et al. 2015).

Article 2 : “Quantification of biofilm exopolysaccharides using an in situ assay with Periodic Acid Schiff reagent”.

*I.Randrianjatovo-Gbalou, E. Girbal-Neuhauser, C-E Marcato-Romain**

**Corresponding author*

[Accepté au Journal Analytical Biochemistry, sous un format Notes and Tips]

Quantification of biofilm exopolysaccharides using an in situ assay with Periodic Acid Schiff reagent

I. Randrianjatovo-Gbalou, E. Girbal-Neuhauser, C-E. Marcato-Romain

Université de Toulouse; UPS; LBAE; Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale, EA 4565; Institut Universitaire de Technologie, 24 rue d'Embaquès, 32000 Auch, France

Abstract

A novel approach for the quantification of extracellular polysaccharides in miniaturized biofilms presenting a large variety of extracellular matrices was developed. The assay used the Periodic Acid-Schiff reagent and was first calibrated on dextran and alginate solutions. Then, it was implemented on 24-hour and 48-hour biofilms from three strains known to produce different expolymeric substances (*P.aeruginosa*, *B.licheniformis*, *W. confusa*). The assay allowed a quantification of the total exopolysaccharides taking into account the possible interferences due to the cells or to the other main expolymers of the matrix (eDNA, proteins).

Keywords: *Biofilms; Exopolysaccharides; in situ; quantification; Periodic Acid-Schiff reagent*

Within the last decade, biofilms have been of increasing interest and various tools have been developed to qualify or quantify their extracellular matrix (Hannig et al. 2010). In situ characterization was classically performed by confocal microscopy allowing visualization of the main matrix components after specific staining with fluorescent dyes (Chen et al. 2007; Baird et al. 2012; Neu and Lawrence 2014). Regarding the exopolysaccharides (ePS), usual staining methods lie on fluorescent lectins whose usefulness has been widely demonstrated (Neu and Lawrence 2014). In particular, concanavalin A has been frequently used due to its low cost and its ability to target glucose and-mannose residues. However, the use of lectins shows some limitations due to

their narrow specificity. That is why a previous screening has to be carried out to select the lectins suitable for the analysis of the different glycoconjugates present in complex bacterial biofilms. A way to consider the whole matrix glycoconjugates is thus to combine multiple fluorophores (Baird et al. 2012), which is sometimes complex due to possible overlapping of emission and excitation wavelengths of the fluorophores. Another suitable strategy would consist in targeting the different polysaccharides of the matrix using a marker able to target various osidic residues.

The periodic acid-Schiff (PAS) reaction consists of a first-step oxidation of the vicinal diols found in all carbohydrates by the action of periodic acid, and results in aldehyde group formation. The second step of the reaction is carried out by the chemical combination of the Schiff's reagent with aldehydes leading to a purple-to-red colored product. The PAS reagent has been classically used for histological staining of vegetal or mammalian tissues (McManus and Cason, 1950). This reaction has also been used to study the effect of environmental conditions on bacterial biofilm formation (Haase et al., 2006). Moreover, some authors have proposed an optimized protocol for PAS reaction in solution using a microtiter plate assay (Kilcoyne et al. 2011).

Based on a similar carbohydrate oxidation, in situ quantification of ePS within biological tissue could be thus expected. That is why this study used the Periodic Acid-Schiff reagent (PAS) to develop and optimize a quantitative assay for the in situ quantification of ePS within biofilms grown in microtiter plates.

Depending on the bacterial populations involved in biofilm formation, various neutral and anionic polysaccharides have been described, such as alginate-like polyuronic sugars (Strathmann et al. 2002) or glucans with α -(1,6) linked glucose (dextran) (Amari et al. 2012). Three strains were thus chosen as model bacteria for biofilm formation depending on the present ePS in the matrix: *Pseudomonas aeruginosa* CIP 103467, (named in this study as *PA*), *Bacillus licheniformis* CIP 110824 (named hereinafter as *BL*) and *Weissella confusa* LBAE-C39.2 from the culture collection WDCM 1016 (named in this study as *WC*).

In order to define the reference molecule for the in situ quantitative assay of ePS in biofilms, solutions of dextran (Dextran from *Leuconostoc spp.* $M_r \sim 40,000$. 31389, Fluka) and Sodium alginate (from *brown algae*, W201502, Sigma-Aldrich) were compared for their reaction with PAS (395B, Sigma-Aldrich). The assay was performed in vitro, in 96-well microtiter plates as previously described (Kilcoyne et al., 2011): 25 μ l of the sample were deposited in each well, and 175 μ l of 0.5% (v/v) periodic acid (diluted in 5% acetic acid) were added for a 30-minute incubation at room temperature. 100 μ l of Schiff's reagent were then added to the mixture for an additional 4-hour incubation and absorbance was measured at 544 nm in a FLUOstar (BMG Labtech) microplate

reader. The color development observed for both saccharides increased linearly during the first 30 minutes; with dextran, the maximum OD value was reached after 150 minutes whereas the coloration was slower with alginate and needed 240 minutes to reach the maximum value. Dextran was chosen as standard for the following experiments.

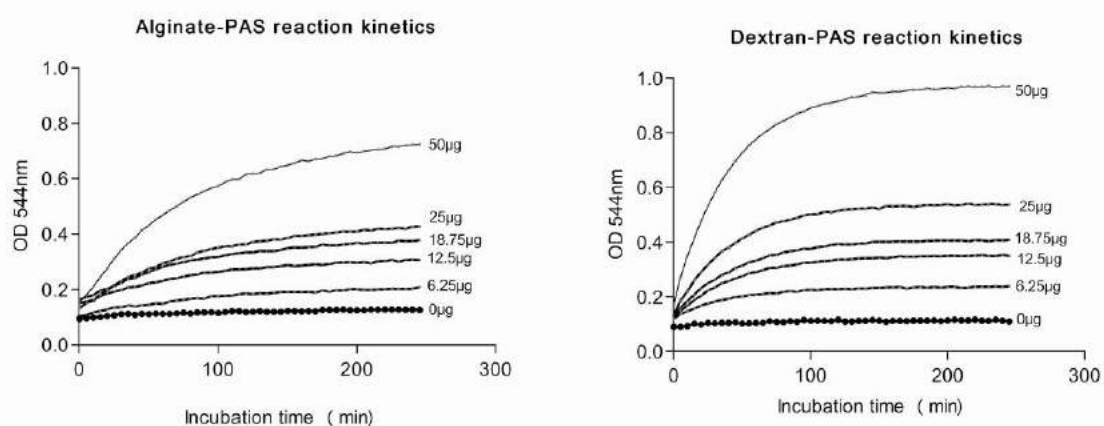


Figure 1: Effects of the Schiff incubation duration and of the polysaccharide concentration on the absorbance of the colored product from soluble alginate and dextran after PAS reaction.

The dextran calibration curves were determined at three incubation times of the Schiff reagent (30 min, 120 in and 245 min): the slope increased with the incubation time (0.010, 0.016 and 0.017 OD₅₄₄ µg⁻¹, respectively) and the linearity was always good ($r^2 > 0.997$). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated as suggested by Randrianjatovo et al. (2015): after 245 min, LOD and LOQ drastically increased, being respectively 6.7 and 20.8 µg, whereas the lowest values were obtained after 120 minutes (LOD = 0.3 µg and LOQ = 1.1 µg). An incubation time of 120 minutes was thus selected for the experiments hereinafter.

Eventual interferences of the biofilm major components on polysaccharide quantification were investigated by applying the previously described PAS protocol on standardized dextran solutions containing proteins (2.5 to 50 µg per well), or λDNA (0.25 to 25 ng per well), or planktonic cells of *PA*, *BL* or *WC* (up to 10^7 CFU per well). The statistical analyses were performed using the GraphPad PRISM 5 software. By applying a one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls Multiple comparison test, neither BSA (p-value, 0.1639) nor λDNA (p-value, 0.2926) showed significant difference from the blank value whatever the concentration tested. The presence of PBS-rinsed planktonic cells in the PAS mixture did not give any significant difference from the

blank response for *BL*, *PA* and *WC* below a cell density of 10^5 (with a p-value of 0.6964), 10^7 (with a p-value of 0.1390), and 10^5 CFU per ml (with a p-value of 0.6711), respectively.

The proposed PAS assay was then applied on mono-species biofilms, with dextran as standard. Bacterial suspensions were exponentially grown in Tryptic Soy Broth (TSB) at 37°C for *BL* and *PA*, or in Man Rogosa and Sharp broth (MRS) at 30°C for *WC*. Overnight subcultures were diluted in fresh culture medium (TSB or MRS broth supplemented with 4% (w/v) sucrose) to an OD595 nm of 0.1. 200µl of each inoculum were then added in six wells of a sterile polystyrene flat-bottomed 96-well microplate and incubated for 24 or 48 hours at 37°C for *PA* and *BL*, or 30°C for *WC*. After development, the biofilms were rinsed twice in sterile physiologic water (9g L^{-1} NaCl).

The figure 2 shows that *BL* biofilms presented the lowest ePS content at 24 hours (4.39 ± 1.54 µg eq dextran) in comparison to *WC* (5.62 ± 0.75 µg eq dextran) and *PA* (7.14 ± 1.68 µg eq dextran). After a 48-h culture, the polysaccharides content assayed with the PAS method slightly decreased for *BL* (4.07 ± 0.79 µg eq dextran) and significantly for *WC* (2.50 ± 0.33 µg eq dextran), whereas it significantly increased for *PA*, reaching the highest value assayed in this study (10.42 ± 0.48 µg eq dextran).

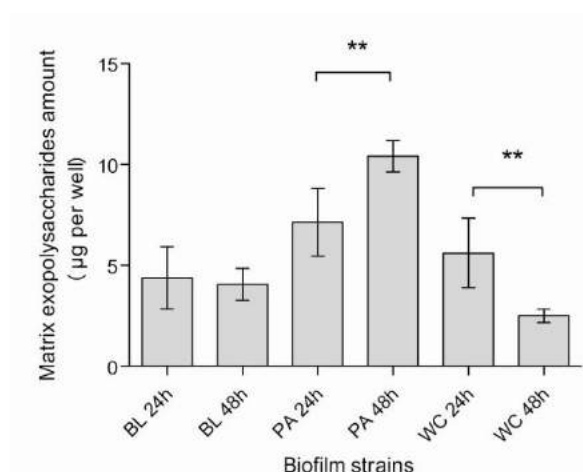


Figure 2. PAS *in situ* assay of the ePSs from 24 and 48-hour biofilms of *B.licheniformis* (BL), *P. aeruginosa* (PA) and *W. confusa* (WC). Errors bars were obtained from 3 replicates. Double stars point out significant difference between the ePS amounts of 24 and 48-hour biofilms

These results were confirmed by applying the standard addition method in which known quantities of dextran were added on the different biofilms (Figure 3). The slopes obtained by applying the PAS assay on biofilms supplemented with a range of dextran were not significantly different from the slope of the calibration curve (p-value, 0.1079). This result showed the absence of interference of the tested biofilm matrices on the PAS assay. Moreover, it also underlined that

adding known quantities of dextran allows quantifying the saccharides of a biofilm even if its total content is lower than the quantification limit of the PAS assay.

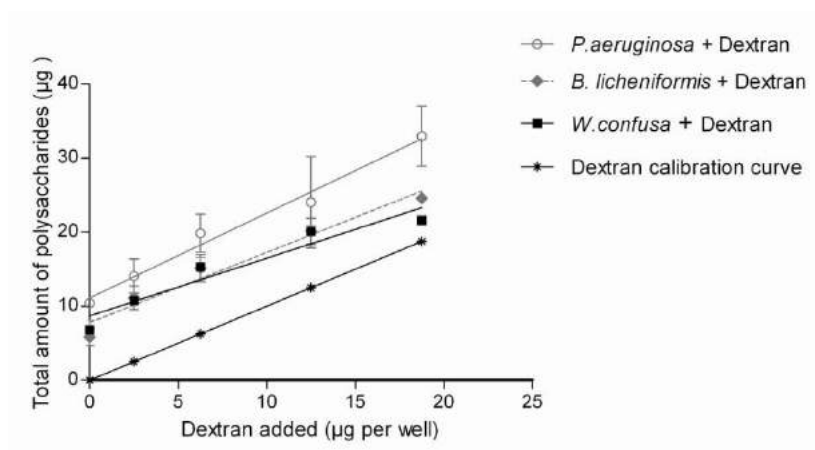


Figure 3. Standard addition curves obtained from a range of dextran (18.75, 12.5, 6.25 and 25 µg per well) added on 48h-old biofilms of the three studied strains. Error bars were calculated from three replicates.

The PAS staining method used here was shown to allow a fast (30 min of oxidation with periodic acid followed by 120-min incubation with Schiff reagent) and reliable quantification of saccharides in miniaturized biofilm matrices. This dye presents the advantage to work on a great majority of carbohydrates as it oxidizes their vicinal diols and does not select one kind of glycoside linkage. Finally, another advantage is that PAS can be used in confocal microscopy, the dye having fluorescent properties (Percival et al. 2012; Janissen et al. 2015).

Acknowledgements

This research was supported by the Council through the grant number 12050475 from Région Midi-Pyrénées and funding from Toulouse University, France. The authors wish to thank David Collado for his assistance on performing data statistical analysis and Florence Cléro-Legendre for proof-reading of the manuscript.

References

- Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A.** 2010. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J Med Microbiol* 59:1–7.
- Neu TR, Lawrence JR.** 2014. Investigation of Microbial Biofilm Structure by Laser Scanning Microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol*.

- Chen M-Y, Lee D-J, Tay J-H, Show K-Y.** 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:467–74.
- Baird FJ, Wadsworth MP, Hill JE.** 2012. Evaluation and optimization of multiple fluorophore analysis of a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Microbiol Methods* 90:192–196.
- McManus JFA, Cason JE.** 1950. Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. *J Exp Med* 91:651–4.
- Haase EM, Bonstein T, Palmer Jr RJ, Scannapieco FA.** 2006. Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *Arch Oral Biol* 51:299–314.
- Kilcoyne M, Gerlach JQ, Farrell MP, Bhavanandan VP, Joshi L.** 2011. Periodic acid–Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format. *Anal Biochem* 416:18–26.
- Strathmann M, Wingender J, Flemming H-C.** 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* 50:237–248.
- Amari M, Laguerre S, Vuillemin M, Robert H, Loux V, Klopp C, Morel S, Gabriel B, Remaud-Siméon M, Gabriel V, Moulis C, Fontagné-Faucher C.** 2012. Genome Sequence of *Weissella confusa* LBAE C39-2, Isolated from a Wheat Sourdough. *J Bacteriol* 194:1608–1609.
- Randrianjatovo I, Girbal-Neuhauser E, Marcato-Romain C-E.** 2015. Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4835–44.
- Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW.** 2012. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen* 20:647–57.
- Janissen R, Murillo DM, Niza B, Sahoo PK, Nobrega MM, Cesar CL, Temperini MLA, Carvalho HF, de Souza AA, Cotta MA.** 2015. Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Sci Rep* 5:9856.

II.3 Résultats complémentaires

II.3.1 Application du PAS pour l'observation des ePS en microscopie à épifluorescence

A la suite du travail de développement analytique, et afin de valider une transposition en microscopie, le PAS a été appliqué sur des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Bacillus licheniformis* cultivés sur lamelles de verre.

Les biofilms ont d'abord été marqués avec le marqueur d'acide nucléique TOTO[®]-1 (2 µM, 20 minutes) puis les lamelles ont été rincées avec du PBS avant d'être traitées avec de l'acide périodique à 0,5% (préparé dans 5% d'acide acétique) pendant 30 min. A l'issue de la réaction, 100 µL de réactif de Schiff (Fuschine basique, Sigma Aldrich) ont été ajoutés sur les biofilms qui ont été incubés pendant 30 min supplémentaires. Après un dernier rinçage au PBS, les lamelles ont été préparées comme décrit dans la **Partie B (page 155)** avant d'être analysées par microscopie à épifluorescence.

Pour le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, le co-marquage permet de distinguer l'ADN extracellulaire, qui forme des filaments reliant les cellules et les exopolysaccharides (FIGURE C- 5). Ces derniers semblent enrober les cellules et forment des régions diffuses. A l'inverse, chez *Bacillus licheniformis*, les exopolysaccharides semblent être co-localisés et sont fortement associés aux cellules. Le PAS s'avère donc bien être un marqueur adapté à la fois pour la quantification des ePS *in situ* et pour l'observation microscopique de ces mêmes polymères.

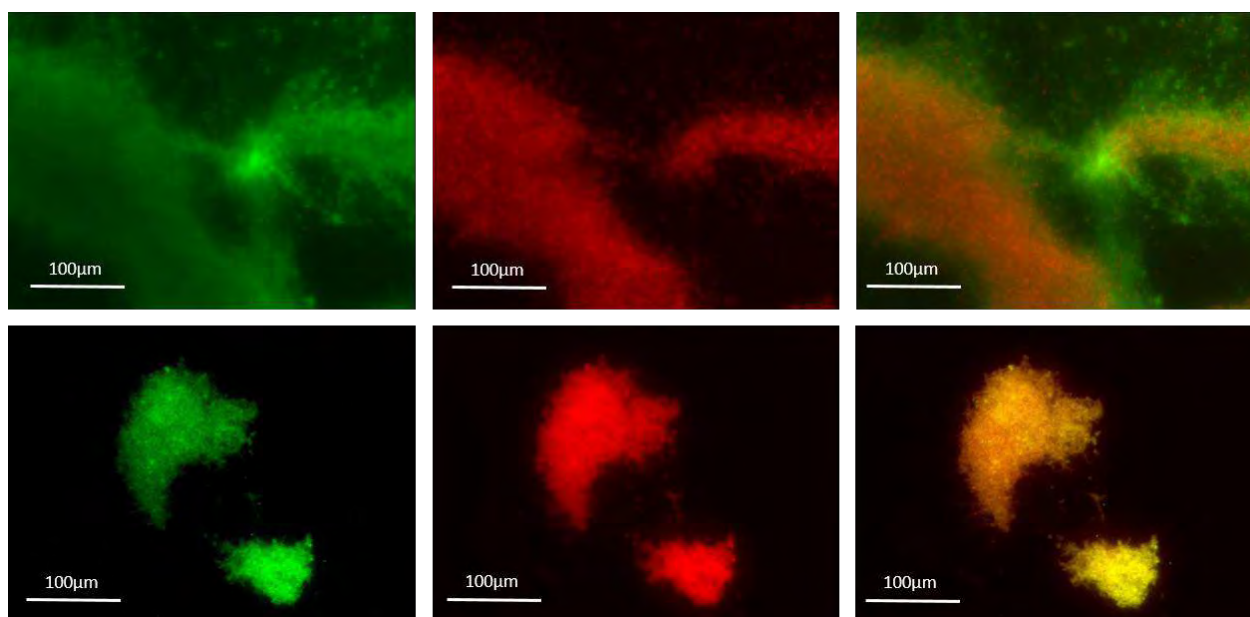


FIGURE C- 5. Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (série du haut) et de *Bacillus licheniformis* (série du bas), formés sur lamelle de verre pendant 24h en milieu TSB. L'ADN extracellulaire est marqué avec le marqueur TOTO-1 (vert) et les exopolysaccharides avec le kit PAS (rouge). Microscopie à épifluorescence, Objectif 40x, OLYMPUS BX 41 (Laboratoire ECOLAB).

II.3.2 Comparaison des approches quantitatives *in situ* développées dans l'étude à des approches qualitatives microscopiques

L'objectif du Chapitre I était de proposer des outils de quantification *in situ* des protéines et polysaccharides extracellulaires totaux. Les exoprotéines ont été dosées grâce aux propriétés pro-fluorescentes de l'épicoconone et les exopolysaccharides totaux ont pu être quantifiés en exploitant la réaction de Schiff. Les deux méthodes ont montré une bonne sensibilité, $0,7\mu\text{g}_{\text{eq BSA}}$ et $1,1\mu\text{g}_{\text{eq dextrane}}$ par puit respectivement pour les ePN et les ePS, et il a été possible de comparer la distribution en SEP chez des biofilms de 24 et 48h (TABLEAU C-3). *B.licheniformis* a présenté la matrice la plus riche en exoprotéines, tandis que les quantités présentes dans le biofilm de *W.confusa* étaient inférieures au seuil de quantification du dosage à l'épicoconone.

TABLEAU C-3 : Profil de SEP des Trois biofilms à 24 et 48h.

	Exoprotéines ($\mu\text{g}_{\text{eq K-CNf}}$)	Exopolysaccharides ($\mu\text{g}_{\text{eq dextrane}}$)	ePN / ePS
BL24h	$38,7\pm 12,9$	$4,39\pm 1,54$	8,8
BL48h	$40,5\pm 1,77$	$4,07\pm 0,79$	10,0
PA24h	$27,1\pm 7,53$	$7,14\pm 1,68$	3,8
PA48h	$23,4\pm 4,70$	$10,4\pm 0,48$	2,3
WC24h	$0,0\pm 0,023$	$4,39\pm 1,54$	0,0
WC48h	$0,23\pm 0,17$	$2,50\pm 0,33$	0,1

Les profils en ePN et ePS obtenus pour les biofilms de 48 heures ont été comparés à des données qualitatives obtenues en microscopie confocale avec des marqueurs classiquement utilisés : le SYPRO® Ruby pour les protéines, et la WGA pour les polysaccharides (voir poster ci-dessous), Ces observations ont corroboré les résultats de quantification en montrant clairement la prédominance des protéines dans le biofilm de *B.licheniformis* et leur quasi-absence dans celui de *W.confusa*,

Le poster illustrant ces résultats a été présenté et a reçu le premier prix du Poster lors du congrès « The Perfect Slime – Nature, Properties, Regulation and Dynamics of EPS », 10-12 Sept, 2014, Essen, Germany.

Les dosages proposés ont donc satisfait au cahier des charges et aux exigences de spécificité, sensibilité, large gamme de dosage en concentration et en diversité de polymères d'un même type, ainsi que transposabilité en microscopie confocale et ont permis de quantifier de façon globale les exoprotéines et les exopolysaccharides des matrices des 3 biofilms modèles.

Towards an *in situ* quantification of extracellular polymeric substances of bacterial biofilms

I.Randrianjatovo, C-E Marcato-Romain, E. Girbal-Neuhauser*

*elisabeth.neuhauser@ut-tlse3.fr

Université de Toulouse III, LBAE, Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale, EA 4565
Institut Universitaire de Technologie, 24 rue d'Embaquès 32000 Auch, France



Context

Biofilms are ecosystems of tightly associated bacteria encapsulated in an extracellular matrix mainly composed of polysaccharides and proteins. While extracellular polysaccharides (ePS) are often described as the main component of the matrix, extracellular proteins (ePN) are far less characterized.

Extracellular Polymeric Substances (EPS) extraction often represents the first step for EPS characterization, but the used physical or chemical extraction techniques may lead to partial EPS recovery with possible alteration of their functional structure. *In situ* characterization methods appear thus a valuable alternative to bring a quantitative approach.

This work proposes new biochemical tools for *in situ* quantification of the main components of bacterial biofilms (ePN, ePS and bacteria) without alteration or disruption of the extracellular matrix.

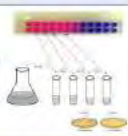
Material & methods

1- *In situ* quantification of biofilm components

Viable adhered cells

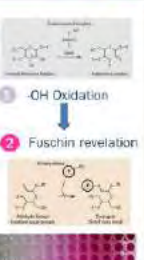
1.1 Calibration in solution

Resazurin Assay
 → Planctonic cells suspension for calibration
 → Fluorescence measurement : ex560/em590nm
 → Kinetic measurement during 2h



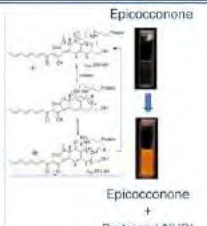
Exopolysaccharides (ePS)

Periodic Acid-Schiff Assay
 → Dextran (MW 40000) solutions for calibration
 → Absorbance measurement at 544nm
 → Oxidation during 30 minutes
 → Fuschin revelation during 30min
 → Matrix interference tested by Standard Addition Method (SAM)*



Exoproteins (ePN)

FluoroProfile® Assay
 → BSA solutions for calibration
 → Pro-fluorescent dye: Epicocconone
 → Fluorescence measurement: ex544/em620nm
 → Kinetic measurement during 30min
 → Matrix interference tested by Standard Addition Method (SAM)*



1.2 48h-biofilm formation on microplates

<i>Bacillus licheniformis</i>	(37 °C, TS broth)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 103467	(37 °C, TS broth)
<i>Weissella confusa</i> CIP 110546	(30 °C, MRS-sucrose broth)

Staining of ePS and ePN with the developed assays

2- *In situ* examination of biofilm by CLSM (ZEISS LSM 710)

Biofilm formation on polycarbonate coupons (37°C TS Broth or 30°C MRS-sucrose Broth, 48h)

Staining :

- cells: DAPI 0,1µg.ml⁻¹
- ePS: WGA-FITC (lectin from *Triticum vulgare*) 100µg.ml⁻¹
- ePN: SyproRUBY®

(ERRMECE, EA 1391, Université Cergy Pontoise)

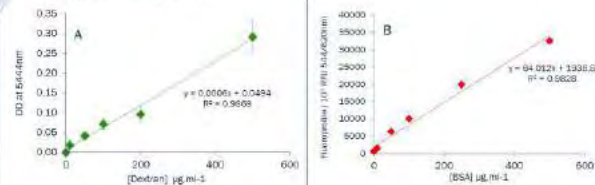
Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27

Lasers : 405nm/480nm/561nm

* Zurriaga-Agusti, E., Bes-Piá, A., Mendoza-Roca, J. A., & Alonso-Molina, J. L. (2013). Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR activated sludge flocs in view of improving EPS determination. *Separation and Purification Technology*, 112, 1–10. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.048

Results

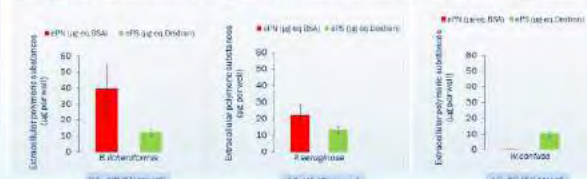
Fig.1- Calibration curve for ePS quantification with PAS assay (A) and ePN quantification with FluoroProfile® assay (B). SD were obtained from 3 independent replicates



□ Broad linear ranges for quantification of ePS and ePN

- ePS from 3 to 50 µg eq Dextran per well
- ePN from 3 to 50 µg eq BSA per well

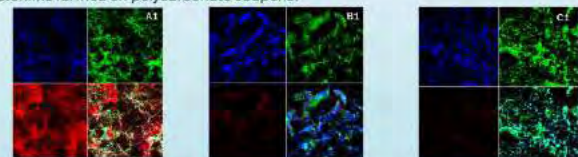
Fig.2 EPS quantitative profiles of the three bacterial biofilms assayed with PAS (ePS) and FluoroProfile® (ePN). SD were obtained from 3 independent replicates.



□ Lack of matrix interferences validated with SAM for *in situ* quantification with weak error percentages (ePS = 5,0% ; ePN= 4,3%)

□ The three bacterial biofilms showed contrasted ePS and ePN contents.

Fig.3 - Biofilm matrix organization of three biofilms strains : Split images visualized by CLSM of (A1) *B.licheniformis*, (B1) *P.aeruginosa* and (C1) *W.confusa* 48h-old biofilms formed on polycarbonate coupons.



□ CLSM observations confirmed ePN/ePS ratios obtained *in situ* through contrasted EPS distributions

□ *In situ* biochemical assays coupled with CLSM allow quantitative and 3D biofilm characterization.

Conclusions & Perspectives

✦ The proposed method was able to globally quantify ePN and ePS within bacterial biofilms without alteration of the extracellular matrix.

✦ The strategy presented here leads to an interesting application for the quantitative analysis of EPS production and/or reduction in response to an antibiofilm treatment.

CHAPITRE II : Caractérisation et quantification *in situ* des fibres amyloïdes de biofilms modèles

Les fibres amyloïdes (FA) sont des polymères protéiques, souvent décrites dans les maladies telles que la maladie d'Alzheimer ou des amyloïdoses. Par ailleurs, les FA sont de plus en plus décrites au sein de biofilms naturels (Larsen et al. 2007; Otzen and Nielsen 2008) ou mono-espèces (Romero et al. 2010; Dueholm et al. 2013b). Les FA d'origine bactérienne sont le plus souvent caractérisées *in vitro* afin d'analyser leurs propriétés chimiques et fonctionnelles (séquence et structure biochimique). Des techniques telles que la microscopie électronique, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, ainsi que la mesure de dichroïsme circulaire peuvent être combinées pour détecter et mettre en évidence la présence de fibres de type amyloïde. Cependant, ces techniques requièrent la maîtrise et l'optimisation des procédés d'extraction des fibres qui doivent le plus souvent être adaptés à chaque espèce bactérienne. Par ailleurs, ces fibres peuvent être détectées *in situ*, et en particulier au sein de biofilms grâce à des marqueurs tels que le rouge Congo ou la Thioflavine T (Nilsson 2004; Fowler et al. 2007). Depuis longtemps, le Rouge Congo est utilisé pour identifier des souches bactériennes produisant des FA ; l'emploi de ce colorant est associé à l'utilisation de la microscopie en lumière blanche ou à lumière polarisée afin de mettre en évidence les propriétés de biréfringence du colorant en présence de structures amyloïdes. Le Rouge Congo est néanmoins décrit comme étant moins spécifique que d'autres marqueurs comme la Thioflavine T (ThT).

C'est la raison pour laquelle ce second marqueur est désormais largement utilisé pour l'étude des FA. Naiki et al. et LeVine ont été les premiers à caractériser le spectre de fluorescence et les propriétés de fixation de la ThT, une molécule de la famille des benzothiazoles (Naiki et al. 1989; LeVine 1995). Ces auteurs ont montré qu'en présence de FA, le spectre de la ThT subit un déplacement de la longueur d'onde maximale d'excitation de 385 à 450nm, et de celle d'émission de 445 à 482nm. Ce déplacement spectral est uniquement dû à la fixation du marqueur au niveau des structures en feuillet β constituant les FA (Naiki et al. 1989; LeVine 1995). Récemment, la ThT a été très utilisée pour suivre la cinétique de fibrillation des fibres *in vitro* (Ecroyd et al. 2010), mais également pour visualiser *in situ* les fibres produites au sein de boues activées, de floccs bactériens et de biofilms naturels (Larsen et al. 2007; Larsen et al. 2008a; Bridier et al. 2013).

Toutefois, très peu, voire aucune étude n'a été rapportée à ce jour quant à la quantification de ces composés au sein d'un biofilm. Une méthode de dosage des FA au sein de biofilms modèles est donc proposée dans ce chapitre.

Pour ce faire, la Thioflavine T a été retenue, dans la mesure où elle semble répondre aux critères de spécificité, d'exhaustivité et de transposabilité énoncés dans le cahier des charges des dosages

(page 151). Par ailleurs, ce marqueur a déjà prouvé sa compatibilité pour les mesures de fluorescence en microplaques (Thorn et al. 2005).

Il conviendra donc de s'assurer que la méthode de quantification *in situ* des FA utilisant la ThT remplit effectivement les critères du cahier des charges, et en particulier qu'elle permet le dosage d'une large gamme de concentrations en FA. Pour ce faire, la stratégie expérimentale en quatre étapes utilisée précédemment sera à nouveau appliquée (calibration, interférences en solution, application sur biofilm, application en microscopie) et sera détaillée dans le **paragraphe III**. Cependant, une difficulté supplémentaire s'est présentée dans le cadre du développement du dosage de FA : il n'existe pas de protéine commercialisée sous forme fibrillée. Aussi, avant de pouvoir procéder à la première étape du développement analytique, il a été nécessaire de produire une FA étalon permettant de calibrer le dosage en solution. Cette production de fibre étalon a été menée en deux étapes :

- La production de protéine fibrillaire en tant que molécule étalon (**paragraphe I**)
- Le dosage *in vitro* de FA en milieu liquide (**paragraphe II** et **article 3**) de façon à quantifier les fibres formées à l'étape précédente. Cette calibration est également utilisable pour le dosage des FA *ex situ*, dans un extrait biologique.

I. Production de fibres de κ -caséine

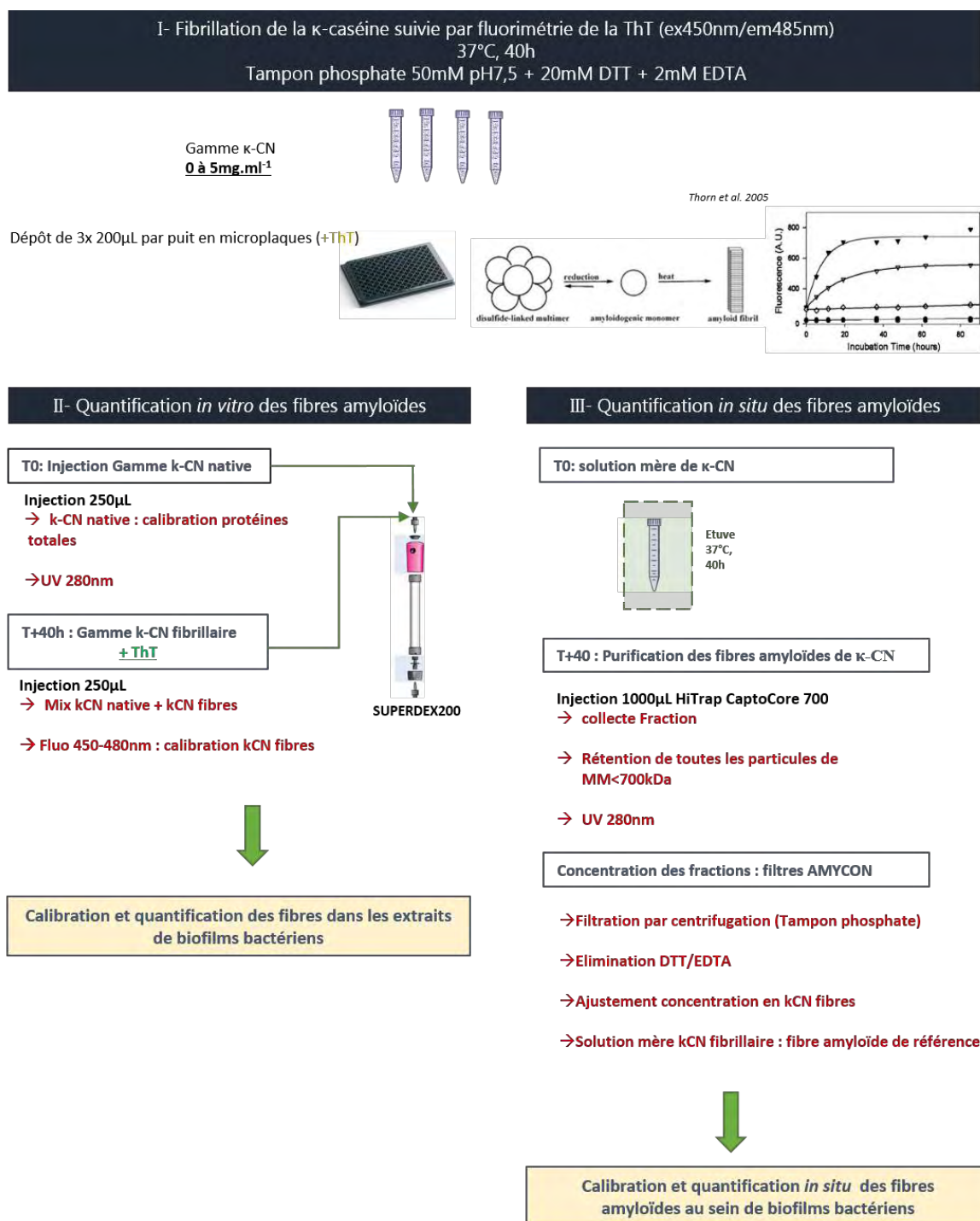
I.1. La κ -caséine, une protéine amyloïdogène

La κ -caséine (κ -CN) est une phosphoprotéine faisant partie de la famille des caséines. Ces dernières, constituants majeurs du lait de mammifères (80% des protéines), forment un agrégat soluble (complexe colloïdal) du fait de leur conformation en micelles. Ces micelles de caséines (CN) sont constituées de l' α_{S1} -CN, l' α_{S2} -CN et de la β -CN et sont stabilisées par la κ -CN. Sous sa forme purifiée, la κ -CN se présente sous forme d'un monomère de 169 acides aminés de 19 kDa. En absence d'agent réducteur et grâce à un unique groupement thiol sur sa séquence primaire, la protéine peut s'auto-assembler en plusieurs multimères, jusqu'à former un octamère, par l'établissement de ponts disulfures intermoléculaires (Farrell et al. 2003). La mise en évidence de sa capacité à s'auto-assembler en FA est gouvernée par des facteurs environnementaux ; en effet, en conditions réductrices et à une température de 37°C, la κ -CN a tendance à former des fibrilles, en équilibre avec les multimères sphériques, dont la longueur peut atteindre 600 nm selon les observations en microscopie électronique. La prédiction par modélisation tridimensionnelle indique la présence d'une région riche en tyrosine avec une répétition du motif feuillet-boucle-feuillet (résidus 15 à 65) qui permet l'empilement des molécules et la formation de structures fibrillaires (Farrell et al. 2003; Ecroyd et al. 2010). La fixation de la Thioflavine T (ThT) sur les fibres de κ -CN a été une preuve supplémentaire de la formation de FA par la κ -CN.

I.2. Fibrillation de la κ -caséine

Dans un premier temps, les conditions optimales de formation des FA à partir de κ -CN ont été déterminées, en s'appuyant sur des conditions préconisées dans la littérature (Thorn et al. 2005; Ecroyd et al. 2010) et en faisant varier la concentration initiale de κ -CN dans la solution. Cet essai a été conduit en microplaque 96-puits noire (BD-Falcon) au cours de laquelle la fibrillation de la κ -CN a été suivie par mesure de l'émission de la fluorescence de la ThT à 485 nm après excitation à 450nm. La FIGURE C-6 présente le déroulement des diverses manipulations qui ont abouti à la production de solutions de κ -CN fibrillaire purifiée destinées à la calibration des tests.

FIGURE C-6. Production et purification de κ -CN fibrillaire pour la quantification des fibres amyloïdes de biofilms bactériens



Au cours de l'étape I (FIGURE C-6) les solutions étalons de κ -CN (de 0 à 5mg.ml⁻¹) ont été préparées dans un milieu tamponné à pH 7.5, contenant 20 mM de dithiotreitol (DTT), 2 mM d'EDTA et de la ThT à une concentration finale de 40 μ M. Le DTT est un agent réducteur permettant de rompre tous les ponts disulfures des multimères de κ -CN et conduisant ainsi à

l'obtention de monomères de κ -CN précurseurs de l'amyloïdogénèse. L'EDTA, un chélateur de cations, a été utilisé pour piéger tous les ions calcium susceptibles d'être présents dans la solution de κ -CN et ainsi prévenir la formation des micelles de caséines. Les solutions ont été mises à incuber en microplaque, à 37°C, sans agitation. La mesure de fluorescence ($\lambda_{ex} = 450\text{nm}$, $\lambda_{em}=485\text{nm}$) a été effectuée au moyen d'un lecteur à microplaque (Optima FLUOSTAR, BMG Labtech) toutes les 10 min dès le début de la réaction (T_0) jusqu'à la fin de la polymérisation (T_F) après environ 16h. La durée d'incubation a été fixée conformément aux résultats obtenus par Ecroyd et al. (2008), qui ont montré que le plateau était atteint au bout de 10h pour les plus fortes concentrations de κ -CN. Chaque mesure a été réalisée en triplicat. La cinétique ainsi obtenue est présentée sur la FIGURE C-7 où l'intensité de fluorescence et la vitesse de fibrillation, sont corrélées à la concentration en κ -CN native initialement ajoutée selon une relation logarithmique ($R^2=0.9688$). En fin d'incubation, les solutions sont conservées en vue de quantifier les protéines totales et les FA (**Paragraphe II.1**).

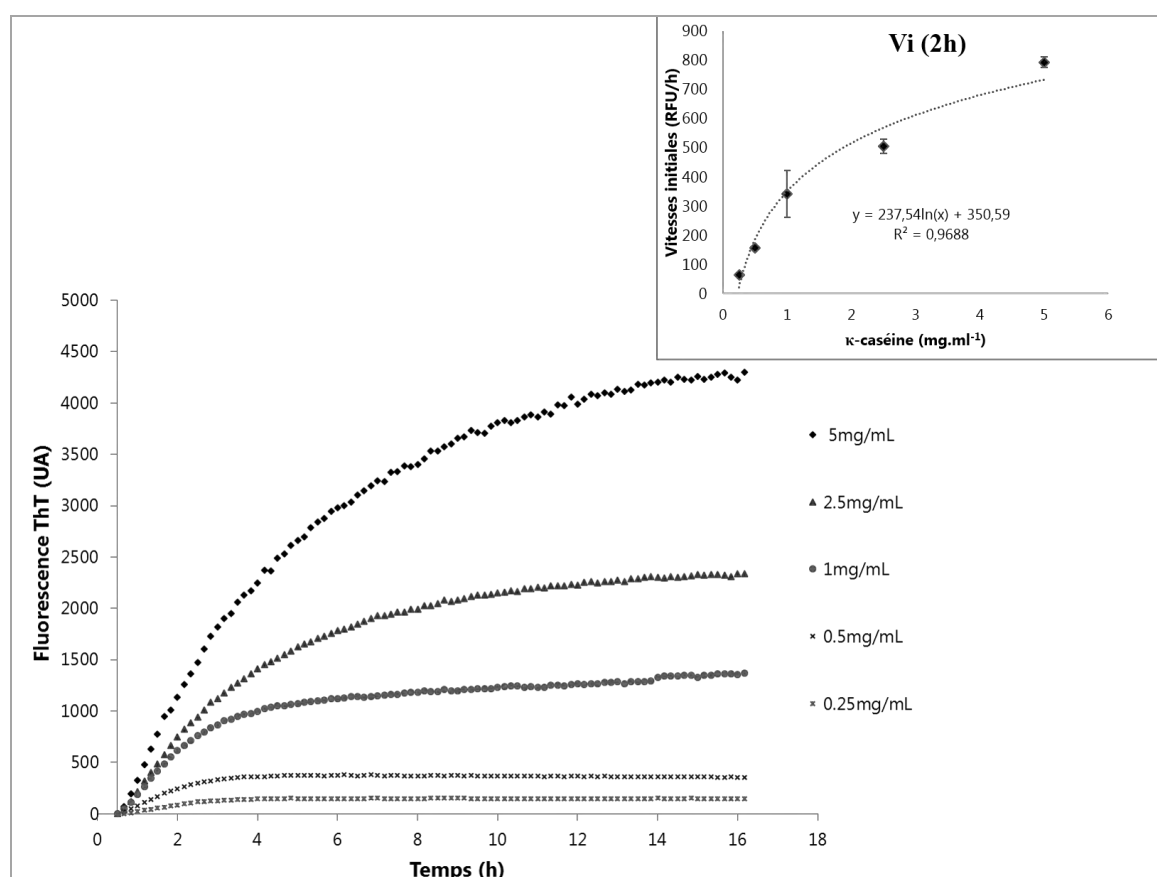


FIGURE C-7. Cinétique de fibrillation de la κ -CN en conditions réductrices (DTT 20mM), en présence d'EDTA 2mM à 37°C pour différentes concentrations de protéines natives. Encadré : évolution des vitesses initiales de fibrillation mesurées entre zéro et 2h en fonction des concentrations en κ -CN native.

Une fois les conditions de fibrillation fixées, une solution mère de κ -CN à $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a été préparée puis mise à incuber pendant 20 heures à 37°C en présence de DTT et d'EDTA. Afin de confirmer la formation de FA de κ -CN dans cette solution, les suspensions de κ -CN fibrillées ont été mises en présence d'une solution de Rouge Congo à $100\ \mu\text{M}$ puis observées au microscope à lumière transmise (FIGURE C-8) : par rapport à une solution contrôle de Rouge Congo, des agrégats plus ou moins denses apparaissent et sont colorés en rouge, confirmant la présence de fibres de κ -CN.

La solution stock de FA de κ -CN (ou κ -CN fibrillaire) a été conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

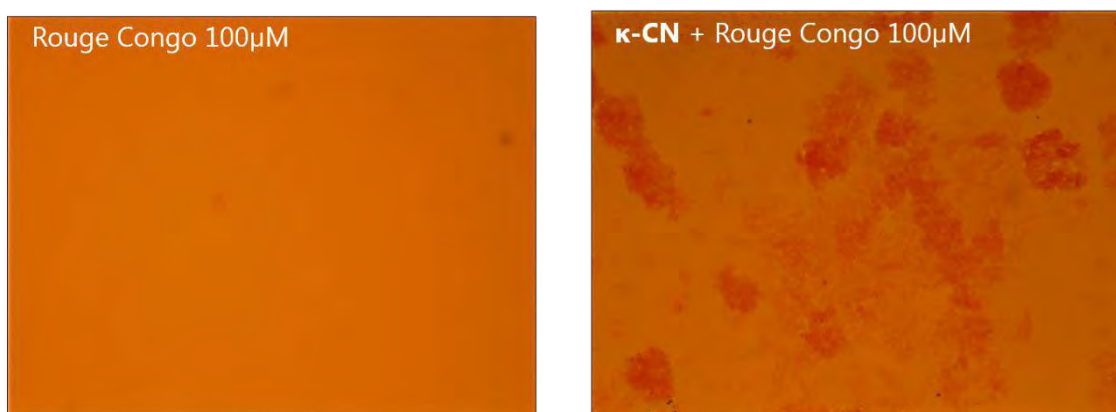


FIGURE C-8. Détection des fibres de κ -CN par coloration au Rouge Congo $100\ \mu\text{M}$. Images obtenues par microscopie en lumière transmise (Grossissement $200\times$, Olympus BX41, ECOLAB).

II. Dosage *ex situ* des fibres amyloïdes

Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication au format Notes & Tips dans le journal Analytical Biochemistry (**Article 3**).

II.1 Calibration du dosage

Une fois la fibrillation achevée, les solutions contiennent un mélange de fibres et de κ -CN non-fibrillée qu'il convient de quantifier afin de pouvoir utiliser la κ -CN fibrillaire comme étalon pour un dosage des FA (FIGURE C-6, étape II).

Cette quantification a été obtenue par chromatographie liquide par exclusion de taille (HPSEC) au moyen d'un AKTA Purifier 10, équipé d'un spectromètre UV et également connecté à un fluorimètre (1260 Infinity, Agilent Technologies). $250\ \mu\text{L}$ de chaque solution étalon de κ -CN polymérisée pendant 20h et marquée à la ThT ont été injectés dans une colonne SUPERDEX 200

10/300GL (GE Healthcare). L'échantillon a été élué avec une phase mobile constituée d'un tampon phosphate de potassium 50mM (pH 7.5) circulant à un débit de 0,5mL.min⁻¹. Deux paramètres ont alors été suivis :

- l'absorbance à 280 nm corrélée à la quantité de protéines totales
- la fluorescence à 480 nm (après excitation à 450 nm), caractéristique de la ThT liée aux fibres de κ -CN formées.

A partir des chromatogrammes, les aires totales d'absorbance à 280nm de chaque étalon ont été calculées et corrélées aux quantités (en mg) de κ -CN introduites dans les solutions initiales. Une gamme étalon a ainsi été établie, reliant la quantité de κ -CN à l'absorbance à 280nm (coefficient β). Pour les pics présentant une absorbance à 280 nm et une fluorescence à 480 nm, les aires des 2 signaux ont été corrélées entre elles, permettant d'obtenir une équation dont la pente constitue le coefficient α . A partir de ces deux équations, il a alors été possible de déduire la quantité totale de κ -CN (fibrillaire et non-fibrillaire) et de l'exprimer en milligrammes de κ -CN.

Cette quantification a pu ensuite être transposée au dosage des FA extraites de la matrice de biofilms bactériens (**Article 3**).

II.2 Quantification des fibres amyloïdes dans des extraits de biofilms

A titre d'illustration, la méthode de détection des FA par fluorimétrie couplée à la chromatographie HPSEC a été appliquée pour quantifier les FA sécrétées par un biofilm de 48h de *Bacillus licheniformis* formé sur membrane de polycarbonate tel qu'il a été décrit dans la **Partie B (page 154)** Une fois formée, la macro-colonie a été raclée (cell-scraper, Nunc) et mise en suspension en tubes eppendorf® dans 1,5ml de PBS. Les suspensions ont été centrifugées (10000 g, 5min) puis le culot a été repris dans 1,5mL de PBS. Afin de séparer les SEP des cellules, la suspension a été soumise aux ultrasons avec une puissance de 0,75W.mL⁻¹ (sonde à ultrasons et générateur Fischer Scientific) pendant deux cycles de 30 secondes avec un temps de pause de 2 minutes entre chaque cycle (Ras et al. 2008a). Les suspensions ont ensuite été centrifugées une seconde fois et les surnageants ont été marqués à la ThT (40 μ M) et incubés pendant 2h à l'obscurité, durée pour laquelle l'intensité de fluorescence de la ThT (et donc la fixation du marqueur aux fibres) se stabilise. Ensuite les surnageants ont été filtrés (0,2 μ m) avant d'être analysés par HPSEC dans les conditions décrites précédemment pour les solutions de κ -CN.

Le chromatogramme obtenu (**Article 3, Figure 2**) indique l'apparition de deux pics de fluorescence majoritaires correspondant à des molécules de haut et moyen poids moléculaire. La calibration à partir de la κ -CN a permis de déduire que ces pics, correspondant à des FA, représentent environ 21% des protéines. Plus de la moitié de ces fibres sortent dans le volume d'exclusion totale de la colonne et peuvent donc être considérées comme des fibres matures car présentant une taille apparente supérieure à 600 000 Da.

La méthode ainsi développée (FIGURE C-9) a permis de proposer, d'une part un moyen de distinguer les protéines de type amyloïde au sein d'un échantillon biologique complexe, et d'autre part d'en estimer leur proportion relative par rapport à la teneur totale en protéines. La calibration avec la κ -CN offre une large fenêtre de quantification pouvant aller de 62,5 à 1000 μ g de fibres par puits. Pour des applications plus spécifiques, cette même méthode peut être adaptée à une autre protéine amyloïde de référence de manière à se rapprocher des conditions de l'échantillon observé (ex. FA bactériennes purifiées comme la protéine FapC de *Pseudomonas fluorescens* (Dueholm et al. 2013b), ou encore la protéine TasA de *Bacillus subtilis* (Romero et al. 2010).

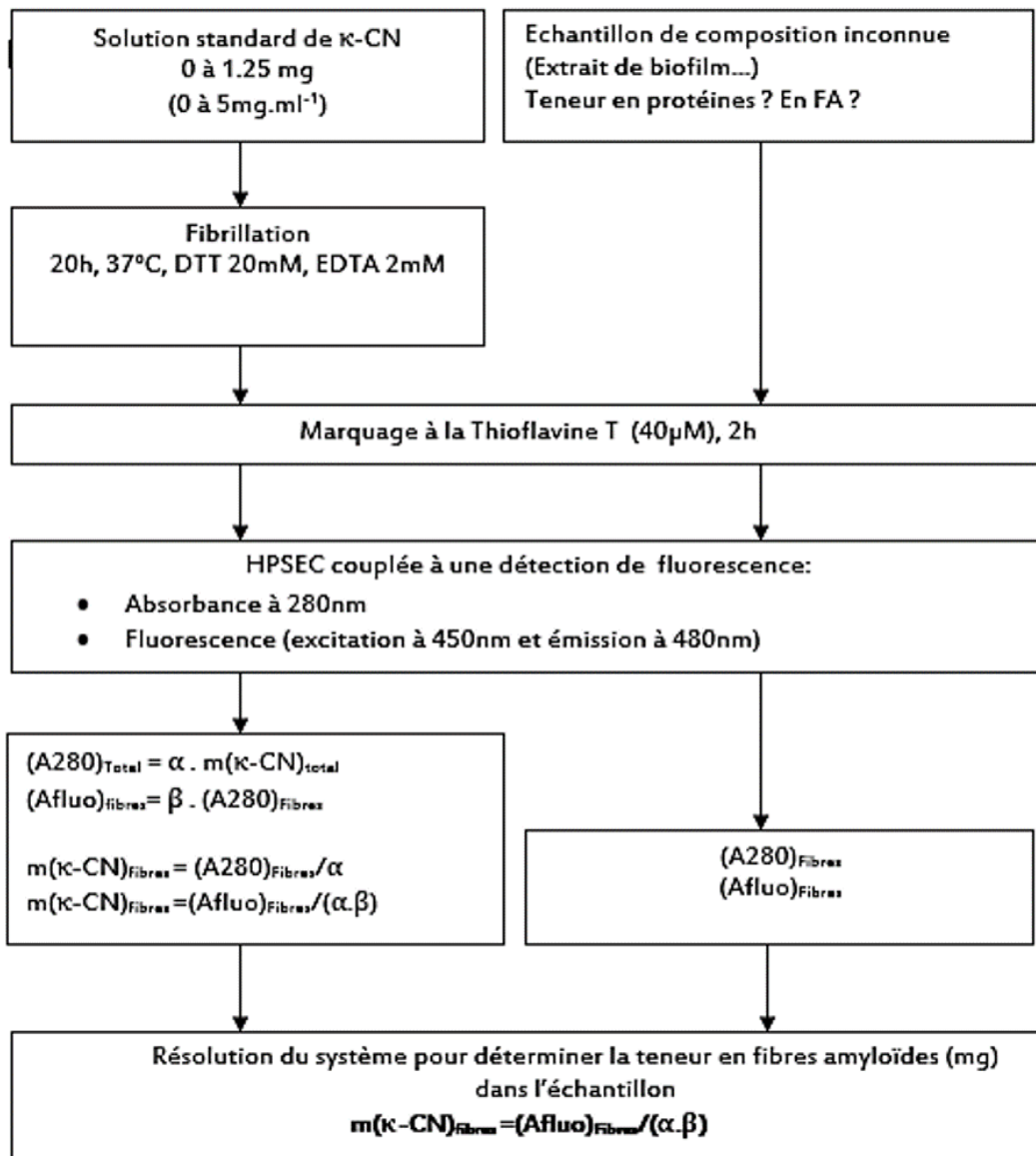


FIGURE C-9. Schéma récapitulatif des étapes de calibration de la quantification des fibres amyloïdes par HPSEC

La méthode ainsi développée a permis de proposer, d'une part un moyen de distinguer les protéines de type amyloïde au sein d'un échantillon biologique complexe et d'autre part d'en estimer leur proportion relative par rapport à la teneur totale en protéines. La calibration avec la k-CN offre une large fenêtre de quantification pouvant aller de 62.5 à 1000µg de fibres. Pour des applications plus spécifiques, cette même méthode peut être adaptée à une autre protéine amyloïde de référence de manière à se rapprocher des conditions de l'échantillon observé (ex. fibres amyloïdes bactériennes purifiées comme la FapC de chez *Pseudomonas fluorescens* (Dueholm et al. 2013b), ou encore la TasA (Romero et al. 2010).

Article 3: “Quantification of Amyloid Fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection”

I. Randrianjatovo-Gbalou, C-E Marcato-Romain, E. Girbal-Neuhauser*

Analytical Biochemistry; Volume 488, 1 November 2015, Pages 19–21.

doi:10.1016/j.ab.2015.07.014



Notes & Tips

Quantification of amyloid fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection



Irina Randrianjatovo-Gbalou, Claire-Emmanuelle Marcato-Romain, Elisabeth Girbal-Neuhauser*

Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE), EA 4565, Institut Universitaire de Technologie, F-32000 Auch, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 April 2015
Received in revised form
29 June 2015
Accepted 22 July 2015
Available online 31 July 2015

Keywords:

Amyloids
Size exclusion chromatography
Thioflavin T
Quantification

ABSTRACT

An amyloid fibrils investigation within biofilm samples requires distinguishing the amyloid β -sheet structure of these proteins and quantifying them. In this study, the property of amyloids to incorporate the fluorescent dye Thioflavin T has been exploited to propose a method of quantification. The experimental protocol includes the preparation of amyloids from commercial κ -casein (κ CN) and their fractionation through size exclusion chromatography (SEC) to provide calibration curves from fluorescence and absorbance signals. Finally, a bacterial biofilm extract was injected into SEC, and the amyloid fibrils could be expressed as equivalent κ CN, representing approximately 21% of the total proteins.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Amyloids are orderly aggregated proteins and are arranged in fibrils showing structured array of β -sheets that are stacked perpendicularly to the fiber axis. Intra- or extracellular deposits of amyloids are thought to be promoted in their inability to adopt native and soluble conformation in the case of several human diseases [1]. In contrast to pathogenic amyloids, "functional amyloids" are of great benefit for many microorganisms, producing outstandingly robust and flexible structures involved in adhesion, aggregation, or colonization of various habitats [2].

Amyloid fibrils are ubiquitous structures that can share the ability to bind and modify the spectroscopic properties of some heteroatomic dyes. They were identified in human and animal tissues while displaying a green birefringence through polarized light microscopy [3]. Alternatively, Thioflavin T (ThT), a benzothiazole dye with a strong affinity for β -sheet stacks, is also largely used for amyloid detection [4]. Absorption spectra of ThT incorporated into amyloid fibrils ($\lambda_{\max} = 450$ nm) indicate a red shift compared with that of free ThT ($\lambda_{\max} = 413$ nm). In addition, on

binding of fibrils, ThT displays a dramatic shift of the emission maximum (from 445 to 482 nm), allowing fluorescence monitoring for specific detection of ThT incorporated into fibrils [4,5]. ThT can be used both in vivo and ex vivo and, thus, has been widely used for kinetic studies of amyloid fibril formation in vitro. In such studies, fibril formation is expressed in arbitrary units (variation in fluorescence units), signal intensities depending closely on the device used. Other analytic methods have been recently developed for amyloids detection, including Fourier transformed infrared spectroscopy and atomic force microscopy [6]. Both methods based on the detection of specific conformations and assemblies (stacked parallel β -sheets) give new structural insights on these fibrils but are not convenient for their quantification. The measurement of amyloids appears, however, to be of real importance because amyloid fibrils are formed by many proteins, even at physiological pH and temperature [7]. That is the reason why quantification of the amyloid fraction of proteins from a sample is proposed in this study, with a determined amyloid protein being used as standard.

The experimental protocol included the preparation of amyloids from commercially available proteins and their fractionation by size exclusion chromatography (SEC) with online ultraviolet (UV) and fluorescence detectors. Calibration curves were then obtained by integration of the peak areas, allowing quantification of amyloids in equivalent amounts to those of the commercial proteins. Commercial κ -casein (κ CN) has been chosen as the standard protein

Abbreviations used: ThT, Thioflavin T; SEC, size exclusion chromatography; UV, ultraviolet; κ CN, κ -casein; DTT, dithiothreitol; EPS, extracellular polymeric substance; PBS, phosphate-buffered saline.

* Corresponding author.

E-mail address: elisabeth.neuhauser@iut-tlse3.fr (E. Girbal-Neuhauser).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.014>
0003-2697/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

because formation of fibrils is well documented and easy to obtain with this protein [8]. However, many other bacterial proteins can form amyloid fibrils *in vitro* and can be used as internal calibrating protein [9].

The ability of bovine milk κ CN (Sigma–Aldrich) to fibrillate *in vitro* was exploited in order to prepare various standardized solutions containing amyloids. Native κ CN solutions (0–5 mg ml⁻¹) were prepared in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 20 mM dithiothreitol (DTT; Life Technologies) and 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Fibril formation was induced by quaternary structure destabilization by DTT reduction of intermolecular disulfide linkages, allowing the reduced dissociated κ CN monomers to form fibrils [8]. Solutions were deposited in triplicate in BD Falcon 96-microtiter plates (Fisher Scientific, France), and 40 μ M ThT (Sigma–Aldrich) was added prior following the kinetics of fibril formation. Temperature was set at 37 °C, and fluorescence intensity was recorded every 10 min for 40 h with a FLUOstar Optima plate reader (BMG Labtech) with the excitation and emission wavelengths set at 450 and 480 nm, respectively, as described previously [7]. The kinetics of ThT fluorescence showed a rapid increase at early periods of the incubation and reached a plateau after 16 h. Maximal fluorescence intensity was proportional to initial native κ CN concentration (0–5 mg ml⁻¹), confirming κ CN fibril formation according to a previous study [8] (not shown).

After fibril formation, 250 μ l of each κ CN solution (0.0625–1.25 mg) was injected for SEC analysis on a preparative chromatography system (AKTA Purifier, GE Healthcare). The chromatograph was connected to a fluorescence detector (1260 Infinity, Agilent Technologies) placed after the UV detector. Fluorescence was monitored at 450 nm for the excitation wavelength and at 480 nm for the emission wavelength. Absorbance was monitored at 280 nm. Proteins were eluted from a Superdex-200HR 10/300 GL column with 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹. According to the manufacturer (GE Healthcare), the column can separate proteins with size in the range of 10–600 kDa, with globular proteins having size above 1300 kDa being excluded from the gel at elution volumes around 8 ml.

The SEC profiles of the κ CN standard solutions after the fibrillation step indicated that both the fibrillar and native forms of κ CN were present, as shown in Fig. 1A for the 1-mg ml⁻¹ solution. Taking the absorbance signal (280 nm) into account, the major part

of κ CN was eluted at 8.03 ml, which corresponds to the total exclusion volume and, thus, to high molecular weight κ CN polymers. A smaller peak was observed at 20.2 ml, which corresponds to 19- to 20-kDa-sized κ CN monomers. Considering the ThT fluorescence signal, a peak was also detected at 8.28 ml, but no peak was observed at 20 ml. These data showed that the fibrillar forms of κ CN were predominant and were eluted in the fraction of high molecular weight. It accorded with Ecroyd and coworkers [8] because the presence of DTT during the fibrillation step ensured that the fibril forms would be promoted.

Calibration curves were obtained after integrating SEC chromatograms of the five standard κ CN solutions containing both fibrillar and native κ CN. For the fibrillar forms, significant correlation was obtained between peak areas of high molecular weight fibrils detected either by the fluorescence detector [(Afluo)_{fibrils}] or by the UV detector [(A280)_{fibrils}], as illustrated in Fig. 1B. This led to determination of the α coefficient relating the fluorescence of κ CN fibrils labeled with ThT and their aromatic content evaluated by UV detection:

$$(Afluo)_{fibrils} = \alpha \cdot (A280)_{fibrils} \quad \text{with } \alpha = 0.722. \quad (1)$$

To determine the fibrils amount, the (A280)_{fibrils} value needs to be converted into milligrams (mg) of equivalent κ CN fibrils. As shown in Fig. 1C, a calibration curve can be obtained after integration of the total UV signal (A280) for the different amounts of injected κ CN (0.0625, 0.125, 0.25, 0.625, and 1.25 mg), leading to determination of the β coefficient relating total peak area at 280 nm (A280) and the amount of total κ CN ($m_{\kappa CN}$):

$$(A280) = \beta \cdot m_{\kappa CN} \quad \text{with } \beta = 865. \quad (2)$$

The amyloid fibrils content ($m_{\kappa CN \text{ fibrils}}$) can finally be expressed as

$$m_{\kappa CN \text{ fibrils}} = \frac{(Afluo)_{fibrils}}{\alpha \times \beta}. \quad (3)$$

To check the feasibility and specificity of this technique, polymers such as protein, nucleic acids, and polysaccharides, which are usually found in biological samples, were assayed for possible interference with the proposed method. After having been incubated with ThT, none of the tested molecules (globular bovine

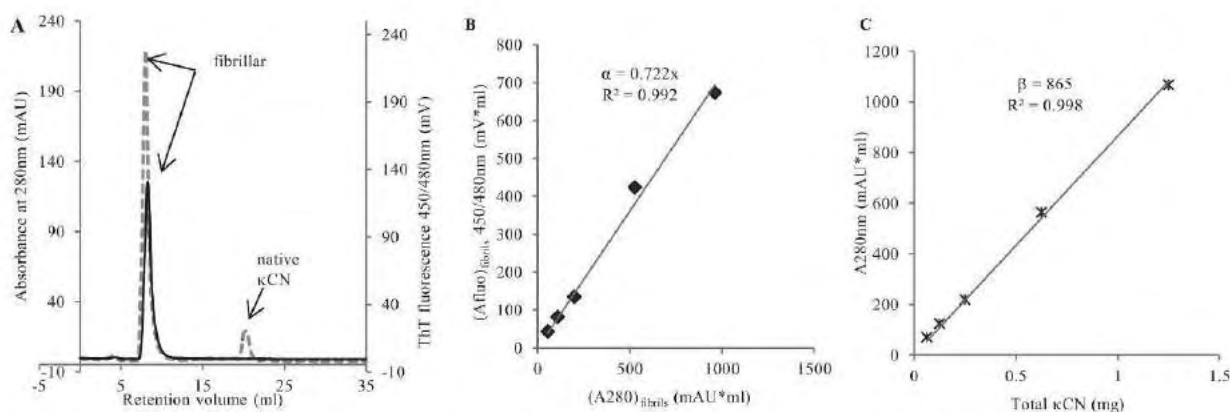


Fig. 1. SEC profiles of native and fibrillar forms of κ CN and correlation of UV peak areas, fluorescence peak areas, and κ CN amounts. (A) SEC chromatogram of 1 mg ml⁻¹ κ CN standard solution after fibrillation step in the presence of 40 μ M ThT and elution on Superdex-200 with UV detection at 280 nm (dotted line) or fluorescence detection with Ex = 450 nm/Em = 480 nm (solid line). (B) Correlation and linear regression parameters between the peak area at 450/480 nm [(Afluo)_{fibrils}] and the peak area at 280 nm [(A280)_{fibrils}] obtained for the high molecular weight fibrils after injection of each standard solution (0.0625, 0.125, 0.25, 0.625, and 1.25 mg). (C) Calibration curve and linear regression parameters between total peak areas at 280 nm (A280) and total κ CN amount (0.0625, 0.125, 0.25, 0.625, and 1.25 mg).

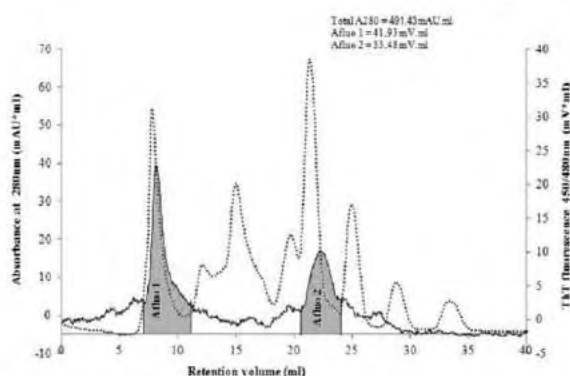


Fig. 2. SEC profiles of EPSS extracted after sonication of a *Bacillus licheniformis* 48-h biofilm. Scrapped biofilm was suspended in 1.5 ml of PBS, and cell–EPS bonds were disrupted by sonication (0.75 W/ml, 3×30 s). After the addition of ThT (40 μ M) and centrifugation (10,000 g, 20 min), the EPS extract was filtered (0.2 μ m) and injected (250 μ l) into the Superdex-200 column with UV detection at 280 nm (dotted line) or fluorescence detection with Ex = 450 nm/Em = 480 nm (solid line).

serum albumin, lambda DNA, dextran, and alginate) could give a signal at the chosen excitation/emission wavelengths (450/480 nm), showing the absence of interference of these biopolymers on amyloid fibers quantification.

The proposed method was finally applied for in vitro measurement of amyloid proteins produced in *Bacillus licheniformis* (strain CIP 110824) biofilms. Indeed, previous work performed in our laboratory has indicated that extracellular proteins are a major component of this biofilm matrix, but no information has yet been provided on the presence of amyloids [10]. To extract extracellular polymeric substances (EPSS) among amyloid proteins, 48-h biofilms were scrapped and suspended into 1.5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) and then sonicated twice for 30 s.

Fig. 2 shows the UV and fluorescence profiles of the EPSS extracted after sonication of the 48-h biofilm and fractionated by SEC on the Superdex-200 column. The ThT fluorescence signal has put in evidence two peaks: a first peak eluted at 8.23 ml with a peak area (Afluo 1)_{fibrils} of 41.93 mV/ml and a second peak eluted at 21.4 ml with a peak area (Afluo 2)_{fibrils} of 33.48 mV/ml.

Through Eq. (3), amyloid fibrils of peaks 1 and 2 could be expressed as 0.0671 and 0.0535 mg_{eq, κ CN}, respectively.

In addition, the proportion of amyloid fibrils in the sample was evaluated thanks to the absorbance profiles at 280 nm. Indeed, through Eq. (1), peak areas of amyloid fibrils (Afluo 1)_{fibrils} and (Afluo 2)_{fibrils} were converted into peak areas detected at 280 nm, i.e. 58.07 mAU/ml for fraction 1 and 46.37 mAU/ml for fraction 2. The comparison of these values with the total area of all the peaks detected at 280 nm (491.43 mAU/ml) indicated that high molecular weight amyloids eluted in fraction 1 represented approximately

12% of the extracted EPSS detected at 280 nm, whereas low molecular weight fibrils (15–20 kDa) of fraction 2 are approximately 9.3%. Therefore, approximately 21% of the extracted protein demonstrated amyloid structures, which was in accordance with the abundance of amyloids detected in *Bacillus* species and more generally in many natural biofilms [11].

This study has proposed a simple method to quantify soluble amyloid-like proteins formed in biological systems. The amount of soluble fibrils was expressed in reference to κ CN, a commercial protein showing a high ability to form structured β -sheet amyloids in vitro, and soluble fibrils could be quantified for amounts ranging from 62.5 to 1000 μ g_{eq, κ CN}. In addition, SEC fractionation allowed evaluation of the amyloids to non-amyloids protein ratio of the analyzed sample. Interestingly, depending on the nature and origin of the biological sample, the fibrillation step could be performed with other commercially available amyloid-forming proteins in order to provide quantification in reference to a relevant amyloid protein.

Acknowledgments

This research was supported by grant 12050475 from Région Midi-Pyrénées and funding from Toulouse University (France). The authors thank Florence Cléro-Legendre for proofreading of the manuscript.

References

- [1] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu. Rev. Biochem.* 75 (2006) 333–366.
- [2] D. Otzen, P.H. Nielsen, We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid, *Cell Mol. Life Sci.* 65 (2008) 910–927.
- [3] S. Chen, V. Berthelot, J.B. Hamilton, B. O’Nuallain, R. Wetzel, Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics, *Biochemistry* 41 (2002) 7391–7398.
- [4] I.M. Kuznetsova, A.I. Sulatskaya, V.N. Uversky, K.K. Turoverov, Analyzing thioflavin T binding to amyloid fibrils by an equilibrium microdialysis-based technique, *PLoS One* 7 (2012) e30724.
- [5] M. Biancalana, S. Koide, Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils, *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (2010) 1405–1412.
- [6] Y. Zou, Y. Li, W. Hao, X. Hu, G. Ma, Parallel β -sheet fibril and antiparallel β -sheet oligomer: new insights into amyloid formation of hen egg white lysozyme under heat and acidic condition from FTIR spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 4003–4013.
- [7] D.C. Thorn, S. Meehan, M. Sunde, A. Rekas, S.L. Gras, C.E. MacPhee, C.M. Dobson, M.R. Wilson, J.A. Carver, Amyloid fibril formation by bovine milk κ -casein and its inhibition by the molecular chaperones α S- and β -casein, *Biochemistry* 44 (2005) 17027–17036.
- [8] H. Ercroyd, D.C. Thorn, Y. Liu, J.A. Carver, The dissociated form of κ -casein is the precursor to its amyloid fibril formation, *Biochem. J.* 429 (2010) 251–260.
- [9] M.S. Dueholm, S.V. Petersen, M. Sønderkær, P. Larsen, G. Christiansen, K.L. Hein, J.J. Enghild, J.L. Nielsen, K.L. Nielsen, P.H. Nielsen, D.E. Otzen, Functional amyloid in *Pseudomonas*, *Mol. Microbiol.* 77 (2010) 1009–1020.
- [10] R. Monique, G.-N. Elisabeth, P. Etienne, L. Dominique, A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 7464–7471.
- [11] P. Larsen, J.L. Nielsen, M.S. Dueholm, R. Wetzel, D. Otzen, P.H. Nielsen, Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms, *Environ. Microbiol.* 9 (2007) 3077–3090.

III. Dosage *in situ* des fibres amyloïdes au sein de biofilms bactériens modèles

Ce volet du chapitre vise à proposer une méthode de quantification *in situ* des FA bactériennes au sein de biofilms modèles. Le développement de cette méthode sera présenté sous-forme d'un article.

Comme évoqué précédemment, la Thioflavine T réunit plusieurs critères favorables à son utilisation pour le dosage *in situ* des fibres amyloïdes : elle est spécifique de ce type de polymère et permet de marquer l'ensemble de ces protéines présentant des feuillets β , et elle est déjà utilisée en microscopie confocale. Seules les informations relatives à la sensibilité et à la gamme de concentrations dosables restent encore à déterminer.

Pour proposer un dosage *in situ* des FA des biofilms bactériens, la stratégie générale de développement des outils de quantification *in situ* a été appliquée. En ce qui concerne le choix de l'étalon et la calibration du dosage en solution, les éléments obtenus au paragraphe précédent ont permis d'orienter rapidement le travail vers l'utilisation de la κ -CN fibrillaire et une transposition du dosage au format microplaque.

Afin de disposer d'un étalon de qualité et en quantité suffisante, les solutions de κ -CN fibrillées préparées comme indiqué au **Paragraphe I** et dans la FIGURE C-6 (Etape I) ont été purifiées par passage sur une colonne CaptoCore 700 permettant de récupérer les fibres de κ -CN (Figure D2, Etape III). La κ -CN fibrillée étalon obtenue a ensuite été concentrée et dosée et a permis de valider un protocole de dosages des FA en solution présentant des limites de détection et de quantification faibles de 2,1 $\mu\text{g}_{\text{eq } \kappa\text{-N fibrillaire}}$ et de 7,1 $\mu\text{g}_{\text{eq } \kappa\text{-N fibrillaire}}$ respectivement (voir Article qui suit en français).

Le dosage a ensuite été appliqué sur des solutions de BSA (10-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), d'alginate et de dextrane (250 à 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), d'ADN lambda (1000 à 10 ng.mL^{-1}) et enfin des dilutions décimales de suspensions bactériennes de *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa* (10^0 à 10^7 et 10^9 CFU/ml respectivement). Aucun des polymères testés n'a induit de réponse significativement différente du blanc, et seules les suspensions bactériennes de *P. aeruginosa* ont montré une réponse significative pour des densités cellulaires supérieures à 10^6 CFU.mL⁻¹.

L'application du dosage sur des biofilms de 24 et 48h des trois espèces modèles de l'étude a révélé que les concentrations en FA dans les biofilms de *W. confusa* étaient inférieures à la limite de quantification, tandis que les biofilms de 48 h de *P. aeruginosa* étaient deux fois plus riches en

FA qu'un biofilm de 24 h ou que les biofilms de *B. licheniformis* (**Figure 3, Article 4 en français**). Ces dosages ont été confortés par la méthode des ajouts dosés, qui par l'ajout de K-CN fibrillaire sur les différents biofilms, a permis de montrer que les différentes matrices n'interféraient pas dans le dosage.

“ Quantification *in situ* des fibres amyloïdes de biofilms bactériens mono-espèces”

I. Randrianjatovo-Gbalou, C-E Marcato-Romain, E. Girbal-Neuhauser*

Introduction

De nombreuses études ont rapporté l'importance des fibres amyloïdes (FA) fonctionnelles dans le maintien de la structure des biofilms bactériens. Chez *Bacillus subtilis*, la protéine TasA semble jouer un rôle essentiel pour assurer l'intégrité structurale des biofilms (Romero et al. 2010). Cette protéine, initialement décrite comme étant associée aux endospores produites par la bactérie et comme ayant une activité antimicrobienne, s'auto-assemble pour former une structure protéique de type amyloïde au sein de la matrice des biofilms de *Bacillus subtilis*. La présence de FA a également été mise en évidence au sein de biofilms naturels (Larsen et al. 2007; Otzen and Nielsen 2008) mais également chez d'autres souches bactériennes formant des biofilms. C'est le cas notamment chez les entérobactéries qui produisent des curli dont la sous-unité protéique est constituée par la protéine CsgA (Saldaña et al. 2009; Dueholm et al. 2011) ou encore chez les espèces de *Pseudomonas* avec la protéine FapC (Dueholm et al. 2013a; Dueholm et al. 2013b). Toutes ces protéines suscitent un intérêt considérable pour leurs propriétés structurales mais également pour les propriétés fonctionnelles qu'elles confèrent aux biofilms en termes d'adhésion, d'agrégation intercellulaire (Garcia et al. 2011) , de viscoélasticité (Lembré et al. 2014a) ou encore d'hydrophobicité de la matrice (Zeng et al. 2015).

Du fait de cet intérêt grandissant, de nombreuses études ont proposé des techniques d'extraction de ces fibres afin de mieux les caractériser *in vitro* (Kaplan et al. 2003a). Cependant, les rendements d'extraction des fibres sont souches-dépendants si bien qu'il est nécessaire d'adapter à chaque fois la méthode à la souche ou l'espèce étudiée (Otzen and Nielsen 2008; Chai et al. 2013). Ces techniques sont mises en œuvre le plus souvent selon des conditions drastiques (acide formique 90%, SDS 2% à 100°C) et donc complètement destructives pour les autres composants du biofilm et pour la structure du biofilm lui-même. D'autre part, la ThT, largement employée pour la mise en évidence des structures amyloïdes à feuillet β antiparallèles, est devenue le biomarqueur de référence pour leur caractérisation *in vitro*.

Ainsi, cet article décrit le développement d'une méthode de quantification *in situ* des FA bactériennes préalablement marquées à la ThT et ceci, directement au sein de biofilms modèles. Pour ce faire, la démarche suivante a été appliquée : purification de κ -CN fibrillaire, calibration de la fluorescence émise par des étalons de concentrations connues en κ -CN fibrillaire, vérification des interférences des principaux constituants du biofilms et déploiement du protocole sur des biofilms modèles avec ajouts dosés *in situ*.

Matériels et méthodes

Formation des biofilms

Les souches bactériennes *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442, *Weissella confusa* LBAE C39-2 ont été choisies pour former les biofilms. Les stocks glycérol de chacune des souches ont été repiqués et incubés à 37°C dans un bouillon TS, pour *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa* et à 30°C dans un bouillon MRS pour la souche *Weissella confusa*. Après 16h de croissance, l'absorbance à 595nm des suspensions a été mesuré afin d'être ajustée à 0,1 par dilution avec du bouillon stérile. Pour la souche de *Weissella confusa*, le milieu MRS a été supplémenté de 4% (m/v) de saccharose afin de favoriser la production de matrice.

Des microplaques 96-puits stériles (Greiner bio-One, PS, F-bottom) ont été ensuite inoculées par dépôt de 200 μ L de chaque inoculum par puits. Les microplaques ont été incubées à 37°C ou à 30°C, sans agitation pendant 24h ou 48h sans renouvellement de milieu.

Réactifs et solutions

Le milieu déshydraté Trypticase soja (TS), la thioflavine T (ref. T3516), la κ -caséine (C0406), la Bovine Serum Albumine (BSA) (FP0010), l'alginate (*sodium alginate from brown algae*, A0682) ont été fournis par Sigma-Aldrich, sous leur forme en poudre. L'ADN lambda a été obtenu à partir du kit PicoGreen[®] dsDNA quantification de chez Molecular Probes (Fischer Scientific) et le Dextrane (*from Leuconostoc mesenteroides*, T 40,000) a été acheté chez Fluka. La solution stock de ThT a été préparée dans de l'eau distillée à une concentration de 4mM puis stockée à -20°C jusqu'à utilisation. L'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, 118430010) a été acheté chez AcrosOrganics sous sa forme en poudre et le dithiothreitol (DTT, A3668) a été obtenu chez Applichem, en solution concentrée de 1M dans l'eau. Le tampon phosphate a été préparé à partir de phosphate

de potassium monobasique (KH_2PO_4 , 60230, Fluka) et de phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4 , 60355, Fluka) à une concentration finale de 50mM et pH de 7.5. Une solution mère de k-caséine a été préparée à une concentration de $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampon phosphate, en présence d'EDTA à 2mM et de DTT à 20mM.

Fibrillation de la κ -caséine

La fibrillation de la κ -caséine (κ -CN) a été effectuée selon le protocole décrit précédemment par Ecroyd et al. (2010) et Randrianjatovo-Gbalou et al. (2015). Brièvement, 5 mL de la solution mère de κ -CN sont placés dans un tube (Falcon®) et incubées à 37°C, pH 7,5 et en présence de DTT et d'EDTA pendant 20h.

Purification des fibres amyloïdes de k-caséine et calibration du dosage

Après fibrillation, 500 μL de la solution mère ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ont été marqués pendant 2h avec la ThT, puis injectés dans une colonne Superdex200 pour vérifier la présence effective de fibres (Pic de fluorescence à 480nm après excitation à 450 nm). Le reste de la solution, soit 4,5mL, a été filtré à 0,2 μm puis injecté par séquence de 1mL dans une colonne HiTrap CaptoCore700 1mL (GE healthcare) afin de piéger les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 700 kDa et de ne garder en solution que les grosses molécules, dont les FA. Les solutions ont ensuite été collectées en sortie de colonne (400 μL /tube eppendorf) et regroupées avant d'être concentrées par filtration grâce à un dispositif de filtration AMICON® (capacité 15mL, volume de concentrat =500 μL ; seuil de coupure 30 kDa, Millipore) par centrifugations successives à 4500 rpm, à 4°C pendant 10min. Au total, trois centrifugations ont été effectuées en ajoutant à chaque fois du tampon phosphate à 50 mM de façon à éliminer les traces de DTT et d'EDTA non retenus dans la colonne. La concentration finale ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de la solution de fibres de k-CN a été déterminée par spectrophotométrie d'absorbance à 280 nm et a été déduite en appliquant la loi de Beer-Lambert à partir de la valeur du coefficient d'extinction molaire de la k-CN donnée dans la littérature ($1,05\text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Cette solution a été utilisée pour préparer une gamme étalon de k-CN fibrillaire (10 à 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) et stockée à -20°C jusqu'au jour de l'analyse.

Pour vérifier la faisabilité de la calibration du dosage des FA par la ThT en microplaque 96-puits, 50 μL de chaque solution étalon ont été mis en présence de 20 μL de ThT à 4mM et le volume réactionnel a été ajusté à 200 μL final par puits avec du tampon phosphate. La plaque a été incubée à l'obscurité, à température ambiante pendant 2h. La fluorescence est mesurée à 485nm

après une excitation à 450nm au moyen du lecteur de microplaque Optima FluoSTAR (BMG Labtech). En parallèle, et afin de vérifier la spécificité du marquage de la ThT pour les FA, une gamme étalon de BSA, une protéine non fibrillaire, a été analysée dans les mêmes conditions (Ex 450nm / Em 485 nm).

Analyse des interférences des autres composants sur le signal de fluorescence de la ThT en solution

Des gammes de BSA (10-1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), d'alginate et de dextrane (250 à 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) puis d'ADN lambda (1000 à 10 ng.mL^{-1}) ont été préparées dans du tampon phosphate 50mM pour évaluer les possibles interférences dues à des protéines non fibrillées, à des polysaccharides ou à l'ADN. Par ailleurs, la contribution des cellules a également été testée pour des suspensions bactériennes de *Bacillus licheniformis* et *Pseudomonas aeruginosa* : des cultures de 18 heures ont été centrifugées (4500rpm, 10 min à 4°C), puis les culots ont été rincés deux fois avec du PBS avant d'être suspendus et dilués en série. Le dosage à la ThT a été appliqué sur l'ensemble des gammes, toutes les mesures étant faites en triplicat.

Les signaux de fluorescence de chaque polymère ou type de cellule testés ont été comparés à un blanc analytique constitué par le tampon phosphate 50mM marqué avec la ThT à 40 μM de façon à évaluer leur interférence sur le dosage. La différence entre les signaux de chaque gamme testée et le blanc analytique a été évaluée en procédant à une analyse de variance à un facteur (1way-ANOVA) suivie du test de comparaison multiple de Dunnett. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel GraphPad PRISM 5.00. En ce qui concerne la réponse des protéines non-amyloïdes (BSA), la différence entre la pente de la courbe de calibration en κ -caséine et celle de la BSA a été évaluée en déterminant la statistique de Fisher (F) grâce au logiciel de statistiques GraphPad PRISM 5.00.

Validation du dosage par la méthode des ajouts dosés

Pour valider le dosage, la réponse globale et non-spécifique provenant de la matrice des biofilms a été évaluée en appliquant la méthode des ajouts dosés (Zuriaga-Agustí et al. 2013). Pour cela, des quantités connues de κ -CN fibrillaire (0 à 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ont été ajoutées sur les biofilms établis (24 et 48h) avant de procéder au dosage des fibres par la ThT. Les pentes de chaque droite, incluant la réponse en fluorescence de l'étalon interne et celle de chaque biofilm, ont été comparées à celle de la droite étalon de la κ -CN fibrillaire. Si les pentes sont identiques, l'effet de

la matrice peut être rejeté ; par ce résultat, il est alors possible de valider l'application du dosage sur des biofilms en microplaque avec une gamme de calibration en solution. L'analyse statistique a été réalisée au moyen du logiciel GraphPad PRISM 5.00.

Quantification in situ des fibres amyloïdes produites par trois biofilms bactériens modèles

Après 24h ou 48h d'incubation en conditions statiques la phase planctonique a été éliminée et les biofilms ont été rincés avec deux volumes (2 x 200 µL) de tampon phosphate 50 mM. Le dosage des FA a été fait après ajout de ThT à 40µM final dans un volume final de 200µL par puit. Les microplaques ont été incubées à l'obscurité et à température ambiante pendant 2h. Les dosages ont été répétés sur au moins trois essais indépendants.

Quantification in situ des exoprotéines produites par trois biofilms bactériens modèles

En parallèle, les protéines totales présentes dans les matrices des biofilms modèles ont été dosées au moyen de l'épicoconone tel que décrit par Randrianjatovo et al. (2015), avec pour seule modification, l'utilisation de la κ-CN fibrillaire comme étalon au lieu de la BSA.

Résultats et discussion

Spécificité de la réponse de la ThT

Afin d'évaluer la spécificité de la ThT pour les structures de type amyloïde, des solutions de concentrations connues en κ-CN amyloïde et en BSA non amyloïde ont été incubées en présence de ThT puis analysées par fluorimétrie. Les signaux de fluorescence obtenus sont représentés sur la FIGURE 1 en fonction de la quantité de protéine (µg par puit). Les deux courbes obtenues décrivent une corrélation linéaire mais dont les pentes sont significativement très différentes ($p < 0.0001$) puisque les valeurs de fluorescence de la BSA sont très faibles par rapport à celles de la κ-CN pour une même concentration. Ainsi, l'analyse statistique par rapport au blanc analytique révèle que le risque d'erreur lié à la surestimation de la quantité de FA en présence de protéines « autres » s'élève à 3,5% en moyenne sur la gamme testée de 5 à 50 µg de BSA par puits. Pour la κ-CN fibrillaire, les limites de détection et de quantification calculées comme indiqué par Shrivastava and Gupta (2011) à partir de la régression linéaire sont respectivement de 2,1 µg_{eq κC-N} fibrillaire et de 7,1 µg_{eq κC-N} fibrillaire.

Ces observations confirment la spécificité de fixation et de réponse de la ThT vis-à-vis des structures amyloïdes.

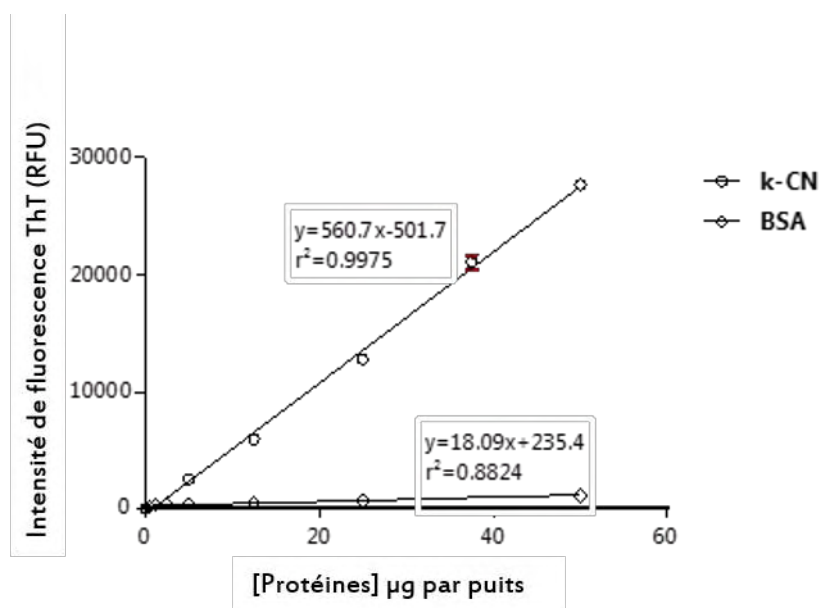


FIGURE 1. Courbe de calibration de la réponse de la ThT en fonction de la quantité de k-CN fibrillaire (cercles) comparée à la réponse de la ThT en présence de la protéine BSA non amyloïde (losanges). Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur la moyenne de trois répétitions.

Analyse des interférences des autres composants du biofilm (SEP et cellules) sur le signal de fluorescence de la ThT en solution

Différentes solutions de polysaccharides (Alginate et Dextrane), d'ADN ainsi que des suspensions bactériennes ont été analysées pour évaluer leur interférence éventuelle sur le dosage des FA au sein de biofilms bactériens. Les gammes de concentrations testées ont été choisies de façon à encadrer les quantités de chaque SEP retrouvées habituellement dans les biofilms formés dans les conditions de notre étude (Randrianjatovo et al. 2015).

Pour ces valeurs, l'analyse de variance (ANOVA), suivie du test de comparaison multiple de Dunnett, a permis d'écarter les contributions des exopolysaccharides, de l'ADN et des cellules de *Bacillus licheniformis* sur les gammes de concentrations testées. Pour les cellules de *Pseudomonas aeruginosa*, un effet significatif a été observé pour une densité cellulaire supérieure à 10^6 CFU.mL⁻¹. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. D'une part, la souche de *Pseudomonas aeruginosa* produit un pigment fluorescent et soluble dans l'eau, la pyoverdine. Bien que les suspensions aient été centrifugées et rincées, il est possible que lors de l'incubation des cellules avec la ThT (2h), les cellules aient continué à produire cette molécule, en réponse aux conditions peu favorables dans lesquelles elles ont été placées. La pyoverdine est un composé

fluorescent (ELLIOTT 1958; Creanga et al. 2011) dont le spectre d'émission atteint son maximum à 410 nm (380 – 480 nm). Ainsi, ce résultat statistique peut s'expliquer par la co-émission de fluorescence d'une faible quantité de pyoverdine et de la ThT. Cette observation limiterait donc l'utilisation de la ThT sur des espèces bactériennes productrices de pigments fluorescents (fluorescéines). D'autre part, les FA sont souvent retrouvées ancrées à la surface des cellules (pili, curli) si bien qu'une lyse des cellules est souvent nécessaire pour les extraire (Sawyer et al. 2012; Dueholm et al. 2013b). En marquant ainsi les suspensions bactériennes avec de la ThT, il est probable qu'une réponse soit détectée du fait de la présence de FA à la surface des cellules.

De manière générale, il est possible de dire que les composants « non-amyloïdes » majoritaires du biofilm n'interfèrent pas sur le dosage en solution des FA par la ThT. Il reste cependant à vérifier que ce dosage peut être utilisé *in situ* et qu'il n'existe pas d'effet global de la matrice qui pourrait gêner le dosage des fibres au sein du biofilm.

Evaluation de l'effet de la matrice par la méthode des ajouts dosés (SAM)

Pour chaque biofilm formé (24 et 48h) sur microplaque 96-puits, la réponse de fluorescence de la ThT a été mesurée après ajout de quantités connues de κ -CN fibrillaire (étalon interne). A partir de la calibration préalablement obtenue avec la gamme de κ -CN en solution, les quantités respectives de FA totales sont calculées puis exprimées en microgrammes équivalents- κ -CN ; cette quantité totale inclut la part de FA produite par le biofilm lui-même, et la part ajoutée par l'étalon interne.

La FIGURE 2 représente les courbes de corrélation entre les quantités totales de fibres dosées chez les biofilms et celles de κ -CN ajoutées, allant de 0 à 37,5 μ g. Les résultats obtenus avec la souche de *W.confusa* ne sont pas représentés car la quantité de FA détectée était en dessous de la limite de quantification à 24 heures et elle restait faible à 48h (1,39 $\text{mg}_{\text{eq KC-N fibrillaire}}$).

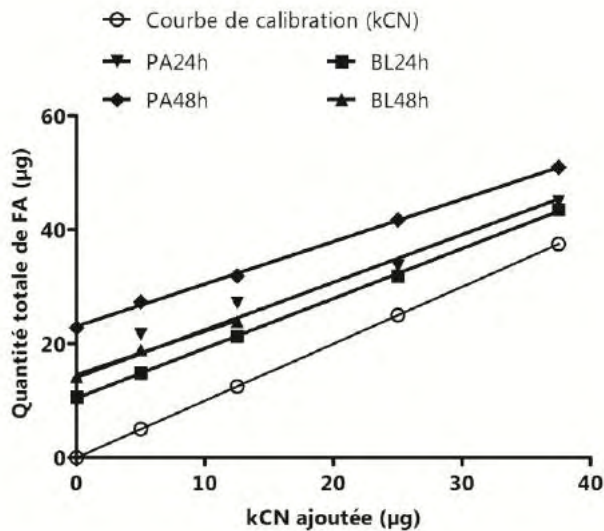


FIGURE 2. Détermination des quantités de fibres totales dosées avec la Thioflavine T pour des biofilms de *B. licheniformis* (BL) et *P. aeruginosa* (PA) dopés ou non avec des quantités connues de κ -CN fibrillaire (5, 12,5 ; 25 et 37,5 µg)

Les tests statistiques indiquent que les différentes droites présentent des valeurs de pente non statistiquement différentes entre elles, mais également identiques à celle de la gamme étalon de κ -CN fibrillaire (p -value=0.0923, α =0.05). Ces résultats permettent donc d'écarter les éventuels effets de la matrice et de valider l'application du dosage aux différents biofilms formés par les souches modèles de l'étude.

Quantification in situ des protéines et des fibres amyloïdes produites par trois biofilms bactériens modèles

Afin d'estimer la proportion de FA par rapport à la quantité totale d'exoprotéines, les protéines ont été dosées avec l'épicoconone selon le protocole proposé par Randrianjatovo et al. (2015), avec la κ -CN fibrillaire comme étalon. Il a été vérifié avec la κ -CN que la méthode de dosage à l'épicoconone permet de doser les protéines sous forme native et fibrillaire avec une sensibilité équivalente (Randrianjatovo et al. 2015). Pour les trois souches modèles, les dosages ThT et épicoconone ont été appliqués *in situ* sur des biofilms formés pendant 24 ou 48h en microplaque. Les concentrations en protéines totales et en FA ont été déterminées en référence à une gamme de κ -CN fibrillaire en solution. En procédant ainsi, il est possible de rapporter la

quantité de fibres sur la quantité totale en protéines de la matrice. La FIGURE 3 présente ainsi la distribution des fibres et des protéines totales pour deux stades de formation des biofilms.

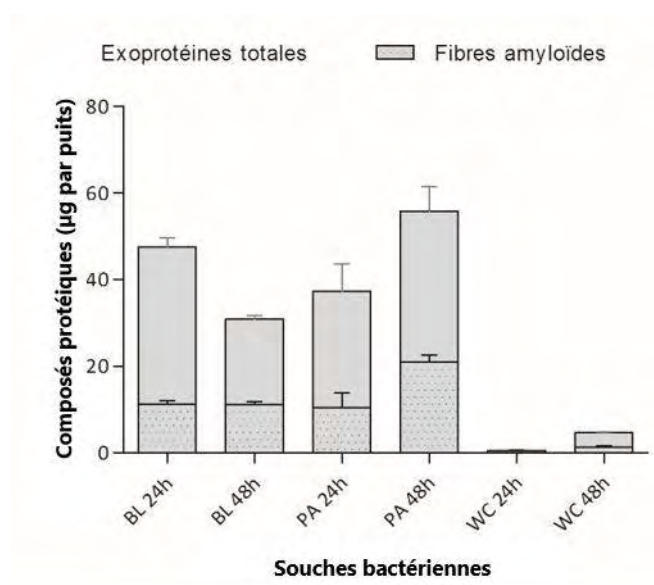


FIGURE 3. Quantités de fibres amyloïdes, exprimées en $\mu\text{g-eq}_{\text{KCN}}^{\text{fibrillaire}}$ et de protéines totales exprimées en $\mu\text{g-eq}_{\text{KCN}}$, trouvées au sein de biofilms bactériens modèles.

Chez *Bacillus licheniformis*, la quantité de fibres après 24h de culture est relativement importante et atteint 11 $\mu\text{g-eq}_{\text{KCN}}$, ce qui représente 24% des protéines totales dosées dans la matrice. Entre 24h et 48h, alors que la teneur en exoprotéines totales diminue, celle des FA reste stable, amenant ainsi la teneur en fibres par rapport à l'ensemble des protéines à 36% après 48h. A l'inverse, chez *Pseudomonas aeruginosa* les quantités de fibres augmentent de 10,5 à 21 $\mu\text{g eq}_{\text{KCN}}$ entre 24 et 48 h. Cette sécrétion participe significativement à l'augmentation des protéines totales. En conséquence, la teneur en FA passe de 28% à 37,7%, soit une valeur proche de celle du biofilm de *B.licheniformis* à 48 heures.

Ces observations sont en accord avec les cinétiques de formation des biofilms observées chez ces 2 souches (résultats non montrés). En effet, durant les premières 24 heures, la vitesse relative de croissance du biofilm de *B.licheniformis* était deux fois plus élevée que celle de *P.aeruginosa* et il est possible que cela impacte la dynamique de production de la composante protéique de la matrice. En d'autres termes, après 24h, les nutriments peuvent être rapidement en limitation chez *Bacillus licheniformis* et induire un ralentissement de la production de matrice. Ce phénomène a été décrit chez la souche *Bacillus subtilis* (Steinberg and Kolodkin-Gal 2015) à l'issue d'une analyse spatiotemporelle du profil d'expression génique de la matrice. En effet, pour s'adapter aux

conditions environnementales, les gènes responsables de la production de la matrice, notamment les opérons *epsA-O* (production d'exopolysaccharides) et *tapA-sipW-tasA* (production des fibres TasA), peuvent exercer une régulation (ou feedback) positive ou négative lorsqu'une forte concentration en SEP est détectée. Ainsi, la machinerie matricielle est stoppée pour éviter un gaspillage d'énergie en produisant continuellement des substances exopolymériques. Ce type de régulation est également décrit chez les espèces de *Pseudomonas* : en réponse à un excès ou à un épuisement soudain des nutriments, des enzymes de dégradation de la matrice, essentiellement des lyases (alginate lyase chez *P. aeruginosa*), sont synthétisées afin d'enclencher la dispersion des cellules (Gjermansen et al. 2010; Kaplan 2010). Dans les conditions de l'étude, le biofilm de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* étudiée ne semble pas être en limitation à 24h et continue le développement de sa matrice, et en particulier de sa composante protéique, jusqu'à 48h. Chez la souche *Weissella confusa*, en revanche les protéines totales et les FA sont retrouvées en très faibles quantités dans les biofilms de 24h (valeurs inférieures au seuil de quantification des dosages) et augmentent légèrement à 48h pour atteindre 4,61 et 1,39 $\mu\text{g}_{\text{eq KC-N fibrillaire}}$ respectivement. Ainsi, il semble que la formation du biofilm ne s'opère réellement qu'après 24 heures ; ces résultats sont en accord avec les résultats de (Marchal et al. 2012) qui ont observé à 48 heures une surproduction d'exopolysaccharides de type dextrane lors de culture dans des conditions similaires, à savoir sur un milieu supplémenté avec 4% (m/v) de saccharose.

En conclusion, quelle que soit la souche et la quantité de fibres produites, celles-ci sont présentes aux phases initiales de formation des biofilms mais sont également retrouvées au sein de la matrice pendant le développement des biofilms. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui ont mis en évidence le rôle des FA dans l'attachement primaire des cellules aux surfaces (Branda et al. 2006; Herbst et al. 2014) ainsi que dans l'adhésion intercellulaire et donc le maintien de l'intégrité structurale des biofilms (Romero et al. 2010; Schwartz et al. 2012; Dueholm et al. 2013b; Zeng et al. 2015).

Par ailleurs, le développement analytique présenté dans cet article a permis de proposer un outil de quantification *in situ* des FA des de biofilms bactériens sans passer par les étapes d'extraction, souvent fastidieuses et espèces-dépendantes. La spécificité de la ThT pour les FA a été démontrée dans les conditions de l'étude. Les protéines non-amyloïdes, les polysaccharides et l'ADN n'ont eu que peu, voire pas de réponse de fluorescence en présence de ThT et l'effet global de la matrice sur le dosage a également pu être écarté. Tous ces résultats réunis ont permis de valider le dosage des FA par la ThT. En termes de performances, le dosage *in situ* à la ThT a une gamme de linéarité allant de 7,08 μg à 50 μg par puit (soit de 141,5 à 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et a montré sa

compatibilité avec des matrices contrastées. La méthode des ajouts dosés a permis de lever la contrainte de la limite de détection (2,34 µg) pour permettre la quantification des fibres et des protéines chez des souches comme *Weissella confusa* qui produisent de très faibles quantités de FA. De même, par cette méthode, l'intégrité des biofilms est préservée et il a été possible de suivre le niveau de production des fibres au cours du développement des biofilms. Pour conclure, la ThT étant un marqueur fluorescent également compatible pour une observation des structures en microscopie confocale, la combinaison de l'analyse quantitative et de l'analyse qualitative est un atout majeur pour une meilleure compréhension des processus biologiques qui s'opèrent au sein des biofilms.

Références bibliographiques

- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R.** 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci* **107**:2230–2234.
- Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH.** 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol* **9**:3077–3090.
- Otzen D, Nielsen PH.** 2008. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol Life Sci* **65**:910–27.
- Dueholm MS, Nielsen SB, Hein KL, Nissen P, Chapman M, Christiansen G, Nielsen PH, Otzen DE.** 2011. Fibrillation of the major curli subunit CsgA under a wide range of conditions implies a robust design of aggregation. *Biochemistry* **50**:8281–90.
- Saldaña Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Girón JA.** 2009. Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol* **11**:992–1006.
- Dueholm MS, Søndergaard MT, Nilsson M, Christiansen G, Stensballe A, Overgaard MT, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Otzen DE, Nielsen PH.** 2013. Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. *Microbiologyopen* **2**:365–382.
- Dueholm MS, Otzen D, Nielsen PH.** 2013. Evolutionary insight into the functional amyloids of the pseudomonads. *PLoS One* **8**:e76630.
- Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN.** 2011. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One* **6**:e17632.
- Lembré P, Di Martino P, Vendrely C.** 2014. Amyloid peptides derived from CsgA and FapC modify the

viscoelastic properties of biofilm model matrices. *Biofouling* 1–12.

Zeng G, Vad BS, Dueholm MS, Christiansen G, Nilsson M, Tolker-Nielsen T, Nielsen PH, Meyer RL, Otzen DE. 2015. Functional bacterial amyloid increases *Pseudomonas* biofilm hydrophobicity and stiffness. *Front Microbiol* **6**.

Kaplan B, Shtrasburg S, Pras M. 2003. Micropurification techniques in the analysis of amyloid proteins. *J Clin Pathol* **56**:86–90.

Chai L, Romero D, Kayatekin C, Akabayov B, Vlamakis H, Losick R, Kolter R. 2013. Isolation, Characterization, and Aggregation of a Structured Bacterial Matrix Precursor. *J Biol Chem* **288**:17559–17568.

Zuriaga-Agustí E, Bes-Piá A, Mendoza-Roca JA, Alonso-Molina JL. 2013. Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR activated sludge flocs in view of improving EPS determination. *Sep Purif Technol* **112**:1–10.

Randrianjatovo I, Girbal-Neuhauser E, Marcato-Romain C-E. 2015. Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**:4835–44.

Shrivastava A, Gupta V. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci* **2**:21.

Elliott RP. 1958. Some properties of pyoverdine, the water-soluble fluorescent pigment of the pseudomonads. *Appl Microbiol* **6**:241–6.

Sawyer EB, Claessen D, Gras SL, Perrett S. 2012. Exploiting amyloid: how and why bacteria use cross- β fibrils. *Biochem Soc Trans*.

Steinberg N, Kolodkin-Gal I. 2015. The Matrix Reloaded: Probing the Extracellular Matrix Synchronizes Bacterial Communities. *J Bacteriol* **JB.02516–14**.

Kaplan JB. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* **89**:205–218.

Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T. 2010. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: Genetic elements and molecular mechanisms. *Mol Microbiol* **75**:815–826.

Marchal F., Robert H., Merhabi N., Fontagné-Faucher C., Yousfi M., Marcato-Romain C-E., Eichwald O., Rondel C., Gabriel B. 2012. Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. *J Phys D Appl Phys* **45**:345202.

- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R.** 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* **59**:1229–1238.
- Herbst F-A, Søndergaard MT, Kjeldal H, Stensballe A, Nielsen PH, Dueholm MS.** 2014. Major Proteomic Changes Associated with Amyloid-Induced Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Proteome Res.*
- Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR.** 2012. Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* **8**:e1002744.
- Creanga, D., Poiata, A., Fifere, N., Airinei, A., & Nadejde, C.** (2011). Fluorescence of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas* under the effect of iron oxide nanoparticles. *Romanian Biotechnological Letters*, *16*(4), 6337.

Chapitre III : Etude de l'implication des SEP dans les mécanismes d'adhérence et de cohésion du biofilm de *Bacillus licheniformis*

L'ADN extracellulaire fait partie des SEP majoritaires de la matrice de biofilms bactériens. En effet, ceci a été évoqué depuis la découverte de son rôle dans la stabilité des biofilms suite à un traitement à la DNase I, une endonucléase, chez *Pseudomonas aeruginosa* (Whitchurch et al. 2002). Depuis, l'intérêt pour le rôle de l'ADN extracellulaire s'est progressivement accentué et est toujours d'actualité (Okshevsky et al. 2015).

De ce fait, dans la continuité de notre étude, nous avons consacré le Chapitre III à l'étude de la contribution de l'ADN extracellulaire dans les propriétés d'adhérence et de cohésion du biofilm de *Bacillus licheniformis*. Le choix de cette souche a été orienté par son implication dans la colonisation de surfaces industrielles, notamment dans les biofilms papetiers dans lesquels la souche a été isolée. D'autre part, *Bacillus licheniformis* a montré sa capacité à former des biofilms robustes dans des conditions contrôlées en laboratoire.

Avant d'aborder cette étude, il a fallu trouver une méthode rapide, sensible et spécifique permettant de quantifier l'ADN extracellulaire. Dans le **paragraphe I**, une méthode de quantification *in situ* de l'ADN extracellulaire, basée une étude antérieure (Tang et al. 2013), est décrite et a été appliquée, aux trois souches modèles, afin d'en estimer leur teneur respective en ADNe mais également de tester l'applicabilité de la méthode. Ce quatrième dosage appliqué sur les biofilms des trois souches modèles a permis d'établir une empreinte en SEP majoritaires : protéines dont fibres amyloïdes, polysaccharides et ADNe.

Puis le **paragraphe II** du chapitre aborde l'étude de l'implication potentielle de l'ADN extracellulaire dans la structuration du biofilm de *Bacillus licheniformis*. Les outils de dosage *in situ* développés précédemment ont donc été utilisés et combinés à la microscopie confocale et à d'autres essais physico-chimiques afin de décrire et d'identifier les SEP qui contribuent au maintien du biofilm.

I. Etude préliminaire

I.1. Dosage in situ de l'ADN extracellulaire

I.1.1 Matériel et méthodes

Le dosage de l'ADNe a été réalisé à l'aide du marqueur™ PicoGreen® selon le protocole décrit par Tang et al. (Tang et al. 2013).

Pour cela, le PicoGreen® est dilué 200 fois dans du tampon Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) avant d'être utilisé. Une solution d'ADNλ (extrait du phage λ, cet ADN est sous-forme double brin et contient environ 48000pb), fournie avec le kit (Molecular Probes) est également préparée dans le même tampon pour obtenir une gamme étalon (0 à 1000 ng.ml⁻¹).

Les biofilms des trois souches ont été formés selon le mode opératoire décrit dans la **Partie B (page 155)** du manuscrit. Des biofilms de 24 et 48 heures ont été formés pour chacune des souches, une fois rincés avec du tampon Tris-EDTA (TE), 100µL de tampon TE sont ajoutés aux biofilms tandis que 100µL de chaque solution étalon d'ADNλ sont déposés dans des puits vierges de la même microplaque, puis à l'aide d'une pipette multicanaux (Eppendorf), 100µL de marqueur PicoGreen® sont rapidement déposés et le mélange est placé à l'obscurité pendant 2 à 4 minutes. Immédiatement après l'incubation, les plaques sont analysées à l'aide du lecteur à microplaque Optima FLUOStar (BMG Labtech). Les échantillons marqués sont excités par un faisceau à 485nm et la fluorescence est émise à une longueur d'onde de 520nm.

I.1.2 Résultats et discussion

Le kit PicoGreen® a donc permis de doser l'ADNe produit au sein des biofilms de 24 et 48h des trois souches modèles sans traitement préalable des échantillons. Avec ce protocole simple, rapide et sensible (Tang et al. 2013), le PicoGreen® diffuse très faiblement à travers les cellules et évite ainsi une surestimation de la quantité dosées.

Les souches de *P. aeruginosa* (PA) et de *B. licheniformis* (BL) ont la plus forte teneur en ADNe chez les biofilms de 24h avec respectivement $36,2 \pm 5,8$ ng et $31,3 \pm 0,2$ ng par biofilm. Lorsque les mêmes biofilms sont âgés de 48h, la quantité d'ADNe chute à $10,9 \pm 0,9$ ng et $10,7 \pm 1,2$ ng respectivement. A l'inverse, la souche de *W. confusa* (WC) démontre une teneur en ADNe 4 à 7

fois plus faible que ce soit pour les biofilms de 24h ($4,6 \pm 0,5$ ng) ou de 48h avec $7,4 \pm 0,8$ ng (FIGURE C-10).

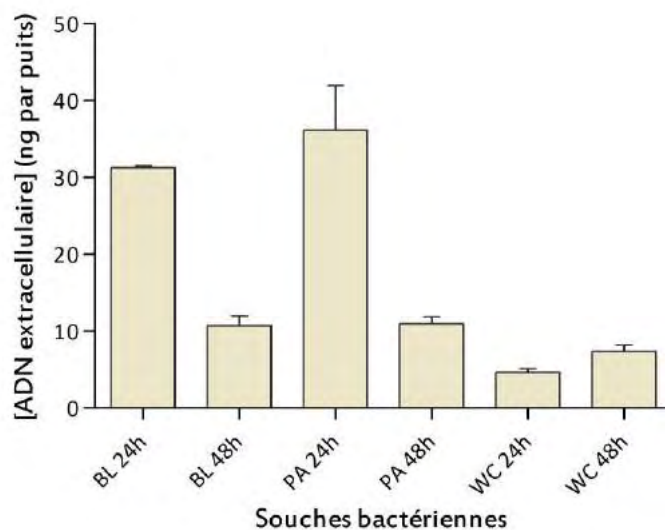


FIGURE C-10. Teneur en ADNe dosés *in situ* avec le PicoGreen® pour les biofilms de 24 et 48 h des trois souches modèles, *B. licheniformis* (BL), *P. aeruginosa* (PA) et *W. confusa* (WC). Les barres d'erreur correspondent aux écart-types des moyennes calculées sur 3 répétitions.

Les résultats obtenus avec *P. aeruginosa* et *B. licheniformis* sont en accord avec ceux de Tang et al. (2013a), qui ont étudié la production d'ADNe entre 4h et 18h de croissance chez 4 souches bactériennes environnementales, dont une *Pseudomonas sp.* Ces auteurs ont pu démontrer que la quantité d'ADN normalisée par rapport à la quantité de biomasse adhérente a tendance à diminuer avec un maximum de 110 ng par puit après 18h.

Il est probable qu'au-delà de 18h la production par une éventuelle sécrétion active d'ADNe soit ralentie et que la teneur résiduelle soit maintenue grâce à l'augmentation de la lyse cellulaire qui libère des fragments d'ADN ou encore qu'une partie des cellules. Vilain et al. (2009a) ont réussi à détecter la présence d'acides nucléiques sur des biofilms de 24 heures de *Bacillus cereus* après un contact de 30 minutes d'une fibre de verre avec une culture planctonique en pleine phase exponentielle. Les auteurs ont supposé que l'ADNe était produit tôt dès la phase exponentielle de croissance des cellules planctoniques et agissait comme une adhésine pour former un film conditionnant pour l'initiation de l'adhésion des biofilms. Dans une autre étude (Zafra et al. 2012) chez *Bacillus subtilis*, il a été rapporté que la production d'ADN extracellulaire était produite par un mécanisme de sécrétion indépendante de la lyse cellulaire. Ces deux résultats peuvent expliquer la baisse de la teneur en ADNe entre un biofilm de 24h et de 48h, observée dans cette étude.

I.2. Bilan et composition en SEP majoritaires des biofilms des 3 souches modèles

Le développement de méthodes de dosages in situ des exoprotéines totales, des fibres amyloïdes, des exopolysaccharides et de l'ADN extracellulaire a permis d'établir des profils des biofilms de 24 et 48 pour les 3 souches modèles de l'étude (FIGURE C-11)

Les dosages montrent que les biofilms de *P. aeruginosa* et *B. licheniformis* sont beaucoup plus riches en SEP que les biofilms de *W. confusa*. De plus, les répartitions obtenues montrent que les exoprotéines sont les SEP les plus abondantes dans les biofilms de *P. aeruginosa* et *B. licheniformis*. Pour les deux souches, la tendance est à la diminution de la quantité des SEP pour *Bacillus licheniformis* au cours de la croissance tandis que l'inverse est observé chez *Pseudomonas aeruginosa*. Toutefois, la teneur en ADN extracellulaire, initialement en forte abondance après 24h diminue significativement dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.

Ainsi, il a été choisi d'étudier plus précisément l'implication des exoprotéines et de l'ADN extracellulaire dans les mécanismes d'adhérence et de cohésion des biofilms, Cette étude portera que sur le biofilm de *Bacillus licheniformis* de 24 heures qui présente une grande quantité cumulée d'exoprotéines et d'ADN extracellulaire. De plus, la structure du biofilm de cette souche, impliquée dans les contaminations de surface dans les milieux industriels, n'a pas encore été élucidée dans la littérature. Ainsi, une meilleure compréhension de l'organisation de la matrice, appuyée par les outils de quantification des différents exopolymères, pourra contribuer à l'optimisation des stratégies de réduction de ces biofilms néfastes.

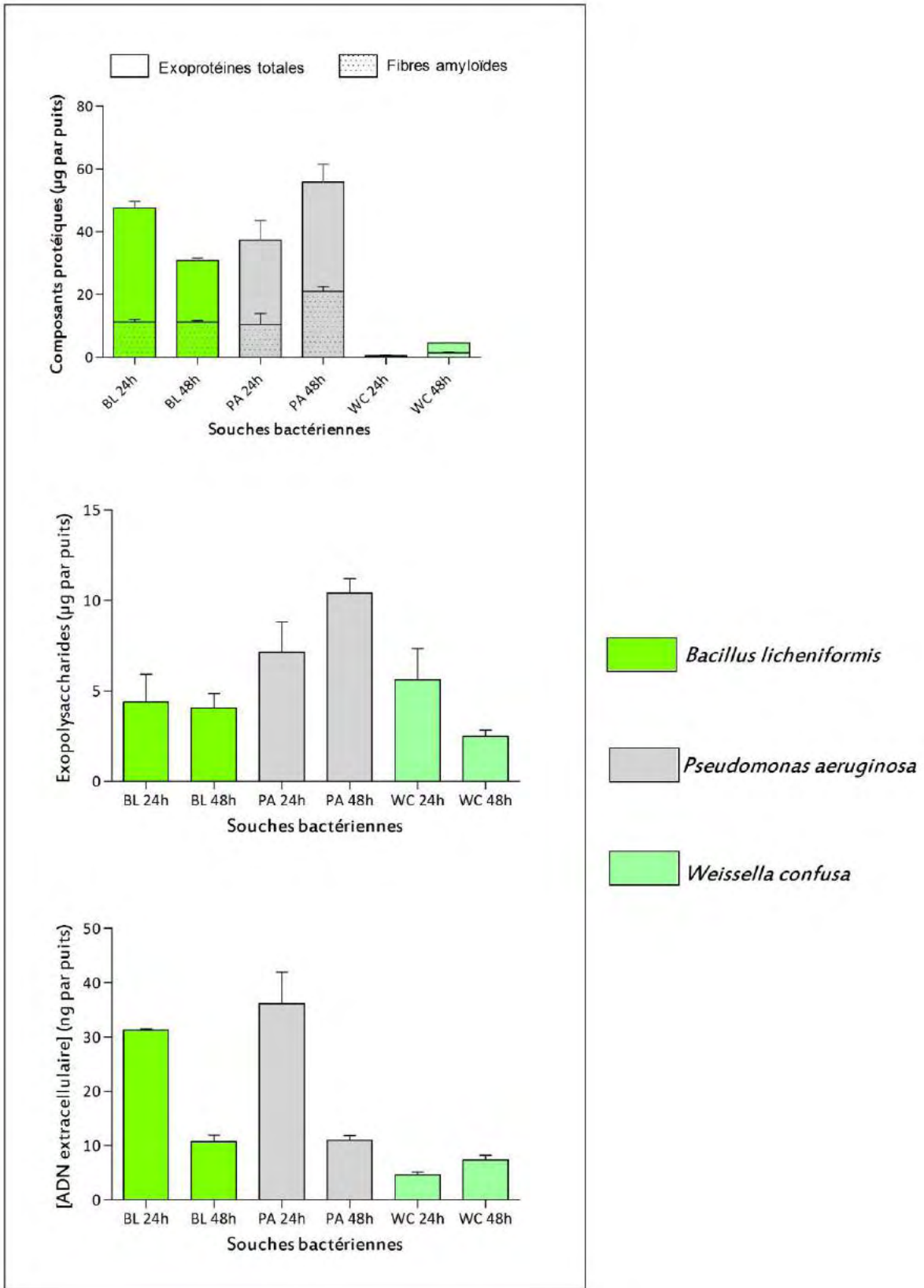


FIGURE C-11. Profil en SEP majoritaires des trois biofilms modèles établis à 24h et 48h. Les composés protéiques comprenant les exoprotéines totales et les fibres amyloides sont exprimés en $\mu\text{g}_{\text{eq-CN}}$, les exopolysaccharides en $\mu\text{g}_{\text{eq-Dextrane}}$, et l'ADN extracellulaires en $\text{ng}_{\text{eq-}\lambda\text{DNA}}$

II. Etude de l'implication des fibres amyloïdes et de l'ADN extracellulaire dans l'adhérence et la cohésion des biofilms de *Bacillus licheniformis*

II.1 Présentation de l'article 4

L'objectif de cette étude consiste à analyser et identifier les SEP impliqués dans les mécanismes d'adhérence (résistance au détachement) et de cohésion du biofilm de *Bacillus licheniformis*. Dans le cadre de l'étude, la notion d'adhérence peut être définie comme étant la résistance du biofilm au détachement, et la notion de cohésion comme la propriété du biofilm résultant de l'auto-agrégation des cellules.

Etant donnés les rôles majeurs des exoprotéines et de l'ADN extracellulaire dans le mécanisme de formation des biofilms (**page 54**), ainsi que l'efficacité des protéases et des nucléases pour réduire les biofilms en formation ou établis (**page 86**), une approche par attaques enzymatiques ciblées de ces deux familles de SEP a été retenue.

Ainsi, les biofilms de *Bacillus licheniformis* ont été traités avec une endonucléase couramment utilisée, la DNase I, et avec une protéase à sérine, la protéinase K. Dans une première approche, le biofilm résiduel, formé en microplaque, est analysé quantitativement en dosant les exoprotéines, les exopolysaccharides, l'ADN extracellulaire et les fibres amyloïdes résiduels suite au détachement partiel du biofilm. En parallèle, les fractions liquides issues des digestions enzymatiques et contenant les composés relargués ont été analysés par chromatographie par exclusion de taille. Cette technique a permis de décrire la distribution en taille des fragments relargués mais aussi d'estimer la composition en acide nucléique et en protéines en mesurant l'absorbance des molécules à 280 nm et à 260 nm et en calculant le ratio 260/280. En effet, ce ratio permet d'estimer la pureté en acide nucléique des solutions et de détecter également la présence de résidus qui absorbent à 280 nm, notamment les protéines. La perméabilité des biofilms a également été testée en mesurant la filtrabilité d'une solution de PBS à travers les biofilms traités à la DNase I ou à la protéinase K. Enfin les biofilms traités à la DNase I ont été observés en microscopie confocale afin de décrire la répartition spatiale des différents SEP et d'évaluer les conséquences du traitement sur l'architecture du biofilm.

La première observation des traitements des biofilms par les enzymes a été le détachement conjoint de l'ADN extracellulaire avec les fibres amyloïdes, quelle que soit l'enzyme utilisée. En effet, la DNase I a provoqué une réduction de 82% de l'ADN extracellulaire initial accompagné de 59% de détachement des fibres amyloïdes. La protéinase K a engendré la réduction de 72% des fibres amyloïdes et 21% de l'ADN extracellulaire. De plus, l'analyse des fragments par chromatographie par exclusion de taille indique le relargage de fragments de haut poids moléculaire constitués à la fois d'acides nucléiques et de résidus protéiques. Ces résultats ont suggéré l'existence d'un complexe stable formé par l'ADN extracellulaire et les fibres amyloïdes au sein du biofilm. Les exopolysaccharides n'ont quasiment pas été affectés par les traitements enzymatiques.

D'autre part, les observations microscopiques ont révélé une forte présence de l'ADN extracellulaire et des protéines à la base d'un biofilm compact et cohésif initialement, ainsi que la dispersion massive du biofilm à la suite d'un traitement à la DNase I. Le test de perméabilité du biofilm a également mis en évidence la perte de la cohésion du biofilm à l'issue d'un traitement à la DNase I.

Tous ces résultats réunis amènent à s'orienter vers l'hypothèse que l'ADN extracellulaire est fortement associé aux fibres amyloïdes, formant ainsi un complexe qui contribue à l'adhérence et à la cohésion des biofilms de *Bacillus licheniformis*.

Cette étude est détaillée dans l'article 4, intitulé « **Extracellular amyloids-DNA complexes contribute to adherence and cohesiveness of *Bacillus licheniformis* biofilms** ».

Extracellular Amyloid-DNA Complexes Contribute to Adherence and Cohesiveness of *Bacillus licheniformis* Biofilms

I. Randrianjatovo-Gbalou^a, P. Rouquette^a, D. Lefebvre^a, E. Girbal-Neuhauser^a, C-E Marcato-Romain^{a*}.

^aUniversité de Toulouse; UPS; LBAE; Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale, EA 4565; Institut Universitaire de Technologie, 24 rue d'Embaquès, F-32000 Auch, France.

*Corresponding author, claire-emmanuelle.romain@iut-tlse3.fr

ABSTRACT

Extracellular proteins and eDNA have been shown to play a crucial role in the formation and resistance properties of biofilms. In this study, hydrolytic enzymes including proteinase K (PK) and DNase I were used to determine which polymers are involved in the architecture of a biofilm formed by *Bacillus licheniformis*. In situ quantification of the extracellular polymeric substances (EPS) after DNase and PK actions revealed that whatever the tested enzymatic activity, both eDNA and amyloid proteins were significantly reduced in the digested biofilms. Size-Exclusion chromatography (SEC), by which 260/280nm ratios were determined in the enzymatic lysates, led to conclude that DNase I released some high molecular weight complexes of associated nucleic acids and proteins that were not detected from untreated biofilms. Put together, these data suggest that DNA and amyloid-like proteins were closely interlaced within the biofilm matrix. This hypothesis was corroborated by the change in the permeability of the DNase I-treated biofilms as the PBS flow through the biofilms was 5-fold increase when compared to untreated biofilms. Finally, CLSM gave supplementary clues about the 3D organization of the biofilms, confirming that eDNA and exoproteins were essentially layered under and around the bacterial cells whereas the amyloid fraction appeared more homogeneously distributed within the matrix. These results confirmed that some DNA-amyloids complexes play a key role in the modulation of the cohesiveness and adherence of *B.licheniformis* biofilm.

KEYWORDS: Biofilm, Matrix, extracellular DNA, Amyloid, Cohesiveness, Adherence.

INTRODUCTION

Bacillus species are often isolated from biofilms in various industrial environments. As example, these Gram-positive spore-forming bacteria have been frequently identified among the multispecies slimes formed in the paper machines surfaces and water in which they bring some negative consequences in terms of product quality and process productivity (Blanco et al. 1996; Kolari et al. 2001; Lahtinen et al. 2006). Food industries are not spared by *Bacillus sp* contaminations that generally lead to the outbreak of food-borne diseases (Flint et al. 1997). In the medical field, some *Bacillus subtilis* strains have been described for their ability to protect other bacterial species such as *Staphylococcus aureus* from biocidal actions (Bridier et al. 2012). For all these reasons, *Bacillus sp* biofilms are in the focus of many studies, and the understanding of their matrix formation is a topic of increasing interest to propose new control strategies. The major matrix components commonly described are exopolysaccharides (ePS), exoproteins (ePN) and extracellular DNA (eDNA) (Flemming 2011).

Besides, several studies have shown that ePNs are, at a first sight, the most abundant compounds within both natural or model biofilms (Molobela et al. 2010; Marcato-Romain et al. 2012). These proteins have been mostly studied for their cohesive and structural functions. Typically, biofilm ePNs include functional amyloids (Larsen et al. 2007; Dueholm et al. 2013a), adhesive fimbriae (De Jong et al. 2009; Dueholm et al. 2013b), non-fimbrial large surface proteins (Lasa and Penadés 2006; Valle et al. 2012; Fong and Yildiz 2015), and DNA- or carbohydrates-binding proteins (Diggle et al. 2006; Novotny et al. 2013; Nur et al. 2013; Devaraj et al. 2015). Regarding to *Bacillus* species biofilms, an increasing interest has been focused on the proteinaceous matrix content, among which amyloid fibrils (AF) have been shown to play determinant roles in their structural integrity (Branda et al. 2006; Romero et al. 2010; Cairns et al. 2014). Tas A protein is a widely

described amyloid protein expressed in the matrix of *Bacillus subtilis* and other related species. Tas A monomers are assembled in robust fibers that are anchored to the cell wall thanks to Tap A protein (Romero et al. 2011; Vlamakis et al. 2013a). These fibers participate to the intercellular aggregation and also to the global EPS framework since Tas A may cooperate with the major ePS of *Bacillus subtilis* biofilm (Ostrowski et al. 2011) and with the hydrophobic BslA protein expressed at the cell surface (Kobayashi and Iwano 2012; Hobley et al. 2013).

In parallel, eDNA has been defined as a major matrix component (Whitchurch et al. 2002), and several investigations have been performed towards its contribution in the initial cell-to-surface adhesion (Tang et al. 2013), and in intercellular aggregation (Gloag et al. 2013; Jakubovics et al. 2013) leading to biofilm formation.

As a consequence, the role of eDNA has been intensively studied in several bacterial species in order to control biofilm formation (Okshevsky et al. 2015) ; concerning *Bacillus cereus*, eDNA has been reported as a crucial factor for biofilm adherence (Vilain et al. 2009).

In the search of alternative and environmental friendly treatments, several strategies using enzymes, and particularly proteases, have been shown to be efficient in reducing biofilms (Leroy et al. 2008; Molobela et al. 2010; Marcato-Romain et al. 2012; Elchinger et al. 2014). Lequette et al (Lequette et al. 2010) have shown that serine proteases targeting key proteins involved in the biofilm cohesiveness of *Bacillus* biofilms would be sufficient to remove biofilms.

Enzymes, and particularly endonuclease-like DNases (Okshevsky et al. 2015), have also been used to understand the mechanisms of biofilm formation; in that aim, enzymes can be used single-handedly or in combination with hydrodynamic factors (Pechaud et al. 2012; Marcato-Romain et al. 2012) or biocides (Tetz et al. 2009). Among others, some studies have shown that eDNA facilitates the *Pseudomonas aeruginosa* cells spreading on surfaces but also provides intercellular adhesion and biocide resistance to *Haemophilus influenza* biofilms (Izano et al. 2009; Gloag et al. 2013; Cavaliere et al. 2014). Evaluation of the efficiency of these enzymatic treatments have been

mostly performed by determining the total biofilm reduction thanks to Crystal violet assays or viability tests (Live/Dead, fluorogenic substrates or MBEC assay) but rarely by quantifying the reduction of the matrix components.

The purpose of this study is thus to bring new elements on the EPS distribution in the biofilm matrix formed by a strain of *Bacillus licheniformis*. Beyond its importance in biopolymers or enzymes production (Shih et al. 2001; Nijland et al. 2010; Parrado et al. 2014), this bacterial species has been rarely studied for its ability to form robust biofilms (Pasvolsky et al. 2014; Randrianjatovo et al. 2015). In order to describe the EPS involved in the cohesiveness of the matrix, enzymatic treatments allowing specific target of eDNA or ePN are proposed.

The effects of DNase I and Proteinase K were first measured by characterizing the digested biofilms through an in situ quantification of the residual EPS, including ePN, AF, ePS and eDNA. This quantitative analysis was combined with SEC analysis of the detached material and microscopic observations by CLSM of the matrix architecture before and after enzymatic treatments. In addition, the permeability towards was investigated on the digested biofilms as a possible consequence of the physical alteration of the matrix properties. This association of different technical approaches is expected to bring additional knowledge on the spatial organization of *Bacillus licheniformis* biofilms, also giving possible strategies to reduce its dense and cohesive biofilms.

MATERIAL AND METHODS

Biofilms formation

The studied strain was isolated from paper mill water (Marcato-Romain et al. 2012) and was identified as *Bacillus licheniformis* using the kits API 50 CH and API 20 E (Biomérieux, France). The identity of the strain was confirmed by partial 16S rRNA sequence analysis.

Bacterial stock cultures were kept at -20 C in Trypticase Soy Broth (TSB, Fluka, France) containing 20 % (v/v) glycerol. Prior to each experiment, an overnight culture of *B. licheniformis* was prepared

from frozen glycerol stock by culturing in TSB at 37 °C for 18h. The optical density at 595nm was then adjusted to 0.1 by adding fresh TSB to prepare an inoculum.

For the quantification of the EPS into 96-well polystyrene microplates (Greiner Bio-one, flat-bottomed plates), wells were inoculated with 200µL of inoculum. Biofilm formation was performed for 24h in static conditions at 37°C. Then, planktonic cells were removed from the plate and the adhered cells were rinsed twice with phosphate buffer saline (PBS).

For the permeability test, biofilms were formed directly on the polyethersulfone (PES) membrane of a centrifugal filter device (MCWO~10000, Nanosep® Omega™, Pall Corporation) by adding exactly 500µL of the inoculum. Prior to biofilm formation, the tubes designed for the collection of the filtrate were all weighed. Cells were allowed to adhere during 24h at 37°C in static conditions and were rinsed twice with PBS.

For CLSM 3D-analysis, biofilms were grown on 12mm rounded-glass coverslips immersed in 12-well microplates (NUNC, Thermo Scientific) containing 500µl of inoculum. Cells were allowed to adhere on the coverslips during 24h at 37°C in static conditions. After incubation, planktonic cells were removed and the coverslips were rinsed twice with PBS.

Enzymatic treatments

Proteinase K (PK) from *Tritirachium album* (P2308, 48U mg⁻¹) was prepared at a final concentration of 100µg ml⁻¹ in sodium acetate buffer (10mM, pH 7± 0.2) supplemented with calcium chloride (5mM). DNase I from bovine pancreas (D5025, 2297 kU mg⁻¹) was also prepared in the same buffer to obtain a final concentration of 45.5µg ml⁻¹.

For exposition in 96-well microplates, six biofilm replicates were exposed to 200µL of each enzyme solution for 5h at 37°C with shaking at 160rpm. Controls with inactivated enzymes were performed on six other biofilm replicates. The DNase solution was heat inactivated (1h at 95°C) whereas the PK solution was chemically inhibited (1mM PMSF). After incubation, the lysate-containing fractions of each well were collected into 1.5ml-centrifuge tubes (Eppendorf®, Fisher Scientific) by delicately pipetting and were stored at 4°C until Size Exclusion chromatography (SEC) analysis. The adhered biofilms were thus rinsed twice with PBS before EPS quantification.

For the permeability test, the biofilms formed on the polyethersulfone (PES) membranes were digested with 500µL of DNase I and Proteinase K solutions for 5h at 37°C with a 160rpm shaking. Control biofilms were immersed in 500 µL of sodium acetate buffer 10mM, CaCl₂ 5mM and were incubated 5h at 37°C and 160rpm as well. Each modality was performed in triplicates and an additional negative control was obtained by adding 500µL of PBS on three filters without biofilm.

For the CLSM analysis, biofilms on coverslips were treated with 500µl of DNase I solution per well to cover the samples and the plates were incubated for 5h at 37°C with a shaking speed of 160rpm. After incubation, the coverslips were rinsed twice with PBS before fluorescent staining.

In situ EPS quantification assays

For all the assays performed thereafter, the microplate reader FluoSTAR (BMG Labtech) was used and both fluorescence and absorbance measurements were monitored with the OPTIMA software.

ePN assay. As previously described (Randrianjatovo et al. 2015), ePN were in situ assayed using the fluorescent dye Epicocconone, the reactive compound of the commercial kit Fluoroprofile® (Sigma Aldrich). κ-casein from bovine milk (C0406, Sigma Aldrich) was used as standard (0 to 1000µg ml⁻¹). Microplates containing the adhered biofilms were left to incubate for 30min in the presence of epicocconone 2-fold concentrated compared to the commercial Fluoroprofile solution. Fluorescence intensity of the dye was then recorded at 620nm after an excitation at 544nm.

ePS assay. The in situ quantification of total exopolysaccharides of the biofilms was performed by implementing the Periodic acid-Schiff reaction. The Periodic acid-Schiff (PAS) kit was purchased from Sigma-Aldrich (395B) to achieve this assay. For the experiment, 25µL of ultrapure water were added to each well, followed by 175µL of a 0.5% periodic acid solution prepared in 5% acetic acid, (pH4 ± 0.5) and the plate was incubated for 30 minutes at room temperature. 100µL of Schiff

reagent were then added to the sample and were left to react for 120 minutes. The absorbance of the colored product was then measured at 544nm. Dextran from *Leuconostoc spp.* (Fluka, 31389, M_r 40,000) prepared in pure water was used as standard (0 to 2000µg ml⁻¹).

eDNA quantification. Extracellular DNA was quantified within the biofilms using the PicoGreen® fluorescent staining (Quant-it™ PicoGreen® dsDNA assay kit, Invitrogen) as described by Tang et al (Tang et al. 2013). Briefly, the samples were incubated with PicoGreen® prepared in TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) for exactly 2min, with a final volume of 200µL in each well. After that, the fluorescence intensity of the emitted light at 520nm was measured after an excitation at 485nm. λDNA was used as standard (0 to 1000 ng ml⁻¹).

AF assay. Thioflavin T (ThT, T3516, Sigma-Aldrich) exhibits enhanced fluorescence upon binding to amyloid fibrils so that ThT is commonly used to detect amyloid fibrils (Biancalana and Koide 2010). However, to our knowledge, ThT has never been used directly on biofilm samples to quantify amyloid fibrils in situ. An adapted method was thus optimized in order to assay amyloid fibrils within biofilms. Calibration of the test was performed with κ-casein (K-CN) fibrils that were produced as previously described (Randrianjatovo-Gbalou et al. 2015). Briefly, κ-casein (C0406, Sigma Aldrich), a protein described for its propensity to form amyloid-like aggregates (Ecroyd et al. 2010), was dissolved at a final concentration of 2.5mg ml⁻¹ in potassium phosphate buffer 50mM (pH 7±0.5) containing 20mM dithiothreitol (DTT) and 2mM EDTA for further polymerization at 37°C for 20h. κ-casein fibrils were purified by SEC and diluted in phosphate buffer to obtain calibrates at concentrations ranging from 0 to 1000 µg ml⁻¹.

Biofilms formed in microplates were assayed for their amyloid fibrils content by adding 200 µL per well of potassium phosphate buffer (50mM, pH 7.5) containing 40µM ThT. ThT was allowed to label the samples for 2h, and the fluorescence intensity of the dye binding to amyloids was recorded after an excitation at 450 nm and emission at 485nm.

Analysis of enzyme-released EPS

Enzymatic lysates were filtered (0.2µm filter devices, Whatman® Vacuum Filtration Devices) before injection for SEC analysis using an AKTA purifier chromatograph system (GE Healthcare) equipped with a UV detector. Absorbance was monitored at 280nm and 260nm. The samples were eluted at 0.4 ml min⁻¹ with 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, from a Superdex Peptide 10/300GL column connected in series (Simon et al. 2009) with a Superdex-200HR 10/300GL column (GE Healthcare). According to the manufacturer, fractionation ranges of Superdex Peptide 10/300GL and Superdex200 10/300GL are respectively 0.1–7 kDa and 10–600 kDa; the two-column series allowed thus to separate particles ranged between 0.1 and 600 kDa. To calibrate the SEC system, protein standards (GE Healthcare) prepared in pure water were injected: thyrotropin, 0.36kDa ; Ribonuclease A, 13kDa; Carbonic anhydrase, 29 kDa; Conalbumin, 75kDa; Ferritin, 440kDa and Thyroglobuline, 669kDa. Pure solutions of native and heat inactivated DNase I were injected as controls in order to visualize the elution volume and the 260/280 nm ratio of the used enzymes.

Biofilm permeability test

After enzymes incubation of the biofilms developed on PES membranes, planktonic cells and detached EPS were removed and the residual biofilms were rinsed twice with PBS. Exactly 500µL of PBS were then added to each device and were centrifuged at 5000xg speed, 20°C for 6 min. Every minute, the centrifugation was stopped and the collector tubes weighed.

CLSM analysis

Two sequences of fluorescent dyes were used after biofilm rinsing with PBS. To perform sequence 1, coverslips were labelled with PicoGreen® (eDNA) for exactly 2 min, then stained with Epicocconone (ePN) for 30min and finally counterstained with DAPI (intracellular DNA) for 10min.

For the second sequence, coverslips were first labelled with ThT (AF) for 20 min, then stained with Epicocconone for 30min and finally counterstained with DAPI for 10min. Samples were rinsed with PBS between each labelling; at the end of each sequence, coverslips were mounted into Mowiol® 4-88 (81381, Sigma-Aldrich) and placed between slide, spacer (Secure-Seal™ Spacer, 13 mm diameter, 0.12 mm deep, Invitrogen, and ThermoFisher) and an additional square coverslip (22x22mm). Slides were then kept overnight at 4°C in the dark to let polymerizing the mounting solution.

Each slide was placed on the motorized stage of a Leica SP2 AOBS confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, France). The CLSM images were obtained by using a 63x/0.9NA water immersion lens and the Leica control software (LCS) was set to take images scans of 512 x 512 pixels (corresponding to 238 by 238 µm) with a speed of 400Hz. The scan of each channel was carried out between frame with first excitation of Epicocconone with a Helium-Neon laser at 561nm, followed by Picogreen® (Argon laser at 488nm) or ThT (Argon laser 458nm) and finally DAPI with a UV diode at 405nm.

The intensity of each channel was fixed according to the optimum value obtained for the untreated biofilms (controls) in order to quantify the loss of fluorescence after the DNase I treatment.

Data analysis

In situ EPS quantification. The values obtained for residual EPS amount were expressed as µg (ePN, AF and ePS) and ng per well (eDNA) and were used to calculate the reduction yield expressed in percentage of the control. Values were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism5 software (GraphPad Software. San Diego California USA. www.graphpad.com). The Dunnett's Multiple Comparison post-test was used to determine the level of significance against the control value (significance level $\alpha = 0.05$).

Biofilm permeability assay. Initial velocity of PBS filtration was calculated after the two first minutes of centrifugation and was expressed as μL of filtered PBS per minute. The means and standard deviations of three replicates were compared using a one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls Multiple comparison test (significance level $\alpha = 0.05$).

Size distribution of DNase I-released EPS. The SEC calibration curve was obtained from plotting the molecular weight (MW) and the retention volume (V_r , in ml) of each standard proteins peak ($\log\text{MW (Da)} = -0.1714 \cdot V_r + 8.9857$). The absorbance ratio 260:280nm of each peak of interest was calculated from the maximum absorbance value expressed in arbitrary unit (mAU).

RESULTS

EPS contribution to the adherence of a *B. licheniformis* biofilm

In order to explore the biochemical nature of the extracellular polymers involved in the adherence of the matrix and their interactions, two hydrolytic enzymes were incubated on 24h-old biofilms of *Bacillus licheniformis*. A serine protease showing a broad specificity towards bacterial proteins (PK) and an endonuclease able to hydrolyze bacterial DNA (DNase I) were chosen as specific hydrolytic enzymes. The effects of the enzymatic digestions were assessed through both in situ quantification of the residual EPS and SEC analysis of the released EPS.

Quantification of the EPS remaining after enzymatic treatments

After each enzymatic treatment, residual ePN, eDNA and ePS contents were assayed in the persistent biofilms and were compared to the untreated biofilms (Figure 1). DNase I demonstrated up to 82% of eDNA removal in the digested biofilm which was accompanied by an important reduction of the ePN content (25%). Interestingly, quantification of the AF revealed that 59% of the amyloid proteins were detached during the DNase I treatment while no significant removal of the biofilm ePS was noticed. PK was able to remove 44% of the initial ePNs, mainly due to the reduction of the AF content which reached 72%. In spite of its proteolytic specificity, PK also showed a noticeable eDNA reduction since 21% of the eDNA content was removed from

the matrix. As mentioned for the DNase I treatment, no significant removal of the biofilm ePS was noticed. These observations indicate that whatever the hydrolytic action, some eDNA, ePN and AF were always detached all together, suggesting that these polymers are closely interlaced within the matrix.

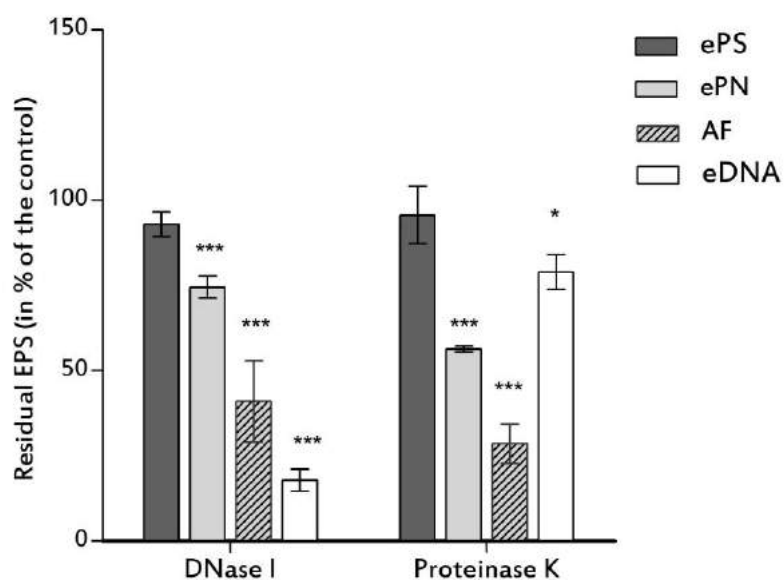


Figure 1. Biofilm detachment assay. The residual EPS were in situ quantified after treatment with DNase I and proteinase K. Reduction yields, were calculated and expressed in percentage of the total content of each EPS from the control biofilms (containing inactivated enzymes). Error bars represent the standard deviation of at least 6 independent replicates. * and *** indicate a significant reduction with $p=0.05$. Reduction yield of the ePS components were not significant when compared with the control the control ($p>0.05$).

Analysis of the released EPS after enzymatic treatments

To support the in situ evaluation of the residual EPS, the lysates originating from the enzymatic treatments of the biofilm were analyzed by SEC. This complementary experiment was expected to give an additional information about the size distribution and the biochemical composition of the released EPS. Indeed, SEC allows fractionation according to the apparent size of the molecules, which is correlated with their elution volume. In addition, dual absorbance monitoring at 260 and 280nm gives information about the protein and /or nucleic acid content of the eluted fractions. According to the Glasel's correlation (Glasel 1995), a 260 :280 ratio equal to 0.57 indicates a

fraction containing pure protein while pure DNA fractions give a 260:280 ratio higher than 1.8. Ratios beyond 1.06 indicate that at least 5% of nucleic acid are present in the analyzed sample.

The lysates obtained in the supernatants after treatment of the biofilms with the DNase I in native or heat-inactivated form were injected in the SEC column (Figure 2). Some compounds were present in the control that might correspond to the inactivated enzyme and to some EPS that were mechanically detached by gentle stirring during the 5h incubation (figure 2A): they were recovered as three unresolved peaks eluted at maximum volumes of 36 ml, 37.6 ml and 40 ml and their 260:280 ratios were respectively equal to 3.4, 1.3 and 1.6. According to the SEC calibration performed with known sized proteins, these detached EPS mainly correspond to fragments with low molecular weight under 1 kDa. Their 260:280 ratio indicate that there are mainly composed by nucleic acids, in particular for the first fraction eluted at 36 ml. Total peak areas at 260nm and 280nm were respectively equal to 89.3mAU*ml and 63.5mAU*ml .

The chromatogram corresponding to the active DNase I lysate was somewhat different (figure 2B): additional molecules were eluted in the region corresponding to elution volumes between 15 to 30 ml and also in the region after 40 ml. In the region of intermediate elution volumes from 30 to 40 ml, a more substantial release of biofilm material was observed. In particular, for the molecules eluted at 36ml and 38.3ml, the 260:280 ratios increased up to 1.9 indicating that additional nucleic acid fragments were released. The global increase in detached material was assessed by the higher values of the total peak areas at 260nm and 280nm reaching 102.7mAU*ml and 82.8 mAU*ml respectively. Interestingly, the high molecular weight EPS eluted between 15 to 23 ml (from 10 kDa to up 700 kDa) showed three peaks with 260:280 ratios of 1.4, 1.7 and 2.2. These fractions were not present in the control and due to their 260:280 ratios, they may be composed of associated nucleic acids and proteins.

Put together, these data are in accordance with the reduction yields determined from EPS quantification within the biofilms after DNase I treatments: the fact that both eDNA and ePN were

jointly detached as high molecular weight colloids suggests that these two polymers participate to the matrix adherence through intermolecular linkages.

Concerning the PK-digested EPS, it was impossible to conclude since the enzyme itself displayed a much higher signal than the total EPS to be detected leading to a misestimating of the results.

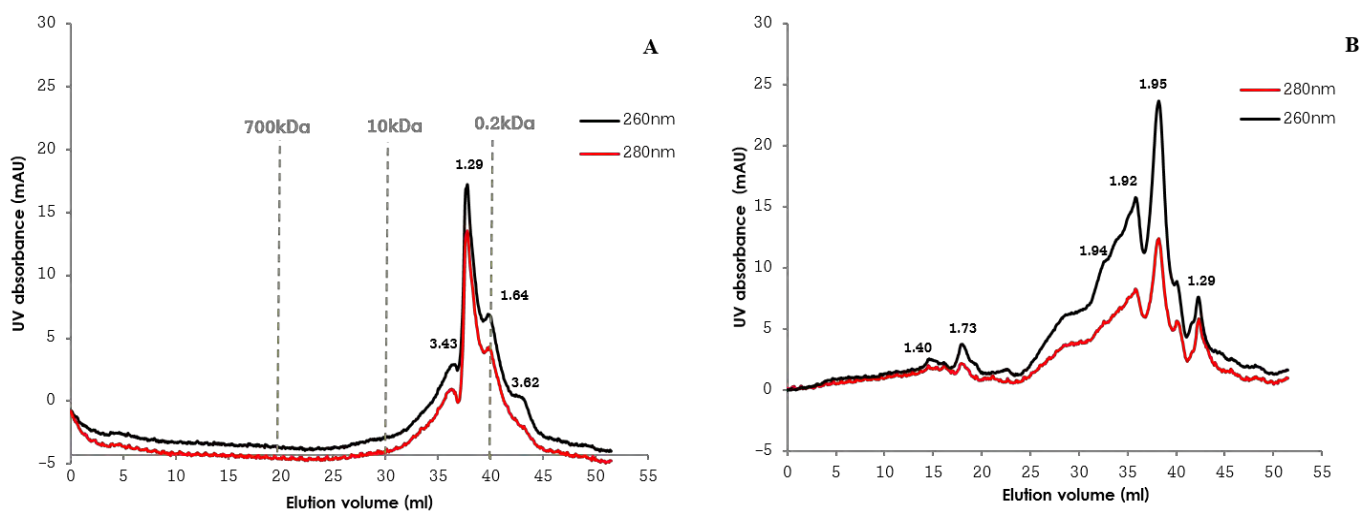


Figure 2. SEC profiles of the released EPS fragments after DNase I treatment of the biofilms. The absorbance at 280nm (black line) and 260nm (red line) were measured for the lysate supernatant exposed to the heat-inactivated enzyme (A) in comparison to the DNase I-treated lysates (B). The 260:280nm ratios were calculated for each maximum peak value in order to evaluate some nucleic acids-proteins association.

Biofilm permeability assay

The permeability of intact and enzyme-treated biofilms developed on porous filtration devices were compared to estimate a possible modification of the biofilm architecture in terms of aggregation or, on the contrary, of dispersion (Figure 3). The maximum initial velocity of PBS filtration was obtained in the absence of biofilm on the membrane ($153.0 \pm 6.5 \mu\text{l min}^{-1}$). Then, the filtration velocity decreased progressively until 6 minutes where the whole PBS of the control tube had been filtered for a final collected volume of 446 mL.

The growth of a biofilm on the membrane significantly modified the kinetic of PBS filtration: the initial velocity, that was maintained constant over the experiment, was 2.3 times lower with a value of $66.4 \pm 11.5 \mu\text{l min}^{-1}$. Moreover, the fluid volume filtered over 6 minutes was significantly reduced to $299\mu\text{L}$, representing 67% of the control volume obtained with the empty filtration device.

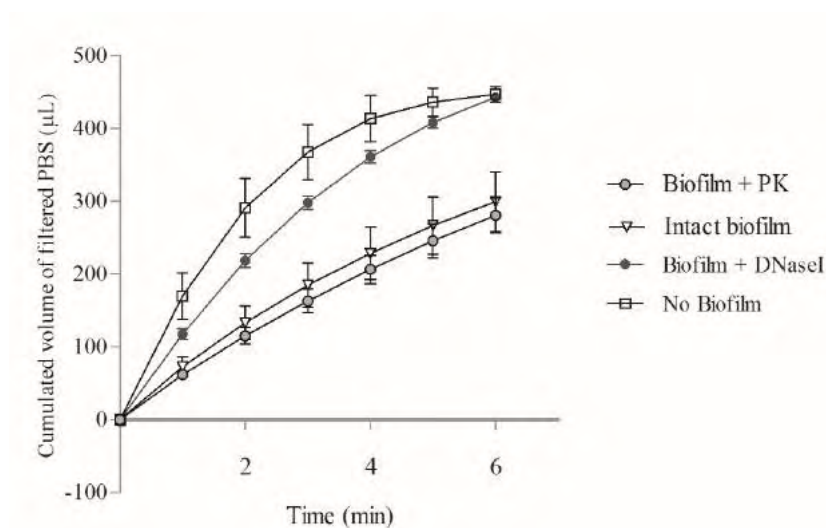


Figure 3. Evaluation of the biofilms permeability after enzymes reduction. Error bars represent the standard deviation of three independent replicates.

Considering the digested biofilms, DNase I was the most effective enzyme to enhance biofilm permeability with an initial velocity of $109.0 \pm 5.4\mu\text{l min}^{-1}$. DNase treatment of the biofilm allowed thus to recover a behavior similar to the control without biofilm and the maximum volume filtered after 6 minutes reached $443\mu\text{L}$, i.e. 99% of the control. On the contrary, PK revealed a filtration kinetic similar to the untreated biofilm with an initial velocity value of $57.7 \pm 8.28 \mu\text{l min}^{-1}$. The statistical analysis of the results indicated that the filtration velocity on the PK-treated biofilms was non-significantly different from the control ($p > 0.05$) whereas DNase I significantly modified the permeability of the biofilm. These results underlined some physical differences among the residual biofilms obtained after the DNase I and PK actions. Residual EPS must then present specific biochemical characteristics (charge, hydrophobicity, length...) as well as different

organization in the biofilm architecture that cannot be elucidated neither with a quantitative approach nor with a mechanical approach.

Three-dimensional description

B. licheniformis biofilms were examined in order to assess the modifications induced by the DNase treatment on the spatial distribution of ePN, eDNA and amyloid fibrils. A series of xyz images with a z-step were performed to acquire an in depth 3D-structure of *B.licheniformis* biofilms (figure 5 and figure 6). Multi-labelling of the biofilm EPS with alternatively PicoGreen® and epicocconone (Figure 5-A1 and A2) or epicocconone and DAPI (Figure 5-B1 and B2) allowed to display the presence of eDNA and ePN surrounding the rod-shaped cells of intact *B.licheniformis* biofilm. Plots of the mean fluorescence intensities of each channel in function of z depth (Figure 5-C1) indicate that eDNA and ePN were present throughout the entire biofilm structure but in a higher density near the substratum (maximum at $z = 4 \mu\text{m}$). The cells were spread and surrounded by this extracellular matrix since their maximum density was found around the z position of $6 \mu\text{m}$ (Figure 4-C1). As the intensity of each channel was set on the intact biofilm samples, it was possible to estimate the gain or the loss of fluorescence emission after the DNase I treatment. Biofilms displayed a less dense feature, and fluorescence intensities from the eDNA and ePN labellings (FIGURE 4-A2 and B2) were significantly lower in comparison to the untreated biofilm. A significant fraction of the bacterial cells were also detached by the enzymatic treatment as the DAPI signal decreased, although in a lesser extent in comparison to the EPS signals. Z profiles confirmed drastic loss of ePN and eDNA intensity that occurred all along the biofilm thickness until $z=1.5 \mu\text{m}$, suggesting that DNase I was able to diffuse in depth within the biofilm (Figure 4-C2).

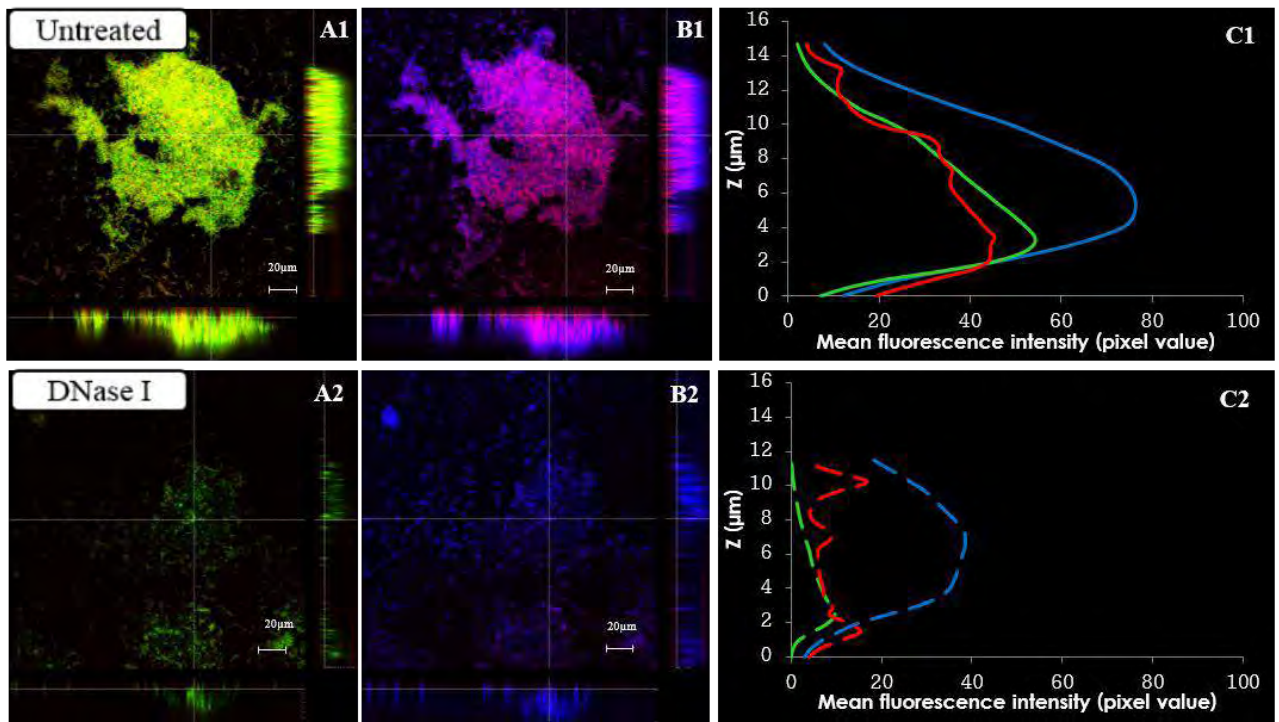


Figure 4. 3D-analysis of the eDNA and ePN distribution within untreated (A1-C1) and DNase I-treated (A2-C2) biofilms. Bacterial cells were labelled with DAPI (blue channel), eDNA was stained with PicoGreen® (Green channel) and exoproteins were stained with Epicocconone (red channel). Vertical projections according to yz and xz axis are respectively presented on the right and on the bottom sides of the 2D-image. The cross sections were taken along transects indicated by the horizontal and vertical grey lines in the 2D-images (xy). For each sample, A1 and A2 images show the overlay of PicoGreen® and Epicocconone stainings. DAPI and Epicocconone merged channels are displayed in images B1 and B2. The Z-profile of each dye relative fluorescence intensity is displayed in C1 and C2 images for untreated and DNase I-treated samples respectively.

In order to appreciate the relative contribution of AF compared to ePN in the matrix structure, similar labellings were performed on another set of biofilm samples using alternatively ThT and epicocconone (Figure 6-A1 and A2) or ThT and DAPI (Figure 6-B1 and B2). AF displayed a high fluorescence within the native biofilm, and z profiles indicate that AF, which are a part of total proteins, are located slightly above in the same region as the ePN, with a maximum intensity at $z = 5 \mu\text{m}$. Noticeably, beyond $z=3\mu\text{m}$, no ThT signal was detected whereas the proteins fluorescence was important.

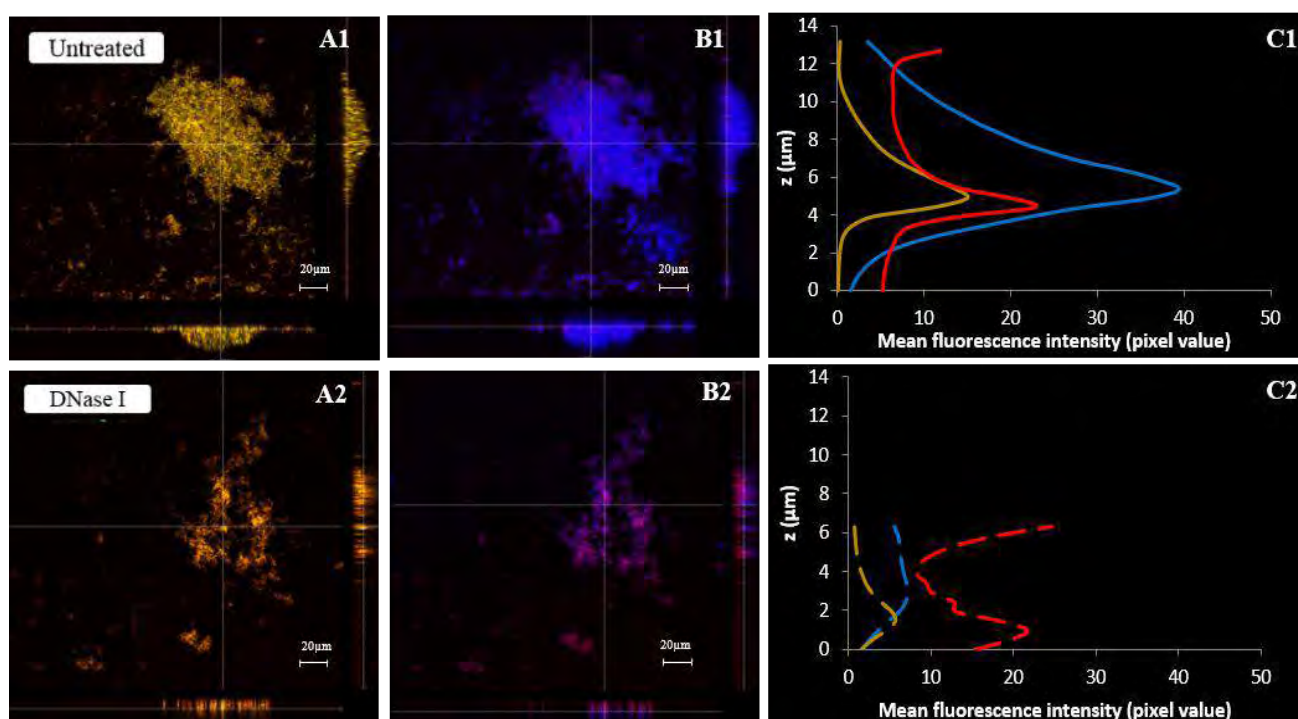


Figure 5. 3D-analysis of the total ePN and AF distributions within untreated (A1-C1) and DNase I-treated (A2-C2) biofilms. Bacterial cells were labelled with DAPI (blue channel), amyloid fibrils were stained with ThT (yellow channel) and exoproteins were stained with Epicocconone (red channel). Vertical projections according to yz and xz axis are respectively presented on the right and on the bottom sides of the 2D-image. The cross sections were taken along transects indicated by the horizontal and vertical grey lines in the 2D-images (xy). For each sample, A1 and A2 images show overlay of ThT and Epicocconone stainings. DAPI and Epicocconone merged channels are displayed in images B1 and B2. The Z-profile of each dye relative fluorescence intensity is displayed in C1 and C2 images for untreated and DNase I-treated samples respectively.

The DNase I treatment induced important removal of both ePN and AF (Figure 6-A2) and could also detached a great part of the cells (Figure 6-B2). The measurement of the mean fluorescence intensities obtained all along the biofilm indicated that AF decreased of 64% against 48% for ePN, some ePN being still present on the biofilm bottom (Figure 6-C2).

These images revealed that eDNA and ePN are present in the deep part of the biofilm with a fraction of amyloid proteins located in the middle part of the biofilm thickness. CLSM observations confirmed the importance of eDNA displaying a relevant function of stabilizer since its removal caused the elimination of a major content of cells and of associated amyloid proteins.

DISCUSSION

eDNA and AF complexes are involved in the biofilm adherence

The objective of the present study was to determine which exopolymeric substances are involved in the adherence and the aggregation of the matrix of *Bacillus licheniformis*, and how they are organized to fulfill these functions. All along the study, DNase I and PK digestions were used for specific EPS hydrolysis and the effects of these depletions on the matrix properties were analyzed using different approaches. Quantitative analysis, supported by SEC of the released EPS, revealed that whatever the tested enzyme, eDNA and ePN were removed simultaneously. In particular, the fraction eluted in the exclusion volume during SEC, i.e with molecular size above 600 kDa, may be composed of strongly associated eDNA and ePN that were removed by the enzymatic hydrolysis but that were not dissociated during their elution through the SEC column. These results revealed that eDNA is a key component of the *Bacillus licheniformis* matrix which is, in a major part, closely bound to ePN. Moreover, eDNA detachment after either DNase I or PK digestion was always accompanied by an important AF removal since less than 50% of the initial amyloid proteins

remained present in the matrix after enzymatic treatments. This is in favor of a preferential binding of eDNA with amyloid-like ePN.

Such aggregative mechanism involving eDNA and ePN interactions was previously described in other biofilm models. Goodman et al. (2011) reported the occurrence of DNA-binding proteins (also defined as the Integration Host factor) in biofilms of Non-Typable *Haemophilus influenzae*. In the same laboratory, Novotny and coworkers (Novotny et al. 2013) showed recently that the treatment of *Burkholderia cenocepacia* biofilms with an antiserum directed against one nucleoid associated protein (referred to DNABII), resulted in a significant disruption of the biofilm. Working on Gram positive strains, Huseby et al. (Huseby et al. 2010) showed that a secreted virulence factor (called β -toxin) can form covalent cross-linking with eDNA, leading to the formation of insoluble nucleoprotein complexes. Their results suggested that this cross-linking assisted in forming the skeletal framework upon which staphylococcal biofilms were established.

Concerning *Bacillus* species, secretion of eDNA was reported for planktonic cells, and in particular during the exponential growing phase, for further initiation of cellular adhesion on surfaces via eDNA. Within *B. cereus* biofilms, eDNA was described to be homogeneously distributed (3,7) and thus involved in the matrix formation; so it is possible that the same mechanism might take place for the formation of *B. licheniformis* biofilms. To our knowledge, the production of eDNA in *Bacillus licheniformis* biofilm has not been yet reported. On the other hand, the homologous gene *tasA* coding for the widely studied TasA amyloid protein, reported as a key protein for *B. subtilis* biofilm architecture (Romero et al. 2010), was recently identified in a single copy in the *B. licheniformis* genome (Pasvolsky et al. 2014). Moreover, an exopolysaccharide component was also described to be involved in the biofilm formation of *B. subtilis*. Its production is regulated by the *epsA-O* operon, and one proposed mechanism to explain the structural function of TasA is its linkage with this major eps polysaccharide. In the present work, the fact that no ePS removal

could be observed neither after PK nor DNase I action is not in favor of the occurrence of ePS binding with other main EPS components.

CLSM imaging of *B. licheniformis* obtained here confirmed the presence of both eDNA and AF within the matrix, most of them being localized in the core of the biofilm. However, the biofilm displayed a rather homogeneous and compact pattern and fibrillary structures could not be visualized. Bridier *et al.* (Bridier *et al.* 2013) observed some heterogeneous architecture in *Bacillus subtilis* 24h-biofilms when imaged by a combination of CLSM, FESEM and ESEM techniques. The biofilms seemed to describe some 'bundle' structures, where cells were interlaced and rose up from the bottom of the biofilm to the aerial area. Some fibrillary structures forming some filaments between cells were also detected by Thioflavin T. By analogy with the present study, this fact suggests that a great part of the *B. subtilis* ePN would be amyloid-like proteins.

Although not yet evidenced in *Bacillus sp.*, some aggregative mechanism based on eDNA and AF binding has been reported in many bacteria species. As an example, Jurcisek *et al.* (Jurcisek and Bakaletz 2007) observed the co-existence of huge amounts of eDNA and type IV pili in biofilms developed in vivo by the pathogenic bacteria *Haemophilus influenzae*. Microscopic observations revealed a complex network composed by pellets of type IV pili anchored on large eDNA fibers. Otherwise and very recently, couple of studies suggested that extracellular DNA tended to form composite by incorporating to proteins or amyloidogenic peptides, and accelerated the polymerization of bacterial amyloids (Devaraj *et al.* 2015; Gallo *et al.* 2015). These discoveries seem to be in accordance with the present results, and lead to conclude that eDNA and amyloids could form an united 'ultrastructure' to bring matrix stability.

eDNA (and associated AF) is essential for *B licheniformis* biofilm cohesiveness

The involvement of eDNA and associated AF in the cohesiveness of the matrix was assessed by measuring the permeability of both intact and altered biofilms. After DNase treatment, the biofilm permeability was greatly enhanced whereas no permeability modification was obtained for the PK

treated biofilms. According to the residual EPS quantification, both eDNA and AF were mainly detached by both enzymes, but much more DNA was removed by the DNase action, that might be crucial for the matrix architecture. As a consequence, eDNA removal seems to directly influence the biofilm permeability. These results are in agreement with those presented by (Izano et al. 2009) which used a similar test on *Haemophilus influenzae* biofilms. Such data indicate that eDNA is the main volumetric component of the matrix and is involved in aggregative mechanisms that influence the biofilm cohesiveness. On the contrary, in the case of the PK digestion, the proteinaceous components were removed in a similar extent than with DNase, but the permeability was not significantly affected. Two hypotheses can be then formulated. On one hand, the ePN and AF removed in similar extents from the biofilms treated with DNase and PK were not the same molecules and differed in terms of biochemical properties (charge, hydrophobicity...) and of functions within the biofilm. On the other hand, by considering that the removed proteinaceous components by both the enzymes were the same, the linkages between eDNA and ePN or AF might explain a simultaneous reduction in the case of DNase, or a more specific ePN reduction in the case of DNase. This last hypothesis is in agreement with the structural organization of the biofilm matrix proposed by Brockson et al. (Brockson et al. 2014). These authors proposed a model consisting in a three-dimensional eDNA-grid that locks the bacterial cells and that is stabilized by DNABII proteins. An attack on the proteins would collapse the whole structure whereas an action on the eDNA would dissolve the matrix. Our permeability results are in accordance with this model as the DNase I-treated biofilms became more permeable to liquid contrary to the PK-treated biofilms. In the case of PK, the collapse-resulting components of the matrix might have condensed and increase the membrane clogging.

Otherwise, in a very recent study (Jennings et al. 2015), the cationic property of the secreted exopolysaccharide Pel was elucidated and was described to cross-link the eDNA thanks to its positive charge and the binding occurred by an ionic mechanism. This was supported by the

finding that negatively-charged eDNA were present in developing biofilm aggregates (Allesen-Holm et al. 2006) of *Pseudomonas aeruginosa*. If this scenario occurs in *Bacillus licheniformis* biofilms, we cannot rule out, as the exopolysaccharides content was not affected, that these matrix components could play a complementary role in the biofilm architecture as previously described (Izano et al. 2008) in *Staphylococcus sp.* biofilms concerning the Poly-N-Acetylglucosamine (PNAG) surface polysaccharides.

As a conclusion and in order to stretch the limits of biofilms control, it is essential to consider the biofilms in their whole structure (cells plus matrix) and to target the interactions between each matrix component. In this purpose, the present study has brought a new insight of the complex interconnection of the main EPS components that regulate the dynamics of the matrix in *Bacillus licheniformis*.

ACKNOWLEDGEMENT

This research is supported by a grant from the Midi-Pyrénées Regional Council and funding from Toulouse University, France. The authors are grateful to P. Rouquette for her technical work in performing a part of the experiments and to the staff of the Cellular Imaging Facility of 'Fédération de Recherche FR3450 Castanet-Tolosan' (FRAIB, TRI Platform) particularly C. Pouzet, A. Jauneau, and A. Le Ru for their technical support for microscopy analyses.

REFERENCES

Kolari M, Nuutinen J, Salkinoja-Salonen MS. 2001. Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **27**:343–351.

- Lahtinen T, Kosonen M, Tirola M, Vuento M, Oker-Blom C.** 2006. Diversity of bacteria contaminating paper machines. *J Ind Microbiol Biotechnol* **33**:734–740.
- Blanco MA, Negro C, Gaspar I, Tijero J.** 1996. Slime problems in the paper and board industry. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**:203–208.
- Flint SH, Bremer PJ, Brooks JD.** 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling* **11**:81–97.
- Bridier A, Sanchez-Vizueté M del P, Le Coq D, Aymerich S, Meylheuc T, Maillard J-Y, Thomas V, Dubois-Brissonnet F, Briandet R.** 2012. Biofilms of a *Bacillus subtilis* Hospital Isolate Protect *Staphylococcus aureus* from Biocide Action. *PLoS One* **7**:e44506.
- Flemming H-C.** 2011. The perfect slime. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **86**:251–259.
- Molobela IP, Cloete TE, Beukes M.** 2010. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African J Microbiol Res* **4**:1515–1524.
- Marcato-Romain CE, Pechaud Y, Paul E, Girbal-Neuhauser E, Dossat-Létisse V.** 2012. Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. *Biofouling* **28**:305–314.
- Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH.** 2007. Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol* **9**:3077–3090.
- Dueholm MS, Otzen D, Nielsen PH.** 2013. Evolutionary insight into the functional amyloids of the pseudomonads. *PLoS One* **8**:e76630.
- Dueholm MS, Søndergaard MT, Nilsson M, Christiansen G, Stensballe A, Overgaard MT, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Otzen DE, Nielsen PH.** 2013. Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. *Microbiologyopen* **2**:365–382.
- De Jong W, Wösten HAB, Dijkhuizen L, Claessen D.** 2009. Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloida fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* **73**:1128–1140.
- Fong JNC, Yildiz FH.** 2015. Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr* **3**.
- Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, Penadés JR, Lasa I.** 2012. Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog* **8**:e1002843.
- Lasa I, Penadés JR.** 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* **157**:99–107.

- Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Cámara M, Williams P, Winzer K.** 2006. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* **8**:1095–1104.
- Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD.** 2015. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol* **96**:1119–35.
- Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO.** 2013. Structural Stability of *Burkholderia cenocepacia* Biofilms Is Reliant on eDNA Structure and Presence of a Bacterial Nucleic Acid Binding Protein. *PLoS One* **8**:e67629.
- Nur A, Hirota K, Yumoto H, Hirao K, Liu D, Takahashi K, Murakami K, Matsuo T, Shu R, Miyake Y.** 2013. Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm. *J Appl Microbiol* **115**:260–70.
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R.** 2010. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci* **107**:2230–2234.
- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R.** 2006. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* **59**:1229–1238.
- Cairns LS, Hobbey L, Stanley-Wall NR.** 2014. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol* **93**:587–98.
- Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R.** 2011. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol Microbiol* **80**:1155–1168.
- Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R.** 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* **11**:157–168.
- Ostrowski A, Mehert A, Prescott A, Kiley TB, Stanley-Wall NR.** 2011. YuaB functions synergistically with the exopolysaccharide and TasA amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**:4821–4831.
- Hobbey L, Ostrowski A, Rao F V, Bromley KM, Porter M, Prescott AR, MacPhee CE, van Aalten DMF, Stanley-Wall NR.** 2013. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:13600–5.
- Kobayashi K, Iwano M.** 2012. BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol Microbiol* **85**:51–66.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS.** 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**:1487.
- Tang L, Schramm A, Neu TR, Revsbech NP, Meyer RL.** 2013. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol Ecol* **86**:n/a–n/a.

- Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, Mililli L, Hunt C, Lu J, Osvath SR, Monahan LG, Cavaliere R, Charles IG, Wand MP, Gee ML, Prabhakar R, Whitchurch CB.** 2013. Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci* **110**:11541–11546.
- Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG.** 2013. Life after death: The critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol* **57**:467–475.
- Okshesky M, Regina VR, Meyer RL.** 2015. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol* **33**:73–80.
- Vilain S, Pretorius JM, Theron J, Brözel VS.** 2009. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microbiol* **75**:2861–8.
- Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D.** 2008. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling* **24**:11–22.
- Elchinger P-HH, Delattre C, Faure S, Roy O, Badel S, Bernardi T, Taillefumier C, Michaud P.** 2014. Effect of proteases against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Microbiol*.
- Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C.** 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* **26**:421–431.
- Pechaud Y, Marcato-Romain CE, Girbal-Neuhauser E, Queinnec I, Bessiere Y, Paul E.** 2012. Combining hydrodynamic and enzymatic treatments to improve multi-species thick biofilm removal. *Chem Eng Sci* **80**:109–118.
- Tetz G V., Artemenko NK, Tetz V V.** 2009. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1204–1209.
- Izano EA, Shah SM, Kaplan JB.** 2009. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Microb Pathog* **46**:207–13.
- Cavaliere R, Ball JL, Turnbull L, Whitchurch CB.** 2014. The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiologyopen* **3**:557–567.
- Nijland R, Hall MJ, Burgess JG.** 2010. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PLoS One* **5**:e15668.
- Shih IL, Van YT, Yeh LC, Lin HG, Chang YN.** 2001. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour Technol* **78**:267–272.
- Parrado J, Rodriguez-Morgado B, Tejada M, Hernandez T, Garcia C.** 2014. Proteomic analysis of enzyme

- production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme Microb Technol* **57**:1–7.
- Pasvolsky R, Zakin V, Ostrova I, Shemesh M.** 2014. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. *Int J Food Microbiol* **181**:19–27.
- Randrianjatovo I, Girbal-Neuhauser E, Marcato-Romain C-E.** 2015. Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**:4835–44.
- Biancalana M, Koide S.** 2010. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* **1804**:1405–1412.
- Randrianjatovo-Gbalou I, Marcato-Romain C-E, Girbal-Neuhauser E.** 2015. Quantification of amyloid fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection. *Anal Biochem* **488**:19–21.
- Ecroyd H, Thorn DC, Liu Y, Carver JA.** 2010. The dissociated form of kappa-casein is the precursor to its amyloid fibril formation. *Biochem J* **429**:251–260.
- Simon S, Pairo B, Villain M, D'Abzac P, Van Hullebusch E, Lens P, Guibaud G.** 2009. Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresour Technol* **100**:6258–68.
- Glaser JA.** 1995. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* **18**:62–63.
- Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO.** 2011. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol* **4**:625–37.
- Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, Bayles KW, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA.** 2010. Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:14407–12.
- Bridier A, Meylheuc T, Briandet R.** 2013. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron* **48**:65–69.
- Jurcisek JA, Bakaletz LO.** 2007. Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *J Bacteriol* **189**:3868–75.
- Gallo PM, Rapsinski GJ, Wilson RP, Oppong GO, Sriram U, Goulian M, Buttaro B, Caricchio R, Gallucci S, Tükel Ç.** 2015. Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity. *Immunity* **42**:1171–84.

- Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO.** 2014. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. *Mol Microbiol* **93**:1246–58.
- Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ, Howell PL, Parsek MR.** 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:11353–11358.
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**:1114–1128.
- Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB.** 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**:470–6.

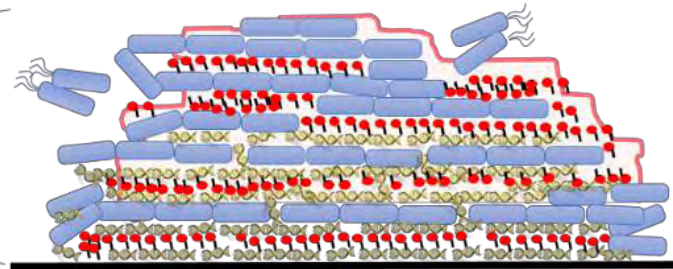
II.2 Résultats complémentaires: Proposition d'un modèle d'architecture du biofilm de *B.licheniformis*

Une explication schématique (FIGURE C-12) des résultats observés après traitements enzymatiques à la DNase I et à la protéinase K peut être proposée pour décrire l'architecture d'un biofilm de 24 heures de *B. licheniformis* en tenant compte du fait que :

- L'ADN extracellulaire et les exoprotéines sont principalement situés à la base du biofilm
- L'ADN est un composant volumétrique majeur du biofilm, tout comme les exopolysaccharides (non représentés sur le schéma)
- La majeure partie des cellules est adhérente sur cette couche basale tandis qu'une autre partie, produisant des fibres amyloïdes, est répartie jusqu'à la surface supérieure du biofilm
- Il existe une couche protéique en surface supérieure du biofilm

Quand le biofilm est traité à la protéinase K, les protéines qui composent la couche supérieure hydrolysée sont libérées avec une petite partie de l'ADN extracellulaire. Du fait de la disparition de ces composés, les cellules restantes s'affaissent, formant des agrégats plus denses, mais sont toujours soutenues par de l'ADN, et accessoirement par les fibres amyloïdes qui y sont associées à la base du biofilm. La couche d'exopolymères supérieure majoritairement composée de protéines ou de glycoprotéines est la partie du biofilm qui est digérée en premier.

Lors d'un traitement à la DNase I, la majorité de l'ADN et une grande partie des fibres amyloïdes sont retirées de la matrice. La structure tridimensionnelle peut être maintenue car les protéines formant la couche supérieure n'ont pas été dégradées par l'enzyme. L'ADN éliminé libère du volume et aère ainsi le réseau matriciel, rendant le biofilm plus poreux. La couche basale est partiellement préservée.

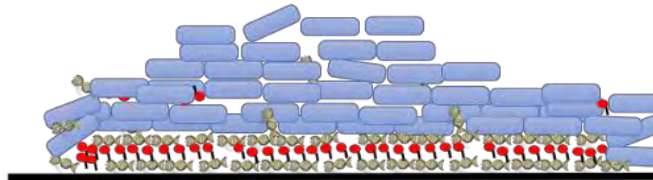


Intact biofilm :

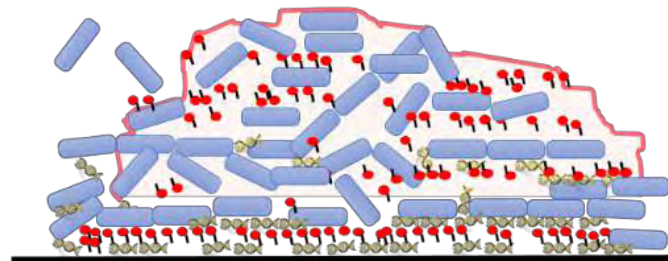
- One part of the cells population is engulfed within EPS matrix while another part accumulate on the top of the biofilm
- eDNA and adhesive proteins, mainly, amyloid fibrils are localised at the bottom of the biofilm to set together the cell in a well organized mesh-row.
- At the surface of the biofilm, some class of proteins are produced to form a protective layer.

+ Proteinase K :

- Surface-layer and cell associate proteins are removed with a part of interlaced eDNA at the upper side of the matrix.
- Persistent cells get enrolled and form some compact aggregates. Exopolysaccharides* may keep the cells consolidated.
- Substratum-attached eDNA hold the cells and insure biofilm adherence.



**Not shown on the figure but quantitative analysis indicated that the carbohydrates content of the matrix remained intact whatever the treatment applied.*



+ DNase I:

- The global architecture of the biofilm display an aerated cells network. Intercellular eDNA and proteins associated are removed from the biofilm
- Basal eDNA are not accessible for the enzyme and maintain a minimal basal structure.
- The proteinaceous layer and exopolysaccharides* are weakly affected by the enzyme and protect cells from external aggression.

FIGURE C-12. Modèle proposé pour décrire l'architecture d'un biofilm de 24 heures de *Bacillus licheniformis* et les effets de la DNase I et de la protéinase K

Conclusion générale et perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse visaient à répondre à deux enjeux concernant la caractérisation de la matrice extracellulaire des biofilms bactériens. Pour faire face au manque d'outils de quantification, le premier objectif de l'étude était de développer et valider des outils de dosage *in situ* des substances exopolymériques (exoprotéines, fibres amyloïdes, exopolysaccharides, ADN extracellulaire) des biofilms afin de permettre une analyse quantitative de la composition biochimique de la matrice tout en préservant l'intégrité du biofilm. Le second enjeu était d'appliquer les outils de quantification développés à l'étude de l'implication des SEP dans la structuration et l'architecture des biofilms formés par une souche *Bacillus licheniformis*, isolée de biofilms papetiers.

Apport des méthodes de quantification *in situ* des SEP de biofilm

Pour le développement des outils de quantification des exoprotéines, dont les fibres amyloïdes et des exopolysaccharides, un cahier des charges a été dressé de façon à sélectionner les marqueurs et/ou colorants à utiliser. Ainsi, pour chacune des familles biochimiques visées, le dosage devait satisfaire des critères de spécificité, de sensibilité et de large gamme dosable, ainsi que de transposabilité à la microscopie à épifluorescence ou confocale.

Une fois le(s) marqueur(s) identifiés, une même démarche expérimentale a été mise en œuvre : dans un premier temps, les protocoles ont été optimisés et un étalon choisi afin d'établir une calibration, puis les interférences des composés majoritaires du biofilm non ciblés par le dosage ont été évaluées en solution. Le protocole a été ensuite appliqué sur des biofilms des 3 souches modèles, et les résultats ont été validés en procédant à des ajouts dosés de l'étalon.

Afin d'évaluer l'adéquation des dosages à différents types de biofilms et de matrices, trois souches modèles présentant des matrices de compositions contrastées ont été retenues : *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Weissella confusa*. Le développement analytique s'est fait sur des biofilms de 24 et 48 heures développés en microplaque 96 puits.

Le **Chapitre I** a permis d'aborder le développement d'outils de quantification *in situ* des exoprotéines et des exopolysaccharides de trois biofilms bactériens modèles, afin d'estimer la distribution de chaque composant au sein de la matrice extracellulaire.

Dans la littérature, seule une étude pionnière avait déjà proposé une méthode de quantification *in situ* des exoprotéines au sein de biofilms par l'usage de la microscopie à fluorescence. Les principaux objectifs de cette étude visaient à s'affranchir des étapes de traitement et de rinçage des échantillons qui risquaient potentiellement de détacher une partie des biofilms analysés, ce pourquoi les marqueurs pro-fluorescents CBCQA et Nano[®]orange avaient été utilisés (Larsen et al. 2008b). Il a en effet été plusieurs fois rapporté que l'efficacité d'extraction des protéines et des polysaccharides pouvait beaucoup varier selon les espèces bactériennes (Sheng et al. 2010; Zuriaga-Agustí et al. 2013). Ainsi, en proposant ces méthodes de dosage, simples à mettre en œuvre et applicables *in situ*, il est possible de s'affranchir de la mésestimation de la quantité des SEP lorsqu'on cherche à comparer des profils biochimiques d'espèces différentes.

Ici, les exoprotéines ont été dosées grâce à une autre molécule pro-fluorescente, l'épicocconone, avec une gamme de linéarité allant de 0,7 à 50 µg BSA par puits qui était en adéquation avec les biofilms modèles étudiés. Les résultats de calibration sur la BSA et la kappa-caséine ont montré que ce dosage est capable de doser indifféremment toutes les protéines, qu'elles soient sous forme globulaire, native ou fibrillaire. Les autres composants principaux des biofilms modèles (exopolysaccharides, ADN et cellules) n'ont pas montré d'interférence dans les conditions de l'étude.

D'autres auteurs ont développé une quantification relative des polysaccharides sur des biofilms bactériens en exploitant la réaction de Schiff (Haase et al. 2006)). De plus, récemment, un marquage au réactif de Schiff a été utilisé pour observer des biofilms en microscopies confocale et à épifluorescence, ce pourquoi le dosage des exopolysaccharides totaux a été développé en utilisant ce colorant. La gamme d'application obtenue va de 1,1 à 50 µg-Dextrane par puit. L'analyse des interférences par les protéines, l'ADN et les cellules a montré que seule une forte densité de cellules de *Pseudomonas aeruginosa* générant un signal significativement différent du blanc.

Pour les deux dosages, les critères du cahier des charges ont ainsi été satisfaits : les protocoles proposés sont sensibles mais permettent de dose une large gamme de concentrations, ils sont spécifiques d'une famille biochimique et les autres familles étudiées n'interfèrent pas, ou peu, dans les résultats, et ils sont utilisables en microscopie.

Ces deux protocoles permettent désormais d'établir un profil protéines/sucres de biofilms différents sans aucune étape préalable de traitement des échantillons et sans rinçages, proposant ainsi une alternative aux risques d'altération des substances exopolymériques par des procédures d'extraction physiques et/ou chimiques. Il est à rappeler tout de même que les teneurs relatives en ePN et ePS dosées par ces deux méthodes ont été déterminées en référence à des molécules standards dont le choix a été justifié dans chacune des différentes parties. Ces molécules peuvent être remplacées afin d'adapter la quantification à la nature de la matrice, et c'est la raison pour laquelle il conviendra de présenter les résultats en « quantité équivalente d'étalon », les valeurs chiffrées finales pouvant varier en fonction de l'étalon retenu. Ce problème est rencontré pour tous les dosages biochimiques s'intéressant à des mélanges de polymères et n'a pas encore trouvé de solution à ce jour. Il faudrait en effet pour cela pouvoir proposer des dosages complètement indépendants de la composition en monomères (acides aminés ou monosaccharides) des polymères.

D'autre part, si les limites de quantification des méthodes assurent une bonne sensibilité des dosages, leur applicabilité aux échantillons de biofilms est quant à elle contrôlée par les gammes de linéarité de chaque dosage ; dans le cadre de notre étude, il a été possible de comparer la distribution en SEP de biofilms de 24 et 48h des trois souches modèles. La difficulté à doser des échantillons peu concentrés (biofilms jeunes ou après traitement de réduction) peut cependant être vaincue par l'ajout de l'étalon du dosage sur l'échantillon à analyser : des ajouts dosés permettent en effet de dépasser la limite de quantification du dosage, et ainsi d'avancer un résultat fiable même pour de faibles quantités présentes dans la matrice. Ainsi, ces deux méthodes pourront être suffisamment sensibles pour évaluer des taux de réduction de biofilm notamment, suite à un traitement ou à l'action d'un facteur de stress.

La quantification des fibres amyloïdes produites par des biofilms bactériens modèles a fait l'objet d'un développement analytique plus spécifique, exposé dans le **Chapitre II**. Depuis la mise en évidence de l'affinité de la Thioflavine T pour les fibres amyloïdes et du déplacement de son pic de fluorescence lors de sa fixation sur les feuillets β , ce marqueur est le plus utilisé pour caractériser ces protéines. Toutefois, rares voire inexistantes sont les études qui proposent une méthode de quantification de ces fibres au sein d'échantillons complexes tels que les biofilms. De plus, il n'existe pas de protéine disponible commercialement sous une forme fibrillée. Ainsi, dans le cadre de notre étude, la κ -caséine, une protéine d'origine animale impliquée dans la formation

des micelles de caséines dans le lait, a été choisie pour constituer un calibrant de référence dans la mesure où elle forme des fibres amyloïdes *in vitro*. Une méthode de production de cet étalon a donc été mise au point dans un premier temps et a permis, dans le même temps, de proposer une stratégie de quantification *in vitro* des fibres amyloïdes au sein d'échantillons complexes en combinant la chromatographie par exclusion de taille et la détection de la fluorescence de la Thioflavine T. Il a ainsi été possible de différencier les fibres amyloïdes des autres protéines au sein d'un extrait de biofilm et d'en estimer la teneur relative par rapport aux protéines totales. Cette méthode pourrait aussi être pertinente pour la purification de fibres amyloïdes à partir d'échantillons complexes.

Après obtention de l'étalon, une méthode de quantification *in situ* des fibres amyloïdes en microplaques a également été développée en suivant la même démarche que pour les dosages des exoprotéines et des exopolysaccharides. La méthode permet de quantifier des fibres amyloïdes directement sur des biofilms dont la teneur varie entre 7.08µg et 50µg par puit, soit 141.5 à 1000µg.ml⁻¹. Similairement aux dosages des protéines et des polysaccharides, le calibrant peut être choisi selon les conditions et la nature de la matrice étudiée. De nombreuses protéines commerciales sont capables de se polymériser et former des structures de type amyloïdes selon certaines conditions comme le lysozyme ou la transthyrétine (Zandomenighi et al. 2004; Vernaglia et al. 2004). *A fortiori*, des extraits de fibres amyloïdes bactériennes comme la FapC ou la TasA mais également des peptides précurseurs de l'amyloïdogenèse peuvent également être envisagés pour servir de molécules standard (Romero et al. 2010; Chai et al. 2013; Dueholm et al. 2013b; Lembré et al. 2014b).

Il est important de noter qu'en se référant à une même protéine standard, les quantités de fibres amyloïdes ont pu être comparées à celles des protéines totales formées au sein de chaque biofilm. Ainsi, il pourra être possible de suivre l'évolution de la fraction amyloïde au sein des protéines totales et de déterminer les étapes clés de production et/ou consommation de ces fibres. En effet, l'étude bibliographique a montré que les protéines amyloïdes sont impliquées depuis l'adhésion cellulaire jusqu'à l'étape de maturation de la matrice mais leur devenir en terme de dégradation et/ou export au sein de la matrice reste à explorer. Les outils proposés permettront ainsi d'apporter une dimension quantitative au suivi de la dynamique des protéines au sein d'un biofilm.

Enfin, les données bibliographiques ont permis de mettre en lumière le rôle central de l'ADN extracellulaire aux différents stades de formation des biofilms. Afin de compléter l'étude de

la matrice de biofilms de 24 et 48h par l'analyse des exoprotéines, dont les fibres amyloïdes, et des exopolysaccharides, le dosage in situ de l'ADN a été réalisé au moyen du PicoGreen® selon la méthode décrite par Tang et al. (2013). Ce marqueur présente l'avantage de pénétrer très faiblement, voire pas du tout, dans les cellules bactériennes. Il présente de plus une très forte affinité pour l'ADN double brin et a démontré une très bonne sensibilité par rapport à d'autres marqueurs d'acides nucléiques. Toutes ces caractéristiques font de ce marqueur un bon candidat pour répondre aux critères de sélection précédemment définis. La mise en œuvre du dosage de l'ADN extracellulaire a ainsi permis de décrire son niveau de production chez les trois souches à l'étude.

Ainsi, les méthodes développées peuvent s'avérer très utiles pour évaluer quantitativement l'effet de facteurs exogènes (conditions environnementales, traitements, etc) mais également pour mieux comprendre les mécanismes biologiques qui gouvernent le cycle de vie des biofilms. En effet, ce besoin a été, souligné dans de nombreuses études, et encore aujourd'hui dans une récente revue (Steinberg and Kolodkin-Gal 2015) centrée sur l'implication des différents acteurs biologiques de la matrice extracellulaire dans l'organisation de biofilms. De nombreux phénomènes sont qualitativement bien décrits et l'aspect quantitatif devrait pouvoir compléter les connaissances de nombreux processus qui s'opèrent au sein du biofilm.

Pour ces différentes méthodes de quantification, trois souches modèles aux matrices extracellulaires structurellement contrastées ont été choisies pour vérifier l'applicabilité et donc valider les performances des dosages en termes de sensibilité et de spécificité. Les résultats obtenus ont alors permis d'apporter de nouveaux éléments de caractérisation du profil en SEP des trois biofilms modèles. En effet, la souche de *Weissella confusa* s'est distinguée des deux autres souches par la très faible production de protéines extracellulaires et la texture visqueuse, voire, semi-liquide de sa matrice extracellulaire. Chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus licheniformis* les protéines extracellulaires sont les SEP les plus abondantes au sein de la matrice. Cependant, outre le fait que les teneurs en protéines extracellulaires étaient du même ordre de grandeur chez les deux souches, l'aspect morphologique des biofilms et donc la structure de la matrice extracellulaire des biofilms formés se sont avérés différents d'un point de vue macroscopique. Ces observations amènent ainsi à s'interroger sur la relation entre l'abondance en protéines et l'architecture des biofilms et nous conduit à rappeler que l'approche quantitative ne

doit pas exclure l'approche qualitative si on veut décrire correctement et exhaustivement les biofilms. L'étude des biofilms microbiens demeure en effet un challenge scientifique et requiert une coordination pluridisciplinaire entre les spécialistes de chaque domaine tant en microbiologie, en chimie, en physique, en ingénierie qu'en modélisation mathématique. Lorsque l'analyse des biofilms se focalise sur l'aspect structural des composés, de nombreuses techniques ont prouvé leur pertinence pour décrire les propriétés physico-chimiques des SEP impliquées dans la structure même des biofilms étudiés. La complexité de la matrice est telle qu'elle nécessite par ailleurs une combinaison des différentes techniques afin d'obtenir une caractérisation exhaustive aussi bien qualitative que quantitative. C'est ainsi qu'une démarche multiparamétrique a été appliquée pour décrire plus précisément la matrice d'un biofilm de *Bacillus licheniformis* de 24 heures et apporter des éléments de compréhension sur le rôle des différentes SEP dans la cohésion du biofilm.

Approche quantitative de l'implication des SEP dans la structuration des biofilms : cas de *Bacillus licheniformis*

Après la validation des méthodes de dosage *in situ*, ces outils ont été utilisés pour étudier le niveau d'implication des SEP dans les mécanismes d'adhésion et d'agrégation des biofilms formés par *Bacillus licheniformis*. Le travail a été décrit dans le **chapitre III**. En suivant distinctement l'évolution de chaque composé après altération enzymatique de la matrice, et pas uniquement la densité de biofilm total par une méthode empirique et peu spécifique comme le Crystal violet, ces outils ont pu apporter de nouvelles connaissances sur le mécanisme de maintien du biofilm de *Bacillus licheniformis*. Les enzymes se sont avérées être des outils pertinents pour élucider les fonctions des exopolymères de la matrice dans la formation, le développement et la dispersion des biofilms. Une des plus utilisées est l'endonucléase DNase I, qui a permis de découvrir l'importance de l'implication de l'ADN extracellulaire dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Whitchurch et al. 2002). Dans le cadre de notre étude cette enzyme a été couplée à la protéinase K, une sérine-protéase à large spectre d'action, afin d'identifier les exopolymères responsables de l'architecture du biofilm et évaluer leur niveau d'implication. Les outils de quantification *in situ* des exoprotéines, des exopolysaccharides, des fibres amyloïdes et l'ADN extracellulaire ont été utilisés pour déterminer quels exopolymères contribuaient à la capacité d'adhérence (résistance au détachement) des biofilms ayant subi un traitement enzymatique à la DNase I ou la protéinase K. Les résultats de ce premier test ont permis de découvrir que la

DNaseI, a massivement détaché l'ADN extracellulaire mais également les fibres amyloïdes. Cela nous a amené à suggérer que ces dernières entraînent en interaction avec l'ADN extracellulaire. Afin de confirmer ces premières observations, une analyse *in vitro* des solutions issues de la digestion des biofilms ont été analysées par chromatographie par exclusion de taille afin de mettre en évidence le relargage de fragments de haut poids moléculaire en plus des petits fragments d'ADN libérés par l'enzyme ainsi que la description de la composition biochimique des digestats. Nous avons donc été en mesure d'affirmer que les fibres amyloïdes et l'ADN extracellulaire formaient un complexe nucléoprotéique suffisamment stable pour perdurer lors de la contrainte d'élution en chromatographie de filtration sur gel. L'observation des biofilms traités par la DNase I par microscopie confocale, sur lesquels chaque composant majoritaire de la matrice a été marqué spécifiquement, a permis, d'une part, de décrire la distribution des exopolymères au sein du biofilm, et d'autre part, de montrer la cohésion des cellules assurée par ce complexe nucléo-amyloïdique.

Les fibres amyloïdes sont déjà connues chez les espèces de *Bacillus* et d'autres espèces pour leur rôle structural dans les biofilms (Romero et al. 2010; Zeng et al. 2015). D'autre part, il a été montré que l'ADN extracellulaire participe à l'adhésion des bactéries de l'espèce *Bacillus* aux surfaces (Vilain et al. 2009), mais une interaction ADN-amyloïde n'avait pas encore été mise en évidence chez les *Bacillus*.

Très récemment, ce type d'interaction intermoléculaire au sein de la matrice de biofilm a été placé au cœur de nombreuses investigations. Les réseaux d'ADN extracellulaire se retrouvent souvent associés à des protéines bactériennes de type histone qui vont stabiliser la structure du biofilm (Novotny et al. 2013; Nur et al. 2013; Das et al. 2013; Brockson et al. 2014). Pour ses capacités à établir des connexions avec les différents polymères de la matrice, l'ADN extracellulaire est devenu la cible des stratégies antibiofilms (Okshevsky et al. 2015). Chez *Pseudomonas aeruginosa* l'ADN extracellulaire se lie à l'exopolysaccharides Pel (Jennings et al. 2015). Lorsque l'ADN extracellulaire se lie aux curli, protéines amyloïdes des entérobactéries, il va favoriser la polymérisation des molécules de CsgA (monomère constitutif des curli) et aboutir à la formation un composite « ADN-amyloïde » (Gallo et al. 2015).

Ainsi, le travail qui s'est focalisé sur chaque constituant de la matrice en réponse à un facteur exogène (ici action enzymatique) sur un biofilm de *Bacillus licheniformis* a permis d'apporter une connaissance plus détaillée sur les interactions entre les SEP de la matrice alors qu'une étude au moyen de la coloration au Crystal violet aurait simplement permis de conclure sur l'efficacité de la

réduction enzymatique sur l'ensemble du biofilm. En procédant ainsi, nous avons pu apporter une information supplémentaire sur les propriétés de la matrice de *Bacillus licheniformis*, qui peut s'avérer essentielle pour la recherche de stratégie de déstructuration de biofilms néfastes dans l'industrie.

Perspectives de l'étude :

A court terme, il pourra être nécessaire de développer une méthode de dosage in situ de l'ADN extracellulaire au sein de biofilms alternative à l'utilisation du PicoGreen®. En effet, la méthode proposée par Tang et al. (2013), bien que sensible et rapide, apparaît contraignante et délicate à mettre en œuvre du fait de la très courte durée d'exposition du marqueur (2 min) à respecter. Ceci a en effet été recommandé afin de s'assurer de la spécificité du marqueur pour l'ADN extracellulaire. Très récemment, une étude a évoqué les avantages du marqueur TOTO-1® (une cyanine dimérique) aussi sensible que le PicoGreen® et qui ne diffusait quasiment pas à l'intérieur des cellules (Okshevsky and Meyer 2014). En effet, il est indispensable de disposer d'un outil sensible et spécifique de l'ADN extracellulaire afin de mieux décrire les mécanismes initiés par ce composant majoritaire de la matrice. De plus en plus d'études évoquent l'importance et le rôle essentiel joué par l'ADN extracellulaire dans le biofilm, et cela à chaque phase de développement du biofilm, ce qui fait de ce composé une cible potentielle pour l'inhibition et l'éradication des biofilms (Okshevsky et al. 2015).

Par ailleurs, très peu d'études ont été réalisées sur l'espèce *Bacillus licheniformis* au détriment de *Bacillus subtilis*. Puisque cette souche est très souvent isolée et identifiée dans les biofilms industriels (Blanco et al. 1996; Fangio et al. 2010), il pourrait être pertinent, à moyen terme, d'apporter de nouvelles connaissances plus approfondies sur cette espèce tout en comparant les données collectées avec la souche modèle *Bacillus subtilis*.

D'autre part, l'ensemble du travail effectué dans le cadre de cette thèse a été réalisé sur des biofilms bactériens formés en laboratoire (conditions contrôlées) et mono-espèces. Il serait intéressant de vérifier l'applicabilité des outils de quantification de la matrice sur un biofilm naturel multi-espèces et de mener également une étude sur l'implication des exopolymères dans la structuration de ces biofilms. Dans de telles conditions où les exopolymères produits peuvent avoir différentes propriétés, il serait intéressant de voir si le complexe ADN-amyloïde prévaut toujours en termes de protection et de structuration des biofilms.

A ce jour, et à notre connaissance, très peu de données, voire aucune, n'a été rapportée sur l'existence d'un agent biologique, capable de dégrader spécifiquement les fibres amyloïdes. Il serait également intéressant de procéder à un criblage biochimique des enzymes ayant une action potentielle sur ces protéines particulières. Notamment, ce criblage pourrait être effectué sur des extraits de fibres amyloïdes de *Bacillus licheniformis*.

A plus long terme enfin, et dans un souci d'application à grande échelle, le travail qui a été amorcé pour une réduction des biofilms par traitement enzymatique pourrait être complété par l'application en synergie d'un antimicrobien (antibiotique, biocide ou détergent) afin d'évaluer le degré de sensibilisation du biofilm après une déstructuration de la matrice. En effet, la tolérance des biofilms bactériens aux biocides est le deuxième verrou qui resterait à lever afin de pouvoir proposer des solutions efficaces à l'éradication des biofilms. De nombreuses études ont rapporté que les bactéries organisées en biofilm produisaient également des enzymes dans le milieu extracellulaire afin de les libérer de la matrice extracellulaire pour aller coloniser de nouvelles surfaces (Kaplan 2010). Ainsi, l'unique traitement des biofilms par des enzymes, bien que réellement efficace, peut contribuer à la recolonisation des surfaces. Pour une meilleure efficacité, il faut donc pouvoir combiner les traitements avec une action hydrodynamique (Pechaud et al. 2012), peu coûteuse et facile à mettre en œuvre dans l'industrie. Des actions biologiques sont aussi proposées dans le domaine médical, notamment avec l'utilisation d'anticorps tournés spécifiquement contre les protéines de structure de la matrice (Brockson et al. 2014). Récemment, la découverte de l'efficacité des jets de plasma atmosphérique sur la viabilité des cellules en biofilms (Hee Lee et al. 2009; Marchal et al. 2012) peut amener la suite de l'étude vers une combinaison à l'action d'enzymes « anti-matrice » pour la décontamination de surfaces (surfaces industrielles ou dispositifs médicaux).

Références bibliographiques

- Abdel-Fattah AF, Mahmoud DAR, Esawy MAT (2005) Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and Fructo-Oligosaccharides. *Curr Microbiol* 51:402–7. doi: 10.1007/s00284-005-0111-1
- Abe Y, Skali-Lami S, Block J-C, Francius G (2012) Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Res* 46:1155–66. doi: 10.1016/j.watres.2011.12.013
- Aberg V, Almqvist F (2007) Pilicides-small molecules targeting bacterial virulence. *Org Biomol Chem* 5:1827–34. doi: 10.1039/b702397a
- Absalon C, Van Dellen K, Watnick PI (2011) A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces. *PLoS Pathog* 7:e1002210. doi: 10.1371/journal.ppat.1002210
- Adav SS, Lee D-J (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *J Hazard Mater* 154:1120–6. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.11.058
- Adav SS, Lin JC-T, Yang Z, Whiteley CG, Lee D-J, Peng X-F, Zhang Z-P (2010) Stereological assessment of extracellular polymeric substances, exo-enzymes, and specific bacterial strains in bioaggregates using fluorescence experiments. *Biotechnol Adv* 28:255–80. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.08.006
- Ahimou F, Semmens MJ, Haugstad G, Novak PJ (2007a) Effect of Protein, Polysaccharide, and Oxygen Concentration Profiles on Biofilm Cohesiveness. *Appl Environ Microbiol* 73:2905–2910.
- Ahimou F, Semmens MJ, Novak PJ, Haugstad G (2007b) Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology. *Appl Environ Microbiol* 73:2897–904. doi: 10.1128/AEM.02388-06
- Alan Hauser and Egon A. Ozer (2011) *Pseudomonas aeruginosa*.pdf. In: *Nat. Rev Microbiol*. <http://www.nature.com/nrmicro/posters/pseudomonas/posters.pdf>. Accessed 30 Nov 2015
- Alhede M, Qvortrup K, Liebrechts R, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2012) Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:335–42. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00956.x
- Alkawash MA, Soothill JS, Schiller NL (2006) Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS* 114:131–8. doi: 10.1111/j.1600-0463.2006.apm_356.x
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59:1114–1128. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x
- Amari M, Laguerre S, Vuillemin M, Robert H, Loux V, Klopp C, Morel S, Gabriel B, Remaud-Siméon M, Gabriel V, Moulis C, Fontagné-Faucher C (2012) Genome Sequence of *Weissella confusa* LBAE C39-2, Isolated from a Wheat Sourdough. *J Bacteriol* 194:1608–1609.
- Andersson EK, Chapman M (2013) Small Molecule Disruption of *B. subtilis* Biofilms by Targeting the Amyloid Matrix. *Chem Biol* 20:5–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.01.004>
- Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L (2015) Polysaccharide intercellular adhesin in

- biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* 5:7. doi: 10.3389/fcimb.2015.00007
- Armitano J, Méjean V, Jourlin-Castelli C (2014) Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environ Microbiol Rep* n/a–n/a. doi: 10.1111/1758-2229.12171
- Asally M, Kittisopikul M, Rué P, Du Y, Hu Z, Çağatay T, Robinson AB, Lu H, Garcia-Ojalvo J, Süel GM (2012) Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:18891–6. doi: 10.1073/pnas.1212429109
- Badel S, Bernardi T, Michaud P (2011) New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol Adv* 29:54–66. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.011>
- Baird FJ, Wadsworth MP, Hill JE (2012) Evaluation and optimization of multiple fluorophore analysis of a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Microbiol Methods* 90:192–196. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.004>
- Bar-Zeev E, Zodrow KR, Kwan SE, Elimelech M (2014) The importance of microscopic characterization of membrane biofilms in an unconfined environment. *Desalination* 348:8–15. doi: 10.1016/j.desal.2014.06.003
- Bell PJJ, Karuso P (2003) Epicocconone, A Novel Fluorescent Compound from the Fungus *Epicoccum nigrum*. *J Am Chem Soc* 125:9304–9305. doi: 10.1021/ja035496+
- Berges JA, Fisher AE, Harrison PJ (1993) A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Mar Biol* 115:187–193. doi: 10.1007/BF00346334
- Berggren K, Steinberg TH, Lauber WM, Carroll J a, Lopez MF, Chernokalskaya E, Zieske L, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF (1999) A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports. *Anal Biochem* 276:129–143. doi: 10.1006/abio.1999.4364
- Berk V, Fong JCN, Dempsey GT, Develioglu ON, Zhuang X, Liphardt J, Yildiz FH, Chu S (2012) Molecular Architecture and Assembly Principles of *Vibrio cholerae* Biofilms. *Science* (80-.). 337:236–239.
- Bhatia D, Bourven I, Simon S, Bordas F, van Hullebusch ED, Rossano S, Lens PNL, Guibaud G (2013) Fluorescence detection to determine proteins and humic-like substances fingerprints of exopolymeric substances (EPS) from biological sludges performed by size exclusion chromatography (SEC). *Bioresour Technol* 131:159–65. doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.078
- Biancalana M, Koide S (2010) Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1804:1405–1412. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Bielig H, Dongre M, Zurek B, Wai SN, Kufer TA (2011) A role for quorum sensing in regulating innate immune responses mediated by *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles (OMVs). *Gut Microbes* 2:274–9. doi: 10.4161/gmic.2.5.18091
- Bixler GD, Bhushan B (2012) Biofouling: lessons from nature. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 370:2381–417. doi: 10.1098/rsta.2011.0502
- Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P

- (2002) Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:141–148.
- Blanchard B, Imberty A, Varrot A (2014) Secondary sugar binding site identified for LecA lectin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins* 82:1060–5. doi: 10.1002/prot.24430
- Blanco LP, Evans ML, Smith DR, Badtke MP, Chapman MR (2012) Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends Microbiol* 20:66–73. doi: 10.1016/j.tim.2011.11.005
- Blanco MA, Negro C, Gaspar I, Tijero J (1996) Slime problems in the paper and board industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:203–208. doi: 10.1007/s002530050806
- Bobrov AG, Kirillina O, Forman S, Mack D, Perry RD (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: Topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol* 10:1419–1432. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01554.x
- Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR (2010) *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 75:827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x
- Bose JL, Lehman MK, Fey PD, Bayles KW (2012) Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *PLoS One* 7:e42244. doi: 10.1371/journal.pone.0042244
- Bounaix M-S, Robert H, Gabriel V, Morel S, Remaud-Siméon M, Gabriel B, Fontagné-Faucher C (2010) Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextranase expression. *FEMS Microbiol Lett* 311:18–26. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02067.x
- Bourhim M, Kruzel M, Srikrishnan T, Nicotera T (2007) Linear quantitation of A β aggregation using Thioflavin T: Reduction in fibril formation by colostrinin. *J Neurosci Methods* 160:264–268. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.09.013>
- Bourven I, Costa G, Guibaud G (2012) Qualitative characterization of the protein fraction of exopolymeric substances (EPS) extracted with EDTA from sludge. *Bioresour Technol* 104:486–496. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.033
- Bourven I, Simon S, Bhatia D, van Hullebusch ED, Guibaud G (2014) Effect of various size exclusion chromatography (SEC) columns on the fingerprints of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from biological sludge. *J Taiwan Inst Chem Eng*. doi: 10.1016/j.jtice.2014.11.025
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brancatisano FL, Maisetta G, Di Luca M, Esin S, Bottai D, Bizzarri R, Campa M, Batoni G (2014) Inhibitory effect of the human liver-derived antimicrobial peptide hepcidin 20 on biofilms of polysaccharide intercellular adhesin (PIA)-positive and PIA-negative strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Biofouling* 30:435–46. doi: 10.1080/08927014.2014.888062
- Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol Microbiol* 59:1229–1238. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x
- Branda SS, González-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R (2001) Fruiting body formation by

Bacillus subtilis. Proc Natl Acad Sci U S A 98:11621–6. doi: 10.1073/pnas.191384198

- Briandet R, Lacroix-Gueu P, Renault M, Lecart S, Meylheuc T, Bidnenko E, Steenkeste K, Bellon-Fontaine M-N, Fontaine-Aupart M-P (2008) Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:2135–43. doi: 10.1128/AEM.02304-07
- Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R (2010) The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods* 82:64–70. doi: 10.1016/j.mimet.2010.04.006
- Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Greub G, Thomas V, Briandet R (2011) Dynamics of the Action of Biocides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2648–2654.
- Bridier A, Meylheuc T, Briandet R (2013) Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron* 48:65–69. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2013.02.013>
- Bridier A, Sanchez-Vizueté M del P, Le Coq D, Aymerich S, Meylheuc T, Maillard J-Y, Thomas V, Dubois-Brissonnet F, Briandet R (2012) Biofilms of a *Bacillus subtilis* Hospital Isolate Protect *Staphylococcus aureus* from Biocide Action. *PLoS One* 7:e44506. doi: 10.1371/journal.pone.0044506
- Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO (2014) Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. *Mol Microbiol* 93:1246–58. doi: 10.1111/mmi.12735
- Cairns LS, Hobbey L, Stanley-Wall NR (2014) Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol Microbiol* 93:587–98. doi: 10.1111/mmi.12697
- Caudan C, Filali A, Lefebvre D, Spérandio M, Girbal-Neuhausser E (2012) Extracellular Polymeric Substances (EPS) from Aerobic Granular Sludges: Extraction, Fractionation, and Anionic Properties. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166:1685–1702.
- Caudan C, Filali A, Spérandio M, Girbal-Neuhausser E (2014) Multiple EPS interactions involved in the cohesion and structure of aerobic granules. *Chemosphere* 117:262–70. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.07.020
- Cavaliere R, Ball JL, Turnbull L, Whitchurch CB (2014) The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Hemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. *Microbiologyopen* 3:557–567. doi: 10.1002/mbo3.187
- Celmer D, Oleszkiewicz JA, Cicek N (2008) Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Res* 42:3057–65. doi: 10.1016/j.watres.2008.02.031
- Chai L, Romero D, Kayatekin C, Akabayov B, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2013) Isolation, Characterization, and Aggregation of a Structured Bacterial Matrix Precursor. *J Biol Chem* 288:17559–17568.
- Chai Y, Beauregard PB, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2012) Galactose Metabolism Plays a Crucial Role in Biofilm Formation by *Bacillus subtilis*.

- Chandler JR, Duerkop B a, Hinz A, West TE, Herman JP, Churchill ME a, Skerrett SJ, Greenberg EP (2009) Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation. *J Bacteriol* 191:5901–9. doi: 10.1128/JB.00591-09
- Characklis WG (1981) Fouling Biofilm Development : A Process Analysis. *Biotech and Bioeng* 23:1923–1960. doi: 10.1002/bit.260230902
- Chen M-Y, Lee D-J, Tay J-H, Show K-Y (2007) Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:467–74. doi: 10.1007/s00253-006-0816-5
- Chen Y-P, Li C, Guo J-S, Fang F, Gao X, Zhang P, Li S (2013) Extraction and characterization of extracellular polymeric substances in biofilm and sludge via completely autotrophic nitrogen removal over nitrite system. *Appl Biochem Biotechnol* 169:526–38. doi: 10.1007/s12010-012-9996-x
- Cheng L, Zhang K, Melo MAS, Weir MD, Zhou X, Xu HHK (2012) Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles. *J Dent Res* 91:598–604. doi: 10.1177/0022034512444128
- Chmielewski RAN, Frank JF (2003) Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2:22–32. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x
- Choi AHK, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T (2009) The *pgaABCD* locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* 191:5953–63. doi: 10.1128/JB.00647-09
- Chung L a (1997) A fluorescamine assay for membrane protein and peptide samples with non-amino-containing lipids. *Anal Biochem* 248:195–201. doi: 10.1006/abio.1997.2137
- Claessen D, Rink R, De Jong W, Siebring J, De Vreugd P, Boersma FGH, Dijkhuizen L, Wösten HAB (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev* 17:1714–1726. doi: 10.1101/gad.264303
- Claverys J-P, Prudhomme M, Martin B (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:451–475. doi: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142139
- Claxton NS, Fellers TJ, Davidson MW (1979) Laser Scanning Confocal Microscopy. *Microscopy* 1979:99–111. doi: 10.1159/000315021
- Clementi F (1997) Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit Rev Biotechnol* 17:327–61. doi: 10.3109/07388559709146618
- Coghlan DR, Mackintosh JA, Karuso P (2005) Mechanism of Reversible Fluorescent Staining of Protein with Epicocconone. *Org Lett* 7:2401–2404. doi: 10.1021/ol050665b
- Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, Howell PL, Wozniak DJ, Parsek MR (2012) The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol* 14:1913–1928. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x
- Comte S, Guibaud G, Baudu M (2007) Effect of extraction method on EPS from activated sludge: an HPSEC investigation. *J Hazard Mater* 140:129–37. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.06.058
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent

- infections. *Science* (80-) 284:1318–1322. doi: 10.1126/science.284.5418.1318
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183:2888–96. doi: 10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001
- D'Abzac P, Bordas F, Van Hullebusch E, Lens PNL, Guibaud G, Hullebusch E, Lens PNL, Guibaud G (2010) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1589–1599. doi: 10.1007/s00253-009-2288-x
- Dalisay DS, Webb JS, Scheffel A, Svenson C, James S, Holmström C, Egan S, Kjelleberg S (2006) A mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA)-like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva australis*. *Microbiology* 152:2875–83. doi: 10.1099/mic.0.29158-0
- Đapa T, Dapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, Scarselli M, Minton NP, Serruto D, Unnikrishnan M (2013) Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 195:545–55. doi: 10.1128/JB.01980-12
- Das T, Manefield M (2012) Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7:e46718. doi: 10.1371/journal.pone.0046718
- Das T, Sehar S, Manefield M (2013) The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ Microbiol Rep* 5:778–86. doi: 10.1111/1758-2229.12085
- Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP (2010) Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol* 76:3405–8. doi: 10.1128/AEM.03119-09
- Das T, Sharma PK, Krom BP, van der Mei HC, Busscher HJ (2011) Role of eDNA on the adhesion forces between *Streptococcus mutans* and substratum surfaces: influence of ionic strength and substratum hydrophobicity. *Langmuir* 27:10113–8. doi: 10.1021/la202013m
- Davies D, Geesey G (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* 61:860–867.
- Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 59:1181–1186.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295–298. doi: 10.1126/science.280.5361.295
- De Jong W, Wösten HAB, Dijkhuizen L, Claessen D (2009) Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloida fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol Microbiol* 73:1128–1140. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06838.x
- De Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C, Iglewski BH (2001) Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 67:1865–73. doi: 10.1128/AEM.67.4.1865-1873.2001

- Denkhaus E, Meisen S, Telgheder U, Wingender J (2007) Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchim. Acta* 158:1–27.
- Desjardins E, Beaulieu C (2003) Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:141–145. doi: 10.1007/s10295-002-0017-x
- Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD (2015) DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Mol Microbiol* 96:1119–35. doi: 10.1111/mmi.12994
- Dhakal R, Seale RB, Deeth HC, Craven H, Turner MS (2014) Draft Genome Comparison of Representatives of the Three Dominant Genotype Groups of Dairy *Bacillus licheniformis* Strains. *Appl Environ Microbiol* 80:3453–3462. doi: 10.1128/AEM.00065-14
- Di Poto A, Sbarra MS, Provenza G, Visai L, Speziale P (2009) The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials* 30:3158–66. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.038
- Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Cámara M, Williams P, Winzer K (2006) The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 8:1095–1104. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.001001.x
- Dobretsov S, Thomason JC, Williams DN (eds) (2014) *Biofouling Methods*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK
- Dogsa I, Brložnik M, Stopar D, Mandić-Mulec I (2013) Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus subtilis* Biofilms. *PLoS One* 8:e62044. doi: 10.1371/journal.pone.0062044
- Dominiak DM, Nielsen JL, Nielsen PH (2011) Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ Microbiol* 13:710–21. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02375.x
- Donlan RM (2001) Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clin Infect Dis* 33:1387–1392.
- Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881–890. doi: 10.3201/eid0809.020063
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193.
- Douterelo I, Sharpe RL, Boxall JB (2013) Influence of hydraulic regimes on bacterial community structure and composition in an experimental drinking water distribution system. *Water Res* 47:503–516. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.053>
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem* 28:350–356. doi: 10.1021/ac60111a017
- Dueholm MS, Nielsen SB, Hein KL, Nissen P, Chapman M, Christiansen G, Nielsen PH, Otzen DE (2011) Fibrillation of the major curli subunit CsgA under a wide range of conditions implies a robust design of aggregation. *Biochemistry* 50:8281–90. doi: 10.1021/bi200967c
- Dueholm MS, Otzen D, Nielsen PH (2013a) Evolutionary insight into the functional amyloids of the pseudomonads. *PLoS One* 8:e76630. doi: 10.1371/journal.pone.0076630

- Dueholm MS, Petersen S V, Sønderkær M, Larsen P, Christiansen G, Hein KL, Enghild JJ, Nielsen JL, Nielsen KL, Nielsen PH, Otzen DE (2010) Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 77:1009–1020. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07269.x
- Dueholm MS, Søndergaard MT, Nilsson M, Christiansen G, Stensballe A, Overgaard MT, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Otzen DE, Nielsen PH (2013b) Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. *Microbiologyopen* 2:365–382. doi: 10.1002/mbo3.81
- Dufrêne YF (2015) Sticky microbes: forces in microbial cell adhesion. *Trends Microbiol.* doi: 10.1016/j.tim.2015.01.011
- Dunny GM (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria.
- Durmaz B, Sanin FD (2001) Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge. In: *Water Science and Technology*. pp 221–229
- Ecroyd H, Koudelka T, Thorn DC, Williams DM, Devlin G, Hoffmann P, Carver JA (2008) Dissociation from the oligomeric state is the rate-limiting step in fibril formation by kappa-casein. *J Biol Chem* 283:9012–22. doi: 10.1074/jbc.M709928200
- Ecroyd H, Thorn DC, Liu Y, Carver JA (2010) The dissociated form of kappa-casein is the precursor to its amyloid fibril formation. *Biochem J* 429:251–260. doi: 10.1042/BJ20091949
- Elchinger P-HH, Delattre C, Faure S, Roy O, Badel S, Bernardi T, Taillefumier C, Michaud P (2014) Effect of proteases against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Lett. Appl. Microbiol.*
- ELLIOTT RP (1958) Some properties of pyoverdine, the water-soluble fluorescent pigment of the pseudomonads. *Appl Microbiol* 6:241–6.
- Fang F, Lu W-T, Shan Q, Cao J-S (2014) Characteristics of extracellular polymeric substances of phototrophic biofilms at different aquatic habitats. *Carbohydr Polym* 106:1–6. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.010
- Farrell HM, Cooke PH, Wickham ED, Piotrowski EG, Hoagland PD (2003) Environmental influences on bovine κ -casein: Reduction and conversion to fibrillar (amyloid) structures. *J Protein Chem* 22:259–273. doi: 10.1023/A:1025020503769
- Federle MJ, Bassler BL (2003) Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 112:1291–1299.
- Flemming H-C (2011) The perfect slime. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 86:251–259. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- Flemming H-C, Meier M, Schild T (2013) Mini-review: microbial problems in paper production. *Biofouling* 29:683–96. doi: 10.1080/08927014.2013.798865
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J Bacteriol* 189:7945–7947. doi: 10.1128/JB.00858-07
- Flint SH, Bremer PJ, Brooks JD (1997) Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling* 11:81–97. doi: 10.1080/08927019709378321
- Fong JCN, Karplus K, Schoolnik GK, Yildiz FH (2006) Identification and Characterization of RbmA, a Novel Protein Required for the Development of Rugose Colony Morphology and Biofilm Structure

- in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 188:1049–1059. doi: 10.1128/JB.188.3.1049-1059.2006
- Fong JNC, Yildiz FH (2015) Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr*. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014
- Fontaine L, Boutry C, De Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P (2010) A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* 192:1444–1454. doi: 10.1128/JB.01251-09
- Fowler DM, Koulov A V, Balch WE, Kelly JW (2007) Functional amyloid – from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 32:217–224. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2007.03.003>
- Frank KL, Patel R (2007) Poly-N-Acetylglucosamine Is Not a Major Component of the Extracellular Matrix in Biofilms Formed by *icaADBC*-Positive *Staphylococcus lugdunensis* Isolates. *Infect Immun* 75:4728–4742. doi: 10.1128/IAI.00640-07
- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL (2011) Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl.
- Franklin MJ, Ohman DE (1993) Identification of *algF* in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* which is required for alginate acetylation. *J Bacteriol* 175:5057–5065.
- Friedman L, Kolter R (2003) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 51:675–690. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x
- 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.
- Gallo PM, Rapsinski GJ, Wilson RP, Oppong GO, Sriram U, Goulian M, Buttaro B, Caricchio R, Gallucci S, Tükel Ç (2015) Amyloid-DNA Composites of Bacterial Biofilms Stimulate Autoimmunity. *Immunity* 42:1171–84. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.002
- Garcia MC, Lee JT, Ramsook CB, Alsteens D, Dufrêne YF, Lipke PN (2011) A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. *PLoS One* 6:e17632. doi: 10.1371/journal.pone.0017632
- Garnier C, Görner T, Lartiges BS, Abdelouhab S, de Donato P (2005) Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Res* 39:3044–3054. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.007>
- Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA (2011) Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. *Appl Environ Microbiol* 77:5238–5246.
- Gjermansen M, Nilsson M, Yang L, Tolker-Nielsen T (2010) Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: Genetic elements and molecular mechanisms. *Mol Microbiol* 75:815–826. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06793.x
- Glasel JA (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 18:62–63.
- Gloag ES, Turnbull L, Huang A, Vallotton P, Wang H, Nolan LM, Mililli L, Hunt C, Lu J, Osvath SR, Monahan LG, Cavaliere R, Charles IG, Wand MP, Gee ML, Prabhakar R, Whitchurch CB (2013) Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci* 110:11541–11546.
- Gökçen A, Vilcinskis A, Wiesner J (2013) Methods to identify enzymes that degrade the main

- extracellular polysaccharide component of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Virulence* 4:260–70. doi: 10.4161/viru.23560
- Goodman SD, Oberfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO (2011) Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol* 4:625–37. doi: 10.1038/mi.2011.27
- Govan JR (1990) Characteristics of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in vivo. *Pseudomonas Infect alginates - Biochem Genet Pathol* 50–75.
- Govan JR, Deretic V (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60:539–74.
- Guiot E, Georges P, Brun A, Fontaine-Aupart MP, Bellon-Fontaine MN, Briandet R (2007) Heterogeneity of Diffusion Inside Microbial Biofilms Determined by Fluorescence Correlation Spectroscopy Under Two-photon Excitation. *Photochem Photobiol* 75:570–578. doi: 10.1562/0031-8655(2002)0750570HODIMB2.0.CO2
- Haase EM, Bonstein T, Palmer Jr RJ, Scannapieco FA (2006) Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation. *Arch Oral Biol* 51:299–314. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.09.002>
- Hamilton HL, Domínguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol* 55:1704–21. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04521.x
- Hammond JB, Kruger NJ (1988) The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 3:25–32. doi: 10.1385/0-89603-126-8:25
- Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A (2010) Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J Med Microbiol* 59:1–7.
- Hao L, Li J, Kappler A, Obst M (2013) Mapping of heavy metal ion sorption to cell-extracellular polymeric substance-mineral aggregates by using metal-selective fluorescent probes and confocal laser scanning microscopy. *Appl Environ Microbiol* 79:6524–34. doi: 10.1128/AEM.02454-13
- Harmsen M, Lappann M, Knøchel S, Molin S (2010) Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 76:2271–2279. doi: 10.1128/AEM.02361-09
- Haussler S, Fuqua C (2013) Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field. *J Bacteriol* 195:2947–58. doi: 10.1128/JB.00239-13
- Herbst F-A, Søndergaard MT, Kjeldal H, Stensballe A, Nielsen PH, Dueholm MS (2014) Major Proteomic Changes Associated with Amyloid-Induced Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Proteome Res*. doi: 10.1021/pr500938x
- Herzberg M, Elimelech M (2007) Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure. *J Memb Sci* 295:11–20. doi: 10.1016/j.memsci.2007.02.024
- Higgins MJ, Novak JT (1997) Characterization of Exocellular Protein and Its Role in Bioflocculation. *J Environ Eng* 123:479–485. doi: 10.1061/(ASCE)0733-9372(1997)123:5(479)
- Hinsa SM, Espinosa-Urgel M, Ramos JL, O'Toole GA (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 49:905–918. doi: 10.1046/j.1365-

2958.2003.03615.x

- Hobley L, Ostrowski A, Rao F V, Bromley KM, Porter M, Prescott AR, MacPhee CE, van Aalten DMF, Stanley-Wall NR (2013) BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:13600–5. doi: 10.1073/pnas.1306390110
- Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35:322–332.
- Horsman SR, Moore RA, Lewenza S (2012) Calcium Chelation by Alginate Activates the Type III Secretion System in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0046826
- Houari A, Seyer D, Kecili K, Heim V, Martino P Di (2013) Kinetic development of biofilm on NF membranes at the Méry-sur-Oise plant, France. *Biofouling* 29:109–18. doi: 10.1080/08927014.2012.752464
- Hoyle BD, Williams LJ, Costerton JW (1993) Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Infect. Immun.* 61:777–780.
- Huseby MJ, Kruse AC, Digre J, Kohler PL, Vocke JA, Mann EE, Bayles KW, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA (2010) Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14407–12. doi: 10.1073/pnas.0911032107
- Imberty A, Wimmerová M, Mitchell EP, Gilboa-Garber N (2004) Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: Insights into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect.* 6:221–228.
- Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB (2008) Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 74:470–6. doi: 10.1128/AEM.02073-07
- Izano EA, Shah SM, Kaplan JB (2009) Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Microb Pathog* 46:207–13. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.004
- Jahn A (1998) Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci Technol* 37:17–24. doi: 10.1016/S0273-1223(97)00751-8
- Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG (2013) Life after death: The critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol* 57:467–475. doi: 10.1111/lam.12134
- Janissen R, Murillo DM, Niza B, Sahoo PK, Nobrega MM, Cesar CL, Temperini MLA, Carvalho HF, de Souza AA, Cotta MA (2015) Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Sci Rep* 5:9856. doi: 10.1038/srep09856
- Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ, Howell PL, Parsek MR (2015) Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11353–11358. doi: 10.1073/pnas.1503058112
- Johnson M (2015) Protein Quantitation.
- Jones LJ, Haugland RP, Singer VL (2003) Development and characterization of the NanoOrange protein quantitation assay: a fluorescence-based assay of proteins in solution. *Biotechniques* 34:850–4,

856, 858 passim.

- Jurcisek JA, Bakaletz LO (2007) Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *J Bacteriol* 189:3868–75. doi: 10.1128/JB.01935-06
- K. Chan B, T. Abedon S, Chan B, Abedon S (2015) Bacteriophages and their Enzymes in Biofilm Control. *Curr Pharm Des* 21:85–99.
- Kaplan B, Shtrasburg S, Pras M (2003a) Micropurification techniques in the analysis of amyloid proteins. *J Clin Pathol* 56:86–90.
- Kaplan HB, Greenberg EP (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163:1210–1214.
- Kaplan JB (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* 89:205–218. doi: 10.1177/0022034509359403
- Kaplan JB, Meyenhofer MF, Fine DH (2003b) Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycescomitans*. *J Bacteriol* 185:1399–404. doi: 10.1128/JB.185.4.1399
- Kaplan JB, Velliyagounder K, Ragunath C, Rohde H, Mack D, Knobloch JK-M, Ramasubbu N (2004) Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 186:8213–20. doi: 10.1128/JB.186.24.8213-8220.2004
- Kearns DB, Bonner PJ, Smith DR, Shimkets LJ (2002) An extracellular matrix-associated zinc metalloprotease is required for dilauroyl phosphatidylethanolamine chemotactic excitation in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 184:1678–1684.
- Kikuchi T, Mizunoe Y, Takade A, Naito S, Yoshida S (2005) Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol Immunol* 49:875–884.
- Kilcoyne M, Gerlach JQ, Farrell MP, Bhavanandan VP, Joshi L (2011) Periodic acid–Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format. *Anal Biochem* 416:18–26. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.05.006>
- Kirn TJ, Jude BA, Taylor RK (2005) A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature* 438:863–866. doi: 10.1038/nature04249
- Kisilevsky R, Snow A (1988) The potential significance of sulphated glycosaminoglycans as a common constituent of all amyloids: or, perhaps amyloid is not a misnomer. *Med Hypotheses* 26:231–236. doi: 10.1016/0306-9877(88)90125-9
- Kives J, Orgaz B, SanJosé C (2006) Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 52:123–127. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.04.018>
- Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, de Vos WM (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 24:895–904. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.4251782.x
- Kobayashi K, Iwano M (2012) BslA(YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Mol Microbiol* 85:51–66. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08094.x

- Kolari M, Nuutinen J, Salkinoja-Salonen MS (2001) Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:343–351. doi: 10.1038/sj.jim.7000201
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R, Ilana Kolodkin-Gal, Diego Romero, Shugeng Cao, Jon Clardy RK, Losick R (2010) D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328:627–9. doi: 10.1126/science.1188628
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013) Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010306. doi: 10.1101/cshperspect.a010306
- Kubota H, Senda S, Tokuda H, Uchiyama H, Nomura N (2009) Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiol* 26:592–597. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.001>
- Kumar Shukla S, Rao TS (2013) Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *J Antibiot (Tokyo)* 66:55–60. doi: 10.1038/ja.2012.98
- Lacroix-Gueu P, Briandet R, Lévêque-Fort S, Bellon-Fontaine M-N, Fontaine-Aupart M-P (2005) In situ measurements of viral particles diffusion inside mucoid biofilms. *C R Biol* 328:1065–72. doi: 10.1016/j.crv.2005.09.010
- Lahtinen T, Kosonen M, Tirola M, Vuento M, Oker-Blom C (2006) Diversity of bacteria contaminating paper machines. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:734–740. doi: 10.1007/s10295-006-0105-4
- Lappann M, Claus H, van Alen T, Harmsen M, Elias J, Molin S, Vogel U (2010) A dual role of extracellular DNA during biofilm formation of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 75:1355–71. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07054.x
- Larsen P, Nielsen JL, Dueholm MS, Wetzel R, Otzen D, Nielsen PH (2007) Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ Microbiol* 9:3077–3090. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01418.x
- Larsen P, Nielsen JL, Otzen D, Nielsen PH (2008a) Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 74:1517–1526. doi: 10.1128/AEM.02274-07
- Larsen P, Olesen BH, Nielsen PH, Nielsen JL (2008b) Quantification of lipids and protein in thin biofilms by fluorescence staining. *Biofouling* 24:241–250. doi: 10.1080/08927010802040255
- Lasa I, Penadés JR (2006) Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157:99–107. doi: 10.1016/j.resmic.2005.11.003
- Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo J-M, Gamazo C, Penadés JR, Lasa I (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Mol Microbiol* 58:1322–39. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04907.x
- Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I (2006) Biofilm-associated proteins. *C R Biol* 329:849–857. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2006.07.008>
- Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen L, Neu TR, Molin S, Ullrich MS (2006) Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology* 152:2909–18. doi: 10.1099/mic.0.28875-0

- Leathers T, Bischoff K (2011) Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. *Biotechnol Lett* 33:517–523. doi: 10.1007/s10529-010-0450-2
- Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* 65:1474–1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x
- Lembré P, Di Martino P, Vendrely C (2014a) Amyloid peptides derived from CsgA and FapC modify the viscoelastic properties of biofilm model matrices. *Biofouling* 1–12. doi: 10.1080/08927014.2014.880112
- Lembre P, Lorentz C, Di Martino P (2012) Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: a complex biophysical world. In: Karunaratne D (ed) *The complex world of polysaccharides*, Rijeka: InTech, pp 371–392
- Lembré P, Vendrely C, Martino P Di (2014b) Identification of an Amyloidogenic Peptide From the Bap Protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Protein Pept Lett* 21:75–9. doi: 10.2174/09298665113209990072
- Leonil J, Henry G, Jouanneau D, Delage M-M, Forge V, Putaux J-L (2008) Kinetics of fibril formation of bovine kappa-casein indicate a conformational rearrangement as a critical step in the process. *J Mol Biol* 381:1267–80. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.064
- Lequette Y, Boels G, Clarisse M, Faille C (2010) Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26:421–431. doi: 10.1080/08927011003699535
- Leriche V, Sibille P, Carpentier B (2000) Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 66:1851–1856. doi: 10.1128/AEM.66.5.1851-1856.2000
- Leroy C, Delbarre C, Ghillebaert F, Compere C, Combes D (2008) Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling* 24:11–22. doi: 10.1080/08927010701784912
- LeVine H (1995) Thioflavine T interaction with amyloid β -sheet structures. *Amyloid* 2:1–6. doi: 10.3109/13506129509031881
- Lewis K (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochem* 70:267–274. doi: 10.1007/s10541-005-0111-6
- Li Y-H, Tian X (2012) Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)* 12:2519–38. doi: 10.3390/s120302519
- Liang Z, Li W, Yang S, Du P (2010) Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere* 81:626–632. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.03.043
- Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ (2015) Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr*. doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014
- Lis H, Sharon N (1998) Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev* 98:637–674. doi: 10.1021/cr940413g
- López D, Vlamakis H, Kolter R (2010) Biofilms.

- Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton WF (2000) A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 21:3673–83. doi: 10.1002/1522-2683(200011)21:17<3673::AID-ELPS3673>3.0.CO;2-M
- Lu TK, Collins JJ (2007) Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11197–202. doi: 10.1073/pnas.0704624104
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ (2009) Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathog* 5:e1000354. doi: 10.1371/journal.ppat.1000354
- Mackintosh JA, Veal DA, Karuso P (2005) Fluoroprofile, a fluorescence-based assay for rapid and sensitive quantitation of proteins in solution. *Proteomics* 5:4673–4677. doi: 10.1002/pmic.200500095
- Madslie E, Olsen J, Granum P, Blatny J (2012) Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. *BMC Microbiol* 12:230.
- Maina NH, Tenkanen M, Maaheimo H, Juvonen R, Virkki L (2008) NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*. *Carbohydr Res* 343:1446–55. doi: 10.1016/j.carres.2008.04.012
- Mann EE, Wozniak DJ (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev* 36:893–916. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x
- Marcato-Romain CE, Pechaud Y, Paul E, Girbal-Neuhauser E, Dossat-Létisse V (2012) Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. *Biofouling* 28:305–314. doi: 10.1080/08927014.2012.673122
- Marchal F, Robert H, Merbahi N, Fontagné-Faucher C, Yousfi M, Romain CE, Eichwald O, Rondel C, Gabriel B (2012) Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure. *J Phys D Appl Phys* 45:345202. doi: 10.1088/0022-3727/45/34/345202
- Marchal F, Robert H, Merbahi N, Randrianjatovo I, Martino P, Yousfi M, Neuhauser E (2013) *Scientia Research Library Journal of Engineering And Technology Research* Atmospheric cold plasmas for biofilm inactivation : does biofilm extracellular matrix limit the bactericidal process ? 1:123–135.
- Martí M, Trotonda MP, Tormo-Más MA, Vergara-Irigaray M, Cheung AL, Lasa I, Penadés JR (2010) Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* 12:55–64. doi: 10.1016/j.micinf.2009.10.005
- Martinez KA, Kitko RD, Mershon JP, Adcox HE, Malek KA, Berkmen MB, Slonczewski JL (2012) Cytoplasmic pH response to acid stress in individual cells of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* observed by fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl Environ Microbiol* 78:3706–14. doi: 10.1128/AEM.00354-12
- Marvasi M, Visscher PT, Casillas Martinez L (2010) Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis* : polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 313:1–9.
- Mashburn-Warren L, Morrison DA, Federle MJ (2010) A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Mol Microbiol* 78:589–606. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07361.x

- Matsukawa M, Greenberg EP (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 186:4449–56. doi: 10.1128/JB.186.14.4449-4456.2004
- McMANUS JFA, CASON JE (1950) Carbohydrate histochemistry studied by acetylation techniques. *J Exp Med* 91:651–4.
- McSwain BS, Irvine RL, Hausner M, Wilderer PA (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl Environ Microbiol* 71:1051–7. doi: 10.1128/AEM.71.2.1051-1057.2005
- Méchin L, Dubois-Brissonnet F, Heyd B, Leveau JY (1999) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecyldimethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells. *J Appl Microbiol* 86:859–866. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00770.x
- Mishra M, Byrd MS, Sergeant S, Azad AK, Parsek MR, McPhail L, Schlesinger LS, Wozniak DJ (2012) *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cell Microbiol* 14:95–106. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01704.x
- Mohammed MMA, Nerland AH, Al-Haroni M, Bakken V (2013) Characterization of extracellular polymeric matrix, and treatment of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* biofilms with DNase I and proteinase K.
- Molobela IP, Cloete TE, Beukes M (2010) Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African J Microbiol Res* 4:1515–1524.
- Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006) Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. *Microbiology* 152:2801–2807.
- Moritz CP, Marz SX, Reiss R, Schulenburg T, Friauf E (2013) Epicocconone staining: a powerful loading control for Western blots. *Proteomics* 162–168. doi: 10.1002/pmic.201300089
- Nagant C, Pitts B, Stewart PS, Feng Y, Savage PB, Dehaye J-P (2013) Study of the effect of antimicrobial peptide mimic, CSA-13, on an established biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen* 2:318–325. doi: 10.1002/mbo3.77
- Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Anal Biochem* 177:244–249. doi: 10.1016/0003-2697(89)90046-8
- Neu TR, Lawrence JR (2014) Investigation of Microbial Biofilm Structure by Laser Scanning Microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. doi: 10.1007/10_2014_272
- Neu TR, Lawrence JR (2015) Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol* 23:233–42. doi: 10.1016/j.tim.2014.12.010
- Neu TR, Swerhone GDW, Lawrence JR (2001) Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology* 147:299–313. doi: 10.1099/00221287-147-2-299
- Neyret C, Herry J-M, Meylheuc T, Dubois-Brissonnet F (2014) Plant-derived compounds as natural

- antimicrobials to control paper mill biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:87–96. doi: 10.1007/s10295-013-1365-4
- Nguyen UT, Burrows LL (2014) DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int J Food Microbiol* 187:26–32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.025
- Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink AL (2001) Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism†. *Biochemistry* 40:6036–6046. doi: 10.1021/bi002555c
- Nijland R, Hall MJ, Burgess JG (2010) Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PLoS One* 5:e15668. doi: 10.1371/journal.pone.0015668
- Nilsson MR (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 34:151–160. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012>
- Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ (2001) Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 183:1047–57. doi: 10.1128/JB.183.3.1047-1057.2001
- Noble JE, Bailey MJA (2009) Quantitation of protein. *Methods Enzymol* 463:73–95. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1
- Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO (2013) Structural Stability of *Burkholderia cenocepacia* Biofilms Is Reliant on eDNA Structure and Presence of a Bacterial Nucleic Acid Binding Protein. *PLoS One* 8:e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629
- Novotny LA, Jurcisek JA, Ward MO, Jordan ZB, Goodman SD, Bakaletz LO (2015) Antibodies against the majority subunit of type IV Pili disperse nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms in a LuxS-dependent manner and confer therapeutic resolution of experimental otitis media. *Mol Microbiol* 96:276–92. doi: 10.1111/mmi.12934
- Nur A, Hirota K, Yumoto H, Hirao K, Liu D, Takahashi K, Murakami K, Matsuo T, Shu R, Miyake Y (2013) Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm. *J Appl Microbiol* 115:260–70. doi: 10.1111/jam.12202
- O’Nuallain B, Wetzel R (2002) Conformational Abs recognizing a generic amyloid fibril epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1485–90. doi: 10.1073/pnas.022662599
- Okshevsky M, Meyer RL (2014) Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *J Microbiol Methods*. doi: 10.1016/j.mimet.2014.07.010
- Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL (2015) Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol* 33:73–80. doi: 10.1016/j.copbio.2014.12.002
- Oliveira R, Marques F, Azeredo J (1999) Purification of polysaccharides from a biofilm matrix by selective precipitation of proteins. *Biotechnol Tech* 13:391–393. doi: 10.1023/A:1008954301470
- Oosthuizen MC, Steyn B, Theron J, Cosette P, Lindsay D, von Holy A, Brozel VS (2002) Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* during Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 68:2770–2780. doi: 10.1128/AEM.68.6.2770-2780.2002
- Ostrowski A, Mehert A, Prescott A, Kiley TB, Stanley-Wall NR (2011) *YuaB* functions synergistically with the exopolysaccharide and *TasA* amyloid fibers to allow biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *J*

Bacteriol 193:4821–4831. doi: 10.1128/JB.00223-11

- Otzen D, Nielsen PH (2008) We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol Life Sci* 65:910–27. doi: 10.1007/s00018-007-7404-4
- Paddock SW (2000) Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. *Mol Biotechnol* 16:127–149. doi: 10.1385/MB:16:2:127
- Paddock SW (1999) Confocal laser scanning microscopy. *Biotechniques* 27:992–1004.
- Pan X, Liu J, Zhang D, Chen XI, Li L, Song W, Yang J (2010) A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using three-dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water SA* 36:111–116. doi: 10.4314/wsa.v36i1.50914
- Paravastu AK, Leapman RD, Yau W-M, Tycko R (2008) Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18349–54. doi: 10.1073/pnas.0806270105
- Parker C, Sperandio V (2009) Cell-to-cell signalling during pathogenesis.
- Parrado J, Rodriguez-Morgado B, Tejada M, Hernandez T, Garcia C (2014) Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme Microb Technol* 57:1–7. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.01.001
- Parsek MR, Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci* 97:8789–8793. doi: 10.1073/pnas.97.16.8789
- Pasvolsky R, Zakin V, Ostrova I, Shemesh M (2014) Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of *Bacillus* species. *Int J Food Microbiol* 181:19–27. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.013
- Pavlovsky L, Younger JG, Solomon MJ (2013) In situ rheology of *Staphylococcus epidermidis* bacterial biofilms. *Soft Matter* 9:122–131. doi: 10.1039/C2SM27005F
- Pechaud Y, Marcato-Romain CE, Girbal-Neuhauser E, Queinnec I, Bessiere Y, Paul E (2012) Combining hydrodynamic and enzymatic treatments to improve multi-species thick biofilm removal. *Chem Eng Sci* 80:109–118. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2012.06.014>
- Pellicer-Nàcher C, Domingo-Félez C, Mutlu AG, Smets BF (2013) Critical assessment of extracellular polymeric substances extraction methods from mixed culture biomass. *Water Res.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.026>
- Pellicer-Nàcher C, Smets BF (2014) Structure, composition, and strength of nitrifying membrane-aerated biofilms. *Water Res* 57:151–61. doi: 10.1016/j.watres.2014.03.026
- Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW (2012) A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen* 20:647–57. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x
- Pierre G, Graber M, Rafiliposon BA, Dupuy C, Orvain F, De Crignis M, Maugard T (2012) Biochemical composition and changes of extracellular polysaccharides (ECPS) produced during microphytobenthic biofilm development (Marennes-Oléron, France). *Microb Ecol* 63:157–69. doi: 10.1007/s00248-011-9959-8

- Pierre Lembre CL and PDM (2012) The Complex World of Polysaccharides. InTech
- Priester JH, Olson SG, Webb SM, Neu MP, Hersman LE, Holden PA (2006) Enhanced Exopolymer Production and Chromium Stabilization in *Pseudomonas putida* Unsaturated Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 72:1988–1996.
- Qin L, Kida Y, Imamura Y, Kuwano K, Watanabe H (2013) Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lower virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Chemother* 19:261–71. doi: 10.1007/s10156-012-0495-3
- Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D (2007) Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 153:2083–2092. doi: 10.1099/mic.0.2007/006031-0
- Quilès F, Humbert F, Delille A (2010) Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 75:610–6. doi: 10.1016/j.saa.2009.11.026
- Quintas V, Tomàs I, Prada-Lopez I (2014) Analyzing the oral biofilm using fluorescence-based microscopy: what's in a dye? In: *Microsc. Adv. Sci. Res. Educ.* (pp. 226-238). http://www.researchgate.net/profile/Inmaculada_Tomas_Carmona/publication/267101101_Analyzing_the_oral_biofilm_using_fluorescence-based_microscopy_what's_in_a_dye/links/5446028c0cf2d62c304d8cb1.pdf. Accessed 30 Nov 2015
- Randrianjatovo I, Girbal-Neuhauser E, Marcato-Romain C-E (2015) Epicocconone, a sensitive and specific fluorescent dye for in situ quantification of extracellular proteins within bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:4835–44. doi: 10.1007/s00253-015-6570-9
- Randrianjatovo-Gbalou I, Marcato-Romain C-E, Girbal-Neuhauser E (2015) Quantification of amyloid fibrils using size exclusion chromatography coupled with online fluorescence and ultraviolet detection. *Anal Biochem* 488:19–21. doi: 10.1016/j.ab.2015.07.014
- Ras M, Girbal-Neuhauser E, Paul E, Lefebvre D (2008a) A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresour Technol* 99:7464–71. doi: 10.1016/j.biortech.2008.02.025
- Ras M, Girbal-Neuhauser E, Paul E, Spérandio M, Lefebvre D (2008b) Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Res* 42:1867–1878. doi: 10.1016/j.watres.2007.11.011
- Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Hamelin J, Bernet N, Paul E, Girbal-Neuhauser E (2013) Distribution and hydrophobic properties of Extracellular Polymeric Substances in biofilms in relation towards cohesion. *J Biotechnol* 165:85–92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.03.001>
- Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Paul E, Girbal-Neuhauser E (2011) Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res* 45:1529–1538. doi: 10.1016/j.watres.2010.11.021
- Raunkjær K, Hvitved-Jacobsen T, Nielsen PH (1994) Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Res* 28:251–262. doi: 10.1016/0043-1354(94)90261-5
- Renner LD, Weibel DB (2011) Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* 36:347–355. doi: 10.1557/mrs.2011.65

- Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS, Bayles KW (2007) The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8113–8. doi: 10.1073/pnas.0610226104
- Robert H, Gabriel V, Fontagné-Faucher C (2009) Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int J Food Microbiol* 135:53–59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.006
- Rochex A, Lebeault JM (2007) Effects of nutrients on biofilm formation and detachment of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine. *Water Res* 41:2885–2892. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.041>
- Romero D (2013) Bacterial determinants of the social behavior of *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* 164:788–98. doi: 10.1016/j.resmic.2013.06.004
- Romero D, Aguilar C, Losick R, Kolter R (2010) Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc Natl Acad Sci* 107:2230–2234.
- Romero D, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2011) An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Mol Microbiol* 80:1155–1168.
- Römling U (2002) Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res. Microbiol.* 153:205–212.
- Rondel C, Marcato-Romain C-E, Girbal-Neuhauser E (2013) Development and validation of a colorimetric assay for simultaneous quantification of neutral and uronic sugars. *Water Res* 47:2901–8. doi: 10.1016/j.watres.2013.03.010
- Roux D, Cywes-Bentley C, Zhang Y-F, Pons S, Konkol M, Kearns DB, Little DJ, Howell PL, Skurnik D, Pier GB (2015) Identification of Poly- N- acetylglucosamine as a Major Polysaccharide Component of the *Bacillus subtilis* Biofilm Matrix. *J Biol Chem* 290:19261–19272. doi: 10.1074/jbc.M115.648709
- Saidi N, Kouki S, Mehri I, Ben Rejeb A, Belila A, Hassen A, Ouzari H (2011) Biofilm and siderophore effects on secondary waste water disinfection. *Curr Microbiol* 63:337–40. doi: 10.1007/s00284-011-9983-4
- Saldaña Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Girón JA (2009) Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ Microbiol* 11:992–1006. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01824.x
- Sanchez Z, Tani A, Kimbara K (2013) Extensive reduction of cell viability and enhanced matrix production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 flow biofilms treated with a D-amino acid mixture. *Appl Environ Microbiol* 79:1396–9. doi: 10.1128/AEM.02911-12
- Sandberg ME, Schellmann D, Brunhofer G, Erker T, Busygin I, Leino R, Vuorela PM, Fallarero A (2009) Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. *J Microbiol Methods* 78:104–106. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.04.014>
- Sandle T (2013) *Bacterial Adhesion: An Introduction*.
- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LAH, Davies DG, Gilbert P (2004) Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm. *J Bacteriol* 186:7312–7326.
- Sawyer EB, Claessen D, Gras SL, Perrett S (2012) Exploiting amyloid: how and why bacteria use cross-β

- fibrils. *Biochem. Soc. Trans.* 40:728–734.
- Schmitt J, Flemming H-C (1998) FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *Int Biodeterior Biodegradation* 41:1–11. doi: 10.1016/S0964-8305(98)80002-4
- Schnabel J (2011) Amyloid: little proteins, big clues. *Nature* 475:S12–4. doi: 10.1038/475S12a
- Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ (2009) Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 191:4097–102. doi: 10.1128/JB.00717-08
- Schwartz K, Syed AK, Stephenson RE, Rickard AH, Boles BR (2012) Functional amyloids composed of phenol soluble modulins stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog* 8:e1002744. doi: 10.1371/journal.ppat.1002744
- Seminara A, Angelini TE, Wilking JN, Vlamakis H, Ebrahim S, Kolter R, Weitz DA, Brenner MP (2012) Osmotic spreading of *Bacillus subtilis* biofilms driven by an extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1116–21. doi: 10.1073/pnas.1109261108
- Seviour T, Hansen SH, Yang L, Yau YH, Wang VB, Stenvang MR, Christiansen G, Marsili E, Givskov M, Chen Y, Otzen DE, Nielsen PH, Geifman-Shochat S, Kjelleberg S, Dueholm MS (2015) Functional amyloids keep quorum-sensing molecules in check. *J Biol Chem* 290:6457–69. doi: 10.1074/jbc.M114.613810
- Sheng G-P, Yu H-Q, Li X-Y (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol Adv* 28:882–894. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>
- Sheng G-P, Yu H-Q, Yue Z-B (2005) Production of extracellular polymeric substances from *Rhodospseudomonas acidophila* in the presence of toxic substances. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:216–22. doi: 10.1007/s00253-005-1990-6
- Shih IL, Van YT, Yeh LC, Lin HG, Chang YN (2001) Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresour Technol* 78:267–272. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00027-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00027-X)
- Shrivastava A, Gupta V (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci* 2:21. doi: 10.4103/2229-5186.79345
- Shukla SK, Rao TS (2013) Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: A confocal laser scanning microscopic study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 103:448–454. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.11.003
- Shumi W, Kim SH, Lim J, Cho K-S, Han H, Park S (2013) Shear stress tolerance of *Streptococcus mutans* aggregates determined by microfluidic funnel device (μ FFD). *J Microbiol Methods* 93:85–9. doi: 10.1016/j.mimet.2013.02.004
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Römling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53:1123–34. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x
- Simões M, Simões LC, Vieira MJ (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci Technol* 43:573–583. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>
- Simon S, Païro B, Villain M, D'Abzac P, Van Hullebusch E, Lens P, Guibaud G (2009) Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances

- (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresour Technol* 100:6258–68. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.013
- Singh R, Shivaprakash MR, Chakrabarti A (2011) Biofilm formation by zygomycetes: quantification, structure and matrix composition. *Microbiology* 157:2611–8. doi: 10.1099/mic.0.048504-0
- Slepecky R, Hemphill HE The Genus *Bacillus*—Nonmedical. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. Springer US, pp 530–562
- Steinberg N, Kolodkin-Gal I (2015) The Matrix Reloaded: Probing the Extracellular Matrix Synchronizes Bacterial Communities. *J Bacteriol* JB.02516–14. doi: 10.1128/JB.02516-14
- Steinberg TH, Elena Chernokalskaya, Berggren K, Lopez MF, Diwu Z, Haugland RP, Patton WF (2000) Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain. *Electrophoresis* 21:486–496. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000201)21:3<486::AID-ELPS486>3.0.CO;2-Q [pii]\r10.1002/(SICI)1522-2683(20000201)21:3<486::AID-ELPS486>3.0.CO;2-Q
- Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I (2002) Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29:361–7. doi: 10.1038/sj.jim.7000282
- Stöver AG, Driks A (1999) Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J Bacteriol* 181:1664–1672. doi: [PubMed: 10049401]
- Strathmann M, Wingender J, Flemming H-C (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* 50:237–248. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00032-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00032-5)
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273:729–739. doi: 10.1006/jmbi.1997.1348
- Sutherland I (2001a) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02012-1
- Sutherland IW (2001b) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3–9.
- Swartjes JJTM, Das T, Sharifi S, Subbiahdoss G, Sharma PK, Krom BP, Busscher HJ, van der Mei HC (2013) A Functional DNase I Coating to Prevent Adhesion of Bacteria and the Formation of Biofilm. *Adv Funct Mater* 23:2843–2849. doi: 10.1002/adfm.201202927
- Swinger KK, Rice PA (2004) IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr Opin Struct Biol* 14:28–35. doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.003
- Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2009) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar Freshw Res* 60:1201. doi: 10.1071/MF08258
- Talaga P, Vialle S, Moreau M (2002) Development of a high-performance anion-exchange chromatography with pulsed-amperometric detection based quantification assay for pneumococcal polysaccharides and conjugates. *Vaccine* 20:2474–2484. doi: 10.1016/S0264-

- Tang L, Schramm A, Neu TR, Revsbech NP, Meyer RL (2013) Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. *FEMS Microbiol Ecol* 86:n/a–n/a. doi: 10.1111/1574-6941.12168
- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N (2004) Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 72:6032–6039. doi: 10.1128/IAI.72.10.6032-6039.2004
- Tetz G V., Artemenko NK, Tetz V V. (2009) Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1204–1209. doi: 10.1128/AAC.00471-08
- Thomas VL, Sanford B a., Moreno R, Ramsay M a. (1997) Enzyme-linked lectinsorbent assay measures N-acetyl-D-glucosamine in matrix of biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Curr Microbiol* 35:249–254. doi: 10.1007/s002849900248
- 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* 188:2681–91. doi: 10.1128/JB.188.7.2681-2691.2006
- Thorn DC, Meehan S, Sunde M, Rekas A, Gras SL, MacPhee CE, Dobson CM, Wilson MR, Carver JA (2005) Amyloid Fibril Formation by Bovine Milk κ -Casein and Its Inhibition by the Molecular Chaperones α S- and β -Casein†. *Biochemistry* 44:17027–17036. doi: 10.1021/bi051352r
- Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151:1313–1323. doi: 10.1099/mic.0.27701-0
- Tischler AD, Camilli A (2004) Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 53:857–69. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04155.x
- Todar K (2012) Review of the Todar's Online Textbook of bacteriology. In: *Sci. Mag. Vol 304* 1421. <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>. Accessed 30 Nov 2015
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I (2001) The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol* 67:4538–4545. doi: 10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001
- Torres C, Lenon G, Craperi D, Wilting R, Blanco Á (2011) Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:95–103. doi: 10.1007/s00253-011-3305-4
- Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L (2012) Identification of Proteins Associated with the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Extracellular Matrix. *J Proteome Res* 11:4906–4915. doi: 10.1021/pr300395j
- Tremblay YDN, Lamarche D, Chever P, Haine D, Messier S, Jacques M (2013) Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J Dairy Sci* 96:234–246. doi: 10.3168/jds.2012-5795
- Tuchscher LPN, Buzzola FR, Alvarez LP, Caccuri RL, Lee JC, Sordelli DO (2005) Capsule-negative *Staphylococcus aureus* induces chronic experimental mastitis in mice. *Infect Immun* 73:7932–7. doi: 10.1128/IAI.73.12.7932-7937.2005

- Turovskiy Y, Kashtanov D, Paskhover B, L. Chikindas M (2007) Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between. *Adv Appl Microbiol* 62:191–234.
- Tycko R (2004) Progress towards a molecular-level structural understanding of amyloid fibrils. *Curr Opin Struct Biol* 14:96–103. doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.002
- Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ (2006) Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ Microbiol* 8:1997–2011. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01080.x
- Väisänen OM, Nurmiäho-Lassila EL, Marmo SA, Salkinoja-Salonen MS (1994) Structure and Composition of Biological Slimes on Paper and Board Machines. *Appl Environ Microbiol* 60:641–653.
- Valle J, Latasa C, Gil C, Toledo-Arana A, Solano C, Penadés JR, Lasa I (2012) Bap, a biofilm matrix protein of *Staphylococcus aureus* prevents cellular internalization through binding to GP96 host receptor. *PLoS Pathog* 8:e1002843. doi: 10.1371/journal.ppat.1002843
- Van den Driessche F, Rigole P, Brackman G, Coenye T (2014) Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *J Microbiol Methods* 98:31–4. doi: 10.1016/j.mimet.2013.12.011
- Vernaglia BA, Huang J, Clark ED (2004) Guanidine hydrochloride can induce amyloid fibril formation from hen egg-white lysozyme. *Biomacromolecules* 5:1362–70. doi: 10.1021/bm0498979
- Verneuil L, Silvestre J, Randrianjatovo I, Marcato-Romain C-E, Girbal-Neuhauser E, Mouchet F, Flahaut E, Gauthier L, Pinelli E (2015) Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N Y* 88:113–125. doi: 10.1016/j.carbon.2015.02.053
- Vilain S, Pretorius JM, Theron J, Brözel VS (2009) DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75:2861–8. doi: 10.1128/AEM.01317-08
- Villain M, Simon S, Bourven I, Guibaud G (2010) The use of a new mobile phase, with no multivalent cation binding properties, to differentiate extracellular polymeric substances (EPS), by size exclusion chromatography (SEC), from biomass used for wastewater treatment. *Process Biochem* 45:1415–1421. doi: 10.1016/j.procbio.2010.05.018
- Villena GK, Fujikawa T, Tsuyumu S, Gutiérrez-Correa M (2010) Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresour Technol* 101:1920–6. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.036
- Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R (2013a) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11:157–168.
- Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Losick R, Kolter R, Hera V, Yunrong C, Pascale B, Richard L, Roberto K (2013b) Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11:157–168. doi: 10.1038/nrmicro2960
- Walker JM (1994) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 32:5–8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5
- Wang H, Wilksch JJ, Strugnell RA, Gee ML (2015a) Role of Capsular Polysaccharides in Biofilm

- Formation: An AFM Nanomechanics Study. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:13007–13. doi: 10.1021/acsami.5b03041
- Wang S, Liu X, Liu H, Zhang L, Guo Y, Yu S, Wozniak DJ, Ma LZ (2015b) The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep* 7:330–40. doi: 10.1111/1758-2229.12252
- Wang X, Preston JF, Romeo T (2004) The pgaABCD Locus of *Escherichia coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. *J Bacteriol* 186:2724–2734. doi: 10.1128/JB.186.9.2724-2734.2004
- Wang Y, Li C, Gao C, Ma C, Xu P (2014) Genome Sequence of the Nonpathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Strain ATCC 15442. *Genome Announc* 2:e00421–14. doi: 10.1128/genomeA.00421-14
- Waterborg JH, Matthews HR (1984) The lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1:1–3. doi: 10.1385/1-59259-169-8:7
- Watnick PI, Fullner KJ, Kolter R (1999) A Role for the Mannose-Sensitive Hemagglutinin in Biofilm Formation by *Vibrio cholerae* El Tor -- Watnick et al. 181 (11): 3606 -- *The Journal of Bacteriology*. *J Bacteriol* 181:3606–9.
- Webster P, Wu S, Gomez G, Apicella M, Plaut AG, St Geme JW (2006) Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Histochem Cytochem* 54:829–842. doi: 10.1369/jhc.6A6922.2006
- Wei Q, Ma LZ (2013) Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Sci.* 14:20983–21005.
- Wetzel R (2006) Kinetics and thermodynamics of amyloid fibril assembly. *Acc. Chem. Res.* 39:671–679.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487
- Wöhlbrand L, Trautwein K, Rabus R (2013) Proteomic tools for environmental microbiology--a roadmap from sample preparation to protein identification and quantification. *Proteomics* 13:2700–30. doi: 10.1002/pmic.201300175
- Wong E, Vaaje-Kolstad G, Ghosh A, Hurtado-Guerrero R, Konarev P V., Ibrahim AFM, Svergun DI, Eijsink VGH, Chatterjee NS, van Aalten DMF (2012) The *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA possesses a modular structure that governs binding to different host surfaces. *PLoS Pathog.* doi: 10.1371/journal.ppat.1002373
- Wozniak DJ, Wyckoff TJO, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsek MR (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7907–12. doi: 10.1073/pnas.1231792100
- Wu J, Xi C (2009) Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. *Appl Environ Microbiol* 75:5390–5395. doi: 10.1128/AEM.00400-09
- Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, Otto M, Gao Q (2006) Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 74:488–496. doi: 10.1128/IAI.74.1.488-496.2006
- Yamada A, Tamura H, Kato H (2009) Identification and characterization of an autolysin gene, atlg, from *Streptococcus sobrinus*. *FEMS Microbiol Lett* 291:17–23. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01426.x

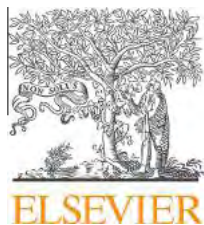
- Yangtse W, Zhou Y, Lei Y, Qiu Y, Wei X, Ji Z, Qi G, Yong Y, Chen L, Chen S (2012) Genome sequence of *Bacillus licheniformis* WX-02. *J Bacteriol* 194:3561–2. doi: 10.1128/JB.00572-12
- Yi K, Rasmussen AW, Gudlavalleti SK, Stephens DS, Stojiljkovic I (2004) Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* 72:6132–8. doi: 10.1128/IAI.72.10.6132-6138.2004
- You WW, Haugland RP, Ryan DK (1997) 3-(4-Carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoproteins in solution. *Anal Biochem* 244:277–82. doi: 10.1006/abio.1996.9920
- Zafra O, Lamprecht-Grandío M, de Figueras CG, González-Pastor JE (2012) Extracellular DNA release by undomesticated *Bacillus subtilis* is regulated by early competence. *PLoS One* 7:e48716. doi: 10.1371/journal.pone.0048716
- Zandomenighi G, Krebs MRH, McCammon MG, Fändrich M (2004) FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci* 13:3314–3321. doi: 10.1110/ps.041024904
- Zeng G, Vad BS, Dueholm MS, Christiansen G, Nilsson M, Tolker-Nielsen T, Nielsen PH, Meyer RL, Otzen DE (2015) Functional bacterial amyloid increases *Pseudomonas* biofilm hydrophobicity and stiffness. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2015.01099
- Zhou Y, Smith D, Leong BJ, Brännström K, Almqvist F, Chapman MR (2012) Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. *J Biol Chem* 287:35092–35103. doi: 10.1074/jbc.M112.383737
- Zippel B, Neu TR (2011) Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectin-binding analysis. *Appl Environ Microbiol* 77:505–516. doi: 10.1128/AEM.01660-10
- Zogaj X, Nitz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39:1452–1463. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x
- Zou Y, Hao W, Li H, Gao Y, Sun Y, Ma G (2014) New Insight into Amyloid Fibril Formation of Hen Egg White Lysozyme Using a Two-Step Temperature-Dependent FTIR Approach. *J Phys Chem B*. doi: 10.1021/jp504201k
- Zuriaga-Agustí E, Bes-Piá A, Mendoza-Roca JA, Alonso-Molina JL (2013) Influence of extraction methods on proteins and carbohydrates analysis from MBR activated sludge flocs in view of improving EPS determination. *Sep Purif Technol* 112:1–10. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.048>

Liste des abréviations

ADNe	ADN extracellulaire
AFM	Atomic Force Microscope
Aβ	Amyloid β
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed InfraRed (Spectroscopy)
AHL	Acyl-Homosérine lactone
CER	Cation Exchange Resin (Résine Echangeuse d'ions)
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
ConA	Concanavaline A
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindole
DNase	Désoxyribonucléase
ePS	Exopolysaccharides
ePN	Exoprotéines
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ELLA	Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay
EPS	Exopolysaccharides composant la matrice extracellulaire de <i>Bacillus subtilis</i>
FA	Fibres amyloïdes
FTIR	Fourier Transformed InfraRed (Spectroscopy)
FLBA	Fluorescence Lectin Binding Analysis
G6PDH	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamine
γ-PGA	Gamma-Poly-Glutamate
κ-CN	kappa-caséine
NAG	N-Acetyl-Glucosamine
PAS	Periodic Acid Schiff
RFU	Relative Fluorescence Unit
SEM/MEB	Scanning Electron Microscope/Microscope Electronique à Balayage
SEP	Substances ExoPolymériques
US	Ultrasons
WGA	Wheat Germ Agglutinin

Annexe 1 :

Article publié en co-auteur, suite à une collaboration avec le Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement (EcoLab, ENSAT, INP, UPS, UMR CNRS 5245, Castanet-Tolosan) de l'Université Toulouse III.

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbon

Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue

Laurent Verneuil ^{a,b}, Jérôme Silvestre ^{a,b,c}, Irina Randrianjatovo ^d,
 Claire-Emmanuelle Marcato-Romain ^d, Elisabeth Girbal-Neuhauser ^d,
 Florence Mouchet ^{a,b,c}, Emmanuel Flahaut ^{c,e,f}, Laury Gauthier ^{a,b,c}, Eric Pinelli ^{a,b,c,*}

^a EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement), ENSAT, INP, UPS, Université de Toulouse, UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France

^b CNRS, EcoLab, Castanet Tolosan, France

^c Laboratoire Commun NAUTILE (CNRS, UPS, INPT, ARKEMA), Laboratoires EcoLab, CIRIMAT, GRL, France

^d LBAE (Laboratoire de Biotechnologies Agro-alimentaire et Environnementale), Université de Toulouse, UPS EA 4565, Institut Universitaire de Technologie, 24 Rue d'Embaquès, 32000 Auch, France

^e Institut Carnot CIRIMAT (Centre Inter-Universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux), Université de Toulouse, INP, UPS, UMR CNRS 5085, Toulouse, France,

^f CNRS, Institut Carnot CIRIMAT, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2014

Accepted 13 February 2015

Available online 2 March 2015

ABSTRACT

The present study assessed the effects of double-wall carbon nanotubes (DWCNTs) dispersed in the presence of a realistic concentration of natural organic matter (NOM, 10 mg L⁻¹) on the benthic diatom *Nitzschia palea* using toxicity tests and quantitative/qualitative extracellular polymeric substances (EPS) assays. No toxic effect was observed. A growth delay was measured after 48 h of exposure to concentrations of DWCNTs ranging from 1 mg L⁻¹ (~29%) to 50 mg L⁻¹ (~84%). Extracellular carbohydrates and proteins were extracted using a sequential multi-methods protocol to collect soluble, hydrophobic and ion-bridged extracellular polymeric substances (EPS). Extracted EPS were analyzed by colorimetric assays and size exclusion chromatography. The results highlighted a higher EPS concentration in exposed cultures that was primarily caused by an overproduction of protein-like polymers (protein or glycoproteins, PLPs). Such EPS overproduction and increase in proteins/carbohydrates ratio can partially explain the observed growth inhibition. EPS were preferentially extracted using hydrophobic conditions and were mainly composed of PLPs with either low (10 kDa) or high (174 kDa) molecular weights. These data highlights the affinity between DWCNTs and EPS, which is primarily driven by both physical and hydrophobic interactions. This indicates that *N. palea* can respond to DWCNTs by forming an EPS network optimized for adhering to and efficiently wrapping DWCNTs.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author at: EcoLab (Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle et Environnement), ENSAT, INP, UPS, Université de Toulouse, UMR CNRS 5245, Castanet Tolosan, France.

E-mail address: pinelli@ensat.fr (E. Pinelli).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>

0008-6223/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

After more than two decades of research and improvements in production processes, manufactured carbon nanotubes (CNTs) have found many applications in various fields. CNTs are already used in electronics, semiconductors, chemicals, polymers, batteries, capacitors, energy, medical, composites, aerospace and defense [1,2]. They are generally grouped into two classes: single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). Among the latter, double-wall carbon nanotubes (DWCNTs) are composed of only two walls, which confer to them intermediate properties [3]. Although their production remains lower than that of MWCNTs, DWCNTs present great interest to high-tech industries that supply nanoprobes or develop composite reinforcements, energy storage media, displays, touch screens, and other electronic devices [4]. They are also of particular interest for biomedical applications [5,6]. Considering their increased uses, sooner or later CNTs will be present in substantial concentrations in the environment [7] and especially in aquatic ecosystems, which are known to concentrate many contaminants. CNTs are presumed to be non-degradable in aqueous environments [8,9] or only slightly in the presence of specific bacterial species and after long term exposure [10]. Thus, CNTs, similar to other carbonaceous nanomaterial such as fullerenes, graphene and diamonds, might remain for prolonged periods of time and strongly accumulate in aquatic media. This makes CNTs particular interesting in the study of the effects of nanostructures on organisms. However, due to the strong physical interactions of CNTs with organisms, their interference with assays or labeling, and their strong light absorption, it is difficult to assess the effect of CNTs or to identify involved mechanisms using standard toxicological assays [11,12]. Although not properly a toxic effect, the shading of photosynthetic organisms that CNTs can cause at high concentrations can also increase the globally observed inhibition of growth, especially in the case of strong adherence to organisms [13–15]. The dispersion of organic compounds such as organic matter also alters the aggregation behavior of nanoparticles in surface water and potentially their interaction with organisms [16]. An underestimation of CNTs properties and dispersion can lead to the misestimating of real toxic effects. Several recent studies point in that direction, highlighting an increased or mitigated effect of CNTs when dispersed by organic compounds such as natural organic matter (NOM) [15,17–19]. This emphasizes the importance of testing the effects of nanoparticles in environmentally relevant conditions.

Low depth aquatic environments are colonized by many benthic microorganisms that form biofilms. At the base of aquatic food chains, these organisms play a key role for many primary consumers. Numerous benthic aquatic microorganisms produce extracellular polymeric substances (EPS). These EPS are mainly composed of carbohydrates and proteins and have different roles in the environment. They are primarily used by benthic microorganisms for their aggregation and grip to substrates. This feature is known to play an important role for sediment aggregation in natural

environments driven by EPS production [20,21]. The mesh formed by these EPS also allows for the retention of exo-enzymes or cellular metabolites and nutrient sequestration from the aquatic environment [24]. They may be partially recycled by organisms using it as a nutrient storage area [25]. Finally, they provide protection against different biocides [22,23], and against nanoparticles or ions that they release [26,27]. Among benthic photosynthetic microorganisms, diatoms often represent the main component of photo-autotrophic biofilms and are ubiquitous in low depth aquatic environments. This makes them responsible for more than 25% of the worldwide primary production [28]. Moreover, diatoms possess a silicified cell wall called a frustule, which confers protection against environmental dangers such as abrasion [29]. The frustule of some species also presents nano-metric pores which can partially or completely prevent the internalization of nanoparticles [27,30]. These features make them of particular interest for toxicity tests and understanding toxicity mechanisms [31].

In a previous study [27] we highlighted the strong interaction between multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and the extracellular polymeric substances (EPS) produced by the benthic diatoms *Nitzschia palea* (Kützing) W.Smith (*N. palea*). It was hypothesized that EPS conferred an efficient protection against MWCNTs to benthic diatoms and that an energetic trade-off could be made by *N. palea* by switching energetic allocation from growth to protection via EPS production. This could explain the growth inhibition often measured only at early stages of exposure [14,27]. In this study, the toxicity of DWCNTs dispersed by an environmentally relevant amount of NOM (as it commonly happens in rivers and lakes) on the common freshwater diatom *N. palea* was assessed, focusing on growth inhibition, viability and the photochemical quantum yield of photosystem II. This work was also interested in how the presence of DWCNTs can affect EPS production, focusing on the secretion of proteins and carbohydrates and using both colorimetric assay and size exclusion chromatography. Finally, the nature of the interaction between DWCNTs and EPS were specified using a sequential extraction protocol enabling the distinct disruption of weak bounds, hydrophobic bonds, and ionic bridges.

2. Experimental methods

2.1. Diatoms strain and cultures

The axenic benthic diatom *N. palea* (CPC-160; *N. palea*) was purchased from the Canadian phycological culture center (University of Waterloo, Waterloo, ON, Canada). Cultures were grown in CHU No. 10 basic medium (CHU10) ($6.4 < \text{pH} < 6.6$) (<http://uwaterloo.ca/canadian-phycologicalculture-centre/cultures/culture-media/chu-10>). All bioassays were performed in a growth room at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ on a rotary shaker at 90 rpm under a light/dark regime of 16 h/8 h provided by high pressure sodium lamps (VIALOX[®] NAV[®] (SON) SUPER 4Y[®], 600 W, OSRAM GmbH) with a luminous intensity of 1300 cd. The media was always renewed 72 h before the experiments and prior to preparing the inoculum. All manipulations during

the experiments were carried out under a class II microbiological safety cabinet (Faster BHA 36, Faster s.r.l, Cornaredo (MI) Italy).

2.2. Natural organic matter and DWCNT suspensions

Suwannee River natural organic matter (NOM; Cat. No. 1R101N) was purchased from the International Humic Substances Society (IHSS, St. Paul, MN, USA). Prior the beginning of the experiments, NOM was hydrated with CHU10 for 1 h before being filtered (0.1- μm ; Minisart high flow polyether-sulfone membrane; SARTORIUS-STEDIM biotech).

DWCNTs were synthesised at the Inter-University Center for Research and Materials Engineering (Institut Carnot CIRIMAT, Toulouse, France) by CCVD synthesis. The CNTs fraction contained DWCNTs ($\sim 80\%$), SWCNTs ($\sim 15\%$), and MWCNTs ($\sim 5\%$) [3]. Their length was between 1 and $>100 \mu\text{m}$ with an outer diameter of between 1 and 3 nm (determined by transmission electron microscopy) for a surface area of $980 \text{ m}^2/\text{g}$ (determined using Brunauer, Emmett and Teller theory). The samples exhibited a Raman spectroscopy I_d/I_g ratio of 0.24 ± 0.05 in (Fig. 1a; \pm indicates the standard deviation; Horiba Jobin Yvon LabRAM HR800 Raman micro-spectrometer at 633 nm, red laser excitation, He/Ne).

The dry sample was composed (mass fraction) of carbon ($92.13 \pm 0.46\%$) cobalt ($3 \pm 0.15\%$), molybdenum ($0.9 \pm 0.04\%$) and iron ($0.04 \pm 0.004\%$) [32].

Four DWCNT suspensions (0.167 , 1.67 , 16.7 , 83.5 mg L^{-1}) were made using CHU10 from a stock suspension which was first sonicated for 1 h (BRANSON digital sonifier S-250D; 200 W; amplitude: 35% 5 s/2 s). NOM (16.7 mg L^{-1}) followed by addition of the DWCNT suspensions, which were then sonicated again for 20 min. These solutions were diluted in culture or CHU10 to obtain exposure concentrations of 0.1, 1, 10 and 50 mg L^{-1} of DWCNTs and 10 mg L^{-1} of NOM. At this environmentally relevant concentration [33], NOM strongly coated both the individual and bundled DWCNTs (Fig. 1b and c). As assessed by optical density, the suspensions appeared stable for $0.1\text{--}1 \text{ mg L}^{-1}$ while sedimentation occurred quickly from 10 mg L^{-1} ($<1 \text{ h}$). Sonication did not cause disruption of the DWCNTs (determined by transmission electronic microscopy and Raman analyses; Fig. 1a and c). The detectable CHU10-soluble metallic residues released by DWCNTs 50 mg after 48 h were cobalt ($33.56 \pm 0.18 \mu\text{g L}^{-1}$), molybdenum ($222.78 \pm 1.85 \mu\text{g L}^{-1}$) and iron ($176.41 \pm 43.3 \mu\text{g L}^{-1}$) (inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS; Agilent-7500ce, Agilent Technologies, Palo, CA).

2.3. Growth and toxicity tests

2.3.1. Exposure strategy

The toxicity of DWCNTs was assessed by determining the effects on growth, photochemical quantum yield of photosystem II, and viability. These tests were carried using the same device as used in a previous study [27]. Briefly, two stacked 12-well plates allowed for the assessment of the total exposure effect, providing an estimation of shading using DWCNT suspensions as external filters. Lower plates were inoculated with 1 mL per well of *N. palea* suspensions ($2.5 \cdot 10^5 \text{ cells/mL}$) and were grown for 24 h in culture conditions but without

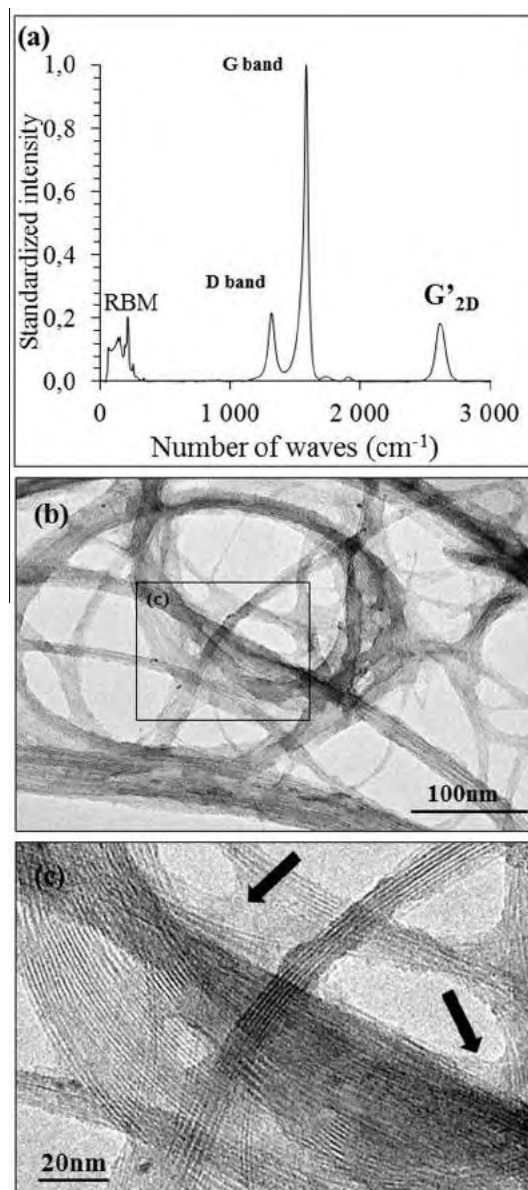


Fig. 1 – (a) Raman spectra of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs). In the upper right, the D-band is normalized with respect to the intensity of the G-band intensity of the same spectra. (b) General transmission electron microscopy view of DWCNTs after drying the DWCNT suspension (10 mg L^{-1}) dispersed with natural organic matter (NOM; 10 mg L^{-1}). (c) A magnified view of (b) highlighting the affinity of NOM for DWCNTs. Arrows indicate the presence of NOM. Image of DWNTC without NOM is given in [Supplementary material 1](#).

shaking. This step allowed the diatoms to adhere, recover their growth and reach the exponential phase. Then, the bottom wells were filled with DWCNT suspensions (1.5 mL), obtaining final DWCNT concentrations of 0.1, 1, 10 and 50 mg L^{-1} or with CHU10 + NOM for controls and shading tests. Upper plates were prepared following the same protocol but the wells were filled using CHU10 + NOM for exposure

tests and with DWCNT suspensions for shading tests, which used external light filters. The rest of the wells were filled with CHU10 to obtain the same final volume in each well. One plate per condition was prepared for the control and for exposure to each concentration of DWCNTs.

2.3.2. Growth tests

Shading caused by DWCNTs was assessed by measuring photosynthetically active radiation (PAR; Li-250A light meter equipped with Li-COR Quantum sensor; Li-COR Biosciences, San Diego, CA) under the upper plates of the shaded plates at the beginning of the test. At 48 and 144 h, 3 wells per plates were scraped, sampled and fixed in formaldehyde 3.6%. The algal concentrations were determined using a Malassez cell counter performing two counts per well. Significant differences between conditions were determined by one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey HSD post hoc tests using the statistical open source software “R” (SSR; R Development Core team 2012, Bio-RAD, Charlottesville, VA). At 48 h of exposure during exponential growth of control cultures, the effective concentrations of 50% (EC_{50}) were determined with the Excel[®] macro REGTOX 7.0.3 (copyright© 2001, Eric Vindimian) using the Hill model. The 95% confidence intervals for the EC_{50} values were calculated by bootstrap simulations ($n = 500$). The correlation between PAR and growth inhibition was assessed using Pearson’s correlation test.

2.3.3. Viability tests

The lethal effect of CNTs was assessed under fluorescent microscopy using Sytox green[®]. This dye only penetrates injured or dead cells and labels their nuclei while it is excluded from entering healthy cells. After 48 h of exposure, a part of the living samples from the growth tests were incubated for 10 min in Sytox green (120 nM in dimethylsulfoxide) and then observed using a fluorescence microscope (BX-41, Olympus, Center Valley, PA) equipped with an Hg lamp (U-LH100HG, Olympus, Center Valley, PA) using a 470–490 nm/520 nm excitation/emission filter and a 500 nm dichromatic filter (U-MNB2, Olympus, Center Valley, PA). The concentration of dye was calibrated to allow for efficient labeling without significant interference caused by DWCNTs [34]. Significant differences were assessed using non-parametric Kruskal–Wallis analysis of variance.

2.3.4. Effect on photosynthesis

The effects of DWCNTs on photosynthesis was evaluated after 48 h of exposure by pulse amplitude modulation (PAM) using a Phyto-PAM (Heinz Waltz GmbH, Effeltrich, Germany) to establish the effective quantum yield of photochemical energy conversion in photosystem II (PSII). This method determines electron transfer efficiency along the photosynthetic chain by establishing the ratio of emitted photons to chlorophyll-absorbed photons after an illumination pulse. The higher the value for PSII, the more efficient the electron transfer is and the less it is impacted by a pollutant. Measurements were done after 30 min in the dark. Significant differences between conditions were determined by Kruskal–Wallis analysis of variance.

2.4. Extracellular polymeric substances assays

2.4.1. Culture and extraction protocols

This experiment was conducted in plastic flasks (Corning[®] cell culture flasks Ref. 431080, surface area 175 cm², Corning Tewksbury MA, USA). Flasks were first inoculated with 100 mL of *N. palea* suspension (2.5 cell mL⁻¹) and grown for 24 h (at 20 ± 1 °C) without shaking. Then, DWCNT suspensions (150 mL) were added to cultures at concentrations of 0, 1.67, 16.7 mg L⁻¹ to reach final concentrations in the flask of 0 mg L⁻¹ (control), 1 and 10 mg L⁻¹, respectively. After 8 days of exposure, the samples reached the stationary phase and similar algal concentrations in all assessed conditions. The biofilms were scraped and vigorously shaken and centrifuged. EPS were then extracted following the multi-methods sequential protocol previously described by Ras et al. [35], but without sonication to prevent diatom lysis. One extraction sequence involving three steps was applied in sequence with intermediate centrifugations (3200g; 10 min) to collect the supernatants, which contained the solubilized EPS. Pellets were first incubated for 1 h at 20 °C in 20 mL of phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. The recovered pellet was then incubated in 4 mL PBS containing Tween[®] 20 (0.25%) for 1 h at 20 °C. The third extraction step was performed using 4 mL of the cationic chelator EDTA (1% EDTA in Tris–HCl 0.3 mol L⁻¹, pH 8.5) for 1 h at 20 °C. Supernatants were stocked at 4 °C (<24 h) before analyses. The remaining pellets (EPS residues + cells + DWCNTs) were diluted in 20 mL of PBS before quantification of the residual fraction (cellular content + EPS residues).

Each extraction step was done under gentle agitation using a rotary disc shaker. This separation method allowed for the isolation of EPS that was linked to DWCNTs through (i) weak bonds ($H_2O_{\text{extract}} + PBS_{\text{extract}}$), (ii) hydrophobic bonds ($TWEEN_{\text{extract}}$) and (iii) ionic bridges ($EDTA_{\text{extract}}$). Samples of pellets were obtained at the end of the extraction before quantification of the residual fraction, and the efficiency of extraction was controlled by light microscopy using Alcian blue as an EPS labeler [25]. Cellular integrity was controlled at the same time as described in the viability tests section.

2.4.2. Proteins and carbohydrates quantification

Carbohydrate measurements were performed for each extract by the anthrone method [34,36]. 200 µL of anthrone reagent (2% in 96% sulfuric acid) was added to 100 µL of each extracted sample in 96-well plates. The mixtures were then incubated at 60 °C for 60 min and then cooled at room temperature for 10 min before light absorbance was measured at 620 nm using a microplate reader (FLUOstar, BGM Labtech, Orthenberg, Germany). Glucose was used as standard.

Proteins were measured using the bicinchoninic acid (BCA) reagent (Sigma–Aldrich). A 25 µL assay sample was added to 200 µL of BCA reagent in a microplate. When samples contained EDTA, a 20 µL assay sample was added to 1 mL of BCA reagent to avoid underestimation of the protein content due to chelation between EDTA and the Cu²⁺ contained in the BCA reagent. Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard [37]. Absorbance was measured at 560 nm with a microplate reader (FLUOstar, BMG Labtech, Orthenberg, Germany).

The background signals of the DWCNT suspensions were always removed. No significant interference of the DWCNTs or of NOM was observed on reagents (anthrone and BCA) at the tested concentrations (data not shown). Significant differences between conditions were determined using SSR by analyses of variance (ANOVA) following by Tukey HSD post hoc when significance was observed. Correlations between DWCNT concentrations and measured protein and carbohydrate contents were determined by Pearson correlation tests when significant differences were observed.

2.4.3. Extracellular polymeric substances size distribution

The size of EPS was determined using high performance liquid chromatography (HPLC; AKTA Purifier, GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) equipped with a 500 μ L injection loop. Size exclusion chromatography was performed using a 24 mL column containing 13 μ m of a spherical composite matrix of cross-linked agarose and dextran with a separation range of 10,000–600,000 Da (Superdex 200 10/300 GL column; AKTA GE Healthcare, Fairfield, CT, USA). Absorbance was measured at 210 nm (non-specific absorbance) and 280 nm (absorbance specific to cyclic amino acids). The values of the extracting solutions (PBS, TWEEN[®] 0.25% in PBS and EDTA, 1% in Tris-HCl) were removed from the various extract signals. The sizes of the extracted molecules were calculated from a calibration curve obtained using a mix of different proteins (dextran blue: 2106 kDa, thyroglobulin: 669 kDa, ferritin: 440 kDa, conalbumin: 75 kDa, ovalbumin: 44 kDa, carbon anhydrase: 29 kDa, ribonuclease: 13.7 kDa, aprotinin: 6.5 kDa) according to the following equation: $y = 4 \cdot 10^8 \cdot x^{-5.876}$; $R^2 = 0.996$, where y is in Da and x is in mL (peak elution volume). Due to the risk of contamination by DWCNTs, the first peak corresponding to the large-sized molecules ($>2 \cdot 10^6$ Da) was not considered.

2.5. Scanning electron microscopy

Interactions between DWCNTs and the biofilm of *N. palea* were investigated by field effect gun scanning electron microscopy (SEM) focusing on the adherence of DWCNTs to the biofilm.

N. palea was grown in the same devices as those used for toxicity tests but with glass coverslips placed at the depth of well. After 48 h of exposure to DWCNTs_{10mg}, the samples were fixed (Sigma-Aldrich, France) as described in [27]. Briefly, this process consisted of a 24 h fixation in a solution of 0.1% Alcian blue (No. CAS: 33864-99-2), acetic acid (0.5 M), paraformaldehyde (2%) and glutaraldehyde (2%) buffered using sodium cacodylate (0.15 M), followed by a subsequent 2 h post-fixation in a solution of potassium ferro-cyanide (1.5%) and OsO₄ (1%) buffered by cacodylate. After rinsing, the samples were dehydrated in an ascending ethanol gradient before being dried under N₂ flux at room temperature. They were finally placed on SEM mounts and platinum-coated before observation (JEOL JSM-6700F, 3 kV, Tokyo, Japan).

3. Results

3.1. Toxicity tests

The results of the growth inhibition test are summarized in Table 1.

48 h of direct exposure to DWCNTs led to significant inhibition of growth at concentrations ranging from DWCNTs_{1mg} (~30%) to DWCNTs_{50mg} (~85%). The 48 h EC₅₀ was 7.5 mg L⁻¹ (at a 95% confidence interval of 3.9/13.3). Moreover, the inhibition was not significantly correlated with PAR (cor = 0.55; $p = 0.06$). The shading effect on growth was only significant at concentrations ranging from DWCNTs_{10mg} (~20%) to DWCNTs_{50mg} (~40%). It corresponds to the two DWCNT concentrations where PAR significantly decreased relative to the control. Furthermore, inhibition in the shading tests was positively correlated with a decrease in PAR (cor = 0.86; $p < 0.001$). This was not the case for the direct exposure tests (cor = 0.54; $p = 0.07$). After 144 h, the inhibition of growth was only significant for cultures directly exposed to DWCNTs_{50mg} (~30%) indicating only a partial recovery of growth while all other conditions exhibited a complete growth recovery over the considered period. DWCNTs_{50mg} did not induce mortality ($6.63 \pm 2.17\%$; \pm indicates the standard deviation) compared to control ($7.37 \pm 1.1\%$). The PSII quantum yield was also

Table 1 – Summarized results of the toxicity tests. The first four lines represent the inhibition of growth (%) under direct exposure or shading. 48 h-EC₅₀ is the exposure concentration of DWCNTs that caused 50% inhibition of growth after 48 h of direct exposure (during the exponential phase). 48 h-PSII are the values of the photochemical quantum yield of photosystem II after 48 h of direct exposure to DWCNTs. Finally, the PAR values represent the photosynthetic active radiation received by diatoms after passing through DWCNT suspensions. Gray values indicate the standard deviation. For any considered line, two groups without any letters in common are significantly different ($p < 0.05$).

	Control		DWCNT _{0.1mg}		DWCNT _{1mg}		DWCNT _{10mg}		DWCNT _{50mg}						
48 h exposure (%)	0	a	13.7	8	a	29.2	1	b	46.4	3	c	84.1	10	d	
48 h shading (%)	0	a	3.9	5	a	-1.0	0.3	a	21.5	7	b	40.6	17	b	
144 h exposure (%)	0	a	-4.0	4	a	2.0	5	a	7.0	2	a	27.4	2	b	
144 h shading (%)	0	a	1.0	1	a	3.3	4	a	-3.5	3	a	-3.2	3	a	
48 h-EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	7.5 (95% confidence interval: 3.9/13.3)														
PSII quantum yield	0.63	0.01	a	0.66	0.01	a	0.66	0.02	a	0.66	0.01	a	0.64	0.01	a
PAR (μ moles s ⁻¹ m ⁻² μ A)	23.9	1.5	a	21.9	1.4	a	23.7	1.3	a	17.3	1.3	b	14.9	3.4	b

unaffected by the presence of DWCNTs regardless of the concentration and always exhibited value of 0.65 ± 0.01 .

3.2. Quantification of carbohydrate and protein contents of extracted EPS

After extraction with the multi-methods protocol, carbohydrates and proteins composing the total extracted EPS were quantified using colorimetric assays (Fig. 2).

Proteins were significantly higher for samples exposed to DWCNTs (control: $31.23 \pm 3.84 \text{ mg L}^{-1}$; DWCNTs_{1mg}: $49.95 \pm 6.86 \text{ mg L}^{-1}$ and DWCNTs_{10mg}: $49.06 \pm 6.49 \text{ mg L}^{-1}$) and no significant difference was revealed between the two tested concentrations (\pm indicates the standard deviation). On the other hand, the carbohydrate assays showed no difference regardless of the DWCNT concentration tested (control: $13.72 \pm 4.13 \text{ mg L}^{-1}$, DWCNTs_{1mg}: $12.6 \pm 3.33 \text{ mg L}^{-1}$ and DWCNTs_{10mg}: $15.46 \pm 3.3 \text{ mg L}^{-1}$). Thus, in the absence of DWCNTs, the total amount of extracted EPS was $44.95 \pm 5.3 \text{ mg L}^{-1}$ and corresponded to a proteins/carbohydrates ratio of 2.27. After exposure to DWCNTs_{1mg} and DWCNTs_{10mg}, the EPS amounts were 62.56 ± 5.26 and $65.14 \pm 5.02 \text{ mg L}^{-1}$ and corresponded to increased proteins/carbohydrates ratios of 3.96 and 3.05, respectively.

3.3. Characterization of extracted EPS by size exclusion HPLC

Global (210 nm) and protein (280 nm) profiles of the different EPS fractions (PBS_{extract}, TWEEN_{extract}, and EDTA_{extract}) extracted from the control, DWCNT_{1mg} and DWCNT_{10mg} cultures were analyzed by size exclusion HPLC (Fig. 3).

Each fraction exhibited singular profiles and exposure to DWCNTs with affected peak amplitudes rather than molecular weight distributions. Indeed, PBS_{extract} profiles at 210 nm

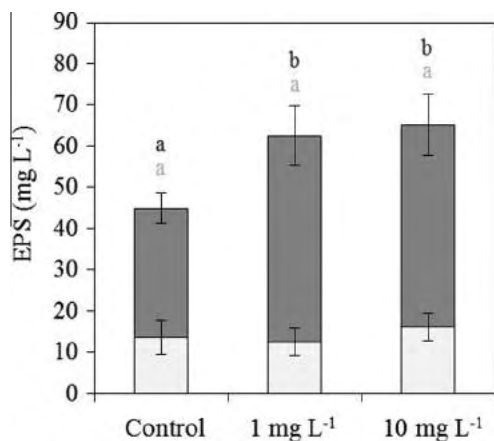


Fig. 2 – Results of the assays measuring total amounts of carbohydrates (anthrone test) and protein-like polymers (BCA test) depending on the DWCNT concentration. Dark bars are proteins (in an equivalent amount of bovine serum albumin) and bright are carbohydrates (in an equivalent amount of glucose). Two groups without any letter in common are significantly different ($p < 0.05$). The details of each fraction are given in Fig. 4.

(Fig. 3a) showed three main peaks in the control and treated cultures (elution volume: Ev = 19.7 mL ~ 10 kDa, 22.05 mL ~ 5 kDa, 24.6 mL ~ 3 kDa). Meanwhile, the protein profile of the PBS_{extract} at 280 nm (Fig. 3d) showed one peak (Ev = 19.7 mL) with a similar area for the three analyzed PBS extracts. The TWEEN_{extract} profiles at 210 nm (Fig. 3b) showed six major peaks occupying the same positions on the chromatographs for different conditions (Ev = 11.2 mL ~ 273.4 kDa, 12.1 mL ~ 174 kDa, 16.1 mL ~ 32 kDa, 19.7 mL ~ 10 kDa, 22.7 mL ~ 4 kDa, 24.6 mL ~ 3 kDa) but with different amplitudes. This was especially the case for DWCNTs_{10mg}, in which the peaks that eluted between 16 and 23 mL were strongly increased. Among these, only two peaks were present at 280 nm (12.1 mL ~ 174 kDa and 19.7 mL ~ 10 kDa; Fig. 3e), suggesting that they were mainly composed of protein-like polymers (proteins or glycoproteins, PLPs) with either high or low molecular weights. Finally, the EDTA_{extract} profiles showed four distinct peaks at 210 nm (Ev = 13.5 mL ~ 91 kDa, 15.6 mL ~ 39 kDa, 25.7 mL ~ 1 kDa; Fig. 3c). At 280 nm, only two peaks (15.6 mL ~ 39 kDa; 19.7 mL ~ 10 kDa; Fig. 3f) were detected with higher amplitudes in the DWCNTs_{10mg} extract compared to the control and DWCNTs_{1mg} chromatographs. A Tris-EDTA signal between ~20 and 24 mL was over the detection limit and was not considered.

3.4. Chemical interaction between EPS and DWCNT

A multi-method extraction processed allowed for the fractionation of EPS according to chemical and physical interactions within the biofilm. The collected EPS fractions can be divided according to their interactions with DWCNTs: (i) weakly linked (H₂O_{extract} + PBS_{extract}), (ii) linked by hydrophobic bonds (TWEEN_{extract}), and (iii) linked by ionic bridges (EDTA_{extract}). Fig. 4 shows the quantitative distribution of carbohydrates and proteins in the recovered fractions after incubation in the absence (control) or in the presence of DWCNTs_{1mg} and DWCNTs_{10mg}.

The weakly bounded EPS fraction (Fig. 4a) showed no significant difference in either the carbohydrate or protein secretion ($p > 0.05$) between the three tested conditions. The TWEEN_{extract} contained a significantly higher concentration of carbohydrates in DWCNT_{10mg} ($p < 0.01$) than either the control or DWCNTs_{1mg} (Fig. 4b). Moreover, the concentrations of carbohydrates and DWCNTs were positively correlated ($\text{cor} = 0.88$; $p = 0.001$). The protein contents of TWEEN_{extract} were significantly different under all conditions and were also strongly correlated ($\text{cor} = 0.92$; $p < 0.001$) with the DWCNT concentration. EDTA_{extract} exhibited no difference or correlation regardless of the concentration of DWCNTs (Fig. 4c). The residual fractions (EPS residues + cellular content + DWCNTs) were also assessed. Neither carbohydrates (control: $1.07 \pm 0.11 \text{ pg cell}^{-1}$, DWCNTs_{1mg}: $1.20 \pm 0.16 \text{ pg cell}^{-1}$, DWCNTs_{10mg}: $1.32 \pm 0.21 \text{ pg cell}^{-1}$) nor proteins (control: $6.13 \pm 0.1 \text{ pg cell}^{-1}$, DWCNTs_{1mg}: $6.51 \pm 0.91 \text{ pg cell}^{-1}$, DWCNTs_{10mg}: $5.99 \pm 2.05 \text{ pg cell}^{-1}$) were significantly different between the different conditions. In addition, Alcian blue staining did not reveal any remaining EPS at the end of the extraction. There was also no difference in mortality between the three conditions tested (results not shown).

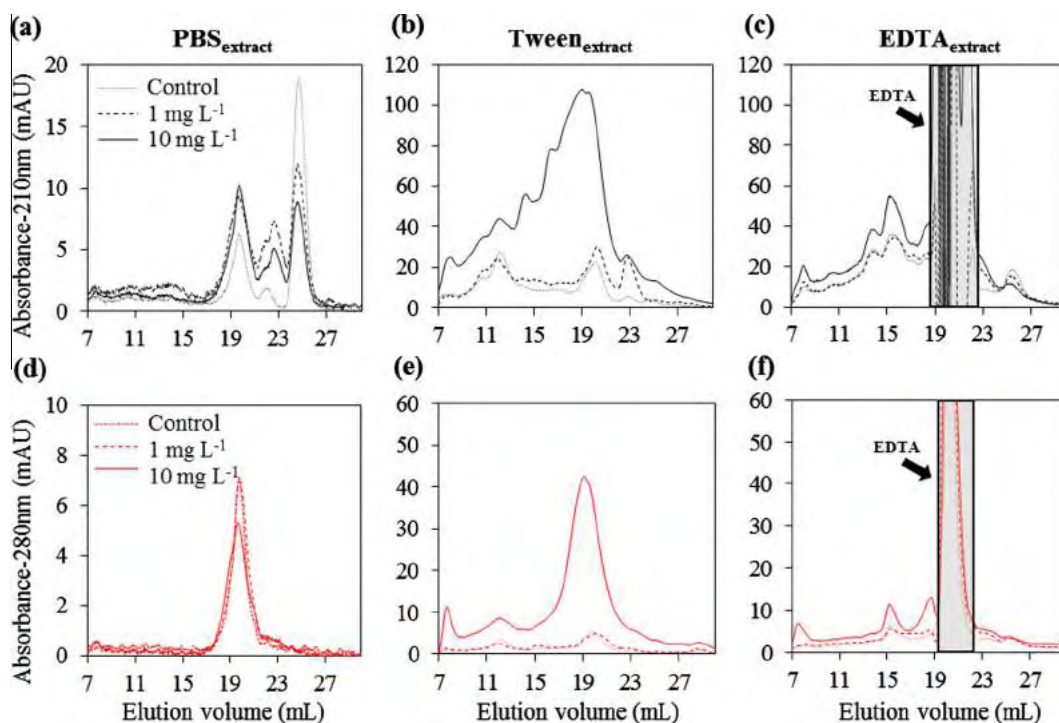


Fig. 3 – Size exclusion high precision liquid chromatography (HPLC) profiles of EPS extracted with (a) and (d) phosphate buffer saline ($\text{PBS}_{\text{extract}}$); (b) and (e) TWEEN 20 ($\text{TWEEN}_{\text{extract}}$); and, (c) and (f) Tris–EDTA ($\text{EDTA}_{\text{extract}}$). (a)–(c) Are nonspecific absorbance profiles at 210 nm showing both carbohydrates and protein-like polymers, while (d)–(f) are absorbance profiles at 280 nm showing only protein-like polymers. Samples from the $\text{TWEEN}_{\text{extract}}$ and $\text{EDTA}_{\text{extract}}$ were 5 times more concentrated than those of the $\text{PBS}_{\text{extract}}$ (cf. Experimental Methods). Note that in (c) and (f), the peak starting at 19.6 corresponds to EDTA and not an extracted molecule. The first peak (~ 8 mL) from each condition corresponds to large molecules or the assembly of molecules (or, potentially, remaining DWCNTs) that were excluded from the column.

3.5. Physical interaction between DWCNTs and biofilm

Fixation of EPS followed by SEM was implemented to visualize the interaction between the biofilm and DWCNTs (Fig. 5).

Fig. 5a shows a picture from the control culture revealing the thin EPS network produced by *N. palea*. Fig. 5b shows the biofilm exposed to $\text{DWCNTs}_{10\text{mg}}$, emphasizing a strong disruption of the EPS network in the presence of DWCNTs. However, no interaction between the frustule and DWCNTs was shown. A higher magnification (Fig. 5c) revealed DWCNT bundles inside the disrupted EPS. This picture also shows the strong affinity of EPS for DWCNTs, which was mostly coated by EPS.

4. Discussion

4.1. Toxicity of DWCNT

In this study, both the effects of direct exposure to DWCNTs and shading using DWCNTs as an external filter on *N. palea* growth were evaluated. DWCNTs toxicity was assessed using assays measuring the decreases in viability and PSII quantum yield. The results summarized in Table 1 are close to those previously obtained for the effect of MWCNTs on *N. palea* using identical experimental conditions [27]. After 48 h, externally shaded cultures showed a growth inhibition only from $\text{DWCNTs}_{10\text{mg}}$ ($\sim 22\%$) to $\text{DWCNTs}_{50\text{mg}}$ ($\sim 41\%$), which is well-

correlated with PAR decreases ($\text{DWCNTs}_{10\text{mg}} \sim 27\%$; $\text{DWCNTs}_{50\text{mg}} \sim 37\%$; $\text{cor} = 0.86$; $p < 0.001$). Over the same time period, direct exposure to 1 mg L^{-1} ($\sim 30\%$) to 50 mg L^{-1} ($\sim 84\%$) of DWCNTs resulted in a significant and dose-dependent growth inhibition. Even though this result was not significantly correlated with a PAR decrease ($\text{cor} = 0.54$; $p = 0.07$), a shading effect resulting from the agglomeration of DWCNTs to algae cannot be excluded at low concentrations and might partially act in the observed growth inhibition [38,39]. In contrast, after 6 days (144 h) of direct exposure, cultures entirely recovered their growth rate in the range of DWCNTs 0.1 mg to DWCNTs 10 mg. This recovery was partial with DWCNTs 50 mg ($\sim 30\%$). This temporary growth inhibition of algae has been frequently observed in the presence of CNTs and is generally explained by the agglomeration of CNTs facilitated by their specific affinity and the molecules produced by exposed organisms, which both decrease the interaction of CNTs with surfaces over time [14,40]. Finally, shaded cultures completely caught up their growth and presented a similar concentration of diatoms to the controls in stationary phase. Thus, in our experimental conditions, the PAR decreases caused by the highest concentrations of DWCNTs only limited cell division. This could also partially explain the growth recovery in the direct exposure tests. The presence of metallic impurities is occasionally put forward to explain the observed toxicity during exposure to CNTs [41,42]. In this study, concentrations of metal ions in

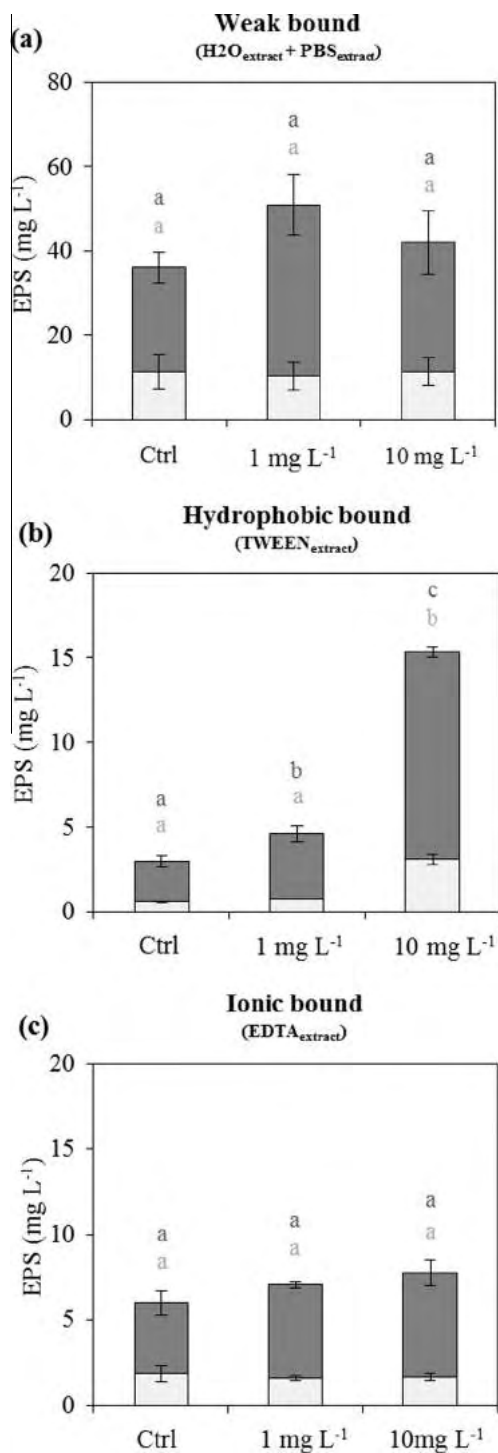


Fig. 4 – Results from the colorimetric assays of each extracted fraction ranked by bonding properties. (a) Weak or mechanical bonds between DWCNTs and organisms ($H_2O_{\text{extract}} + PBS_{\text{extract}}$). (b) Linked by hydrophobic bound ($TWEEN_{\text{extract}}$). (c) Linked by ionic bridges ($EDTA_{\text{extract}}$). Error bars indicate the standard deviation. For each graph, two groups without any letter in common are significantly different ($p < 0.05$). Global concentrations of extracted EPS (obtained from the addition of these different fractions) are given in Fig. 2.

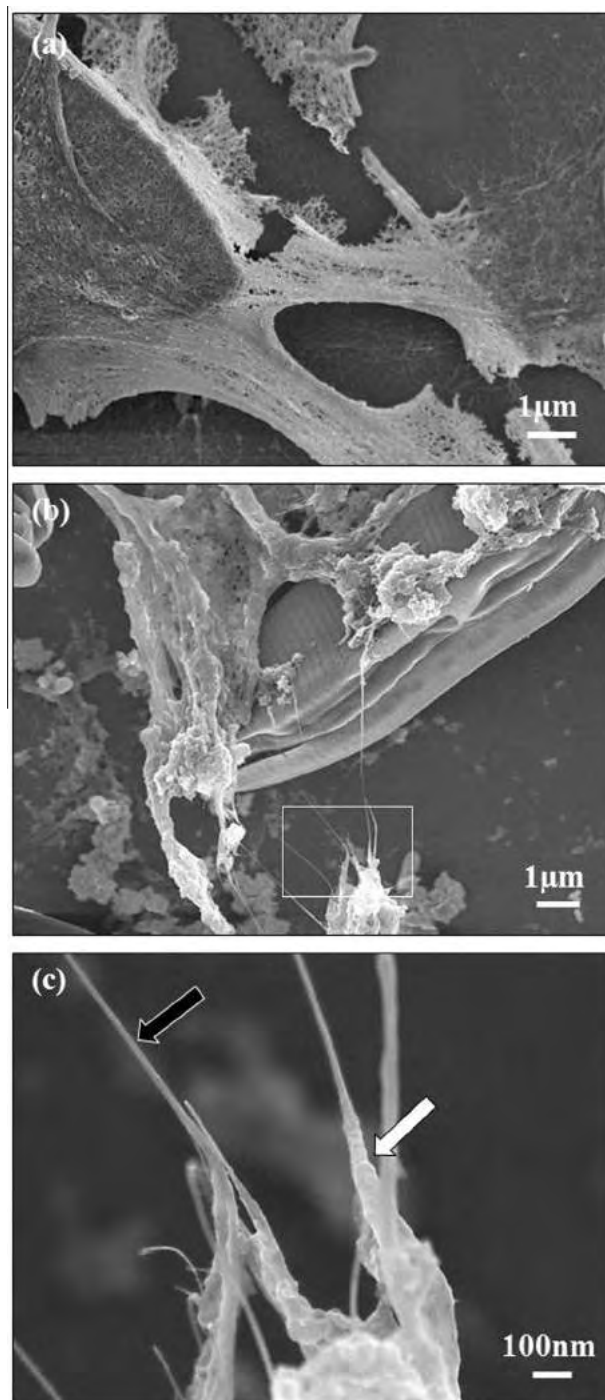


Fig. 5 – Scanning electron microscopy observations of (a) the control biofilm and (b) the biofilm exposed to 10 mg L^{-1} of double-walled carbon nanotubes (DWCNTs). (c) A magnified view of (b) highlighting the thin interactions between EPS and DWCNTs and the disrupted aspects of EPS in the presence of DWCNTs. The black arrow indicates a DWCNT bundle. The white arrow shows EPS wrapping around a bundle of DWCNTs.

solution from the DWCNT suspensions were ten times lower for cobalt ($\sim 34 \mu\text{g L}^{-1}$) and forty times lower for molybdenum ($\sim 222 \mu\text{g L}^{-1}$) than those causing effects on various unicellular

green algae and diatoms [43–45]. The iron content of the DWCNT_{50mg} solution was only increased by ~7% compared to the amount inherent to the CHU10 concentration (2.5 mg L⁻¹). Moreover, metallic particles were mainly embedded inside carbon shells which avoid direct interaction with organisms. Finally, no increase in mortality or decrease in PSII quantum yield was observed (Table 1). These results highlight a delaying effect of DWCNTs on the growth of *N. palea* rather than a toxic effect.

4.2. DWCNT effect on EPS production and possible involvement in growth delay

The effects of DWCNTs on EPS production by *N. palea* was assessed using anthrone (carbohydrates) and BCA (proteins) colorimetric assays performed on extracted EPS fractions. Unlike what is generally reported in the literature but has already been highlighted by some authors [46,47], this study found that protein was actually the primary part of extracted EPS. Thus, this fraction of EPS should always be considered in future studies dealing with the EPS of diatoms.

In this study, the data revealed a higher EPS production in cultures exposed to DWCNTs (Fig. 2), indicating that the amount of EPS produced by microorganisms can be driven by environmental conditions [35,48,49]. EPS allows for the adherence of benthic organisms to substrates. EPS secretions are also known to decrease water turbidity by aggregating suspended particles while allowing for the movement of diatoms to brighter areas [20,50,51]. In this work, the overproduction of EPS could therefore lead to decreased turbidity of the medium, increasing the catching efficiency of DWCNTs by the biofilm. It can also reflect the efficiency of the diatoms to move in an attempt to reach brighter areas while leaving behind the DWCNTs-adhered areas. EPS are also known to protect organisms from particulate abrasion [22,29] and against many biocides [23]. Some authors highlighted an enhanced resistance of bacteria against TiO₂ and silver nanoparticles conferred by an overproduction of EPS [52,53]. In the present study, EPS could perform the same function against the DWCNTs by covering them, reducing the possibility of direct contact between the DWCNTs and cells, as already reported by some authors [14,27,40,54] and highlighted by SEM (Fig. 5). Another interesting finding is that the overproduction of EPS was similar between DWCNTs_{1mg} and DWCNTs_{10mg}. On the one hand, it cannot be excluded that the decrease in PAR from DWCNTs_{10mg} could have limited the photosynthetic activity and thus EPS production [55,56]. On the other hand, this result suggests that *N. palea* responded in a massive way from exposure to DWCNTs_{1mg} to both limit its contact with particles and to improve the brightness of the water column [55]. Despite the energetic cost, this response may constitute a considerable benefit in this case. From an adaptive perspective, the overproduction of EPS can provide maximum protection from weaker doses of CNTs. Some diatoms are also known to use extracellular carbohydrates as an energy reserve, and can use a portion of the carbohydrates produced on a daily basis to ensure the continuity of growth and cell function during the night [25,56]. However, interactions between DWCNTs and EPS might limit carbohydrate recycling during the night. The fact that the

amounts of extracted carbohydrates were similar between the three assessed conditions suggests that DWCNTs did not appreciably limit the EPS recycling.

Finally, the overproduction of EPS could explain the higher growth delay observed in the 48 h cultures directly exposed to DWCNTs_{0.1mg} and DWCNTs_{1mg} while neither a decrease in growth or in PAR were observed in the shaded cultures. Even if we cannot rule out the underestimation of the shading effect from the external filters, the energetic cost of EPS overproduction could at least partially explain the observed inhibition of directly exposed cells. From the growth inhibition results (Table 1) and EPS production (Fig. 2), the energy expenditure related to the overproduction of EPS seems to be responsible for ~100% of the growth inhibition in diatoms in direct contact with DWCNTs_{1mg} whereas only ~60% of the growth inhibition in DWCNTs_{10mg} is linked to EPS overproduction and ~40% is due to shading. These estimates are consistent with other works on *Chlorella* sp. exposed to MWCNTs [40] but are different from other studies [15] in which the inhibition by shading during exposure was considered to be ~67%. This study underlines a potential additive effect of two mechanisms that are responsible for the temporary growth inhibition of *N. palea* when directly exposed to DWCNTs: (i) the energy cost of EPS overproduction, which can cause the agglomeration of MWCNTs both to themselves and to organisms, and (ii) the shading caused by MWCNTs.

4.3. DWCNT effect on EPS distribution

Analysis of the different EPS fractions by size exclusion chromatography revealed three distinct profiles with peak amplitudes related to the concentrations of DWCNTs (Fig. 3). This result, as well as those of the EPS assays (Fig. 2), indicates that in the presence of DWCNTs, *N. palea* can increase EPS production (specifically PLPs) without strongly changing the size of molecules produced. In the PBS_{extract}, four separate peaks were detected at 210 nm that correspond to low molecular weight molecules with sizes ranging from 3 to 10 kDa. Among these molecules, only one (~10 kDa) was a PLP. These molecules can correspond to fragments of proteins or glycoproteins that were easily detached from the biofilm due to previous digestion of the matrix by extracellular proteases. Six distinct fractions were eluted from the column using TWEEN as a detergent for the extraction of hydrophobic molecules. The eluted molecules exhibited a wide range of sizes ranging from 273.4 to 3 kDa. Among these, two fractions were PLPs, one contained high molecular weight proteins approximately 174 kDa, and the last contained low molecular weight proteins approximately 10 kDa. Notably, a ~10 kDa PLP was present in large amounts in the PBS_{extract}, the TWEEN_{extract} and the EDTA_{extract} and could be the same molecule in each sample. This finding indicates that this molecule might be heavily involved in the DWCNT/EPS interaction. The EDTA extract contained four different molecules with sizes ranging from 1 to 91 kDa (Fig. 3c). The 39 kDa and the 10 kDa fractions were detected at 280 nm as PLPs. This indicates that the 10 kDa molecules might be heavily involved in the DWCNT/EPS interaction and, even if a large part remains unlinked to DWCNTs, some of them are linked to the biofilm and can be extracted after the disruption of

chemical interactions. Interestingly, a protein-like polymer with an intermediate molecular weight of 39 kDa was only found in the EDTA extract. The 39 kDa peak was, however, increased for DWCNTs_{10mg}, suggesting that this molecule could either bridge with divalent ions in functionalized areas of DWCNTs that contain structural imperfections or non-covalently functionalize NOM to cover CNT. As previously described by Caudan et al. [57], anionic proteins and divalent calcium were reported to be key components for the aggregation of microbial granules involved in the elimination of organic components. Due to the presence of negative carboxyl groups on the glutamic and aspartic amino acids of proteins, this mechanism may be involved in the formation and stability of many other biological matrixes, including diatom biofilms.

4.4. Interactions between DWCNTs and EPS

The adhesion of CNTs to algae has often been observed [14,15,40,58]. In this study, HPLC (Fig. 3) and carbohydrates/proteins assays (Fig. 4) for each extracted fraction as well as SEM (Fig. 5) were implemented to better understand the nature of the interactions between EPS and DWCNTs. Water-soluble and weak bonds between EPS and DWCNTs were obtained in the H₂O_{extract}/PBS_{extract}, hydrophobic bonds were obtained in the TWEEN_{extract}, and or bridged interactions between divalent ions were obtained in the EDTA_{extract}.

No significant difference was observed in the H₂O_{extract}/PBS_{extract} after DWCNTs exposure. However, this sample constituted a majority of the produced EPS reaching ~50% and ~60% of the total EPS amount. These EPS could be involved in the mechanical action occasionally used to explain the interaction between DWCNTs and organisms [14,15] or EPS [27,54]. TWEEN 20 was used as a chemical substitute for hydrophobic bonds [59], freeing the EPS linked by hydrophobic interactions to DWCNTs. Considering the high solubility of polysaccharides, the hydrophobicity of EPS is mostly inherent to proteins [49,60]. In this study, carbohydrates and PLPs from the TWEEN_{extract} were strongly correlated (~0.95) with the concentration of DWCNTs. Moreover, the amount of PLPs extracted for each condition increased according to the concentration of DWCNTs. In contrast, the concentration of carbohydrates from the TWEEN_{extract} was significantly higher only at the highest concentration of DWCNTs. As already observed with polystyrene nanoparticles [60], our results suggest a strong hydrophobic interaction between DWCNTs and EPS, which is mainly driven by PLPs. These results corroborate the HPLC results, which showed increases in two PLPs (~174 kDa, ~10 kDa) that could be strongly implicated in the observed hydrophobic interaction between EPS and DWCNTs. Tyrosine and tryptophan, which are cyclic amino acids, are especially involved in the CNTs-protein interaction [61]. This indicates that these two PLPs could contain a large amount of these two amino acids. In addition, the sharp increase in the protein/carbohydrates ratio of EPS in the exposed cultures appears to be an adaptive/adhesive response of *N. palea* that works by increasing the hydrophobicity of the EPS produced. EDTA was used to chelate ions responsible for the ionic bridge between DWCNTs and EPS, allowing for their extraction. The EDTA_{extract} (Fig. 4c) revealed no

significant difference between conditions, although the amount extracted showed an increasing trend following that of DWCNTs. Thus, the involvement of ionic bonds was weak but they cannot be ruled out in the binding of DWCNTs to EPS. Structural defects in DWCNTs might be implicated in this type of interaction, and replicating the experiment using functionalized DWCNTs would better help us to grasp the potential of EPS to form ionic bonds with DWCNTs. NOM could also be involved in the interaction observed between EPS and DWCNTs either by reducing or promoting it. On the one hand, NOM can occupy hydrophobic areas that are inherent to DWCNTs, limiting interaction between DWCNTs and EPS [64]. On the other hand, NOM could promote the interaction between DWCNTs and EPS through forming different bonds such as electrostatic, hydrophobic, π - π and hydrogen-bond interactions [17,63] with both DWCNTs and EPS [17,50].

Due to the nano-particulate and fibrous nature of the DWCNTs as well as the structure of the EPS network, a mechanical interaction seems obvious. This is supported by SEM observations showing DWCNTs strongly entangled in the EPS (Fig. 5). According to other authors, the assembly of DWCNTs and EPS is consistent with them encountering each other within a few seconds [62] and occurs even under dynamic water flow, as in the used experimental setup. In the present study, a strong disruption in the EPS structure was also highlighted, which was already observed during the exposure of human mucus to MWCNTs [27] using other non-metallic nanoparticles [54]. This disruption could be a consequence of both mechanical phenomena and chemical interactions (mainly hydrophobic, Figs. 4b and 5c) between different EPS polymers and DWCNTs. This could increase the coating and retention of DWCNTs within the EPS that compose aquatic biofilms.

5. Conclusion

Exposure to 1–50 mg L⁻¹ of DWCNTs dispersed by NOM led to a temporary growth inhibition of the diatom *N. palea*. However, no toxic effect was observed in either the viability or the PSII quantum yield. Shading seemed involved only in growth inhibition from DWCNTs_{10mg}, although the device used in the present study is believed to underestimate the shading effect at low concentrations of CNT. The EPS analysis revealed a DWCNT-driven overproduction of EPS from DWCNTs_{1mg}. This was specifically the case for PLPs but not for carbohydrate polymers. Overproduction was stable for DWCNTs_{1mg} to DWCNTs_{10mg}, indicating a strong response from low DWCNT concentrations. An additive effect of shading and energetic trade-off between cell division and EPS production (focused on protection against DWCNTs) could explain the observed growth inhibition after 48 h of contact.

This study has also shown that two distinct mechanisms were involved in the interaction between DWCNTs and EPS: (i) physical, via the EPS meshing, and (ii) chemical, mainly via hydrophobic interactions. Two PLPs seemed particularly involved in the latter but further studies are needed to better characterize the implicated molecules and understand the basics of the interaction. In general, our results show that EPS production by *N. palea* could be a general response to

stress from both natural particles (clays and sediments) and anthropogenic particles (manufactured nanoparticles). However, it is unlikely that EPS production is changed similarly for algae under shading conditions and DWCNTs exposure. This might be confirmed by an additional study on EPS production, making the distinction between the role of direct interactions (contact between DWCNTs and diatoms) and the shading caused by DWCNTs.

However, considering that the present and future concentrations of CNTs in aquatic environments are low in comparison to those of natural particles, only a minor impact of CNTs on EPS production at a worldwide scale is foreseen. In contrast, the covering of CNTs by EPS and probably by other hydrophobic nanoparticles could hide them from the recognition and defense systems of many organisms. Thus, EPS-coated nanoparticles could become Trojans overlooked by many organisms that consume the biofilms.

Declaration of interest

This research was supported by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research. The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgments

We acknowledge the Common Service for Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy of the University Paul Sabatier and Stephane Du Plouy for his help. Part of the present study was achieved in the framework of the public/private joint research laboratory NAUTILÉ (NANotubes et écoToxicologie; Arkema France – CNRS/INPT/UPS). This work is also integrated in the international research group ICEINT (International Consortium for the Environmental Implications of NanoTechnology).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2015.02.053>.

REFERENCES

- [1] Carbon nanotubes (CNTs) market by type (SWCNTs & MWCNTs), application (electronics & semiconductors, chemical & polymers, batteries & capacitors, energy, medical, composites, & aerospace & defense) & geography – global trends & forecasts to 2018; MarketsandMarkets publisher. 2013.
- [2] Production and applications of carbon nanotubes, carbon nanofibers, fullerenes, graphene and nanodiamonds: a global technology survey and market analysis. Innovative Research and Products (iRAP), Inc, 2011.
- [3] Flahaut E, Bacsa R, Peigney A, Laurent C. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chem Commun* 2003;1442. <http://dx.doi.org/10.1039/b301514a>.
- [4] Endo M, Strano MS, Ajayan PM. Potential applications of carbon nanotubes. *Carbon Nanotubes*, vol. 111. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [p. 13–61].
- [5] Bédier A, Seichepine F, Flahaut E, Loubinoux I, Vaysse L, Vieu C. Elucidation of the role of carbon nanotube patterns on the development of cultured neuronal cells. *Langmuir* 2012;28:17363–71. <http://dx.doi.org/10.1021/la304278n>.
- [6] Neves V, Heister E, Costa S, Tilmaciuc C, Flahaut E, Soula B, et al. Design of double-walled carbon nanotubes for biomedical applications. *Nanotechnology* 2012;23:365102. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/23/36/365102>.
- [7] Petersen EJ, Zhang L, Mattison NT, O'Carroll DM, Whelton AJ, Uddin N, et al. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. *Environ Sci Technol* 2011;45:9837–56. <http://dx.doi.org/10.1021/es201579y>.
- [8] Kümmerer K, Menz J, Schubert T, Thielemans W. Biodegradability of organic nanoparticles in the aqueous environment. *Chemosphere* 2011;82:1387–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.11.069>.
- [9] Parks AN, Chandler GT, Ho KT, Burgess RM, Ferguson PL. Environmental biodegradability of [¹⁴C]SWNT by *Trametes versicolor* and natural microbial cultures found in New Bedford Harbor sediment and aerated wastewater treatment plant sludge: environmental biodegradability of [¹⁴C]SWNT. *Environ Toxicol Chem* 2014;n/a–a. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2791>.
- [10] Zhang L, Petersen EJ, Habteselassie MY, Mao L, Huang Q. Degradation of multiwall carbon nanotubes by bacteria. *Environ Pollut* 2013;181:335–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.058>.
- [11] Smart SK, Cassidy AI, Lu GQ, Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* 2006;44:1034–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2005.10.011>.
- [12] Petersen EJ, Henry TB. Methodological considerations for testing the ecotoxicity of carbon nanotubes and fullerenes: review. *Environ Toxicol Chem* 2012;31:60–72. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.710>.
- [13] Wick P, Manser P, Limbach L, Dettlaffweglikowska U, Krumeich F, Roth S, et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2007;168:121–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.019>.
- [14] Wei L, Thakkar M, Chen Y, Ntim SA, Mitra S, Zhang X. Cytotoxicity effects of water dispersible oxidized multiwalled carbon nanotubes on marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *Aquat Toxicol* 2010;100:194–201. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.07.001>.
- [15] Schwab F, Bucheli TD, Lukhele LP, Magrez A, Nowack B, Sigg L, et al. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? *Environ Sci Technol* 2011;45:6136–44. <http://dx.doi.org/10.1021/es200506b>.
- [16] Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A-J, et al. Environmental behavior and ecotoxicology of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 2008;17:372–86. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>.
- [17] Yang K, Xing B. Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. *Environ Pollut* 2009;157:1095–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.007>.
- [18] Zhang S, Shao T, Kose HS, Karanfil T. Adsorption kinetics of aromatic compounds on carbon nanotubes and activated carbons. *Environ Toxicol Chem* 2012;31:79–85. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.724>.
- [19] Bourdiol F, Mouchet F, Perrault A, Fourquaux I, Datas L, Gancet C, et al. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon* 2013;54:175–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.11.024>.

- [20] Staats N, De Winder B, Stal L, Mur L. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *Eur J Phycol* 1999;34:161–9. <http://dx.doi.org/10.1080/09670269910001736212>.
- [21] Tolhurst TJ, Gust G, Paterson DM. The influence of an extracellular polymeric substance (EPS) on cohesive sediment stability. *Proc Mar Sci* 2002;5:409–25.
- [22] Brouwer JFC, Wolfstein K, Ruddy GK, Jones TER, Stal LJ. Biogenic stabilization of intertidal sediments: the importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. *Microb Ecol* 2005;49:501–12. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-004-0020-z>.
- [23] Flemming HC, Wingender J. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: structural and ecological aspects. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res* 2001;43:1–8.
- [24] Riding RE, Awramik SM, editors. *Microbial sediments*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2000.
- [25] De Brouwer JFC, Stal LJ. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae). *J Phycol* 2002;38:464–72. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01164.x>.
- [26] Miao A-J, Schwehr KA, Xu C, Zhang S-J, Luo Z, Quigg A, et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ Pollut* 2009;157:3034–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.047>.
- [27] Verneuil L, Silvestre J, Mouchet F, Flahaut E, Boutonnet J-C, Bourdiol F, et al. Multi-walled carbon nanotubes, natural organic matter, and the benthic diatom *Nitzschia palea*: “A sticky story”. *Nanotoxicology* 2014;1–11. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2014.918202>.
- [28] Scala S, Bowler C. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1666–73. <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000804>.
- [29] Hamm CE, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K, et al. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* 2003;421:841–3. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01416>.
- [30] Losic D, Rosengarten G, Mitchell JG, Voelcker NH. Pore Architecture of diatom frustules: potential nanostructured membranes for molecular and particle separations. *J Nanosci Nanotechnol* 2006;6:982–9. <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2006.174>.
- [31] Debenest T, Silvestre J, Coste M, Pinelli E. Effects of pesticides on freshwater diatoms. In: Whitacre DM, editor. *Reviews of environmental contamination and toxicology volume 203*, vol. 203. New York, NY: Springer; 2010. p. 87–103.
- [32] Landois P. *Synthèse, fonctionnalisation et impact sur l'environnement de nanotubes de carbone*. Toulouse: Centre Interuniversitaire de la Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (CIRIMAT), UMR 5085; Laboratoire D'Ecologie fonctionnelle et environnement (EcoLab), UMR 5245; 2008.
- [33] Oeurng C, Sauvage S, Coynel A, Maneux E, Etcheber H, Sánchez-Pérez J-M. Fluvial transport of suspended sediment and organic carbon during flood events in a large agricultural catchment in southwest France. *Hydrol Processes* 2011;25:2365–78. <http://dx.doi.org/10.1002/hyp.7999>.
- [34] Horst AM, Vukanti R, Priester JH, Holden PA. An assessment of fluorescence- and absorbance-based assays to study metal-oxide nanoparticle ROS production and effects on bacterial membranes. *Small* 2013;9:1753–64. <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201201455>.
- [35] Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Paul E, Giralbal-Neuhauser E. Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res* 2011;45:1529–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.021>.
- [36] Dreywood R. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind Eng Chem Anal Ed* 1946;18:499. <http://dx.doi.org/10.1021/i560156a015>.
- [37] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
- [38] Cleuvers M, Ratte HT. The importance of light intensity in algal tests with coloured substances. *Water Res* 2002;36:2173–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00455-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00455-9).
- [39] *Oecd O. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*. Paris, France: OECD Publishing; 2002.
- [40] Youn S, Wang R, Gao J, Hovespyan A, Ziegler KJ, Bonzongo J-C, et al. Mitigation of the impact of single-walled carbon nanotubes on a freshwater green alga: *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Nanotoxicology* 2012;6:161–72. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2011.562329>.
- [41] Ge C, Li Y, Yin J-J, Liu Y, Wang L, Zhao Y, et al. The contributions of metal impurities and tube structure to the toxicity of carbon nanotube materials. *NPG Asia Mater* 2012;4:e32. <http://dx.doi.org/10.1038/am.2012.60>.
- [42] Von Moos N, Slaveykova VI. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology* 2013;1–26. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2013.809810>.
- [43] El-Sheekh MM, El-Naggar AH, Osman MEH, El-Mazaly E. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Braz J Plant Physiol* 2003;15. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202003000300005>.
- [44] Nagpal NK, Golder Associates, British Columbia, Ministry of Water Land AP. Technical report, water quality guidelines for cobalt. Victoria, B.C.: Ministry of Water, Land and Air Protection; 2004.
- [45] *Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian environmental quality guidelines*. Hull, QC: CCME; 1999.
- [46] Khandeparker RD, Bhosle NB. Extracellular polymeric substances of the marine fouling diatom *Amphora rostrata* Wm. Sm. *Biofouling* 2001;17:117–27. <http://dx.doi.org/10.1080/08927010109378471>.
- [47] Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F. Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar Freshw Res* 2009;60:1201. <http://dx.doi.org/10.1071/MF08258>.
- [48] Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA, Waldron K. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *J Phycol* 2004;40:293–304. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03076.x>.
- [49] Chen Y-P, Zhang P, Guo J-S, Fang F, Gao X, Li C. Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. *Chemosphere* 2013;92:633–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.059>.
- [50] Stal LJ. Microphytobenthos, their extracellular polymeric substances, and the morphogenesis of intertidal sediments. *Geomicrobiol J* 2003;20:463–78. <http://dx.doi.org/10.1080/713851126>.
- [51] Pouličková A, Hašler P, Lysáková M, Spears B. The ecology of freshwater epipelagic algae: an update. *Phycologia* 2008;47:437–50. <http://dx.doi.org/10.2216/07-59.1>.
- [52] Joshi N, Ngwenya BT, French CE. Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. *J Hazard Mater* 2012;241–242:363–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.09.057>.

- [53] Hessler CM, Wu M-Y, Xue Z, Choi H, Seo Y. The influence of capsular extracellular polymeric substances on the interaction between TiO₂ nanoparticles and planktonic bacteria. *Water Res* 2012;46:4687–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.009>.
- [54] Wang Y-Y, Lai SK, So C, Schneider C, Cone R, Hanes J. Mucoadhesive nanoparticles may disrupt the protective human mucus barrier by altering its microstructure. *PLoS One* 2011;6:e21547. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021547>.
- [55] Smith DJ, Underwood JC. Exopolymer production by intertidal epipelagic diatoms. *Limnol Oceanogr* 1998;7:1578–91.
- [56] Wolfstein K, Stal L. Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: effect of irradiance and temperature. *Mar Ecol Prog Ser* 2002;236:13–22. <http://dx.doi.org/10.3354/meps236013>.
- [57] Caudan C, Filali A, Lefebvre D, Spérandio M, Girbal-Neuhauser E. Extracellular polymeric substances (eps) from aerobic granular sludges: extraction, fractionation, and anionic properties. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;166:1685–702. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-012-9569-z>.
- [58] Long Z, Ji J, Yang K, Lin D, Wu F. Systematic and quantitative investigation of the mechanism of carbon nanotubes' toxicity toward algae. *Environ Sci Technol* 2012;46:8458–66. <http://dx.doi.org/10.1021/es301802g>.
- [59] Johnson M. Detergents: triton X-100, tween-20, and more. *Mater Methods* 2013;3. <http://dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.163>.
- [60] Chen C-S, Anaya JM, Zhang S, Spurgin J, Chuang C-Y, Xu C, et al. Effects of engineered nanoparticles on the assembly of exopolymeric substances from phytoplankton. *PLoS One* 2011;6:e21865. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0021865>.
- [61] Mu Q, Jiang G, Chen L, Zhou H, Fourches D, Tropsha A, et al. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chem Rev* 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/cr400295a> [140613144559008].
- [62] Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol* 2013;8:772–81. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2013.181>.
- [63] Zhou X, Shu L, Zhao H, Guo X, Wang X, Tao S, et al. Suspending multi-walled carbon nanotubes by humic acids from a peat soil. *Environ Sci Technol* 2012;46:3891–7. <http://dx.doi.org/10.1021/es204657k>.
- [64] Edgington AJ, Roberts AP, Taylor LM, Alloy MM, Reppert J, Rao AM, et al. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. *Environ Toxicol Chem* 2010;29:2511–8. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.309>.

Annexe 2 :

Article publié en co-auteur, suite à une collaboration entre le LBAE (EA 4565), le Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie (LAPLACE, Université Paul Sabatier Toulouse III), ainsi que le laboratoire ERRMECe (EA 1391, Université Cergy-Pontoise). Les outils développés dans ce travail de thèse ont pu être appliqués afin d'apporter à une approche quantitative à l'analyse de l'efficacité du traitement au jet de plasma atmosphérique sur des biofilms bactériens.



Scientia Research Library

Journal of Engineering And Technology Research
, 2013, 1 (1):123-135

<http://www.scientiaresearchlibrary.com/archive.php>

Atmospheric cold plasmas for biofilm inactivation: does biofilm extracellular matrix limit the bactericidal process?

Marchal F¹, Robert H², Seyer³, Merbahi N¹, Randrianjatovo I², Fontagné-Faucher C², Di Martino P³, Yousfi M¹, Neuhauser E²

⁽¹⁾ Université de Toulouse; UPS, INPT, CNRS ; LAPLACE UMR 5213 (Laboratoire Plasma et Conversion d'Énergie); 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

⁽²⁾ Université de Toulouse; UPS, IUT 'A'; LBAE EA 4565 (Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale); 24 rue d'Embaquès, F-32000 Auch, France

⁽³⁾ Université de Cergy-Pontoise ; Laboratoire ERRMECe EA 1391, 2 avenue Adolphe Chauvin, F-95302 Cergy Pontoise Cedex , Pontoise, France

ABSTARCT

Low Temperature Atmospheric Pressure Plasmas (LTAPPs) is a new promising sterilization and decontamination technology with a high potential to inactivate microbial biofilms. Conventional methods for inactivation of planktonic bacteria are often ineffective with biofilms that constitute a protected mode of bacterial growth. Microbial biofilms can be seen as a complex functional organization of microbial cells, water, and secreted extracellular substances of polysaccharides, proteins, nucleic acids and other cellular products. There is a lack of studies focused on the interaction of plasma with the organic matrix of biofilms that acts as a protective barrier against any physical or chemical stress. That is why the bactericidal action of LTAPPs on lactic acid bacteria organized or not in biofilm was measured. and the protective role of the exopolymeric matrix produced by this strain against cold plasma was highlighted. Therefore future strategies should focus on the interaction of matrix components toward reactive species generated by plasma.. Some relevant tools were thus proposed to follow the alteration of either the biochemical components or the physical properties of the matrix in order to provide new experimental approaches for the global analysis of plasma effect on the architecture of bacterial biofilms.

KeyWords: Low temperature atmospheric pressure plasma, microbial biofilm, exopolymeric matrix, sterilization decontamination

INTRODUCTION

Plasma technology is one of the most promising technologies that may offer enhanced quality of care and food safety at a reduced cost. This technology providing absence of harmful residues, is a “white” technology that can be used as an alternative to classical chemical procedures. The advent of Low Temperature Atmospheric Pressure Plasmas (LTAPPs) technology has induced the

development of biomedical applications and the emergence of innovative processes in food industry. These considerations suggest that applications of plasmas are about to become a major field of research in many advanced technologies with a major economic impact and substantial industrial activity. For example, LTAPPs have been adopted for wide ranging applications including cell manipulation, oral health, tissue ablation, blood coagulation, wound healing, cancer treatment, sterilization and decontamination of inorganic and bio-materials (Yousfi et al. 2013). LTAPPs are also under intensive study as an alternative approach to control superficial wound and skin infections when the effectiveness of chemical agents is weak due to natural pathogens or biofilm resistance (Ermolaeva et al. 2011). LTAPP treatment is also generally considered to be a candidate method for ensuring food safety during processing (Maisch et al. 2012). Plasma technology thus represents a new state of the art sterilization and disinfection treatment for oral and environmental pathogens, heat-sensitive materials, contaminated medical waste, and decontamination of fresh foods without significantly affecting nutrient content and textural qualities.

Numerous studies have demonstrated the effectiveness of LTAPPs for inactivation of free-living (planktonic) microorganisms or adherent cells. Due to a mean low plasma temperature, plasma jets exhibit antimicrobial effects without any visible thermal damage on the treated bio-surfaces. Such low-temperature plasma jets and in particular those operating in open air, generate numerous active species (radicals, charged particles, long living excited species, UV photons) playing an efficient role for the inactivation of planktonic microorganisms (bacteria, yeasts) and even spores (Joshi et al. 2010). Involvement of reactive species such as ROS (Reactive Oxygen Species) and RNS (Reactive Nitrogen Species) is suspected since inactivation is more efficient with plasma jets generated in the ambient air than those using rare gas flows (Sarrette et al. 2009). These species are formed in the plasma and might react with the liquid layers surrounding bacteria, forming antibacterial by-products such as peroxides or superoxides. These sterilization studies report that both Gram-negative and Gram-positive bacteria were successfully inactivated by LTAPPs. However, most of the treatments have been carried out on abiotic surfaces that discourage cell growth (Vleugels et al. 2005) and only single bacterial species models have been used.

Conventional methods of inactivation of planktonic bacteria by chemical, physical or biological ways are often ineffective with biofilms, because bacteria within biofilm show different properties from those in planktonic life and the matrix acts as a shield protecting cells (Stewart and William Costerton 2001). Biofilms are the default mode of life for many bacterial species and constitute a major proportion of the bacterial biomass present in the nature as complex multispecies ecosystems. Biofilms are present almost everywhere, and their presence leads to disease, prostheses colonization, product contamination, biofouling and equipment damage. According to the National Institutes of Health (Brelles-mariño 2012), 90% of infections in humans and 65% of nosocomial infections are due to biofilms.

Biofilms are highly organized communities of microbial cells embedded in a self-produced matrix composed of exopolymers such as proteins, polysaccharides and nucleic acids (Flemming and Wingender 2010). Biofilm formation begins when the free-living bacteria (planktonic) attach to a surface and recruit additional cells. This is followed by formation of cell clusters and further development and stabilisation of these microcolonies, which are occurring in extracellular matrix of variable density and composition. Dispersal mechanisms also facilitate colonization of surrounding area (Hall-Stoodley, Costerton, and Stoodley 2004).

The organic matrix of biofilms plays an essential role in the protection of biofilm cells against physical or chemical bactericidal stress; alteration and/or destruction of the matrix physical integrity appears thus indispensable to ensure efficient biofilm elimination. However, there is a lack of studies focused on the interaction of plasma with the organic matrix. In a first part of this study, the

bactericidal activity of LTAPP on an exopolymeric glucan-producing lactic acid bacteria organized or not in biofilm was measured in order to evaluate the involvement of the exopolymeric matrix in the biofilm resistance. In a second part, some relevant tools were proposed to follow the alteration of either the biochemical components or the physical properties of the matrix in order to provide new experimental approaches for the global analysis of plasma effect on the complex architecture of bacterial biofilms.

MATERIAL AND METHODS

Low temperature plasma generation for bacterial biofilm treatment

The low temperature plasma jet that look like to a flame of for instance of candle (but with a lower temperature) is produced by specific corona design is described elsewhere (Marchal et al. 2012). Plasma is produced by anodic needle inside a cylindrical cathode configuration driven by a DC high voltage power supply. This corona configuration gives a natural repetitive discharge current with a frequency of about 20 kHz under a high voltage DC power supply. The instantaneous discharge current for a given applied DC high voltage illustrating the dissipated power (about 100 mW) is displayed in figure 1.

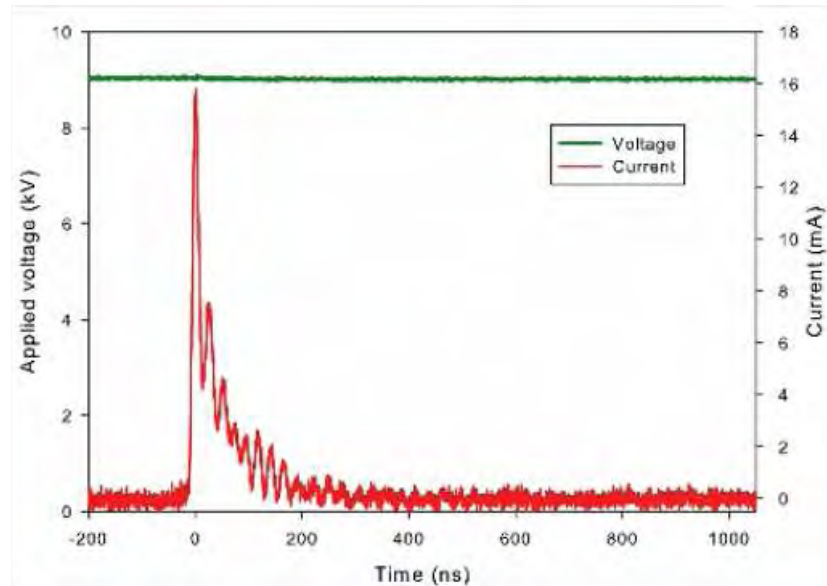


Fig. 1: Instantaneous discharge current generated by the plasma jet setup under a given DC high voltage (Marchal et al. 2012).

The plasma jet is generated directly in the ambient air at atmospheric pressure and launched by itself without any system of gas inlet feed. In fact, the plasma is ejected in open air with the help of physical forces that are the corona ionic winds having a subsonic velocity (close to 20 m/s) that are able to dry the treated biofilm during its exposure to plasma. The plasma temperature measured on the top of the plasma jet (at about 1 cm) using a thermocouple does not exceed 27°C. Bacterial samples are placed at the top of the air plasma jet at a distance $d = 10\text{mm}$ of the jet nozzle (see figure 2). The sample temperatures measured after treatment do not differ from ambient temperature more than 2 °C. The UV-visible spectrum corresponding to the light emission of the top of the air plasma jet, already detailed elsewhere [12], shows classical emission bands of Nitrogen such as the Second Positive System (SPS) of $\text{N}_2(\text{C}_3\pi_u)_v \rightarrow \text{N}_2(\text{B}_3\pi_g)_v$ (from about 290 nm up to 440) and the First Positive System (FPS) $\text{N}_2(\text{B}^3\Pi_g) \rightarrow \text{N}_2(\text{A}^3\Sigma_u^+)$ (between about 600 nm up to 900 nm).

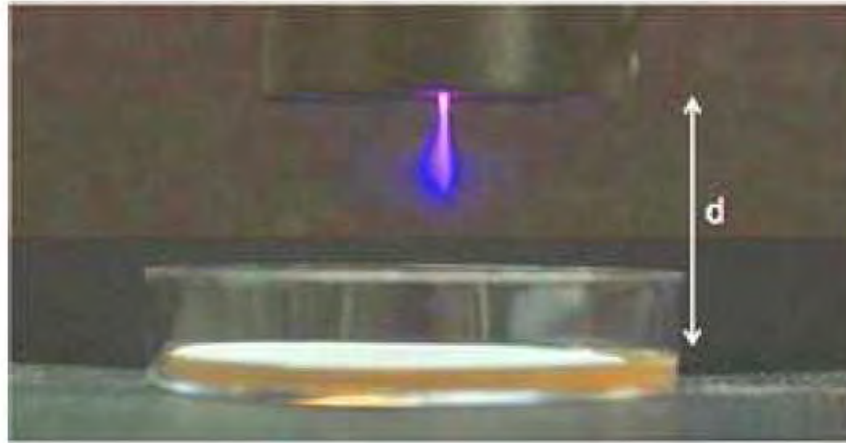


Fig. 2: View on the plasma jet ejected in open air with a bacteria sample positioned at a distance d from the nozzle of the plasma setup (Marchal et al. 2012).

There are also oxygen emissions $O_2(b^1\Sigma_g^+ v=0) \rightarrow O_2(X^3\Sigma_g^-, v=0)$ at 759 nm and atomic line of the triplet state of O at 777.47 nm. This overview on plasma jet spectrum means that the excited species present at the top of jet are at least those involved by the emission bands such as $N_2(C_3\pi_u)_v$, $N_2(B_3\pi_g)_v$, $O_2(b^1\Sigma_g^+ v=0)$, $O_2(X^3\Sigma_g^-, v=0)$, $N_2(A^3\Sigma_u^+)$ and O.

To summarize, the different plasma species able to more or less inactivate bacteria and biofilms and present on the top of the plasma jet in open air are:

- Radicals and long lived neutrals such as NO, NO₂, NO₃, OH, HO₂, O₃, H₂O₂ but in a low concentration ($< 10^{13} \text{ cm}^{-3}$)
- Metastable states storing internal energy such as: $N_2(A^3\Sigma_u^+)$, $O_2(a^1\Delta_g)$, ...
- Radiative states: $O_2(b^1\Sigma_g^+)$, N^* , O^*
- charged particles such as electrons, O_2^- , N^+ , O^+ , N_2^+ , N_4^+ , O_4^+ , etc. in relatively low concentration ($< 10^{13} \text{ cm}^{-3}$)

There are also photons and electric field on the top of the plasma jet:

- UV-A emitted by nitrogen bands $N_2(\text{SPS})$ while UV-C and UV-B are quenched since $NO\gamma$ and $OH(A-X)$ bands are not detected (see figure 3)
- Visible radiation emitted by $N_2^+(\text{FNS})$, $N_2(\text{FPS})$ and NO_2 continuum
- low electric field (around 10^4 V/cm)

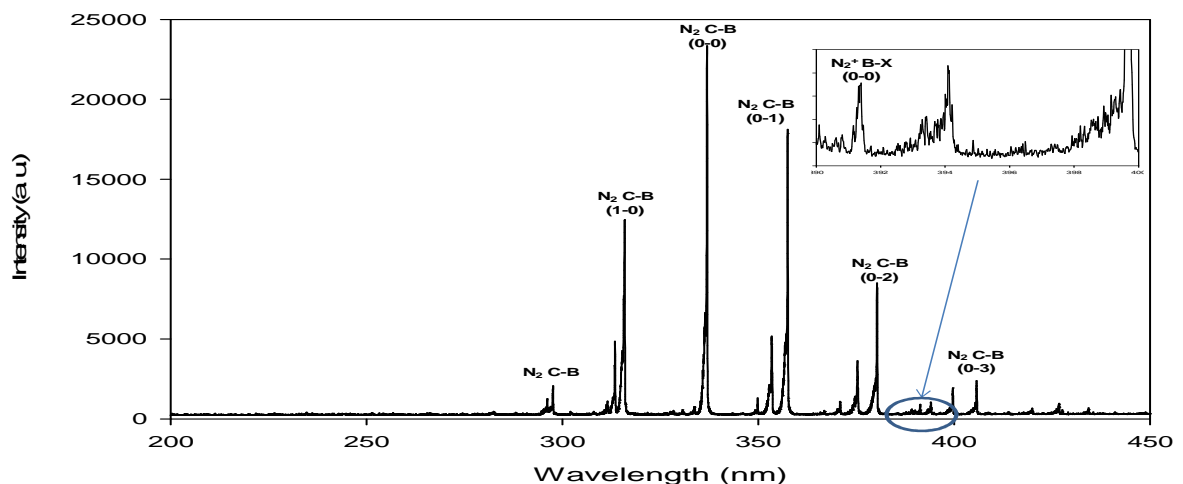


Fig. 3: Spectra between 200nm to 450 nm at the top of the plasma jet

showing some specific molecular nitrogen bands and also the quenching of NO γ (between 200 to 260nm) and OH(A-X) (between 306 to 310nm) bands synonymous of the absence of UV-C radiations by the plasma jet (Marchal et al. 2012)

Adherent cells and biofilm formation of *Weissella confusa* bacterial strain

The strain *Weissella confusa* LBAE C39-2 (Amari, Laguerre, et al. 2012) was pregrown in MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) broth. Then 0.2 ml of standardized bacterial suspension was diluted in 20 ml of sterile MRS broth. A simple method modified from Cao *et al* (Cao, Y., Yang, P., Lu, X., Xiong, Z., Ye, T., Xiong, Q., Sun 2011) was developed to form biofilms on membrane after filtration. The diluted suspension was passed through a sterile filtration device containing a membrane Pall GN-6 Metricel® (17 cm², cut-off 0.45 μ m). Thereafter, the membrane was recovered under sterile conditions and deposited on Petri dishes (55 mm diameter) containing MRS solid media or MRS solid media supplemented with sucrose (40 g l⁻¹) in order to trigger glucan production. There immediately proceeded to perform adherent cells plasma treatment. Otherwise, a uniform biofilm was formed on membrane during growth for 48 h at 30°C.

Evaluation of cell viability before and after plasma treatment by bacterial count

To evaluate the effect of plasma treatment on biofilm and adherent cells, a piece of membrane (1.5 cm²) corresponding to the central treated surface by plasma was cut under sterile conditions. Then bacterial cells present on membrane were recovered in 1ml of sterile saline solution (sodium chloride 9 g l⁻¹) by pipetting extensively the colonized surface. Decimal dilutions in saline solution were performed to count viable bacterial population on MRS solid media after incubation at 30 °C for 48 h. All plasma treatments were performed in triplicate. Inactivation kinetics of adherent or biofilms cells were modelled with GInaFIT (Geeraerd, Valdramidis, and Van Impe 2005).

Analysis of the exopolymeric matrix of biofilms

Observations in laser scanning confocal microscopy (CLSM) were performed to visualize the main components of a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*, i.e. cells, proteins and polysaccharides of the matrix. Biofilms of the *P. aeruginosa* CIP103.467 strain were obtained after 48h of growth on glass slides in Tryptic Soy Broth (TSB) at 37°C. The CLSM observations were done after biofilm staining with the fluorescent DNA-binding stain 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma-Aldrich), the protein stain Sypro Ruby (Molecular Probes), and the polysaccharide staining *Lycopersicon esculentum*-FITC (LE-FITC) lectin (Sigma-Aldrich), essentially as previously described (Doumèche et al. 2007). The stained biofilms were examined with a Leica SP2 upright confocal laser scanning microscope (CLSM) (DM RAX-UV) (Leica microsystems, Reuil-Malmaison, France).

For *in situ* determination of polysaccharides and proteins contents of the extracellular matrix, biofilms of *P. aeruginosa* were formed into polystyrene 96-well microtiter plates for 48 hours in TSB at 37°C and those of *Weissella confusa* in MRS medium at 30°C. Exopolysaccharides were quantified using Periodic Acid-Schiff staining (Kilcoyne et al. 2011)(PAS kit® from Sigma-Aldrich) with dextran solutions (dextran from *Leuconostoc spp.*T40, Fluka Bioch.) prepared in ultrapure water as standards. Extracellular proteins were determined using fluorescence staining with Epicocconone (Mackintosh, Veal, and Karuso 2005)(*Fluoroprofile Protein Kit*® from Sigma-Aldrich) with Bovine Albumin Serum (BSA) solutions, prepared in ultrapure water as standards. The mechanical properties of a bacterial biofilm and of artificial matrices made of polysaccharides alone or polysaccharides and proteins have been evaluated by rheology using a cone-plate technology. For rheology analysis, biofilms of the mucoid *P. aeruginosa* NK125502 strain (Rebière-Huët et al. 1999) were obtained after 10 days of growth on glass slides at 26°C in TSB. Gels corresponding to artificial matrices were obtained by adding a protein solution (histones from calf thymus, Sigma-Aldrich, France) to an alginate solution (A2033, Sigma-Aldrich) or by using an alginate solution alone. Rheology measurements were performed with a MCR 301 from Anton Paar (Anton Paar, Courtaboeuf, France) in rotation mode.

RESULT AND DISCUSSION

Inactivation of bacteria biofilms by LTAPP

Gram-positive bacteria are considered more resistant than Gram-negative to plasma treatment. The Gram-positive bacteria cell wall (peptidoglycan) exposed to plasma is thicker than the cell wall of the Gram negative bacteria. Moreover, in Gram negative bacteria, the cell membrane is directly exposed to plasma because the thin peptidoglycan layer is localized under the outer membrane. Among Gram positive species, pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, are implicated in wound infection and implant, catheter biofilms whereas *Streptococcus mutans* is a cariogenic associated bacteria involved in dental plaque biofilm formation (Bowen and Koo 2011). It is noteworthy that, *in vivo*, biofilm is a very complex living structure of multiple species bacteria. To test the efficacy of cold plasma, a Gram-positive and acid resistant bacteria from *Weissella confusa* species was selected. This strain produces from sucrose a glucan exopolymer containing mainly α -(1,6) linked glucose (dextran) due to the activity of a single dextransucrase (Bounaix et al. 2010)(Amari, Arango, et al. 2012). Hence, this allows by a very simple way to obtain a monospecies biofilm model where matrix composition could be controlled by simple adjunction of sucrose.

Biofilms of *Weissella confusa* were cultivated for 48h on membranes deposited on Petri dishes containing MRS nutritive media with or without sucrose. Adherent cells (without any incubation period) were deposited on membrane just before plasma jet treatment. Figure 1 presents *W. confusa* viability counts after a 0, 10 and 20 min cold plasma treatment

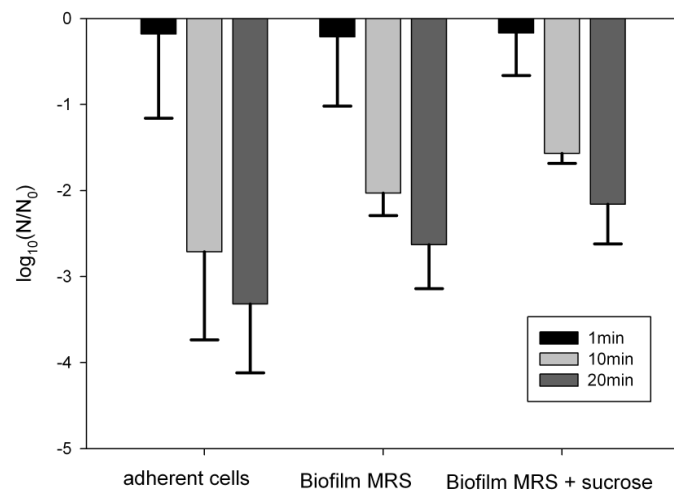


Fig 4 : Inactivation by LTAPP of the Gram positive bacteria *Weissella confusa* in adherent state and biofilms formed with or without sucrose

As illustrated in figure 4, *Weissella* biofilms were more resistant to cold plasma treatment than adherent cells. The time necessary to reduce by ten the population (D_{10}) is two-fold higher for biofilm conditions ($D_{10}=5-6$ min) than for adherent cells ($D_{10}=3,5$ min). Moreover, bacterial population embedded in dextran biofilm polymer (presence of sucrose) shows only a 2.16 log reduction after 20 min treatment. Bacterial population reduction is 10 fold greater for adherent cells for this time. Obviously, the increased thickness of biofilms grown with sucrose could explain the

obtained results. It was estimated that plasma penetration depth does not exceed a thickness less than 20 μm (Fricke et al. 2012)(Xiong et al. 2011).

Thus, after inactivation of the first layers, where the bacteria are more exposed to the plasma reactive species, the inactivation rate may decrease to nearly zero.

Typical biofilm survival curves obtained after plasma treatment often exhibits a biphasic behaviour, which is not true for planktonic cells treated on a surface or in a liquid suspension. During the first times of plasma treatment, bacteria seem to be more sensitive to reactive species generated by plasma. During the second part of curve, D10-value could be until 10 fold increased. Plasma have no additional significant lethal effect on biofilm after twenty minutes (results not shown).

In numerous studies, only a partial inactivation of Gram positive bacteria biofilm is obtained after a cold plasma treatment. For example a 2.19 Log reduction has been obtained for *Staphylococcus epidermis* biofilm by the kinpen 09 device after 5 min (Matthes, Koban, et al. 2013). Efficacy of surface discharge devices is higher for the same time in biofilm, with value near 3.5 log reduction in 10 min (Matthes, Bender, et al. 2013). For the same species cultivated in biofilm a greater inactivation has been obtained by Kampang et al., (Kamgang et al. 2007) using gliding discharge plasma but for a long time treatment of 70 min.

Considering all the available data for Gram positive bacteria, a maximum of 4-5 log reduction of bacterial viable population is generally observed, depending of plasma device, bacterial strain or biofilm growth conditions. However, this is clearly not enough to ensure a complete sterilization of abiotic surfaces or living tissues.

Results presented in these experiments are in favour of a protective role of polysaccharide (dextran) against cold plasma and highlighted the role of matrix components toward reactive species generated by plasma. They are also in agreement with previous observations that, after a single plasma treatment, re-growth of *Streptococcus mutans* biofilms (another lactic acid bacteria producing from sucrose a mixture of glucans) was depending on the presence of excreted polysaccharides (Sladek et al. 2007). Polysaccharides and proteins are the main components of matrix and form the backbone of a network where other components and bacteria can be included. Killing biofilm cells is insufficient to eradicate a biofilm; an action against the exopolymeric matrix is needed to decrease the regrowth of the structure.

Recently, some authors have postulated that dehydration of the first layers of biofilms could limit plasma efficacy (Matthes, Bender, et al. 2013). Indeed, they have observed by microscopy a "coagulation" state of the matrix after plasma treatment.. Future challenges in biofilm inactivation by LTAPP have thus to take into account the parameters (biological depending factors and plasma ones) that could counteract bactericidal effect of cold plasma. Thus, we propose to extensively study one key parameter that represents the matrix components of biofilms.

Characterization of the exopolymeric matrix of biofilms

The main extracellular components of the biofilm matrix are proteins and polysaccharides but their respective proportion and distribution are very dependent with the type of bacteria, the age of biofilm (initial adhesion or mature biofilm) and the environmental conditions (nutrients, temperature, flux forces). *Pseudomonas aeruginosa*, a Gram negative pathogenic bacteria highly efficient in biofilm formation, was chosen to illustrate the distribution of the matrix components in a model biofilm.

Organization of the extracellular matrix of *Paeruginosa* biofilms

The spatial organization of *P. aeruginosa* biofilm was analysed by CLSM. Multiple stains were applied and recorded simultaneously to visualize the different components of the biofilm: DAPI for bacterial cells (blue, Figure 5A) + LE-FITC for N-acetyl glucosamine (glcNAc)₃ -containing polysaccharides (green, Figure 5B) + Sypro Ruby for proteins (red, Figure 5C). The

polysaccharides stained with the lectin LE were both located extracellularly and close to the bacterial cells surface in the biofilm matrix (Figure 5B). Some areas of the biofilm devoid of cells were stained by the LE-FITC lectin. Proteins were present all along the biofilm matrix where cells were present, but some areas of the matrix contained higher concentrations of proteins. Confocal images showing the Z-axis revealed that the biofilm varied in depth from 2 to 7 μm (Figure 5D). The microbial cells were organized as huge microcolonies localized in the entire depth of the biofilm. We have previously used this CLSM technology based on biofilm staining with fluorescent lectins and DAPI to analyse the biofilm growth and to determine the efficiency of anti-biofilm treatments (Di Martino et al. 2007) (Houari et al. 2013) (Marconnet et al. 2011). Nevertheless, this is only a semi-quantitative approach that needs to be used in conjunction with other analytical tools.

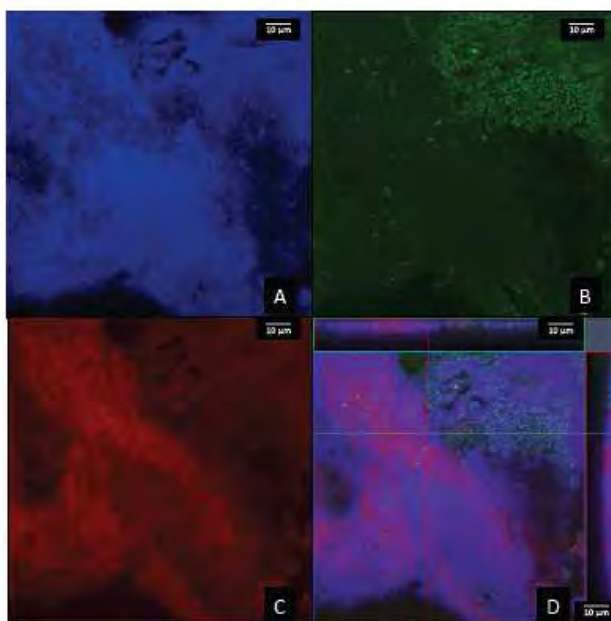


Fig. 5: CLSM observation of fluorescent signals from labeled microbial, exopolysaccharide and protein components of *Pseudomonas aeruginosa* 48h-biofilms.

The biofilm was stained with the fluorescent DNA-binding stain DAPI (A), the polysaccharide staining *Lycopodium esculentum*-FITC lectin (B), and the protein stain Sypro Ruby (C). Fluorescent signals inside the *P. aeruginosa* biofilm corresponding to cells, exopolysaccharides and proteins are shown together in panel D.

Quantification of the extracellular matrix components

Quantification of the matrix components is classically performed after extraction and *in vitro* determination of the exopolymeric substances using specific colorimetric methods. Various physical or chemical methods can be used to extract the exopolymers, some of them being tightly bound to the biofilm matrix (Marcato-Romain et al. 2012). Although efficient, these methods can be selective for one type of biopolymer and can induce alteration of the extracted EPS.

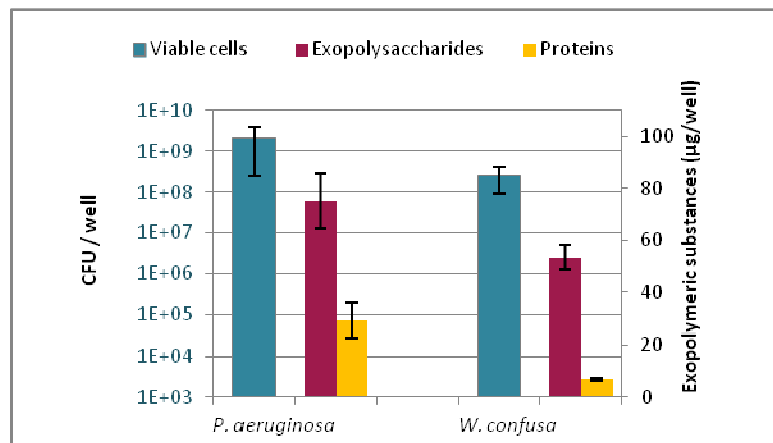


Fig. 6 : Viability and exopolymeric substances contents of *Pseudomonas aeruginosa* and *Weissella confusa* 48h-biofilms.

Carbohydrate content is expressed in microgram of dextran-equivalent and protein level is in microgram of BSA-equivalent. Bacteria growth is expressed in Colony Forming Unit (CFU) which represents the number of cells of the analysed well. Errors bars represent the standard deviations after six independent experiments.

An original method for “*in situ*” quantification of proteins and polysaccharides was adapted to avoid extraction or alteration of the matrix structure. Figure 6 shows the quantitative profiles of the proteins and polysaccharides measured in the biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442 (a reference strain for the evaluation of disinfectants under the NF EN 1040) and in the biofilm of *Weissella confusa*.

A clear predominance of the polysaccharides towards the proteins was observed in both biofilm matrixes. After 48h, *P. aeruginosa* matrix is composed of about 2.5-fold (in weight) of exopolysaccharides ($75.05 \pm 10.57 \mu\text{g/well}$) compared to proteins ($29.16 \pm 6.72 \mu\text{g/well}$) for a cell-adhered viability of 2.09×10^9 CFU/well.

As expected, *W. confusa* demonstrates here important sugar production within the biofilm, with an amount of $53.49 \pm 4.82 \mu\text{g}$ per well of total polysaccharides against $6.80 \pm 0.59 \mu\text{g}$ per well of proteins. Such biofilm, with a lower cell-adhered viability of 2.53×10^8 CFU per well, shows a polysaccharide/protein weight ratio of 7.87.

The CLSM observations previously described in Figure 5 indicate a predominance of proteins in the biofilm matrix of *P. aeruginosa* while the quantitative data show a majority of polysaccharides. This may be explained by the fact that the polysaccharides observed in CLSM were only those stained by the LE-lectin, i.e. the polysaccharides containing (glcNAc)₃ residues. Thus, in the CLSM approach that generally employs lectins, exopolysaccharides may be underestimated. On the contrary, PAS assay was tested with several types of carbohydrates (data not shown) and seems to match with a great majority of them. This approach was selected because of its capacity to provide a global quantification of a wide variety of polysaccharides.. This example illustrates the importance to have the better knowledge as possible of the constitution and organization of the biofilm that needs to be inactivated by plasma.

Quantification of the physical properties of the matrix

Biofilms are considered to be highly porous polymer gels and laboratory-grown as well as natural biofilms are viscoelastic in nature. The ability of biofilms to deform in response to mechanical stress is thought to be a conserved strategy of defence to enable persistence on surfaces in different

flow conditions. The viscoelastic nature of the *P. aeruginosa* biofilm and of the artificial matrices and their deformation under shear stress has been studied by measuring the creep response to shear (Figure 7). The character of the strain response for the *P. aeruginosa* biofilm and for artificial matrices made of alginate or alginate and proteins under a shear stress of 2.5 Pa showed a typical viscoelastic nature. The curves exhibited an instantaneous elastic response, and a time-dependent viscous deformation. After removal of the shear stress, an instantaneous elastic partial recovery and a partial viscous relaxation were observed. The stress of the alginate matrix containing proteins was about three times higher than the value measured for the matrix made of pure alginate. The presence of proteins inside the alginate matrix enhanced its deformability, mimicking the viscoelastic response of *P. aeruginosa* biofilms under stress. Thus, artificial matrices (made of alginate and histone) can be used to study the effects of a cold plasma treatment onto the exopolymeric matrix of a *P. aeruginosa* biofilm.

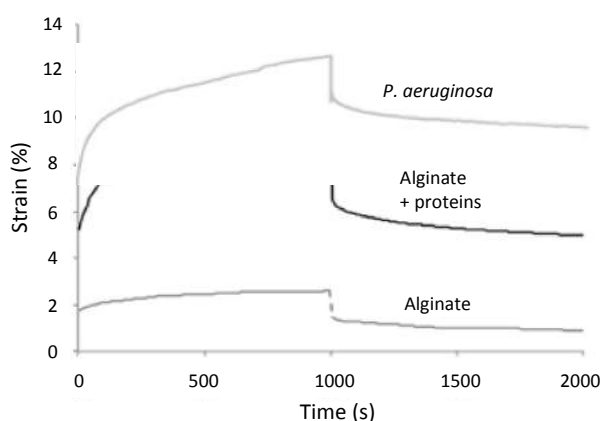


Fig 7. Creep test analysis showing the deformation and relaxation under stress of a 10 days old *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, and of artificial matrices made of alginate or alginate and proteins.

A constant shear stress was held on the sample during 1000 sec and decreased to 0 during a second period of 1000 sec. The resulting deformation on gels was monitored by measuring the variations of shear strain with time.

CONCLUSION

The biofilm matrix is a key parameter to consider for efficient LTAPPs treatment against bacterial biofilms, in particular against biofilms formed by Gram positive bacteria such as *Weissella confusa*. Matrix components (polysaccharides, proteins and nucleic acids) can act as a physical barrier interacting with plasma reactive species, as ROS and RNS. Moreover ionic wind self-generated by plasma device has a dehydrating effect on biofilm matrix limiting reactive plasma species penetration and lowering water activity of biofilm. Hence apparent LTAPPs bactericidal power is lower on bacteria cluster located in the deeper layers of the biofilm.

In situ analytical tools (CLSM, proteins and polysaccharides quantification), matrix models (polysaccharides +/- proteins +/- nucleic acid) and biofilm models are now available to understand molecular interactions between LTAPPs and matrix components. This would greatly enhance our comprehension of bactericidal effect of LTAPPs and this is necessary to optimize plasma key parameters such as the gas composition (with for instance additional humidity), the choice of power supply (direct current or pulsed voltage or microwave source), the production rate of reactive species and the plasma device design to increase the biofilm surface treated by the plasma jet.

Combined treatments of biofilm should be a good solution to destroy matrix components before plasma treatment. For example, polysaccharides or proteins digestion by enzymatic treatments could be applied on biofilms to lower the biofilm cohesion before LTAPP treatment to get a better access to bacterial cells and enhance efficacy of plasma treatment.

Comparison of efficacy of different plasma devices is still challenging due to the diversity of biofilm models used in literature:

- Monospecies, multispecies or *ex vivo* biofilm models,
- Biofilm models growing conditions (liquid/semi-dried static or dynamic conditions, colonizing surfaces, maturity of biofilm)

Lack of common and well defined biofilm models could be a limiting factor to use plasma device in decontamination, our *Weissella confusa* biofilm model where the polysaccharide matrix component is easily modulated could be a good candidate for further experiments and researches.

REFERENCES

- [1] Amari, Myriam, Luisa Fernanda Gomez Arango, et al. **2012**. "Characterization of a novel dextransucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough." *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- [2] Amari, Myriam, Sandrine Laguerre, et al. **2012**. "Genome sequence of *Weissella confusa* LBAE C39-2, isolated from a wheat sourdough." *Journal of bacteriology* 194(6):1608–9. Retrieved December 1, **2013** (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3294846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- [3] Bounaix, Marie-Sophie et al. **2010**. "Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs evidence of constitutive dextransucrase expression." *FEMS microbiology letters* 311(1):18–26. Retrieved November 30, **2013** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20722740>).
- [4] Bowen, W. H., and H. Koo. **2011**. "Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms." *Caries research* 45:69–86.
- [5] Brelles-mariño, Graciela. **2012**. "Challenges in Biofilm Inactivation : The Use of Cold Plasma as a New Approach." 2(4):2–5.
- [6] Cao, Y., Yang, P., Lu, X., Xiong, Z., Ye, T., Xiong, Q., Sun, Z. **2011**. "Efficacy of Atmospheric Pressure Plasma as an Antibacterial Agent Against *Enterococcus Faecalis* in Vitro No Title." *Plasma Science and Technology* 13(1):93–98.
- [7] Doumèche, B., L. Galas, H. Vaudry, and P. Di Martino. **2007**. "Membrane Foulants Characterization in a Drinking Water Production Unit." *Food and Bioprocess Processing* 85:42–48. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308507705734>).
- [8] Ermolaeva, Svetlana a et al. **2011**. "Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds." *Journal of medical microbiology* 60(Pt 1):75–83. Retrieved December 1, **2013** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829396>).
- [9] Flemming, Hans-Curt, and Jost Wingender. **2010**. "The biofilm matrix." *Nature reviews. Microbiology* 8:623–33.
- [10] Fricke, Katja et al. **2012**. "Atmospheric pressure plasma: a high-performance tool for the efficient removal of biofilms." *PloS one* 7(8):e42539. Retrieved November 29, **2013** (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3412829&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

- [11] Geeraerd, a H., V. P. Valdramidis, and J. F. Van Impe. **2005**. "GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves." *International journal of food microbiology* 102(1):95–105. Retrieved November 7, **2013** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893399>).
- [12] Hall-Stoodley, Luanne, J. William Costerton, and Paul Stoodley. **2004**. "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nature reviews. Microbiology* 2:95–108.
- [13] Houari, Ahmed, Damien Seyer, Karima Kecili, Véronique Heim, and Patrick Di Martino. **2013**. "Kinetic development of biofilm on NF membranes at the Méry-sur-Oise plant, France." *Biofouling* 29:109–18. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927014.2012.752464>).
- [14] Joshi, Suresh G. et al. **2010**. "Control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in planktonic form and biofilms: a biocidal efficacy study of nonthermal dielectric-barrier discharge plasma." *American journal of infection control* 38(4):293–301. Retrieved November 21, **2013** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085853>).
- [15] Kamgang, J. O., R. Briandet, J. M. Herry, J. L. Brisset, and M. Naïtali. **2007**. "Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of Staphylococcus epidermidis using a gliding discharge in humid air." *Journal of applied microbiology* 103(3):621–28. Retrieved December 2, **2013** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714395>).
- [16] Kilcoyne, Michelle, Jared Q. Gerlach, Mark P. Farrell, Veer P. Bhavanandan, and Lokesh Joshi. **2011**. "Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format." *Analytical biochemistry* 416:18–26.
- [17] Mackintosh, James A., Duncan A. Veal, and Peter Karuso. **2005**. "Fluoroprofile, a fluorescence-based assay for rapid and sensitive quantitation of proteins in solution." *Proteomics* 5:4673–77.
- [18] Maisch, Tim et al. **2012**. "Contact-free inactivation of Candida albicans biofilms by cold atmospheric air plasma." *Applied and environmental microbiology* 78(12):4242–47. Retrieved December 1, **2013** (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3370520&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- [19] Marcato-Romain, C. E., V. Dossat-Létisse, E. Paul, Y. Pechaud, and E. Girbal-Neuhauser. **2012**. "Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments." *Biofouling* 28:305–14.
- [20] Marchal, F. et al. **2012**. "Inactivation of Gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure." *Journal of Physics D: Applied Physics* 45(34):345202. Retrieved November 11, 2013 (<http://stacks.iop.org/0022-3727/45/i=34/a=345202?key=crossref.1ca097870f0d23bc3af8f418173d4e88>).
- [21] Marconnet, C. et al. **2011**. "Membrane biofouling control by UV irradiation." *Desalination* 276:75–81.
- [21] Di Martino, P. et al. **2007**. "Assessing chemical cleaning of nanofiltration membranes in a drinking water production plant: a combination of chemical composition analysis and fluorescence microscopy." *Water Sci Technol* 55:219–25. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17546990).
- [22] Matthes, Rutger, Ina Koban, et al. **2013**. "Antimicrobial Efficacy of an Atmospheric Pressure Plasma Jet Against Biofilms of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus epidermidis." *Plasma Processes and Polymers* 10(2):161–66. Retrieved December 1, **2013** (<http://doi.wiley.com/10.1002/ppap.201100133>).
- [23] Matthes, Rutger, Claudia Bender, et al. **2013**. "Antimicrobial efficacy of two surface barrier discharges with air plasma against in vitro biofilms." *PloS one* 8(7):e70462. Retrieved November 14, **2013**

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3722131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

[24] Rebière-Huët, Julie, Patrick Di Martino, Olivier Gallet, and Christian Hulen. **1999**.

“Interactions de protéines de membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* avec la fibronectine plasmatique. Recherche d’adhésines bactériennes.” *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322(12):1071–80. Retrieved

(<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0764446999001067>).

[25] Sarrette, J. P., S. Cousty, N. Merbahi, a. Nègre-Salvayre, and F. Clément. **2009**. “Observation of antibacterial effects obtained at atmospheric and reduced pressures in afterglow conditions.” *The European Physical Journal Applied Physics* 49(1):13108. Retrieved December 3, **2013**

(<http://www.epjap.org/10.1051/epjap/2009169>).

[26] Sladek, R. E. J., S. K. Filoche, C. H. Sissons, and E. Stoffels. **2007**. “Treatment of *Streptococcus mutans* biofilms with a nonthermal atmospheric plasma.” *Letters in applied microbiology* 45(3):318–23. Retrieved December 3, 2013

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718846>).

[27] Stewart, P. S., and J. William Costerton. **2001**. “Antibiotic resistance of bacteria in biofilms.” *The Lancet* 358:135–38.

[28] Vleugels, M. et al. **2005**. “Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control.” *IEEE Transactions on Plasma Science* 33.

[29] Xiong, Z., T. Du, X. Lu, Y. Cao, and Y. Pan. **2011**. “How deep can plasma penetrate into a biofilm?” *Applied Physics Letters* 98:221503. Retrieved

(<http://link.aip.org/link/APPLAB/v98/i22/p221503/s1&Agg=doi>).

[30] Yousfi, Mohammed, Nofel Merbahi, Atul Pathak, and Olivier Eichwald. **2013**. “Low-temperature plasmas at atmospheric pressure: toward new pharmaceutical treatments in medicine.” *Fundamental & clinical pharmacology* 1–13. Retrieved

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432667>).