HAL
open science

Interactions entre la macroalgue brune Laminaria digitata et ses épibiontes bactériens : études moléculaire et spectroscopiques : capacité d'adhésion et de formation de biofilm

Stéphanie Salaün

▶ **To cite this version:**

Stéphanie Salaün. Interactions entre la macroalgue brune Laminaria digitata et ses épibiontes bactériens : études moléculaire et spectroscopiques : capacité d'adhésion et de formation de biofilm. Biologie moléculaire. Université de Bretagne Sud, 2009. Français. NNT : . tel-01110841

HAL Id: tel-01110841

https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01110841

Submitted on 29 Jan 2015

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

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

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

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

pour obtenir le titre de :
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE SUD

École Doctorale Santé Information Communication Matière et Mathématiques – SICMA
Mention : Biologie Santé

présentée par
Stéphanie Salaün

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche 7139
CNRS-UPMC Paris VI
Végétaux marins et biomolécules

Interactions entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épibiontes bactériens : Etudes moléculaire et spectroscopiques, et capacité d'adhésion et de formation de biofilm

Thèse soutenue le 12 novembre 2009,
devant le jury composé de :

Bernard BANAIGS
Chargé de Recherche INSERM / *rapporteur*

Christian JEANTHON
Directeur de Recherche CNRS / *rapporteur*

Nathalie BOURGOUGNON
Professeur Université de Bretagne Sud / *examinateur*

Yannick LERAT
Responsable Service Valorisation Industrielle CEVA / *examinateur*

Gilles SALVAT
Docteur AFSSA / *examinateur*

Valérie STIGER-POUVREAU
Enseignant Chercheur Institut Universitaire Européen de la Mer / *examinateur*

Alexis BAZIRE
Enseignant Chercheur Université de Bretagne Sud / Co-directeur de thèse

Stéphane LA BARRE
Chargé de Recherche CNRS / Directeur de thèse

« Chaque publication scientifique ne sert qu'à poser 10, 20 questions. Chaque découverte scientifique est passionnante parce qu'elle ouvre un univers de questions. Si les questions vous angoissent, ne soyez pas scientifique ».

Boris Cyrulnik

REMERCIEMENTS

Ce projet de thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans le financement précieux de la Région Bretagne, à laquelle j'exprime toute ma gratitude.

Je tiens tout spécialement à remercier chaleureusement Messieurs Dominique Haras et Stéphane La Barre, pour avoir élaboré ce projet de thèse. Ils m'ont ainsi offert l'opportunité de faire mes premiers pas de scientifique sur un travail de recherche passionnant et prometteur : le monde des bactéries et des biofilms. Ils m'ont, par la même occasion, donné la responsabilité d'ouvrir une nouvelle thématique de recherche à la Station Biologique de Roscoff, et je les en remercie encore pour cette confiance accordée. Enfin, un grand merci pour m'avoir permis d'apprendre bien plus que le métier de chercheur et de m'avoir fait grandir.

Je tiens également à remercier Monsieur Alexis Bazire pour avoir pris en charge la suite de Dominique dans la co-direction de ma thèse, lors de cette troisième et dernière année. Prendre une thèse en cours de route et surtout vers la fin, n'est pas chose facile, surtout en pareils conditions. Ta venue dans ce projet a permis de donner le petit coup de fraîcheur qu'il fallait pour terminer ce travail, et je t'en remercie d'autant plus Alexis. Merci également pour les relectures de ce manuscrit.

J'adresse toute ma reconnaissance à Madame Nathalie Bourgougnon pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, ainsi qu'à Christian Jeanthon et Bernard Banaigs, rapporteurs, pour avoir donné de leur temps afin d'assurer la lourde tâche de juger ce manuscrit. Enfin, en grand merci également aux autres membres du jury, Yannick Lerat, Gilles Salvat et Valérie Stiger-Pouvreau, pour me faire l'honneur de juger ces trois années de recherche et pour être présent le jour de ma soutenance.

Je remercie chaleureusement Monsieur Philippe Potin, pour m'avoir accueillie dans son équipe « Biochimie des défenses des algues », pour sa gentillesse, pour son soutien durant ces trois années passées en sa compagnie, et pour le partage de sa passion des algues et plus particulièrement de leur mécanisme de défense. Elles sont trop fortes ces algues ! Et surtout, un grand merci pour les relectures de ce manuscrit et ses précieux conseils, sans quoi ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui.

Cette thèse a été réalisée à la Station Biologique de Roscoff, dans l'UMR7139 « Végétaux Marins et Biomolécules » de Madame Catherine Boyen. Je lui exprime donc mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie. Mais je tiens plus particulièrement à la remercier pour m'avoir soutenue et épaulée lors de certains choix difficiles à faire durant cette thèse.

J'exprime ici mes plus sincères remerciements à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer, ou que j'ai pu côtoyer durant ces trois courtes années de thèse :

A Nelly Kervarec, du service de RMN à Brest. Que de temps passé ensemble, devant tous ces jolis spectres HR-MAS acquis sur mes petites bactos ! Que de fous-rires, de bonne humeur, de confidences…Je suis fière d'avoir passé tous ces moments avec toi, et te remercie grandement pour tout le temps que tu m'as consacré pour réaliser cette thèse.

A tout le personnel du LBCM de Lorient, avec qui j'ai passé d'excellents moments inoubliables. En particulier : Xaviera pour tous ces moments à faire, et refaire et re-refaire ces spectres MALDI, mais aussi pour le soutien mutuel de par notre histoire commune de thésarde ; Manue, la reine du confocal et de la bonne humeur, sans toi, je te le dis, le LBCM sera perdu ! ; David, le tombeur de ces dames ; Laure, ta fraîcheur et tes blagues pourries, surtout, ne change

rien ! ; Laurène, miss bisous et ma colloc de choc ; Gaël et Johan, un grand merci pour avoir partagé l'espace de vos éponges avec mes petites Laminaires, les vitres de l'aquarium s'en souviennent ! ; Karine et Alain pour votre gentillesse et votre soutien ; Florence, la ravissante secrétaire ; mais aussi Gaëlle, Anne-Cé, Hoï-Khuan, Isabelle, Chrystel, Koki, Jat et Julius. A tous, merci, merci beaucoup pour ces presque trois mois passés à vos côtés, et ces quelques jours par-ci par-là. Je suis venue à reculons, et repartie à contrecœur !

Et bien sûr, à toutes les personnes de l'UMR 7139 et de la SBR, avec qui j'ai passé de supers moments, et qui ont su faire de ses années de thèse une agréable ambiance de travail. Merci beaucoup pour vos conseils, pour votre joie de vivre, pour ces moments de détente, de fous-rires, de plaisir gustatifs aussi, et j'en passe…Alors, pour tout ça, je remercie dans un premier temps tous les thésards, passés et présents : Audrey et François (vive les coups de déprime dans notre équipe, balayés par les apéros maison corsés d'Audrey), Andrès(bienvenue dans le monde des biofilms !), Aude, Etienne et Jan (mes collègues de bureau préférés), Diane, Simon, Sarah, P-O, Marion, Jérôme, Bernhard, ma p'tite Maud, Thomas, Aurélie, Nathalie. Aux chefs d'équipe : Philippe, Mirjam, Marc, Bénédicte, William etCatherine B. Et puis, encore merci à tous les autres de cette UMR de choc : Alex (une super amie que je me suis fait là !!),Ludo, Mumu (Vive la musique !!), Gaëlle (ma belle Gaëlle, je t'adore !), Sabine (notre mère poule préférée), Jystina, Catherine L, Romain, Sylvie (ma voisine de paillasse et binôme d'anglais), Agnès, Tristan (pour tes coups de gueule et ta passion pour les bactéries),Jonas, Pi, Gurvan, Thierry, Bernard, Lionel, Maude, Suzanna, Maryvonne, Florian et Jess (mes deux stagiaires). Aux autres UMR de la station (la liste est trop longue pour en énumérer toutes les personnes, mais le cœur y est !). Et enfin, à tous ceux qui font fonctionner ce lieu de travail privilégié : Brigitte de l'accueil, Martine à la laverie, les femmes de ménage avec mention spéciale pour Marie-Noëlle, le personnel du Gulf Stream, de l'administration, de la bibliothèque, du service info, de l'atelier en particulier Jack et son sifflement musical, le service mer, les gardiens, et enfin, Bernard Kloareg pour gérer tout ce petit monde !

Enfin, je voudrai conclure ces remerciements en m'adressant à ma famille et à mes amis. En particulier, à mes parents, pour avoir toujours cru en moi dès ma plus tendre enfance à trainer toutes mes journées de vacances à la plage, les fesses dans les mares à regarder et toucher les « bébettes », et pour m'avoir permis de faire de cette passion mon travail. Un grand merci à Thomas, pour sa patience, pour son amour, pour avoir su gérer mes crises d'angoisse, et pour m'avoir permis de rédiger dans les meilleurs conditions qu'il puisse y avoir, en me cuisinant de bons petits plats et en gérant la vie quotidienne. La vie à deux ne fait que commencer ! A tous, un grand merci pour votre confiance sans faille pour moi, votre soutien, vos encouragements et les moments de détente passés en votre compagnie.

A toutes les personnes citées et les autres que j'aurai pu oublier : MERCI ! ! !

SOMMAIRE

Liste des abbréviations……7

Table des illustrations……9

Avant-propos……..13

CHAPITRE I INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE……15

I - Biofilm.....15
I.A - Définition.....15
I.B - Les mécanismes de formation d'un biofilm 16
I.B.1 - Film conditionnant.....17
I.B.2 - Transport des bactéries vers le support.....18
I.B.3 - Adhésion des bactéries.....20
I.B.3.1 - Adhésion réversible.....20
I.B.3.2 - Adhésion irréversible 22
I.B.4 - Maturation du biofilm.....23
I.B.4.1 - Structure des biofilms 24
I.B.4.2 - Perte des appendices de surface.....25
I.B.4.3 - Rôle du glycocalyx : une matrice structurale et protectrice 26
I.B.4.4 - Quorum-sensing.....28
I.B.5 - Détachement de cellules bactériennes 31
I.B.5.1 - Dispersion passive 32
I.B.5.2 - Dispersion active 32
I.C - Avantage de la vie en biofilm 34
I.D - Les problèmes liés aux biofilms 35
I.D.1 - Biofilms associés à des bactéries pathogènes 35
I.D.2 - Biofilm et salissures marines 36

II - Interactions bactéries-algues 40
II.A - Complexité de l'interaction bactéries-surfaces organiques.....40
II.B - Intérêt de la recherche sur les bactéries marines associées aux macroalgues 41
II.B.1 - Métabolites secondaires des bactéries marines.....42
II.B.2 - Métabolites secondaires des macroalgues 45
II.B.2.1 - Chez les Chlorophytes 45
II.B.2.2 - Chez les Rhodophytes 47
II.B.2.3 - Chez les Heterokontophytes 49
II.C - Modèles d'interaction algues-bactéries.....52
II.C.1 - Chez les Chlorophytes.....52
II.C.2 - Chez les Rhodophytes 54
II.C.3 - Chez les Heterokontophytes 56
II.D - Bactéries pathogènes chez les algues marines.....58

III - Modèle d'étude : *Laminaria digitata* 59
III.A - Ses caractéristiques biologiques 59
III.A.1 - L'algue et sa position phylogénétique 59
III.A.2 - L'algue et son écologie 60
III.A.3 - Son cycle de vie et sa morphologie 61
III.A.4 - Sa paroi et l'importance de son composé majoritaire : l'alginate 63
III.B - Ses mécanismes de défense 65
III.B.1 - Pathologies rencontrées chez les Laminaires 66
III.B.2 - Reconnaissance du pathogène 67
III.B.2.1 - Eliciteur endogène : les blocs GG 68
III.B.2.2 - Eliciteur exogène : les LPS d'origine bactérienne 69
III.B.3 - Réponses de défense connues chez cette macroalgue 69
III.B.3.1 - Le burst oxydant 70
III.B.3.2 - L'iode et les composés organiques halogénés volatils 71
III.B.3.3 - Les composés phénoliques : implication des phlorotanins ? 76
III.B.3.4 - Les oxylipines 78
III.B.3.5 - Les Aldéhydes polyinsaturés volatils 80
III.B.3.6 - Le mannitol : rôle dans la défense ? 83

Objectifs de l'étude 85

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES 87

I - Matériel végétal 87
I.A - Echantillonnage et conditionnement 87
I.B - Observation des sporophytes au MEB 88
I.C - Elicitation des plantules par les oligoguluronates 89
I.C.1 - Préparation des oligoguluronates (GG) 89
I.C.2 - Elicitation des plantules 89
I.D - Extraction de métabolites 90

II - Matériel bactérien 91
II.A - Isolement des bactéries cultivables associées à *L. digitata* 91
II.B - Souches bactériennes marines de référence 91
II.B.1 - Souches bactériennes provenant de l'Ifremer 92
II.B.2 - Souches bactériennes provenant du LBCM 92
II.B.3 - Souches bactériennes provenant de la SBR 93
II.C - Milieux de culture 93
II.C.1 - ZoBell 93
II.C.2 - VNSS modifié (Väätänen nine-salt solution) 94
II.C.3 - CN (Cétrimide – Acide nalidixique) 94
II.D - Cryoconservation des souches isolées 94

III - Etude moléculaire des souches bactériennes 95
III.A - Taxonomie moléculaire des bactéries cultivables 95
III.A.1 - Amplification des gènes de l'ADN ribosomal 16S 95

III.A.2 - Séquençage des ADNr 16S amplifiées 96
III.A.3 - Analyses phylogénétiques 96
III.A.4 - Numéros d'accession des souches 97
III.B - Vers une taxonomie moléculaire des bactéries associées totales 97
III.B.1 - Amplification des gènes de l'ADN ribosomal 16S bactérien.....97
III.B.2 - Amplification des gènes des régions ITS 97
III.B.3 - Extraction de l'ADN bactérien de surface.....98

IV - Etudes spectroscopiques des souches bactériennes cultivables 100
IV.A - Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....100
IV.A.1 - RMN ^{1}H-HRMAS 101
IV.A.2 - RMN 1D et 2D 102
IV.B - MALDI-ToF MS 103

V - Capacité d'adhésion et de formation de biofilm des souches bactériennes cultivables 106
V.A - Adhésion des souches bactériennes sur microplaques 96 puits 106
V.A.1 - Protocole.....106
V.A.2 - Choix de la microplaque 108
V.A.3 - Etude de l'adhésion.....109
V.A.3.1 - En EMSF 109
V.A.3.2 - En présence de métabolites extraits de L. digitata 110
V.A.3.3 - En présence d'exsudats de L. digitata 111
V.A.3.4 - En présence de métabolites individuels 111
V.B - Formation de biofilm en chambres à flux 114
V.B.1 - Mise en place du système 114
V.B.1.1 - Première étape : l'adhésion des bactéries.....115
V.B.1.2 - Deuxième étape : la formation des biofilms.....116
V.B.2 - Etude de la formation de biofilm dans différentes conditions de culture.117
V.B.2.1 - En milieu de culture ZoBell.....117
V.B.2.2 - En présence d'exsudats d'algues dans le milieu de culture ZoBell 117
V.B.2.3 - En présence de métabolites individuels dans le milieu de culture ZoBell..118

CHAPITRE III NOUVELLES APPROCHES POUR LA CARACTERISATION DE BACTERIES MARINES EPIPHYTES ISOLEES DE *L. DIGITATA* 121

I - Isolement et suivi saisonnier des populations bactériennes cultivables 123
I.A - Observation au MEB de la surface d'un sporophyte de *L. digitata*.....123
I.B - Isolement des souches bactériennes associées.....123

II - Taxonomie moléculaire d'une sélection d'isolats bactériens 125
II.A - Amplification du gène de l'ADNr 16S 125
II.B - Etude phylogénétique.....126

III - Identification bactérienne par des outils spectroscopiques.....129
III.A - Spectrométrie de masse MALDI-ToF 129

III.A.1 - Réalisation et validation de la banque de données spectrales 129
III.A.2 - Acquisition de nouveaux spectres sur milieu riche.....131
III.A.3 - Acquisition de spectres sur milieu minimum 133
III.B - La Résonance Magnétique Nucléaire 133
III.B.1 - Similitudes dans le profilage métabolique en RMN ^{1}H HR-MAS 133
III.B.2 - Identification de composés par RMN en solution.....137

IV - Vers une analyse phylogénétique de la microflore associée totale 141
IV.A - Amplification des régions ITS et 16S des bactéries cultivables 141
IV.A.1 - Les régions ITS.....141
IV.A.2 - Les régions 16S 142
IV.B - Extraction de l'ADN 16S de surface 143

V - Discussion générale.....146
V.A - La spectrométrie de masse MALDI-ToF fournie un outil utile pour l'identification rapide de bactéries marines 146
V.B - La spectrométrie RMN, un outil complémentaire puissant pour les études physiologique et chimiotaxonomique.....148
V.C - Combinaison de la taxonomie moléculaire, la MALDI-ToF – MS et la spectrométrie RMN. 151

CHAPITRE IV CAPACITE D'ADHESION ET DE FORMATION DE BIOFILM DES SOUCHES BACTERIENNES ETUDIEES.....153

I - Capacité d'adhesion.....154
I.A - Choix de la microplaque.....154
I.B - Etude de l'adhésion des souches bactériennes étudiées 155
I.B.1 - Capacité d'adhésion en eau de mer.....155
I.B.1.1 - Etude de la reproductibilité.....155
I.B.1.2 - Synthèse des résultats d'adhésion.....156
I.B.2 - Capacité d'adhésion en présence de métabolites extraits de *L. digitata*....158
I.B.3 - Capacité d'adhésion en présence d'exsudats de *L. digitata*.....160
I.B.4 - Capacité d'adhésion en présence de métabolites purs 162
I.B.4.1 - Mannitol 163
I.B.4.2 - Diiodométhane.....164
I.B.4.3 - Stabrex ST40®.....165

II - Formation de biofilm.....167
II.A - En milieu de culture ZoBell 167
II.A.1 - A 2h d'adhésion en statique.....167
II.A.2 - A 24h de biofilm en flux dynamique.....169
II.B - En présence d'exsudats de *L. digitata* (approche biomimétique) 173
II.C - En présence de métabolites purs (approche individuelle) 179
II.C.1 - Mannitol.....180
II.C.2 - Diiodométhane 183

III - Discussion générale.....188

CHAPITRE V CONCLUSION ET PERSPECTIVES……...197

I - Conclusion.....197

II - Perspectives 200

Références bibliographiques……...…205

Annexes……..…..…233

LISTE DES ABBREVIATIONS

1D, 2D, 3D	Une, deux, trois dimensions
13-HOTrE	Acide-13-hydroxyoctadecatrienoïque
15-HEPE	Acide hydroxyeicosapentaenoïque
4-HDDE	4-hydroxydodéca-2,6-diénal
4-HHE	(*E*)-4-hydroxyhex-2-enal
4-HNE	(*E*)-4-hydroxynon-2-enal
γ-PGA	Acide poly-DL-glutamique
ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
AHL, HSL	N-acyl homosérine lactone
AIP	AutoInducing Peptides
ARISA	Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search
Br	Brome
CARD-FISH	CAtalyzed Reporter Deposition Fluorescence *In Situ* Hybridization
C-EtAc	Extrait de crampons à l'acétate d'éthyle
CFB	*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes*
C_2H_5I	Iodoéthane
CHV	Composé halogéné volatil
CH_2I_2	Diiodométhane
CH_3I	Iodométhane
CH_3Br	Bromométhane
CH_3Cl	Chlorométhane
CH_2ICl	Chloroiodométhane
CH_2IBr	Bromoiodométhane
$CHIBr_2$	Iododibromométhane
$CHBr_3$	Bromoforme
CH_2Br_2	Dibromométhane
$CHBr_2Cl$	Dibromochlorométhane
C_2H_5Br	Bromoéthane
Cl	Chlore
C-MeOH	Extrait de crampons au méthanol
COHV	Composé organique halogéné volatil
COSY	COrrelation SpectroscopY
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DGGE	Denaturant Gradient Gel Electrophoresis
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DPI	Diphénylène iodonium
EOR	Espèces oxygénées réactives
EM	Eau de mer
EMSF	Eau de mer stérile filtrée
EM+Alg	EM filtrée restée au contact de plantules non stressées pendant 1h30
EM+Alg+GG	EM filtrée restée 1h30 au contact de plantules stressées aux GG

EPS	Exopolysaccharides
EtAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
FC	Flow Cells
GG	Oligoguluronates
H_2O mQS	Eau milliQ stérile
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HOBr	Acide hypobromeux
HRMAS	High Resonance Magic Angle Spinning
I	Iode
I^-	Iodure
IPO	Iodoperoxydase
ITS	Internal Transcribed Spacer ou espaceur intergénique
LBCM	Laboratoire de Biotechnologies et de Chimie Marine
L-MeOH	Extrait de lames au méthanol
LPS	Lipopolysaccharide
M1PDH	Mannitol-1-phosphate déshydrogénase
MALDI-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
MCBL	Microscopie confocale à balayage laser
MDA	Malonaldéhyde
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MeJA	Jasmonate de méthyle
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MeOH	Méthanol
MF	Matière Fraîche
ML	« Maximum Likelihood » ou méthode de maximum de vraisemblance
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
NJ	Neighbour-Joining
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIXE	Particle Induced X-ray Emission
PVC	Chlorure de polyvinyle
QS	Quorum sensing
RBS	Rutherford Backscattering Spectrometry
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SBR	Station biologique de Roscoff
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
S-EtAc	Extrait de stipes à l'acétate d'éthyle
S-MeOH	Extrait de stipes au méthanol
TBT	Tributylétain
UBS	Université de Bretagne Sud
UBO	Université de Bretagne Occidentale
UEB	Université Européenne de Bretagne
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultra Violet
v-HPO	Haloperoxydase dépendante du vanadium
VNSS	Väätänen nine-salt solution

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures :

Figure 1 : Surfaces de macroalgues recouvertes d'organismes épiphytes.....13

Figure 2 : Représentation schématique du cycle de vie d'un biofilm 16

Figure 3 : Représentation schématique de la structure externe des bactéries, avec notamment les appendices générateurs de mouvement.....19

Figure 4 : Structures tridimensionnelles de biofilm bactérien. 25

Figure 5 : Biofilm de *Staphylococcus* spp. englué dans un glycocalyx sur une surface inerte, observé au microscope électronique à balayage 27

Figure 6 : Modèle généralisé du quorum sensing régulé par les molécules-signal HSL chez une bactérie à Gram négatif.....30

Figure 7 : Etape de la dispersion chez la souche sauvage *P. aeruginosa* PAO1 cultivée en chambre à flux. 33

Figure 8 : Représentation schématique de la formation du macro-fouling marin (les salissures).....37

Figure 9 : Macro-salissures sur diverses surfaces ayant séjournées plusieurs mois en eau de mer 37

Figure 10 : Représentation schématique des facteurs chimique, physique et biologique influençant la fonction et la diversité de la communauté microbienne associée aux surfaces marines vivantes.....41

Figure 11 : Représentation des structures chimiques de composés naturels produits par la bactérie marine *Pseudoalteromonas luteoviolacea*.....43

Figure 12 : Représentation des structures chimiques de composés naturels produits par la bactérie marine *Pseudoalteromonas tunicata.*.....44

Figure 13 : Représentation des structures chimiques des composés naturels produits par les Chlorophytes.....46

Figure 14 : Représentation des structures chimiques des composés naturels produits par les Rhodophytes. 48

Figure 15 : Représentation des structures chimiques des composés naturels produits par les Heterokontophytes. 51

Figure 16 : Différentes morphologies observées chez l'algue verte *Ulva lactuca* 53

Figure 17 : Cellules bactériennes visualisées *in situ* sur l'algue verte *Ulva lactuca* par la technique CARD-FISH en microscopie confocale à balayage laser.....53

Figure 18 : Inhibition du quorum sensing par l'algue rouge marine *Delisea pulchra*....55

Figure 19 : Analyse moléculaire par DGGE d'échantillons d'ADN bactériens extraits de *Saccharina latissima* 57

Figure 20 : Arbre phylogénétique des eucaryotes.....60

Figure 21 : Représentation schématique de l'étagement des ceintures de macroalgues brunes sur un estran breton en mode abrité ou semi-abrité 61

Figure 22 : Morphologie d'un sporophyte de *Laminaria digitata*. 62

Figure 23 : Cycle digénétique hétéromorphe de *L. digitata* 62

Figure 24 : Schéma d'interprétation de la structure pariétale des Phéophycées 63

Figure 25 : Structure des unités chimiques de l'alginate, composant principal de la paroi de *L. digitata* 64

Figure 26 : Thalles de *L. digitata* sains et infectés par des endophytes et des bactéries, récoltées dans une population sauvage de l'île de Sieck en Bretagne 67

Figure 27 : Cinétique de l'émission de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en nanomoles par gramme de matière fraîche (MF) de frondes de *L. digitata*..... 71

Figure 28 : Schéma d'interprétation de la localisation de l'accumulation d'iode inorganique dans les sporophytes de *L. digitata*. 73

Figure 29 : Cartographies de trois composés halogénés (Chlore : Cl ; Brome : Br ; Iode : I) au niveau des tissus périphériques de coupes transversales de stipe de *L. digitata*..... 74

Figure 30 : Sections de thalles de *L. digitata*, prétraités ou non par des oligoguluronates, prises 34 jours après l'inoculation avec le pathogène *L. tomentosoides*. 78

Figure 31 : Comparaison de la production d'aldéhydes dans l'eau de mer et l'espace de tête environnants des sporophytes de *L. digitata* après différents traitements 81

Figure 32 : Site d'échantillonnage des sporophytes de *Laminaria digitata*. 87

Figure 33 : Représentation schématique des différentes étapes du protocole d'adhésion des bactéries. 107

Figure 34 : Représentation schématique du montage pour créer et étudier la formation des biofilms. 114

Figure 35 : Observation en microscopie électronique à balayage de la surface des différentes parties d'un thalle de *L. digitata*. 122

Figure 36 : Isolement sur boîtes de Petri de bactéries épiphytes de *L. digitata* selon deux techniques. 124

Figure 37 : Représentation graphique de la variation saisonnière des isolats bactériens associés aux différentes parties de sporophytes de *L. digitata*. 124

Figure 38 : Produits d'amplification PCR du gène d'ADNr 16S des souches bactériennes isolées de *L. digitata* et de référence, sur gel d'électrophorèse agarose 1 %. 125

Figure 39 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode de maximum de vraisemblance montrant les liens phylogénétiques entre 68 séquences basées sur les gènes d'ADNr 16S des souches bactériennes associées à *L. digitata* de référence et des données additionnelles. 127

Figure 40 : Superposition des spectres de RMN ^{1}H HR-MAS (δ = 0,5 – 4,5 ppm) de souches bactériennes isolées de thalles de *L. digitata* ou d'échantillons environnementaux, classés selon leur appartenance phylogénétique.....134

Figure 41 : ACP avec le logiciel AMIX (Bruker) sur les spectres RMN ^{1}H HR-MAS normalisés de cultures bactériennes sur milieu de culture ZoBell – Agar. 135

Figure 42 : Comparaison de spectres RMN ^{1}H HR-MAS de souches bactériennes cultivées sur milieux de culture ZoBell et VNSS. 136

Figure 43 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2 % des produits PCR des régions ITS de souches bactériennes isolées de *L. digitata*. 141

Figure 44 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2 % des produits PCR 16S de souches bactériennes isolées de *L. digitata* et digérés par les enzymes de restriction *Xcm I* et *Bgl II*. 143

Figure 45 : Electrophorèses sur gel d'agarose 1 % de deux échantillons d'ADN total extraits de la surface de *L. digitata*, et des produits PCR 16S et ITS. 144

Figure 46 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % des produits PCR 16S digérés avec le couple d'enzymes de restriction *Sca I* / *Mlu I*. 145

Figure 47 : Adhésion bactérienne sur trois types de microplaques 96 puits. 154

Figure 48 : Série n°3 des expériences d'adhésion bactérienne en EMSF sur microplaques 96 puits.....155

Figure 49 : Adhésion des souches bactériennes en microplaques 96 puits co-incubées 2h avec différentes concentrations de mannitol.....163

Figure 50 : Adhésion des souches bactériennes en microplaques 96 puits co-incubées 2h avec différentes concentrations de diiodométhane. 164

Figure 51 : Adhésion des souches bactériennes en microplaques 96 puits co-incubées 2h avec différentes concentrations de Stabrex®, produits commercial composé d'acide hypobromeux. 166

Figure 52 : Adhésion bactérienne en EMSF au bout de 2h en Flow Cell, en condition statique et à 20°C, observée en microscopie confocale à balayage laser en contraste de phase. 168

Figure 53 : Biofilms bactériens formés en chambre à flux en 24h avec du milieu de culture ZoBell, et observés par microscopie confocale à balayage laser. ..170

Figure 54 : Quantification des biofilms bactériens formés en chambre à flux pendant 24h en milieu de culture ZoBell.....172

Figure 55 : Quantification des biofilms bactériens formés en chambre à flux en 24h, avec des exsudats de *L. digitata* dans le milieu de culture ZoBell. 174

Figure 56 : Biofilms de *Pseudomonas* sp. Ld6 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG. 175

Figure 57 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG. 176

Figure 58 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. D41 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG. 177

Figure 59 : Biofilms de *Zobellia galactanivorans* soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG.....178

Figure 60 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG. 179

Figure 61 : Quantification des biofilms bactériens de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en FC en 24h, avec du mannitol à différentes concentrations dans le milieu de culture ZoBell. 180

Figure 62 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en milieu de culture ZoBell plus ou moins enrichi en mannitol.....181

Figure 63 : Quantification des biofilms bactériens de *Z. galactanivorans* formés en chambre à flux en 24h, avec du mannitol à différentes concentrations dans le milieu de culture ZoBell. 182

Figure 64 : Biofilms de *Z. galactanivorans* formés en milieu de culture ZoBell plus ou moins enrichi en mannitol. 183

Figure 65 : Quantification des biofilms bactériens de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en chambre à flux en 24h, avec du diiodométhane dans le milieu de culture ZoBell. 184

Figure 66 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en milieu de culture ZoBell avec ou sans diiodométhane.....185

Figure 67 : Quantification des biofilms bactériens de *Z. galactanivorans* formés en chambre à flux en 24h, avec du diiodométhane dans le milieu de culture ZoBell. 186

Figure 68 : Quantification des biofilms bactériens de *Pseudoalteromonas* sp. D41 formés en chambre à flux en 24h, avec du diiodométhane dans le milieu de culture ZoBell. 187

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Profilage MALDI-ToF de macromolécules (essentiellement des protéines ribosomal) d'une masse comprise entre 2000 et 18000 Da, à partir de souches bactériennes marines cultivées.....132

Tableau 2 : Identification de composés à partir de spectres de souches bactériennes en RMN ^{1}H HR-MAS et en solution, avec une distribution en accord avec la phylogénie du 16S.....138

Tableau 3 : Test de *Student* sur la reproductibilité des valeurs moyennes de fluorescence des souches bactériennes entre les cinq séries d'adhésion. 156

Tableau 4 : Capacité d'adhésion en EMSF de souches bactériennes marines sur microplaques. 157

Tableau 5 : Effet des extraits de métabolites sur l'adhésion de souches bactériennes marines.....159

Tableau 6 : Effet des exsudats de *L. digitata* sur l'adhésion de souches bactériennes marines.....161

Avant propos

Il est désormais admis que toute surface immergée en eau de mer est rapidement couverte d'un biofilm bactérien marin, suivi pour certaines de macroorganismes marins vivants. Lorsque les surfaces sont colonisées par les salissures marines, le phénomène est appelé biosalissures ou biofouling. Mais ce phénomène peut également être appelé « épibiose » lorsque la surface est vivante, alors elle-même appelée « basibionte », et les organismes colonisateurs les « épibiontes ». Par conséquent, les thalles de macroalgues fournissent des surfaces importantes à la formation de biosalissures, et sont donc particulièrement sujets à l'épibiose **(Figure 1)** (Wahl, 1989). A noter que pour les algues, par analogie avec la nomenclature terrestre, les bactéries **(Figure 1C)** et autres organismes associés comme les microalgues **(Figure 1C)** ou même d'autres macroalgues **(Figure 1A et 1B)**, sont aussi définis sous le terme « épiphytes » (Wahl, 1989).

Figure 1 : Surfaces de macroalgues recouvertes d'organismes épiphytes.

(A) Stipe du *Laminaria hyperborea* recouvert d'algues rouges épiphytes. *(Photographie d'après le site internet* http://www.marlin.ac.uk/galleryimage.php?imageid=1894*)*
(B) Algue brune *Ascophyllum nodosum* et son algue rouge éphiphyte *Polysiphonia lanosa*. *(Photographie d'après le site internet* http://www.marlin.ac.uk/galleryimage.php?imageid=1894*)*
(C) Image en microscopie électronique à balayage de la surface de l'algue rouge *Chondrus crispus* recouvert d'épiphytes microscopiques. (*D'après Sieburth & Tootle, 1981)*

Les macroalgues sont d'autant plus sujettes aux biosalissures qu'elles se situent préférentiellement dans les zones trophiques des mers et océans, là où les conditions de croissance pour le zoo- et le phytoplancton sont optimales (de Nys *et al.*, 1995). Cependant, leur surface reste la plupart du temps exempte de macro-salissures, peut-être en relation avec leur succès évolutif, montrant ainsi leurs multiples stratégies de cohabitation avec leurs colonisateurs. Les macroalgues sont donc des modèles naturels de choix, susceptibles d'inspirer des solutions originales aux problèmes causés par les biofilms marins. Elles ont développé un grand nombre de stratégies anti-salissures pour combattre la croissance de ces organismes épiphytes sur leur surface, faisant intervenir les propriétés de surface, ou encore, la production de composés anti-salissures (Clare, 1996). Cependant et paradoxalement, les algues sont bien connues pour émettre de grande quantité de carbone organique (exsudats) et de molécules dans leur environnement proche (Sieburth, 1969), fournissant ainsi un habitat hautement nutritif et osmoprotecteur pour les micro-organismes.

C'est pourquoi, dans la majorité des cas, les populations bactériennes rencontrées sur les surfaces, et notamment celles des macroalgues, sont spécifiques et souvent évolutives au cours de l'année ou même au cours des différents stades du cycle de vie de l'hôte (Laycock, 1974; Prieur *et al.*, 1993). Néanmoins, quelques études récentes suggèrent fortement que le succès de la colonisation bactérienne est plus le résultat de la capacité que les bactéries ont à répondre à la sélection naturelle qu'à leur large tolérance ou leur plasticité physiologique (Lee, 2002). Ces bactéries peuvent avoir des effets positifs comme négatifs sur leur hôte. Ainsi, en terme d'écologie chimique, il semble probable qu'il y ait un rôle « protecteur » de quelques souches bactériennes épiphytes présentes sur les surfaces, qui émettent dans l'eau de mer environnante des composés chimiques faisant obstacle aux biosalissures extensives des surfaces (Armstrong *et al.*, 2001).

La compréhension du mode de vie en biofilm de la plupart des peuplements bactériens associés aux surfaces marines inertes et aux organismes marins a joué un rôle clé dans les développements des études récentes en microbiologie marine. Les études sur ces biofilms sont encore limitées, mais elles se sont largement inspirées des concepts et des méthodes établis pour les microorganismes infectieux ou d'autres bactéries d'origine terrestre.

Introduction bibliographique

Chapitre I Introduction bibliographique

I - BIOFILM

I.A - Définition

Au cours des vingt dernières années, l'étude des populations microbiennes adhérées sur des surfaces hydratées plutôt qu'en suspension a révolutionné la microbiologie. Il avait tout d'abord été observé, depuis presque un siècle, que les bactéries aquatiques sont plus nombreuses sur la surface solide contenant l'échantillon qu'en suspension (Zobell & Allen, 1935; Zobell, 1943). Depuis une trentaine d'années seulement, les microbiologistes se sont concentrés sur l'état des bactéries associées à une surface, appelé le « biofilm ». Les biofilms sont omniprésents et jouent un rôle clé dans tous les écosystèmes, des revêtements des galets des torrents à la plaque dentaire. Depuis sa découverte, la définition d'un biofilm n'a de cesse d'évoluer au fil des recherches.

Le terme biofilm a été proposé pour la première fois par Costerton *et al.*, (1978) pour suggérer que le mode de vie des microorganismes attachés à une surface serait le mode de vie naturel de la plupart des microorganismes dans des systèmes aquatiques. Il y décrivait des bactéries sessiles engluées dans une matrice extracellulaire polysaccharidique appelée « glycocalyx ». Quelques années plus tard, il a été admis que dans l'environnement naturel, la majorité des bactéries se présentait sous cette forme d'agrégation (Costerton, 1995; Davey & O'Toole, 2000).

Aujourd'hui, un biofilm bactérien est défini comme étant un assemblage de cellules bactériennes attachées irréversiblement à un support ou à une interface, enveloppées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires produites par les bactéries elles-mêmes, et qui présentent un phénotype différent de celui des bactéries planctoniques, au niveau du taux de croissance et de la transcription de gènes. Cette définition exclut les Unités Formant une Colonie (UFC) qui se forment à la surface des milieux de culture gélosé des boîtes de Petri, et qui sont en fait les clones d'une même cellule bactérienne, non différenciés et sans les expressions de résistance qui caractérisent un biofilm. Ainsi, le mode de vie en biofilm permet l'expression de phénotypes dépendants de la densité cellulaire ou *quorum sensing*, dont par exemple la

virulence, la pathogénicité, la bioluminescence ou encore la mobilité. Cette définition globale tient compte des connaissances acquises ces trois dernières décennies par des milliers de publications de tous domaines confondus : médecine générale et orthopédique, écologie, microbiologie, matériaux industriels, agroalimentaire et biotechnologies.

I.B - Les mécanismes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est actuellement largement décrite dans la littérature (Pratt & Kolter, 1998; Filloux & Vallet, 2003; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Haras, 2005; Kolter & Greenberg, 2006; La Barre & Haras, 2007). Toutefois, il reste encore de nombreux points à éclaircir, car la formation de biofilm est dépendante de nombreux paramètres environnementaux. L'étude de ce phénomène d'agrégation est donc complexe et relève de l'interdisciplinarité : microbiologie, biologie moléculaire, génétique, physico-chimie de surface…

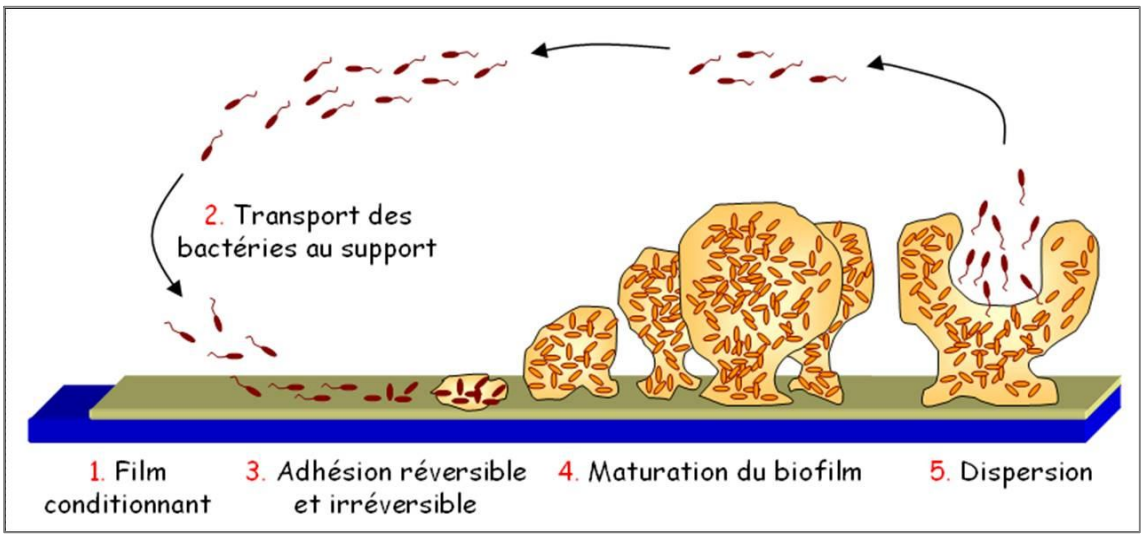


Figure 2 : Représentation schématique du cycle de vie d'un biofilm *(D'après Sauer* et al.*, 2002)*.

(1) Formation d'un film conditionnant par adsorption spontanée de molécules organiques et d'ions présents dans le milieu aqueux
(2) Transport passif et actif des bactéries vers le support
(3) Adhésion réversible puis irréversible des bactéries au support pour former des micro-colonies
(4) Maturation du biofilm grâce à l'accroissement par division de ces bactéries, afin d'agrandir la colonie formée à la surface
(5) Dispersion des bactéries

Aujourd'hui, les scientifiques admettent que les biofilms peuvent, sauf exceptions, se développer sur n'importe quel type de surface organique ou inorganique, tant que les bactéries sont dans un milieu aqueux ou au minimum exposées à l'humidité (le film hydratant). Pour passer de l'état de bactéries en suspension (état planctonique) à celui de bactéries en communautés fixées à un support, c'est-à dire à l'état de biofilm, cinq étapes sont nécessaires et décrites ci-après **(Figure 2)**.

I.B.1 - Film conditionnant

Dès les premières secondes qui suivent l'immersion du support en milieu naturel, il s'ensuit une adsorption spontanée de molécules organiques et d'ions qui couvrent toutes les surfaces exposées. Ce phénomène de conditionnement de surface est appelé « film conditionnant » ou encore « film primaire », faisant référence à une salissure moléculaire du support (Loeb & Neihof, 1975; Little & Zsolnay, 1985; Pasmore & Costerton, 2003; Qian *et al.*, 2007). Ce film conditionnant constitue alors la première étape des mécanismes de formation de biofilm **(Figure 2-1)**.

L'adsorption spontanée est due à l'interaction charge et distance-dépendante, de forces attractives et répulsives (électrostatiques, de van der Waals, et au mouvement Brownien), sur des espèces moléculaire chargées venant à proximité. Celles-ci incluent des protéines ou des peptides (Baier, 1972), des sucres, des lipides, des substances humiques (Loeb & Neihof, 1975; Taylor *et al.*, 1997), et des sels minéraux et organiques (Compère *et al.*, 2001), dont l'adsorption confèrent de nouvelles propriétés physico-chimiques à la surface. Cette adsorption hétérogène est capable de neutraliser partiellement la charge nette et l'énergie libre de la surface, et donc prévenir l'approche des bactéries de la surface. A l'inverse, il résulte de cette accumulation de molécules organiques et inorganiques une concentration plus élevée en nutriments sur le support que dans la phase aqueuse (Kumar & Anand, 1998), créant ainsi des micro-niches favorables à l'adhésion stable des bactéries, qui y trouvent des nutriments disponibles et/ou des molécules organiques avec lesquelles elles peuvent engager des interactions spécifiques.

Cette première étape confère donc un nouveau conditionnement de surface au support, lequel influe sur le choix des souches pionnières et affecte leur cinétique de recrutement sur cette surface (Schneider & Marshall, 1994; Schneider *et al.*, 2006).

I.B.2 - Transport des bactéries vers le support

La deuxième étape de formation de biofilm est le transport des bactéries vers le support nouvellement conditionné **(Figure 2-2)**. Divers signaux environnementaux et nutritionnels vont alors attirer ou au contraire repousser les bactéries planctoniques. La résultante dépend de la nature du milieu dans lequel les bactéries évoluent (viscosité et force ionique), et du mouvement de ce milieu (écoulement, flux, sédimentation). Il existe deux types d'approche des bactéries vers le support.

La première approche, de type passive, est due à l'environnement dans lequel baignent les microorganismes. Ils peuvent alors être déposés sur la surface à coloniser par gravitation, diffusion ou encore par la force de projection d'un flux turbulent (Donlan & Costerton, 2002). De plus, en condition statique (flux nul ou réduit), on considère qu'à plus de 10 nm de distance entre le support et les microorganismes, les interactions sont faibles. Par conséquent, si la particule bactérienne et la surface portent des charges électrostatiques nettes globalement identiques (généralement négatives), ajoutées aux interactions de type van der Walls, elles ont tendance à se repousser. En revanche, à une distance inférieure à 10 nm, les interactions électrostatiques sont plus fortes, favorisant l'attraction des cellules bactériennes sur le support.

La deuxième approche, de type active, met en évidence la mobilité intrinsèque des microorganismes, les conditions statiques favorisant la locomotion autonome des particules bactériennes planctoniques (Thomas *et al.*, 2002). Le déplacement de la bactérie s'effectue généralement grâce à des appendices générateurs de mouvement (*pili*, flagelles) **(Figure 3)**, qui l'aident à se déplacer dans le milieu aqueux pour s'approcher de la surface à coloniser. Toutefois, il faut noter que certaines bactéries utilisent différentes approches pour former les biofilms, comme par exemple *Staphylococcus aureus* et *S. epidermidis*, qui ne possèdent pas de flagelle.

En revanche, chez *Escherichia coli*, la présence de flagelles est importante pour le mouvement du microorganisme le long de la surface, et celle du *pili* pour les interactions initiales avec la surface (Pratt & Kolter, 1998). Ainsi, chez *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste capable d'infecter une multitude d'hôtes comme les nématodes, les insectes, l'homme et même les plantes, la présence de gènes codant pour la formation du *pili* (O'Toole & Kolter, 1998) et la mobilité du flagelle (Vallet *et al.*, 2001) est nécessaire pour la formation du biofilm. Une fois les cellules bactériennes en biofilm, l'expression des gènes codant pour les sous-unités structurales du *pili* est alors diminuée, démontrant le rôle essentiel de ces appendices dans les étapes d'adhésion (Whiteley *et al.*, 2001).

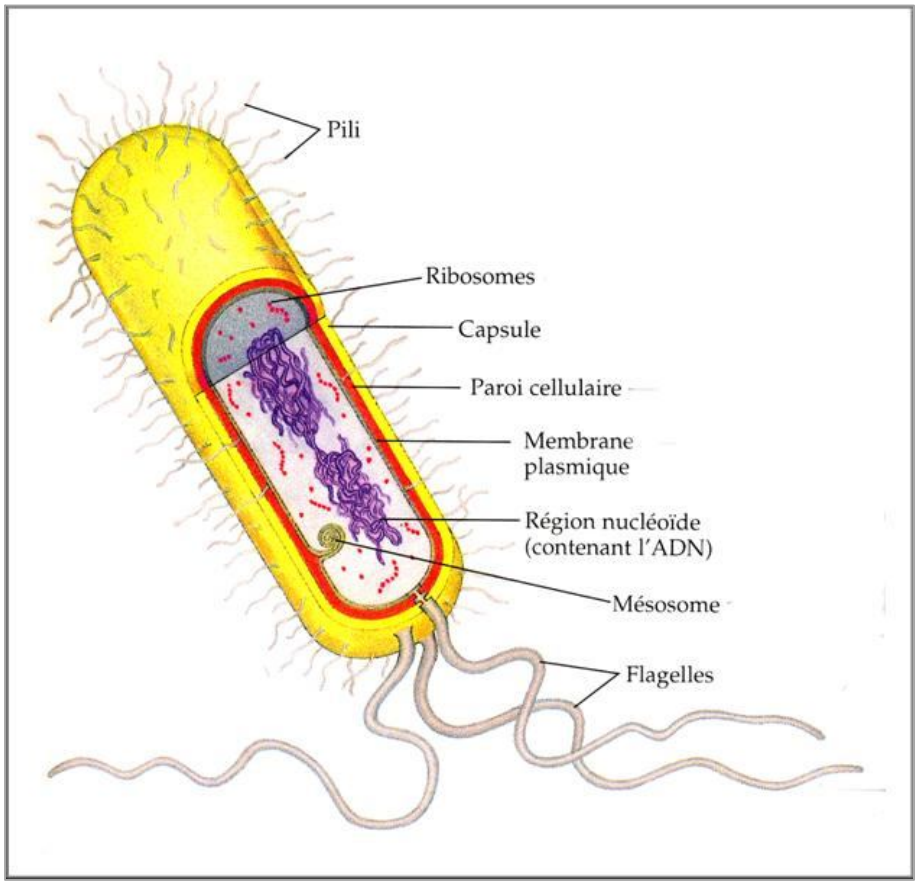


Figure 3 : Représentation schématique de la structure externe des bactéries, avec notamment les appendices générateurs de mouvement *(D'après Genest, 2008)*.

- les flagelles : filaments longs et très fins servant au déplacement de plusieurs types de bactéries
- les *pili* : filaments relativement courts, rigides et servant de moyen d'exploration, de reconnaissance et de fixation à différentes surfaces, d'où la bactérie peut tirer sa nourriture (il existe également les *pili* sexuels servant au transfert de matériel génétique entre bactéries au cours d'un processus appelé conjugaison)

I.B.3 - Adhésion des bactéries

Cette troisième étape dans la formation du biofilm est liée à de nombreux facteurs dépendant des trois principaux acteurs qui sont la surface, le milieu et la bactérie. Cet attachement intervient quelques heures après l'immersion du support **(Figure 2-3)**. Les bactéries non mobiles utilisent des forces d'interactions avec la surface à coloniser, ou bien des éléments situés sur leurs propres surfaces pour faciliter leur attachement, alors que les bactéries mobiles développent également des facteurs d'adhésion impliquant des structures extracellulaires comme les flagelles et les *pili* décrits ci-dessus.

I.B.3.1 - Adhésion réversible

Cette approche des microorganismes vers le support conduit à un attachement transitoire pendant lequel la bactérie va chercher à « évaluer » la surface sur laquelle elle se trouve. Cette première adhésion est appelée « adhésion réversible ». Les cellules bactériennes établissent un premier contact avec la surface et interagissent avec le film conditionnant. Cette adhésion réversible est caractérisée par l'adsorption faible des cellules bactériennes sur la surface par des liaisons chimiques non covalentes. Ces liaisons entre la cellule et la surface d'attachement sont de type van der Waals, électrostatique, ou encore acide-base de Lewis. Elles font intervenir des macromolécules de surface, regroupées sous le terme d'adhésines (Costerton *et al.*, 1978; Costerton *et al.*, 1981), telles que des flagelles, des *pili* de type I et IV, des curli, des protéines, des polysaccharides ou encore des lipopolysaccharides (LPS).

Le rôle du flagelle est démontré chez *P. aeruginosa* par l'étude des mutants *sad* (pour « Surface Attachment Defective ») de la souche PA14, défectueux dans la mobilité du flagelle et n'adhèrant que très faiblement au support (O'Toole & Kolter, 1998). De même, les travaux sur des mutants d'*Escherichia coli* déficients dans la formation de biofilm et dans la biosynthèse des flagelles, mettent en évidence la difficulté de ces mutants à adhérer au support, et donc par la même occasion, montrent le rôle essentiel de la mobilité par rapport au chimiotactisme dans l'attachement des cellules au *substratum* (Pratt & Kolter, 1998). Plus récemment, des travaux sur des mutants de gènes *MotA* et *MotY*, qui codent pour des éléments du moteur du flagelle,

mais dont l'inactivation n'empêche pas l'assemblage, démontrent qu'ils sont incapables d'adhérer à un support, mettant de nouveau en avant l'importance non seulement du flagelle, mais aussi de son fonctionnement normal pour l'attachement au support (Vallet *et al.*, 2001).

Chez *E. coli* comme chez d'autres organismes, les appendices extracellulaires non flagellés tels que les *pili* de type I, autrement appelés *fimbriae* (Pratt & Kolter, 1998), et curli (Prigent-Combaret *et al.*, 2001), jouent un rôle important dans l'adhésion. En effet, une altération du gène *fimH*, qui intervient dans la biosynthèse des *pili* de type I, ne permet plus l'attachement initial des bactéries, et à l'inverse, une augmentation de la production des curli favorise l'attachement des cellules au support. De même, des mutations portant sur le gène *agfB* impliqué dans le fonctionnement des curli de *Salmonella enterica* engendrent une diminution de l'adhésion de ces mutants par rapport aux souches sauvages (Barak *et al.*, 2005). Enfin, il a été mis en évidence chez *P. aeruginosa* un groupe de gène appelé *cup* (pour « Chaperone Usher Pathway ») qui permet l'assemblage de sous-unités de type *fimbriae*. La mutation de ce groupe de gène entraine l'incapacité de ces mutants à adhérer au chlorure de polyvvinyle (PVC, polymère organique). Cette voie *cup* permet l'assemblage de *pili* de type I, qui sont essentiels à l'adhésion d'*E. coli* uropathogènes (Sauer *et al.*, 2000). Quelques bactéries utilisent des protéines de surface ayant une affinité avec des composés ou des matériaux spécifiques qui facilitent l'adsorption, tels que des fibronectines et des ligands de collagène MSCRAMM (pour « Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules ») de *S. aureus*, qui reconnaissent et s'attachent aux cellules de leurs hôtes eucaryotes (Foster & Höök, 1998; Cucarella *et al.*, 2002). D'autre part, des travaux ont montré la production de longs et fins polysaccharides extracellulaires (EPS, pour exopolysaccharides), qui aident à l'adsorption et peuvent former des liaisons chimiques qui permettent l'attachement des bactéries sur la surface de leurs hôtes (Bianciotto *et al.*, 2001). De plus, d'autres recherches montrent l'implication des LPS vis-à-vis de l'adhésion bactérienne, comme par exemple chez l'espèce *Burkholderia cepacia* (DeFlaun *et al.*, 1999).

Par conséquent, l'adhésion réversible de microorganismes mobiles à une surface fait principalement intervenir des liaisons chimiques non covalentes ou faibles. Ces liaisons impliquent surtout des protéines membranaires, de type curli, qui contribuent à l'hydrophobicité des surfaces cellulaires. Cette colonisation primaire de ces

microorganismes peut alors facilement être altérée en manipulant les propriétés physico-chimiques de la surface (Ista *et al.*, 1996). En conclusion, l'adhésion réversible est sensible aux facteurs physiques, chimiques ou encore biologiques, et à ce stade, le contact entre la surface et la bactérie s'effectue à un pôle cellulaire.

I.B.3.2 - Adhésion irréversible

L'attachement transitoire est suivie d'une association stable avec la surface, appelée « adhésion irréversible ». Cette adhésion stable est rendue possible par la sécrétion de polymères extracellulaires formant des ponts de fixation entre la cellule et la surface. Ces exopolymères ont un rôle multiple : ils assurent l'attachement irréversible des microorganismes aux surfaces, mais également le piégeage des éléments nutritifs (matières organique et inorganique) nécessaires à la croissance bactérienne, et protègent ces mêmes bactéries des agressions de nature biochimiques, chimiques ou biologiques. Il faut toutefois noter que certaines espèces bactériennes ne sont pas capables de s'ancrer elles-mêmes et s'intègrent donc à d'autres espèces déjà installées en colonies, en s'attachant à leur biofilm.

Pour permettre cette adhésion irréversible, les bactéries doivent se réorienter pour établir un contact optimal selon leur axe longitudinal, et explorer la surface. Ce déplacement de la bactérie sur la surface est appelé le « swarming » ou l'essaimage. Ce mouvement collectif sur la surface permet aux bactéries de se diriger vers les zones où il est possible d'établir des interactions fortes entre ses molécules de surface et celles du substrat. Ces interactions de haute énergie entre les macromolécules du substrat et celles de la membrane bactérienne sont de type covalent.

Alors que les *pili* de type I sont essentiels à l'attachement initial à la surface, les *pili* de type IV, ainsi que les flagelles, sont des éléments essentiels dans cette étape de formation de biofilm (Davey & O'Toole, 2000). En effet, les *pili* de type IV sont des structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à Gram négatif, et sont impliquées dans un type particulier de mobilité appelée le « twitching » (Whitchurch *et al.*, 1991). Le pouvoir de rétraction de ces *pili* permet aux bactéries les possédant de se mouvoir à l'interface de surfaces solides. La biosynthèse de ces *pili* fait intervenir plus d'une vingtaine de gènes, la sous-unité structurale étant codée par le gène *pilA*. En plus des mutants *sad* de *P. aeruginosa* PA14 décrits dans le paragraphe précédent

(défectueux dans la mobilité du flagelle), d'autres mutants défectueux dans la biogenèse des *pili* de type IV ont été étudiés. Ces mutants sont capables de former une monocouche cellulaire sur un support, mais sont en revanche incapables de former les micro-colonies caractéristiques du phénotype sauvage (O'Toole & Kolter, 1998; Vallet *et al.*, 2001). Chez la bactérie à Gram négatif *Myxococcus xanthis*, le « gliding », mouvement exploratoire qui consiste en de rapides roulades du bâtonnet sur lui-même, a été observé, mettant en avant le rôle de la protéine AlgZ des *pili* de type IV (nécessaire à la transcription de l'opéron permettant la production d'alginate) dans l'adhésion et la formation de biofilm (Mattick, 2002; Baynham *et al.*, 2006; Mignot *et al.*, 2007). Comme chez les pathogènes à Gram négatif, les *pili* de type IV des bactéries à Gram positif semblent jouer un rôle important dans l'adhésion des bactéries à la surface de leur hôte. C'est le cas du pathogène buccal *Streptococcus parasanguis*, dont la sous-unité distale *FimA* permet l'adhésion au revêtement d'hydroxyapatite enduit de salive « saliva-coated hydroxyl apatite » (Ton-Hat & Schneewind, 2004). D'autres travaux ont montré le rôle des flagelles dans l'adhésion irréversible. En effet, les cellules d'*E. coli* peuvent migrer le long de surfaces abiotiques grâce à leurs flagelles, permettant ainsi la formation du biofilm (Pratt & Kolter, 1998). De même, chez *Vibrio cholerae* El Tor, les flagelles sont également utilisés pour effectuer des mouvements parallèles à la surface, permettant ainsi aux microorganismes de se mouvoir et de former des colonies sur les surfaces colonisées (Watnick & Kolter, 1999).

Ces observations suggèrent donc que les flagelles et les *pili* de type IV, appendices de surface, sont bien nécessaires à la formation d'agrégats par les cellules bactériennes, et le développement de micro-colonies. Cette étape permet donc à terme la formation d'un biofilm mature.

I.B.4 - Maturation du biofilm

La maturation du biofilm qui suit l'adhésion irréversible des microorganismes au support est caractérisée par un accroissement par division de ces bactéries, afin d'agrandir la colonie formée à la surface (les agrégats) **(Figure 2-4)**. Cependant, les données actuelles sur le rôle de l'agrégation dans l'étape initiale de la formation des micro-colonies (Klausen *et al.*, 2003) ne permettent pas encore de vérifier l'hypothèse

postulant que les agrégats de bactéries sur une surface soit une étape importante dans le développement des biofilms (Watnick & Kolter, 1999). Ceci est en partie dû au fait que les agrégats bactériens sont difficiles à observer directement et sont dépendant du flux extérieur. Toutefois, le mode de vie en biofilm est maintenant considéré comme le mode de vie naturel primaire des bactéries, constituant un mode protecteur de la croissance qui permet la survie dans un environnement hostile (Costerton *et al.*, 1999). La structuration et la différentiation des cellules bactériennes en biofilm mature sont ordonnées par divers déterminants décrits dans les paragraphes qui suivent.

I.B.4.1 - Structure des biofilms

La structuration des biofilms est déterminée par des facteurs physiques et biochimiques tels que le flux des liquides environnants, la force de tension du polymère et les propriétés de surface des cellules bactériennes. Ces facteurs influencent la disponibilité des nutriments au sein du biofilm et la capacité d'un biofilm à assurer l'union sous l'action de stress. Ils déterminent si les cellules peuvent persévérer sur une surface particulière. La structuration des biofilms est également contrôlée par des facteurs génétiques qui déterminent les réponses aux signaux chimiques ou environnementaux, fournissant ainsi aux bactéries diverses options comportementales (Johnson, 2008).

La maturation du biofilm est caractérisée par la multiplication des cellules bactériennes adhérées à la surface et conduit donc à la formation de colonies qui vont recouvrir en partie ou en totalité la surface. Même si chaque biofilm microbien est unique, quelques attributs structuraux peuvent être considérés comme universels (Tolker-Nielsen & Molin, 2000).

Les biofilms forment en général un film tridimensionnel hétérogène. Les colonies se trouvent normalement séparées les unes des autres par des canaux où circule le flux du milieu qui permet la diffusion des nutriments, d'oxygène et parfois d'agents antimicrobiens (Donlan, 2002). Ce concept d'hétérogénéité est décrit non seulement pour les biofilms de cultures mixtes, biofilms généralement environnementaux, mais aussi pour des biofilms de cultures pures, mono-spécifiques, communément trouvé dans le domaine médical. L'architecture tridimensionnelle finale du biofilm mature prend

souvent une structure particulière, qui peut prendre la forme de champignons « mushroom-like structure » **(Figure 4)**, de piliers ou bien encore de pyramides (Costerton, 1995; Cowan *et al.*, 2000; Greenberg, 2003).

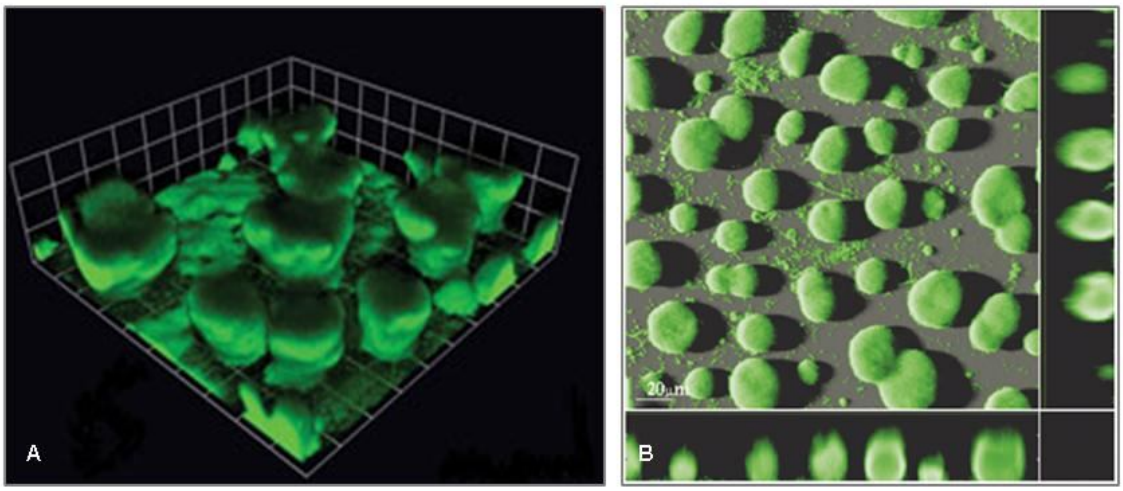


Figure 4 : Structures tridimensionnelles de biofilm bactérien.

(A) Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* formant des structures comme des champignons *(D'après Greenberg, 2003)*
(B) Photographies de colonies bactériennes (en vert) en forme de champignons, espacées les unes des autres, sur un support (arrère-plan en gris), obtenues par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) *(D'après Schrauwers, 2003).*

Les cellules bactériennes dans les différentes régions du biofilm expriment différents modèles d'expression de gènes (Davies *et al.*, 1993). Ainsi, les parties du biofilm les plus élevées sont généralement habitées par les bactéries en mode de division actif, et dont le phénotype se modifie en fonction par exemple de l'activation de gènes de pathogénicité ou de résistance aux antibiotiques. En revanche, les parties basales du biofilm sont occupées par des bactéries en état de dormance, car peu ou pas oxygénées, mais qui se trouvent davantage protégées des agressions extérieures. La complexité de la structure et du métabolisme du biofilm a conduit à proposer l'analogie du biofilm avec des tissus d'organismes pluricellulaires (Costerton, 1995).

I.B.4.2 - Perte des appendices de surface

Des études ont montré que les appendices de surface, nécessaires dans l'étape d'adhésion des microorganismes aux surfaces, avaient tendance à disparaître lors de cette étape de maturation, laissant place à d'autres déterminants qui vont permettre la structuration et la différenciation des cellules bactériennes en biofilm mature

(Characklis & Marshall, 1990; Costerton & Lappin-Scott, 1995; Filloux & Vallet, 2003). Ainsi, chez *P. aeruginosa*, il a été constaté que le facteur sigma alternatif σ^{22}, ou AlgT, contrôle négativement la synthèse du flagelle (Garrett *et al.*, 1999). L'utilisation de puces à ADN chez *P. aeruginosa* a notamment permis de mettre en évidence la variation de l'expression de gènes chez les bactéries organisées en biofilm, par rapport à des bactéries planctoniques (Whiteley *et al.*, 2001). Cette étude a montré que l'expression des gènes codant pour PilA (sous-unité structurale des *pili* de type IV, nécessaires à l'adhésion des bactéries), FliC (sous-unité structurale des flagelles) et CupA1 (sous-unité structurale des *pili* de type I) diminue en contexte biofilm, montrant ainsi que ces structures ne sont plus nécessaires au maintien du biofilm, une fois le développement débuté. Il s'ensuit la production d'une matrice extracellulaire par les bactéries adhérées, le glycocalyx, largement reconnue pour influencer l'architecture finale de la communauté bactérienne (Mayer *et al.*, 1999; Watnick & Kolter, 1999; Davey & O'Toole, 2000; Branda *et al.*, 2005).

I.B.4.3 - Rôle du glycocalyx : une matrice structurale et protectrice

De nombreux termes tels que glycocalyx, slime ou exopolysaccharides ont été utilisés pour désigner la production du biofilm par les bactéries (Falcieri *et al.*, 1987). Comme la relation entre ces différents termes n'est pas très claire, le terme glycocalyx est général et se réfère également à l'environnement visqueux bactérien (slime) et aux exopolysaccharides (Buxton *et al.*, 1987).

Le glycocalyx qui entoure les agrégats bactériens est caractéristique de la vie bactérienne en biofilm. Il permet d'ancrer les cellules au support, et correspond à une matrice d'exopolymères. Une matrice type d'exopolymères est composée de différentes molécules organiques extracellulaires, dominées par des polysaccharides, des EPS, parfois des protéines ou des acides nucléiques, et forme un film viscoélastique **(Figure 5)**. Les EPS sont issus de la dégradation des bactéries, mais sont aussi synthétisés et sécrétés par les bactéries lors de leur croissance en biofilm. Ainsi, leur composition et leur quantité produite et sécrétée varient en fonction du genre bactérien, de l'âge du biofilm et des facteurs environnementaux (Donlan & Costerton, 2002). Par conséquent, la production d'EPS est régie par des facteurs génétiques. Par exemple, après trois jours de culture de souches mutantes de *Vibrio cholerae* El Tor ne produisant plus d'EPS, la

formation du biofilm mature rencontrée chez les souches sauvages de *V. cholerae* est réduite à une monocouche sur verre comme sur PVC (Watnick & Kolter, 1999). La participation des EPS dans l'élaboration de biofilm mature est également retrouvée chez *V. cholerae* O1 (Wai *et al.*, 1998) ou encore *E. coli* (Maeyama *et al.*, 2004). De même, depuis de nombreuses années, il est connu que les isolats pulmonaires de la bactérie pathogène opportuniste *P. aeruginosa* sont fortement muqueux et dus à la production d'alginate bactérien structuralement proche des alginates d'algues. L'expression du gène *algC* qui code pour une enzyme essentielle dans la biosynthèse des alginates (la phosphomannomutase) est augmentée dès les premières minutes qui suivent l'adhérence à une surface solide et d'un facteur quatre en biofilm (Davies & Geesey, 1995; Garrett *et al.*, 1999). L'importance des alginates dans la maturation d'un biofilm a été plus récemment confirmée chez *P. aeruginosa* (Sriramulu *et al.*, 2005), bien que certains travaux soient en contradiction avec ces résultats. En effet, les résultats obtenus chez des mutants de *P. aeruginosa* surproduisant l'alginate (Alg^+) ou au contraire n'en produisant pas (Alg^-), montrent que la production d'alginate n'est pas indispensable à la formation de biofilm *in vitro* sur lame de verre, mais cependant, modifie l'architecture globale (Stapper *et al.*, 2004).

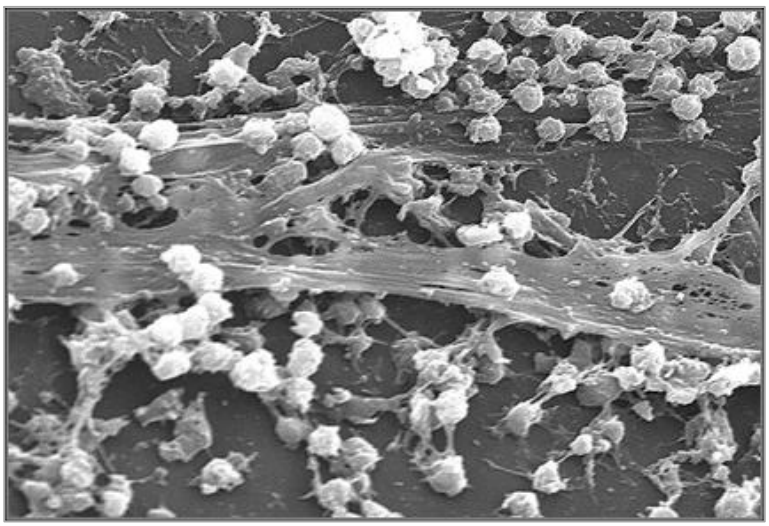


Figure 5 : Biofilm de *Staphylococcus* spp. englué dans un glycocalyx sur une surface inerte, observé au microscope électronique à balayage *(D'après Donlan, 2002)*.

De plus, certains travaux mettent en évidence que l'alginate n'est pas le composé majoritaire de la matrice d'exopolymères produit par les cellules du biofilm de *P. aeruginosa*, et suggèrent que d'autres composés jouent un rôle dans l'établissement du

biofilm mature (Wozniak *et al.*, 2003; Matsukawa & Greenberg, 2004). Des souches de *P. aeruginosa* ne possédant pas un cluster de 15 gènes *pslA* à *pslO* (pour « polysaccharide synthesis locus »), qui codent pour une autre classe d'EPS, ne forment plus de structures tridimensionnelles. Les LPS, qui forment le feuillet externe de l'enveloppe bactérienne des bactéries à Gram négatif, semblent également avoir une influence sur la structuration du biofilm (Makin & Beveridge, 1996; Matsukawa & Greenberg, 2004). Les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* permettraient de maintenir activement les canaux du biofilm en jouant sur les interactions cellule-cellule, et cellule-support (Davey *et al.*, 2003). Des travaux sur la bactérie *Bacillus subtilis* (considérée comme non pathogène pour l'Homme, mais pouvant contaminer des aliments et donc pouvant exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire), ont montré que celle-ci synthétise et sécrète de l'acide poly-DL-glutamique (γ-PGA), un polymère extracellulaire retrouvé dans la matrice entourant le biofilm et qui permet également la formation de ce biofilm (Stanley & Lazazzera, 2005; Branda *et al.*, 2006). Ce polymère est retrouvé dans la matrice produite par une autre bactérie généralement non pathogène (bactérie des flores cutanéo-muqueuses de l'Homme), *Staphylococcus epidermidis* (Kocianova *et al.*, 2005).

En conclusion, la liste des matières organiques qui entourent les agrégats bactériens n'est pas exhaustive. L'enrobement des bactéries par des EPS a un rôle non seulement structural, mais également protecteur. La résistance au décrochement sera d'autant plus grande qu'il aura été formé de matrice en conditions de flux plus important. Le développement des biofilms est par conséquent dépendant des facteurs nutritionnels et environnementaux, entraînant ainsi une architecture particulière pour chaque condition de culture.

I.B.4.4 - Quorum-sensing

Les recherches actuelles indiquent que le profil d'expression de gènes des bactéries vivant au sein d'un biofilm est différente des bactéries planctoniques, et peut être contrôlée par un processus appelé « *quorum sensing* », contribuant ainsi à la formation et à la maturation des biofilms (Davies *et al.*, 1998; Heydorn *et al.*, 2002; Parsek & Greenberg, 2005; Williams, 2007; Johnson, 2008; Dobretsov *et al.*, 2009).

Les bactéries sont capables de communiquer de cellule à cellule, grâce à des petites molécules-signal qu'elles synthétisent. Les travaux sur les communications entre cellules bactériennes se sont développées avec la découverte d'une régulation coordonnée de la luminescence chez une bactérie marine à Gram négatif, *Vibrio fisheri* (Nealson *et al.*, 1970; Hastings & Nealson, 1977; Nealson, 1977). C'est à la suite de ces travaux que la notion de *quorum sensing* (QS) a vu le jour (Fuqua *et al.*, 1994). Ce terme est couramment employé pour décrire le phénomène de régulation spécifique de gènes en réponse à la densité de la population. Une cellule bactérienne individuelle est donc capable de détecter, par l'accumulation extracellulaire de molécules de faible poids moléculaire, le moment où la population bactérienne est suffisante pour réaliser une action concertée. Le QS peut alors être considéré comme un exemple de comportement multicellulaire mettant en œuvre des processus physiologiques variés et bénéfiques à une communauté. Il module la production d'une grande variété de protéines extracellulaires, de métabolites secondaires, et de protéines de régulation (Miller & Bassler, 2001; Gonzalez & Keshavan, 2006). Aujourd'hui, la notion de QS s'est largement répandue et de nouvelles molécules de communication ont été identifiées chez de nombreuses bactéries, aussi bien à Gram positif qu'à Gram négatif. Toutefois, ces systèmes de communication sont différents selon les espèces. De manière générale, la régulation des gènes contrôlés par le QS chez les bactéries à Gram négatif s'effectue toujours selon le même schéma général, faisant intervenir trois acteurs principaux : un signal ou autoinducteur, une enzyme permettant la synthèse de ce signal, et enfin, un régulateur transcriptionnel.

Il existe donc un grand nombre de systèmes de signalisation du QS employé par les bactéries à Gram négatif (Dobretsov *et al.*, 2009), mais celui qui est le plus caractérisé est le système de type LuxR-N-acyl homosérine lactones (HSL), qui a été identifié chez plus de soixante-dix espèces, telles que *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *Burkholderia cepacia*, *B. vietnamiensis* ou encore *Erwinia carotovora* (Holden *et al.*, 1998; Lewenza *et al.*, 1999; Fuqua *et al.*, 2001; Miller & Bassler, 2001; Whitehead *et al.*, 2001; Conway & Greenberg, 2002). Ce système HSL est caractérisé par une cascade d'événements **(Figure 6)**. La première étape du phénomène consiste à synthétiser les molécules-signal du QS, qui vont diffuser ou être activement transportées hors de la cellule. Quand la concentration extracellulaire des HSL atteint un certain seuil, ces molécules-signal entrent de nouveau dans la cellule, passivement (courte chaîne de

HSL) ou activement (longue chaîne de HSL), et se lient à leurs récepteurs conduisant à la formation de dimères actifs. Le complexe néoformé se lie sur des régions du génome spécifiques (*lux* box) correspondant à des séquences promotrices, avec pour conséquence d'activer la transcription des gènes du QS responsables de la luminescence, de la formation du biofilm, de la virulence et autres processus.

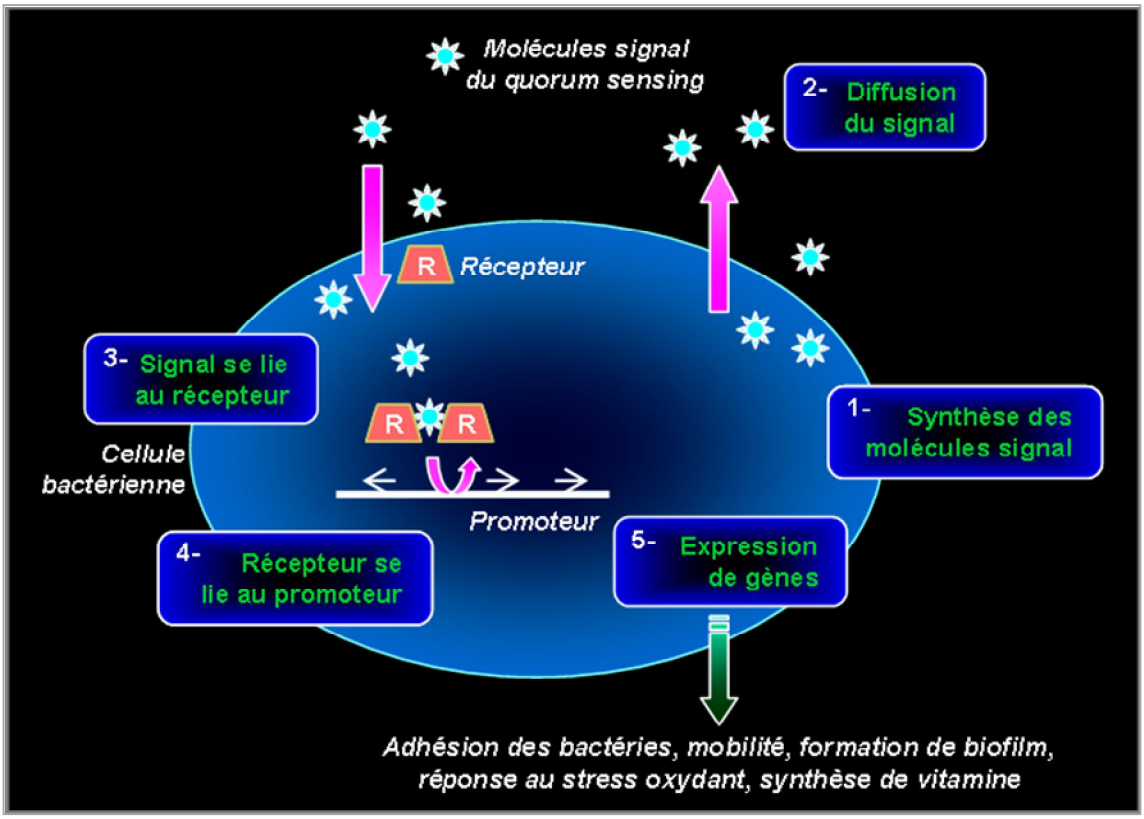


Figure 6 : Modèle généralisé du quorum sensing régulé par les molécules-signal HSL chez une bactérie à Gram négatif. ***(D'après Dobretsov, 2009)***

Les chiffres numérotés de 1 à 5 dans les cadres représentent les différentes étapes du processus de QS. Les flèches vertes montrent la direction principale du transport du signal : diffusif (chaîne courte des HSL) ou actif (chaîne longue des HSL).

Chez les bactéries à Gram positif telles que *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus* spp., aucune molécule signal de type HSL n'a encore été détectée, mais un autre type de molécules-signal a été identifié. En effet, ces bactéries communiquent en utilisant des oligopeptides modifiés, également nommé « autoinducing peptides » (AIP). Ces peptides signal sont généralement constitués de cinq à dix-sept acides aminés (Federle & Bassler, 2003) et ne sont pas diffusibles à travers la membrane. Par conséquent, la libération des molécules-signal est effectuée par des exportateurs dédiés aux oligopeptides (Waters & Bassler, 2005).

Les systèmes de communications décrits ci-dessus sont plutôt utilisés pour les communications intra-spécifiques. Cependant, il existe un troisième type de molécules de communication, le furanosyl borate diester (AI2), qui a été mis en évidence à la fois chez des bactéries à Gram positif et négatif (Henke & Bassler, 2004). Ce système de communication est un système hybride entre celui des bactéries à Gram négatif et à Gram positif, ce qui permet une communication interspécifique. Il a notamment été découvert chez *Vibrio harveyi* (Cao & Meighen, 1989).

Il a été montré que les communications inter-bactériennes par les molécules du QS sont essentielles à l'établissement d'une communauté cellulaire ordonnée en biofilm. Ainsi, un mutant de *P. aeruginosa*, incapable de synthétiser des molécules de communication inter-bactérienne (HSL), forme un biofilm radicalement différent de celui de la souche sauvage. Ces mutants ont également perdu leur capacité à résister à un traitement de désinfection au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). La complémentation en HSL exogènes dans la culture permet par la suite de restaurer le phénotype sauvage (Davies *et al.*, 1993). Cependant, le rôle des molécules de communication dans la formation du biofilm reste encore mal défini, au vu des effets que ces dernières causent sur l'ensemble des étapes de la formation du biofilm (adhésion, maturation, dispersion) (Parsek & Greenberg, 2005). Le QS joue donc un rôle important dans la régulation de la densité bactérienne au sein du biofilm, initiant la dispersion des bactéries quand la population atteint une densité beaucoup trop élevée.

I.B.5 - Détachement de cellules bactériennes

La dernière étape du cycle de vie du biofilm, dite planctonique, est donc la phase de détachement de cellules bactériennes du biofilm **(Figure 2-5)**. Ce phénomène de dispersion est induit par le vieillissement du biofilm ou bien par certains stress ou carences. Aidés par le flux du milieu, le détachement de fragments de biofilm contenant des bactéries phénotypiquement altérées ou de formes nageantes (ayant repris un mode planctonique) va permettre de coloniser de nouvelles surfaces, et ainsi, réinitialiser un nouveau biofilm (Parsek & Greenberg, 2005). Cette dernière étape peut être dite passive, ou à l'inverse active.

I.B.5.1 - Dispersion passive

La dispersion dite passive est généralement liée aux forces physiques appliquées sur le biofilm mature (Brading *et al.*, 1995). Elle peut être divisée en trois processus : l'érosion, le relargage (« sloughing ») ou l'abrasion. L'érosion est définie comme étant un détachement continu de cellules individuelles ou de petites parties du biofilm, alors que le relargage est plutôt considéré comme une perte rapide et massive du biofilm. Le troisième processus, l'abrasion, est un détachement dû à la collision de particules du fluide liquide avec le biofilm. Le taux d'érosion du biofilm devenant plus important à mesure de l'augmentation de l'épaisseur du biofilm et du flux existant à l'interface biofilm-phase liquide (Characklis, 1981).

Plusieurs mécanismes conduisant à la dispersion passive ont été décrits : la limitation, selon un gradient, de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, les forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, et la diminution et/ou la modification de la composition de nutriments disponibles. La diminution de biomasse d'un biofilm peut également être due à des agents chimiques, tels que des molécules tensioactives, des enzymes, des dérivés chlorés, des chélateurs, ou encore des modifications du pH. Selon l'agent considéré, il peut y avoir mort cellulaire ou détachement des bactéries avec un faible taux de mortalité (Haras, 2005).

I.B.5.2 - Dispersion active

La dispersion des cellules bactériennes peut également être contrôlée par des mécanismes biologiques. C'est la dispersion active.

La mort cellulaire induite par un phage de *P. aeruginosa* peut amener à la destruction partielle du biofilm et à la sélection de micro-colonies résistantes. L'ensemble est considéré comme une stratégie avantageant la dispersion de la bactérie (Webb *et al.*, 2003). De plus, l'induction de l'expression d'*algL* (pour « alginate lyase ») par *P. aeruginosa* diminue la production d'alginate (composant majeur des EPS de *P. aeruginosa*) et correspond à l'augmentation significative du nombre de cellules détachées du biofilm (Boyd & Chakrabarty, 1994). Ces résultats suggèrent donc l'implication du gène *algL* dans le détachement des cellules chez le type sauvage de

cette bactérie pathogène, l'aidant ainsi à se disperser et à coloniser d'autres organismes. Ce processus de détachement peut être observé par microscopie à balayage laser chez les biofilms matures des types sauvages de *P. aeruginosa* **(Figure 7)**. Les cavités centrales de ces biofilms se remplissent de bactéries nageantes, planctoniques, la dispersion se produisant lors de la rupture de cette cavité, libérant ainsi les bactéries mobiles qui peuvent aller coloniser une autre surface (Parsek & Fuqua, 2004).

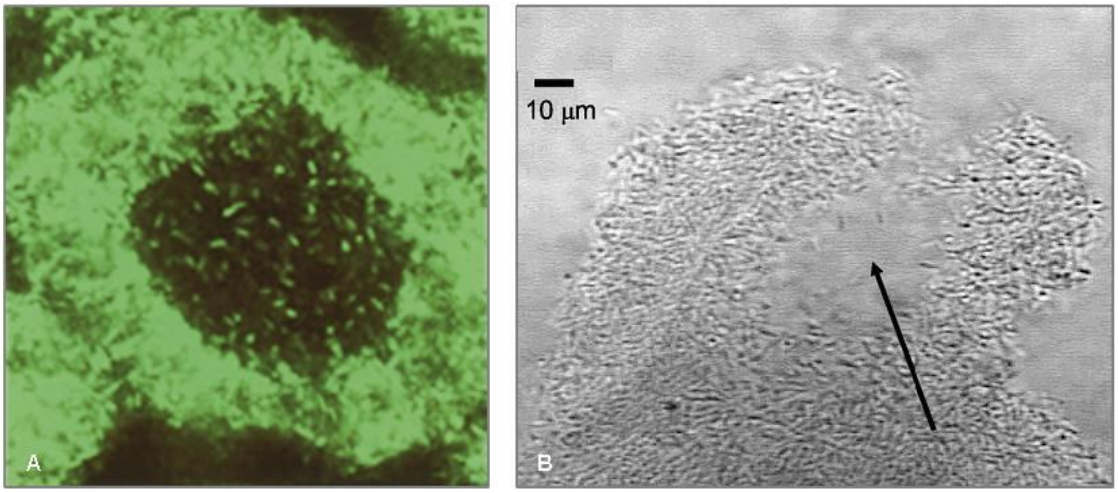


Figure 7 : Etape de la dispersion chez la souche sauvage *P. aeruginosa* PAO1 cultivée en chambre à flux.

(A) Observation en microscopie confocale à balayage laser d'une cavité du biofilm mature-GFP (x630) *(Parsek & Fuqua, 2004).*
(B) Observation en microscopie à contraste de phase d'une cavité rompue du biofilm matureavec libération des cellules bactériennes nageantes dans le milieu environnant, permettant la dispersion et la colonisation de nouvelles surfaces *(Sauer, 2002).*

Ce détachement « programmé » chez les bactéries est généralement du aux enzymes, les polysaccharidases, qui dégradent la matrice extracellulaire du biofilm et qui représente alors une source d'énergie. Les enzymes spécifiques des EPS peuvent probablement être produites durant les différentes étapes de la croissance du biofilm des bactéries. Par conséquent, la dispersion des bactéries dans le milieu environnant est alors naturellement accompagnée par l'induction de gènes impliqués dans la mobilité des flagelles pour la nage des bactéries et dans la répression des gènes *PilA* (Sauer *et al.*, 2002). La perte de cellules peut avoir lieu soit par lyse cellulaire, soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement.

Ces communautés permettent alors aux bactéries d'être dans un environnement favorable. Toutefois, le temps de génération des bactéries en communauté est généralement plus faible que celui des bactéries vivant à l'extérieur. C'est pourquoi, vivre en biofilm représente souvent un compromis entre la reproduction et la survie.

I.C - Avantage de la vie en biofilm

La vie en biofilm, en communauté, permet aux bactéries de créer leur propre niche écologique au sein de leurs exoproduits. Cet écosystème a l'avantage majeur de protéger les bactéries contre des conditions environnementales défavorables, comme l'attaque par des prédateurs bactériophages, des amibes phagocytrices, des substances antibiotiques de toute nature, des stress thermiques, mais aussi pour accéder aux ressources, pour la diversité génétique (Roszak & Colwell, 1987; Hahn & Höfle, 2001; Jefferson, 2004; Matz *et al.*, 2005).

L'utilisation de produits d'entretien ménager, d'antibiotiques, même s'ils éradiquent efficacement les bactéries récentes, n'atteignent pas les bactéries dites en état de sommeil métabolique, protégées par un cocon anoxique et les cavités du substrat (Stewart & Costerton, 2001). Le biofilm permet en outre un plus grand accès aux nutriments, circulant entre les colonies, et qui sont concentrés par les EPS (Costerton *et al.*, 1981; Branda *et al.*, 2005). De même, l'alimentation en oxygène se fait soit passivement avec l'apport des nutriments et des oligoéléments, soit activement avec la transformation du substrat dans l'environnement (oxydation des métaux, dégradation de substrats organiques) (Haras, 2005) ou avec l'exploitation offensive de l'hôte eucaryote (étapes d'invasion, pathogénèse, colonisation interne, métabolisme altéré) (Bryers, 2008). Cette alimentation en oxygène est alors dépendante du flux entourant le biofilm, qui le rend par la même occasion perméable, protégeant ainsi le biofilm de la dessiccation (Costerton *et al.*, 1999).

Les bactéries en biofilm ont une vie sociale active, où s'établissent des communications et des échanges inter-espèces. Ceci permet par exemple d'effectuer le transfert horizontal de gènes et/ou de protéines vers les bactéries compétentes du biofilm ou vers l'hôte (transfection), ou alors à distance par sécrétion ou infection virale (transduction) (Donlan, 2002). Les bactéries se trouvent dans une structure de résistance

aux agents antibactériens (comme les biocides ou encore les antibiotiques), en établissant une barrière de diffusion et en concentrant dans les EPS des enzymes sécrétées comme par exemple des protéases.

Les biofilms peuvent également être bénéfiques dans les activités humaines. En conchyliculture, des recherches portent sur des substrats conditionnés par des biofilms et favorisant la fixation des naissains d'huîtres (Compère, 1999). De même, dans le cas de la protection de l'environnement marin, des recherches sont effectuées sur le développement de structures en béton qui favoriseraient la prolifération d'un voile biologique (Compère, 1999). Cependant, l'avantage de la croissance d'un voile biologique reste limité, et les applications telles que le traitement d'eaux polluées, la récupération d'huiles, l'exploitation de la production d'EPS bactériens par l'industrie pharmaceutique, alimentaire ou des cosmétiques restent encore restreintes. En règle générale, les biofilms sont plutôt considérés comme un facteur de gêne.

I.D - Les problèmes liés aux biofilms

Dès lors qu'une surface organique ou inorganique est au contact d'un environnement aqueux, il y a formation d'un biofilm. Par conséquent, de nombreux domaines sont concernés par les problèmes causés par cette formation de biofilm : la santé (pose d'implants, infections bactériennes, plaque dentaire), l'industrie (agro-alimentaire, textile, traitement des eaux usées, échangeurs de chaleur comme les centrales nucléaires), et tous les domaines nécessitant une immersion totale ou en partie de structures solides (appareils océanographiques, coques des bateaux, structures aquacoles).

I.D.1 - Biofilms associés à des bactéries pathogènes

Les biofilms sont connus pour causer de graves problèmes dans les domaines de l'agro-alimentaire comme dans le médical.

En effet, les problèmes d'hygiène rencontrés dans le domaine agro-alimentaire sont principalement dus à la prolifération de bactéries dites pathogènes pour l'Homme, telles que *Listeria monocytogenes* (Lee Wong, 1998). La consommation d'aliments

ayant été au contact des microorganismes pathogènes peut entraîner de simples troubles digestifs, jusqu'au décès du consommateur. De même, les biofilms sont responsables des plaques dentaires et des caries générées principalement par des bactéries du genre *Streptococcus* (Farge, 1998), ou bien des maladies parodontales (Boschin *et al.*, 2004).

Dans le secteur médical, les biofilms sont responsables de nombreuses infections (Fux *et al.*, 2004; Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Les maladies les plus connues causées par des infections bactériennes sont les maladies contractées lors d'un séjour à l'hôpital, plus communément appelées les « maladies nosocomiales ». Les microorganismes associés à ces infections sont le plus souvent *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou encore *E. coli*. Ce n'est donc pas sans raison que ces bactéries sont au centre de la majorité des études portant sur la compréhension du mode de vie en biofilm. Les infections par ces bactéries pathogènes en milieu hospitalier se font généralement par contamination directe avec des matériaux médicaux (cathéters, valves cardiaques, pacemakers, prothèses), mais aussi par contamination indirecte, souvent due à une transmission entre patients ou personnels hospitaliers. Les conséquences de ces infections peuvent aller de l'infection urinaire jusqu'à la septicémie. En France, la mortalité annuelle par les infections nosocomiales serait comprise entre 10 000 et 20 000 individus. Malheureusement, ces infections sont d'autant plus difficiles à combattre que les bactéries associées en biofilm sont résistantes aux antibiotiques et aux défenses de l'hôte (Fux *et al.*, 2004).

I.D.2 - Biofilm et salissures marines

Le biofilm est un écosystème qui favorise l'établissement de nouveaux organismes tels que des spores de macroalgues, des diatomées, des invertébrés comme les balanes, les bryozoaires, les éponges, mais aussi des macroalgues. Cette étape finale se nomme le "macro-fouling", anglicisme qui désigne les salissures **(Figure 8)**.

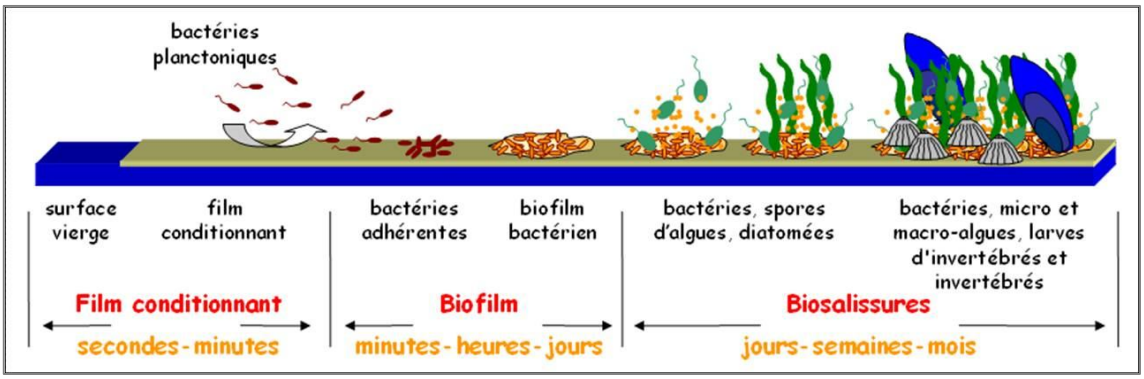


Figure 8 : Représentation schématique de la formation du macro-fouling marin (les salissures) ***(D'après Haras, 2005)*****.**

En l'espace de quelques mois, les macro-salissures peuvent représenter une biomasse conséquente sur les surfaces colonisées (structures ou équipements marins), pouvant causer de nombreux problèmes pour l'industrie et les activités de la mer en général (coques des bateaux, plateformes pétrolières, gazoducs, structures portuaires, installations aquacoles, bouées de signalisation, ou encore appareils d'observations scientifiques) **(Figure 9)**.

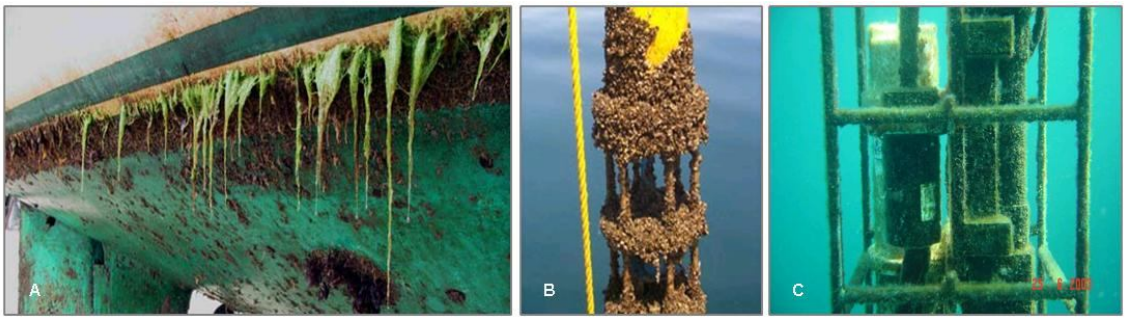


Figure 9 : Macro-salissures sur diverses surfaces ayant séjournées plusieurs mois en eau de mer ***(Images du web).***

(A) Coque d'un bateau.
(B) et *(C)* Appareils de mesures océanographiques.

Les salissures présentes sur les coques des navires alourdissent les bateaux et induisent une augmentation de la rugosité, avec pour conséquence d'augmenter les forces de frottement lors de leur déplacement dans l'eau. Ceci conduit alors à une perte de vitesse, à des manœuvres plus difficiles à exécuter, mais surtout, à une détérioration et à une corrosion plus importante des coques, ainsi qu'à une augmentation de la consommation de carburant (Yebra *et al.*, 2004). Pour exemples, un biofilm d'1 mm

d'épaisseur entraîne une diminution de la vitesse d'un navire de 15 % (Callow, 1986), et la résistance de friction augmente de 5 à 15 % dès lors qu'un biofilm atteint 100 µm d'épaisseur (Characklis & Marshall, 1990). Tout ceci a alors un impact direct sur les coûts financiers. A titre d'exemple, les opérations de nettoyage des nœuds des plates-formes pétrolières, avant inspection, sont estimées à des millions d'euros par an en Mer du Nord, et 500 millions de dollars de dépenses annuelles supplémentaires en fuel sont nécessaires à la Marine Américaine pour combattre la résistance de friction additionnelle occasionnée par la présence d'un biofilm (Compère, 1999). Le coût annuel global pour l'industrie maritime est estimé à 6,5 milliards de dollars (Callow & Callow, 2000).

De la même manière, l'application de peintures anti-salissures marines (peintures antifouling), leur renouvellement quasi annuel, ainsi que leur récupération lors des carénages augmentent les coûts d'entretien des navires. La corrosion des matériaux métalliques due à la présence de bactéries sulfato-réductrices et méthanogènes dans les biofilms a également un coût financier important, s'élevant à près d'un milliard d'euros par an rien que pour la France. De plus, les conséquences sur l'environnement ne sont pas négligeables compte-tenu du facteur d'impact important que cause l'augmentation de la consommation de carburant sur l'émission de composés nocifs (Corbett & Fischbank, 1997), ou encore les substances nocives libérées par l'érosion des peintures antifouling. Au début du 20ème siècle, des peintures à base de cuivre ou de plomb étaient massivement utilisées, mais de par leur persistance à long terme dans l'environnement (Bennett, 1996) et leur effet tératogène sur les larves de poissons et d'invertébrés marins, celles-ci ont été rapidement interdites. Puis, les peintures antifouling les plus utilisées dans le monde maritime ont été des peintures auto-polissantes, développées à partir de copolymères de méthacrylate de tributylétain (TBT). Elles étaient devenues interdites d'utilisation pour les petits navires dès 2003, par ordre de l'organisation maritime internationale, et depuis l'année dernière (2008), ces peintures sont totalement interdites *via* la directive 99/51/CEE.

D'autre part, les macrosalissures présentes sur les coques des bateaux peuvent avoir une incidence sur la flore et la faune locale, au même titre que la dispersion par l'évacuation des eaux de ballaste par les gros navires. En effet, de nouvelles espèces peuvent être introduites au sein d'environnements marins où elles n'étaient pas présentes naturellement (Reise *et al.*, 1999). La présence de biofilm induit également

une dérive des mesures réalisées par des capteurs océanographiques immergés (capteurs de pH, de chlorophylle, de température, de pH, de substances toxiques), des détecteurs otiques, ou encore des caméras sous-marines.

II - INTERACTIONS BACTERIES-ALGUES

Parmi les études existantes sur les interactions entre les microorganismes et les eucaryotes sessiles marins, celles concernant la diversité microbienne associée aux coraux et aux éponges sont les plus importantes (Hentschel *et al.*, 2002; Longford *et al.*, 2007; Santiago-Vazquez *et al.*, 2007; Taylor *et al.*, 2007). En comparaison, les autres surfaces comme celles des macroalgues n'ont pas reçu autant d'intérêt, et de nombreux systèmes d'interaction ne demandent qu'à être explorés. De ce fait, l'étendue de la diversité des hôtes sessiles pouvant héberger une communauté microbienne distincte peut avoir un impact remarquable sur notre vue actuelle de la diversité microbienne marine globale (Egan *et al.*, 2008).

II.A - Complexité de l'interaction bactéries-surfaces organiques

Comparées aux systèmes planctoniques, les bactéries associées aux surfaces sont sujettes à diverses interactions qui ont un impact direct sur la diversité et la fonction de ces communautés microbiennes. Ainsi, il peut se produire des interactions chimiques entre l'hôte et les colonisateurs microbiens, des interactions entre les microorganismes nichant au sein d'un même biofilm, mais également, des interactions chimiques et physiques dues aux spécificités de surfaces **(Figure 10)** (Egan *et al.*, 2008).

La forte proximité spatiale des microorganismes aux surfaces conduit à des interactions intercellulaires spécifiques et crée des communautés complexes et hautement différenciées. La limitation nutritive et spatiale, ainsi qu'un environnement fortement compétitif, ont conduit la surface colonisée par les microorganismes à développer des réponses adaptatives particulières, telles que des stratégies antagonistes pour empêcher la colonisation ou la croissance de compétiteurs potentiels (Egan *et al.*, 2008). Les interactions contrôlées chimiquement, et la communication entre les microorganismes et leurs hôtes eucaryotes, ont également un impact significatif sur la composition et la fonction des *consortia* de surface. En effet, le contrôle des populations bactériennes par les surfaces est souvent caractérisé par une défense de l'hôte, comme chez les algues, contre d'éventuels organismes pathogènes, ou un contrôle des bactéries colonisatrices pour réduire leur prolifération (Kubanek *et al.*, 2003; Amsler *et al.*, 2005; Paul *et al.*, 2007; Potin, 2008). En revanche, très peu d'études montrent le rôle parfois

bénéfique des bactéries associées aux algues (Provasoli & Pintner, 1980; Tatewaki *et al.*, 1983).

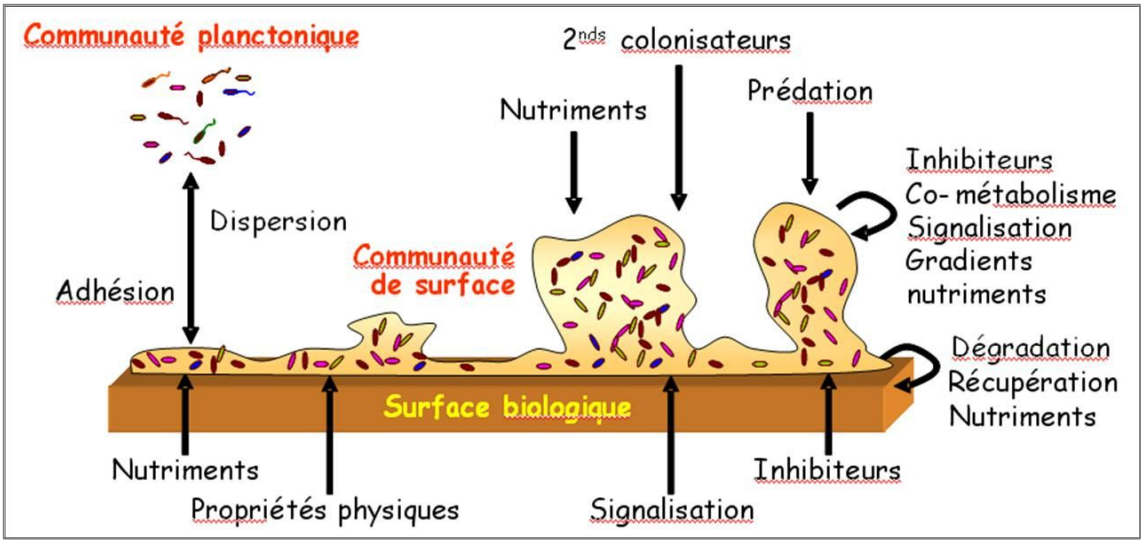


Figure 10 : Représentation schématique des facteurs chimique, physique et biologique influençant la fonction et la diversité de la communauté microbienne associée aux surfaces marines vivantes. *(D'après Egan* et al.*, 2008)*

Ainsi, cette multitude de facteurs mis en jeu dans ces interactions forme la composition et les propriétés de la communauté de surface. Par conséquent, il devient important de mieux connaître la diversité et l'écologie des communautés microbiennes marines associées aux surfaces, dans le but de découvrir entre autres des composés biologiquement actifs, potentiellement biocides ou bactériostatiques.

II.B - Intérêt de la recherche sur les bactéries marines associées aux macroalgues

Les avancées conceptuelles et technologiques récentes sur la microbiologie des surfaces marines organiques ont mis en évidence la production d'un panel de composés bioactifs encore inconnus (Debashish *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2007), et produit aussi bien par l'hôte que par les membres de la communauté microbienne associée à la surface (Steinberg & de Nys, 2002; Bowman, 2007; Cumashi *et al.*, 2007; Kannan *et al.*, 2007; Yooseph *et al.*, 2007). Beaucoup de problèmes biologiques, chimiques et/ou physiques pourraient ainsi être résolus par le développement de nouvelles biotechnologies marines, puisque ces problèmes sont aussi rencontrés chez les organismes marins qui doivent naturellement y faire face. Les investigations sur les

modèles naturels pertinents représentent une voie plus directe à la découverte de métabolites utiles.

La colonisation par des organismes encroûtant suit généralement l'apparition d'un biofilm bactérien sur une surface inerte. En fait, la présence à la fois de substances attractives et de molécules antibiotiques, à certaines concentrations respectives, déterminera l'effet promoteur ou inhibiteur sur l'établissement ou sur la métamorphose d'une spore épiphyte ou d'un invertébré épibionte (Bowman, 2007). Les tetraspores d'Ulves peuvent être attirées par l'émission de molécules du quorum-sensing de biofilms dominés par des *γ-proteobacteria* du genre *Pseudoalteromonas* (Qian *et al.*, 2007), et inversement, la germination de spores de plusieurs espèces d'algues peut être inhibée par la présence de *P. tunicata* (Egan *et al.*, 2000).

La majorité des organismes marins restent relativement dépourvus de macrosalissure, bien que la plupart d'entre eux soit recouvert d'un fin film de bactéries épiphytes (Clare, 1996). Par conséquent, ces bactéries épiphytes ont tout intérêt à maintenir la santé de l'hôte qui les porte. Les bactéries présentes à la surface des macroalgues marines semblent donc jouer un rôle protecteur en émettant dans l'eau de mer environnante des composés qui aident à la prévention des salissures extensives des surfaces. Ces composés émis peuvent également avoir des applications industrielles et médicales. La facilité relative à cultiver en forte biomasse ces bactéries épiphytes, qui produisent des composés actifs, comparée aux autres bactéries planctoniques, suggère que les bactéries associées aux algues peuvent être utiles dans les applications de bioprocédés, comme la production de composés antimicrobiens ou antisalissures (Armstrong *et al.*, 2001).

II.B.1 - Métabolites secondaires des bactéries marines

Le genre *Pseudoalteromonas* est un groupe de bactéries marines appartenant à la classe des *γ-proteobacteria*, et dont les recherches sur les produits naturels et le domaine des sciences de l'écologie microbienne ont fortement augmenté depuis la dernière décennie. Il semble que ce soit l'un des seuls genres bactériens marins montrant clairement des propriétés pharmacologiques et écologiques intéressantes et innovantes. Les souches bactériennes étudiées sont principalement isolées

d'échantillons d'eau de mer, de sédiments, d'ascidies, de tuniciers, de poissons, de crustacés, et plus rarement, d'algues (Gauthier & Breittmayer, 1979; Holmström & Kjelleberg, 1999; Egan *et al.*, 2000; Holmström *et al.*, 2002; Bowman, 2007; Debnath *et al.*, 2007). Les espèces pigmentées de ce genre ont montré leur capacité à produire un panel de composés de faible ou fort poids moléculaire, avec des activités antimicrobiennes, antifongiques, algicides et pharmacologiquement utiles. Ces composés peuvent être des protéines toxiques, des exopolymères polyanioniques, des alcaloïdes contenant des pyrolles ou des phénoliques substitués, des peptides cycliques et une large gamme de composés bromés (Bowman, 2007).

Les premiers antibiotiques d'origine marine ont été découverts suite à l'identification de pyrroles bromés à partir de pigments pourpres d'*Alteromonadales*, dont le pyrrole 2,3,4-tribromo-5(1'-hydroxy-2',4'-dibromophenyl) de *Thalassia* sp. (Lowell, 1966). Par la suite, de nombreuses autres substances antibactériennes de faibles masses ont été identifiés à partir de *P. luteoviolacea* (anciennement nommée *Chromobacterium marinum* (Gauthier, 1982)), telles que le 2,3,4,5-tetrabromopyrrole **(Figure 11A)** (Gribble, 1999) ou encore le pentabromopseudilin **(Figure 11B)** (Hanefeld *et al.*, 1994).

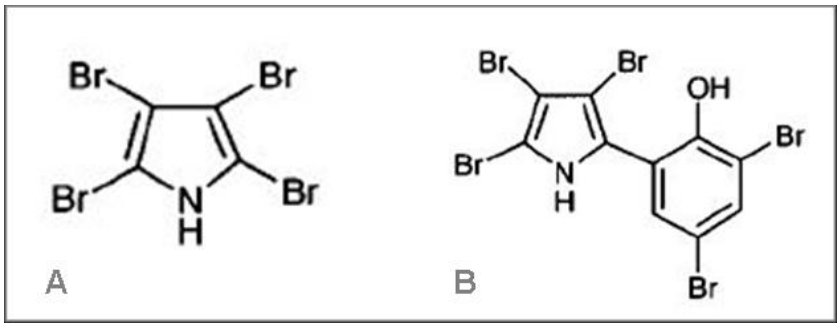


Figure 11 : Représentation des structures chimiques de composés naturels produits par la bactérie marine *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. *(D'après Bowman, 2007)*

(A) 2,3,4,5-tetrabromopyrrole
(B) 2,3,4-tribromo-5(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenyl)pyrrole (also called pentabromopseudilin)

Il n'existe que peu d'exemples de bactéries marines isolées à partir de macroalgues et étudiées pour des éventuelles propriétés industrielles, pharmaceutiques. Toutefois, plusieurs *Pseudoalteromonas* nichant sur les thalles de macroalgues ont montré ces types d'activité.

P. ulvae et *P. tunicata* sont des bactéries marines présentes à la surface de l'algue verte *Ulva lactuca*. Ces bactéries ont la capacité de diminuer l'adhésion de nombreux organismes salissants et d'inhiber la germination des spores de cette algue verte, mais aussi ceux de l'algue rouge *Polysiphonia* sp. pour la bactérie *P. tunicata* (Holmström & Kjelleberg, 1999; Egan *et al.*, 2001). Le pouvoir antisalissure de *P. tunicata* est dû à la production d'un pigment bactéricide jaune, appartenant à la classe des alcaloïdes tambjamines et appelé YP1 **(Figure 12A)** (Egan *et al.*, 2002; Franks *et al.*, 2005). Un autre pigment de couleur violet a été identifié chez *P. tunicata*. Il s'agit d'un alcaloïde appelé violacein **(Figure 12B)**, qui permet aux biofilms bactériens de se protéger contre les prédateurs tels que les protozoaires, en induisant un programme de mort cellulaire eucaryote conservé (Matz *et al.*, 2008).

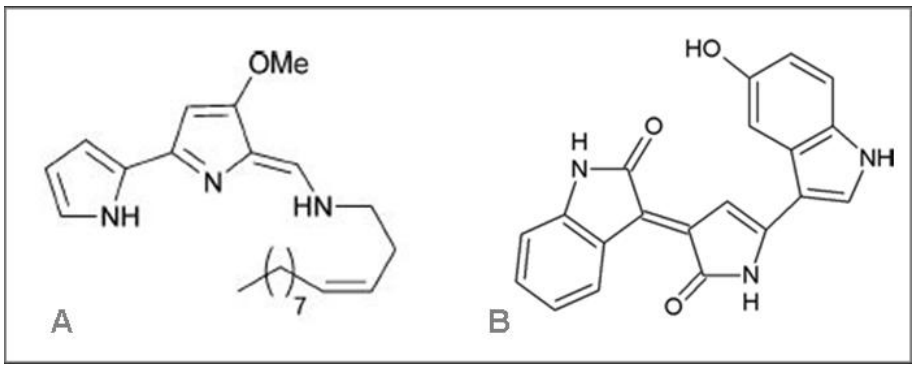


Figure 12 : Représentation des structures chimiques de composés naturels produits par la bactérie marine *Pseudoalteromonas tunicata*.

(A) YP1, classe des tambjamines. *(D'après Bowman, 2007)*
(B) 2,3,4-tribromo-5(2'-hydroxy-3',5'-dibromophenyl)pyrrole ou pentabromopseudilin. *(D'après Matz* et al., *2008)*

Pseudoalteromonas sp. A3 a été isolé d'une algue rouge encroûtante *Hydrolithon onkodes* (coralline), et encourage clairement l'attachement des larves (planules) de coraux. Par la suite, elle induit la métamorphose des planules des coraux *Acropora willisae* et *A. millepora* (Negri *et al.*, 2001). Bien que le(s) métabolite(s) responsable(s) de ces inductions ne soi(en)t toujours pas identifié(s), des extraits méthanoliques des cultures de la souche A3 ont déjà montré une large variété d'induction. D'autres *Pseudoalteromonas* isolées d'une coralline ont également prouvé leur capacité à induire l'attachement de larves de l'oursin *Heliocidaris erythrogramma* (Bowman, 2007). La découverte de ces substances chimiques induisant l'attachement et

la métamorphose de larves d'invertébrés marins pourrait avoir un intérêt non négligeable dans des applications biotechnologiques telles que le réensemencement de récifs coralliens ou en élevage larvaire en aquaculture (Negri *et al.*, 2001).

P. atlantica, isolé d'une algue rouge échantillonnée à Inubousaki au Japon (anciennement *Pseudomonas atlantica* (Gauthier *et al.*, 1995)), est capable de dégrader les polysaccharides des algues rouges (agar), tout comme *P. carrageenovora* pour les carraghénanes (Yaphe, 1957; Akagawa-Matsushita *et al.*, 1992). Des LPS purifiés de culture de *P. atlantica* peuvent également causer des maladies chez les crabes (Costa-Ramos & Rowley, 2004), mais il existe encore de nombreux EPS produits par cette bactérie qui ne sont pas encore étudiés, et qui pourraient présenter de nombreuses propriétés à intérêt biotechnologique (Holmström & Kjelleberg, 1999).

Il existe encore de nombreuses autres substances d'intérêt chez les bactéries marines associées aux algues, du genre *Pseudoalteromonas* ou autres. Les recherches n'en sont qu'à leur début, et celles concernant les peptides de substances pigmentées ou non de bactéries marines paraissent d'autant plus nécessaires que leurs composés semblent avoir un impact potentiellement important dans les interactions biologiques.

II.B.2 - Métabolites secondaires des macroalgues

II.B.2.1 - Chez les Chlorophytes

Des trois lignées de macroalgues, celle des algues vertes est la moins diversifiée pour la production de produits naturels avec moins de 300 composés connus, et seulement une poignée de nouveaux métabolites secondaires annoncée chaque année (Blunt *et al.*, 2007). Les Chlorophytes sont connues pour produire des composés semblables à ceux des Rhodophytes (algues rouges), principalement des di- et sesquiterpénoïdes fonctionnalisés, mais sans l'halogénation extensive des composés des algues rouges **(Figure 13)**.

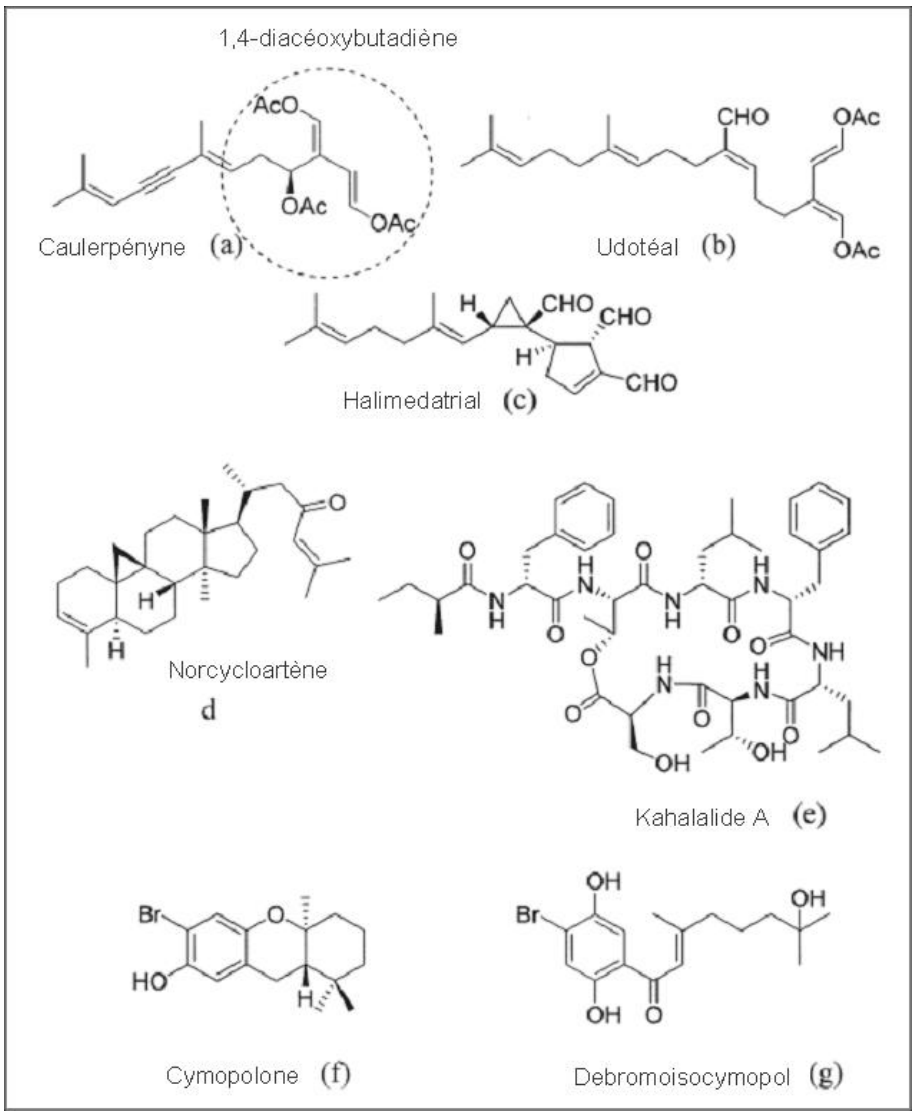


Figure 13 : Représentation des structures chimiques des composés naturels produits par les Chlorophytes. ***(D'après Maschek & Baker, 2008)***

Un peu moins de la moitié des produits naturels reportés dans la littérature viennent de l'ordre des Bryopsidales, et la majorité de ces métabolites (> 85 %) sont des terpénoïdes (Munro & Blunt, 2005). La caractéristique chimique des Chlorophytes est donc la présence de l'ester diénolate 1,4-diaceoxybutadiène, trouvé chez la plupart des terpènes de ces algues vertes. Les familles des Udoteacées, des Caulerpacées, et des Halimedacées produisent plus de 85 % des composés connus des Bryopsidales, dont la plupart contiennent l'ester cité ci-dessus (1,4-diaceoxybutadiène), comme par exemple la caulerpényne de *Caulerpa flexilis* **(Figure 13a)** (Amico *et al.*, 1978) et l'udotéal trouvé chez les espèces d'*Udotea* **(Figure 13b)** (Paul *et al.*, 1982). Ces esters énolate sont souvent considérés comme des « aldéhydes masqués », car ils peuvent être hydrolysés enzymatiquement en aldéhydes (Paul & Van Alstyne, 1992). Ils peuvent

occasionnellement être trouvés sous leur forme aldéhyde, comme c'est le cas de l'halimedatrial chez *Halimeda* spp. **(Figure 13c)** (Paul & Fenical, 1983).

D'autres motifs de terpénoïdes ont été reportés, tels que le triterpénoïde norcycloartène de chez *Tydemania expeditionis* **(Figure 13d)** (Paul *et al.*, 1982), bien qu'ils ne soient pas très répandus chez les Chlorophytes. De même, des polypeptides de type kahalalides comme le kahalalide A **(Figure 13e)** sont des composés rarement trouvés chez les algues vertes (Hamann *et al.*, 1996), mais qui peuvent avoir une utilisation dans l'industrie. Toujours en figure d'exception, les composés produits par l'algue *Cymopolia barbata* : des cymopoles tels que le cymopolone **(Figure 13f)**, et des isoprènes originaires des unités géranyles C10, tels que le debromoisocymopol ont été décrits **(Figure 13g)** (Högberg *et al.*, 1976).

II.B.2.2 - Chez les Rhodophytes

Avec plus de 1500 composés répertoriés, les métabolites secondaires des Rhodophytes sont les plus importants de toutes les macroalgues, aussi bien en terme de diversité que d'abondance. A l'exception des phlorotannins, toutes les classes majoritaires des produits naturels sont représentées chez les algues rouges (Munro & Blunt, 2005). Elles élaborent majoritairement des dérivés d'isoprénoïde et d'acétogénine, avec quelques acides aminés, dérivés d'acides nucléiques et de l'acide shikimique. Ce qui distingue les algues rouges des autres macroalgues, c'est leur capacité importante à produire des composés halogénés contenant du brome et du chlore qui représentent plus de 90 % de ceux répertoriés, comparé à seulement 7 % chez les Chlorophytes et moins de 1 % chez algues brunes (Harper *et al.*, 2001). Plus de la moitié des composés répertoriés chez les Rhodophytes proviennent de la famille des Rhodomélacées, et la plus grande majorité aux genres *Laurencia*, qui produit énormément de sesquiterpènes halogénés et d'acétogénines C_{15}, avec quelques terpènes de plus longues chaines (C_{20} et plus) **(Figure 14)**.

Les sesquiterpènes de *Laurencia*, comme ceux de plusieurs autres genres des Rhodomélacées, sont cycliques, souvent polycycliques, tels que le laurenterol **(figure 14a)**, le pacifenol **(figure 14b)** et l'elatol (Irie *et al.*, 1966; Sims *et al.*, 1971; Sims *et al.*, 1974). Chez les Rhodophytes, il existe également quelques diterpènes comme l'irieol **(Figure 14d)** ou des triterpènes comme le callicladol **(Figure 14e)**, mais ces composés

sont majoritairement limités au genre *Laurencia*, sauf exceptions (Fenical *et al.*, 1975; Suzuki *et al.*, 1995; Kubanek *et al.*, 2005). En fait, parmi toutes les familles des Rhodophytes, les hauts terpènes polyhalogénés sont rares, et les sesterterpènes non réprésentés. De même, le genre *Laurencia* est quasiment le seul à élaborer des composés uniques d'acétogénines C_{15}, tels que la laurepinnacine **(Figure 14f)** et le laurallène **(Figure 14g)** (Fukuzawa *et al.*, 1979; Fukuzawa & Masamune, 1981). Il existe également d'autres acétogénines C_{15}, généralement ornées de brome ou d'iode, ou les deux, avec une oxygénation sur le carbone adjacent.

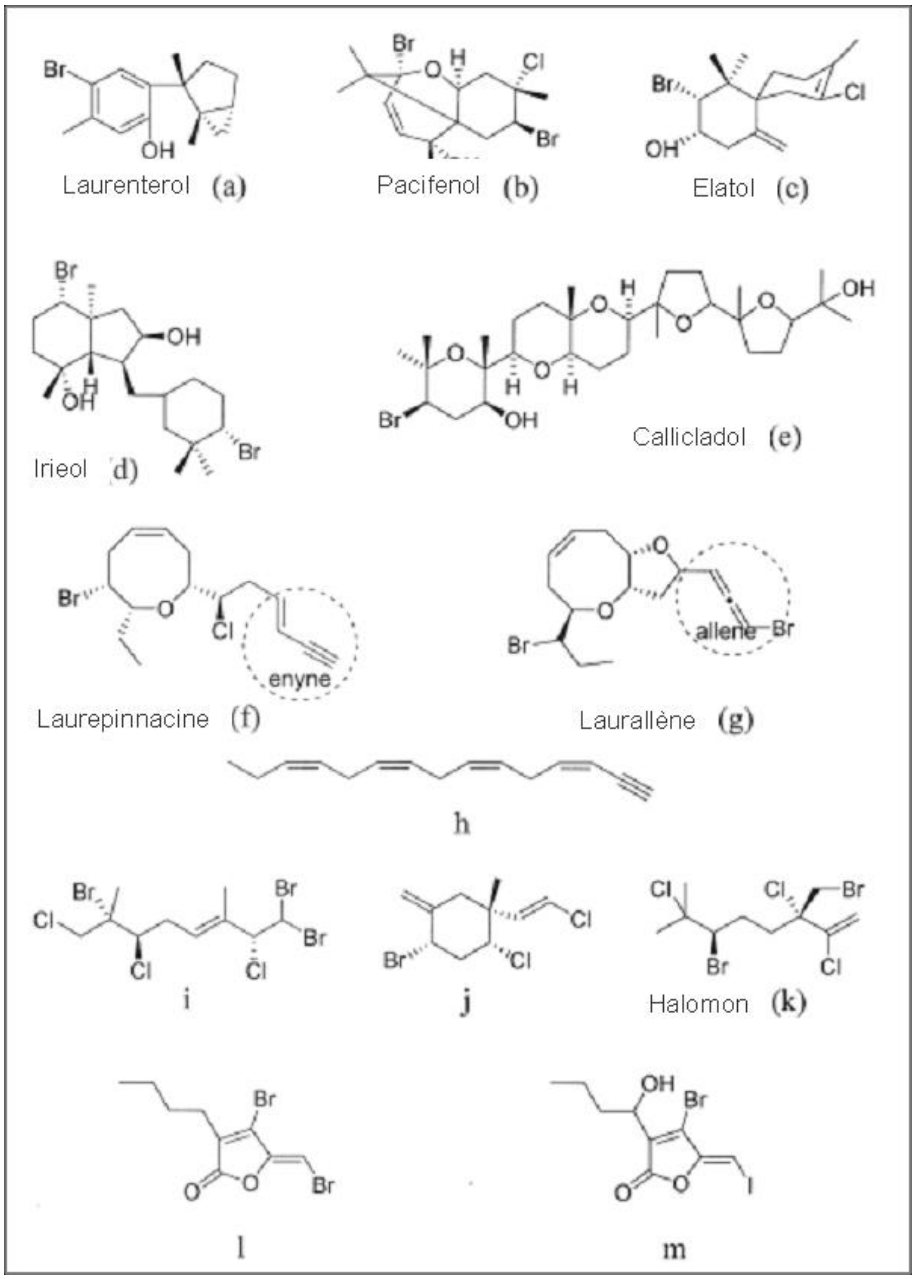


Figure 14 : Représentation des structures chimiques des composés naturels produits par les Rhodophytes. ***(D'après Maschek & Baker, 2008)***

Trois autres familles des Rhodophytes, les Rhizophyllidacées, les Plocamiacées et les Delesseriacées, se distinguent des Rhodomélacées en produisant des monoterpènes fortement halogénés. Les genres Rhizophyllidacées avec *Chondrococcus*, *Desmia* et *Ochtodes*, Plocamiacées avec *Plocamium*, et Delesseriacées avec *Pantoneura* sont, à peu d'exceptions près, les uniques sources de monoterpènes parmi les algues rouges. Ces composés sont souvent hautement halogénés, linéraires **(Figure 14i)** ou monocycliques **(Figure 14j)**, sauf exception notable chez *Portiera* spp. des Rhizophyllidacées, qui produit un métabolite anticancéreux très étudié chez les algues rouges, l'halomon **(Figure 14k)** (Crews *et al.*, 1978; Bates *et al.*, 1979; Fuller *et al.*, 1992).

De plus, quelques autres genres de la famille des Rhodomélacées, tels que les *Odonthalia*, *Polysiphonia*, *Rytiphloea*, *Vadalia* et *Symphyocladia*, élaborent des phénols bromés. Le genre *Acanthophora* quant à lui, se distingue des autres genres en produisant des stéroïdes non halogénés. Plusieurs genres de la famille des Bonnemaisoniacées tels que *Delisea*, *Asparagopsis*, *Bonnemaisonia* et *Ptilonia*, sont remarquables par leur production de cétones aliphatiques halogénées (Hay & Fenical, 1992). Enfin, les composés les plus connus chez les algues rouges pour leur capacité à interférer dans la communication bactérienne et pour fournir à l'algue une défense antisalissure (Kjelleberg & Steinberg, 2001), sont les furanones halogénées, antagonistes des acyl-homosérine lactones, découvertes chez *Delisea pulchra*, telles que les fimbrolides **(Figure 14 l et m)** (Kazlauskas *et al.*, 1977; de Nys *et al.*, 2006).

II.B.2.3 - Chez les Heterokontophytes

Chez les Heterokontophytes, plus de 1140 produits naturels ont été répertoriés, dont des terpènes, des diterpènes, des galactoglycérolipides, des phlorotannins et des petites acétogénines C_{11}, tous avec très peu d'halogénation (Blunt *et al.*, 2007; Plouguerné *et al.*, 2009) **(Figure 15)**.

Presqu'un tiers des composés chimiques répertoriés chez les algues brunes provient d'un seul genre : les *Dictyota*. Il a élaboré une grande richesse de terpènes, plus de 250 (Munro & Blunt, 2005), dont les diterpènes di- et tri-cyclisés tels que le dyctyol **(Figure 15a)**, l'amijiol **(Figure 15b-c)** et le dictyoxetane **(Figure 15d)** (Danise *et al.*,

1977; Ochi *et al.*, 1980; Tringali *et al.*, 1984; Pullaiah *et al.*, 1985). Des dérivés d'acétogénines C_{11} cycliques ou acycliques d'acides gras ont également été découverts chez les *Dictyopteris*, autre genre des Dictyotales, tels que les hydrocarbones dictyopterène A **(Figure 15e)** et D' **(Figure 15f)**, qui agissent comme des phéromones dans la reproduction sexuelle (Moore *et al.*, 1968; Moore & Pettus, 1971; Stratmann *et al.*, 1992). Ces composés peuvent être facilement dégradés par oxydation pour donner des composés tels que le dictyoprolène **(Figure 15g)** et le dihydrotropone **(Figure 15h)** (Moore & Yost, 1973; Yamada *et al.*, 1979).

Les phlorotannins, ou polyphénols, sont des oligomères ou polymères du phloroglucinol (tri-phénol), et les composés majoritaires des algues brunes qui peuvent représenter jusqu'à 10 - 20 % de leur poids sec (Ragan & Glombitza, 1986; Amsler & Fairhead, 2006). Les phlorotannins sont synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi, et sont véhiculés sous forme d'oligomères dans des vacuoles (physodes) qui migrent le long de filaments du cytosquelette pour déverser leur contenu à l'extérieur de la cellule. Le rôle de métabolites secondaires des phlorotannins est limité aux oligomères présents dans les physodes, et semblent jouer un rôle écologique dans la force de dissuasion des herbivores et des infections bactériennes. Ils ont également des activités anti-algues et anti-fongiques. Ils sont considérés comme métabolites primaires dès lors qu'ils sont polymérisés et complexés, et ont alors un rôle dans la construction, la consolidation et la protection de la paroi cellulaire, avec entre autres des propriétés antiradiculaires. (Sieburth & Conover, 1965; Ragan & Glombitza, 1986; Lau & Qian, 1997; Pavia *et al.*, 1997; Targett & Arnold, 1998; Amsler & Fairhead, 2006). Les tannins libérés dans l'eau de mer (donc solubles), ne sont pas polymérisés, et sont sécrétés uniquement sous forme de monomères bromés (bromophénols) et iodés (Shibata *et al.*, 2006).

Les phlorotannins sont classés en six groupes, basés sur des variations dans leur assemblage lors de la polymérisation des unités de phloroglucinol **(Figure 15i)** (Ragan & Glombitza, 1986; Targett & Arnold, 2001) : les fucols **(Figure 15j)**, rencontrés chez les *Fucus*, les phloréthols, les fucophloréthols, les fuhalols, les isofuhalols **(Figure 15k)** et les eckols, trouvés chez les *Ecklonia*, qui diffèrent de par le nombre de groupes hydroxylés présents et la nature de leurs liaisons aryl-aryl ou ester-aryl (Geiselman & McConnell, 1981; Grosse-Damhues & Glombitzka, 1984). Ces unités sont souvent estérifiées ou acylées, et peuvent dimériser ou polymériser en plus grandes unités.

Le genre *Cystoseira* chez les Fucales compte pas moins de 100 structures répertoriées (Munro & Blunt, 2005). Les composés sont principalement des quinones prénylées et des hydroquinones, allant des formes simples et linéaires à des formes complexes et polycycliques, comme pour le cystoketal **(Figure 15l)**, chez *C. balearica* et *C. stricta* **(Figure 15m)** (Amico *et al.*, 1984; Amico *et al.*, 1987).

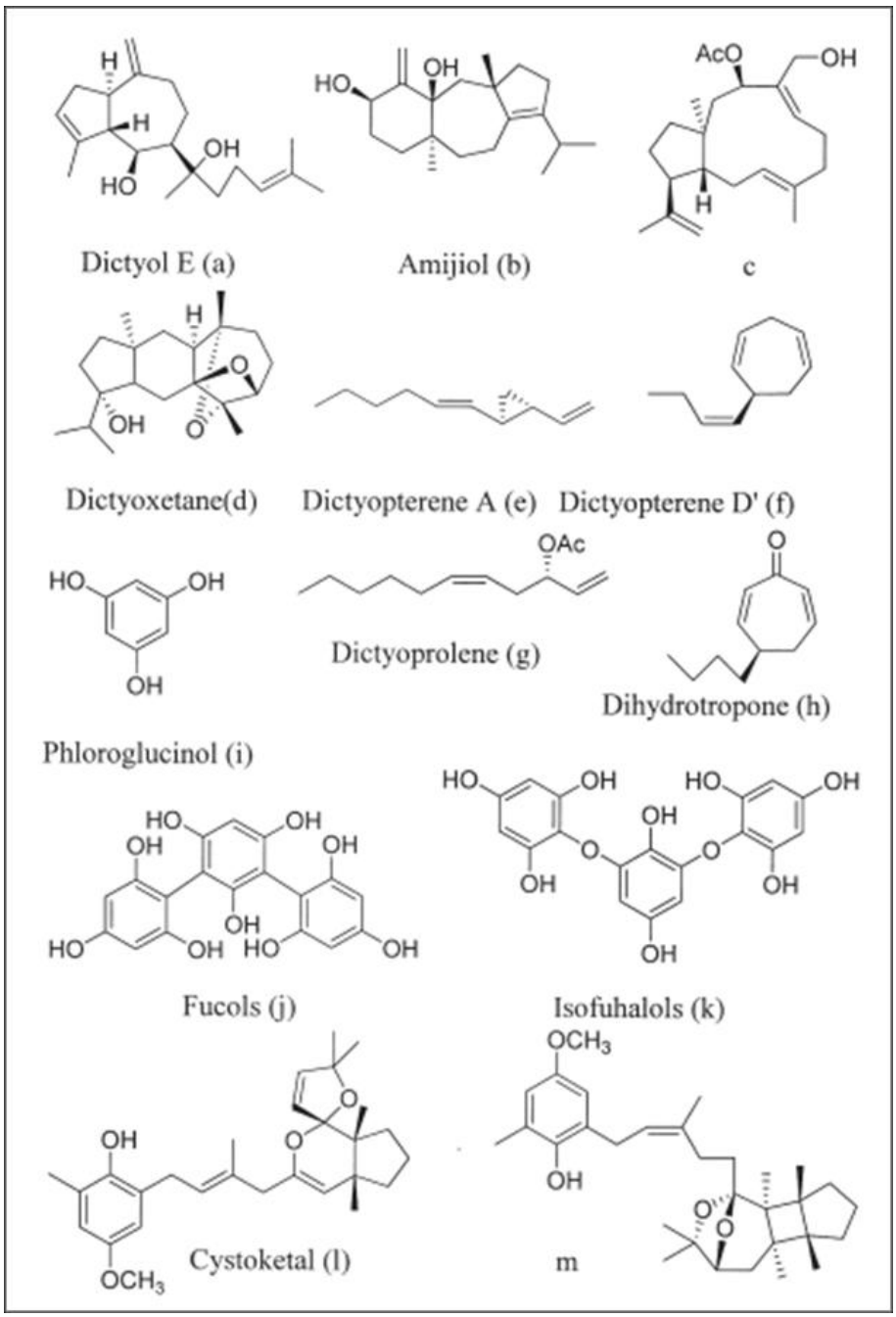


Figure 15 : Représentation des structures chimiques des composés naturels produits par les Heterokontophytes. ***(D'après Maschek & Baker, 2008)***

II.C - Modèles d'interaction algues-bactéries

II.C.1 - Chez les Chlorophytes

L'algue verte australienne *Ulva australis* est colonisée par une microflore très peu diversifiée, dominée par l'espèce bactérienne *Roseobacter gallaeciensis*, qui facilite à son tour l'établissement sélectif de la bactérie *Pseudoalteromonas tunicata* (Dalisay *et al.*, 2006). Les deux bactéries utilisent des stratégies différentes. En effet, *R. gallaeciensis* envahit et déstructure les biofilms des bactéries compétitrices, à l'exception de *P. tunicata* qui peut alors profiter de son « immunité » pour proliférer face à une compétition qu'elle ne peut gérer seule (Rao *et al.*, 2005). *P. tunicata* forme alors des microcolonies spatialement séparées et allélopathiquement dominantes pour les nutriments exsudés en faible quantité par l'algue hôte face aux autres souches bactériennes. Ces comportements bactériens à la surface d'*U. australis* permettent à l'algue un contrôle métaboliquement peu coûteux du biofilm bactérien.

Chez une autre Ulve, *Ulva lactuca*, il a été montré que les cultures axéniques possédées en laboratoire depuis des années **(Figure 16B)** présentaient une morphologie différente des cultures sauvages **(Figure 16A)** (Provasoli & Pintner, 1980). Lorsque des souches de bactéries marines, isolées d'Ulves ou d'autres algues récoltées dans leur environnement naturel, sont ajoutées en co-culture avec les thalles d'Ulves axéniques, ces souches bactériennes induisent la croissance de longs et fins tubes, ressemblant alors à la morphologie des *Enteromorpha* (bactéries actives) **(Figure 16C)**. En revanche, d'autres souches bactériennes n'ont aucun effet visible sur la morphologie de ces Ulves (bactéries inactives). Toutefois, la combinaison de plusieurs souches de bactéries actives et inactives ne permet pas d'aboutir à la morphologie existante à l'état sauvage, mais à l'obtention de rubans plats. Des résultats similaires ont également été observés chez une autre algue verte, *Monostroma oxyspermum* (Tatewaki *et al.*, 1983). Par conséquent, l'environnement bactérien proche des algues peut jouer un rôle essentiel et non négligeable dans la morphogénèse des thalles. Un principe actif, la thallusine, produite par des bactéries du groupe des *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes* isolées de l'algue verte *Monostroma oxyspermum* a depuis démontré une activité morpho-inductrice à des concentrations extraordinairement faibles (Matsuo *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2006).

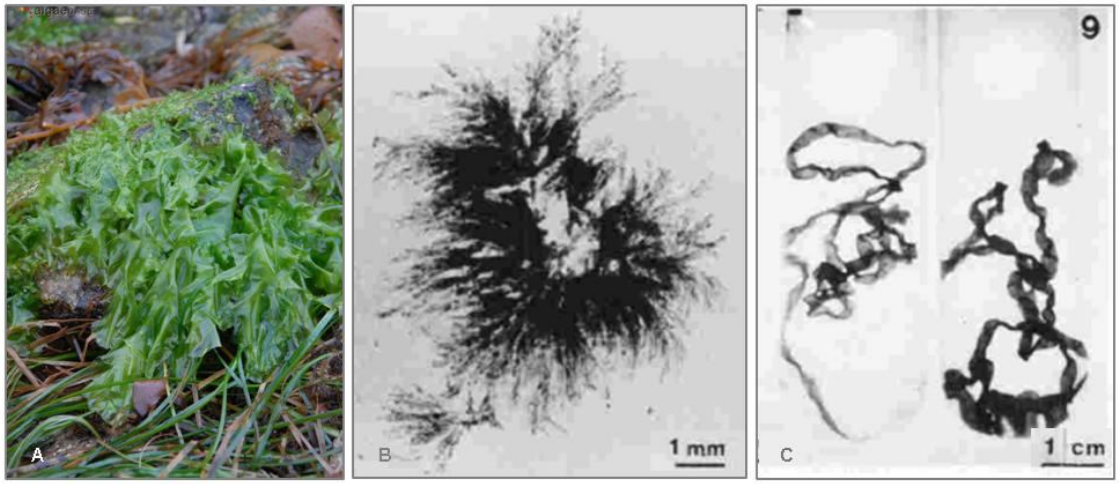


Figure 16 : Différentes morphologies observées chez l'algue verte *Ulva lactuca.*

(A) Morphologie des thalles de types sauvages d'*U. lactuca. (Photographie du site internet AlgaeaBase)*
(B) Morphologie des thalles axéniques d'*U. lactuca. (D'après Provasoli & Pintner, 1980)*
(C) Morphologie des thalles d'*U. lactuca* co-incubés avec des souches bactériennes marines. *(D'après Provasoli & Pintner, 1980)*

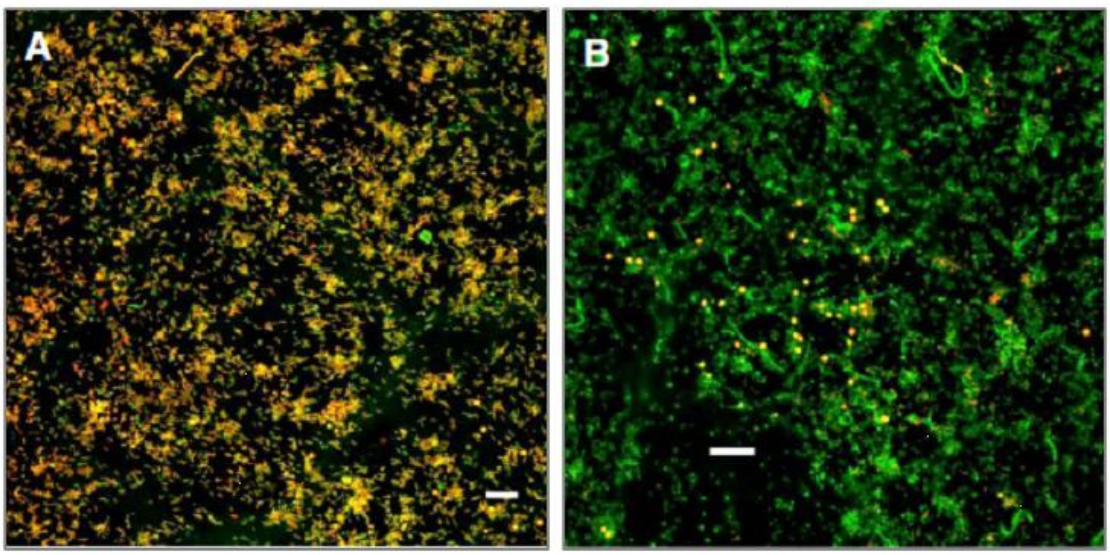


Figure 17 : Cellules bactériennes visualisées *in situ* sur l'algue verte *Ulva lactuca* par la technique CARD-FISH en microscopie confocale à balayage laser. *(D'après Tujula* et al.*, 2006)*

(A) Détection des bactéries avec la sonde EUB338 i-iii
(B) Détection des *Γ-proteobacteria* avec la sonde GAM42a
Les fluorescences sont obtenues avec la sonde $Alexa_{456}$ comme signal rapporteur (fluorescence rouge) et le fluorochrome SYBR Green II (fluorescence verte) ; Les barres d'échelle représentent 10 µm.

Une autre technique moléculaire a également fait ses preuves dans la caractérisation de la communauté bactérienne associée à une algue verte invasive *Caulerpa taxifolia* : la DGGE, pour « Denaturant Gradient Gel Electrophoresis » (Meusnier *et al.*, 2001). L'analyse de 54 séquences bactériennes de gène d'ADNr 16S de la microflore associée à quatre individus de *C. taxifolia* échantillonnés en Australie, à Tahiti, aux Philippines et en Méditerranée, a permis d'identifier cinq lignées bactériennes, dont trois dominantes. Les *Alphaproteobacteria* sont les plus abondantes et rencontrées à la surface de tous les échantillons. A l'inverse, les bactéries appartenant aux *Betaproteobacteria* et aux *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes* (CFB) sont principalement associées aux échantillons méditerranéens et australiens. Par conséquent, cette étude par DGGE a montré que les fréquences de distribution des cinq lignées bactériennes sont significativement différentes selon les situations biogéographiques de cette algue, prouvant par la même occasion la complexité et la spécificité des interactions entre les algues et les bactéries.

II.C.2 - Chez les Rhodophytes

L'algue rouge probablement la plus étudiée pour son activité antibactérienne, est une Rhodophyte vivant dans les eaux tempérées australiennes. Il s'agit de *Delisea pulchra*, produisant des métabolites secondaires non toxiques qui semblent contrôler la colonisation bactérienne à sa surface, en interférant avec le système de régulation bactérien, les AHL **(Figure 18A)** (de Nys *et al.*, 1995; Steinberg *et al.*, 1997; Manefield *et al.*, 1999; Kjelleberg & Steinberg, 2001; Steinberg & de Nys, 2002; de Nys *et al.*, 2006; Burke *et al.*, 2009).

Ces métabolites, appelés fimbrolides, sont des furanones halogénées essentiellement bromées **(Figure 18B)**, et sont encapsulées dans les vésicules des glandes cellulaires des algues, permettant la libération de ces métabolites à la surface de l'algue, à des concentrations qui détruisent une grande diversité d'organismes salissants procaryotes et eucaryotes (Kjelleberg & Steinberg, 2001). Néanmoins, ces furanones ne sont pas toxiques et n'inhibent pas la croissance des bactéries. De par leur similitude de structure avec les AHL, l'hypothèse que ces furanones agissent comme des antagonistes ou agonistes spécifiques des systèmes de régulation des AHL a été testée avec succès

dans plusieurs modèles de bactéries pathogènes (Manefield *et al.*, 1999; Martinelli *et al.*, 2004).

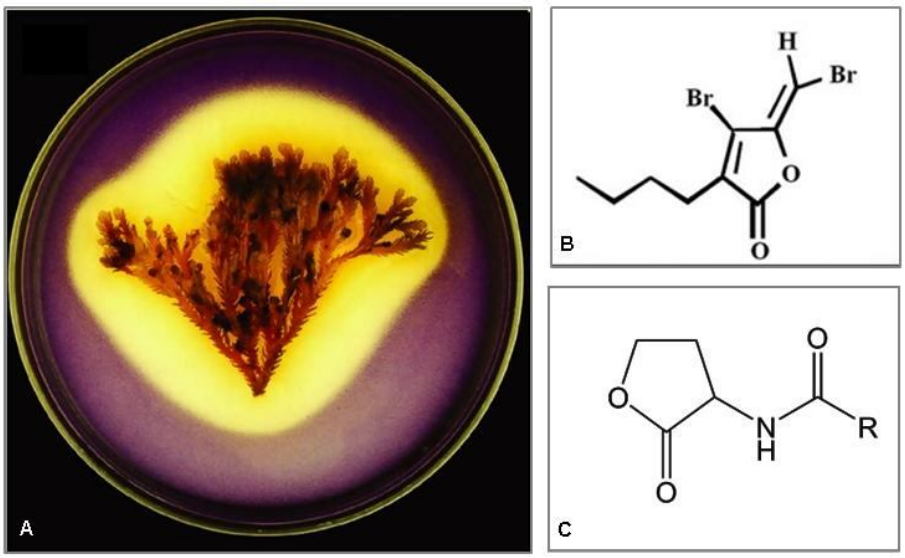


Figure 18 : Inhibition du quorum sensing par l'algue rouge marine *Delisea pulchra*

(A) La présence de *D. pulchra* inhibe la production du pigment violet produit par *Chromobacterium violaceum* en réponse au *quorum sensing*, ce pigment pouvant être utilisé comme senseur de la production d'HSL. *(D'après Filloux & Vallet, 2003)*
(B) Furanones produites par *D. pulchra* et qui interfèrent avec le fonctionnement du *quorum sensing* chez *C. violaceum*, et en particulier avec le fonctionnement du C6-HSL. *(D'après Hentzer* et al., *2003)*
(C) N-acyl homosérine lactone, molécule signal du *quorum sensing* chez les bactéries. *(Image à partir du site http://en.wikipedia.org/wiki/N-Acyl_homoserine_lactone)*

Les métabolites secondaires halogénés de certaines Rhodophytes sont donc très performants dans leurs activités bactéricides (e.g. dans *Asparagopsis armata*) et bactériostatiques (e.g. dans *Delisea pulchra*), tant par leur productivité que par la diversité des molécules produites. Ainsi, l'algue rouge *Asparagopsis armata* vit essentiellement sous forme d'épiphytes (non invasif) d'algues fixées comme l'algue verte *Ulva* sp., et produit un cocktail d'hydrocarbures halogénés volatils dont certains sont très toxiques (Kladi *et al.*, 2004). L'hydrosphère immédiate de cette algue rouge est alors protégée des bactéries colonisatrices, au bénéfice de l'algue verte porteuse, elle-même dépourvue de métabolites secondaires antibactériens. De même, la phase sporophytique de l'algue rouge *Bonnemaisonnia hamifera*, introduite du Japon en Europe en plusieurs vagues, semble produire un métabolite, le 4-bromo-heptanone, qui contribue à son pouvoir invasif depuis son introduction en Suède (Svensson *et al.*, 2009).

II.C.3 - Chez les Heterokontophytes

Les laminaires sont les Heterokontophytes les plus étudiés au niveau de leur microflore associée. L'étude la plus récente a été réalisée sur les communautés bactériennes associées à *Laminaria saccharina* (renommée *Saccharina latissima*) **(Figure 19A)** provenant de deux sites d'échantillonnages différents (la mer Baltique et la mer du Nord), par les techniques de DGGE et de banques de clones de gènes d'ARNr 16S (Staufenberger *et al.*, 2008). Les résultats ont montré que les quatre parties des thalles (crampon, stipe, méristème et fronde), ainsi que l'eau de mer environnant les algues échantillonnées, présentaient des profils de bandes de gènes d'ARNr 16S en DGGE différents **(Figure 19B)**. Les associations bactériennes au niveau des stipes et des crampons étant plus spécifiques que celles obtenues à partir des frondes âgées. Les phylotypes des bactéries associées à cette algue sont affiliés aux groupes des *Alphaproteobacteria*, des *Γ-proteobacteria* et des *Bacteroidetes*. Cette étude a permis de mettre en évidence la complexité des associations bactériennes, qui sont non seulement spécifiques à l'algue qui les héberge, mais aussi spécifiques aux différentes parties de l'algue, de sa situation géographique et de la saison (Staufenberger *et al.*, 2008).

Cette étude a fortement été inspirée d'une étude réalisée en Bretagne sur les communautés bactériennes épiphytes d'une autre laminaire, *L. digitata*, au début des années 1990 (Corre & Prieur, 1990). A l'époque, le travail a été effectué par microscopie électronique à balayage (MEB) et par cultures sur boîte de Petri. Les résultats obtenus montrent des différences de densités bactériennes qui augmentent de la zone méristématique aux zones médiane et distale des frondes, puis aux débris résultant de la fragmentation naturelle de l'algue. Comme l'étude précédente, les densités bactériennes fluctuent de manière saisonnière, surtout au niveau du méristème, les valeurs les plus élevées étant observées en été, sauf au niveau des débris où les valeurs semblent stables. Ces résultats sont également en accord avec ceux obtenus sur les frondes de *L. longicruris* au Canada (Laycock, 1974), et de *L. pallida* et *Ecklonia maxima* en Afrique du Sud (Mazure & Field, 1980). Les flores bactériennes présentes sur ces algues sont principalement des bactéries à Gram négatif (Laycock, 1974; Kong & Chan, 1979; Corre & Prieur, 1990), allant de la forme coccoïdale au niveau des zones méristématiques, à des formes plutôt en bâtonnets sur les surfaces vieillissantes des tissus de l'algue (Corre & Prieur, 1990).

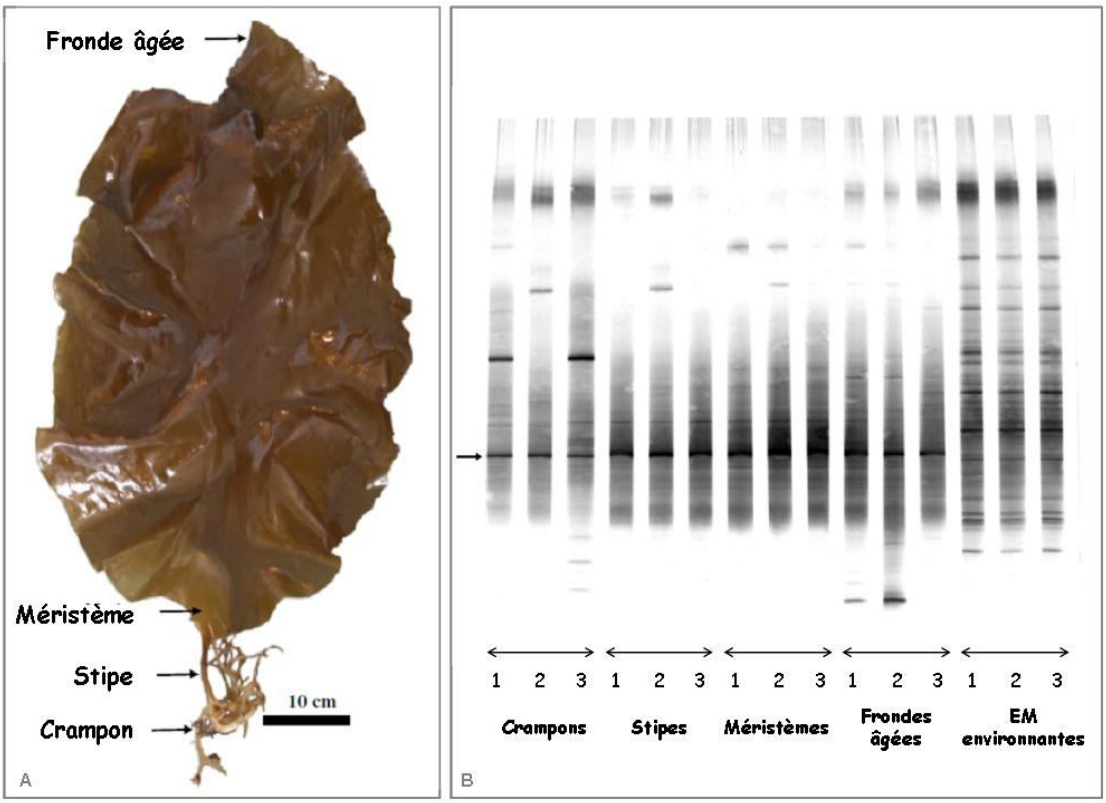


Figure 19 : Analyse moléculaire par DGGE d'échantillons d'ADN bactériens extraits de *Saccharina latissima*. *(D'après Staufenberger* et al.*, 2008)*

(A) Thalle de l'algue brune *L. saccharina*, avec les différentes parties utilisées pour l'étude : le crampon, le stipe, le méristème et la fronde âgée.
(B) Analyse en DGGE des trois thalles de *L. saccharina* échantillonnés dans la mer Baltique en janvier 2006 ; 1-2-3 correspond aux trois individus différents ; la flèche correspond aux bandes utilisées pour la réamplification de l'ADN.

Il a été mis en évidence quelques années plus tard que *L. digitata* a la capacité de contrôler son épiphytisme bactérien, grâce à un mécanisme de reconnaissance de produits de dégradation pariétale par des bactéries ayant infecté un tissu lésé (Küpper *et al.*, 2001; Küpper *et al.*, 2002; Potin *et al.*, 2002). Cette élicitation provoque l'émission précoce d'une bouffée oxydante appelée burst oxydant, ainsi que la suractivation d'haloperoxydases extracellulaires à vanadium (Colin *et al.*, 2005; Leblanc *et al.*, 2006), lesquelles orchestrent la production plus tardive d'halocarbonés volatils, d'iode moléculaire et d'acides hypohalogéneux toxiques (Potin *et al.*, 1999; Potin *et al.*, 2002; Abrahamsson *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2005), et participent à la reconstruction cuticulaire des tissus endommagées. Les acides hypohalogéneux sont reconnus pour leur action biocide sur les particules bactériennes, mais peuvent également dégrader les AHL bactériens (Daniels *et al.*, 2004).

II.D - Bactéries pathogènes chez les algues marines

Comme dans toutes les interactions entre organismes vivants, et notamment dans celles impliquant des bactéries marines, la santé de l'hôte peut être endommagée. Les bactéries épiphytes peuvent causer des maladies, des nécroses des tissus, diminuer la croissance et/ou la photosynthèse, inhiber les échanges gazeux, interférer dans les processus de reproduction, et peuvent même conduire à la mort de l'individu hôte (Andrews, 1976; Uchida *et al.*, 1995; Correa & Sánchez, 1996; Steinberg *et al.*, 1997; Sawabe *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2000b; Uchida *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

Les études effectuées sur les bactéries épiphytes pathogènes concernent majoritairement les algues marines cultivées. En effet, l'exemple type est celui de la laminaire *L. japonica* (renommée *Saccharina japonica*), dont le thalle peut se couvrir de nécroses rouges (Uchida *et al.*, 1995; Sawabe *et al.*, 1998; Sawabe *et al.*, 2000; Uchida *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008). Cinq souches bactériennes à Gram positif et négatif, et ayant une activité bactériolytique, ont été isolées à partir des points rouges présents sur les thalles des champs de *S. japonica* (Sawabe *et al.*, 1998). Ces isolats, identifiés comme *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., ont été reconnus comme étant les agents pathogènes responsables de la maladie des nécroses rouges de cette algue. Des travaux plus récents sur cette algue cultivée dans les fermes aquacoles chinoises ont permis d'isoler et de cultiver quarante-deux souches bactériennes à Gram négatif associées aux thalles malades (Wang *et al.*, 2008). Ces souches bactériennes appartiennent aux genres *Pseudoalteromonas* (61,9 %), *Vibrio* (28,6 %), *Halomonas* (7,1 %) et *Bacillus* (2,4 %). Les tests de pathogénécité réalisés sur ces souches ont montré que douze d'entre elles étaient capable de causer les symptômes de la maladie sur les sporophytes de *L. japonica*. Elles appartiennent aux genres *Pseudoalteromonas* (58,3 %), *Vibrio* (33,3 %) et *Halomonas* (8,3 %), et pourraient potentiellement être les bactéries pathogènes responsables de la maladie des nécroses rouges chez ces algues cultivées.

III - MODELE D'ETUDE : *LAMINARIA DIGITATA*

III.A - Ses caractéristiques biologiques

III.A.1 - L'algue et sa position phylogénétique

Les algues représentent un ensemble diversifié d'organismes autotrophes, comprenant des lignées unicellulaires telles que les microalgues, et des lignées multicellulaires telles que les macroalgues. En d'autres termes, les algues appartiennent à des groupes phylogénétiques très différents, et ont souvent été regroupées par défaut, par simple opposition aux végétaux terrestres pluricellulaires.

Une macroalgue est un organisme photosynthétique, multicellulaire, non vascularisé, sans tige, ni racine, ni feuille, et vivant dans un milieu aquatique. Ces algues sont classées sur la base de leur composition pigmentaire, à savoir les algues brunes (chlorophylle *a* et *c*, caroténoïdes), les algues rouges (chlorophylle *a*, phycoéryhtrine) et les algues vertes (chlorophylle *a* et *b*). Elles appartiennent à des lignées évolutives indépendantes **(Figure 20)**. Une endosymbiose primaire entre une cyanobactérie photosynthétique et un hôte eucaryote serait à l'origine des algues rouges (les Rhodophytes), qui appartiennent à la lignée verte comprenant également les algues vertes (les Chlorophytes) et les végétaux terrestres (les Streptophytes). Les algues brunes (Heterokontophytes) sont quant à elles issues d'une endosymbiose secondaire entre un protiste sans plaste et un ancêtre unicellulaire d'algue rouge. Ces algues brunes, les diatomées ainsi que les oomycètes appartiennent ainsi à la lignée des Hétérocontes (Baldauf, 2003; Selosse, 2006; Baldauf, 2008). L'histoire évolutive des Hétérokontes semble avoir aussi impliquée une autre endosymbiose avec une algue verte primitive, avant la symbiose avec un ancêtre unicellulaire d'algue rouge (Moustafa *et al.*, 2009). Mon modèle végétal d'étude *Laminaria digitata*, appartient à cette lignée des Hétérocontes.

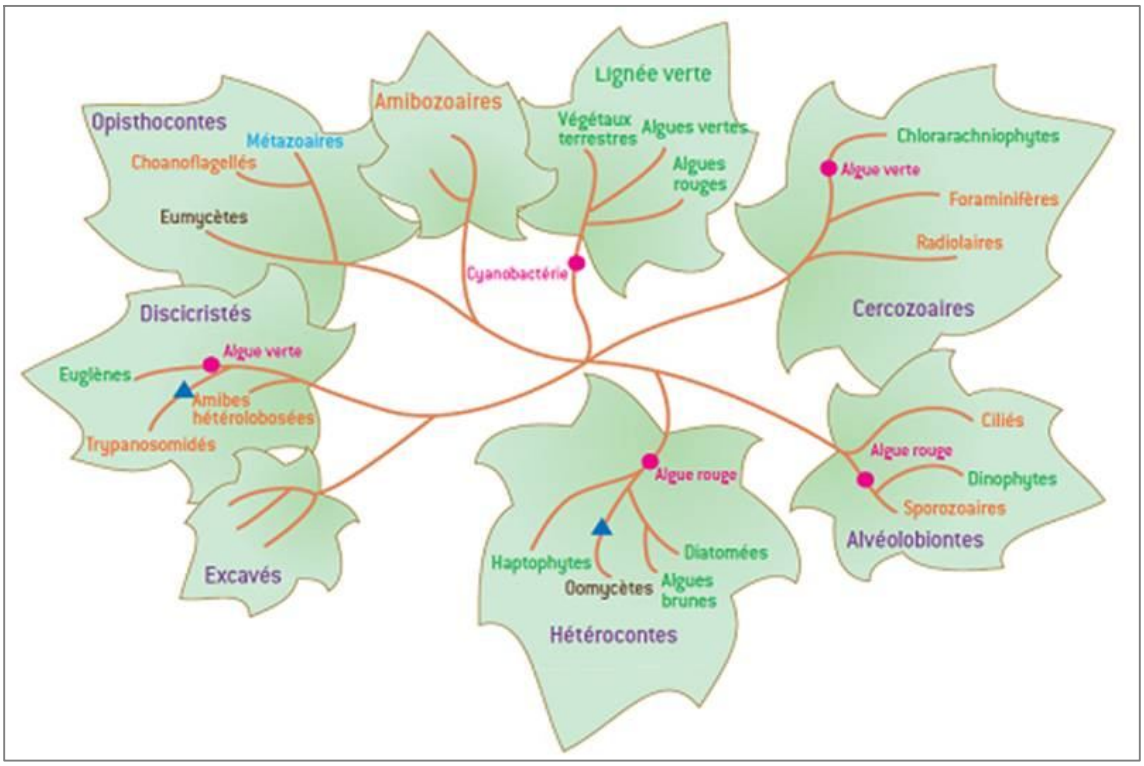


Figure 20 : Arbre phylogénétique des eucaryotes. ***(D'après Selosse, 2006)***

Cet arbre est sans racine, et met en scène les huit grandes lignées évolutives reconnues aujourd'hui. Les lignées qui ont « adopté » la photosynthèse (en vert), par suite d'endosymbiose (les ronds roses, le nom indique l'infrakingdom aquis), sont représentées dans cinq des huit groupes. La macroalgue brune *Laminaria digitata* appartient à la lignée des Hétérocontes

III.A.2 - L'algue et son écologie

Le genre *Laminaria* a été décrit par Lamouroux en 1813, avec pour espèce type *Laminaria digitata*. Cette macroalgue brune appartient à la classe des Phéophycées et à l'ordre des Laminariales. Sa répartition géographique plutôt nordique s'étend des côtes du Spitzberg au golfe de Gascogne, dans des eaux arctiques et tempérées ne dépassant pas les 18°C en été. Elle atteint sa limite sud dans le Golfe du Morbihan. Cette espèce se développe sur des faciès rocheux, sur des zones moyennement battues et/ou à fort courant (Lewis, 1964), juste au-dessous de la ceinture à *Fucus serratus* et au-dessus de celle à *Laminaria hyperborea* **(Figure 21)**. Elle forme des populations généralement denses, se limitant aux étages littoraux inférieurs et infralittoraux, jusqu'à une profondeur voisine des 10 m en eaux claires. Cette caractéristique lui permet de rester immergée en permanence, à l'exception des basses mers de vive-eau (*i.e.* coefficient ≥ 90). De ce fait, cette algue n'est soumise que très rarement à la dessiccation ou aux

variations de salinité du milieu liées au marnage. Son exposition à l'intensité lumineuse est réduite, comprise entre 10 et 20 % de la lumière incidente.

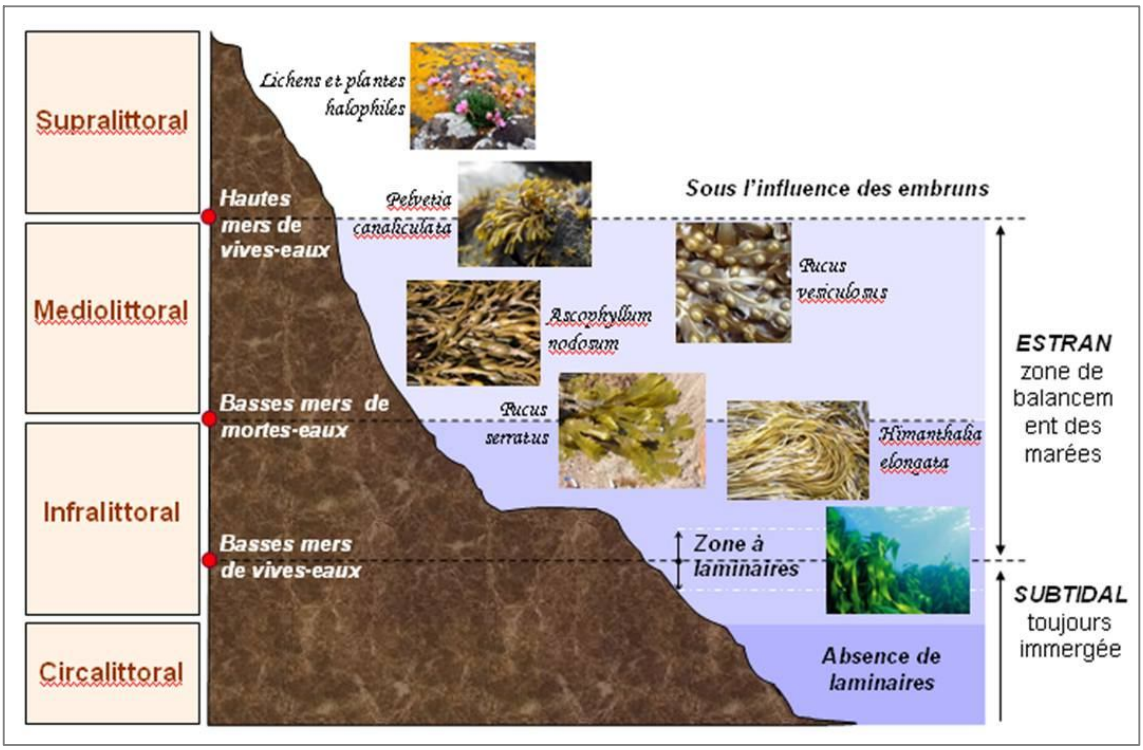


Figure 21 : Représentation schématique de l'étagement des ceintures de macroalgues brunes sur un estran breton en mode abrité ou semi-abrité.

L. digitata se situe au niveau de la ceinture des Laminaires de l'infralittoral.

III.A.3 - Son cycle de vie et sa morphologie

Le cycle biologique de *L. digitata* est digénétique hétéromorphe, c'est-à-dire qu'il comporte une phase haploïde filamenteuse microscopique, le gamétophyte, et une phase diploïde macroscopique, le sporophyte (Sauvageau, 1918).

Le sporophyte diploïde correspond à la génération visible. C'est un grand thalle brun sombre à brun olive pouvant atteindre 2,50 mètres (Gayral & Cosson, 1973), avec une durée de vie maximale de 4 à 5 ans. Il se différencie à sa base par un système de crampons assurant la fixation de l'algue au substrat par une série d'haptères sans ordre apparent **(Figure 22)**. Il est surmonté d'un stipe long, lisse, flexible et cylindrique, comprimé à son sommet, et qui ne porte pas ou que très rarement d'épiphytes. Vient ensuite une lame (ou fronde) arrondie à la base et divisée en lanières, d'où le nom

d'espèce « *digitata* ». La formation des tissus du stipe et de la lame est assurée par un méristème intercalaire situé à la jonction stipofrondale. Le fonctionnement de cette zone méristématique au niveau de la lame repousse les tissus les plus anciens vers les tissus des extrémités distales de l'algue.

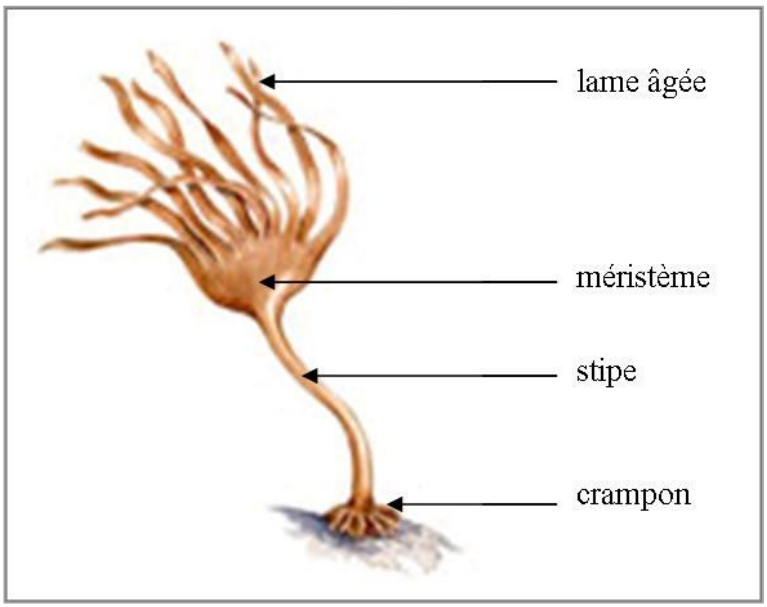


Figure 22 : Morphologie d'un sporophyte de *Laminaria digitata*.

Il peut être divisé en 4 parties : le crampon qui permet la fixation de l'algue au substrat, le stipe surmonté d'une lame digitée, et le méristème, zone de croissance de l'algue.

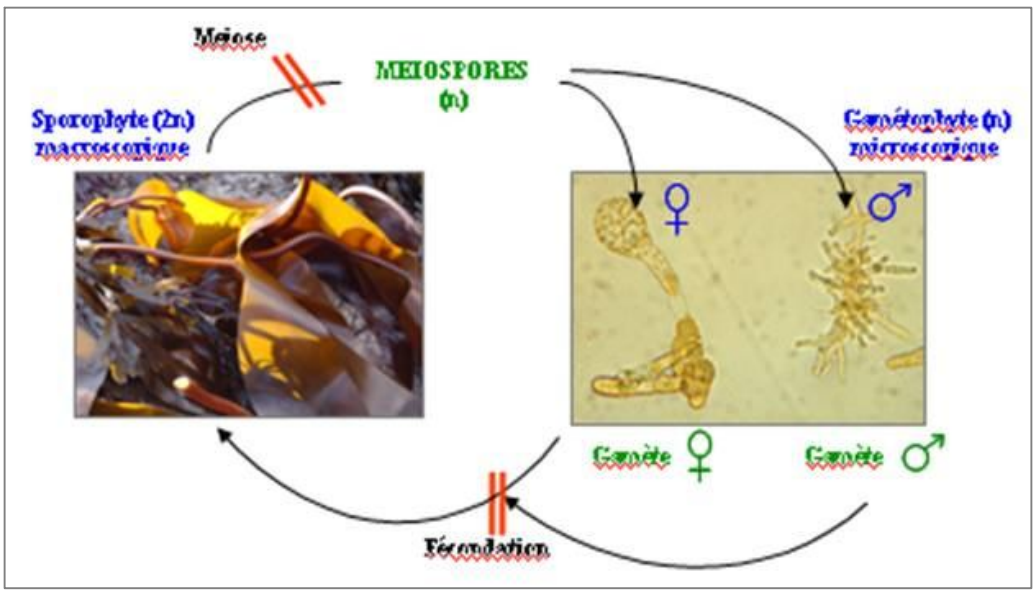


Figure 23 : Cycle digénétique hétéromorphe de *L. digitata*. *(D'après Colin, 2004)*

Le sporophyte macroscopique (2n) produit des spores méiotiques (n) qui donnent naissance à des gamétophytes microscopiques mâles (n) ou femelles (n). La fusion des gamètes redonne un nouveau sporophyte (2n), sur le gamétophyte femelle.

A maturité, le sporophyte produit des spores méiotiques dans des sporocystes en sores (zoospores), disséminés sur la lame et visibles sous forme de taches sombres **(Figure 23)**. Les zoospores vont germer en gamétophytes microscopiques mâles ou femelles, réduits à quelques cellules. La fusion des gamètes sur le gamétophyte femelle aboutit à un zygote diploïde qui permet de nouveau la formation de jeunes plantules, puis de sporophytes de grande taille.

III.A.4 - Sa paroi et l'importance de son composé majoritaire : l'alginate

La paroi cellulaire de *L. digitata* est composée d'un squelette fibrillaire de cellulose et d'une matrice amorphe mucilagineuse, principalement composée d'acides alginiques : les alginates. Les alginates, qui sont également présents dans le mucilage externe et les espaces intercellulaires, peuvent représenter jusqu'à 45 % du poids sec de l'algue (Kloareg & Quatrano, 1988). La paroi est également constituée de fucanes caractéristiques des algues brunes, les homofucanes, et d'hémi-celluloses tels que les xylo-fuco-glucanes, les xylo-fuco-glycuronanes et reliés à des glycoprotéines **(Figure 24)**. Les fucanes sont notamment reconnus pour leurs propriétés biologiques intéressantes en pharmacologie et en médecine.

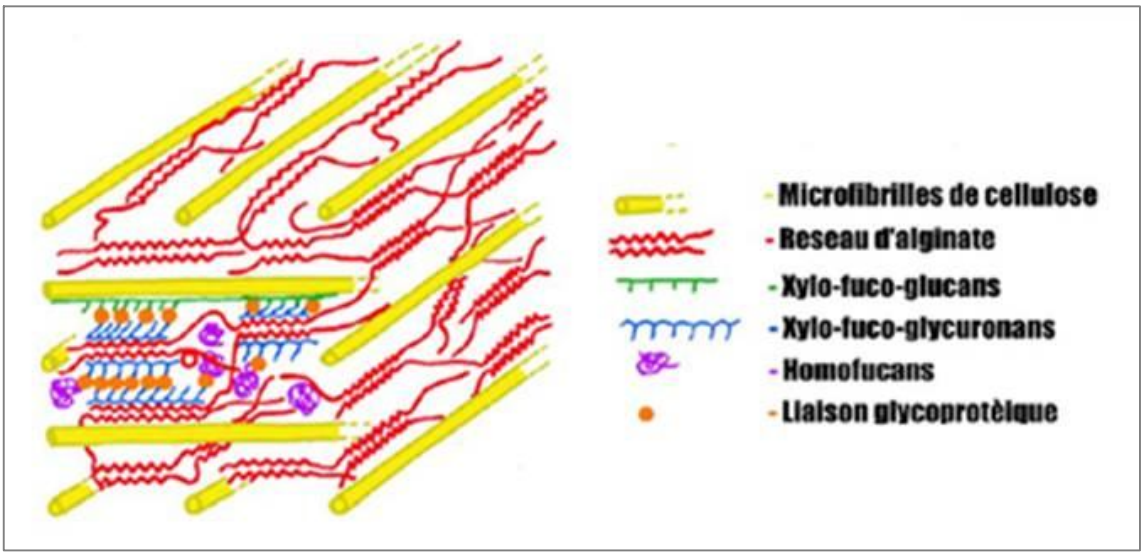


Figure 24 : Schéma d'interprétation de la structure pariétale des Phéophycées. ***(D'après Kloareg & Quatrano, 1988)***

L'alginate est un polysaccharide formé de deux monomères liés ensemble : le mannuronate ou acide β-D-mannuronique (**M**), et le guluronate ou acide α-L-guluronique (**G**). La proportion et la distribution aléatoires de ces deux monomères sont déterminantes pour une large expansion des propriétés physiques et chimiques de l'alginate. C'est pourquoi, la lame souple du thalle est plus riche en mannuronate, tandis que le crampon rigide, est quant à lui riche en guluronate. Les chaînes sont constituées par l'enchaînement de blocs **M** (**MM**), de blocs **G** (**GG**) et de l'alternance de **M** et de **G**, les blocs mixtes (**MG**) **(Figure 25)**.

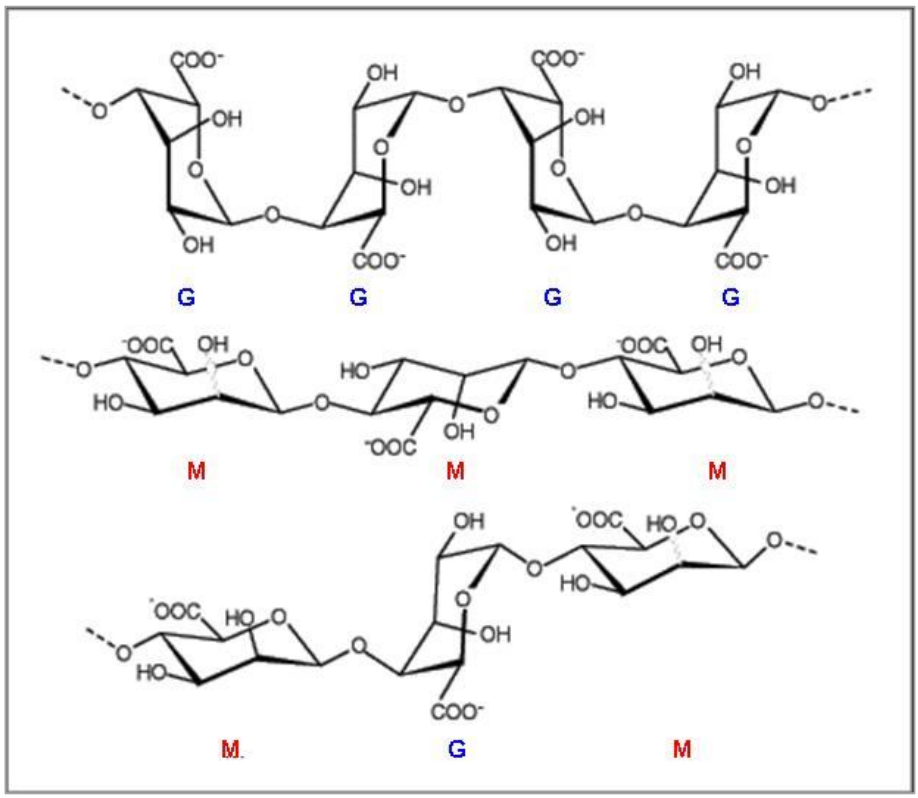


Figure 25 : Structure des unités chimiques de l'alginate, composant principal de la paroi de *L. digitata*. *(D'après Küpper* et al.*, 2001)*

L'alginate est composé de deux types de sucres : l'acide α-L-guluronique (**G**) et l'acide β-D-mannuronique (**M**). Les chaînes de polysaccharides sont constituées de l'alternance de blocs homogènes G (**GG**) ou de M (**MM**), et de blocs hétérogènes contenant les deux types de sucres (**MG**).

Les champs de laminaires sont fortement exploités pour fournir la matière première essentielle à l'extraction des alginates, particulièrement en Bretagne. Toutefois, il faut noter que les teneurs en alginates varient selon plusieurs paramètres, notamment selon la période de la récolte et l'origine géographique des échantillons,

mais aussi selon l'âge des tissus avec une abondance plus marquée dans les tissus jeunes (Perez, 1970).

Les alginates ont la propriété de former des gels de rhéologie variable en fonction de leur teneur en acides guluroniques et de la nature des cations présents en solution. En raison de leur charge, ils interagissent également avec de nombreuses molécules biologiques, telles que des protéines ou des acides gras. Ils sont de ce fait très largement utilisés pour leurs pouvoirs épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants, sous l'appellation E400 à E405 dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique et textile. Les applications industrielles qui en découlent sont alors très diverses : texture de produits alimentaires ou cosmétiques, empreinte dentaire, plâtrage d'estomac, encapsulage de médicaments ou de substances biologiques fragiles, traitement des papiers, propriétés absorbantes des couches, fixation des colorants dans le textile, fil biodégradable, précipitation des impuretés dans les eaux usées etc…Autant d'applications diverses et variées retrouvées dans notre vie de tous les jours.

III.B - Ses mécanismes de défense

Contrairement aux plantes terrestres, les mécanismes de défense chez les algues restent encore mal connus. Pourtant, tout comme les plantes terrestres, les macroalgues sont continuellement confrontées à des agressions biotiques et/ou abiotiques. Un certain nombre de pathologies ont déjà été décrites, montrant pour certaines des effets véritablement destructeurs sur des cultures d'algues ou des populations naturelles (Andrews, 1976; Andrews, 1977; Correa & Sánchez, 1996). Pour répondre aux agressions, les algues ont dû développer un répertoire chimique très diversifié, qui constitue une première barrière constitutive à de nombreux agresseurs (Pohnert, 2004; Paul *et al.*, 2006a). Les composés chimiques les plus connus et décrits chez les algues sont les métabolites secondaires. Ils peuvent avoir des propriétés biocides et détergentes qui permettent aux algues de lutter contre l'invasion de microorganismes potentiellement nocifs (de Nys & Steinberg, 2002; Kubanek *et al.*, 2003). Ils peuvent également avoir des propriétés astringentes, pour se défendre du broutage des herbivores (Paul & Puglisi, 2004; Paul *et al.*, 2006b). Si les interactions biotiques sont abondamment décrites par des observations de terrain et des expériences de

comportement, les divers mécanismes de défense des algues commencent seulement à être explorés (Potin *et al.*, 1999; Bouarab *et al.*, 2001; Potin *et al.*, 2002; Pohnert, 2004; Cosse *et al.*, 2007; Ritter *et al.*, 2008; Cosse *et al.*, 2009; Goulitquer *et al.*, 2009).

III.B.1 - Pathologies rencontrées chez les Laminaires

Les maladies infectieuses des algues sont causées par une grande variété d'organismes, en passant par des virus, des bactéries, des champignons et jusqu'à d'autres algues endophytes (Ellertsdóttir & Peters, 1997; Müller *et al.*, 1998; Sawabe *et al.*, 1998; Heesch & Peters, 1999; Küpper & Müller, 1999; Maier *et al.*, 2000; Sawabe *et al.*, 2000; Bouarab *et al.*, 2001; Kubanek *et al.*, 2003; Gachon *et al.*, 2006; Sekimoto *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Chez *Laminaria digitata*, les pathologies les plus étudiées sont celles causées par des endophytes pathogènes, comme *Laminariocolax tomentosoides*, *L. aecidioides* et *Laminarionema elsbetia*. Ce sont des algues unicellulaires, filamenteuses, qui peuvent être des gamétophytes de macroalgues ou des espèces différentes. Ces endophytes sont capables de pénétrer dans les jeunes thalles de *L. digitata*, provoquant ainsi une forte inhibition de la croissance des plantules et causant des malformations diverses : hyperplasie et/ou hypoplasie, torsion du stipe et de la lame **(Figure 26)**.

De plus, il existe de nombreux cas de pathogénicité dus aux interactions des bactéries avec les algues. Malheureusement, les espèces bactériennes responsables de maladies observées sur les thalles des algues restent que trop rarement décrites (Laycock, 1974; Correa, 1996; Potin *et al.*, 1999; Sawabe *et al.*, 2000; Küpper *et al.*, 2002; Uchida *et al.*, 2002). Chez *L. digitata*, des bactéries sont responsables de la dégradation et du pourrissement des lames, par leur capacité à hydrolyser différents sucres et polyols (Corre & Prieur, 1990). Toutefois, cette observation a été effectuée au niveau des frondes âgées, ne causant pas la mortalité du thalle. L'algue brune *L. digitata* pourrait donc être capable de contrôler en partie son épiphytisme bactérien, en contrôlant les communautés bactériennes peuplant les différentes régions de son thalle, laissant se faire dégrader les parties âgées, favorisant ainsi la croissance des parties jeunes.

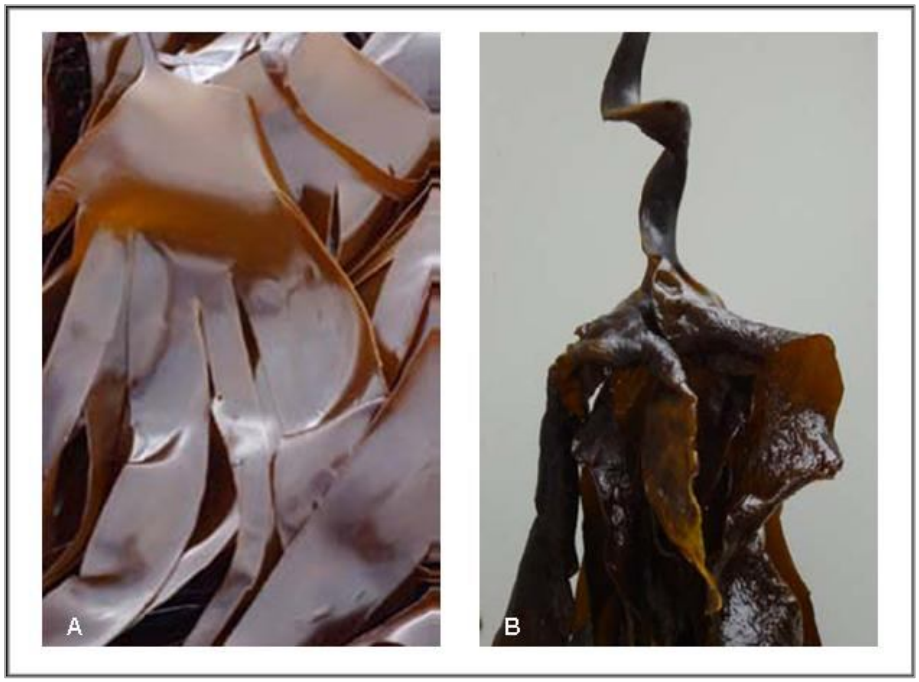


Figure 26 : Thalles de *L. digitata* sains et infectés par des endophytes et des bactéries, récoltées dans une population sauvage de l'île de Sieck en Bretagne. *(Photographies : A. Cosse)*

(A) sporophyte parfaitement sain, avec des tissus lisses et turgescents, ne présentant aucun épiphyte visible.
(B) sporophyte profondément infecté par des endophytes et des bactéries, avec des déformations importantes au niveau de la lame et du stipe, et certaines zones tissulaires présentant un début de pourrissement.

III.B.2 - Reconnaissance du pathogène

La première étape indispensable pour se défendre de l'attaque de pathogènes reste la reconnaissance de ce pathogène. Chez les plantes terrestres, il existe un grand nombre de travaux décrivant des interactions négatives entre les végétaux et leurs pathogènes, ainsi que leurs moyens de défense (Van den Ackerveken *et al.*, 1996; John *et al.*, 1997; Ebel & Mithöfer, 1998; Fritig *et al.*, 1998; Scheel, 1998; Somssich & Hahlbrock, 1998).

En revanche, il n'en existe que très peu chez les algues, de par le manque de données concernant leur pathosystème. En effet, l'identification d'éliciteurs endogènes et exogènes chez quelques espèces d'algues est récente. Elle concerne les trois macroalgues rouges *Gracilaria conferta* (Weinberger *et al.*, 1999; Weinberger & Friedlander, 2000a; Weinberger & Friedlander, 2000b; Weinberger *et al.*, 2001; Weinberger *et al.*, 2005; Weinberger, 2007), *Gracilaria chilensis* (Weinberger *et al.*,

2005) et *Chondrus crispus* (Bouarab *et al.*, 1999; Bouarab *et al.*, 2001; Bouarab *et al.*, 2004; Hervé *et al.*, 2006), et la macroalgue brune *Laminaria digitata* (Potin *et al.*, 1999; Küpper *et al.*, 2001; Küpper *et al.*, 2002; Potin, 2008; Cosse *et al.*, 2009).

III.B.2.1 - Eliciteur endogène : les blocs GG

L. digitata fut le premier modèle d'étude sur la perception d'une agression pathogène avec *G. conferta*, grâce à la reconnaissance d'un éliciteur endogène (Potin *et al.*, 1999; Weinberger *et al.*, 1999).

L'éliciteur endogène majeur chez *L. digitata* est issu de l'alginate, principal composant de la paroi de l'algue **(cf paragraphe III.A.4 p.63)**. Les oligosaccharides issus de l'alginate, induisent chez cette algue un burst respiratoire et oxydant, rapide et transitoire. Ils peuvent être produits naturellement au cours de l'agression d'un pathogène, notamment par des bactéries alginolytiques (Küpper *et al.*, 2001; Küpper *et al.*, 2002). Ces bactéries ont un équipement enzymatique qui permet la dégradation de l'alginate, donc de la paroi de l'algue, qui représente une source importante de carbone. Les oligosaccharides peuvent également être produits en laboratoire par hydrolyse acide d'alginate purifié, et servir ainsi d'éliciteurs pour étudier les réponses de défense de cette algue.

Par conséquent, suite à la dégradation de la paroi de l'algue, des fragments d'alginate sont libérés. Ils sont composés d'oligosaccharides d'assemblage en guluronate et en mannuronate différents : les blocs GG, les blocs MM et les blocs mixtes MG. Toutefois, la capacité de ces oligosaccharides à déclencher l'émission d'un burst oxydant est dépendante de leur structure. En effet, seuls les blocs GG sont capables d'induire une réponse rapide de *L. digitata*, tandis que les blocs MM ou mixtes sont inefficaces (Küpper *et al.*, 2001).

La compréhension du mode de fonctionnement de ces blocs GG comme éliciteur endogène de l'algue n'est que partielle. Cependant, il existe bien une activité élicitrice clairement dépendante de la taille et de la structure des oligosaccharides. De plus, il existe une période réfractaire d'élicitation de trois heures, pendant laquelle l'algue ne peut réagir à une nouvelle stimulation par des GG. Ainsi, il existerait des récepteurs

spécifiques à ces oligoguluronates (Küpper *et al.*, 2001). Les blocs GG établissent des ponts intermoléculaires en présence d'ions calciques (Ca^{2+}) et ont une structure ordonnée en forme de boîtes à œufs, appelée « egg-box », qui représenterait la forme d'oligogalacturonides possédant l'activité élicitrice chez le tabac *Nicotiana tabacum* (Spiro *et al.*, 1998). Par conséquent, toutes ces observations laissent à penser que le mode de perception des blocs GG par *L. digitata* est comparable à celui des oligosaccharides chez les végétaux supérieurs.

III.B.2.2 - Eliciteur exogène : les LPS d'origine bactérienne

En plus des éliciteurs endogènes mentionnés chez *L. digitata*, des éliciteurs exogènes ont également été mis en évidence.
En effet, suite à l'application de LPS d'origines diverses, notamment des LPS de bactéries marines ou pathogènes de mammifères, *L. digitata* émet du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec une amplitude similaire à celle observée par une élicitation aux GG, mais plus tardive (Küpper *et al.*, 2006). L'internalisation des LPS et la déstructuration de la composante lipidique de la bicouche membranaire induisent une cascade d'oxydation d'acides gras saturés et insaturés, ainsi que la biosynthèse d'oxylipines (Goulitquer, 2008).

III.B.3 - Réponses de défense connues chez cette macroalgue

Les réponses de défense de *L. digitata* suite à une élicitation endogène ou exogène sont diverses, de durées variables et généralement séquentielles. La première réponse connue et immédiate est l'apparition d'un burst respiratoire et oxydant au niveau de l'apoplasme (espace extracytoplasmique). L'internalisation dans le cytosol du signal éliciteur active les phospholipases A_2 (Küpper *et al.*, 2001), avec l'accumulation d'acides gras saturés et insaturés par destruction de la bicouche lipidique membranaire. Les lipoxygénases (LOX) et cycloxygénases (COX) utilisent les acides gras libres comme substrat pour la synthèse d'oxypilines à haute activité antimicrobienne (Küpper *et al.*, 2006), tout comme chez les plantes supérieures (Chandra *et al.*, 1996). L'émission de composés organiques halogénés volatils et d'aldéhydes accompagne ces évènements par l'action d'espèces oxygénées réactives (ROS) dues au stress oxydant, sur divers substrats organiques. Il semblerait également que le mannitol, sucre-alcool

majoritaire produit par *L. digitata*, ait un rôle à jouer dans la défense (Cosse, résultats non publié).

III.B.3.1 - Le burst oxydant

Le burst oxydant est une réponse de défense précoce à la reconnaissance d'un signal moléculaire de l'agression (l'éliciteur), rencontrée chez les eucaryotes, allant des macrophages de mammifères aux diatomées (protistes unicellulaires), en passant par les végétaux (Baldridge & Gerard, 1932; Wojtaszek, 1997). Il a également été reconnu depuis peu comme étant un événement clef des réponses de défense chez les algues (Potin *et al.*, 2002; Dring & Callow, 2005). En effet, sur quarante cinq espèces d'algues brunes étudiées, appartenant à onze ordres différents, seuls quelques membres sont capables de reconnaître les oligoguluronates (blocs GG) comme signal de défense, et donc d'émettre du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Dès la mise en contact de sporophytes de *L. digitata* avec des fragments oligosaccharidiques d'alginate hydrolysé, l'algue émet un burst oxydant rapide, massif et transitoire (Küpper *et al.*, 2001). Ce burst est uniquement obtenu au contact de blocs GG, les blocs MM et mixtes ne produisant pas d'émission de H_2O_2 chez cette algue **(Figure 27)**.

La production de H_2O_2 est due à l'activation d'une flavo-enzyme oxydase, qui semblerait être une NADPH oxydase. En effet, lorsque des sporophytes sont dans l'incapacité d'émettre un burst oxydant par l'action d'un inhibiteur irréversible de la NADPH, le diphénylène iodonium (DPI), ceux-ci sont alors rapidement dégradés par leur épiflore bactérienne (Küpper *et al.*, 2002). La transduction du signal aboutissant à la mise en place du burst oxydant fait donc intervenir des phosphorylations, des phospholipases A_2, des influx calciques, ainsi que des efflux potassiques et anioniques (Küpper *et al.*, 2001). A court terme, le burst oxydant est important pour l'activation des réponses de défense. A long terme, il permet d'acquérir une résistance en agissant sur la régulation transcriptomique des gènes concernés par la production d'enzymes de biosynthèse de nouveaux métabolites bioactifs.

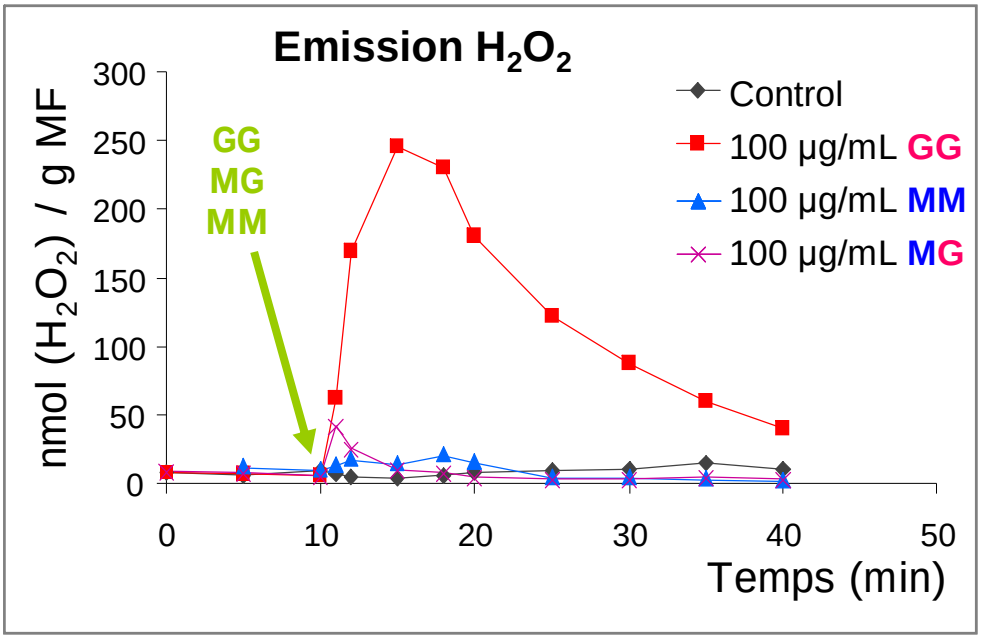


Figure 27 : Cinétique de l'émission de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en nanomoles par gramme de matière fraîche (MF) de frondes de *L. digitata. (D'après Küpper et al., 2001)*

Au bout de 10 min, des blocs GG (—■—), des blocs MM (—▲—) ou des blocs mixtes MG (—✕—) sont ajoutés, à une concentration de 50 µg.mL^{-1}, le control étant uniquement une incubation des sporophytes avec de l'eau de mer (—◆—). Seuls les blocs GG induisent immédiatement l'émission massive et transitoire de H_2O_2. Après 30 min d'incubation, cette émission retrouve approximativement son état d'origine.

Par conséquent, tout comme chez les plantes, le burst oxydant serait impliqué chez cette algue dans l'immunité naturelle, mais également, dans l'immunité induite. Ainsi, le burst joue un rôle crucial dans le contrôle de la croissance des épiphytes, comme des bactéries pathogènes, et pourrait augmenter la résistance de l'algue à son endophyte algal *Laminariocolax tomentosoides* (Küpper *et al.*, 2001; Küpper *et al.*, 2002), en produisant du H_2O_2 à des concentrations suffisantes pour réduire significativement la croissance bactérienne, et réduire également le nombre de microorganismes présents à la surface de l'algue.

III.B.3.2 - L'iode et les composés organiques halogénés volatils

Suite à la réponse immédiate du burst oxydant, une autre réponse rapide, constitutive à la défense chimique spécifique de *L. digitata* se produit : une augmentation de l'émission de composés organiques halogénés volatils (COHV) et de l'iode inorganique (I_2) (Potin *et al.*, 1999; Potin *et al.*, 2002; Abrahamsson *et al.*, 2003; Palmer *et al.*, 2005).

En effet, l'élément chimique iode a été découvert dans les cendres des laminaires au début du 19ème siècle (Courtois, 1813). Depuis, en raison notamment de l'importance de l'iode dans la santé humaine, la très grande majorité des études a ciblé le contenu en iode des algues commerciales (Teas *et al.*, 2004), et a montré que cet halogène est essentiellement présent sous la forme iodures (I^-) (Roche & Yagi, 1952; Shah *et al.*, 2005). Les travaux ont ensuite pris une nouvelle dimension après la découverte de la contribution importante de cet iode dans le cycle biogéochimique des halogènes. En effet, les COHV, et plus particulièrement l'iode, ont un impact significatif sur la destruction de l'ozone et la formation des nuages au-dessus des zones côtières (McFiggans *et al.*, 2004; O'Dowd *et al.*, 2005). De plus, il a été prouvé qu'à marée basse, l'augmentation de la production de COHV chez les macroalgues brunes est très généralement associée au stress oxydant généré par l'émersion des thalles (Carpenter *et al.*, 1999).

Comme d'autres Laminariaceae, *L. digitata* a la particularité de pouvoir concentrer l'iode dans ses tissus à des concentrations qui souvent excèdent les 50 mM, soit un facteur de 100 000 par rapport aux concentrations d'iode rencontrées dans les océans (Küpper *et al.*, 1998). Cela fait de ces laminaires les plus grands accumulateurs d'iode parmi les organismes vivants (pour comparaison, l'être humain concentre l'iode dans sa thyroïde à hauteur de 10 mg, concentration 10 000 fois supérieure à celle retrouvée dans le sang (Wolff, 2001)). Cependant, les concentrations d'iode de cette algue varient selon divers facteurs : l'âge du thalle, la partie du thalle (les tissus), la saison et le site (Ar Gall *et al.*, 2004). En effet, les premiers travaux sur la localisation de l'iode inorganique dans les tissus d'un thalle de *L. digitata* ont montré que les jeunes plantules sont plus riches en iode que les sporophytes âgés (Küpper *et al.*, 1998; Küpper *et al.*, 2008). L'iode concentré dans les thalles correspond à environ 5 % du poids sec chez les jeunes plantules contre 1 % chez les thalles adultes **(Figure 28)**. Ces mêmes travaux ont également montré qu'au sein d'un sporophyte adulte, la distribution de l'iode est hétérogène. Ainsi, la teneur en iode augmente nettement depuis la zone méristématique (tissus les plus jeunes) jusqu'aux parties distales de la lame et jusqu'au crampon **(Figure 28)** (Küpper *et al.*, 1998). De plus, les teneurs les plus faibles sont observées en été, quand les sporophytes sont les plus exposés aux stress abiotiques (luminosité, UV, température, dessication…). Ces derniers ont un impact direct sur l'augmentation des niveaux d'espèces activées de l'oxygène (EAO), et donc,

sur la production de COHV par l'algue, en particulier l'émission d'I_2, appelée la iodovolatilisation (Ar Gall *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2005).

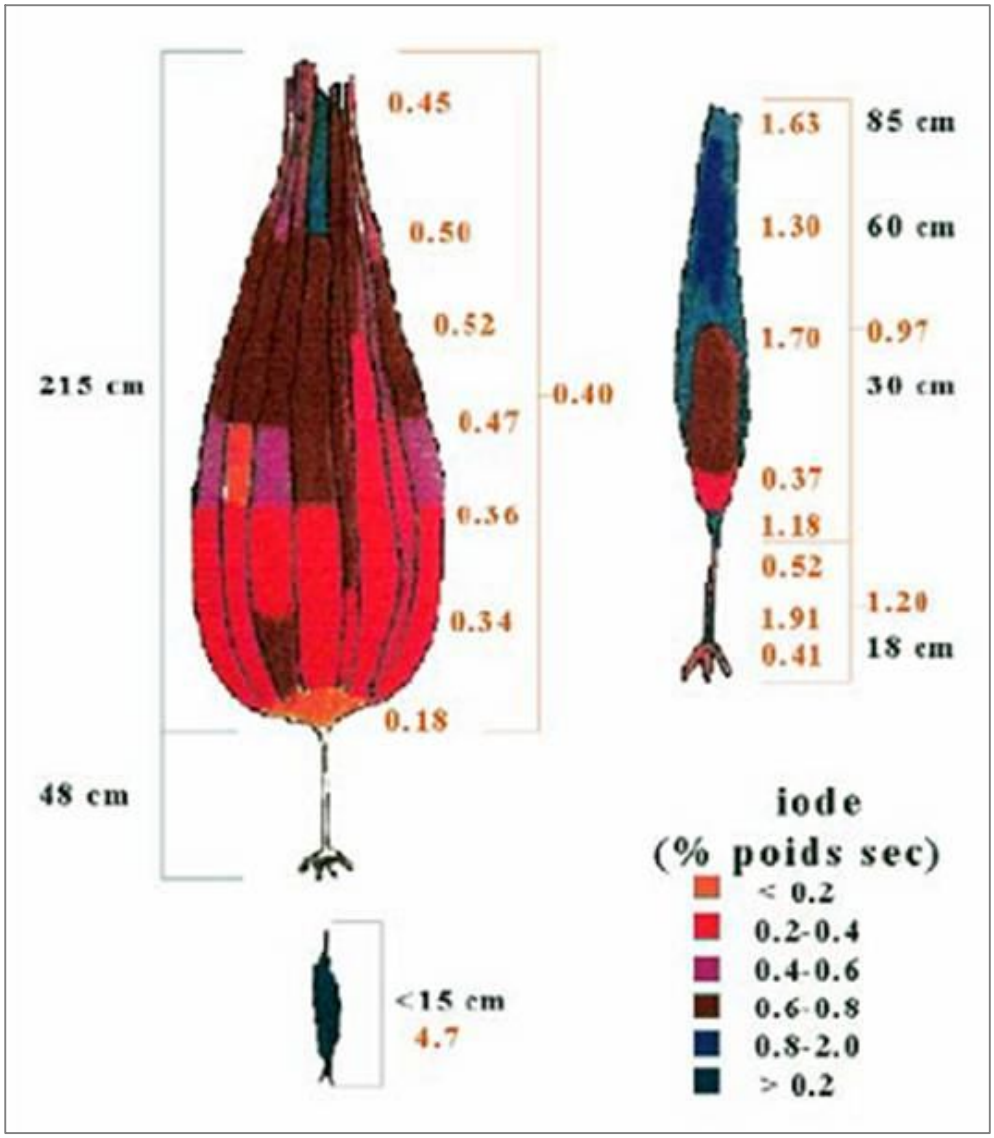


Figure 28 : Schéma d'interprétation de la localisation de l'accumulation d'iode inorganique dans les sporophytes de *L. digitata*. *(D'après Küpper* et al.*, 1998)*

Les jeunes plantules sont plus concentrées en iode, avec une concentration pouvant atteindre 4,7 % du poids sec. De même, chez les thalles adultes, plus les tissus sont jeunes (zone méristématique), moins ils contiennent d'iode.

Ces accumulateurs d'iode présentent également de fortes concentrations en brome (Saenko *et al.*, 1978). Très peu de données sont actuellement connues sur la localisation sub-cellulaire de ces composés chez les laminaires. L'hypothèse jusqu'alors émise portait sur un stockage de l'iode dans des vacuoles non spécialisées des cellules corticales de la lame ou dans le compartiment intra-cellulaire, probablement au sein de

physodes (vésicules riches en polyphénols) des cellules du stipe (Dangeard, 1957; Ar Gall *et al.*, 2004). Mais cette hypothèse a très récemment été remise en question. En effet, de la micro-imagerie chimique a révélé que ces deux halogènes, l'iode et le brome, sont essentiellement stockés sous la forme inorganique (Küpper *et al.*, 2008) dans la matrice extracellulaire des cellules de *L. digitata*, donc dans les tissus périphériques **(Figure 29)** (Verhaeghe *et al.*, 2008).

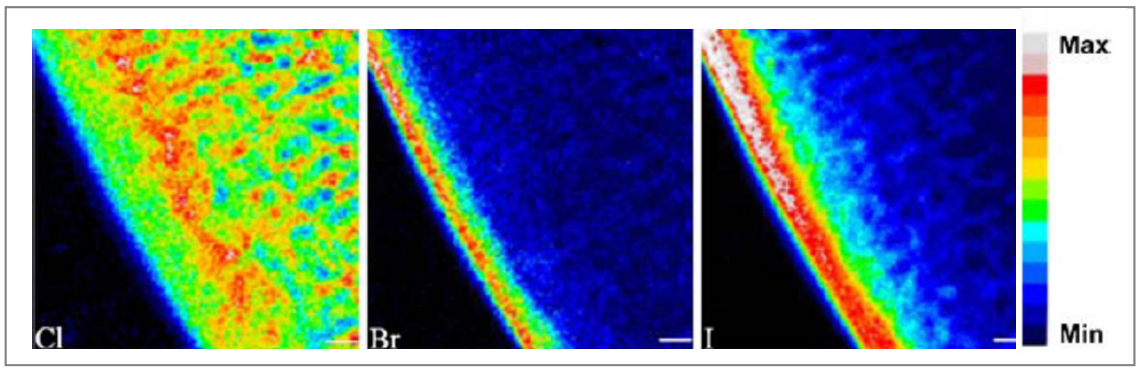


Figure 29 : Cartographies de trois composés halogénés (Chlore : Cl ; Brome : Br ; Iode : I) au niveau des tissus périphériques de coupes transversales de stipe de *L. digitata*. *(D'après Verhaeghe et al., 2008)*

Les images sont obtenues à partir de données brutes en spectrométrie de Rutherford Backscattering (RBS) et par émission de particules induites par rayons-X (PIXE) ; la barre d'échelle correspond à 25 µm ; l'échelle de couleur Min-Max est linéaire et arbitraire, donc propre à chaque élément.

L'iode aurait une distribution très hétérogène, avec un très fort gradient de répartition depuis le tissu périphérique jusqu'au cœur du stipe, appelé la medulla. A partir de ces résultats, il a été déduit que 80 % de l'iode contenu dans la section analysée est localisé dans le tissu périphérique, sur une zone qui ne représente que 20 % de la superficie totale de la section. De même, le brome, second halogène d'intérêt chez *L. digitata*, est aussi préférentiellement localisé au niveau du tissu périphérique, mais sa répartition est relativement homogène dans les parties plus centrales du stipe, c'est-à-dire le cortex et la medulla. A l'inverse, le chlore, un autre composé halogéné présent chez la laminaire, essentiellement sous forme NaCl et KCl, a ses valeurs les plus faibles au sein du tissu périphérique, alors que sa répartition est relativement homogène dans les tissus plus internes.

Malgré un nombre considérable de recherches effectuées sur l'iode présent chez les Laminaires, la fonction biologique de cet halogène stocké en grande quantité reste encore floue. Il semblerait toutefois que l'émission d'iode jouerait un rôle dans le

contrôle de l'épiphytisme bactérien. En effet, suite à un stress, il se produit une émission d'halocarbonés iodés (I), de plus haute toxicité microbienne que les composés chlorés (Cl) et bromés (Br), qui sont quant à eux émis constitutivement en condition de non-stress (Carpenter *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2005). Il s'ensuit également un fort efflux d'iode, accumulé sous forme réduite d'iodure et sous forme oxydée d'I_2 (Küpper *et al.*, 2008). Cette accumulation importante d'iode et de brome dans les tissus de *L. digitata*, suggère qu'un mécanisme commun d'absorption et de rétention serait impliqué, bien que celui-ci ne soit toujours pas clairement élucidé.

Les avancées actuelles proposent que les mécanismes d'absorption de l'iode chez cette algue soient effectués par diffusion, facilitée par l'intervention d'enzymes : les haloperoxydases dépendantes du vanadium (v-HPO) (Küpper *et al.*, 1998). Des expériences avec des thalles de *L. digitata* ont montré que son système de HPO, et notamment l'acide hypobromeux (HOBr) est capable de désactiver les molécules de communication de la bactérie marine *Chromobacterium violaceum* CV026 (les AHL du quorum sensing), illustrant ainsi le mécanisme naturel de défense de cette algue pour empêcher la formation de biofilm à sa surface (Borchardt *et al.*, 2001), à l'image des furanones halogénées de l'algue rouge australienne *Delisea pulchra* (Steinberg *et al.*, 1997). L'identification d'une iodoperoxydase (IPO) chez *L. digitata* a renforcé l'hypothèse du rôle de ces enzymes dans l'accumulation de l'iode et donc de son rôle dans le contrôle de l'épiphytisme bactérien (Colin *et al.*, 2005). Des études récentes ont montré que les v-HPO catalyseraient l'oxydation ou la réduction de cet iode inorganique et assureraient la synthèse des COHV en présence de H_2O_2 et de courtes chaînes carbonées (Leblanc *et al.*, 2006). De même, les enzymes v-IPO3 et v-BPO3 de cette algue représenteraient des formes de HPO exclusivement et spécifiquement induites au cours des réponses de défense suite à une élicitation par des oligoguluronates (Roeder *et al.*, 2005; Cosse *et al.*, 2009). Le temps nécessaire à la surexpression des gènes codant pour ces enzymes suggèrerait ainsi que le premier rôle physiologique lié à la régulation de ces enzymes pourrait être la production de COH, volatils ou non. Toutefois, comme l'iode semble être essentiellement présent sous forme inorganique dans les tissus périphériques de l'algue, et plus particulièrement dans les espaces intercellulaires, et qu'il se colocalise avec des sources carbonées, azotées et soufrées, ceci laisse envisager que des protéines et des polysaccharides pourraient être impliqués dans le piégeage de l'iode au niveau de l'apoplasme (Verhaeghe *et al.*, 2008).

Par conséquent, le burst oxydant, l'efflux d'iodure et les v-HPO pariétales pourraient prendre une part importante dans les réponses précoces de défense, en utilisant I_2 et des COHV comme composés de défense contre les pathogènes, les bio-salissures et/ou les herbivores, bien qu'encore aucune expérience n'en fasse la preuve. Les COHV émis par cette algue sont encore peu référencés, de par la difficulté d'étudier des composés volatils. Toutefois, il en existe quelques uns bien décrits dans la littérature.

Les premiers CHV identifiés ont été le iodométhane (CH_3I), le bromométhane (CH_3Br) et le chlorométhane (CH_3Cl) (Lovelock, 1975; Manley & Dastoor, 1987; Manley & Dastoor, 1988; Carpenter *et al.*, 2000). Ces halocarbonés ont principalement été identifiés de par leur présence dans l'air et les océans, et en particulier au dessus des champs de laminaires. Le CHV relargué par cette algue et le plus étudié, est le diiodométhane (CH_2I_2). Il a notamment été identifié grâce aux études effectuées dans la compréhension du cycle biogéochimique de l'iode dans l'atmosphère et dans les océans (Carpenter *et al.*, 1999; Carpenter *et al.*, 2000; McFiggans, 2005). Le CH_2I_2 est un précurseur important des radicaux d'iode oxydé dans l'atmosphère. Son flux dans les zones intertidales est dépendant des marées : l'émission de CH_2I_2 par les macroalgues brunes soumises aux stress oxydants lors des marées basses est alors augmenté (Carpenter *et al.*, 2001), prouvant son implication dans la réponse de défense de cette algue face aux stress abiotiques. Enfin, plusieurs autres CHV comme le iodoéthane (C_2H_5I), le chloroiodométhane (CH_2ICl), le bromoiodométhane (CH_2IBr), le iododibromométhane ($CHIBr_2$), le bromoforme ($CHBr_3$), le dibromométhane (CH_2Br_2), le dibromochlorométhane ($CHBr_2Cl$), et le bromoéthane (C_2H_5Br) ont été identifiés comme production naturelle d'halocarbonés par les macroalgues stimulées par un stress abiotique, mais sans réelle certitude chez notre modèle d'étude *L. digitata* (Carpenter *et al.*, 2000; Amsler *et al.*, 2005).

III.B.3.3 - Les composés phénoliques : implication des phlorotanins ?

Les phlorotannins sont des polyphénols, des molécules chimiquement réactives, fonctionnant à la fois comme métabolites primaires et secondaires chez les macroalgues (Arnold & Targett, 2003). Ils sont surtout reconnus depuis plusieurs années pour leurs actions antibiotiques, antivirales, et en particulier anti-oxydantes.

Ces composés phénoliques marins sont rencontrés essentiellement chez les algues brunes sous forme de polymères de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). La plus forte concentration de phlorotannins dans la cellule est trouvée dans les physodes, sous forme soluble, liés à la membrane des vésicules, et apparaissant comme des corps réfractant la lumière dans le cytoplasme (Ragan & Glombitza, 1986; Schoenwaelder, 2002). Ils peuvent représenter jusqu'à 10 % de la matière sèche de la plupart de ces algues, et jusqu'à 20 % pour certaines (Ragan & Glombitza, 1986). Ils sont plus amplement décrits dans le **paragraphe II.B.2.3 p.49**.

Chez *L. digitata*, suite à l'élicitation par des blocs GG, les thalles produisent des composés phénoliques qui seraient directement liée au burst oxydant (Küpper *et al.*, 2002). Par exemple, lorsque des plantules de *L. digitata* sont infectées par l'endophyte *L. tomentosoides*, ces dernières synthétisent des composés qui, sous UV, auto-fluorescent en bleu dans l'environnement cortical situé au contact des filaments de cet endophyte **(Figure 30)**. En revanche, quand les plantules sont préalablement incubées avec des GG, celles-ci semblent devenir plus résistantes à l'infection causée par l'inoculation de l'endophyte. Les composés auto-fluorescents bleus ont alors une distribution générale dans le cortex, tout en étant moins denses. Ces composés pourraient donc être des métabolites secondaires aromatiques tels que les phlorotannins, mais il n'est pas exclu qu'ils soient également composés de bromophénols et iodobromophénols tels que ceux décrits récemment comme étant secrétés dans l'eau de mer par les algues brunes *Ecklonia kurome* et *Eseinia bicyclis* (Shibata *et al.*, 2006).

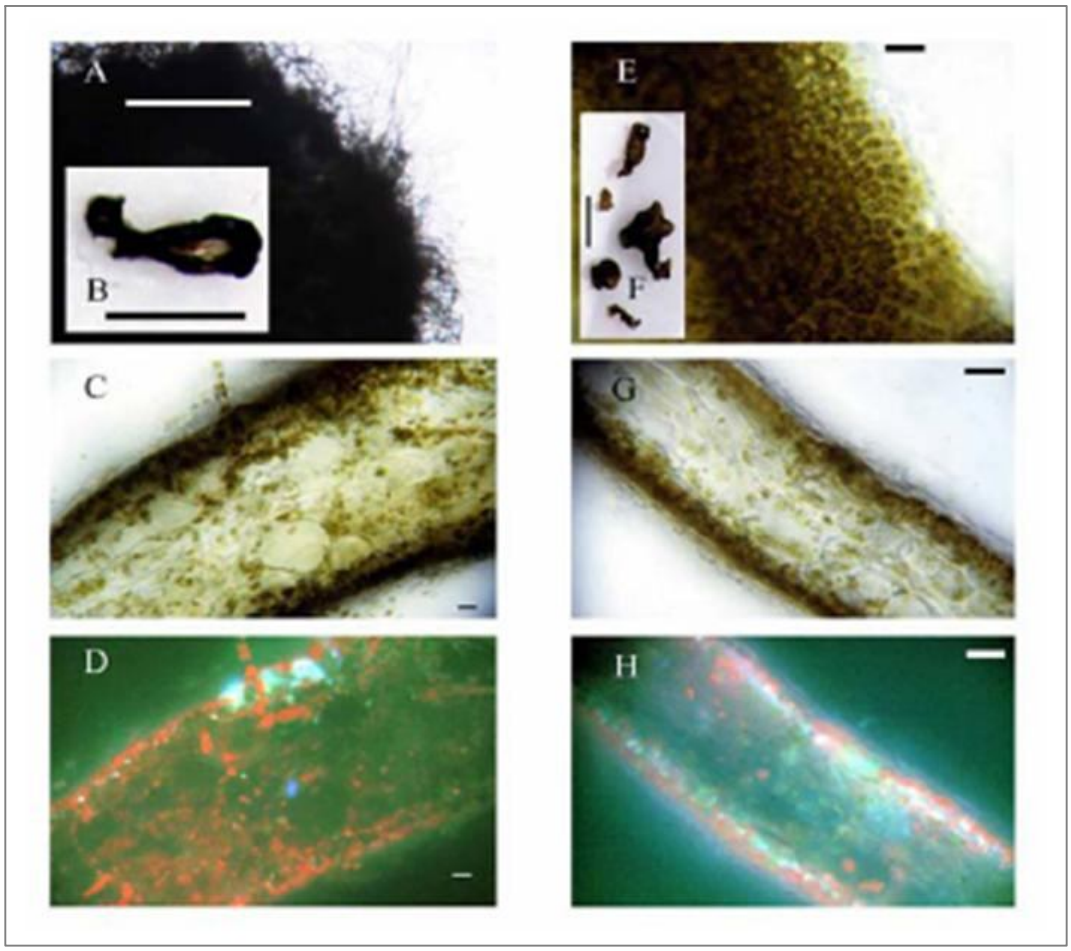


Figure 30 : Sections de thalles de *L. digitata,* prétraités ou non par des oligoguluronates, prises 34 jours après l'inoculation avec le pathogène *L. tomentosoides*. *(D'après Küpper* et al., *2002)*

(A) à (D) : thalle de *L. digitata* témoin, complètement recouvert par les filaments de *L. tomentosoides* (B), qui pénètrent également dans le thalle (C), et qui sont souvent entourés par des composés émettant une auto-fluorescence rouge visible sous excitation aux UV (D). Une auto-fluorescence bleue est également observée aux abords des sites de pénétration des filaments.
(E) à (H) : thalle de *L. digitata* élicité avec 150 µg.mL^{-1} de GG pendant 2h, et cultivé durant 9 jours dans un milieu de culture Provasoli ES, puis inoculé avec *L. tomentosoides*. Les filaments épi- (E) et endophytiques (G) de *L. tomentosoides* sont difficilement visibles, même sous UV (H). Le cortex des thalles traités aux GG montre alors souvent une accumulation de composés auto-fluorescents bleus moins intenses et plus dispersés et diffus que les thalles non traités (H).
Le prétraitement des thalles par les GG est donc accompagné par l'accumulation abondante et générale de composés auto-fluorescents bleus, leur permettant ainsi une protection accrue contre le pathogène.
Barres d'échelle : A, 1 mm ; B, F : 1 cm ; C, D, E, G, H: 10 µm.

III.B.3.4 - Les oxylipines

Les oxylipines sont des dérivés d'acides gras polyinsaturés contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène qui peuvent agir en tant que signaux dans la régulation de l'expression de gènes liés à la défense. Elles peuvent également agir en tant que

composés antimicrobiens, antiherbivores, ou potentiellement, en tant que composés toxiques pour les cellules végétales.

Les oxylipines sont donc synthétisées en réponse à des stress biotiques et/ou abiotiques, par l'action coordonnée de lipases, de lipoxygénases, de cyclooxygénases et de certaines enzymes à cytochrome P450, selon les oxylipines et les êtres vivants concernés. Chez *L. digitata*, l'application de LPS d'origine bactérienne induit un burst oxydant plus tardif qu'avec une élicitation par des GG, mais d'une amplitude similaire. A la différence des réponses induites par les GG, il s'ensuit une libération d'acides gras libres, ainsi qu'une accumulation de dérivés oxydés de l'acide linoléique et de l'acide eicosapentaenoïque (Küpper *et al.*, 2006). Les produits majeurs détectés après une heure de traitement avec les LPS bactériens sont alors l'acide-13-hydroxyoctadecatrienoïque (13-HOTrE) et l'acide hydroxyeicosapentaenoïque (15-HEPE). Cette différence de réponse entre les deux éliciteurs, l'un endogène (GG), l'autre exogène (LPS de bactéries non pathogènes pour la laminaire), montre que l'augmentation de ces deux dérivés oxydés, suite uniquement à l'application des LPS, semble être indépendante du burst oxydant observé, et implique donc l'activation de voies de signalisation et de réponses de défense différentes. Leur voie de synthèse reste encore non élucidée à ce jour. Toutefois, ils ont déjà été décrits chez les Laminaires comme des dérivés d'acides gras hydroxylés dérivant du métabolisme putatif d'une lipoxygénase (Gerwick *et al.*, 1993). Une autre étude portant sur les acides gras libres a montré que l'application exogène de jasmonate de méthyle (MeJA), d'acide arachidonique (C20:4) et d'acide linoléique (C18:3) déclenche un burst oxydant sensible au DPI chez *L. digitata* (Küpper *et al.*, 2001; Küpper *et al.*, 2009). Le traitement avec l'acide arachidonique permet également l'accumulation d'acides gras libres et de dérivés hydroxylés. De plus, l'application de C20:4 ou de MeJA confère à *L. digitata* un résistance accrue à l'endophyte *L. tomentosoides*, tout comme un traitement avec des GG (Küpper *et al.*, 2009).

Chez une autre algue brune, *Fucus vesiculosus*, l'application de MeJA entraîne également l'accumulation de phlorotanins à marée basse (Arnold *et al.*, 2001). La cinétique et l'amplitude de cette accumulation sont comparables à celles observées en réponse à des agressions herbivores chez d'autres algues brunes. Le MeJA est désormais bien connu pour être un messager volatil chez les plantes terrestres (Mur *et al.*, 1997), mais il n'a jamais été reporté chez les algues brunes. Toutefois, le rôle d'un

analogue du MeJA en tant que molécule signal chez *L. digitata* est soutenu par les données transcriptomiques de l'algue rouge *Chondrus crispus*, suggérant que le MeJA est un régulateur de la défense régulée par les gènes, incluant la NADPH oxydase (Collén *et al.*, 2006), et qu'il déclenche une cascade d'oxydation des acides gras polyinsaturés menant à la biosynthèse de prostaglandines et d'autres oxylipines (Gaquerel *et al.*, 2007). Une étude récente est venue compléter ces recherches, en montrant que le stress cuivré peut aussi induire la production d'oxylipines chez *L. digitata*, notamment des cyclopenténones d'acides gras C18 et C20, tels que l'acide 12-oxo-phytodiénoïque, ainsi que des prostaglandines détectées pour la première fois chez les algues brunes et des composés uniques comme l'acide 18-hydroxy-17-oxo-eicosatetraénoïque (Ritter *et al.*, 2008)

Par conséquent, l'activation de la voie de synthèse des oxylipines joue un rôle clef dans l'induction de la défense chez les algues brunes, et en particulier chez *L. digitata*.

III.B.3.5 - Les aldéhydes polyinsaturés volatils

Les aldéhydes, et en particulier les composés volatils C6 et C9, jouent un rôle important dans la cicatrisation et la résistance aux parasites, et sont souvent caractéristiques des fraîches odeurs vertes dégagées par les végétaux supérieurs (Matsui *et al.*, 2006). La présence d'aldéhydes polyinsaturés volatils a également été mis en évidence chez plusieurs diatomées marines (d'Ippolito *et al.*, 2002; Wichard *et al.*, 2005) et autres algues planctoniques (Pohnert, 2000; Wichard *et al.*, 2005), qui semblent utilisés les aldéhydes polyinsaturés volatils tels que le (2*E*,4*E*)-octa-2,4,7-triénal et le (2*E*,4*E*,7*Z*)-deca-2,4,7-trienal comme molécules signal liées aux mécanismes de défense (Ianora *et al.*, 2004) et comme système d'alarme de stress (Vardi *et al.*, 2006). De plus, des études ont montré la présence de ces aldéhydes polyinsaturés volatils chez des macroalgues vertes comme *Ulva conglobata* produisant du 2,4-decadiénal (Akakabe *et al.*, 2003), et brunes comme *Laminaria angustata* capable de produire enzymatiquement de courtes et longues chaînes d'aldéhydes (Boonprab *et al.*, 2003; Boonprab *et al.*, 2006). Une étude très récente a également mis en évidence la production d'aldéhydes, dans un contexte physiologique, chez notre modèle d'étude *L. digitata* (Goulitquer *et al.*, 2009).

En effet, ces travaux ont montré une libération d'aldéhydes dans l'eau de mer et l'air environnants de sporophytes de *L. digitata* soumis à différents stress biotiques (traitement aux GG) et abiotiques (exposition à un excès de cuivre ; augmentation de l'exposition aux UV, de la salinité et de la température) par rapport à des sporophytes témoins, non stressés. Ainsi, après une élicitation avec des GG, plus de onze composés ont pu être identifiés, allant de l'hexanal au 4-hydroxydodeca-2,6-diénal (4-HDDE) **(Figure 31A)**. L'augmentation de l'émission par les sporophytes élicités du (*E*)-4-hydroxyhex-2-enal (4-HHE) est particulièrement importante dans l'eau de mer (24 fois plus élevée que dans l'eau de mer des sporophytes témoins). A l'inverse, le (*E*)-4-hydroxynon-2-enal (4-HNE) et le 4-HDDE sont quant à eux plus abondants dans l'espace de tête. Par conséquent, l'élicitation aux GG induit une régulation rapide de la synthèse des aldéhydes, formés par des mécanismes chimiques mais également enzymatiques.

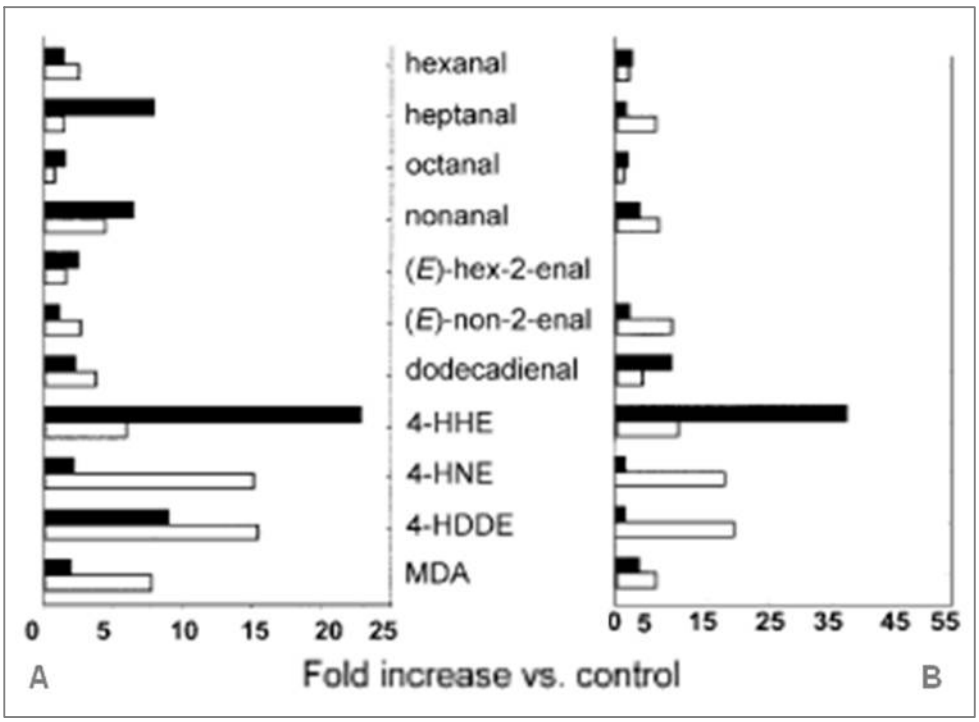


Figure 31 : Comparaison de la production d'aldéhydes dans l'eau de mer et l'espace de tête environnants des sporophytes de *L. digitata* après différents traitements. *(D'après Goulitquer et al., 2009)*

(A) Elicitation aux GG (150 µg.mL^{-1})
(B) Application d'un stress au cuivre (100 µg.mL^{-1})
Les niveaux d'aldéhydes dans l'eau de mer (▬) et l'air (▭) sont déterminés après 1 h d'incubation. Les résultats sont exprimés après soustraction des valeurs obtenues avec les échantillons témoins.

Le stress causé par un excès de cuivre (100 µg.mL^{-1}) induit une émission tardive d'un bouquet de plus de seize composés, incluant l'hexanal, le (*E*)-non-2-enal et le 4-hydroxyalkenals tels que le 4-HHE et le 4-HNE, alors que ces métabolites ne sont retrouvés qu'en toute petite quantité chez les sporophytes témoins **(Figure 31B)**. Après un traitement d'une heure avec un excès de cuivre, les concentrations du 4-HHE et du dodecadiénal dans la phase aqueuse sont respectivement 37 et 10 fois plus élevées que chez les témoins. De même, dans la phase air, les concentrations en (*E*)-non-2-enal, malonaldéhyde (MDA) et hexanal produits par les sporophytes de *L. digitata* stressés au cuivre sont respectivement 10, 4 et 3 fois plus élevées que chez les témoins. En revanche, contrairement à une élicitation aux GG, aucun (*E*)-hex-2-enal n'a pu être identifié après un stress au cuivre, ni dans l'espace de tête, ni dans l'eau de mer environnant.

Une étude sur l'émission d'aldéhydes volatils par *L. digitata* en environnement naturel a également été effectuée dans des mares d'eau de mer situées dans les rochers de la zone intertidale aux alentours de Roscoff, et contenant des sporophytes sujets à différents stress environnementaux (dessiccation, UV, ozone, variations rapides de la salinité et de la température) (Goulitquer *et al.*, 2009). Ces derniers induisent la peroxydation des lipides avec un stress oxydant, aboutissant à la libération d'aldéhydes mesurés après deux heures et trente minutes d'expérimentation. Ainsi, les concentrations d'aldéhydes C6, et particulièrement le (*E*)-hex-2-enal, C9 tels que le (*E*)-non-2-enal et le (*E*,*E*)-nona-2,4-dienal, mais également le (*E*)-4-hydroxyalk-2-enals et le MDA, augmentent significativement une heure après la basse mer. De plus, les concentrations de ces aldéhydes diminuent fortement à la marée montante, ce qui peut être dû à un effet de dilution quand la mer vient recouvrir les mares d'expérimentation.
Très peu d'études ont été effectuées sur le rôle potentiels des aldéhydes chez les macroalgues, contrairement aux mammifères (O'Brien *et al.*, 2005), aux plantes terrestres (Matsui *et al.*, 2006) et aux diatomées (Pohnert, 2005). Cependant, l'addition d'aldéhydes dans l'eau de mer environnant de thalles de *L. digitata* a montré que seuls un des aldéhydes testés (le 4-HHE) peut induire la synthèse d'oxylipines, agissant ainsi comme un inducteur de réponses métaboliques (Goulitquer *et al.*, 2009). L'émission d'aldéhyde chez cette algue pourrait donc jouer le rôle de signal d'alarme externe (au niveau de la population) et/ou interne (au niveau systémique) lorsque l'algue est

confrontée à des modifications physiques de son environnement et/ou est exposée à des polluants.

III.B.3.6 - Le mannitol : rôle dans la défense ?

Contrairement au métabolisme du mannitol chez les bactéries, les champignons, et les plantes terrestres, celui des organismes photosynthétiques marins tels que les algues brunes reste encore peu connu (Iwamoto & Shiraiwa, 2005). Chez les algues brunes, et notamment chez *L. digitata*, le mannitol est le principal produit de la photosynthèse (Craigie *et al.*, 1966; Yamaguchi *et al.*, 1966), représentant ainsi la principale source de carbone de ces algues. Ce diol libre peut représenter jusqu'à 30 % du poids sec de l'algue, avec un taux variable selon les espèces (Reed & Stewart, 1985). Ce métabolite, comme de nombreux diols, possède un fort potentiel antioxydant. Par conséquent, de par son abondance chez *L. digitata*, il pourrait jouer un rôle important dans les processus de détoxication des EAO (Shen *et al.*, 1997a; Shen *et al.*, 1997b), originale et propre aux algues brunes.

En effet, une étude portant sur les gènes impliqués dans les réponses de stress a montré que le gène codant la mannitol-1-phosphate déshydrogénase (M1PDH) est l'un des gènes dont l'induction est la plus forte suite à une élicitation avec des GG (Cosse, résultats non publiés). Cette étude a également montré qu'en diminuant le pool de mannitol par activation de la M1PDH, la cellule diminuerait sa capacité à détoxifier les EAO et permettrait ainsi au H_2O_2 de jouer son rôle de messager, conduisant entre autres à l'activation des gènes de défense. Cependant, le rôle anti-oxydant du mannitol reste à démontrer compte tenu des fortes variations saisonnières de sa concentration chez notre modèle d'étude (Haug & Jensen, 1954). De plus, l'activité de la M1PDH conduit directement à la production de fructose-6-phosphate, qui est le précurseur de la voie de biosynthèse de l'acide alginique, lui-même principal constituant de la paroi de l'algue. Par conséquent, l'induction du gène codant la M1PDH pourrait être également liée à la nécessité de restaurer la paroi dégradée au cours de l'agression par un pathogène. Dans ce cas, l'activation de la transcription de la M1PDH pourrait jouer un rôle clef en permettant la dégradation du mannitol, fournissant donc le potentiel carboné et énergétique nécessaire à la synthèse de composés de défense et au maintien de la paroi.

En conclusion, compte-tenu des hypothèses soulevées suite à la caractérisation de la M1PDH comme protéine liée à la pathogénie chez les plantes supérieures (Williamson *et al.*, 1995), du pouvoir oxydant du mannitol (Shen *et al.*, 1997a; Shen *et al.*, 1997b) et de sa forte concentration chez les algues brunes (Reed & Stewart, 1985), il semblerait donc que la M1PDH soit un gène de défense particulièrement intéressant et représentant une originalité certaine chez cette algue modèle (Cosse, résultats non publiés).

Objectifs de l'étude

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Toute surface inerte ou vivante immergée en eau de mer est rapidement colonisée par des bactéries, formant, par une suite de mécanismes initialement physico-chimiques, une communauté complexe appelée biofilm. Les populations sauvages d'algues marines fournissent de larges surfaces à coloniser. Diverses stratégies leur permettent de combattre l'attaque par les bactéries, et même d'en prévenir la prolifération, ou au contraire, de les attirer de manière plus ou moins sélective, comme démontré chez plusieurs algues rouges et vertes. *Laminaria digitata* (Phéophycée) a été choisie comme modèle d'algue brune pour l'étude des peuplements bactériens épiphytes avec pour objectif d'étudier les réponses métaboliques de l'algue permettant ou décourageant l'adhésion bactérienne ou la formation du biofilm sur sa surface. En effet, cette algue d'intérêt commercial et écologique reconnus, abondante sur les côtes bretonnes et accessible aux basses mers de vives eaux, possède un métabolisme halogéné très particulier et étudié depuis plusieurs années à la Station Biologique de Roscoff.

Ces travaux de thèse sur l'épiphytisme bactérien de *Laminaria digitata* s'articulent autour de deux axes portant (i) sur le développement d'outils pour étudier la microflore bactérienne associée à *L. digitata* et (ii) sur la compréhension des interactions pouvant exister entre l'algue et les bactéries marines à sa surface.

Le premier axe de travail a été de mettre au point des outils pour étudier la microflore associée à l'algue. Cette étude est passée par les étapes indispensables d'isolement et de culture des souches bactériennes tolérantes aux milieux classiques, et à l'identification taxinomique de quelques-unes de ces souches bactériennes associées. Puis, deux techniques spectroscopiques ont été utilisées sur des cellules bactériennes entières et vivantes, isolées ou non de cette algue : (i) la RMN HR-MAS (Résonance Magnétique Nucléaire de haute résolution) et (ii) la spectrométrie de masse MALDI-ToF, dans le but de mettre au point des techniques rapides d'études bactériennes taxinomique et physiologique. D'autre part, une première approche de la diversité microbienne totale a été effectuée pour développer de nouveaux outils d'extraction

d'ADN environnemental dans l'étude des interactions de cette algue brune avec les bactéries cultivables ou non.

Le deuxième axe de travail s'est articulé sur deux études, (i) l'une portant sur l'adhésion et (ii) l'autre sur la formation de biofilm de quelques souches bactériennes marines isolées de l'algue, et exogènes à l'algue (souches de référence). La compréhension des interactions biochimiques pouvant exister entre les bactéries marines et l'algue à sa surface, a été basée sur l'application de mélanges de métabolites extraits de *L. digitata*, d'exsudats d'algues en condition ou non de stress, et enfin, de métabolites purs, dans le but d'observer l'influence de ces différents composés émis par notre modèle d'étude sur l'adhésion et la formation de souches bactériennes marines.

Matériels et Méthodes

Chapitre II Matériels et méthodes

I - MATERIEL VEGETAL

I.A - Echantillonnage et conditionnement

Les sporophytes sauvages de *Laminaria digitata* (Linneus) Lamouroux 1813 ont été récoltés à marée basse, les jours de grand coefficient de marée (≥ 95), à Sainte-Barbe (+48°43'3564 et -3°58'697, commune de Roscoff) **(Figure 32)**.

Figure 32 : Site d'échantillonnage des sporophytes de *Laminaria digitata*.

Les sporophytes de *L. digitata* ont été récoltés au niveau des champs de laminaire de Ste-Barbe, à Roscoff, en Bretagne.

Plusieurs tailles ont été récoltées selon les expériences à réaliser : des jeunes plantules de 2 cm à une dizaine de cm pour les expériences d'adhésion bactérienne et de formation de biofilm, et des thalles plus âgés de plusieurs dizaines de cm pour l'isolement des bactéries associées et cultivables, ainsi que pour des extractions de métabolites secondaires potentiellement bactériostatiques ou bactéricides.

Une fois les plantules récoltées sur le site d'échantillonnage, elles sont ensuite transportées sur glace dans un sac de transport fermé hermétiquement et contenant de l'eau de mer (EM) environnante. Au laboratoire, elles sont stockées au maximum deux semaines dans un aquarium de 10 L contenant environ 7 L d'eau de mer stérilisée et

filtrée (EMSF), brassée et oxygénée par un système de bullage. La photopériode est programmée à 12 heures d'éclairage néon lumière du jour (Mazdafluor F36W Jour) et 12 heures d'obscurité, à une intensité lumineuse de 50-60 µmoles de photons.$m^2.s^{-1}$. Pour les expériences d'adhésion, les plantules sont gardées à une température de 14°C (± 1°C), température de la chambre de culture à la Station Biologique de Roscoff (SBR), tandis que la température de stockage des plantules pour les expériences de formation de biofilm est d'environ 18°C, ces expériences étant réalisées au Laboratoire de Biotechnologie et de Chimie Marines (LBCM) à Lorient, qui n'est pas équipé pour accueillir ce type de culture.

Les thalles adultes sont quant à eux prélevés sur le site à l'aide de gants de laboratoire, afin de ne pas contaminer la flore bactérienne épiphyte existante sur la surface des thalles. Ils sont aussitôt placés individuellement dans des sacs hermétiquement fermés et stériles, contenant un fond d'EM environnante. Ils sont également transportés sur glace et utilisés immédiatement au laboratoire pour diverses expériences.

I.B - Observation des sporophytes au MEB

Toutes les observations de *L. digitata* ont été effectuées par Gaël Le Pennec au LBCM. Le but étant d'observer la présence ou non de bactéries à la surface et à l'intérieur des tissus de cette algue. Le protocole utilisé est décrit ci-après.

Les algues (jeunes plantules ou morceaux de thalles adultes des différentes parties de l'algue) sont fixées au glutaraldéhyde à 2,5 % 1 h à 4°C dans un tampon de cacodylate de sodium à 0,1 M, pH 7,3 et à une osmolarité à 1100 mOsm. Les échantillons sont ensuite lavés dans du tampon de cacodylate de sodium par 2 bains successifs et peuvent être stockés dans de l'éthanol à 70°. Les échantillons sont déshydratés par trois bains successifs de 5 min d'éthanol à 70°, puis par trois autres bains successifs de 10 min d'éthanol à 95°, et enfin, trois derniers bains successifs de 15 min d'éthanol absolu. Les échantillons sont ensuite séchés au CO_2 dans un point critique CPD030 (Bal-Tec, France), puis enrobés d'un mélange d'or/palladium pendant 120 s à 20 mA, à l'aide du 501 sputter coater (Edwards Pirani, UK). Les échantillons peuvent alors être observés au microscope à balayage électronique (JEOL 6460LV, JEOL Ltd, Tokyo, Japon).

I.C - Elicitation des plantules par les oligoguluronates

I.C.1 - Préparation des oligoguluronates (GG)

Les oligoguluronates sont obtenus par hydrolyse acide douce d'alginate de sodium de stipes de *Laminaria hyperborea* (DANISCO, lot 602704). Une solution à 0,5 % d'alginate est hydrolysée à chaud (100 °C) pendant 4 à 5 heures par 0,3 M d'acide chlorhydrique. Trois séquences d'oligosaccharides sont alors produites : des oligoguluronates (GG), des oligomannuronates (MM) et des oligosaccharides hybrides (MG). Comme seuls les GG sont connus pour éliciter les sporophytes de *L. digitata*, ces séquences d'oligosaccharides sont séparées par des étapes de centrifugation et de précipitation sélective. La fraction correspondant aux GG est alors dialysée, lyophilisée, puis analysée en RMN afin de vérifier sa pureté.

I.C.2 - Elicitation des plantules

Selon les expériences (adhésion ou formation de biofilm), la quantité d'algues élicitées est différente **(cf paragraphes V.A.3.3 p.111 et V.B.2.2 p.117)**, mais le mode opératoire reste le même.

Les plantules sont placées sous agitation à 250 rpm dans de l'eau de mer filtrée stérile (EMSF) pendant 15 min, à 14°C (± 1°C) pour les expériences d'adhésion et à 21°C (± 1°C) pour les expériences de formation de biofilm. Cette étape permet aux algues de s'adapter à leur nouvel environnement, et de diminuer le risque de stress causé par la manipulation des algues. Ensuite, les plantules de *L. digitata* sont élicitées par les oligoguluronates (GG) à raison de 150 $\mu g.mL^{-1}$, qui correspond à la concentration optimale déterminée par Küpper *et al*. (2001). L'ajout de GG provoque l'émission de peroxyde d'hydrogène dans le milieu d'incubation, correspondant à la mise en place d'un *burst* oxydant, qui peut être mesurée par chimioluminescence. Un contrôle est effectué en parallèle par ajout d'eau milliQ stérile (H_20 mQS) à la place de la solution de GG, afin d'effectuer les mêmes manipulations sur les deux lots (élicités ou non). Les plantules sont ensuite remises sous agitation à 250 rpm 15 min après élicitation, les algues sont rincées par trois bains successifs d'EMSF, puis placées dans

un nouveau volume d'EMSF. Cette étape permet d'éliminer les GG contenus dans l'EM environnante, qui seraient susceptibles d'agir sur l'adhésion ou la formation de biofilm bactérien. Les plantules sont alors remises sous agitation à 250 rpm, pendant 90 min. Pour ces deux traitements, les plantules sont ensuite retirées et leur milieu environnant est filtré stérilement à 0,22 µm (nitrate de cellulose, Durapore type GVWP) et stocké à température ambiante pour une utilisation quasi immédiate, sous la désignation suivante : EM+Alg pour EM filtrée du lot d'algues non élicitées, et EM+Alg+GG pour EM filtrée du lot d'algues élicitées par les GG.

I.D - Extraction de métabolites

Les métabolites ont été extraits à partir de trois parties de thalles de *L. digitata* : le stipe, le crampon et la lame **(Figure 22 p.62)**.

Pour cela, 5 g de matière fraîche (MF) de chacune de ces parties ont été congelées à l'azote liquide. Une première extraction a été effectuée à trois reprises avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Les trois fractions ont ensuite été combinées, puis évaporées au rotovapor (Büchi Rotavapor R-200-205, Flawil, Suisse) afin d'obtenir un extrait sec. Cette extraction permet d'avoir des métabolites de polarité moyenne, tels que les polyphénols, les acides gras oxydés, les aldéhydes et les aromatiques éventuels, susceptibles de se trouver à la surface de l'algue. Une deuxième extraction a été effectuée à trois reprises sur le marc restant avec 50 mL de méthanol (MeOH). Les fractions ont également été combinées et évaporées au rotovapor pour en obtenir un extrait sec. Cette extraction comprend la petite fraction d'eau résiduelle de l'algue, et permet d'avoir un éventail des substances polaires qui sont théoriquement susceptibles d'être libérées dans l'environnement, sans prédominance de mannitol qui aurait gêné les tests si l'extraction avait été réalisée uniquement avec de l'eau milliQ.

Les extraits secs n'étant pas tous solubles dans l'EMSF, ils ont donc été repris à une concentration mère de 10 $mg.mL^{-1}$ dans du DMSO à 5 % v/v final en EMSF, en homogénéisant les solutions au vortex et par sonication durant 5 min. Les extraits sont ensuite filtrés sous hotte chimique avec un filtre stérile de 0,20 µm (Whatman® HPLC 4 mm syringe filter tips), excepté l'extrait à l'acétate d'éthyle de la lame qui ne s'est pas resolubilisé. Ils sont finalement stockés pour être utilisés lors des expériences d'adhésion des souches bactériennes marines en microplaques 96 puits.

II - MATERIEL BACTERIEN

II.A - Isolement des bactéries cultivables associées à *L. digitata*

Les thalles adultes de la macroalgue brune *Laminaria digitata* ont été collectés à quatre reprises durant l'année 2006 (janvier, mars, mai et octobre) lors de forts coefficients de marée basse à Sainte-Barbe **(cf paragraphe I.A p.87)**. Cet échantillonnage a permis d'effectuer un suivi saisonnier des populations bactériennes cultivables et l'observation d'une éventuelle variation de diversité de celles-ci. Les thalles récoltés ont été placés dans des sacs hermétiques contenant un peu d'eau de mer environnante et transportés sur glace jusqu'au laboratoire. Deux techniques d'isolement ont été utilisées au niveau des quatre parties du thalle : le crampon, le stipe, le méristème et la lame âgée (fronde), afin de récupérer le maximum de la biodiversité bactérienne cultivable.

La première méthode a consisté à découper des morceaux d'environ 1 cm^2 sur la surface du thalle et à les déposer directement sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture ZoBell enrichi en agar. La deuxième méthode utilisée est plus complexe. Des morceaux de 2 - 3 cm^2 ont été découpés, toujours au niveau des quatre parties du thalle, puis ont été placés dans des tubes Falcon de 50 mL contenant de l'EMSF. Ils ont ensuite été soumis à un bain à ultra-sons durant 3 min, afin de décrocher les bactéries adhérées à leur surface. Enfin, deux filtrations successives sous vide de l'EMSF contenue dans les tubes ont été effectuées à l'aide de tamis en nylon stérilisés (60 µm), puis de filtres en polycarbonate (8 µm, Millipore, France). Une partie des filtrats recueillis a ensuite été ensemencée sur des boîtes de Pétri contenant comme précédemment, du milieu de culture ZoBell-agar.

Après quelques jours de développement à température ambiante, les premières unités formant colonie (UFC) sont discriminées et sélectionnées à partir de leur morphologie, puis ensemencées individuellement sur des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture ZoBell-agar, afin d'obtenir des cultures bactériennes monospécifiques.

II.B - Souches bactériennes marines de référence

Pour compléter les études effectuées sur les bactéries cultivables isolées à partir de *L. digitata*, douze souches provenant d'isolats marins de surfaces inertes ou

biologiques ont été récupérées de diverses sources. Elles seront par la suite appelées « souches bactériennes marines de référence », en vue des quelques études existant déjà sur ces souches, en plus de leur caractérisation phylogénétique.

II.B.1 - Souches bactériennes provenant de l'Ifremer

Parmi les souches bactériennes marines de référence récupérées pour ce travail de thèse, deux ont été isolées à l'Ifremer du Centre de Brest : la souche D01 et la souche D41 (Rubio, 2002; Pradier *et al.*, 2005). Toutes deux ont été isolées à partir de biofilms marins naturels adhérés sur des coupons immergés dans des bains d'eau de mer à Sainte-Anne du Porzic (Brest) en novembre 1998.

La souche marine D01 a été isolée à partir d'un biofilm marin naturel formé sur lame de verre immergée pendant 6 heures. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, et a été provisoirement attribuée à l'espèce *Vibrio lentus* (98 %) par séquençage de l'ARN 16S.

La bactérie modèle *Pseudoalteromonas* sp. D41^{T} provient d'un biofilm marin naturel formé sur lame de Téflon immergée en eau de mer durant 24 heures. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, qui a été attribuée au genre *Pseudoalteromonas* par séquençage de l'ARN 16S. La séquence a été déposée sur la banque de données EMBL et est accessible sous le numéro d'accès AJ555627.

II.B.2 - Souches bactériennes provenant du LBCM

Six souches bactériennes marines de référence ont été obtenues grâce au LBCM, UBS - Université de Bretagne Sud à Lorient. Ces souches ont été isolées à partir de lames de verre stériles immergées en eau de mer à une profondeur de 1m, durant t = 3 h d'immersion pour la souche 3J3, et t = 6 h d'immersion pour les souches 1M6, 4M6, 3J6 et 4J6, en mars et juin 2000 à proximité de l'île de Bailleron (Golfe du Morbihan, France) (Grasland, 2002). La caractérisation du gène codant pour l'ARN 16S (Grasland *et al.*, 2003) indique que la souche 1M6 appartient au genre *Cytophaga*, la souche 4M6 au genre *Paracoccus*, 4J6 au genre *Bacillus*, et 3J3 et 3J6 au genre *Pseudoalteromonas*. Une autre souche a été ajoutée à ce travail, il s'agit de la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* sp. 3J6GFP, qui correspond en fait à la souche 3J6 contenant le

plasmide pCJS10 marqué par un gène codant la protéine de fluorescence verte GFP (Dheilly, 2007). Les séquences de l'ARN 16S de ces souches n'ont pas été déposées dans une banque, et ne sont donc pas accessibles.

II.B.3 - Souches bactériennes provenant de la SBR

Enfin, quatre autres souches bactériennes marines étudiées à la SBR ont également été obtenues pour être étudiées dans cette thèse. Elles proviennent pour la plupart de la banque allemande DSMZ. Il s'agit de la souche bactérienne *Pseudoalteromanas carrageenovora* ATCC 43555^{T}. Elle fut isolée à partir d'une algue, aux alentours de Halifax en Nouvelle-Ecosse (Canada), anciennement appelée *Pseudomonas carrageenovora* (Yaphe & Morgan, 1959), elle a ensuite été renommée (Gauthier *et al.*, 1995). La souche *Pseudoalteromanas haloplanktis* ATCC 14393 a été isolée et identifiée par Zobell et Upham (ZoBell & Upham, 1944) en tant que *Vibrio haloplanktis*, puis également renommée par Gauthier en 1995. La souche bactérienne *Cobetia marina* ATCC 25374^{T} a été isolée à partir d'un échantillon d'eau de mer du littoral de Woods Hole dans le Massachussets (Etats-Unis) (Cobet *et al.*, 1970), anciennement appelée *Arthrobacter marinus*, elle a ensuite été renommée par (Arahal *et al.*, 2002). Contrairement aux souches bactériennes précédentes, *Zobellia galactanivorans* Dsij^{T} a été isolée à la SBR, à partir de l'algue rouge *Delesseria sanguinea* par (Barbeyron *et al.*, 2001).

Un tableau récapitulatif des différentes souches bactériennes isolées de *L. digitata* et étudiées dans cette thèse est présenté en annexe **(Annexe 1)**.

II.C - Milieux de culture

II.C.1 - ZoBell

Ce milieu de culture est utilisé pour la croissance des bactéries hétérotrophes prototrophes, vivant en milieu marin. 15 g d'agar bactériologique est ajouté à la solution d'1 L suivante pour obtenir un milieu gélosé: Bacto-peptone (Tryptone) (5 g), extrait de levure (1 g), eau de mer filtrée (800 mL), qsp 1 L eau ultra-pure.

Ce milieu sera considéré comme étant le « milieu riche ».

II.C.2 - VNSS modifié (Väätänen nine-salt solution)

Les milieux gélosés (sur boîte) sont obtenus en ajoutant 15 g d'agar bactériologique à la solution d'1 L : bacto-peptone (Tryptone) (1 g), extrait de levure (0,5 g), glucose (0,5 g), amidon soluble (0,5 g), $FeSO_4.7H_2O$ (0,01 g), $Na2HPO_4$ (0,01 g), eau de mer filtrée (800 mL), qsp 1 L d'eau ultra-pur.
Ce milieu sera également appelé « milieu pauvre ».

II.C.3 - CN (Cétrimide – Acide nalidixique)

Ce milieu de culture CN (Biokar) a été utilisé uniquement pour le calibrant de la MALDI-ToF MS, la souche bactérienne *E. coli* CIP531 du laboratoire CGI-IPL Bretagne (Lorient, France). C'est un milieu préparé au LBCM selon les recommandations du fournisseur, et se compose pour 1 L de milieu à pH 7,1 ± 0,2 à 25°C de : peptone pancréatique de gélatine (16 g), hydrolysat acide de caséine (10 g), glycérol (10 mL), sulfate de potassium (10 g), chlorure de magnésium (1,4 g), cétrimide (0,2 g), acide nalidixique (15 mg), agar agar bactériologique (11 g).

II.D - Cryoconservation des souches isolées

Toutes les souches bactériennes marines étudiées ici sont conservées à - 80°C dans un mélange liquide de milieu de culture ZoBell et de glycérol 15 % final. Toutes les souches sont cultivées sur boîtes ou en milieu liquide avec du ZoBell - agar ou VNSS - agar à 13°C (± 1°C).

Les expériences en microbiologie sont réalisées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Toutes les solutions, les matériels et les milieux de culture sont préalablement stérilisés à l'autoclave (120°C pendant 20 minutes). Certaines solutions ne pouvant pas être autoclavées (comme les solutions enzymatiques, les marqueurs) sont stérilisées par filtration sur filtres seringues 0,20 µm en conditions stériles.

L'eau de mer utilisée a été prélevée régulièrement au cours de la thèse au large de Roscoff (Station SOMLIT d'Astan). Elle a été filtrée sur des filtres en ligne de 0,22 µm (Milipore Sterivex), et stérilisée à l'autoclave (120°C pendant 20 minutes).

III - ETUDE MOLECULAIRE DES SOUCHES BACTERIENNES

III.A - Taxonomie moléculaire des bactéries cultivables

Afin d'identifier une partie de la communauté bactérienne présente à la surface des thalles de *L. digitata*, les régions codant pour l'ARN 16S de 18 souches bactériennes isolées de l'algue (choisies de par leur différence d'aspect), ainsi que les 12 souches marines de référence, sont amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction), séquencées, puis analysées, avec au final la construction d'un arbre phylogénétique.

III.A.1 - Amplification des gènes de l'ADN ribosomal 16S

Les gènes d'ADNr 16S sont amplifiés par PCR, directement à partir des cellules bactériennes entières. La PCR est réalisée dans un volume final de 25 µL, grâce à l'enzyme *Taq* polymerase (Promega) et au couple d'amorces spécifiques aux bactéries : l'amorce 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Hicks *et al.*, 1992) et l'amorce 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Kane *et al.*, 1993). Le milieu réactionnel est composé des réactifs suivants : 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 µM de chaque amorce, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,5 U de *Taq* polymerase (Promega), 1 x de tampon GoTaq Buffer et 1 µL de bactéries préalablement mises en suspension (1-2 µg d'UFC dans 200 µL d'H_2O mQS). Des réactions sans cellules bactériennes, donc sans ADN, sont également effectuées en tant que témoins négatifs. Les réactions PCR sont effectuées dans un thermocycleur (GeneAmp®PCR System 2700, Applied Biosystems), selon les conditions suivantes : une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, 35 cycles constitués d'une dénaturation de 30 s à 95°C, d'une hybridation de 30 s à 53°C et d'une élongation de 1 min 30 s à 72°C, suivis d'une extension finale de 4 min à 72°C.
Les produits PCR amplifiés sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % (Eurogentec), dans un tampon TAE x 0,5 (40 mM de Tris-acetate et 1 mM d'EDTA à pH 8), et avec un marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec).

III.A.2 - Séquençage des ADNr 16S amplifiées

Les produits PCR sont ensuite purifiés grâce au kit Montage™µPCR96Cleanup (Millipore, France). Les réactions de séquençage sont de nouveau effectuées avec le couple d'amorces 8F et 1492R, et le kit ABI v 3.1 BigDye (Applied Biosystems), sur un séquenceur à capillaire ABI 3130xl (Applied Biosystems) de la plateforme technique de séquençage de la SBR, Génopôle Ouest.

III.A.3 - Analyses phylogénétiques

Les séquences d'ADNr 16S sont éditées sur le logiciel DNAMAN v 4.15, et comparées aux bases de données nucléotidiques publiques du programme de recherche avancée en libre accès de Genbank : Basic Local Alignment Search (BLAST ; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Les séquences résultantes sont ensuite alignées aux séquences de gènes d'ADNr 16S (disponibles au moment de l'alignement) montrant une identité significative, grâce aux bases de données EMBL, GenBank et RDP. Ces bases de données sont accessibles à partir de l'interface SINA Webaligner (www.arb-silva.de/aligner/), qui permet de réaliser un alignement basé sur les structures primaire et secondaire des ADNr 16S (Pruesse *et al.*, 2007). Les alignements des séquences multiples, incluant les domaines conservés et variables des structures primaires d'ARNr 16S, ont été utilisés pour générer les ressemblances par paire et les distances génétiques entre les souches bactériennes Ld et les souches bactériennes les plus proches. L'alignement final a été édité avec le logiciel MEGA v 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) et la curation avec les paramètres les moins rigoureux du logiciel public GBlocks (Castresana, 2000), accessible sur www.phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008).

Les analyses phylogénétiques ont finalement été effectuées sur 62 séquences et 948 positions nucléotidiques, avec deux méthodes de reconstruction sur le modèle F84 (d'autres modèles tels que HKY85, Jukes & Cantor et GTR, ont également été utilisés, donnant une très forte similarité de topologie et de valeur de bootstrap :

- la méthode de maximum de vraisemblance ou Maximum Likelihood (ML), grâce au logiciel PhyML librement accessible sur www.atgc-montpellier.fr/phyml (Guindon & Gascuel, 2003).

- la méthode du Neighbour-Joining (NJ), algorithme fondé sur la notion de distance, grâce au logiciel Phylip (Felsenstein, 1989).

L'ordre d'apport des séquences dans les divers programmes phylogénétiques et la sélection de groupes externes ont variés durant l'étude. L'évaluation statistique des divergences génétiques a été exécutée par le re-échantillonnage du bootstrap des données des séquences (100 réplicats), afin d'obtenir une estimation de confiance de la topologie de l'arbre phylogénétique.

III.A.4 - Numéros d'accession des souches

Les séquences partielles des gènes d'ARNr 16S entièrement séquencées durant cette thèse ont été déposées dans la base de données GenBank au NCBI, sous les numéros d'accession FJ966928 à FJ966945 pour les séquences obtenues à partir bactéries isolées des sporophytes de *L. digitata* à Roscoff, et FJ966946 à FJ966951 pour les séquences obtenues des souches bactériennes de référence utilisées.

III.B - Vers une taxonomie moléculaire des bactéries associées totales

III.B.1 - Amplification des gènes de l'ADN ribosomal 16S bactérien

Le protocole d'amplification des gènes d'ADNr 16S est le même que celui utilisé pour réaliser le séquençage des souches bactériennes isolées. Une fois les produits PCR purifiés, ils sont digérés par deux enzymes de restriction *Xcm I* et *Bgl II*, selon les recommandations du fournisseur (NE Biolabs). Les produits PCR digérés sont observés sur gel d'électrophorèse agarose 1 %.

III.B.2 - Amplification des gènes des régions ITS

La méthode PCR-ARISA (*Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis)* consiste à amplifier les espaceurs intergéniques, appelés ITS, situés entre les gènes 16S et 23S, grâce au couple d'amorces 16S-1392F (5'-GYACACACCGCCCGT-3') et 23S-

125R (5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3'). Ces fragments d'ADN sont surtout composés de répétitions de séquences. Le nombre de ces répétions, et donc la taille de ces fragments, varient selon les espèces. L'utilisation de cette technique est donc adaptée à la détermination de genres, voir de taxons différents. La mise au point de cette méthode sur les extraits d'ADN des bactéries isolées et cultivables est un préalable obligatoire, afin de pouvoir ultérieurement l'appliquer sur un mélange bactérien.

Les régions ITS sont amplifiées par PCR (GeneAmp®PCR System 2700, Applied Biosystems) directement à partir de CFU diluées en EMSF, sur 40 cycles : une dénaturation initiale de 10 min à 95°C, 40 cycles constitués d'une dénaturation de 30 s à 95°C, d'une hybridation de 30 s à 52°C et d'une élongation de 1 min 30 s à 72°C, suivis d'une extension finale de 4 min à 72°C. Les produits PCR sont ensuite précipités avec 2,5 volumes d'éthanol à 95 % et 0,04 volumes de NaCl 5M sur une nuit à - 20°C. Après centrifugation à 4°C pendant 15 min à 15000 g, le culot d'ADN est repris dans 50 µL d'H_2O mQS. La visualisation des fragments de tailles différentes s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, permettant une meilleure séparation des molécules d'ADN en fonction de leur taille, afin de discriminer les différents genres bactériens.

III.B.3 - Extraction de l'ADN bactérien de surface

De nombreux protocoles ont été testés pour réaliser cette étude (broyage de l'algue, grattage en surface, sonication…). A chaque expérience, de l'ADNr 16S de l'algue (ADN mitochondrial et chloroplastique) a été amplifié en grande quantité, dominant ainsi l'ADNr 16S bactérien. Toutefois, un protocole a cependant été retenu, inspiré des travaux de Morán *et al*. (2008).

Sur le terrain, 20 g de matières fraîche de thalles adultes de *L. digitata* ont été découpés et insérés dans des tubes Falcon contenant 50 mL d'EMSF, puis transportés sur glace jusqu'au laboratoire. Les morceaux d'algues ont ensuite été transvasés et soniqués 15 min dans des bouteilles en verre de 500 mL, contenant 100 mL de TBE (Tris Borate EDTA) à pH 8,3. Puis, la solution tampon a été récupérée et centrifugée 10 min à température ambiante et à 18000 g. L'ADN du culot récolté a finalement été

extrait à l'aide du kit d'extraction « Genomic DNA from Food NucleoSpin®Food », en suivant les recommandations du fournisseur. La qualité de l'ADN extrait est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %, puis est stocké à - 20°C avant analyse. Les régions ITS et ADNr 16S de l'ADN total extrait sont ensuite amplifiées selon les protocoles décrits précédemment, et vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %.

Les produits PCR sont purifiés avec 2,5 volumes d'éthanol à 95 % et 0,04 volumes de NaCl 5M pendant au minimum 1 h à - 20°C, et culottés à 4°C pendant 10 min à 13000 g. Les culots sont repris dans 20 µL d'H_20 mQS et des queues PolyA sont ajoutées pendant 10 min à 72°C, avec 1 µL de GoTaq, 2 µL de dNTP et 2,5 µL de tampon Buffer GoTaq, dans un volume final de 50 µL. Les produits PCR sont finalement digérés par les couples d'enzyme de restriction Sca I / Mlu I et Bst XI / Mlu I, pendant 1h30 à 37°C, selon les recommandations du fournisseur (NE Biolabs). Les produits PCR digérés sont déposés sur gel d'électrophorèse agarose 1%, et seules les bandes de 1500 pb sont découpées et purifiées avec le kit DNA Gel Extraction (Genomics, Millipore), puist redéposées sur gel d'électrophorèse agarose 1 % pour s'assurer qu'il n'y a pas d'autres bandes amplifiées que celles à 1500 pb. Les produits PCR sont ensuite précipités avec 2,5 volumes d'éthanol à 95 % et 0,04 volumes de NaCl 5M sur une nuit à - 20°C, et culottés à 4°C pendant 15 min à 15000 g. Les culots sont repris dans 25 µL d'H20 mQS après avoir été lavés à l'éthanol 80 % froid. Enfin, les produits PCR d'ADNr 16S sont clonés avec le kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen).

IV - ETUDES SPECTROSCOPIQUES DES SOUCHES BACTERIENNES CULTIVABLES

Cette étude est réalisée sur 18 souches isolées de *L. digitata*, sur les 2 souches d'Ifremer, les 6 souches du LBCM et enfin sur les 4 souches disponibles à la SBR. Le but de ce travail est de mettre au point de nouveaux outils de caractérisation spectrale pour rapidement discriminer des souches bactériennes entre elles, sur des cellules entières, puis d'élaborer des bases de données spectrales dédiées en observant rigoureusement les mêmes paramètres de culture. Afin d'établir les bases de données spectrales, il est nécessaire d'évaluer au préalable le pouvoir discriminant de deux approches spectroscopiques (RMN et spectrométrie de masse), par rapport à l'approche moléculaire (16S rDNA) réalisées sur les mêmes souches. Ainsi, des alternatives simples et rapides à la taxonomie moléculaire, sont offertes à un expérimentateur ayant accès aux différents équipements (milieu universitaire, centre de recherche). Dans ces conditions, il peut établir rapidement ses propres bases de données spectrales en corrélation avec ses déterminations par taxonomie moléculaire, puis utiliser uniquement les empreintes spectrales pour les déterminations de routine.

Outre la complémentarité offerte avec la taxonomie moléculaire, des indications sur le métabolome de souches bactériennes prises individuellement peuvent être utiles, en faisant varier paramètre par paramètre, les conditions de culture. Cette approche peut être utile pour comprendre par exemple les carences et les prérequis pour la culture de souches réputées non-cultivables.

IV.A - Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) est une technique d'analyse basée sur les propriétés cinétiques et magnétiques des noyaux. En effet, pour qu'un noyau soit étudiable en RMN, il faut que son spin nucléaire, noté I ou S, soit différent de 0, sans quoi il ne peut s'orienter dans un champ magnétique (c'est le cas du ^{12}C et de l'^{16}O dont les spins nuls rendent l'observation de ces noyaux impossible). La RMN offre de nombreuses approches pour étudier les souches bactériennes sur des extraits en solution comme la RMN ^{1}H – ^{13}C ; COSY ; HMBC ; HMQC, mais aussi en solide avec une sonde spécifique pour étudier les cellules entières de bactéries : la sonde HR-MAS (High Resonance Magic Angle Spinning). Cette sonde reproduit l'homogénéité d'un

liquide par une vitesse de rotation importante de l'échantillon (5000 Hz) et permet d'obtenir des signaux en haute résolution des molécules libres. Il est ainsi possible de discriminer, dans un tissu vivant, les métabolites dissous dans les liquides intracellulaires des polymères constituants la membrane.

IV.A.1 - RMN ^{1}H-HRMAS

Le premier outil spectrométrique utilisé pour étudier les 30 souches bactériennes est la RMN proton du solide, soit la RMN ^{1}H-HRMAS. Les échantillons analysés proviennent de deux types d'expérimentation. La première expérimentation consiste à cultiver en triplicat les 30 souches monospéficiques sur du milieu de culture ZoBell-Agar à 14°C (± 1°C) au bout de 6, 10 et 18 jours. La deuxième expérimentation consiste à cultiver sur du milieu de culture VNSS-Agar, 16 souches bactériennes parmi les 30, selon les mêmes paramètres de culture, afin de comparer les profils spectraux obtenus aux cultures bactériennes sur milieu ZoBell. Une analyse est également effectuée sur des morceaux de gélose stérile de ZoBell-Agar et de VNSS-Agar, afin de comparer leur spectre à ceux des souches bactériennes.

Pour acquérir le profil spectral des différentes souches bactériennes cultivées, les cellules bactériennes entières présentes sous forme de CFU (cultures monospécifiques) sont prélevées et introduites dans un rotor d'oxyde de zirconium de 4 mm au Service Commun de RMN à l'Université de Bretagne Occidentale (UBO^{ueb}, Brest). Les échantillons sont homogénéisés avec du D_2O (Euriso-top, Saclay, France), le rotor est ensuite correctement bouché sans bulles d'air et introduit dans la sonde HR-MAS SB BL4 ^{1}H/^{31}P de l'aimant supraconducteur DRX de 500 MHz (Bruker). Il est alors soumis à une rotation de 5000 Hz à 25°C. L'acquisition des spectres se fait sur 32 scans, et selon un protocole standard de présaturation du pic de l'eau, suivi d'une normalisation (prétraitement des spectres) en trois étapes :

(i) une correction de la ligne de base des spectres en utilisant un algorithme standard de correction de la ligne de base du logiciel XWIN (Bruker)

(ii) un référencement de tous les spectres des pics communs identifiés, tels que les singulets méthyle de la glycine bétaïne, à δ = 3,90 et 3,26 ppm, ou celui de l'alanine à δ = 1,47 ppm

(iii) une réduction de l'échelle d'acquisition des spectres initialement compris entre 0 et 12 ppm, et réduit à un intervalle compris entre 0 et 4,5 ppm (zones des métabolites majoritaires)

Les spectres sont ensuite superposés, comparés et groupés visuellement grâce au logiciel MestReNova v 5.2.5 (MestRec, Santiago, Espagne). Une analyse en composantes principales (ACP) automatique des spectres est également effectuée avec le logiciel AMIX v 3.8 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Allemagne), en utilisant la fenêtre spectrale comprise entre 0,5 et 4,5 ppm, estimée être la plus représentative, et une matrice comprenant une taille rectangulaire d'analyse de 0,04 ppm. Les déterminations préliminaires de composés sur les spectres en HR-MAS ont été réalisées en s'appuyant sur les données botaniques (Broberg, 1998; Chauton *et al.*, 2003a; Chauton *et al.*, 2003b; Krishnan *et al.*, 2005) ou biomédicales à pH physiologique sur différents tissus ou liquides.

IV.A.2 - RMN 1D et 2D

Des extraits de cultures bactériennes monospécifiques sont également passés en RMN en solution, permettant une analyse plus approfondie des métabolites présents chez ces bactéries marines, que par la HR-MAS sur cellules entières. Les 30 souches sont mises en culture à 14°C (±1°C) sur des milieux ZoBell-Agar, en prenant soin de bien inoculer toute la surface de la gélose, afin d'obtenir suffisamment de biomasse. Au bout de 8 jours de croissance, toute la surface des boîtes de Petri est raclée délicatement pour ne pas prélever de gélose, et les biomasses sont transférées dans des tubes Falcon stériles de 50 mL contenant 3 mL de D_2O. Les échantillons sont ensuite homogénéisés en trois étapes : 2 min de vortex, suivi de 2 min de sonication, et enfin une mise sous pression par une FrenchPress à 1,5 bar. Les échantillons sont ensuite concentrés par évaporation et transférés dans des tubes RMN avec 0,02 % d'azoture de sodium (NaN_3), afin d'empêcher toute prolifération bactérienne. Au Service Commun de RMN de l'UBO^{ueb}, des spectres à 1 et 2 dimensions (1D et 2D), ^{1}H et ^{13}C de haute résolution sont obtenus à partir de ces échantillons grâce à la sonde triple résonance de 5 mm TBI ^{1}H /(BB)/^{13}C, de l'aimant supraconducteur DRX de 400 MHz (Bruker). Des séquences pulsées standards en 2D enchaînant une COSY (corrélation spectroscopique ^{1}H-^{1}H), une

HMQC (cohérence du quantum hétéronucléé multiple ^{1}H-^{13}C), et une HMBC (corrélation des liaisons multiples hétéronuclées), toutes les fois que la concentration des extraits et que la résolution s'y prêtaient. Quelques souches ont été extraites avec des solvants apolaires afin d'affiner l'attribution de pics très minoritaires dans les extraits au D_2O, et lever les certitudes liées à la solubilité insuffisante de certains métabolites.

Les spectres des extraits en solution ont été travaillés grâce au logiciel MestReNova® et les caractérisations des composés identifiables ont été réalisées en s'appuyant sur la base de données spectrales de composés purs, du Service Commun de RMN de Brest, en tenant compte des écarts possibles dûs à l'utilisation de solvants parfois différents, des effets de pH ou de température.

IV.B - MALDI-ToF MS

Le second outil est la MALTI-ToF, un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser, assistée par une matrice « MALDI » (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) et un analyseur à temps de vol « ToF » (*Time-of-flight mass spectrometry*). La résolution du spectromètre de masse permet une grande finesse des pics, et est définie comme étant le rapport de la masse « m » du pic, sur la largeur à mi-hauteur « Δm ». Ainsi, plus la résolution est élevée, plus les pics sont fins. Il est alors possible de visualiser deux molécules de masses proches. Dans notre contexte d'étude, le MALDI-ToF MS est équipé d'un réflectron (miroir électrostatique ou « miroir à ions », qui dévie les ions avec un champ électrique, doublant ainsi la longueur du chemin de vol de l'ion et augmente la résolution de l'instrument. Le spectromètre de masse MALDI-ToF atteint alors des résolutions de 20 000 avec réflectron, contre 5 000 en mode linéaire sans réflectron.

Dans ce travail, la spectrométrie de masse MALDI-ToF a également été effectuée sur des cellules entières et vivantes de bactéries. Toutes les souches bactériennes marines, à l'exception de la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* sp. Ld1 (isolée de *L. digitata*) sont étudiées.

Approximativement 1 à 2 µg de cellules bactériennes vivantes sont prélevées à partir de CFU et sont directement disposées en un très fin film bactérien sur une plaque

de MALDI (MSP 96 ground S/N, Bruker). Chaque spot est recouvert avec 1 µL d'une solution matrice d'acide α-cyano-4-hydroxycinnanique dans 50 % d'acétonitrile, et 50 % d'eau acidifié avec 2,5 % d'acide trifluoroacétique, et laissé sécher à l'air sous la hotte microbiologique à température ambiante. Les spectres MALDI sont acquis sur un Microflex Bruker Dactonics « Time-of-Flight » (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Allemagne) du LBCM, en mode linéaire positif avec un voltage d'accélération de ± 20 kV, un délai d'une durée de 300 ns et une longueur d'onde d'émission de 337 nm. A chaque échantillon, un total de 200 tirs de laser consécutifs sont accumulés (4 x 50 tirs). L'instrument est calibré à partir de 11 masses de référence suivantes (référencement effectué par Bruker), d'une souche d'*Escherichia coli* CIP531 du laboratoire CGI-IPL Bretagne (Lorient, France), cultivée pendant 24h à 37°C (± 1°C) sur du milieu CN : RL36 4364,33 ; RS32 5095,82 ; RS34 5380,39 ; RS33 Meth 6254,39 ; RL32 6315,19 ; RL30 6410,60 ; RL35 7157,74 ; RL29 7273,45 ; RL31 7871,06 ; RS15 8476,74 ; RS19 10137,57.

Tous les spectres sont ensuite lissés par l'algorithme centroïde de Savitzky-Golay et la ligne de base TopHat est soustraite. Les spectres de masse sont acquis avec le logiciel FlexControl v 3.0 et analysés avec le logiciel FlexAnalysis v 3.0 (logiciels disponibles avec l'instrument). Après l'acquisition de tous les spectres, le logiciel Biotyper (Bruker) est utilisé pour classer la totalité des 464 spectres individuels qui composent la base de données, en utilisant une approche en ACP.

Par conséquent, pour effectuer ce travail, il a fallu tout d'abord analyser les 29 souches bactériennes par une acquisition de 16 spectres individuels par souche, d'un signal d'intensité compris entre 2000 et 6000 unités, et sur une fenêtre de masse comprise entre 2000 et 18000 m/z. Ainsi, une base de données de 29 spectres consensus est créée, basée sur la moyenne des 16 spectres individuels d'une même souche, *i.e.* 29 spectres consensus x 16 spectres individuels, *i.e.* 464 spectres individuels. Ensuite, différentes études sont menées à partir de cette base de données spectrales :

(i) les 464 spectres individuels composant la base de données sont comparés avec les 29 spectres consensus provenant des moyennes de ces spectres individuels, afin de vérifier la robustesse de cette base de données.

(ii) De nouveaux spectres sont acquis sur les 29 mêmes souches bactériennes cultivées dans les mêmes conditions que celles utilisées pour créer la base de

données, à raison de 4 spectres individuels par souches, i.e. 116 nouveaux spectres individuels ZoBell. Ces nouveaux spectres sont comparés à la base de données.

(iii) De nouveaux spectres sont acquis sur les 29 mêmes souches bactériennes, toujours dans les mêmes conditions de culture, à l'exception du milieu ZoBell-Agar qui est remplacé par du VNSS-Agar. 116 spectres individuels VNSS sont obtenus (*i.e.* 4 x 29 souches), qui sont à leur tour comparés à la base de données.

Les résultats des comparaisons spectrales sont exprimés par un score chiffré, en considérant qu'un score supérieur à 50 correspond à une similitude des spectres, et plus le score est élevé, plus les souches comparées sont identiques. Les scores peuvent être assignés jusqu'à 5 des plus proches spectres consensus, soit jusqu'à 5 souches bactériennes les plus ressemblantes d'un point de vue spectral.

V - CAPACITE D'ADHESION ET DE FORMATION DE BIOFILM DES SOUCHES BACTERIENNES CULTIVABLES

V.A - Adhésion des souches bactériennes sur microplaques 96 puits

V.A.1 - Protocole

Le protocole d'adhésion des souches bactériennes a été inspiré des travaux de thèse de Leroy (2006), qui a étudié entre autres, la formation de biofilms en microplaques à 96 puits. Toutes les étapes où il est nécessaire d'ouvrir les microplaques sont réalisées sous hotte à flux laminaire, afin de rester en condition stérile. Ci-dessous est schématisé le protocole d'adhésion des souches bactériennes étudiées et révélées grâce au marqueur d'ADN : le Di Aminido Phenyl lndol (DAPI) **(Figure 33)**.

La 1ère étape de ce protocole est de mettre en route des cultures bactériennes monospécifiques liquides. Pour cela, une UFC par souche bactérienne est prélevée à partir de culture sur boîte de Petri contenant du milieu ZoBell – agar, et ayant été cultivée durant plusieurs jours à 13°C (± 1°C). Les UFC sont directement introduites dans des tubes Falcon de 50 mL contenant 10 mL de milieu de culture ZoBell. Les tubes Falcon sont alors placés trois jours sous agitation orbitale à 20°C et à 250 rpm. Les cultures monospécifiques obtenues sont ensuite culottées par centrifugation à 4°C pendant 10 min à 7000 rpm. Puis, les culots sont lavés à trois reprises dans un volume de 5 mL d'EMSF, et remis en suspension dans de l'EMSF, à une DO_{600} = 2.

Selon les différentes études effectuées sur la capacité d'adhésion des souches, la seconde étape de distribution des suspensions bactériennes dans les puits des microplaques sera différente, et détaillée dans les paragraphes suivants. En revanche, toutes les autres étapes seront effectuées selon le protocole établi **(Figure 33)**, et détaillé ci-après.

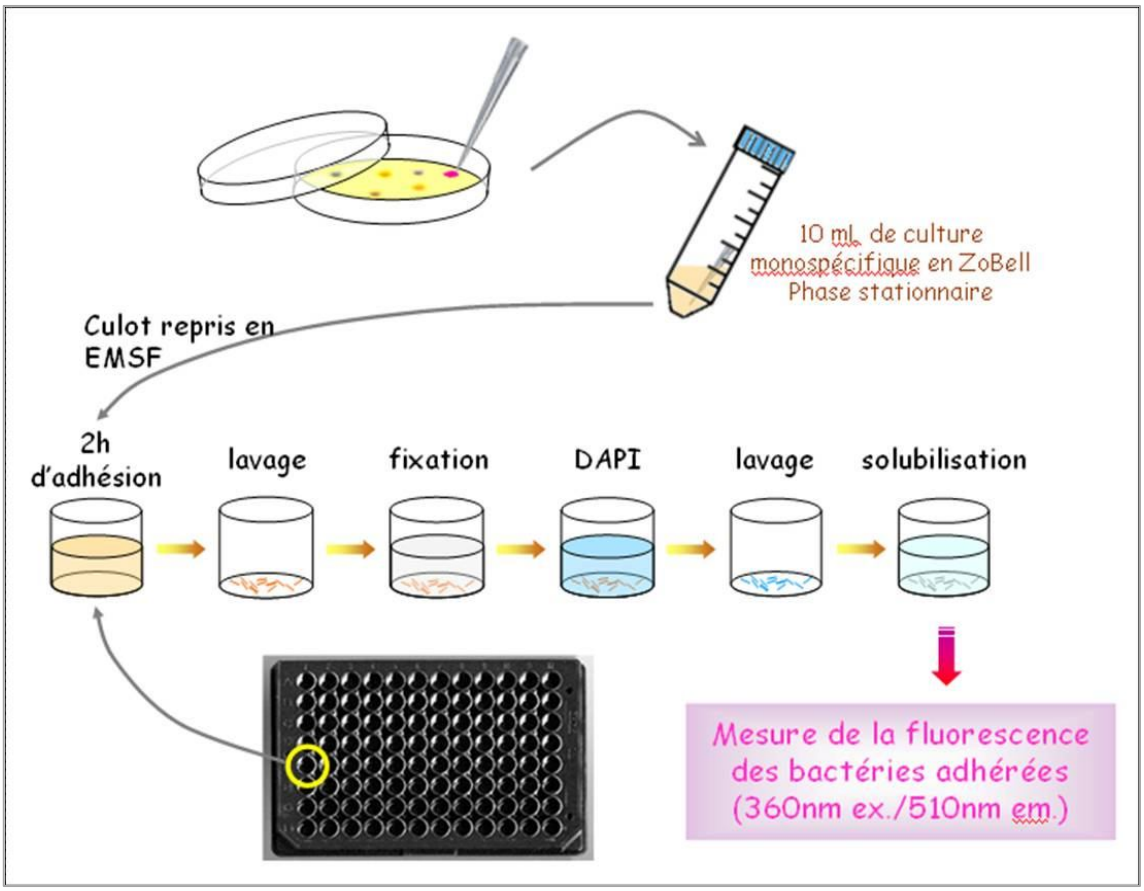


Figure 33 : Représentation schématique des différentes étapes du protocole d'adhésion des bactéries.

Les microplaques sont recouvertes et incubées 2 heures à température ambiante sous agitation orbitale de 300 rpm. Elles sont ensuite renversées pour en retirer les suspensions bactériennes. Les bactéries non adhérées sont alors éliminées par trois lavages successifs : les plaques sont mises sous agitation orbitale de 250 rpm, pendant 3 min, avec 200 µL par puits d'une solution préalablement stérilisée de NaCl 36g.L^{-1} (eau salée), puis sont à nouveau renversées. Ensuite, les bactéries adhérées sont fixées par une incubation durant 1h30 à 4°C avec 200 µL d'une solution d'eau salée contenant 2,5 % de formaldéhyde préalablement stérilisée par filtration sur 0,20 µm. L'ADN bactérien est alors coloré à l'obscurité et à température ambiante pendant 20 min, avec 200 µL d'une solution d'eau salée contenant du DAPI à 4 µg.mL^{-1}, préalablement filtrée sur 0,20 µm. Puis, l'excès de DAPI est éliminé par trois lavages successifs à l'eau salée. Enfin, le DAPI complexé à l'ADN des bactéries adhérées est solubilisé par l'ajout de 200 µL d'une solution d'éthanol (EtOH) à 95 %, pendant 15 min à température ambiante et sous agitation orbitale de 250 rpm. La fluorescence est finalement mesurée

à 360 nm de longueur d'onde d'excitation et 510 nm de longueur d'onde d'émission, avec le lecteur de microplaques Safire^2 (TECAN), relié au logiciel Magellan Explorer v 5.03. Lors des diverses expériences, quelques puits de chaque microplaque ont été ensemencés avec uniquement 200 µL d'EMSF, afin de déduire les valeurs de fluorescence de ce « blanc » aux valeurs de fluorescences obtenues dans les puits contenant les bactéries adhérées.

V.A.2 - Choix de la microplaque

La première étape de ce travail a été de choisir la microplaque qui sera utilisée pour tous les tests d'adhésion. Pour cela, trois types de plaques ont été testés :

- OptiPlate 96F® : en polystyrène noir, fond noir, non traitée, non stérile (stérilisation à l'EtOH 70 % par immersion, puis aux UV pendant 30 min chacun)
- Nunc® : en polystyrène noir, fond noir, non traitée, stérile (Leroy *et al.*, 2007)
- Costar® : polystyrène noir, fond en verre transparent, non traitée, stérile

Les expériences d'adhésion sur les trois types de plaque ont été réalisées sur 11 souches bactériennes : 3 souches isolées de la macroalgue brune *L. digitata* (*Paracoccus* sp. Ld16, *Pseudoalteromonas* sp. Ld18 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20), 2 souches de la SBR (*Zobellia galactanivorans* Dsij^T et *Cobetia marina* ATCC 25374^T), les 2 souches de l'Ifremer dont des expériences d'adhésion cellulaire similaire ont déjà été effectuées (*Vibrio* sp. D01 et *Pseudoalteromonas* sp. D41), et enfin 4 souches du LBCM (*Pseudoalteromonas* sp. 3J3, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et 3J6 GFP, et *Paracoccus* sp. 4M6).

Chaque microplaque de 96 puits a été ensemencée de la manière suivante : 200 µL d'EMSF a été distribuée dans les 8 puits de la première colonne (*i.e.* blanc), et 200 µL de suspension bactérienne en EMSF à DO_{600} = 2 a été distribuée dans les puits des 11 autres colonnes, à raison d'une souche bactérienne par colonne. La suite du protocole est détaillée dans le paragraphe précédent. L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois sur chacune des microplaques testées.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes, à raison d'un histogramme par type de microplaques. Ils représentent la valeur moyenne de la fluorescence des 8 puits pour chaque souche bactérienne, à laquelle est déduite la valeur

moyenne de la fluorescence du blanc (EMSF). Les erreur-types sont calculés à l'aide du logiciel Microsoft Excel.

V.A.3 - Etude de l'adhésion

Tous les résultats ont été traités avec le logiciel Microsoft Excel, qui a permis de calculer les erreur-types, d'effectuer un test de *Student* avec un niveau statistique de significativité fixé à 95 %, soit $p < 0,05$.

V.A.3.1 - En EMSF

Le pouvoir d'adhésion des 29 souches bactériennes sélectionnées (excepté la souche non viable *Pseudoalteromonas* sp. Ld1) a été testé en microplaques 96 puits Costar. Comme précédemment, 200 µL d'EMSF ont été ensemencés dans les puits de la première colonne, et les 11 autres colonnes ont été ensemencées avec 200 µL de suspension bactérienne d'une $DO_{600} = 2$, à raison d'une souche bactérienne par colonne, *i.e.* 8 puits par souche. Chaque souche bactérienne a été testée 5 fois sur des microplaques différentes, à des jours différents et avec des cultures bactériennes différentes (*i.e.* 5 séries d'expérimentation). Ce procédé permet d'avoir une idée de la répétabilité des résultats de fluorescence d'une souche bactérienne au sein d'une même microplaque, mais aussi de la reproductibilité entre différentes microplaques.

Un premier travail d'analyse a été effectué sur la reproductibilité de l'adhésion pour une souche bactérienne donnée sur des plaques différentes (5 séries). Les résultats d'adhésion sont représentés sous forme d'histogrammes, qui représentent la valeur moyenne de la fluorescence des 8 réplicats par souche, à laquelle est déduite la valeur moyenne de la fluorescence du blanc (EMSF). Une étude statistique sur la reproductibilité des valeurs de fluorescence entre les différentes séries d'adhésion, grâce au test de *Student*, a également été effectuée. Ces résultats sont exprimés sous forme d'un tableau.

Tous les résultats d'adhésion sont ensuite synthétisés dans un second tableau. Pour chaque série, les valeurs de fluorescence moyennes des 8 réplicats après soustraction de celle des 8 réplicats du blanc sont exprimées par des sigles. La dernière colonne du tableau correspond à la moyenne des 5 séries d'expérience d'adhésion en

EMSF. Lorsque les valeurs moyennes de DO_{510} obtenues sont inférieures à 2500, alors l'adhésion est considérée comme nulle et représentée par un « - » ; quand elles sont comprises entre 2500 et 10000, l'adhésion est dite faible et caractérisée par un « 0 » ; enfin, lorsqu'elles sont supérieures à 10000, l'adhésion est considérée comme forte et représentée par un « + ».

V.A.3.2 - En présence de métabolites extraits de L. digitata

Lors de cette expérience, douze souches bactériennes isolées de *L. digitata*, les quatre souches de la SBR, les deux souches d'Ifremer ainsi que les souches du LBCM, excepté *Bacillus* sp. 4J6, ont été utilisées. Les métabolites testés sont issus des extractions au méthanol (MeOH) et à l'acétate d'éthyle (EtAc), effectuées à partir des trois parties de thalles de *L. digitata* **(cf paragraphe III.A.3 p.61)**. Cinq extraits ont ainsi été préparés :

- extrait de crampons à l'acétate d'éthyle : extrait « C-EtAc »
- extrait de crampons au méthanol : extrait « C-MeOH »
- extrait de stipes à l'acétate d'éthyle : extrait « S-EtAc »
- extrait de stipes au méthanol : extrait « S-MeOH »
- extrait de lames au méthanol : extrait « L-MeOH »

Les 29 souches bactériennes marines, d'une DO_{600} = 2, ont été co-incubés en triplicats dans des microplaques à 96 puits, 2h avec les différents extraits préparés, dans un volume finale d'EMSF de 200 µL et à une concentration finale de 1 $mg.mL^{-1}$. La concentration en DMSO finale retrouvée dans les puits est alors inférieure à 0,1 %. Un blanc d'EMSF (200 µL d'EMSF seule), un témoin d'adhésion en EMSF (200 µL de suspension bactérienne en EMSF : « Témoin ») et un témoin solvant (200 µL de suspension bactérienne contenant une concentration finale en DMSO inférieure à 0,1 % : « Témoin DMSO », pour évaluer la toxicité éventuelle du solvant sur les souches bactériennes) ont également été réalisés en triplicat. Les différentes conditions d'adhésion pour une même souche bactérienne sont effectuées sur une même microplaque.

Lorsque les conditions testées n'ont aucun effet sur l'adhésion ($p > 0,05$), alors le sigle « 0 » est représenté. A l'inverse, lorsque $p < 0,05$, ceci signifie que le pouvoir d'adhésion des souches bactériennes testées est modifié. Le sigle « + » correspond à une

adhésion favorisée par la condition testée, tandis que le sigle « - » signifie que le pouvoir d'adhésion est diminué.

V.A.3.3 - En présence d'exsudats de L. digitata

Lors de ce travail, deux types d'exsudats d'algues ont été testés : ceux naturellement exsudés par les algues, et ceux libérés en réponse à une élicitation par les GG. La préparation de ces exsudats est décrite dans le **paragraphe I.C.2 p.89** de ce chapitre. Pour cette expérience, 1 g de plantules de *L. digitata* a été utilisé dans un volume de 50 mL d'EMSF, contenu dans des tubes Falcon de 50 mL.

Sur chaque microplaque, 6 puits ont été consacrés à l'EMSF pour le blanc (200 µL par puits), et le reste de la microplaque, aux 22 souches bactériennes à tester. 100 µL de suspensions bactériennes d'une DO_{600} d'ensemencement de 3 (au lieu de 2 pour les adhésions en EMSF) ont été déposées dans les puits, ceci en raison de l'ajout de 100 µL de différents types d'EM qui diluent dans les puits la DO_{600} finale des suspensions bactériennes. Les EM testées sont : l'EMSF pour le témoin, l'EM+Alg pour étudier l'effet des exsudats naturellement sécrétés par les algues, et l'EM+Alg+GG pour étudier l'effet des exsudats sécrétés par les algues stressées aux GG. Trois puits sont utilisés par souche et par condition à tester, et cette expérience est réalisée en duplicat.

Les résultats sont présentés sous forme d'un tableau. Il représente la moyenne des valeurs de fluorescence des bactéries adhérées (3 puits par souche bactérienne et par condition à tester) après soustraction de la valeur moyenne de la fluorescence du blanc (6 puits d'EMSF). Quand les exsudats testés n'ont aucun effet sur l'adhésion ($p > 0,05$), alors le sigle « 0 » est représenté. A l'inverse, lorsque $p < 0,05$, ceci signifie que le pouvoir d'adhésion des souches bactériennes testées est modifié. Le sigle « + » correspondant à une adhésion favorisée par les exsudats, et « - » à un pouvoir d'adhésion diminué.

V.A.3.4 - En présence de métabolites individuels

Cinq souches bactériennes ont été étudiées : 2 souches bactériennes isolées de *L. digitata*, *Cobetia* sp. Ld8 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 ; et 3 souches marines de référence, *Zobellia galactanivorans*, *Pseudoalteromonas* sp. D41 et *Pseudoalteromonas*

sp. 3J6. Tous les tests d'adhésion ont été réalisés comme suit : aux 100 µL de suspensions bactériennes d'une DO_{600} = 3, 100µL de solution à tester à différentes concentrations sont ajoutées (DO_{600} finale des suspensions bactériennes : 1,5). Les expériences sont réalisées en triplicat sur une même microplaque. Sur chaque plaque, des témoins négatifs contenant uniquement de l'EMSF et les composés à tester sont effectués, afin de soustraire les valeurs moyennes de fluorescence de ces témoins à celles obtenues pour les souches bactériennes adhérées.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes, à raison d'un histogramme par métabolite purifié ou de sa préparation commerciale stabilisée. Ils représentent la moyenne des valeurs de fluorescence des bactéries adhérées (3 puits par souche bactérienne et par métabolite à différentes concentrations) et leur erreur-type. Lorsqu'une différence d'adhésion significative apparaît en présence des métabolites par rapport aux témoins d'adhésion en EMSF, elle est représentée par une étoile sur l'histogramme.

Les composés testés individuellement sont des composés industriels, bien connus chez *L. digitata* pour être exsudés suite ou non à une élicitation par des oligoguluronates.

Il s'agit du mannitol, un diol ou "sucre-alcool" à 6 carbones, parmi les plus abondants dans la nature. On le retrouve chez *L. digitata* en abondance sur toute la surface de son thalle **(cf paragraphe III.B.3.6 p.83)**.

Le diiodométhane est un composé présent chez les laminaires en grande quantité, ce qui fait de ces laminaires les plus importants réservoirs à iode parmi les systèmes vivants. On sait également que le CH_2I_2 est le plus important composé organique iodé libéré par l'algue lors d'une élicitation aux GG **(cf paragraphe III.B.3.2 p.71)**. Il est donc tout naturel de tester ce composé sur l'adhésion des bactéries marines isolées de *L. digitata*, mais aussi sur celle de bactéries marines exogènes à l'algue.

Enfin, le troisième composé testé est le Stabrex ST40®. Ce dernier est un produit commercial développé par Nalco Chemical Company, dans le but de contrôler les microorganismes dans les colonnes d'eau. Il est basé sur un acide hypobromeux stabilisé antimicrobien (HOBr) : l'acide *N*-bromoaminoéthanesulfonique. Cet acide est produit par les éosinophiles (leucocytes polynucléaires) dans l'oxydation de bromine, enzymatiquement catalysée par du H_2O_2 qui réagit avec l'acide aminoéthanesulfonique (la taurine) (Hjeresen, 2001). Le STABREX® ST40 est donc un mélange d'hydroxyde

de sodium et de solution antimicrobienne de brome liquide alcalin stabilisé. Dans notre contexte d'étude, ce produit est utilisé de par son contenu en HOBr. En effet, le brome est l'un des composés halogénés connus pour être en forte concentration chez *L. digitata* **(cf paragraphe III.B.3.2 p.71)**.

- *Le mannitol*

L'adhésion bactérienne est étudiée en présence des 5 concentrations de mannitol en EMSF suivantes : 2,5 $\mu g.mL^{-1}$, 25 $\mu g.mL^{-1}$, 250 $\mu g.mL^{-1}$, 2,5 $mg.mL^{-1}$ et enfin 25 $mg.mL^{-1}$.

- *Le diiodométhane : CH_2I_2*

Le CH_2I_2 n'étant pas soluble dans l'eau de mer, il est préalablement mis en suspension dans 100 % de DMSO (diméthylsulfoxyde) à une concentration de 10 $mg.mL^{-1}$. A partir de cette solution mère de CH_2I_2-DMSO, différentes concentrations de CH_2I_2 en EMSF sont effectuées pour tester leur effet sur l'adhésion des bactéries : 5 $\mu g.mL^{-1}$, 10 $\mu g.mL^{-1}$, 20 $\mu g.mL^{-1}$, 50 $\mu g.mL^{-1}$ et 100 $\mu g.mL^{-1}$. De par les dilutions successives lors de la préparation des différentes solutions à tester, les teneurs en DMSO maximales retrouvées dans les solutions les plus concentrées en CH_2I_2 sont de 1 %, soit au final à 0,5 % avec les suspensions bactériennes. Les teneurs les plus faibles étant de 0,01 % final pour les solutions à 5 $\mu g.mL^{-1}$. Ces faibles teneurs devraient donc limiter l'effet du solvant sur l'adhésion bactérienne.

- *STABREX ST40® : HOBr*

L'adhésion bactérienne est testée en EMSF avec plusieurs dilutions du produit commercial STABREX® ST40 : 10^{-3}, 2.10^{-4}, 10^{-4}, 2.10^{-5} et 10^{-5}. (3 µL de Stabrex® dans 1 mL d'eau = teneur totale en brome 2,2 ppm).

V.B - Formation de biofilm en chambre à flux

V.B.1 - Mise en place du système

L'étude de la formation de biofilm a été réalisée en système de chambre à flux (Flow Cell), au LBCM de Lorient. Toutes les expériences ont été effectuées suivant un même protocole décrit et schématisé ci-dessous **(Figure 34)**, dans une pièce thermostatée à 21°C (± 1°C).

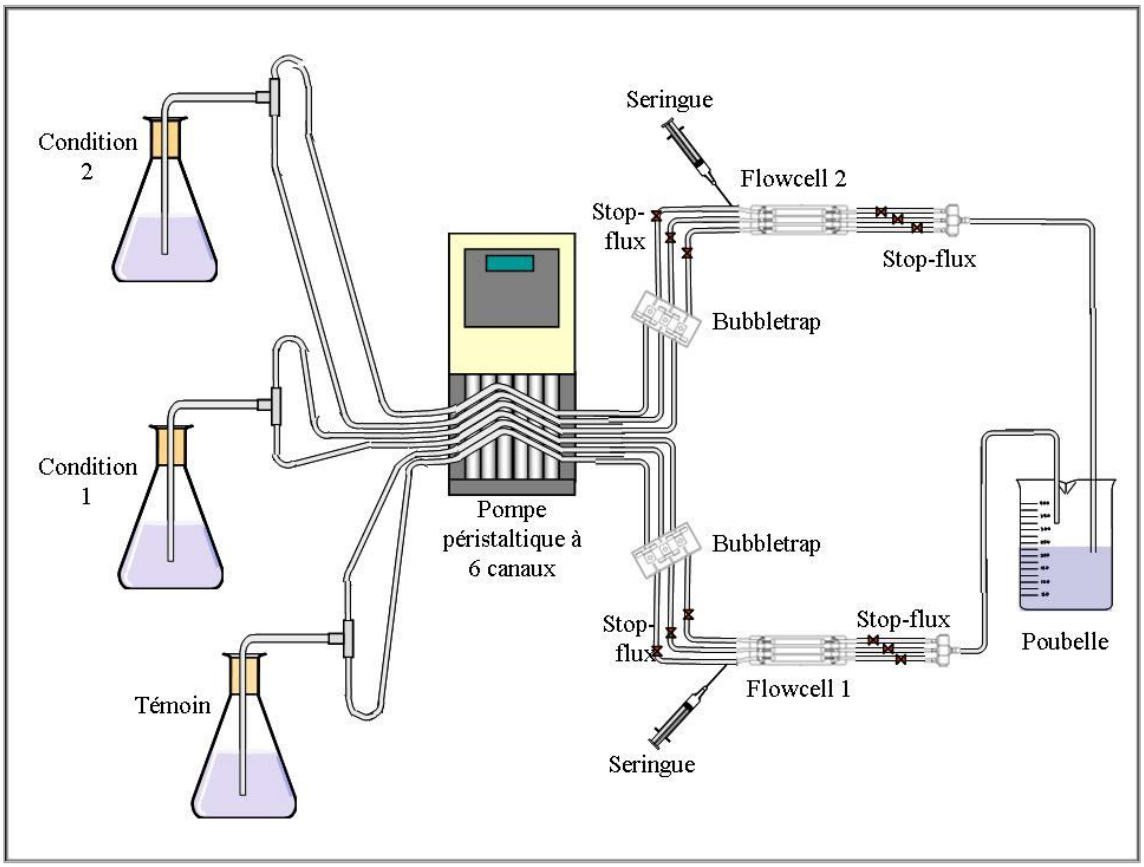


Figure 34 : Représentation schématique du montage pour créer et étudier la formation des biofilms.

Le système est équipé d'erlenmeyers contenant les milieux à tester (Témoin, Condition 1 et Condition 2), d'une pompe péristaltique pour pomper à une vitesse déterminée le milieu de culture, et alimenter les flowcells dans lesquelles ont été injectées les souches bactériennes. Des pièges à bulles (bubbletraps) sont disposés entre la pompe et les flowcells, afin de piéger les éventuelles bulles d'air contenues dans les milieux de culture. Des clips « stop-flux » sont positionnés sur chaque tube, en amont et en aval des flowcells, pour couper le flux pendant l'injection des bactéries et des fluorochromes, mais également pour empêcher toute remontée des bactéries dans le système positionné en amont lorsque le flux est stoppé. Un bécher « poubelle » de 2 L est disposé à la fin du montage, de manière à récupérer le flux de milieu de culture à sa sortie.

Les Flow Cells (FC) sont des chambres d'adhésion à trois canaux, de 1 x 40 x 44 mm de dimension (Biocentrum, DTU, Danemark), et qui permettent l'écoulement d'un flux laminaire (Christensen *et al.*, 2002). Elles sont préparées la veille de la mise en route du système. Une lamelle en verre de 48 x 50 mm (knittel glasser) est montée sur la base des FC, afin de fermer ces dernières. Les FC sont ensuite raccordées au montage, et de l'eau de javel à 0,5 % est injectée pendant 30 min à une vitesse de flux de 20 rpm, grâce à une pompe péristaltique à six canaux (Watson Marlow 205 U). Cette étape permet de bien nettoyer et stériliser le système. Ensuite, de l'H_2O mQS est passée durant toute une nuit à 2 rpm, dans le but d'éliminer toute trace d'eau de javel.

V.B.1.1 - Première étape : l'adhésion des bactéries

Lors de chaque expérience, trois milieux de culture ont été testés en parallèle : le milieu ZoBell étant le milieu témoin, et les deux autres conditions étant des milieux de culture ZoBell enrichis différemment selon les types d'expérience à réaliser. Les milieux de culture sont reliés au montage juste avant d'injecter les bactéries, en raccordant les tubes à proximité d'un bec électrique pour garder la zone stérile. Le flux est pompé à 0,8 rpm, afin d'alimenter tout le système. Une fois les FC remplies de milieux de culture, le flux est stoppé par l'arrêt de la pompe et les stop-flux clipsés en amont et en aval des FC. Des pièges à bulles (ou Bubbletraps) sont positionnés à la sortie de la pompe, juste avant les FC, afin de piéger les éventuelles bulles d'air qui viendraient détériorer la formation des biofilms.

Les bactéries étudiées sont cultivées dans 8 mL de milieu ZoBell contenu dans des tubes Falcon de 50 mL, à 20°C sous agitation orbitale de 250 rpm pendant trois jours. Elles sont ensuite culottées par centrifugation à 4°C, pendant 10 min à 7000 rpm. Les culots sont rincés à trois reprises avec 5 mL d'EMSF, et finalement repris en EMSF à une DO_{600} = 2. Les stop-flux en amont sont alors ouverts pour injectées les bactéries à l'entrée des FC, à raison de 300 µL de suspension bactérienne par chambre. De la colle silicone (3M) est immédiatement appliquée sur les tubes pour boucher les trous causés par les injections, et les stop-flux sont de nouveau clipsés. Afin de permettre l'adhésion des bactéries sur les lamelles des FC, celles-ci sont retournées. Au bout de 2h, les stop-flux sont ouverts et le flux est rallumé à 0,8 rpm pour éliminer les bactéries non adhérées. Après 15 min de flux, les FC sont observées en contraste de phase en

microscopie confocale à balayage laser DMB6000B (MCBL, Leica Microsystems, Heidelberg, Allemagne), avec un objectif à immersion à huile x63. Six photographies des bactéries adhérées sont prises par chambre : trois en zoom normal (x1), et trois autres en zoom x4.

V.B.1.2 - Deuxième étape : la formation des biofilms

La formation de biofilm est observée au bout de 24h de croissance bactérienne sous flux hydrodynamique de 0,8 rpm de milieux de culture à tester. Le flux est alors interrompu, les stop-flux en amont sont clipsés, et un fluorochrome est très délicatement injecté dans les flowcells pour ne pas détériorer le biofilm, à raison de 250 µL de colorant à 20 µM par chambre à flux. Les clips sont immédiatement refermés et les FC enveloppées de papier aluminium pour les préserver de la lumière. Le fluorochrome utilisé est le SYTO 61 Red (Molecular Probes). C'est un marqueur intercalant fluorescent, qui se fixe à l'ADN en pénétrant à travers toutes les membranes bactériennes et qui permet de marquer les cellules bactériennes (mortes ou vivantes) en rouge. Sa longueur d'onde d'excitation est de $\lambda = 633$ nm et sa longueur d'onde d'émission de $645 < \lambda < 700$ nm.

Après 15 min de coloration à l'obscurité et à température ambiante, les FC sont de nouveau observées au MCBL avec l'objectif à immersion à huile x63. Les prises de vue sont réalisées en surface et dans les différentes couches des biofilms (tous les micromètres), afin d'appréhender la structure du biofilm monospécifique. De 3 à 5 prises de vue sont effectuées par chambre. Le traitement des images s'effectue en plusieurs étapes. La première étape est réalisée sur le logiciel Leica Confocal®. Il permet de traiter les images en reconstituant les biofilms tridimensionnels (3D) grâce aux images prises dans les couches des biofilms (z), et d'avoir différents points de vue de ce biofilm reconstitué (vues de dessus, en coupe, en section, en 3D avec ou sans effet d'ombre). Ensuite, tous les fichiers de chaque prise de vue sont analysés par le logiciel COMSTAT® (Heydorn *et al.*, 2000). Ce dernier permet de déterminer les épaisseurs moyenne et maximale des biofilms, mais aussi, la biomasse bactérienne des biofilms.

V.B.2 - Etude de la formation de biofilm dans différentes conditions de culture

V.B.2.1 - En milieu de culture ZoBell

Les biofilms formés en milieu de culture ZoBell correspondent à la condition témoin de toutes les expériences réalisée en FC, excepté celles avec le diiodométhane qui nécessite un supplément de DSMO pour être solubilisé. Par conséquent, il y a 2 témoins pour les souches *Agrococcus* sp. Ld7 et *Pseudoalteromonas* sp. D41, 3 témoins pour *Pseudomonas* sp. Ld6 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, 4 témoins pour *Zobellia galactanivorans*, et enfin 5 témoins pour *Pseudoalteromonas* sp. Ld20.

V.B.2.2 - En présence d'exsudats d'algues dans le milieu de culture ZoBell

Trois souches isolées de *L. digitata* (*Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20), et trois souches marines de référence (*Pseudoalteromonas* sp. D41, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *Zobellia galactanivorans*) sont utilisées pour réaliser ces expériences, en triplicat.

Les milieux de culture sont préparés juste avant l'injection des bactéries dans les FC. Les exsudats étudiés sont les exsudats sécrétés naturellement par l'algue, et ceux sécrétés après élicitation. Ici, 2 g de plantules de *L. digitata* sont incubés dans 100 mL d'EMSF, et traité selon le **paragraphe I.C.2 p.89**. Les EM+Alg±GG sont alors incorporées au milieu de culture, après filtration à 0,2 µm, à la place du volume d'EMSF normalement utilisé pour préparer le milieu de culture ZoBell (**cf paragraphe II.C.1 p.93)**. Ainsi, 100 mL de chaque milieu sont préparés : un milieu de culture Témoin contenant uniquement du milieu de culture ZoBell, un milieu de culture ZoBell préparé avec de l'EM+Alg, et enfin, un milieu de culture ZoBell préparé avec de l'EM+Alg+GG. L'adhésion est observée à 2h et le biofilm à 24h, selon les protocoles décrits ci-dessous.

V.B.2.3 - En présence de métabolites individuels dans le milieu de culture ZoBell

- *Le mannitol*

Le mannitol est sécrété constitutivement par les algues à leur surface. Il représente une source carbonée nutritive pour les bactéries, et pourrait de ce fait favoriser la formation de biofilm à la surface des thalles de laminaires.
Seules les souches *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 et *Zobellia galactanivorans* sont testées pour cette expérience, en duplicat. Deux concentrations de mannitol sont ajoutées au milieu de culture ZoBell Témoin : 2,5 $\mu g.mL^{-1}$ et 250 $\mu g.mL^{-1}$. L'adhésion est observée à 2h et le biofilm à 24h, selon les protocoles décrits ci-dessus.

- *Le diiodométhane : CH_2I_2*

Le CH_2I_2 serait susceptible d'être un des produits de la défense chimique de l'algue qui permettrait à cette dernière de combattre la prolifération bactérienne à sa surface puisqu'il est le principal composé halogéné volatil (CHV) libéré suite à une élicitation aux GG.
Trois souches sont testées : *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, *Zobellia galactanivorans* et *Pseudoalteromonas* sp. D41. Une seule concentration est testée, d'après des résultats obtenus par Tessier (2005). Le CH_2I_2 n'étant pas soluble dans le milieu ZoBell, il est repris dans du dimethyl sulfoxide (DMSO), et incorporé par la suite dans le milieu de culture ZoBell à une concentration finale de 5 $\mu g.mL^{-1}$, à 0,5 % de DMSO. Du DMSO à 0,5 % est également ajouté au milieu de culture ZoBell témoin pour en vérifier un éventuel effet sur la formation de biofilm. L'adhésion est observée à 2h et le biofilm à 24h, selon les protocoles décrits ci-dessus.

Tous les résultats de cette partie V.2.B sont présentés sous forme d'histogrammes. Ils représentent les valeurs moyennes des valeurs moyennées des 2 à 5 prises de vue par série et par souche bactérienne, de la biomasse ($\mu m^3.\mu m^{-2}$), de l'épaisseur moyenne et maximale (μm) des biofilms formés dans différents type de milieu de culture ZoBell. Lorsqu'il y a significativement une différence de la biomasse ou de l'épaisseur moyenne ou maximale du biofilm, en présence des métabolites par rapport aux témoins d'adhésion en EMSF, elle est représentée par une étoile sur

l'histogramme. Les biofilms formés sont également présentés par reconstitution informatique des images de microscopie confocale à balayage laser prises dans la couche z (épaisseur) du biofilm obtenue. Ainsi, sont représentées les coupes en section, les coupes transversales et les reconstitutions du biofilm en 3D avec effet d'ombrage.

Résultats et Discussion

Chapitre III Nouvelles approches pour la caractérisation de bactéries marines épiphytes isolées de *Laminaria digitata*

Dans ce chapitre, les résultats traitent des bactéries associées aux thalles de *Laminaria digitata*, dans un contexte de développement de nouvelles approches spectrométriques et moléculaires pour étudier la diversité taxonomique et métabolique. Il se compose de cinq parties.

La première concerne l'isolement de souches bactériennes cultivables associées, à différentes périodes de l'année 2006, et échantillonnées au niveau des quatre parties distinctes du thalle de l'algue. Cet isolement a permis de fournir la matière première nécessaire à la réalisation des différents travaux de cette thèse.

La seconde partie concerne le descriptif taxinomique de quelques unes de ces souches isolées, par des méthodes de biologie moléculaire, incluant une douzaine de souches marines de référence principalement isolées de surfaces de matériaux inertes et préstérilisés (verre, inox, téflon). Cette caractérisation permet d'avoir une vue d'ensemble d'une partie de la biodiversité bactérienne associée à *L. digitata*, et ainsi, de la comparer à celle associée à d'autres surfaces organiques ou inorganiques. La microflore bactérienne associée à cette algue est-elle spécifique ?

Ensuite, la troisième partie est consacrée à la mise au point d'outils nouveaux pour caractériser les microflores bactériennes. L'utilisation d'outils spectrométriques en tant que méthodes rapides d'identification bactérienne représente-elle une solution intéressante pour les identifications en routine ? Si oui, avec quelles limitations et contraintes. La spectroscopie permet-elle une caractérisation originale (protéome et métabolome) et rapide au-delà des tests biochimiques classiques ?

Enfin, la quatrième partie est constitué de travaux débutés sur la mise au point de techniques moléculaires pour caractériser la microflore bactérienne totale (bactéries cultivables ou non) associées aux thalles de *L. digitata*. Le but de ces expériences était de réaliser des empreintes moléculaires (principalement avec des bandes de produits d'amplification 16S ou d'ITS) des thalles de *L. digitata* sauvages, et de les comparer à des empreintes de microflores associées à des thalles soumis à des stress abiotiques. Les réactions de défense de l'algue influent-elles sur la biodiversité bactérienne épiphyte ?

Cette première partie de résultats se termine par une discussion générale.

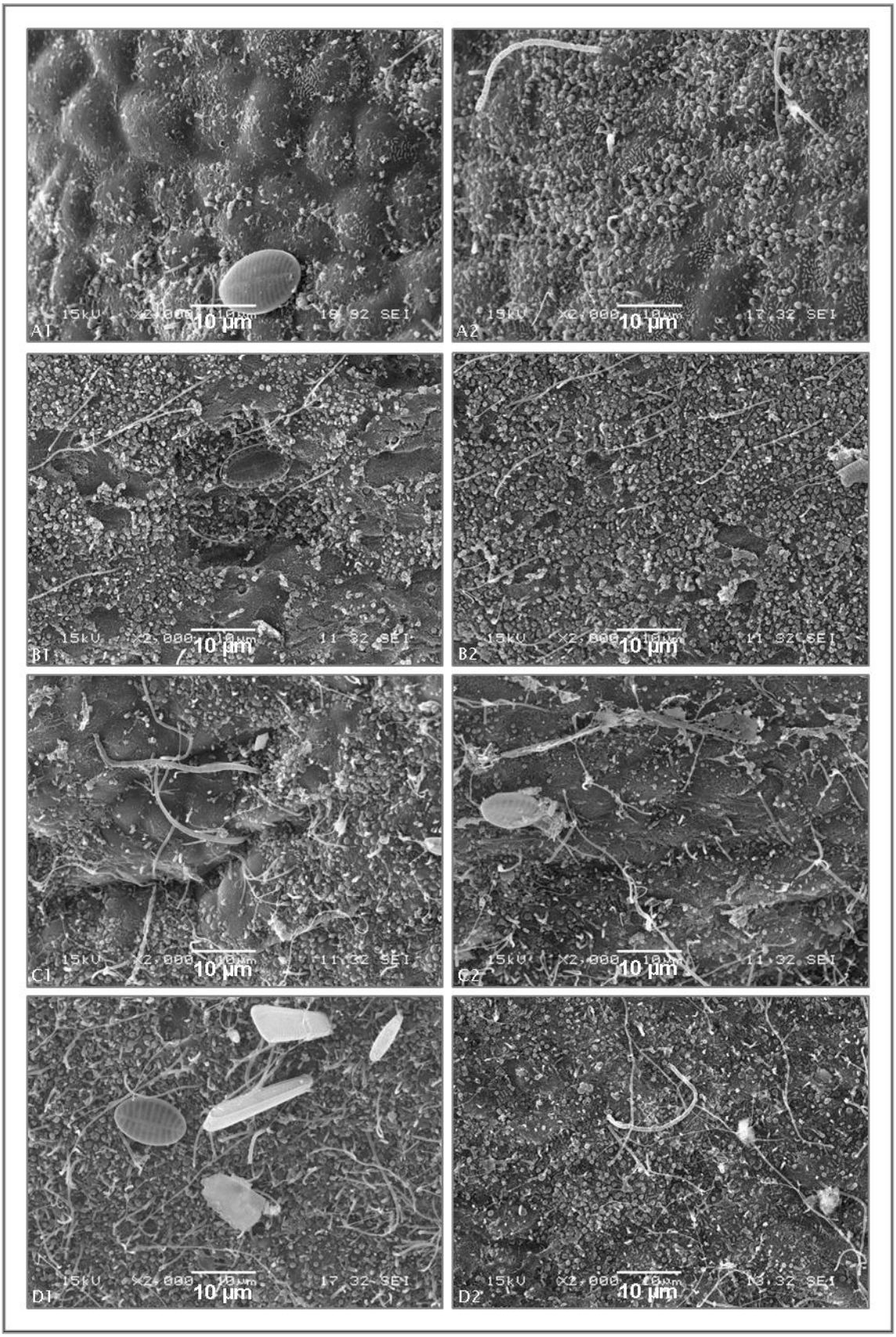


Figure 35 : Observation en microscopie électronique à balayage de la surface des différentes parties d'un thalle de *L. digitata*.

(A1-2) Crampon ; (B1-2) Stipe ; (C1-2) Méristème ; (D1-2) Lame
Images en microscopie électronique à balayage (x 2000)

I - ISOLEMENT ET SUIVI SAISONNIER DES POPULATIONS BACTERIENNES CULTIVABLES

I.A - Observation au MEB de la surface d'un sporophyte de *L. digitata*

L. digitata est une algue brune qui visuellement semble dépourvue de macroorganismes épiphytes. Les observations en MEB (microscopie électronique à balayage) de la surface de l'algue montrent qu'elle est épiphytée par des microorganismes, quelque soit la partie de son thalle **(Figure 35)**. Essentiellement des bactéries en bâtonnet, rondes, formant ou non des chaînes, mais également des diatomées ou des spores de microalgues.

I.B - Isolement des souches bactériennes associées

L'échantillonnage des thalles de *L. digitata* a été effectué durant quatre périodes de l'année 2006, en janvier, mars, mai et octobre, à partir des quatre parties du thalle de la laminaire : le crampon, le stipe, le méristème et la lame. Deux techniques d'isolement ont été utilisées en parallèle : (i) la sonication des morceaux d'algues, puis filtration de l'EMSF, et (ii) la découpe de morceaux préalablement rincés à l'EMSF. Les filtrats et les morceaux ont ensuite été ensemencés sur des boîtes de Petri contenant un milieu de culture ZoBell **(Figure 36)**.

Une différence quantitative d'isolats bactériens a été mise en évidence entre les quatre prélèvements saisonniers, et entre les quatre parties du thalle **(Figure 37)**. En effet, les résultats montrent que la diversité bactérienne triple entre janvier (19 isolats bactériens) et mai 2006 (61 isolats bactériens), mais qu'elle diminue de nouveau pendant la période d'échantillonnage d'octobre (25 isolats bactériens). De plus, il semblerait que le crampon soit la partie du thalle la plus sujette à la diversité bactérienne épiphyte, puisqu'il réunit à lui seul 65 isolats bactériens sur l'ensemble des périodes d'échantillonnage, contre 20 pour le stipe, 29 pour le méristème et 20 également pour la lame âgée.

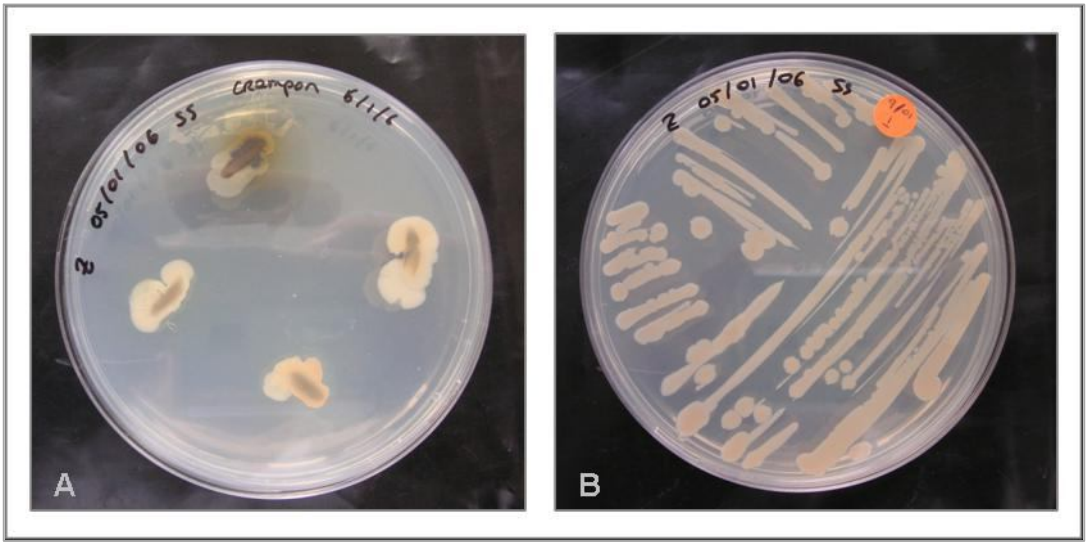


Figure 36 : **Isolement sur boîtes de Petri de bactéries épiphytes de *L. digitata* selon deux techniques.**

(A) Isolement bactérien à partir de morceaux de thalles posés directement sur le milieu de culture ZoBell
(B) Isolement à partir de filtrats de 8 µm de morceaux de thalles soniqués en eau de mer stérile, étalés sur milieu de culture ZoBell

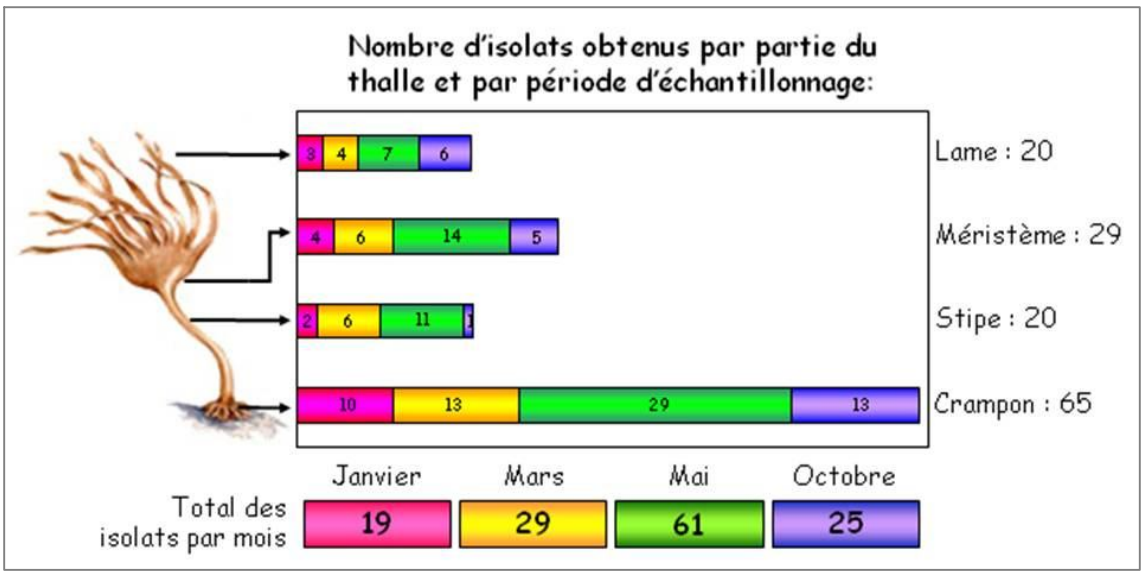


Figure 37 : Représentation graphique de la variation saisonnière des isolats bactériens associés aux différentes parties de sporophytes de *L. digitata.*

Les barres de l'histogramme correspondent aux différentes parties d'un thalle de *L. digitata* (crampon, stipe, méristème et lame âgée). Les chiffres dans les barres correspondent au nombre d'isolats bactériens cultivés, et les couleurs, aux différentes périodes d'échantillonnage (Rose : janvier ; Jaune : Mars ; Vert : mai ; Bleu : octobre). Le tableau correspond au nombre total d'isolats bactériens distincts obtenus sur l'ensemble du thalle par période d'échantillonnage.

II - TAXONOMIE MOLECULAIRE D'UNE SELECTION D'ISOLATS BACTERIENS

Dix-huit souches bactériennes isolées de *L. digitata* et cultivées sur milieu de culture ZoBell ont été sélectionnées pour réaliser la suite du travail. Ces 18 souches ont été nommées de Ld1 à Ld20 (Ld2 et Ld3 n'ont plus été cultivables par la suite et ne seront donc pas présentés dans les résultats). A celles-ci ont été ajoutées 12 souches dites de référence : 2 souches provenant de l'Ifremer de Brest (*Vibrio* sp. D01 et *Pseudoalteromonas* sp. D41), 6 souches du LBCM de Lorient (*Pseudoalteromonas* sp. 3J3, 3J6, 3J6GFP, *Bacillus* sp. 4J6, *Cytophaga* sp. 1M6 et *Paracoccus* sp. 4M6), et enfin, quatre souches de la SBR (*Zobellia galactanivorans* Dsij^T, *Pseudoalteromonas carrageenovora* ATCC 43555^T, *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393 et *Cobetia marina* ATCC 25374^T.

II.A - Amplification du gène de l'ADNr 16S

Dans un premier temps, le gène de l'ARN 16S de toutes ces bactéries a été amplifié par PCR. Différents protocoles ont été testés, et c'est celui basé sur des amplifications effectuées directement sur les cellules bactériennes entières qui a été retenu. A chaque amplification, un témoin négatif (sans bactérie) est réalisé, et les résultats sont observés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % **(Figure 38)**.

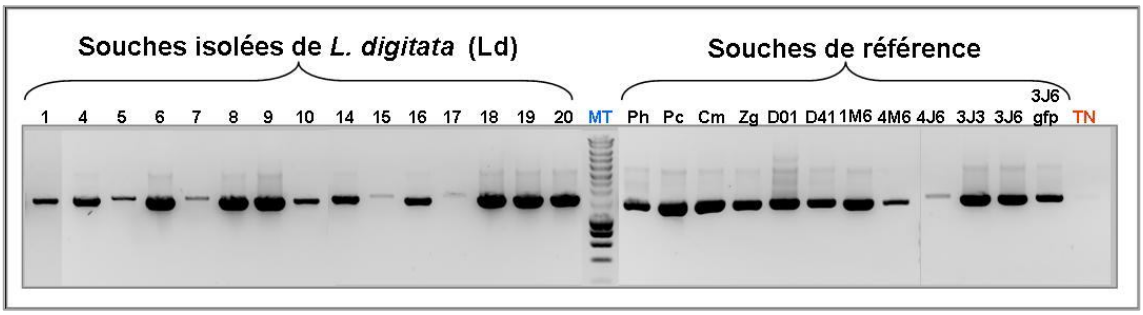


Figure 38 : Produits d'amplification PCR du gène d'ADNr 16S des souches bactériennes isolées de *L. digitata* et de référence, sur gel d'électrophorèse agarose 1 %.

Les souches bactériennes associées à *L. digitata* sont numérotées de 1 à 20 ; **MT** : Marqueur de taille Smart Ladder ; **TN** : Témoin négatif, sans ADN bactérien ; Ph : *P. haloplanktis* ; Pc : *P. carrageenovora* ; Cm : *C. marina* ; Zg : *Z. galactanivorans*.

Une bande d'amplification unique à 1500 pb a été obtenue pour toutes les souches bactériennes. Le TN est exempt d'amplification, signifiant que l'étude phylogénétique peut être correctement réalisée sur les produits PCR 16S non contaminés.

II.B - Etude phylogénétique

Après purification des produits d'amplification PCR, préparation des réactions de séquences, et séquençage sur la plateforme Ouest-Génopôle de la SBR, des séquences d'ADNr 16S de 1370 bases maximum ont été obtenues. L'analyse phylogénétique a permis l'identification des isolats bactériens au niveau du genre (jusqu'à 99 % d'identité au minimum), grâce aux banques de données accessibles sur Genbank. La topologie de l'arbre phylogénétique construit avec la méthode de maximum de vraisemblance (ML) **(Figure 39)** est identique aux deux autres représentations statistiques du jeu de données de séquences, le Neighbour-Joining (NJ) et la parcimonie.

Par conséquent, en se basant sur la caractérisation phylogénétique des isolats bactériens associés à *L. digitata*, 6 des 18 souches sont des bactéries à Gram positif et appartiennent au phylum des *Actinobacteria*. Ainsi, *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14, et *Agrococcus* sp. Ld7, représentent la famille des *Microbacteriaceae*, avec 100 % d'homologie entre les souches bactériennes Ld4 et Ld14. *Arthrobacter* sp. Ld5 et *Kocuria* sp. Ld15 représentent quant à elles la famille des *Micrococcaceae*, et *Rhodococcus* sp. Ld17 appartient à la famille des *Nocardiaceae*. Les bactéries à Gram négatif sont majoritairement représentées par le phylum des *Proteobacteria* (9 isolats bactériens sur 12 appartenant aux bactéries à Gram négatif), les trois autres isolats appartenant au phylum des *Bacteroidetes*. Parmi les *Proteobacteria*, la classe des *Γ-proteobacteria* est représentée par les souches *Pseudomonas* sp. Ld6 (famille des *Pseudomonadaceae*), *Cobetia* sp. Ld8 (famille des *Halomonadaceae*), et *Pseudoalteromonas* sp. Ld1, Ld9, Ld18, Ld19 et Ld20 (famille des *Pseudolteromonadaceae*). La classe des *Alphaproteobacteria* est quant à elle représentée par les souches bactériennes *Paracoccus* sp. Ld10 et Ld16 (famille des *Rhodobacteriaceae*) qui montrent 99 % d'homologie entre elles. Enfin, le phylum des *Bacteroidetes* est représenté par la famille des *Flavobacteriaceae*, avec les isolats

bactériens *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13 qui ont 100 % d'homologie entre eux, et *Cellulophaga* sp. Ld12.

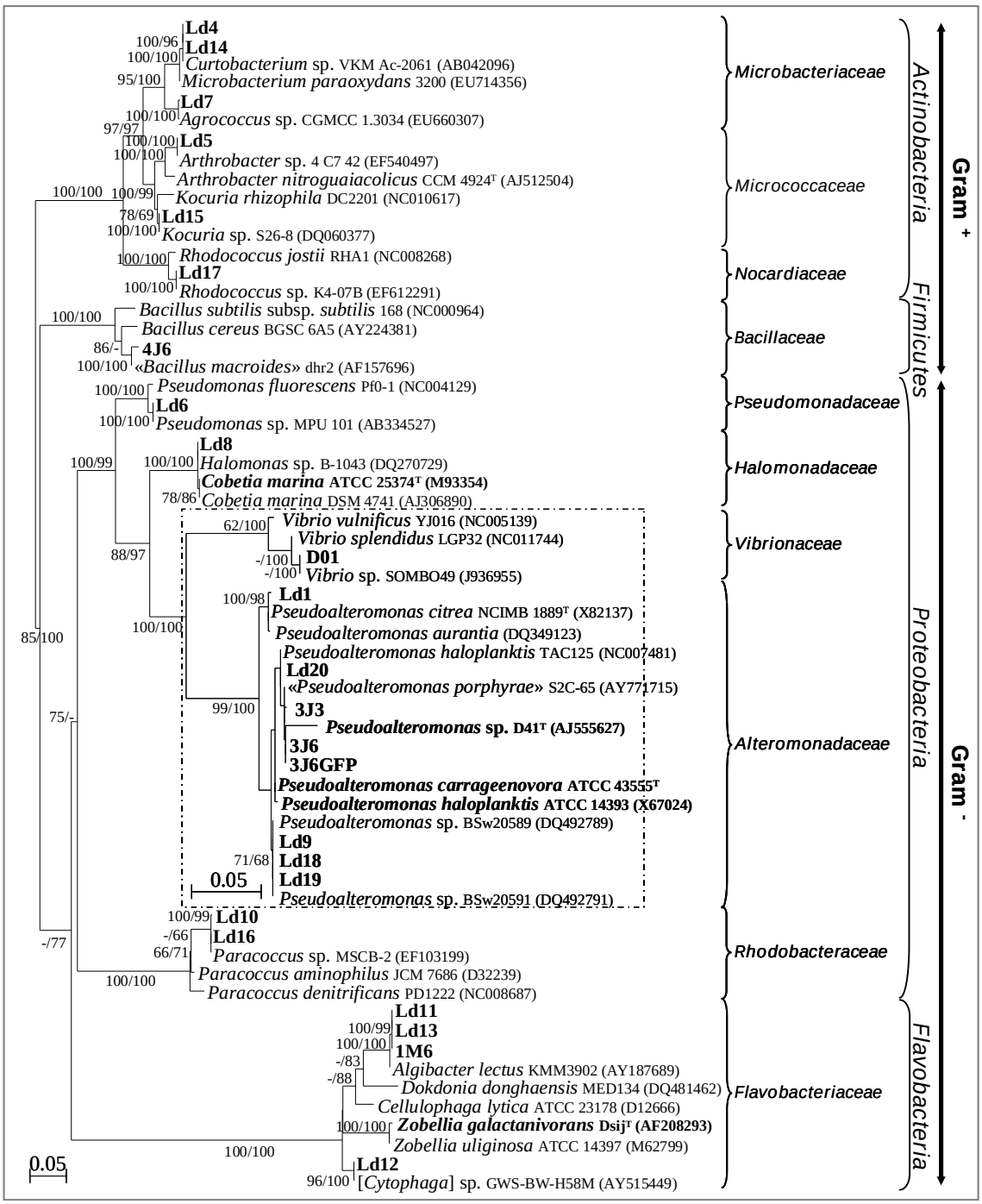


Figure 39 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode de maximum de vraisemblance montrant les liens phylogénétiques entre 68 séquences basées sur les gènes d'ADNr 16S des souches bactériennes associées à *L. digitata* de référence et des données additionnelles.

Les arbres phylogénétiques NJ et PHYML ont été construits à partir de 948 sites nucléotidiques. Si supérieures à 65, les valeurs de bootstrap (100 réplicats) sont fournies par les analyses NJ (première valeur) et PHYML (deuxième valeur). Le cadre en pointillé correspond à l'élargissement du sous-arbre des *Vibrionaceae* et des *Pseudoalteromonadaceae*.

Le genre des 12 souches exogènes de référence ont été identifiées, excepté pour *Cytophaga* sp. 1M6. J'ai confirmé que la bactérie à Gram positif *Bacillus* sp. 4J6 appartient bien à la famille des *Bacillaceae* (phylum des *Firmicutes*). Il en est de même pour les bactéries à Gram négatif. Ainsi, *Vibrio* sp. D01 appartient bien au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des *γ-proteobacteria* et à la famille des *Vibrionaceae*. Les *Pseudoalteromonas* sp. 3J3, 3J6, 3J6GFP et *P. carrageenovora* ATCC 43555^T sont bien des *Pseudoalteromonas* sp. avec 97 % d'identité entre *P. carrageenovora* et 3J6, et 100 % entre 3J6 et 3J6GFP (son transformant exprimant la protéine fluorescente GFP). Enfin, la souche *Cytophaga* sp. 1M6 appartenant au phylum des *Bacteroidetes* et à la famille des *Flavobacteriaceae*, présente 100 % d'identité avec les souches *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13 isolées de *L. digitata*, ce qui signifie que *Cytophaga* sp. 1M6 est en fait une *Algibacter* sp. 1M6.

Les données additionnelles présentées dans l'arbre phylogénétique sont extraites du site internet NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites /entrez). Celles-ci incluent la séquence du gène d'ADNr 16S de *Cobetia marina* ATCC25374^T (GenBank M93354, classe des *γ-proteobacteria* et famille des *Halomonadaceae*) qui présente 99 % d'identité avec *Cobetia* sp. Ld8. Celle de *Pseudoalteromonas* sp. D41 (GenBank AJ555627, classe des *γ-proteobacteria* et famille des *Pseudoalteromonadaceae*) présente 98 % d'identité avec *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. La séquence de *P. haloplanktis* ATCC 14393 (GenBank X67024, classe des *γ-proteobacteria*, famille des *Pseudoalteromonadaceae*) présente quant à elle 97 % d'identité avec la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Enfin, celle de *Zobellia galactanivorans* DsijT (GenBank AF208293, phylum des *Bacteroidetes* et famille des *Flavobacteriaceae*).

Toutes les souches isolées de *L. digitata* et identifiées par leur ADNr 16S, ainsi que les souches marines de référence sont listées dans un tableau récapitulatif en **Annexe 1 p.231**. Une colonne est consacrée à leur lieu d'isolement (partie du thalle pour celles isolées de *L. digitata*, et type de surface pour les bactéries marines de référence).

III - IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR DES OUTILS SPECTROSCOPIQUES

III.A - Spectrométrie de masse MALDI-ToF

Toutes les expériences réalisées en spectrométrie de masse MALDI-ToF ont été effectuées sur 29 souches bactériennes : 17 isolats bactériens de *L. digitata* (*Pseudoalteromonas* sp. Ld1 n'a pas été utilisé à cause d'un problème de viabilité à long terme sur boîte) et les 12 souches bactériennes de référence. Toutes ces souches bactériennes ont été cultivées en boîte de Petri pendant environ 7 jours à 14°C (± 1°C) sur du milieu de culture riche, le ZoBell-Agar, et sur du milieu de culture pauvre, le VNSS.

III.A.1 - Réalisation et validation de la banque de données spectrales

La base de données a été réalisée sur l'ensemble des 29 souches bactériennes cultivées sur du milieu riche. Pour cela, 16 spectres individuels par souches bactériennes ont été acquis, soit 464 spectres individuels pour l'ensemble des souches étudiées. Au final, la base de données est constituée de 29 spectres moyen, appelés « spectres consensus », résultant de la moyenne des 16 spectres individuels acquis par souche, grâce au logiciel Biotyper (Bruker).

Afin de vérifier la solidité de la banque de données, les 464 spectres individuels ont été comparés à leurs spectres consensus de la base de données. Lorsque le résultat de la comparaison (exprimé par un score chiffré) est supérieur à 50, il existe suffisamment de similitudes entre les spectres individuels comparés et le spectre consensus identifié pour considérer que les souches sont taxonomiquement proches **(Tableau 1, 1er bloc)**.

Dans tous les cas, les résultats obtenus ont montré que le spectre consensus d'une souche bactérienne sélectionné par l'ACP comme le meilleur identifiant des spectres individuels de cette même souche, corrèle bien avec ses propres spectres individuels (score supérieur à 50). Par exemple, la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 a obtenu un score maximum moyenné de 410, lors de la comparaison de ses spectres

individuels avec son spectre consensus **(Tableau 1, 1er bloc)**. Dans les paramètres de contrôle Biotyper, il a été demandé jusqu'à 5 spectres consensus pouvant être identifié. Par conséquent, dans mon étude, il a été identifié jusqu'à 3 spectres consensus au maximum pour les spectres individuels d'une seule souche bactérienne (ex : les spectres consensus de *Paracoccus* sp. Ld10, *Paracoccus* sp. 4M6 et *Paracoccus* sp. Ld16 ont été corrélés aux spectres individuels de *Paracoccus* sp. Ld10, avec des scores moyennés respectifs de 275, 220 et 14). Par conséquent, la bonne identification obtenue avec des scores supérieurs à 50 entre les spectres individuels et le spectre consensus correspondant, indique la reproductibilité de l'expérience, et valide ainsi la base de données. Lorsque les scores des spectres consensus identifiés sont inférieurs à 50, ceci signifie que les souches bactériennes sont taxonomiquement proches l'une de l'autre (ex : *Paracoccus* sp. Ld10 et *Paracoccus* sp. Ld16, avec des scores d'identifications moyennés de 14 et 25), comme indiqué par les résultats des analyses d'ADNr 16S **(Figure 39)**.

Au sein des bactéries à Gram positif, les souches *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14 ont obtenu des scores de 264 et 122 respectivement, suggérant fortement qu'elles sont conspécifiques. A l'inverse, les bactéries à Gram positif *Arthrobacter* sp. Ld5, *Agrococcus* sp. Ld7 et *Kocuria* sp. Ld15 n'ont pas de spectre consensus identifié autre que leurs propres spectres individuels, avec des scores de 237, 166 et 309 respectivement. Ceci confirme donc que ces trois souches bactériennes appartiennent à des genres distincts au sein de la famille des *Micrococcaceae*. De même, la souche *Rhodococcus* sp. Ld17, appartenant à la famille des *Nocardiaceae*, et la souche *Bacillus* sp. 4J6, appartenant à la classe des *Bacilli*, n'ont aucun autre spectre consensus identifié en dehors de leur propre spectre consensus, avec des scores respectifs de 211 et 329.

Au sein des bactéries à Gram négatif, les *α-proteobacteria* 4M6, Ld10 et Ld16 qui sont toutes les trois des *Paracoccus*, ont obtenu les plus hauts scores d'identification entre 4M6 et Ld10 (entre 220 et 248), ce qui suggère que ces deux souches bactériennes sont conspécifiques. La souche *Paracoccus* sp. Ld16 a également obtenu des scores d'identification et surtout, inférieures à 50 (entre 14 et 30), indiquant que cette souche est une autre espèce de *Paracoccus* que 4M6 et Ld10, mais qu'elles sont cependant très proches. Les *γ-proteobacteria* incluent le genre bactérien *Pseudoalteromonas*, qui apparaît comme un groupe assez hétérogène. Ainsi, les souches *Pseudoalteromonas* sp.

Ld9, Ld18 et Ld19 forment un sous-groupe séparé des autres *Pseudoalteromonas*, la souche Ld18 étant une autre espèce très proche de Ld9 et Ld19 (score d'identification de 4 et 15) qui sont quant à elles très similaires. *P. haloplanktis* ATCC 14393, et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et 3J6GFP, semblent former un autre sous-groupe, *P. carrageenovora* ATCC 43555^{T} étant corrélé une seule fois avec la souche 3J6GFP avec un score insignifiant de 7. Enfin, les souches bactériennes *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, 3J3 et D41, qui ont un score d'identification très élevé entre leurs spectres individuels et leur spectre consensus (respectivement 296, 410 et 325), ne corrèle avec aucune autre souche bactérienne identifiée. Les souches bactériennes *Vibrio* sp. D01 (propre score d'identification de 236) et *Pseudomonas* sp. Ld6 (propre score d'identification de 214), n'ont également aucun autre spectre consensus identifié que le leur, comme attendu. Les souches *Cobetia* sp. Ld8 et *C. marina* ATCC 25374^{T}, appartenant à la famille des *Halomonadaceae*, sont significativement différentes, avec un score d'identification entre elles de 3. Pour finir, dans le groupe des *Flavobacteriaceae*, les souches bactériennes Ld11, Ld13 et 1M6, appartenant aux *Algibacter* sp., montrent de hauts scores d'identification entre elles (entre 145 et 297), suggérant que ces souches sont conspécifiques. En revanche, les souches *Cellulophaga* sp. Ld12 et Z. *galactanivorans* Dsij^{T} n'ont aucun autre spectre consensus identifié dans le phylum des *Bacteroidetes* que leur propre spectre consensus (respectivement 179 et 303).

III.A.2 - Acquisition de nouveaux spectres sur milieu riche

Quatre spectres par souches bactériennes cultivées sur du milieu de culture ZoBell ont été acquis ultérieurement afin d'ajouter un nouveau paramètre de reproductibilité. Ces 116 nouveaux spectres individuels (4 spectres individuels x 29 souches) ont été comparés à la base de données et sont également présentés dans le **Tableau 1, 2nd bloc**.

Dans tous les cas, à l'exception des souches *Pseudoalteromonas* sp. Ld18 et Ld19, les nouveaux spectres individuels ont bien été corrélés à leur spectre consensus de la base de données, avec des scores au-dessus de 50.

Tableau 1 : Profilage MALDI-ToF de macromolécules (essentiellement des protéines ribosomal) d'une masse comprise entre 2000 et 18000 Da, à partir de souches bactériennes marines cultivées

Zobell database (16 replicates)

Matrix ZoBell strains	Ld4		Ld5	Ld6	Ld7	Ld8		Ld9		Ld10			Ld11			Ld12	Ld13			Ld14		Ld15	Ld16			Ld17	Ld19	
Matching ZoBell standards	Ld4	Ld14	Ld5	Ld6	Ld7	Ld8	C.m.	Ld9	Ld19	Ld10	4M6	Ld16	Ld11	Ld13	1M6	Ld12	Ld13	Ld11	1M6	Ld14	Ld4	Ld15	Ld16	Ld10	4M6	Ld17	Ld19	Ld9
% times ranking first	37,5	62,5	100	100	100	100	0	100	0	87,5	12,5	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	0	100	100	0
Average Biotyper score	**216**	**264**	**237**	**214**	**166**	**345**	**3**	**234**	**101**	**275**	**220**	**14**	**297**	**171**	**147**	**179**	**234**	**151**	**147**	**399**	**122**	**309**	**308**	**25**	**30**	**211**	**91**	**40**

Matrix ZoBell strains	Ld18		Ld20	P.h.			P.c.		C.m.		Z.g.	1M6			4M6			4J6	3J3	3J6			3J6 GFP			D01	D41
Matching ZoBell standards	Ld18	Ld9	Ld19	Ld20	P.h.	3J6gfp	3J6	P.c.	3J6gfp	C.m.	Ld8	Z.g.	1M6	Ld13	Ld11	4M6	Ld10	Ld16	4J6	3J3	3J6	3J6gfp	P.h.	3J6gfp	3J6	P.h.	D01	D41
% times ranking first	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	0	100	93,7	6,3	0	81,2	18,8	0	100	100	33,3	66,7	0	93,7	0	6,3	100	100
Average Biotyper score	**172**	**15**	**4**	**296**	**319**	**103**	**3**	**377**	**7**	**138**	**3**	**303**	**262**	**178**	**145**	**280**	**248**	**21**	**329**	**410**	**113**	**142**	**32**	**401**	**89**	**92**	**236**	**325**

Zobell (4 replicates)

Matrix ZoBell strains	Ld4		Ld5	Ld6	Ld7	Ld8	Ld9		Ld10		Ld11			Ld12	Ld13			Ld14		Ld15	Ld16	Ld17	Ld19			Ld18	
Matching ZoBell standards	Ld4	Ld14	Ld5	Ld6	Ld7	Ld8	Ld9	Ld19	Ld10	4M6	Ld11	Ld13	1M6	Ld12	Ld13	Ld11	1M6	Ld14	Ld4	Ld15	Ld16	Ld17	Ld9	Ld19	Ld18	Ld9	Ld19
% times ranking first	0	100	100	100	100	100	50	50	33,3	66,7	25	25	50	100	25	75	0	100	0	100	100	100	100	0	0	100	0
Average Biotyper score	**58**	**272**	**134**	**263**	**261**	**274**	**60**	**68**	**148**	**159**	**169**	**158**	**169**	**68**	**120**	**112**	**98**	**272**	**68**	**224**	**113**	**54**	**62**	**39**	**9**	**56**	**39**

Matrix ZoBell strains	P.h.		P.c.		C.m.		Z.g.	1M6			4M6		4J6	3J3	3J6			3J6 GFP			D01	D41
Matching ZoBell standards	P.h.	3J6gfp	P.c.	3J6gfp	C.m.	Ld8	Z.g.	1M6	Ld13	Ld11	4M6	Ld10	4J6	3J3	3J6	P.h.	3J6gfp	3J6gfp	3J6	P.h.	D01	D41
% times ranking first	100	0	100	0	100	0	100	0	75	25	50	50	100	100	50	0	50	100	0	0	100	100
Average Biotyper score	**212**	**69**	**267**	**13**	**109**	**42**	**166**	**84**	**116**	**105**	**68**	**76**	**118**	**150**	**201**	**55**	**204**	**247**	**108**	**92**	**172**	**143**

VNSS (4 replicates)

Matrix ZoBell strains	Ld4		Ld5	Ld6	Ld7	Ld8		Ld9			Ld10			Ld11			Ld12	Ld13			Ld14		Ld15	Ld16		Ld17	Ld19	
Matching VNSS standards	Ld4	Ld14	Ld5	Ld6	Ld7	Ld8	C.m.	Ld9	Ld19	Ld18	4M6	Ld10	Ld16	Ld11	Ld13	1M6	Ld12	Ld13	Ld11	1M6	Ld14	Ld4	Ld15	Ld16	4M6	Ld17	Ld19	Ld9
% times ranking first	0	100	100	100	100	100	0	100	0	0	50	0	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	100	0	100
Average Biotyper score	**147**	**399**	**79**	**84**	**230**	**240**	**5**	**122**	**74**	**6**	**194**	**174**	**19**	**166**	**142**	**114**	**74**	**91**	**68**	**56**	**488**	**169**	**210**	**144**	**17**	**100**	**80**	**125**

Matrix ZoBell strains	Ld18		Ld20	P.h.			P.c.		C.m.	Z.g.	1M6			4M6		4J6	3J3	3J6			3J6gfp			D01	D41
Matching VNSS standards	Ld18	Ld9	Ld19	Ld20	P.h.	3J6gfp	3J6	P.c.	3J6gfp	C.m.	Z.g.	1M6	Ld13	Ld11	4M6	Ld10	4J6	3J3	3J6	3J6gfp	P.h.	3J6	P.h.	3J6gfp	D01	D41
% times ranking first	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	0	75	25	25	75	100	100	0	100	0	0	0	100	100	100
Average Biotyper score	**137**	**30**	**25**	**209**	**255**	**102**	**14**	**407**	**5**	**98**	**73**	**65**	**101**	**82**	**123**	**129**	**123**	**363**	**82**	**296**	**61**	**71**	**61**	**296**	**67**	**237**

(1er bloc) Comparaison des 464 spectres individuels avec la base de données de bactéries cultivées sur milieu ZoBell
(2nd bloc) Série de 4 nouveaux spectres individuels par souches bactériennes cultivées sur milieu ZoBell et comparée à la base de données.
(3ème bloc) Série de 4 spectres individuels par souches bactériennes cultivées sur milieu VNSS et comparée à la base de données.
Ligne 1: 16 spectres individuels x 29 souches (représenté par le nom de la souche), *i.e.* 464 spectres individuels, lesquels sont comparés individuellement aux 29 spectres consensus de la base de données (obtenues avec le logiciel Biotyper en moyennant les 16 spectres réplicats). Ligne 2: résultats de la comparaison des 464 spectres individuels avec la base de données, indiquant jusqu'à 3 des meilleurs spectres consensus identifiés. Ligne 3: les entrées (en pourcentage) représentent le nombre de fois où le spectre consensus identifié sort en 1er. Ligne 4: moyenne du score basée sur les similitudes spectrales de chacun des 16 spectres individuels (réplicats) avec la base de données. Les scores > 50 signifient que les souches bactériennes sont conspécifiques et < 50 qu'elles sont congénériques.

III.A.3 - Acquisition de spectres sur milieu minimum

Enfin, quatre nouveaux spectres par souches bactériennes cultivées sur du milieu de culture VNSS ont été acquis et comparés à la base de données créée à partir de culture sur ZoBell **(Tableau 1, 3ème bloc)**.

Là encore, les 116 spectres individuels obtenus sur culture VNSS ont bien été corrélés à leur spectre consensus, avec des scores comparables à ceux obtenus lors de la 1ère analyse **(Tableau 1, 1er bloc)**, et toujours supérieurs à 50.

III.B - La Résonance Magnétique Nucléaire

Les expériences réalisées en RMN ont été effectuées sur toutes les souches bactériennes, soit 30 au total. Ces souches sont cultivées sur milieu solide gélosé ZoBell ou VNSS, et pendant 6, 10 ou 18 jours à 14°C (± 1°C). Les souches ont été analysées sous forme d'extraits (en RMN en solution) et en conservant leur intégrité cellulaire (en RMN du solide, *i.e.* HR-MAS).

III.B.1 - Similitudes dans le profilage métabolique en RMN ^{1}H HR-MAS

Après normalisation, la superposition des spectres ^{1}H HR-MAS de bactéries entières de cultures de 6 à 10 jours sur du milieu ZoBell montrent clairement des groupes bactériens délimités, partageant des similitudes dans leur profil proton situé dans la fenêtre de 0,5 à 4,5 ppm.

Quelques bactéries à Gram négatif comme les *Bacteroidetes* **(Figure 40C)** et à Gram positif comme les *Actinobacteria* et les *Firmicutes* (classe des *Bacilli*) **(Figure 40D)** possèdent un profil spectral caractéristique. Les *α-proteobacteria* de la classe des *Paracoccus* (*Paracoccus* sp. Ld10, Ld16 et 4M6) forment également un groupe homogène **(Figure 40B)**. A l'inverse, le genre *Pseudoalteromonas* est un peu moins homogène en apparence forme un groupe avec des ressemblances spectrales plus ou moins fortes **(Figure 40A)**.

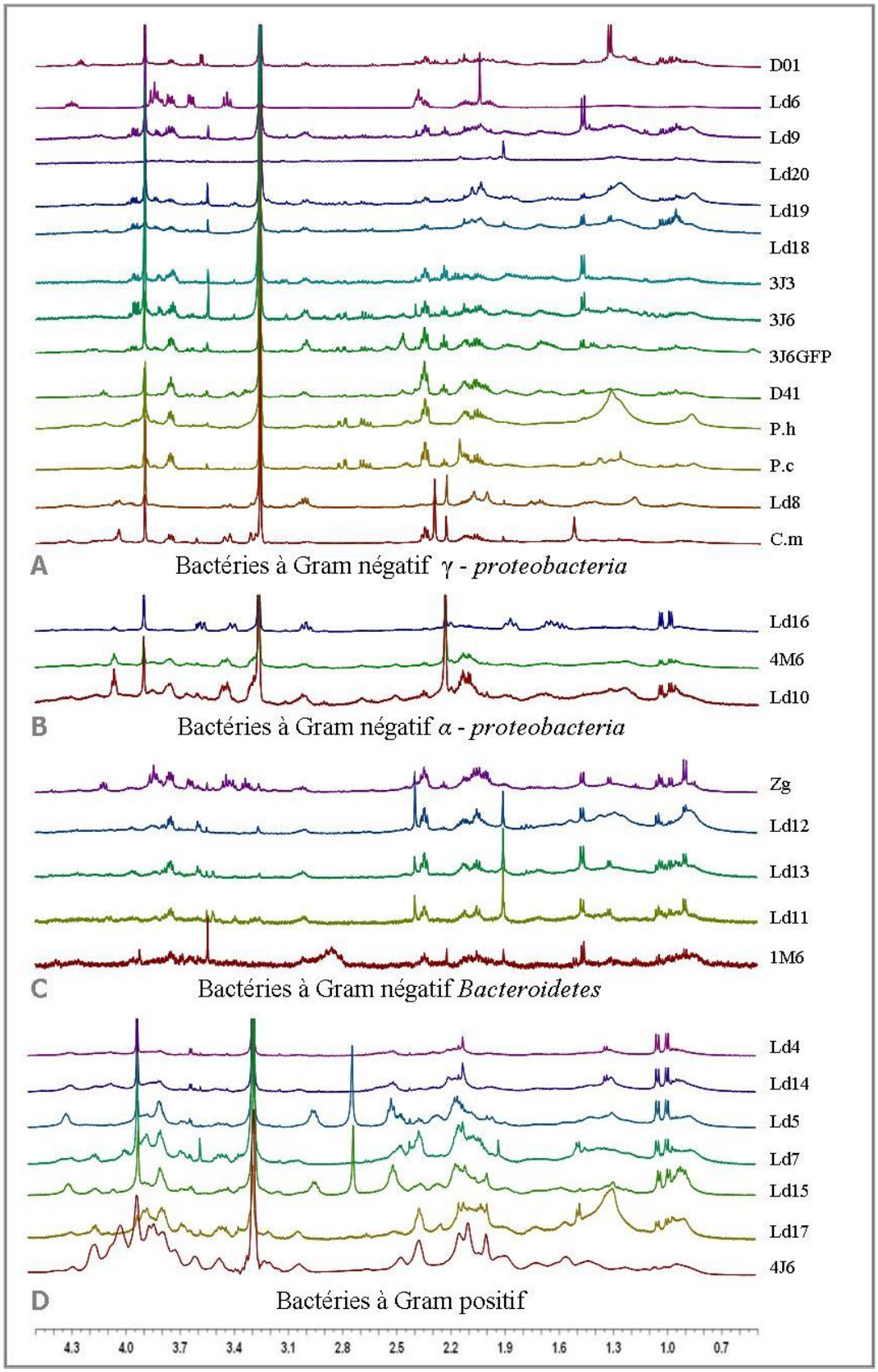


Figure 40 : Superposition des spectres de RMN ^{1}H HR-MAS (δ = 0,5 – 4,5 ppm) de souches bactériennes isolées de thalles de *L. digitata* ou d'échantillons environnementaux, classés selon leur appartenance phylogénétique.

(A) Bactéries à Gram⁻, classe des *Γ-proteobacteria* avec la famille des *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* sp. Ld6), *Halomonadaceae* (*Cobetia* sp. C.m and Ld8), *Pseudoalteromonadaceae* (3J6, 3J6GFP, P.c, P.h, D41, 3J3, Ld20, Ld19, Ld18, Ld9, Ld1, toutes du genre des *Pseudoalteromonas*) et *Vibrionaceae* (*Vibrio* sp. D01).
(B) Bactéries à Gram⁻, classe des *Alphaproteobacteria*, avec la famille des *Rhodobacteraceae* (Paracoccus sp. Ld16, Ld10, 4M6.
(C) Bactéries à Gram⁻ phylum *Bacteroidetes.* Family is *Flavobacteriaceae* (*Algibacter* sp. Ld11, Ld13 and 1M6; *Cytophaga* sp. Ld12 and *Zobellia galactanivorans* Zg).
(D) Bactéries à Gram⁺, classe des *Actinobacteria* avec la famille des *Microbacteriaceae* (*Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14 ; *Agrococcus* sp. Ld7), des *Micrococcaceae* (*Arthrobacter* sp. Ld5; *Kocuria* sp. Ld15 et des *Nocardiaceae* (*Rhodococcus* sp. Ld17) ; et classe des *Firmicutes* avec uniquement la famille des *Bacillus* (*Bacillus* sp. 4J6).

L'ACP effectuée sur les signaux de RMN par le logiciel AMIX sur tous les spectres normalisés peut discriminer deux souches différentes à un âge donné **(Figure 41A)**. L'ACP conclut également que les différences de profil spectral entre les différents âges de cultures d'une même souche bactérienne, ainsi qu'entre les deux milieux de culture ne sont pas significatives, malgré les changements qualitatifs et quantitatifs visuels important des profils spectraux de nombreuses souches **(Figure 41B et C)**.

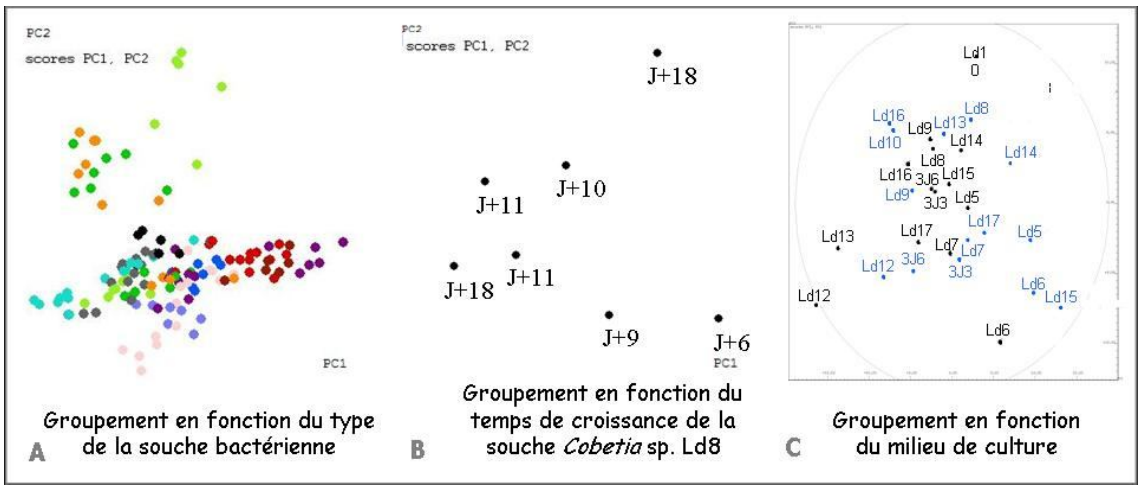


Figure 41 : ACP avec le logiciel AMIX (Bruker) sur les spectres RMN ^{1}H HR-MAS normalisés de cultures bactériennes sur milieu de culture ZoBell – Agar.

(A) les points de couleurs représentent des souches bactériennes d'âges de culture différents et en duplicat voire en triplicat (1 groupe = 1 couleur = 1 souche bactérienne)
(B) les points correspondent aux différents âges de culture de la souche bactérienne *Cobetia* sp. Ld8 isolée de *L. digitata* (6, 9, 10, 11 et 18 jours)
(C) les points noir correspondent aux souches cultivées sur milieu ZoBell, et les points bleu les souches cultivées sur milieu VNSS
Les groupes sont significativement différents en *(A)*, ce qui signifie que la taxonomie est impliquée dans la ressemblance statistique des signatures spectrales, et globalement non significativement différents en *(B)* et *(C)* quand l'ACP compare des spectres d'âge et de milieu de culture différents.

Seize souches bactériennes ont été cultivées sur les milieux de culture ZoBell et VNSS, puis ont été analysées en RMN. Quatre paires de spectres ne montrent pas de différences spectrales qualitatives, telle que la souche *Pseudomonas* sp. Ld6 **(Figure 42B)**. Six paires montrent au contraire des différences majeures, voire même des spectres totalement différents, comme la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 **(Figure 42C)**. Enfin, les six paires restantes présentent quant à elles de fortes ressemblances spectrales, avec très peu de différences visuelles dans l'expression d'un ou plusieurs métabolites mineurs, telle que la souche *Arthrobacter* sp. Ld5 **(Figure 42A)**. L'expression de plusieurs acides amines aliphatiques et de glycine bétaïne peut arriver dans certains cas, uniquement chez les souches bactériennes cultivées sur du milieu VNSS, et dans d'autres cas, uniquement sur milieu ZoBell. D'autres métabolites présents dans les cultures peuvent être spécifiques au milieu de culture utilisé. La proline est présente dans trois spectres obtenus avec des souches bactériennes cultivées sur milieu VNSS, alors qu'elle est absente chez ces mêmes souches cultivées sur milieu ZoBell. A l'inverse, des ions d'acétate et de succinate apparaissent chez des souches cultivées sur milieu ZoBell, et pas chez les mêmes souches cultivées sur milieu VNSS.

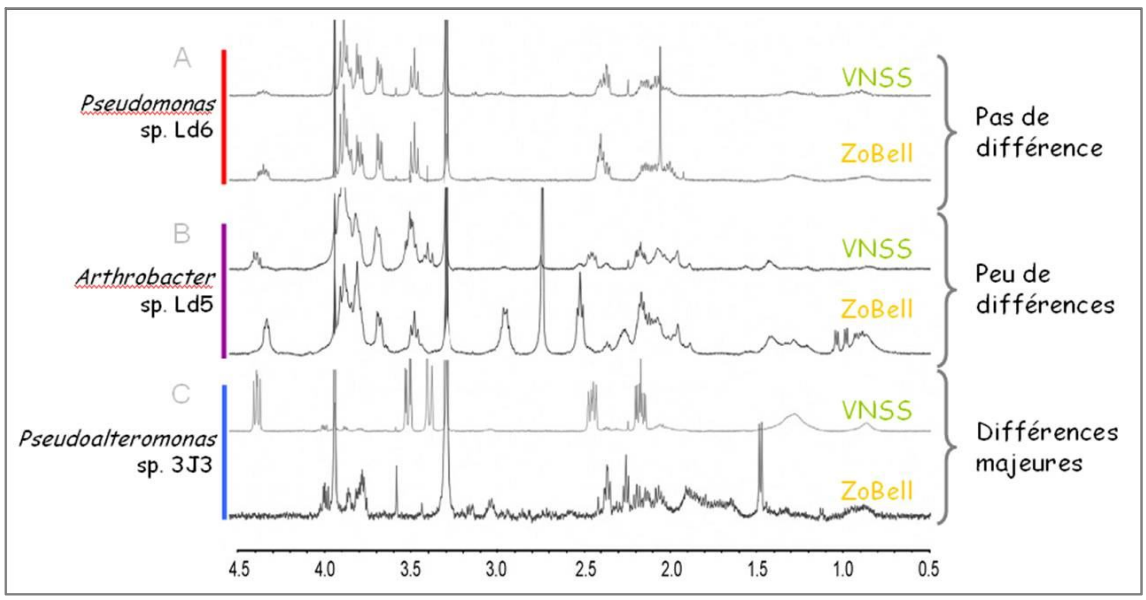


Figure 42 : Comparaison de spectres RMN ^{1}H HR-MAS de souches bactériennes cultivées sur milieux de culture ZoBell et VNSS.

(A) pas de différence visuelle entre les spectres *Pseudomonas* sp. Ld6
(B) peu de différences visuelles entre les spectres d'*Arthrobacter* sp. Ld5
(C) spectres de *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 totalement différents entre les deux milieux de culture ZoBell et VNSS.

III.B.2 - Identification de composés par RMN en solution

Des échantillons en solution dans le D_2O de toutes les bactéries ont été analysés en RMN et ont prouvé la présence de métabolites hautement polaires.

Toutes les molécules identifiées ainsi que leurs déplacements chimiques indicatifs sont listées dans le **Tableau 2**. L'attribution des signaux de la plupart des métabolites a été réalisée en comparant les spectres avec les spectres de molécules pures de la base de données du service de RMN de l'UBO à Brest, et en tenant compte d'éventuelles différences dues au pH et à la température. La base de données en ligne http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/query_metab.php du BMRB (Biological Magnetic Resonance Databank) et des données recueillies sur des publications individuelles ont permis de compléter les attributions pour quelques métabolites. Leur présence et abondance peuvent être corrélées avec la détermination taxinomique des bactéries (ADNr 16S), d'où l'ordre d'apparition des souches bactériennes dans le tableau, triés selon l'arbre phylogénétique **(Figure 39)**. Les métabolites dominants étant surlignés en noir et les mineurs en gris.

Ainsi, plusieurs genres représentés par quelques souches bactériennes sont homogènes, c'est-à-dire que tous les composés présents dans le spectre le plus pauvre du genre sont trouvés dans toutes les souches congénériques. C'est le cas pour les trois genres *Curtobacterium*, *Paracoccus* et *Algibacter*. D'autres genres ont une distribution de métabolites un peu moins cohérente, comme pour les *Cobetia* et les *Pseudoalteromonas*, avec parfois, seulement la moitié des composés qui est partagée entre les membres du même genre.

Au sein du genre *Pseudoalteromonas*, les souches bactériennes Ld9, Ld18 et Ld19 forment un groupe homogène (comme dans l'analyse en MALDI-ToF – MS). Ceci est également observé avec les souches 3J6, 3J6GFP, 3J3, D41, *P. carrageenovora* et *P. haloplanktis*, qui forment un autre sous-groupe parmi les *Pseudoalteromonas* (comme dans l'arbre phylogénétique).

Par souci de clarté, les molécules sont organisées en trois catégories dans le tableau : les molécules facilement ionisables (sels) et les composés aminés, les carbohydrates simples (sources carbone), et enfin, les acides aminés non-cycliques et cyclisés.

Tableau 2 : Identification de composés à partir de spectres de souches bactériennes en RMN ^{1}H HR-MAS et en solution, avec une distribution en accord avec la phylogénie du 16S

METABOLITE	d proton (ppm)	Ld4	Ld14	Ld7	Ld5	Ld15	Ld17	4J6	Ld6	Ld8	C.m	D01	Ld1	P.c	Ld20	3J3	P.h	3J6	3J6 gfp	Ld9	Ld18	Ld19	4M6	Ld10	Ld16	Ld11	Ld13	lM6	Z.g	Ld12
Formate	8,45s	▒		▒						▒		▒				▒		▒		▒						▒	▒	▒		▒
Acetate	1,91s			▒						▒	▒				■						▒	▒				■	■	■		■
Succinate	2,41s			▒												▒										■	■	■	▒	■
Lactate	1,31d											▒	▒		▒			▒	▒		▒	▒				▒	▒	▒	▒	▒
Acetaldehyde	2,22s										▒	▒	▒										■	■	▒					▒
a - b D - glucose	5,23d 4,64d							▒																						▒
Mannitol	3,55 to 3,80m																												▒	
Glycine	3,54s	▒		▒			▒							▒		▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒				▒	▒	▒	▒	▒
Alanine	1,47d			▒			▒					▒	▒	▒	▒	■	▒	▒	▒	▒	▒	▒				■	■	■	▒	▒
Leucine	0,96t			▒			▒		▒			▒	▒			▒		▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒		▒	▒	▒		▒
Isoleucine	1,04d 1,00d 0,94t			▒			▒		▒			▒	▒			▒		▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒		▒	▒	▒		▒
Valine	1,05d 1,04d	■	■	▒	▒		▒		▒	▒						▒		▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒		▒	▒	▒	▒	▒
Threonine	1,32d 3,58d 4,25m	▒	▒																											
Glutamate	3,75t 2,34m 2,05m			▒			▒				▒	▒		■		▒		▒	▒	▒	▒	▒				▒	▒		■	▒
Glutamine	3,75t 2,43m 2,13m			▒			▒	▒			▒	▒				▒	▒	▒	▒	▒						▒	▒			▒
Lysine	3,01t 3,74t 1,90m			▒			▒					▒		▒		▒							▒	▒		▒	▒	▒		▒
Phenylalanine	7,30 to 7,45 m	▒	▒	▒		▒	▒		▒		▒	▒				▒		▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
Tryptophane	7,32s																		▒		▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
Tyrosine	7,04d 6,67d			▒		▒	▒		▒			▒				▒		▒	▒				▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
Histidine	7,83s 7,10s (var)								▒	▒	▒	▒				▒		▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒				
Proline	2,08m 3,35m 3,42m					▒	▒																							
Ectoine	4,04t 3,27dd 3,42dd									▒													▒	▒	▒					
Glycine betaine	3,26s 3,90s	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
BACTERIA	FAMILY	*Microbacteriaceae*			*Micrococcaceae*		*Nocardiaceae*	*Bacillus*	*Pseudomonadaceae*	*Halomonadaceae*		*Vibrio*	*Pseudoalteromonadaceae*										*Rhodobacteriaceae*			*Flavobacteriaceae*				
	ORDER	*Actinomycetales*						*Bacillales*	*Pseudomonadales*	*Oceanospirillales*		*Vibrionales*	*Alteromonadales*										*Rhodobacterales*			*Flavobacteriales*				
	CLASS	*Actinobacteria*						*Bacilla-ceae*	*Gammaproteobacteria*														*Alphaproteo bacteria*			*Flavobacteria*				

De droite à gauche: - Metabolites classés par type: sels simples, sucres, acides amines non cycliques et cycliques, osmolytes aminés
- Déplacement chimique (□en ppm) des protons qui caractérisent les métabolites ci-dessus dans les spectres HR-MAS et en solution
- Souches bactériennes classées par catégories taxinomiques selon l'arbre phylogénétique (Figure 39)

Tous les extraits ont été effectués à partir de cultures bactériennes de 10-11 jours sur milieu ZoBell. (■) métabolites présents en concentration majeurs de par leur signal proton correspondant ; (▒) métabolites en concentration mineure ; (□) traces ou absence de métabolites. Les groupes de bloc suivent une distribution phylogénique confirmant la discrimination visuelle des spectres HR-MAS (Figure 40), la présence de taxon spécifique de quelques uns des métabolites listés étant caractéristiques de leurs voies d'osmorégulation connues.

Parmi les composés polyaminés, la glycine bétaïne est le composé le plus rencontré (présent dans toutes les bactéries à Gram positif et dans la plupart des bactéries à Gram négatif, excepté pour le phylum des *Bacteroidetes*). L'ectoïne semble presque exclusivement distribuée dans la classe des *α-proteobacteria*.

Les acides aminés réguliers sont préférentiellement identifiés dans les spectres en solution plutôt que sur cellules entières (RMN HRMAS), en particulier pour les moins solubles ou ceux présents en très faibles concentrations. L'alanine est présente dans la plupart des souches bactériennes à Gram négatif (excepté la classe des *α-proteobacteria*), et est moins fréquente chez les bactéries à Gram positif. Elle est le composé dominant chez les deux souches de *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14, chez le phylum des Bacteroidetes (*Algibacter* sp. Ld11, Ld13 et 1M6, *Cellulophaga* sp. Ld12 et *Z. galactanivorans*), et chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J3. De même, les autres acides aminés aliphatiques comme la leucine, l'isoleucine et la valine ont une distribution similaire dans les deux taxa (bactéries à Gram positif et négatif). La glycine est également représentée dans tous les groupes et est le métabolite dominant chez *Pseudoalteromonas* sp. Ld19, la longue chaîne lysine étant détectable dans 40 % de toutes les souches bactériennes. Le glutamate et la glutamine sont aussi largement trouvés chez les échantillons des deux taxa, excepté une nouvelle fois dans la classe des *α-proteobacteria*, et sont les composés dominants des deux *Pseudoalteromonas* sp. D41 et *P. carrageenovora*, ainsi que chez *Z. galactanivorans* (phylum des *Bacteroidetes*, classe des *Flavobacteria*). La proline est trouvée uniquement dans les spectres de deux souches bactériennes appartenant aux *Actinobacteria* (*Kocuria* sp. Ld15 et *Rhodococcus* sp. Ld17).

Les autres composés tels que le mannitol, sont rencontrés uniquement chez *Z. galactanivorans*. Toutes les *Bacteroidetes* sont clairement dépourvues de glycine betaïne, composé présent et généralement majoritaire dans toutes les autres souches bactériennes analysées. Le glucose (ou les espèces proches telles que le tréhalose) ont été identifiés uniquement sur la base de leurs protons anomériques alpha et beta, en faible quantité et chez très peu de souches bactériennes : *Bacillus* sp. 4J6 ($Gram^+$) et *Cellulophaga* sp. Ld12 (phylum des *Bacteroidetes*). Le lactate, resultant de la fermentation de carbohydrates, est trouvé chez tous les Bacteroidetes et chez plusieurs *γ-proteobacteria* (toutes les *Pseudoalteromonas* sp.). Les ions organiques tels que le

formiate, l'acétate et le succinate, apparaissant comme des singulets sur les spectres protons, peuvent être des marqueurs taxinomiques utiles, et sont bien représentés chez les cinq souches bactériennes des *Bacteroidetes* (*Flavobacteriaceae*, *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13, et *Cellulophaga* sp. Ld12). L'acétate et le succinate dominent occasionnellement le spectre proton, pouvant être les produits du catabolisme des carbohydrates. Enfin, les aldéhydes, qui sont considérés comme des volatils, sont trouvés chez toutes les *α-proteobacteria* étudiées (*Paracoccus* sp. Ld10, Ld16 et 4M6), où ils dominent occasionnellement le spectre, comme chez *Paracoccus* sp. Ld10 et 4M6. Ils sont également présents chez les γ-*proteobacteria Vibrio* sp. D01 et *C. marina*, et chez la souche bactérienne *Cellulophaga* sp. Ld12.

IV - VERS UNE ANALYSE PHYLOGENETIQUE DE LA MICROFLORE ASSOCIEE TOTALE

IV.A - Amplification des régions *ITS* et 16S des bactéries cultivables

IV.A.1 - Les régions *ITS*

Des PCR ont été réalisées directement à partir de CFU pour amplifier les régions *ITS*. Comme les régions *ITS* sont surtout composées de répétitions de séquences, le nombre de ces répétions, et donc la taille de ces fragments, varient selon les espèces bactériennes **(Figure 43)**.

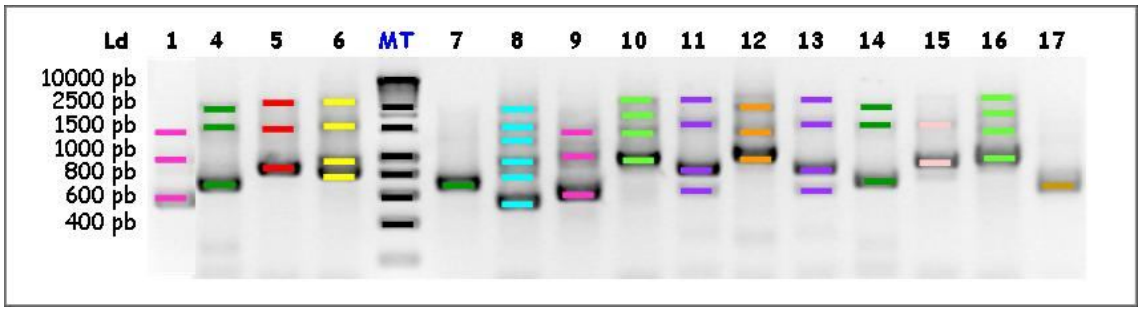


Figure 43 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2 % des produits PCR des régions *ITS* de souches bactériennes isolées de *L. digitata*.

Les souches bactériennes isolées sont : *Pseudoalteromonas* sp. Ld1 et Ld9, *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14, *Arthrobacter* sp. Ld5, *Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7, *Cobetia* sp. Ld8, *Paracoccus* sp. Ld10 et Ld16, *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13, *Cellulophaga* sp. Ld12, *Kocuria* sp. Ld15 et *Rhodococcus* sp. Ld17. Les traits de couleurs correspondent aux bandes des produits *ITS* amplifiés ; (**MT**) Marqueur de taille Smart Ladder.

Les résultats obtenus après électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose à 2 %, révèlent des bandes de tailles différentes. Cependant, la résolution des gels d'agarose étant assez basse, la diversité de taille des produits PCR réellement présents ne peut-être déterminée précisément. Toutefois, de une à six bandes ont été attribuées aux différentes souches analysées.

Une bande a été attribuée aux souches *Agrococcus* sp. Ld7 et *Rhodococcus* sp. Ld17, à 700 et 650 pb respectivement. Deux bandes de 800 et 1500 pb correspondent à la souche *Kocuria* sp. Ld15. La souche *Arthrobacter* sp. Ld5 est caractérisée par 3 bandes amplifiées de 850, 1400 et 3000 pb. Ensuite, 4 bandes de 800, 950, 1500 et 3000

pb ont été amplifiées, caractérisant la souche *Pseudomonas* sp. Ld6, et 6 bandes ont été attribuées à la souche bactérienne *Cobetia* sp. Ld8, amplifiées à 550, 800, 950, 1250, 1500 et 2500 pb. Enfin, des fragments identiques de 600, 1000 et 1300 pb ont été attribués aux deux souches bactériennes Ld1 et Ld9, toutes deux appartenant au genre *Pseudoalteromonas*. Il en est de même pour les deux souches *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14, caractérisées par les 3 bandes de 700, 1500 et 2500 pb, ainsi que les deux souches *Paracoccus* sp. Ld10 et Ld16, avec 4 bandes identiques amplifiées à 950, 1300, 2000 et 3000 pb, et 4 autres bandes identiques amplifiées à 650, 800, 1500 et 3000 pb attribuées aux deux souches bactériennes Ld11 et Ld13, appartenant toutes les deux au genre *Algibacter*.

Par conséquent, chaque souche bactérienne est codée par un nombre de bandes des régions *ITS* amplifié, de poids moléculaire particulier. Les souches appartenant au même genre (voire à la même espèce, mais non défini dans cette étude), sont donc codées par le même type d'amplification (même nombre et poids moléculaire des bandes amplifiées).

IV.A.2 - Les régions 16S

L'ADN bactérien amplifié pour le séquençage a également été digéré par un couple d'enzymes de restriction : *Xcm I* et *Bgl II* **(Figure 44)**.

Tous les produits PCR 16S ne sont pas digérés avec l'enzyme *Xcm I*, et il existe deux types de produits de digestion obtenus. Le premier est composé de trois fragments de 520, 590 et 1100 pb, et concerne *Pseudoalteromonas* sp. Ld1 et Ld9, *Pseudomonas* sp. Ld6 et *Cobetia* sp. Ld8. Le second type de digestion engendre quatre fragments de 360, 460, 550 et 1200 pb, et concerne les souches bactériennes *Paracoccus* sp. Ld10 et Ld16. Les autres produits PCR 16S des souches bactériennes *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14, *Arthrobacter* sp. Ld5, *Agrococcus* sp. Ld7, *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13, *Cellulophaga* sp. Ld12, Kocuria sp. Ld15 et *Rhodococcus* sp. Ld17 ne sont pas digérés par cette enzyme.

La seconde enzyme, *Bgl II*, engendre également deux types de digestion. La première aboutit à deux fragments de 740 et 820 pb, pour les souches bactériennes

Pseudoalteromonas sp. Ld1 et Ld9, *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14 et *Agrococcus* sp. Ld7. La seconde concerne uniquement la souche *Cellulophaga* sp. Ld12, avec des fragments de digestion de 500 et 1100 pb. Les produits PCR 16S des autres souches ne sont donc pas digérés par cette enzyme.

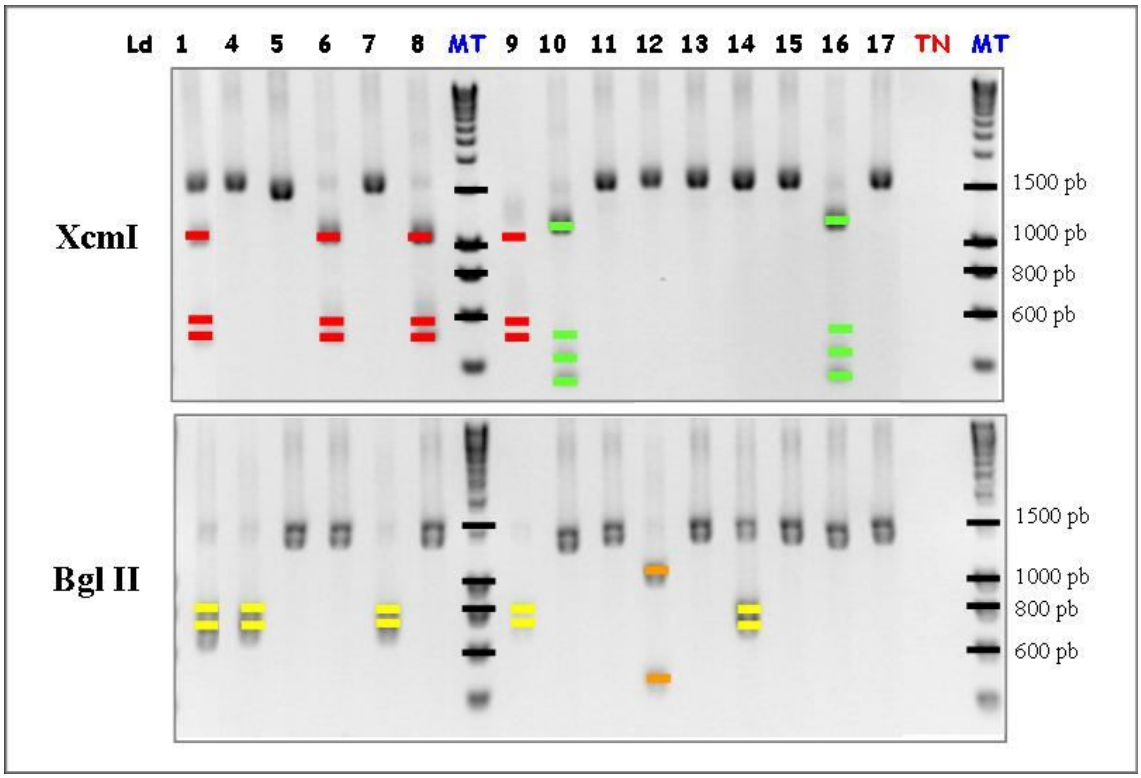


Figure 44 : Electrophorèse sur gel d'agarose 2 % des produits PCR 16S de souches bactériennes isolées de *L. digitata* et digérés par les enzymes de restriction *Xcm I* et *Bgl II*.

Les souches bactériennes isolées sont : *Pseudoalteromonas* sp. Ld1 et Ld9, *Curtobacterium* sp. Ld4 et Ld14, *Arthrobacter* sp. Ld5, *Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7, *Cobetia* sp. Ld8, *Paracoccus* sp. Ld10 et Ld16, *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13, *Cellulophaga* sp. Ld12, *Kocuria* sp. Ld15 et *Rhodococcus* sp. Ld17. Les traits de couleurs correspondent aux bandes des produits *ITS* amplifiés ; (**MT**) Marqueur de taille Smart Ladder.

Par conséquent, les souches appartenant au même genre bactérien ont des produits de digestion identiques avec ce couple d'enzymes. Les autres ont bien des clivages qui leurs sont propres.

IV.B - Extraction de l'ADN 16S de surface

Plusieurs protocoles d'extraction de l'ADN bactérien total présent à la surface des thalles de *L. digitata* ont été effectués. Dans la majorité des cas, l'ADN 16S

chloroplastique et mitochondrial de l'algue amplifié par PCR avec le couple d'amorces 8F-1492R dominaient largement l'ADN 16S bactériens.

Toutefois, la dernière expérimentation utilisant un kit d'extraction d'ADN de nourriture sur deux échantillons (A) et (B) de 20 g de matière fraîche d'algues non broyées, a permis d'obtenir suffisamment de matière première (ADN total), avec une seule bande amplifiée à plus de 10000 pb **(Figure 45A)**. Deux PCR ont ensuite été effectuées sur cet ADN total. La première pour amplifier l'ADNr 16S (couple d'amorces 8F – 1492R), et permet d'obtenir une seule bande amplifiée à 1500 pb. La seconde PCR, pour amplifier les régions *ITS* (couple d'amorces 125R – 1392F), et permet d'obtenir plusieurs bandes d'amplification **(Figure 45B)**. Le témoin négatif de la PCR des régions *ITS* est légèrement positif, cependant, les bandes les plus amplifiées des échantillons ne sont pas communes à celles du TN. De plus, les bandes des deux échantillons A et B sont identiques, avec une bande majoritairement amplifiée à environ 900 pb, et une autre bande à un peu plus de 1500 pb. Les autres bandes amplifiées étant communes à celles du TN.

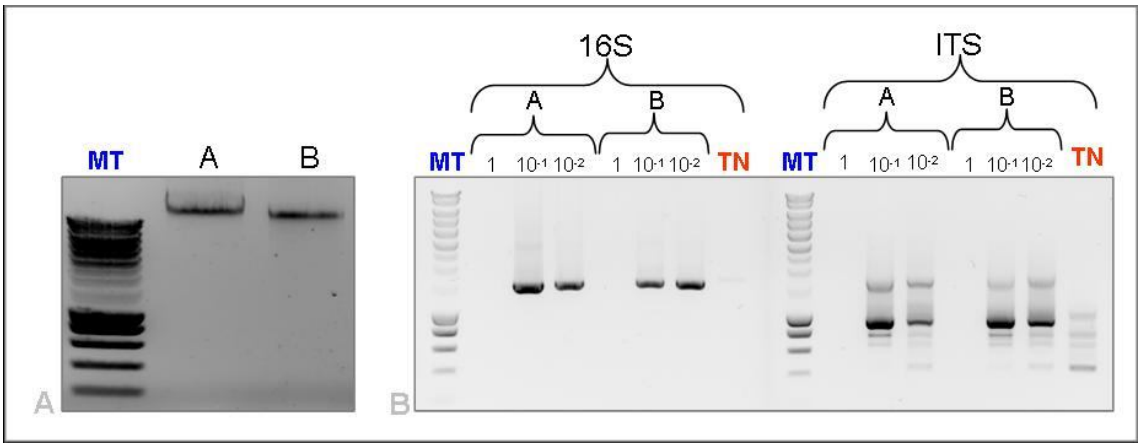


Figure 45 : Electrophorèses sur gel d'agarose 1 % de deux échantillons d'ADN total extraits de la surface de *L. digitata*, et des produits PCR 16S et *ITS*.

(A) ADN total extrait de la surface de l'algue : une bande de plus de 10 000 pb
(B) Produits PCR 16S (1 seule bande amplifiée à 1500 pb) et *ITS* (plusieurs bandes d'amplification de tailles variées) de l'ADN total de la surface de *L. digitata*
(MT) Marqueur de taille Smart Ladder ; (TN) Témoin négatif sans ADN ; (A) 1er morceau de 20 g de matière fraîche d'algue et (B) 2ème échantillon de 20 g de MF d'algue

Une digestion enzymatique des produits PCR 16S avec un couple d'enzymes de restriction *Sca I* / *Mlu I*, a permis de séparer les ADN 16S mitochondriaux et chloroplastiques de l'algue (*Mlu I*) des ADN 16S bactériens **(Figure 46)**. L'enzyme *Sca*

I digère l'ADN 16S pour donner des fragments de 696 pb, correspondant à l'ADN 16S mitochondrial, tandis que l'enzyme de restriction *Mlu I* donne des fragments de 817 pb, correspondant à l'ADN 16S chloroplastique. Les bandes d'amplification non digérées de 1500 pb correspondent donc aux ADN 16S bactériens, et sont ensuite découpées pour être purifiées, et par la suite clonées. Malheureusement, ce travail de clonage n'a pas été concluant jusqu'ici (aucun clone n'a été obtenu).

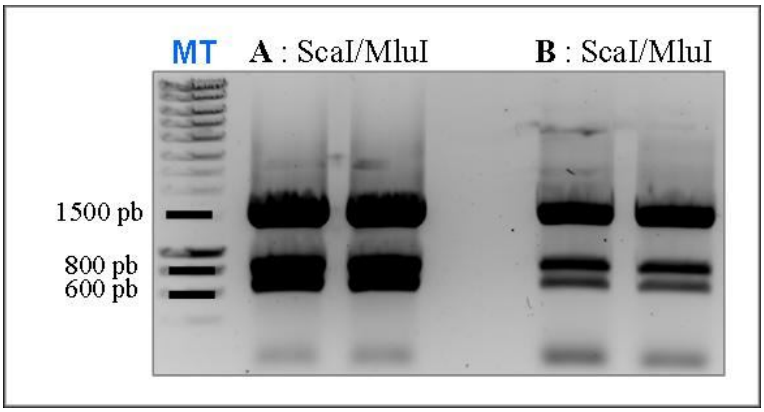


Figure 46 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % des produits PCR 16S digérés avec le couple d'enzymes de restriction *Sca I* / *Mlu I*.

Deux échantillons (A) et (B) de 20 g de matière fraîche ; (MT) Marqueur de taille Smart Ladder.
La bande d'amplification non digérée à 1500 pb correspond à l'ADN 16S bactérien. Les deux autres bandes digérées à environ 700 pb et 800 pb correspondent respectivement aux ADN 16S mitochondrial et chloroplastique.

V - DISCUSSION GENERALE

V.A - La spectrométrie de masse MALDI-ToF fournie un outil utile pour l'identification rapide de bactéries marines

Ce travail démontre que la MALDI-ToF MS sur des CFU de bactéries marines fournit des profils spectraux fiables et spécifiques aux souches, dans une fenêtre spectrale de 2 à 18 kDa. Ce sont majoritairement des protéines ribosomales qui semblent y être représentées.

La MALDI-ToF MS est désormais considéré comme le principal outil dans l'analyse des signatures du protéome en réponse aux changements de conditions environnementales (Schweder *et al.*, 2008). Par exemple, le profil protéomique en MALDI-ToF de cultures de différents âges d'*E. coli* K-12 présentent des variations quantitatives considérables entre 2 et 84 h d'incubation en milieu liquide (Arnold *et al.*, 1999). Dans cette étude, les profils spectraux des CFU en MALDI-ToF (cultivées sur du milieu solide) ne variaient pas significativement avec l'âge (d'après l'analyse avec le logiciel Biotyper), et ceci a été attribué au fait que l'expression de gènes diffère selon le mode de vie, l'un planctonique et l'autre en microcolonies. Le fait que les profils MALDI-ToF MS obtenus à partir de colonies développées sur milieu VNSS (milieu minimum) ne varient pas significativement de celles cultivées sur milieu ZoBell (milieu riche) dans cette étude est un peu plus surprenant, dans la mesure où les profils établis avec la RMN ^{1}H HR-MAS peuvent être visuellement très différents. Par conséquent, les spectres MALDI-ToF MS ne constituent pas des marqueurs physiologiques en réponse à des différences de paramètres de culture, comme peuvent l'être les spectres en RMN HR-MAS obtenus à partir de cellules entières. Nos résultats sont en accord avec d'autres études déjà réalisées en MALDI-ToF MS, où différents isolats de la bactérie à Gram positif *Arthrobacter* sp. peuvent être discriminés au niveau de la souche, en étant à 100 % en accord avec les séquences de gènes d'ADNr 16S (Vargha *et al.*, 2006). Les différences spectrales entre les cultures sur boîtes des souches d'*Arthrobacter sp.* d'âges différents, apparaissent également moins importantes que ces mêmes souches cultivées en milieu liquide. Ceci peut-être dû aux changements des profils de protéines pendant la phase de croissance en milieu liquide. Toujours dans cette étude, les profils spectraux d'*Arthrobacter* sp. à partir de milieux de culture riche et pauvre ne montrent pas de

différence significative, en accord avec notre propre observation, indiquant donc qu'il n'y a pas de changements majeurs de l'expression de biopolymères entre les deux milieux de culture. Cette variabilité indésirable demande que la base de données de référence soit construite avec des profils spectraux utilisant des souches cultivées sous des conditions de cultures strictement contrôlées. Le plein potentiel taxonomique d'une base de données de référence fiable est en effet seulement révélé avec la série d'échantillons cultivés dans des conditions de cultures identiques (Ruelle *et al.*, 2004) et dans notre étude, permet de discriminer *Pseudoalteromonas* sp. D41 (probablement une nouvelle espèce, C. Compère, communication personnelle) de *P. haloplanktis* comme attribué par l'analyse de la séquence d'ADNr 16S avec 98 % d'identité de séquence. Le potentiel métabolique des souches individuelles peut cependant être exploité en changeant des paramètres de culture un à un, comme par exemple le milieu de culture, la salinité, la température etc…, pour comparer ces profils aux spectres consensus de la base de données. La protéomique bactérienne est un domaine en pleine expansion, avec une importance plus particulière dans le domaine médical et la biotechnologie, comme dans les études d'adhésion où sont impliquées les protéines membranaires et les EPS.

Dans ce travail de thèse, les *γ-proteobacteria* cultivables sont dominées par le genre récemment révisé des *Pseudoalteromonas* (Ivanova *et al.*, 2004), qui sont écologiquement très diversifiés (Bowman, 2007) et souvent associés aux surfaces d'algues. Ce genre a fourni plusieurs modèles intéressant pour les études d'adhésion et du *quorum sensing* (Mai-Prochnow *et al.*, 2006). Parmi les isolats environnementaux de *Pseudoalteromonas* sp. utilisés dans cette étude, la spectrométrie de masse MALDI-ToF a été capable de discriminer la souche 3J6 de celle avec le transformant 3J6GFP, indiquant des changements majeurs dans l'expression du protéome du transformant porteur du plasmide. Notre étude indique seulement deux *α-proteobacteria* (*Paracoccus* sp.) sur les 18 souches isolées sur milieu de culture ZoBell, mais ceci ne reflète pas la biodiversité globale naturelle associée à *L. digitata*. En fait, dans une expérience de culture indépendante, il a été trouvé que les souches planctoniques d'*α-proteobacteria* ne sont pas efficacement éliminées par les exsudats de Laminaire, comme c'est le cas des *Roseobacter* planctoniques, ce qui signifie que les souches peuvent être différentiellement sélectionnées par l'algue (Lam *et al.*, 2008b). Ceci peut aussi expliquer l'absence dans nos isolats étudiés de *Vibrio*, taxon des *γ-proteobacteria* planctoniques important. Cependant, la formulation du milieu de culture et le choix des

amorces spécifiques pour optimiser le *corpus* des bactéries cultivables n'ont pas été le cœur de notre étude, le but étant seulement de valider l'utilité d'outils d'empreintes spectrales comme aides taxinomique, protéomique et métabolomique.

V.B - La spectrométrie RMN, un outil complémentaire puissant pour les études physiologique et chimiotaxonomique

La combinaison de la RMN proton HR-MAS et en solution (D_20) sur des cellules bactériennes entières a prouvé son utilité tant comme indicateur chimiotaxinomique rapide que comme outil métabolomique pour identifier des composés connus pour avoir un rôle important dans l'adaptation environnementale bactérienne (Motta *et al.*, 2004; Mai-Prochnow *et al.*, 2006; Bowman, 2007).

La base de données spectrale construite à partir de trente souches bactériennes associées à *L. digitata* (série Ld) et isolées de surface inerte ou d'autres algues, et cultivées dans des conditions strictement contrôlées sur milieu ZoBell, peut être visuellement analysée. Les souches peuvent être séparées dans des groupes taxinomiques en accord avec l'identification de leur séquence d'ADNr 16S et leur groupe spectral obtenu en MALDI-ToF, et ce jusqu'au niveau du genre ou de la famille. La RMN en solution (δ de 0,5 à 4,5 ppm) a été utilisée avec succès dans l'empreinte spectrale d'extraits bactériens, avec une bonne reproductibilité grâce à sa haute résolution (Delpassand *et al.*, 1995).

Dans le contexte de mon travail de thèse, j'ai été capable de mettre en évidence une erreur d'étiquetage jusqu'ici non soupçonnée sur deux souches accidentellement échangées dans la collection de souches bactériennes marines de référence, grâce à la méthode de RMN ^{1}H HR-MAS. Ceci indique donc le potentiel d'utilisation de cet outil dans des recherches sur des souches bactériennes marines. La distribution des métabolites identifiés (non sans hésitation) chez nos 30 souches, et présentée dans le **Tableau 2**, peut être corrélée avec les profils HR-MAS (δ = 0 – 4,5 ppm) groupés par leur ressemblance visuelle. Il existe des petites molécules qui sont généralement rencontrées dans les mécanismes de communication chimique et d'adaptation au milieu, comme par exemple l'ectoïne, une substance produite par des bactéries se développant dans des milieux à concentrations salines élevées (ou à des températures extrêmes), et

produisant alors un manteau protecteur grâce auquel elles peuvent survivre à ces environnements agressifs. Leur distribution au sein des différents groupes taxinomiques est en accord avec les informations rencontrées dans les études sur la physiologie et la biochimie microbiennes, et les revues spécialisées (Ivanova *et al.*, 2004). La RMN a beaucoup été utilisée pour élucider la biosynthèse d'acides aminés bactériens à partir de précurseurs marqués. Le fait que quelques taxa utilisent des voies de régulation différentes peut permettre d'attribuer un rôle de biomarqueur aux molécules individuelles. Par exemple, les *Flavobacteriaceae* analysées dans cette étude n'utilisent pas la glycine bétaïne, mais elles présentent de fortes concentrations d'ions tels que le succinate ou l'acétate, à l'inverse des autres groupes étudiés. De même, les *Rhodobacteriaceae* identifiées ici (*α-proteobacteria*) n'ont pas d'alanine, de glutamate et de glutamine, tous trois des métabolites transitoires répandus chez beaucoup de bactéries. Elles semblent également produire de grandes quantités d'aldéhydes, qui sont rarement rencontrés dans les autres taxa.

En pratique, les informations RMN fournies sur les souches individuelles cultivées sur un milieu de culture donné, en conditions contrôlées, peuvent être utiles pour évaluer au cas par cas, la pertinence biochimique et les limitations de ce milieu de culture, ou bien pour suivre des cinétiques enzymatiques à partir de bactéries vivantes, ou encore pour d'autres applications au-delà des objectifs de cette étude. De plus, Motta *et al*. (2004) ont utilisé avec succès la RMN, directement sur des souches bactériennes marines en milieu de culture liquide, dans le but de quantifier les divers osmolytes libérés et solubles dans l'eau. Un travail qui ne peut être réalisé avec les analyses en HR-MAS. Cependant, la RMN HR-MAS représente un outil chimiotaxinomique utile pour caractériser rapidement une bactérie inconnue, puisque l'acquisition d'un spectre proton prend moins de 10 min par souche bactérienne. La seule obligation est que toutes les bactéries soient cultivées dans des conditions de culture identique à celles constituant la base de données, une restriction toutefois déjà mentionnée pour l'acquisition des spectres protons des extraits bactériens (Aguayo *et al.*, 1988). Dans certains cas, l'adaptation physiologique aux différents milieux de culture doit être effectuée par l'activation de diverses voies de régulation, si le précurseur n'est pas présent dans le milieu minimum, c'est-à-dire, si les sources de carbones par défaut sont différentes à des niveaux de salinité équivalents. Notre analyse comparative des spectres des bactéries cultivées sur milieu minimum (VNSS) et riche (ZoBell) illustre ces

différences qualitatives majeures rencontrées sur les profils spectraux en RMN de CFU de même âge, qui peuvent être attribuées aux différences de capacité d'adaptation entre les souches bactériennes analysées (ex : *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 de la **(Figure 42)**). D'autres souches sont capables de croître sur les deux types de milieu, sans changement visuel de leur réponse adaptative (ex : *Pseudomonas* sp. Ld6 **(Figure 42)**). Finalement, plus d'un tiers de nos souches bactériennes présentent des modifications de profils spectraux d'ampleurs variables, quelques fois plus complexes sur le milieu VNSS, et d'autres sur le milieu ZoBell (ex : *Arthrobacter* sp. Ld5 **(Figure 42)**).

La capacité à enregistrer rapidement de telles réponses physiologiques sensibles, sur des cellules bactériennes vivantes par de la spectrométrie RMN HR-MAS, peut apporter une aide dans la recherche de milieux de culture spécifique pour cibler les espèces bactériennes viables mais non cultivables qui sont estimées représenter plus de 98 % de la diversité bactérienne rencontrée sur les échantillons d'algues naturelles. Le fait que l'analyse AMIX (basée sur une ACP) ne soit pas capable de discriminer globalement des profils spectraux entre des cultures sur ZoBell et sur VNSS, peut être attribué à l'insuffisance du jeu de données, à une préparation inadéquate des spectres ou tout simplement à l'incapacité d'établir une tendance de significativité avec de telles réponses fortement diverses **(Figure 41C)**. Les réponses de l'exométabolome, reflétées par les acides aminés et autres métabolites de régulation, sont en fait très complexes, que ce soit en réponse à un milieu de culture ou à un âge de culture, et peuvent échapper à la discrimination de traitement de signal basé sur l'ACP. De plus, l'utilisation de CFU cultivées en conditions strictement identiques sur des milieux de culture agar, et profilées (en RMN et/ou RMN HR-MAS) à des mêmes stades d'incubation, limitent la variabilité du signal de l'empreinte spectrale, et apparaissent comme des procédures essentielles pour construire une base de données fiables d'empreintes spectrales.

En cas d'étude d'une seule souche bactérienne, la RMN HR-MAS peut être utilisée comme méthode rapide pour enregistrer les réponses métaboliques à différents stades de croissance, et ainsi permettre de comparer la cinétique d'apparition et de disparition de métabolites entre différents milieux de culture. Ce travail a d'ailleurs déjà été réalisé avec succès sur des extraits de cellules bactériennes d'*E. coli* en RMN, cultivées sur deux milieux de culture liquides et à des stades de croissance différents (Behrends *et al.*, 2009).

V.C - Combinaison de la taxonomie moléculaire, la MALDI-ToF – MS et la spectrométrie RMN.

Les précédentes approches pour étudier les eucaryotes et leur microflore associée impliquaient souvent des caractérisations physicochimiques et visuelles fastidieuses, comme sur les microépiphytes d'algues brunes (Laycock, 1974; Corre & Prieur, 1990). Ces travaux ont progressivement été remplacés par des études de diversité globale sur des échantillons environnementaux, en utilisant des outils de taxonomie moléculaire, comme pour *Saccharina latissima* (Staufenberger *et al.*, 2008), et par des études plus spécifiques utilisant des souches bactériennes cultivables pour étudier les compétitions entre les épiphytes (La Barre & Haras, 2007) et les réponses de défense de l'hôte, comme chez *L. digitata* (Borchardt *et al.*, 2001; Leblanc *et al.*, 2006).

En basant nos recherches au niveau de la communauté bactérienne associée à *L. digitata*, notre étude indique que ces techniques spectroscopiques sont rapides d'utilisation, informatives et fiables, et qu'elles peuvent fournir une empreinte chimiotaxinomique utile. Mais ces techniques peuvent également mettre en évidence des réponses bactériennes adaptatives, au niveau du protéome et du métabolome, ce qui offre une dimension dynamique aux anciennes caractérisations physicochimiques. A cette fin, les bases de données spectrales doivent être construites à partir de souches bactériennes cultivées avec des paramètres de culture strictement contrôlés. La spectrométrie de masse MALDI-ToF et la RMN HR-MAS sont des outils puissants, qui peuvent aussi permettre de faire progresser les recherches génomiques et transcriptomiques au niveau d'une souche bactérienne, en variant sélectivement des paramètres clefs.

Chapitre IV Capacité d'adhésion et de formation de biofilm des souches bactériennes étudiées

Cette seconde partie des résultats se situe dans un contexte de compréhension des interactions existant entre les thalles de *Laminaria digitata* et des bactéries marines. Elle se décompose en trois parties.

La première est consacrée à l'étude de l'adhésion de souches bactériennes marines en microplaques. Différents types d'adhésion ont été testés afin de mieux comprendre comment l'adhésion des souches bactériennes peut être influencée chimiquement par l'algue. Pour cela, l'adhésion des bactéries a été effectuée en présence d'EMSF uniquement, puis avec des métabolites extraits de *L. digitata* et des exsudats de cette algue stressée et non stressée. Enfin, l'adhésion a été testés avec des métabolites purs, connus pour être émis par l'algue et qui pourraient avoir une influence sur l'adhésion des bactéries au support.

La seconde partie de ce chapitre concerne l'étude de la formation de biofilm de ces mêmes souches bactériennes marines en conditions dynamiques (chambre à flux). Cette formation de biofilm a été effectuée en milieu de culture ZoBell uniquement, puis avec ce même milieu enrichi d'exsudats d'algues stressées ou non (approche biomimétique globale), ainsi qu'avec des métabolites purs (approche pharmacologique et systématique).

Enfin, je terminerai par une discussion générale des résultats obtenus à partir des différents travaux abordés sur l'adhésion et la formation de biofilm bactérien. Ces résultats permettront d'apporter les premières informations sur les interactions existantes entre *L. digitata* et les bactéries marines avec lesquelles elle est susceptible d'être en relation en conditions naturelles.

I - CAPACITE D'ADHESION

I.A - Choix de la microplaque

La mise au point du protocole d'adhésion a été effectuée sur trois types de microplaques, et sur 11 souches bactériennes marines dont 3 isolées de *L. digitata*. Le pouvoir d'adhésion semble varier d'une souche bactérienne à l'autre, et les valeurs de fluorescence du DAPI complexé aux bactéries adhérées varient également d'un type de microplaque à l'autre **(Figure 47)**.

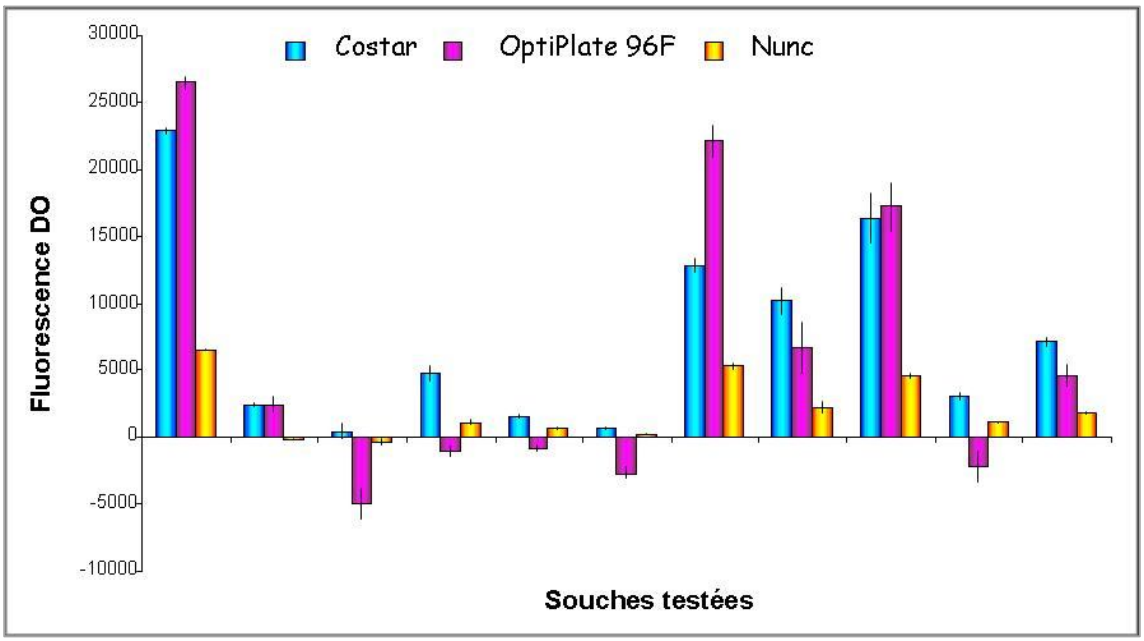


Figure 47 : Adhésion bactérienne sur trois types de microplaques 96 puits.

Onze souches bactériennes marines testées : 3 souches bactériennes isolées de *L. digitata* (*Paracoccus* sp. Ld16, *Pseudoalteromonas* sp. Ld18 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20) ; 2 souches de la SBR (*Zobellia galactanivorans* et *Cobetia marina*) ; les 2 souches de l'Ifremer (*Vibrio* sp. D01 et *Pseudoalteromonas* sp. D41) ; 4 souches du LBCM (*Pseudoalteromonas* sp. 3J3, 3J6 et 3J6GFP, et *Paracoccus* sp. 4M6), sur trois types de microplaques 96 puits testés : Costar®, OptiPlate96® et Nunc®.
Les barres correspondent aux erreur-types des valeurs de fluorescence des 8 réplicats par souche bactérienne.

Bien que les valeurs de DO_{600} varient d'un type de microplaque à l'autre, le pouvoir d'adhésion des souches bactériennes marines semble suivre une même tendance, montrant ainsi la cohérence des résultats d'adhésion. Contrairement aux plaques de type Nunc®, celles des marques Costar® et OptiPlate 96F® permettent d'obtenir des valeurs plus élevées de fluorescence, donc permettent une plus forte

adhésion. Toutefois, des valeurs négatives sont obtenues après soustraction des valeurs de fluorescence de l'EMSF sur les microplaques OptiPlate 96F® et Nunc®.

La microplaque de type Costar® semble donc être la plus appropriée, puisque le fond de ces plaques est en verre, tout comme les chambres à flux utilisées pour réaliser les biofilms. Les autres types de microplaques ont un fond en polystyrène.

Par conséquent, la suite des expériences d'adhésion a été réalisée sur les microplaques à fond en verre de la marque Costar®.

I.B - Etude de l'adhésion des souches bactériennes étudiées

I.B.1 - Capacité d'adhésion en eau de mer

I.B.1.1 - Etude de la reproductibilité

L'adhésion de la totalité des souches marines étudiées (excepté *Pseudoalteromonas* sp. Ld1) a donc été testée en EMSF sur cinq microplaques différentes de type Costar®. Une seule série d'adhésion est montrée ci-dessous sous forme d'histogramme **(Figure 48)**, les quatre autres séries étant montrées en **Annexe 2 p.233**.

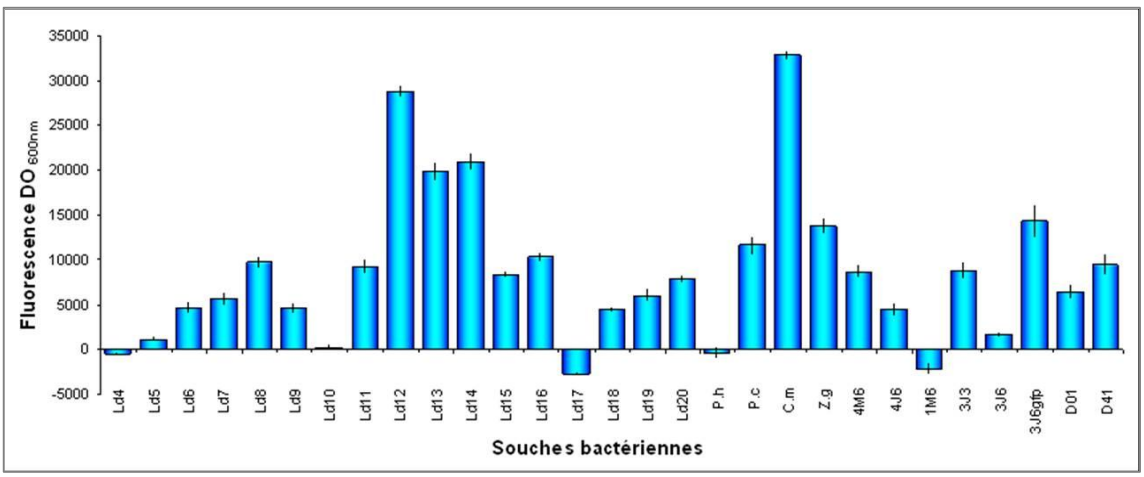


Figure 48 : Série n°3 des expériences d'adhésion bactérienne en EMSF sur microplaques 96 puits.

Toutes les souches bactériennes isolées de *L. digitata* excepté *Pseudoalteromonas* sp. Ld1 ont été testées, ainsi que toutes les souches bactériennes marines de référence, soit au total 29 souches bactériennes marines. Chaque colonne correspond à la moyenne des 8 réplicats des valeurs de fluorescence pour une souche bactérienne, après déduction de la valeur moyenne du blanc (EMSF). Les barres correspondent aux erreur-types des 8 réplicats.

Les erreur-types obtenues pour chacune des souches bactériennes étudiées sont faibles (8 puits par souche), ce qui montre que la répétabilité de l'expérience sur une même microplaque est correcte. De plus, le pouvoir d'adhésion varie selon les souches marines testées, avec des valeurs allant de - 2772 pour *Agrococcus* sp. Ld7, à + 32936 pour *C. marina*. En revanche, bien que le pouvoir d'adhésion des souches bactériennes soit relativement homogène entre les cinq séries d'expérimentation, les valeurs moyennes de fluorescence obtenues par série ne sont quant à elles pas reproductibles **(Tableau 3)**.

Tableau 3 : Test de *Student* sur la reproductibilité des valeurs moyennes de fluorescence des souches bactériennes entre les cinq séries d'adhésion.

Test *Student*	Ld4	Ld5	Ld6	Ld7	Ld8	Ld9	Ld10	Ld11	Ld12	Ld13	Ld14	Ld15	Ld16	Ld17	Ld18	Ld19	Ld20
Comparaison des séries 1/2	0,00	0,04	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,00	0,10	0,08	0,00	0,00
1/3	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1/4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	0,02	0,13	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,01	0,28	0,00	0,00
1/5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00			0,00	0,06	0,12	0,11	0,02	0,00	0,00
2/3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23
2/4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,01
2/5	0,01	0,08	0,00	0,18	0,00	0,00	0,44	0,06			0,00	0,03	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00
3/4	0,00	0,00	0,04	0,08	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
3/5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00			0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00
4/5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00			0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,13	0,00

Test *Student*	P.h	P.c	C.m	Z.g	4M6	4J6	1M6	3J3	3J6	3J6gfp	D01	D41
Comparaison des séries 1/2	0,34	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00
1/3	0,18	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	0,29	0,00	0,00
1/4	0,16	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1/5	0,28	0,00	0,00	0,10	0,25	0,21	0,00	0,01	0,06	0,00	0,41	0,00
2/3	0,22	0,09	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2/4	0,18	0,39	0,08	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
2/5	0,43	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
3/4	0,43	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09
3/5	0,13	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
4/5	0,08	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Test de *Student* effectué à un niveau statistique de significativité fixé à 95 %, soit $p < 0,05$. Seules les valeurs > 0,05 (surlignées en jaune) indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs d'adhésion des cinq séries effectuées (après soustraction de la fluorescence moyenne de l'EMSF). Le premier tableau (de Ld4 à Ld20) correspond aux souches bactériennes isolées de *L. digitata* ; le second tableau correspond aux souches bactériennes de référence. Les fractions correspondent aux numéros des séries comparées deux à deux (ex : ½ signifie que les valeurs moyennes de fluorescence des souches bactériennes de la série d'expérimentation n°1 sont comparées à celles de la série n°2).

I.B.1.2 - Synthèse des résultats d'adhésion

Ces cinq séries d'expérimentation sur l'adhésion des souches bactériennes marines a permis de montrer des différences de capacité d'adhésion sur verre selon les souches étudiées. Une unité arbitraire basée sur les valeurs moyennes de fluorescence

par série d'expérimentation a donc été choisie pour déterminer le pouvoir d'adhésion des différentes souches bactériennes marines testées **(Tableau 4)** :

- valeurs moyennes de fluorescence < 2500 : adhésion nulle
- valeurs moyennes de fluorescence comprises entre 2500 et 10000 : adhésion faible
- valeurs moyennes de fluorescence > 10000 : adhésion forte

Tableau 4 : Capacité d'adhésion en EMSF de souches bactériennes marines sur microplaques.

Souches bactériennes	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Moyenne	
Curtobacterium sp. Ld4	-	-	-	-	-	-	Gram +
Curtobacterium sp. Ld14	0	+	+	0	-	+	
Agrococcus sp. Ld7	-	-	0	0	-	-	
Arthrobacter sp. Ld5	-	-	-	0	-	-	
Kocuria sp. Ld15	-	-	0	+	-	0	
Rhodococcus sp. Ld17	-	-	-	-	-	-	
Bacillus sp. 4J6	-	0	0	-	-	-	
Pseudomonas sp. Ld6	-	+	0	0	-	0	Gram -
Cobetia sp. Ld8	-	-	0	-	-	-	
Cobetia marina	-	0	+	+	0	+	
Vibrio sp. D01	-	-	0	+	-	0	
Pseudoalteromonas sp. Ld20	-	0	0	0	+	0	
Pseudoalteromonas sp. 3J3	0	-	0	0	+	0	
Pseudoalteromonas sp. D41	0	+	0	0	+	+	
Pseudoalteromonas sp. 3J6	0	0	-	0	+	0	
Pseudoalteromonas sp. 3J6 GFP	+	0	+	-	+	+	
Pseudoalteromonas carrageenovora	0	+	+	+	0	+	
Pseudoalteromonas haloplanktis	-	-	-	-	0	-	
Pseudoalteromonas sp. Ld9	+	+	0	+	+	+	
Pseudoalteromonas sp. Ld18	-	-	0	-	0	0	
Pseudoalteromonas sp. Ld19	+	-	0	+	+	+	
Paracoccus sp. Ld10	-	-	-	-	-	-	
Paracoccus sp. Ld16	-	+	+	0	-	0	
Paracoccus sp. 4M6	-	0	0	+	-	0	
Algibacter sp. Ld11	+	+	0	0	+	+	
Algibacter sp. Ld13	0	+	+	0	+	+	
Algibacter sp. 1M6	0	0	-	0	+	0	
Zobellia galactanivorans	+	+	+	+	+	+	
Cytophaga sp. Ld12	0	+	+	0	+	+	

- : Adhésion nulle (DO<2500)	0 : Faible adhésion (2500<DO<10000)	+ : Forte adhésion (DO>10000)

29 souches bactériennes marines testées (17 isolées de *L. digitata*, 4 de la SBR, 6 du LBCM et 2 d'Ifremer) en 8 réplicats par microplaque et sur 5 microplaques (5 séries),. Les souches sont présentées dans le tableau suivant la distribution phylogénétique de la figure 39. Pour chaque série, les valeurs de fluorescence moyennées (moyenne des 8 réplicats par souche bactérienne) obtenues après soustraction de celles des blancs (EMSF) sont exprimées par des sigles. La dernière colonne du tableau correspond à la moyenne des valeurs de DO_{510} moyennées de chaque série. Lorsque les valeurs obtenues sont inférieures à 2500, alors l'adhésion est considérée comme nulle et représentée par un « - » ; quand elles sont comprises entre 2500 et 10000, l'adhésion est dite faible et caractérisée par un « 0 » ; enfin, lorsqu'elles sont supérieures à 10000, l'adhésion est considérée comme forte et représentée par un « + ».

La dernière colonne du tableau représente la synthèse des résultats d'adhésion de cinq séries d'expérimentation, par le calcul de la moyenne des moyennes de DO_{510} de

chaque série. Ce résultat est cohérent avec les résultats qui seraient obtenus en moyennant l'unité arbitraire obtenue par souches bactériennes avec les cinq séries.

Par conséquent, huit souches bactériennes n'ont pas la capacité d'adhérer (ou très faiblement ; valeurs < 2500) en 2h sur ce type de microplaques : *Curtobacterium* sp. Ld4, *Agrococcus* sp. Ld7, *Arthrobacter* sp. Ld5, *Rhodococcus* sp. Ld17, *Bacillus* sp. 4J6 (appartenant toutes les cinq aux bactéries à Gram positif), et *Cobetia* sp. Ld8, *Pseudoalteromonas haloplanktis* et *Paracoccus* sp. Ld10 (appartenant aux bactéries à Gram négatif). Dix souches n'adhèrent que faiblement (valeurs comprises entre 2500 et 10000) : essentiellement *Kocuria* sp. Ld15 pour les bactéries à Gram positif, et *Pseudomonas* sp. Ld6, *Vibrio* sp. D01, *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, 3J3, 3J6 et Ld18 *Paracoccus* sp. Ld16 et 4M6, et *Algibacter* sp. 1M6 pour les bactéries à Gram négatif. Enfin, onze souches adhèrent fortement en 2h sur ce type de microplaques (valeurs > 10000) : avec *Curtobacterium* sp. Ld14 pour les bactéries à Gram positif, et *Cobetia marina*, *Pseudoalteromonas* sp. D41, 3J6GFP, *carrageenovora*, Ld9 et Ld19, *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13, *Zobellia galactanivorans* et *Cellulophaga* sp. Ld12 pour les bactéries à Gram négatif.

I.B.2 - Capacité d'adhésion en présence de métabolites extraits de *L. digitata*

Cinq extraits organiques de *L. digitata* ont été testés sur le pouvoir d'adhésion de 23 souches bactériennes. Ces extraits ont été incubés 2 heures avec les suspensions bactériennes. Les résultats obtenus sont présentés ci-après **(Tableau 5)**.

Le solvant DMSO utilisé pour solubiliser les extraits secs de *L. digitata* ne semble pas influer sur l'adhésion des souches bactériennes testées, excepté pour *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 et 3J3, où l'adhésion est légèrement diminuée. Par conséquent, les résultats d'adhésion de ces deux souches avec les métabolites extraits ne seront pas commentés.

Aucun des extraits n'a eu d'effet sur l'adhésion des souches bactériennes *Curtobacterium* sp. Ld4 et *Arthrobacter* sp. Ld5, isolées à partir de crampons de *L. digitata*, et étant des bactéries à Gram positif. Il en est de même pour les souches de

référence *P. carrageenovora*, *P. haloplanktis*, *C. marina* et *Vibrio* sp. D01, toutes les quatre étant des bactéries à Gram négatif. Il semble également que les souches « Ld » soient plus sensibles aux extraits de leur algue hôte que les souches de référence, principalement isolées de surfaces inertes, exceptées *P. carrageenovora* et *Z. galactanivorans* (isolées d'algues).

	Souches bactériennes	Témoin DMSO	C-EtAc	C-MeOH	S-EtAc	S-MeOH	L-MeOH
Gram+	*Curtobacterium* sp. Ld4	0	0	0	0	0	0
	Curtobacterium sp. Ld14	0	0	0	0	0	-
	Arthrobacter sp. Ld5	0	0	0	0	0	0
	Kocuria sp. Ld15	0	+	0	0	0	0
Gram-	*Pseudomonas* sp. Ld6	0	0	0	0	0	-
	Cobetia sp. Ld8	0	0	-	0	-	-
	Cobetia marina	0	0	0	0	0	0
	Vibrio sp. D01	0	0	0	0	0	0
	Pseudoalteromonas sp. D41	0	0	0	+	+	+
	Pseudoalteromonas sp. 3J6	0	0	+	+	0	0
	Pseudoalteromonas sp. 3J6GFP	0	0	+	0	0	-
	P. haloplanktis	0	0	0	0	0	0
	Pseudoalteromonas sp. Ld9	0	0	0	0	-	-
	Pseudoalteromonas sp. Ld18	0	0	0	0	+	0
	Paracoccus sp. Ld16	0	0	0	0	+	+
	Paracoccus sp. 4M6	0	0	0	0	0	-
	Algibacter sp. Ld13	0	-	-	0	0	+
	Algibacter sp. 1M6	0	0	0	+	0	+
	Zobellia galactanivorans	0	+	0	0	0	-
	Cytophaga sp. Ld12	0	-	0	0	+	0
	Total des effets observés sur l'adhésion	0	4	4	3	6	11

Tableau 5 : Effet des extraits de métabolites sur l'adhésion de souches bactériennes marines.

Les résultats d'adhésion ont été traités avec le test de *Student* à un niveau statistique de significativité fixé à 95 %, soit $p < 0,05$. Les souches sont classées suivant la distribution phylogénétique de la figure 39. Si $p > 0,05$, les extraits n'ont pas d'effet sur l'adhésion des souches bactériennes et caractérisé par un (0). A l'inverse, si $p < 0,05$, alors le pouvoir d'adhésion des souches bactériennes testées est modifié par les extraits : (+) adhésion favorisée par les extraits, (-) le pouvoir d'adhésion est diminué par les extraits. « C » : extraits de crampons, « S » : extraits de stipe, (L) extraits de lames, « EtAc » extraits à l'acétate d'éthyle, « MeOH » : extraits au méthanol.

De plus, l'extrait MeOH des lames de l'algue semble avoir plus d'effet sur l'adhésion des souches testées comparée aux quatre autres extraits, en comptabilisant 11 effets (effet négatif sur *Pseudoalteromonas* sp. Ld12 non pris en compte) sur les 28 observés. Ainsi, il diminuerait l'adhésion des souches bactériennes *Curtobacterium* sp. Ld14, *Pseudomonas* sp. Ld6, *Cobetia* sp. Ld8, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6GFP et Ld9, *Paracoccus* sp. 4M6 et *Z. galactanivorans*. En revanche, cet extrait favoriserait

l'adhésion des souches *Pseudoalteromonas* sp. D41, *Paracoccus* sp. Ld16, *Algibacter* sp. Ld13 et 1M6.

En ce qui concerne l'extrait de stipes à l'acétate d'éthyle, un effet positif sur l'adhésion est observé pour les souches bactériennes *Pseudoalteromonas* sp. D41 et 3J6, et *Algibacter* sp. 1M6, essentiellement des souches de référence. Aucun effet de cet extrait n'a été mis en évidence sur les souches isolées de l'algue. En revanche, l'extrait de stipes au méthanol diminuerait l'adhésion des souches *Cobetia* sp. Ld8 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld9, et favoriserait le pouvoir d'adhésion des souches *Pseudoalteromonas* sp. D41 et Ld18, *Paracoccus* sp. Ld16 et *Cellulophaga* sp. Ld12.

Enfin, des effets notables ont été mis en évidence pour les extraits de crampons. Celui au MeOH diminuerait l'adhésion des souches *Cobetia* sp. Ld8 et *Algibacter* sp. Ld13 (isolées de l'algue), alors qu'il augmenterait l'adhésion des souches de référence *Pseudoalteromonas* 3J6 et 3J6GFP. L'extrait de crampons à l'EtAc diminuerait le pouvoir d'adhésion de *Pseudoalteromonas* sp. Ld13 et *Cellulophaga* sp. Ld12, tandis qu'il augmenterait l'adhésion de *Kocuria* sp. Ld15 et de *Z. galactanivorans*.

I.B.3 - Capacité d'adhésion en présence d'exsudats de *L. digitata*

Deux types d'exsudats de *L. digitata* ont été testés sur le pouvoir d'adhésion de 22 souches bactériennes. Ces exsudats correspondent à des bouquets de molécules émissibles, obtenues à partir d'algues vivantes : exsudats libérés constitutivement dans l'eau de mer environnante par des jeunes sporophytes (exsudats EM+Alg) ; et les exsudats libérés dans l'eau de mer environnante par des jeunes sporophytes élicités par des oligoguluronates (exsudats EM+Alg+GG), après 2 heures d'incubation avec les suspensions bactériennes. Les résultats obtenus sont présentés ci-après **(Tableau 6)**.

Les souches apparaissent dans le tableau selon leur provenance (en premier sont listées toutes les souches bactériennes isolées de *L. digitata*, et en second toutes les souches de référence). Elles n'apparaissent pas selon une distribution phylogénétique (comme les résultats présentés précédemment), car il semblerait que les souches isolées de l'algue sont plus sensibles à ces exsudats que les souches de référence.

Tableau 6 : Effet des exsudats de *L. digitata* sur l'adhésion de souches bactériennes marines

	EMSF+Alg		EMSF+Alg+GG	
Souches bactériennes	Série 1	Série 2	Série 1	Série 2
***Curtobacterium* sp. Ld4**		0		+
***Arthrobacter* sp. Ld5**	-	-	0	-
***Pseudomonas* sp. Ld6**	-	-	-	-
***Agrococcus* sp. Ld7**	0	-	0	-
***Cobetia* sp. Ld8**	0	-	-	-
***Pseudoalteromonas* sp. Ld9**	0	-	0	-
***Paracoccus* sp. Ld10**	-	-	+	+
***Algibacter* sp. Ld11**	0	-	0	-
***Cytophaga* sp. Ld12**	+	0	+	-
***Kocuria* sp. Ld15**	0	0	0	0
***Rhodococcus* sp. Ld17**	-	-	0	+
***Pseudoalteromonas* sp. Ld20**	-	-	0	-
Pseudoalteromonas haloplanktis		0		0
Pseudoalteromonas carrageenovora	0	0	-	
Cobetia marina	-	0	-	0
Zobellia galactanivorans	-	0	0	-
***Paracoccus* sp. 4M6**	0	0	0	0
***Bacillus* sp. 4J6**	0	0	0	0
***Pseudoalteromonas* sp. 3J3**	0		0	
***Pseudoalteromonas* sp. 3J6 GFP**	0	0	0	0
***Vibrio* sp. D01**		0		0
***Pseudoalteromonas* sp. D41**		0		0

Les résultats d'adhésion ont été traités avec le test de *Student* à un niveau statistique de significativité fixé à 95 %, soit $p < 0,05$. Les souches bactériennes ont une distribution selon leur provenance (souches associées à *L. digitata*, puis souches de référence). Si $p > 0,05$, les exsudats n'ont pas d'effet sur l'adhésion des souches bactériennes et caractérisé par un (0). A l'inverse, si $p < 0,05$, alors le pouvoir d'adhésion des souches bactériennes testées est modifié par les exsudats : (+) adhésion favorisée par les exsudats ; (-) le pouvoir d'adhésion est diminué par les exsudats. ( ) correspond aux souches qui n'ont pas été testées. EMSF+Alg : exsudats sécrétées naturellement par l'algue ; EMSF+AlgGG : exsudats sécrétées en réponse à un stress par des oligoguluronates à 150 $\mu g.mL^{-1}$.

Les exsudats de *L. digitata* n'ont aucun effet sur l'adhésion des souches bactériennes *Kocuria* sp. Ld15, *P. haloplanktis*, *Paracoccus* sp. 4M6, *Bacillus* sp. 4J6, *Vibrio* sp. D01, et les *Pseudoalteromonas* sp. 3J3, 3J6GFP et D41. A l'inverse, ces deux types d'exsudats diminuent l'adhésion des souches bactériennes *Arthrobacter* sp. Ld5, *Pseudomonas* sp. Ld6 et *Cobetia* sp. Ld8. Les exsudats EM+Alg diminuent l'adhésion des souches *Paracoccus* sp. Ld10, *Rhodococcus* sp. Ld17 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20. Ils n'ont en revanche aucun effet sur *P. carrageenovora*. Enfin, les exsudats EM+Alg+GG augmentent l'adhésion des souches bactériennes *Curtobacterium* sp. Ld4 (uniquement la série 2, pas d'effet sur la série 1), *Paracoccus* sp. Ld10 et *Rhodococcus* sp. Ld17 (uniquement la série 2 également). A l'inverse, ils diminuent l'adhésion de la souche *P. carrageenovora*.

Il existe toutefois quelques divergences entre les résultats d'une même souche avec un même type d'exsudat. Cette différence pourrait s'expliquer par la DO_{600} d'ensemencement des suspensions bactériennes dans les puits, qui n'a pas été homogène dans la première série d'expérimentation pour toutes les souches testés (normalement DO_{600} = 3). En effet, les résultats obtenus pour la souche bactérienne *Agrococcus* sp. Ld7 dans la série 1 et dans la série 2 divergent. La DO_{600} d'ensemencement dans les puits de la 1ère série a été beaucoup plus élevée que celle de la 2ème série. Les résultats de la série 2 seraient donc plus proches des conditions naturelles et démontrent l'effet important de la charge bactérienne de l'*inoculum* sur la sensibilité aux concentrations d'actifs dans les exsudats, avec une diminution de l'adhésion de cette souche en présence des 2 types d'exsudats. Il existe également une petite différence pour la souche *Z. galactanivorans*, dont la DO_{600} d'ensemencement a été < 3 lors de la 1ère série. Concernant *Cellulophaga* sp. Ld12, c'est une suspension bactérienne d'une DO_{600} < 3 qui a été ensemencée dans la 1ère série, laissant penser que les exsudats EM+Alg n'ont pas d'effet sur son adhésion, et que les exsudats EM+Alg+GG diminueraient son adhésion. Par conséquent, les résultats à prendre en compte dans cette partie d'étude sont principalement les résultats de la 2ème série d'expérimentation.

Ainsi, pour *Pseudoalteromonas* sp. Ld9 et *Algibacter* sp. Ld11, il y a une diminution de l'adhésion lorsque des exsudats EM+Alg±GG sont ajoutés aux puits d'ensemencement. En revanche, aucun effet n'est observé sur l'adhésion de la souche de référence *Cobetia marina*.

I.B.4 - Capacité d'adhésion en présence de métabolites purs

Trois métabolites purs (disponibles commercialement) ont été testés pour observer leur effet sur l'adhésion des souches bactériennes isolées de *L. digitata*. Ces métabolites ont été choisis à partir des connaissances existantes sur les métabolites exsudés par l'algue, et qui sont donc potentiellement présents dans l'hydrosphère immédiate de l'algue stressée ou non. Ainsi, le mannitol est sécrété continuellement sur toute la surface de l'algue. De plus, *L. digitata* est connue pour avoir des mécanismes de défense impliquant le métabolisme de l'iode et du brome (Küpper *et al.*, 2002), d'où le

choix de tester le diiodométhane (CH_2I_2), connu pour être libéré en grande quantité lorsque l'algue est soumise à un stress oxydant, et l'acide hypobromeux (HOBr) présent dans le produit industriel Stabrex ST40®.

Cinq souches bactériennes ont été choisies pour réaliser ces tests d'adhésion. Les deux souches isolées de *L. digitata*, *Cobetia* sp. Ld8 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, et les trois souches de référence *Z. galactanivorans*, les *Pseudoalteromonas* sp. D41 et 3J6. Ces souches ont été choisies par rapport à l'ensemble des résultats d'adhésion obtenus précédemment.

I.B.4.1 - Mannitol

Cinq concentrations croissantes de mannitol ont été ajoutées dans les puits d'incubation de cinq souches bactériennes pendant 2h **(Figure 49)**.

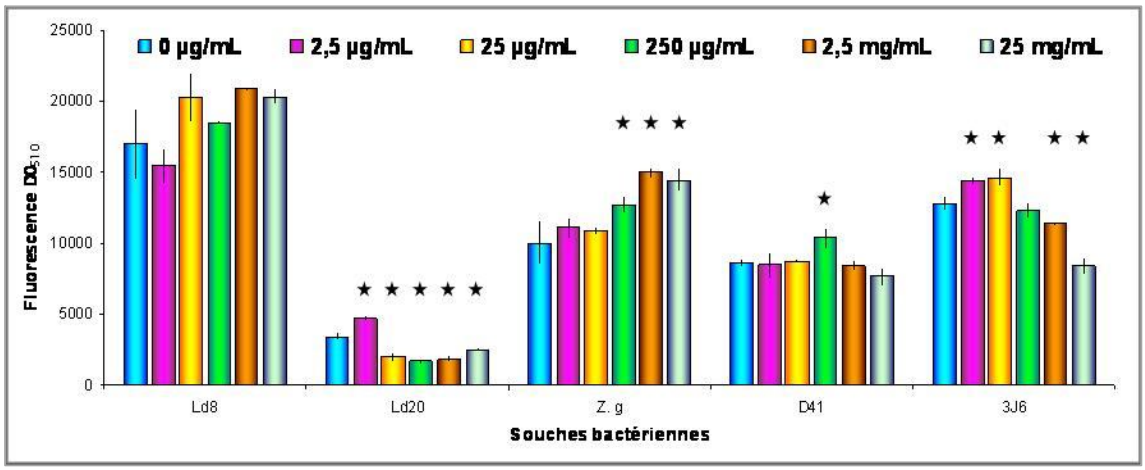


Figure 49 : Adhésion des souches bactériennes en microplaques 96 puits co-incubées 2h avec différentes concentrations de mannitol.

Cinq souches étudiées : *Cobetia* sp. Ld8, *Z. galactanivorans* et les *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, D41 et 3J6. Les barres correspondent aux erreurs-types. Les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenus en présence de mannitol par rapport aux témoins sans mannitol ( ) (soit $p < 0,05$) ; les différentes concentrations en mannitol testées sont ( ) 2,5 µg.mL^{-1}, ( ) 25 µg.mL^{-1}, ( ) 250 µg.mL^{-1}, ( ) 2,5 µg.mL^{-1} et ( ) 25 µg.mL^{-1}.

Aucun effet n'a été observé sur l'adhésion de *Cobetia* sp. Ld8, avec une valeur de fluorescence moyenne de 18751. Chez la souche *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, le mannitol à une concentration de 2,5 µg.mL^{-1} favorise l'adhésion de cette souche au support de la microplaque, avec une fluorescence de 4724 contre 3419 en EMSF. En revanche, les quatre autres concentrations diminuent son adhésion (respectivement en

ordre croissant de quantité de mannitol ajouté : 1988, 1670, 1831 et 2514). Une augmentation de l'adhésion avec des concentrations en mannitol de 2,5 et 25 µg.mL^{-1} a également été observée pour *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, avec des valeurs de fluorescence de 14364 et 14642, contre 12833 pour le témoin. Une diminution de l'adhésion a quant à elle été observée avec les deux plus fortes concentrations en mannitol (11357 et 8384). Aucune différence d'adhésion n'a été notée pour une concentration de 250 µg.mL^{-1}. Chez *Pseudoalteromonas* sp. D41, une seule concentration a un effet positif sur l'adhésion (celle à 250 µg.mL^{-1}) avec une valeur de fluorescence de 10371, contre 8620 en condition témoin (sans mannitol). Enfin, pour la souche *Z. galactanivorans*, plus la concentration en mannitol est élevée, plus son adhésion est favorisée, avec des valeurs de fluorescence significativement plus élevées pour des concentrations en mannitol de 250 µg.mL^{-1}, 2,5 mg.mL^{-1} et 25 mg.mL^{-1} (respectivement 12669, 14986 et 14444, contre 10007 en condition témoin).

I.B.4.2 - Diiodométhane

Cinq concentrations croissantes de CH_2I_2 ont été ajoutées dans les puits d'incubation de ces cinq mêmes souches bactériennes, et pendant 2h **(Figure 50)**.

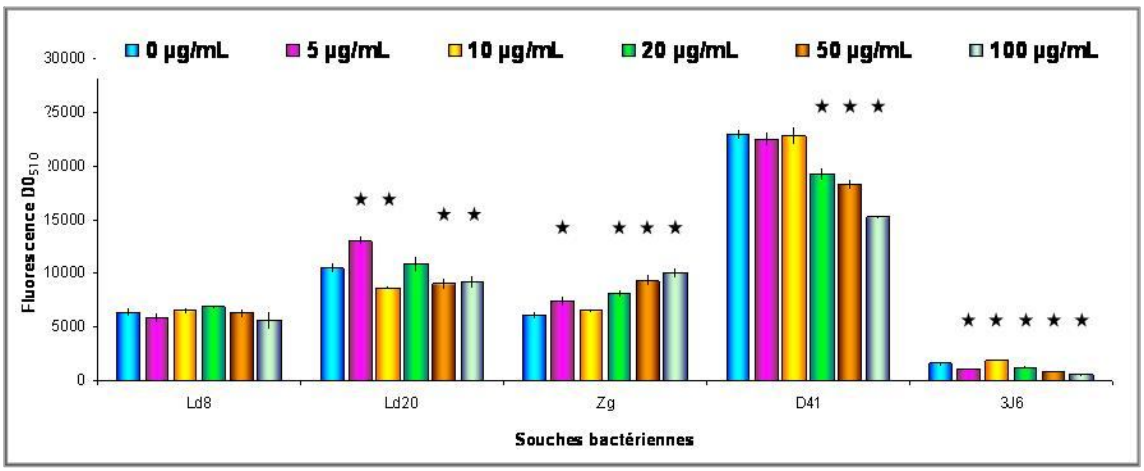


Figure 50 : Adhésion des souches bactériennes en microplaques 96 puits co-incubées 2h avec différentes concentrations de diiodométhane.

Cinq souches étudiées : *Cobetia* sp. Ld8, *Z. galactanivorans* et les *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, D41 et 3J6. Les barres correspondent aux erreurs-types. Les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenus en présence de mannitol par rapport aux témoins sans mannitol (■) (soit $p < 0,05$) ; les différentes concentrations en mannitol testées sont (■) 5 µg.mL^{-1}, (■) 10 µg.mL^{-1}, (■) 20 µg.mL^{-1}, (■) 50 µg.mL^{-1} et (■) 100 µg.mL^{-1}.

Comme pour le mannitol, aucun effet sur l'adhésion n'est observé pour la souche *Cobetia* sp. Ld8 co-incubées avec les différentes concentrations de CH_2I_2, avec une valeur moyenne de fluorescence de 6230. En revanche, les autres souches sont sensibles aux différentes concentrations de CH_2I_2.

En effet, toutes les concentrations de CH_2I_2 diminuent significativement l'adhésion de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, excepté pour une concentration de 10 $\mu g.mL^{-1}$ où la valeur d'adhésion augmente significativement (1794). La valeur de fluorescence témoin étant de 1526, contre 1041, 1220, 800 et 428 pour des concentrations croissantes de CH_2I_2 de 5, 20, 50, 100 $\mu g.mL^{-1}$. Les trois plus fortes concentrations de CH_2I_2 ont également un effet significativement négatif sur l'adhésion de la souche *Pseudoalteromonas* sp. D41, avec des valeurs de fluorescence passant de 19197 pour 20 $\mu g.mL^{-1}$, à 1822 pour 50 $\mu g.mL^{-1}$ et à 15200 pour 100 $\mu g.mL^{-1}$, contre 22883 pour la condition témoin. A l'inverse, ces trois concentrations favorisent l'adhésion de la souche *Z. galactanivorans*, avec des valeurs de 8078 pour 20 $\mu g.mL^{-1}$, 9298 pour 50 $\mu g.mL^{-1}$ et 10026 pour 100 $\mu g.mL^{-1}$, contre 6102 pour la condition témoin. De même, pour une concentration de 5 $\mu g.mL^{-1}$, il y a une augmentation significative de l'adhésion, avec une valeur moyenne de fluorescence de 7367 $\mu g.mL^{-1}$. Chez *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, l'adhésion est augmentée avec la concentration la plus faible en CH_2I_2, avec une valeur de fluorescence de 12985 contre 10476. En revanche, avec des concentrations de 10, 50 et 100 $\mu g.mL^{-1}$, l'adhésion est alors diminuer, avec des valeurs moyennes de fluorescence de 8622, 8938 et 9117.

I.B.4.3 - Stabrex ST40®

Cinq dilutions en EMSF du produit commercial Stabrex ST40® ont été ajoutées dans les puits d'incubation de cinq souches bactériennes décrites précédemment pendant 2h **(Figure 51)**.

Toutes les souches bactériennes testées ont été sensibles à ce produit, excepté peut-être pour la souche *Z. galactanivorans*. En effet, seule la dilution au 2.10^{-4} diminue significativement l'adhésion de cette souche, de 16205 de valeur moyenne de fluorescence pour la condition témoin, à 2383. Cependant, comme aucune autre dilution n'a d'effet sur son adhésion, il semblerait que ce soit un artefact.

Chez *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, les trois plus fortes concentrations en Stabrex® diminuent significativement son adhésion, avec des valeurs de 293 pour une dilution au 10^{-4}, 618 pour 2.10^{-4} et 1631 pour 10^{-3}, contre 2765 pour le témoin. Elles diminuent également l'adhésion de la souche *Cobetia* sp. Ld8, avec des valeurs de fluorescence de 6650 pour 10^{-4}, 8920 pour 2.10^{-4} et 8291 pour 10^{-3}, contre 18297 pour le témoin. Cependant, la dilution au 2.10^{-5} augmente significativement l'adhésion de cette souche, avec une valeur moyenne de fluorescence atteignant les 24776. Pour la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, les quatre concentrations les plus fortes en Stabrex® diminuent significativement l'adhésion de cette souche, en particulier les trois concentrations les plus fortes, avec des valeurs moyennes de fluorescence comprise entre -166 et 1163, contre 9908 pour la valeur moyenne témoin. A une dilution de 2.10^{-5}, la diminution de l'adhésion est faible mais significative, avec une valeur moyenne de 8312. Enfin, en ce qui concerne la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* sp. D41, toutes les concentrations en Stabrex® ont un effet positif sur l'adhésion de cette souche (5212 pour 10^{-5}, 7136 pour 2.10^{-5}, 8875 pour 10^{-4} et 5915 pour 2.10^{-4}, contre 4539 pour le témoin), excepté la plus forte concentration en Stabrex® (dilution au 10^{-3}) qui diminue l'adhésion de *Pseudoalteromonas* sp. D41 (valeur moyenne de fluorescence de 2841).

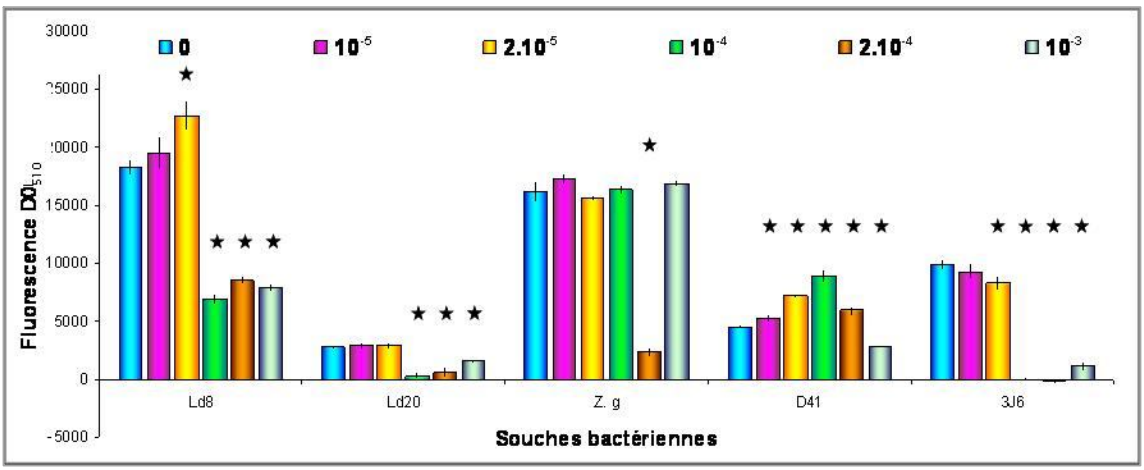


Figure 51 : Adhésion des souches bactériennes en microplaques 96 puits co-incubées 2h avec différentes concentrations de Stabrex®, produits commercial composé d'acide hypobromeux.

Cinq souches étudiées : *Cobetia* sp. Ld8, *Z. galactanivorans* et les *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, D41 et 3J6. Les barres correspondent aux erreurs-types. Les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenus en présence de Stabrex par rapport aux témoins sans mannitol ( ) (soit $p < 0,05$) ; les différentes dilutions en Stabrex testées sont ( ) 10^{-5}, ( ) 2.10^{-5}, ( ) 10^{-4}, ( ) 2.10^{-4} et ( ) 10^{-3}.

II - FORMATION DE BIOFILM

Dans cette partie, seules quelques bactéries ont été sélectionnées pour effectuer l'étude de la formation de biofilm. Les souches choisies sont les trois souches isolées de *L. digitata* : *Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, de capacités d'adhésion en EMSF différentes et de modifications de l'adhésion en contact d'exsudats d'algue et de métabolites également différentes. Trois souches de référence ont également été choisies : *Zobellia galactanivorans*, notamment pour son métabolisme iodé important (Michel *et al*., résultats non publiés), ainsi que pour avoir été isolée d'une algue rouge, contrairement aux deux autres souches utilisées : *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41, isolées de surfaces inertes. Ces deux *Pseudoalteromonas* ont une bonne capacité d'adhésion, elles sont également sensibles aux différentes conditions d'adhésion, et surtout, ce sont des souches bactériennes très étudiées dans leur laboratoire d'origine (respectivement le LBCM et l'Ifremer).

II.A - En milieu de culture ZoBell

II.A.1 - A 2h d'adhésion en statique

Deux heures après l'injection des souches bactériennes, l'adhésion des bactéries aux lamelles des FC est observée en contraste de phase au MCBL (microscope confocale à balayage laser) avant de mettre le flux de milieu de culture ZoBell en route, afin de former les biofilms. Les bactéries ont donc plus ou moins adhéré aux lamelles en verre, dans un environnement constitué d'EMSF **(Figure 52)**.

En ce qui concerne les souches associées à *L. digitata*, *Agrococcus* sp. Ld7 n'adhère que très peu au support, contrairement aux deux autres souches étudiées. Les cellules bactériennes de *Pseudomonas* sp. Ld6 adhèrent au support de manière homogène, recouvrant la totalité de la surface à coloniser, alors que les bactéries de la souche *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 adhèrent également au support, mais d'une manière plus hétérogène, en formant des petits amas bactériens et en laissant ainsi des espaces exempts de cellules sur la surface. Du côté des souches marines de référence, les cellules bactériennes adhèrent toutes au *substratum*. Les longs et fins bâtonnets de

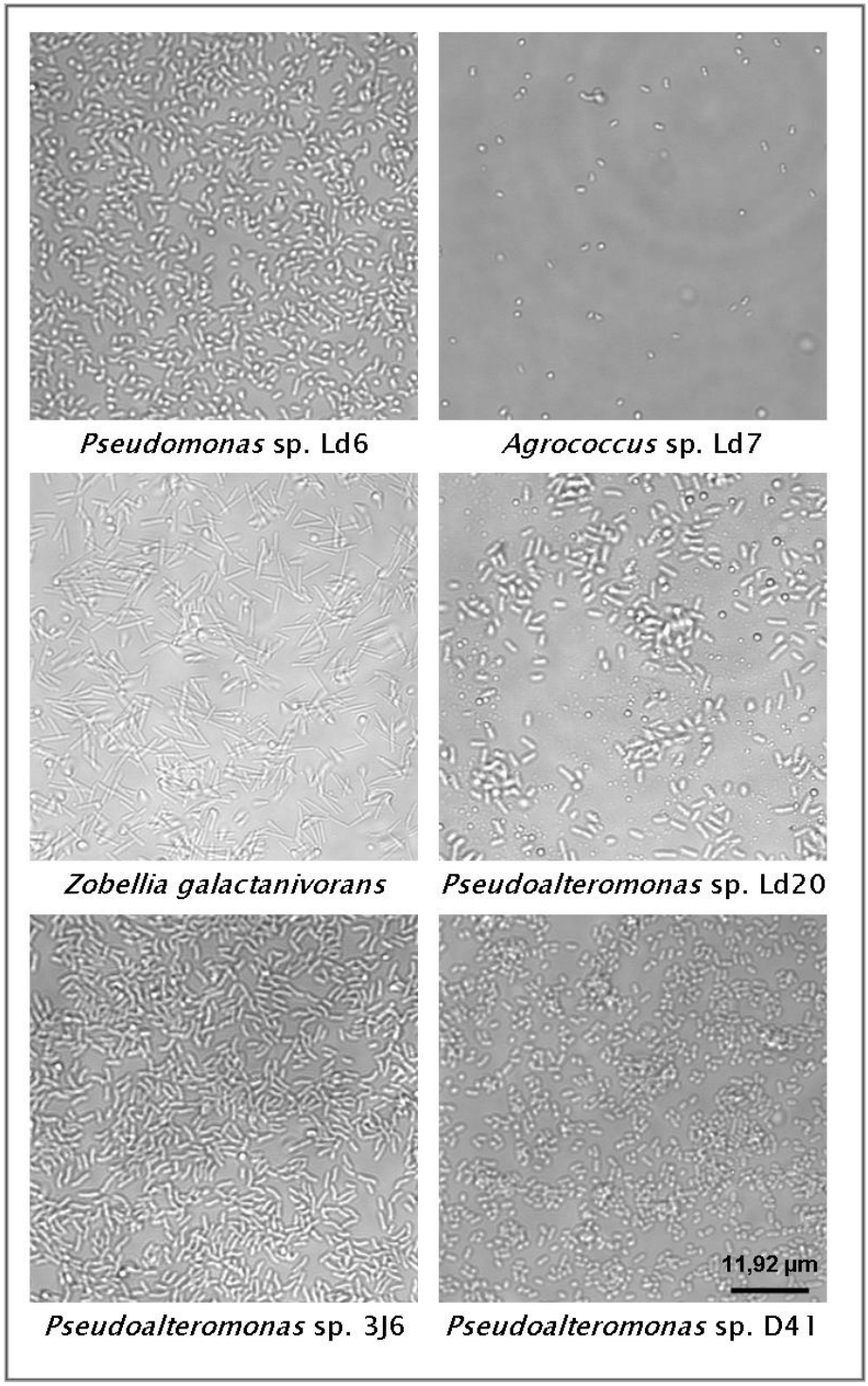


Figure 52 : Adhésion bactérienne en EMSF au bout de 2h en Flow Cell, en condition statique et à 20°C, observée en microscopie confocale à balayage laser en contraste de phase.

Trois souches bactériennes associées et isolées de l'algue brune *Laminaria digitata* : *Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7, *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 ; et trois souches bactériennes marines de référence : *Z. galactanivorans, Pseudoalteromonas* sp. D41 et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. La barre d'échelle est commune aux 6 souches bactériennes.

Z. galactanivorans sont équitablement répartis sur la surface à coloniser, tout comme les bactéries en forme de bâtonnet de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. Les cellules bactériennes de *Pseudoalteromonas* sp. D41, plus petites que ses homologues *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et Ld20, sont réparties de manière un peu moins homogène sur la surface, et des agrégats de bactéries apparaissent déjà au bout de 2h d'adhésion.

II.A.2 - A 24 h de biofilm en flux dynamique

La reconstitution tridimensionnelle (3D) des images obtenues par les prises de vue effectuées sur toute la hauteur (dans les couches z) des biofilms de *Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7, *Zobellia galactanivorans*, *Pseudoalteromonas* sp. D41, 3J6 et Ld20 en microscopie confocale à balayage laser permet d'avoir un aperçu de la structure de leur biofilm formé au bout de 24h en milieu de culture ZoBell **(Figure 53)**.

Toutes les souches bactériennes étudiées forment un biofilm, excepté la souche *Agrococcus* sp. Ld7 isolée de *L. digitata*. En effet, les images en MCBL montrent davantage des bactéries individuelles adhérées au support qu'un biofilm **(Figure 53B)**. En revanche, les autres souches bactériennes forment bien des biofilms, avec des architectures différentes et propres à chaque souche.

Par conséquent, les souches *Pseudomonas* sp. Ld6, *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 et *Pseudalteromonas* sp. D41 semblent former des biofilms d'architecture proche, avec plus ou moins de biomasse et d'épaisseur **(Figure 53A, 53C**, **53F)**. Quelques colonies ou amas bactériens sont visibles dans la représentation en 3D de leur biofilm, dépassant le tapis bactérien formé à la surface de la FC. Les biofilms de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sont formés de structures de type champignon (amas bactériens beaucoup plus importants que les souches bactériennes décrites précédemment) **(Figure 53D)**. Les sections de la coupe sagittale de son biofilm révèlent que ces amas bactériens formés sont creux à l'intérieur **(Figure 53D)**. C'est également le cas de la souche *Z. galactanivorans*. En effet, le biofilm de cette souche forme des amas bactériens creux en leur intérieur, mais l'architecture finale est cependant bien différente de celui de la souche 3J6 **(Figure 53E)**. Alors que chez *Pseudoalteromonas*

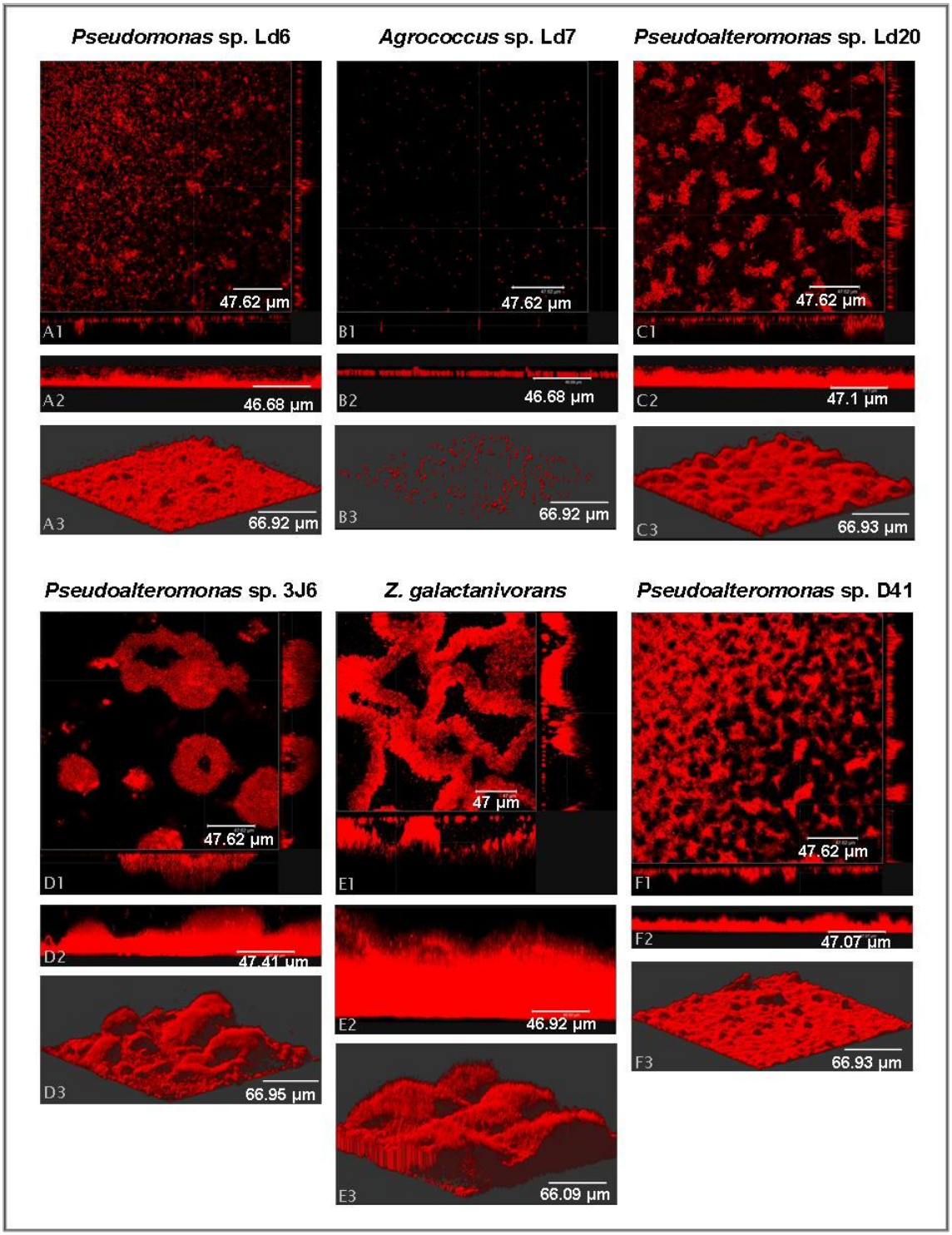


Figure 53 : Biofilms bactériens formés en chambre à flux en 24h avec du milieu de culture ZoBell, et observés par microscopie confocale à balayage laser.

(A) Pseudomonas sp. Ld6, *(B) Agrococcus* sp. Ld7, *(C) Pseudoalteromonas* sp. Ld20, *(D) Pseudoalteromonas* sp. 3J6, *(E) Zobellia galactanivorans* et *(F) Pseudoalteromonas* sp. D41. Les chiffres suivants correspondent aux différents types d'observation des prises de vue dans les couches des biofilms : (1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

sp. 3J6 les colonies sont bien distantes les unes des autres, chez *Z. galactanivorans*, les colonies semblent toutes liées les unes aux autres, formant ainsi un réseau structuré. Les amas bactériens ne sont vraisemblablement pas des structures en champignon, puisque les colonies formées ne sont pas sphériques, mais au contraire « difformes » et beaucoup moins épaisses que celles rencontrées chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. De même, la base du biofilm est plus épaisse, formant un biofilm épais et dense contrairement aux autres souches étudiées.

L'analyse informatique de toutes les images acquises permet d'évaluer la biomasse, et les épaisseurs moyennes et maximales de chaque biofilm formé des six souches bactériennes étudiées. Ci-après sont représentées graphiquement les valeurs moyennes (de 2 à 5 séries d'expérimentation), de toutes les valeurs déjà moyennées (moyennes des 2 à 5 prises de vue par série d'expérimentation), de la biomasse ($\mu m^3.\mu m^{-2}$), et des épaisseurs moyennes et maximales (µm) des biofilms de ces six souches bactériennes étudiées **(Figure 54)**.

Par conséquent, *Agrococcus* sp. Ld7 a une biomasse de 0,04 $\mu m^3.\mu m^{-2}$, valeur très faible révélant bien que ce n'est vraisemblablement pas un biofilm qui s'est formé en 24h, mais plus la résultante de bactéries adhérées au support. Les épaisseurs moyenne et maximale obtenues sont de 0,04 µm et 8 µm respectivement. En revanche, *Pseudomonas* sp. Ld6, *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et *Pseudoalteromonas* sp. D41 forment toutes les quatre un biofilm de biomasse équivalente, comprise entre 1,9 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour Ld6 à 4 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour Ld20 (2,1 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour 3J6 et 2,9 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour D41). Les biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 atteignent une épaisseur maximale de 28,3 µm, contre une épaisseur moyenne de 2,6 µm, montrant ainsi l'existence de structures montantes et irrégulières, s'élevant du film bactérien formé à la base de la surface des FC. Les autres souches bactériennes semblent également avoir ce genre de structures, mais avec une hauteur moyenne plus importante (ou légèrement plus faible pour *Pseudomonas* sp. Ld6) et une épaisseur maximale plus faible que celle de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, signifiant ainsi que leurs structures montantes sont moins épaisses. En effet, les biofilms de *Pseudomonas* sp. Ld6 ont une épaisseur moyenne et maximale de 2,3 et 16,7 µm respectivement. Pour *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, ils sont de 6,3 µm d'épaisseur moyenne et atteignent les 24,3 µm de hauteur. Enfin, les biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. D41 ont une

épaisseur maximale de 15,4 µm, ce qui correspond à un peu plus de cinq fois leur épaisseur moyenne (2,9 µm).

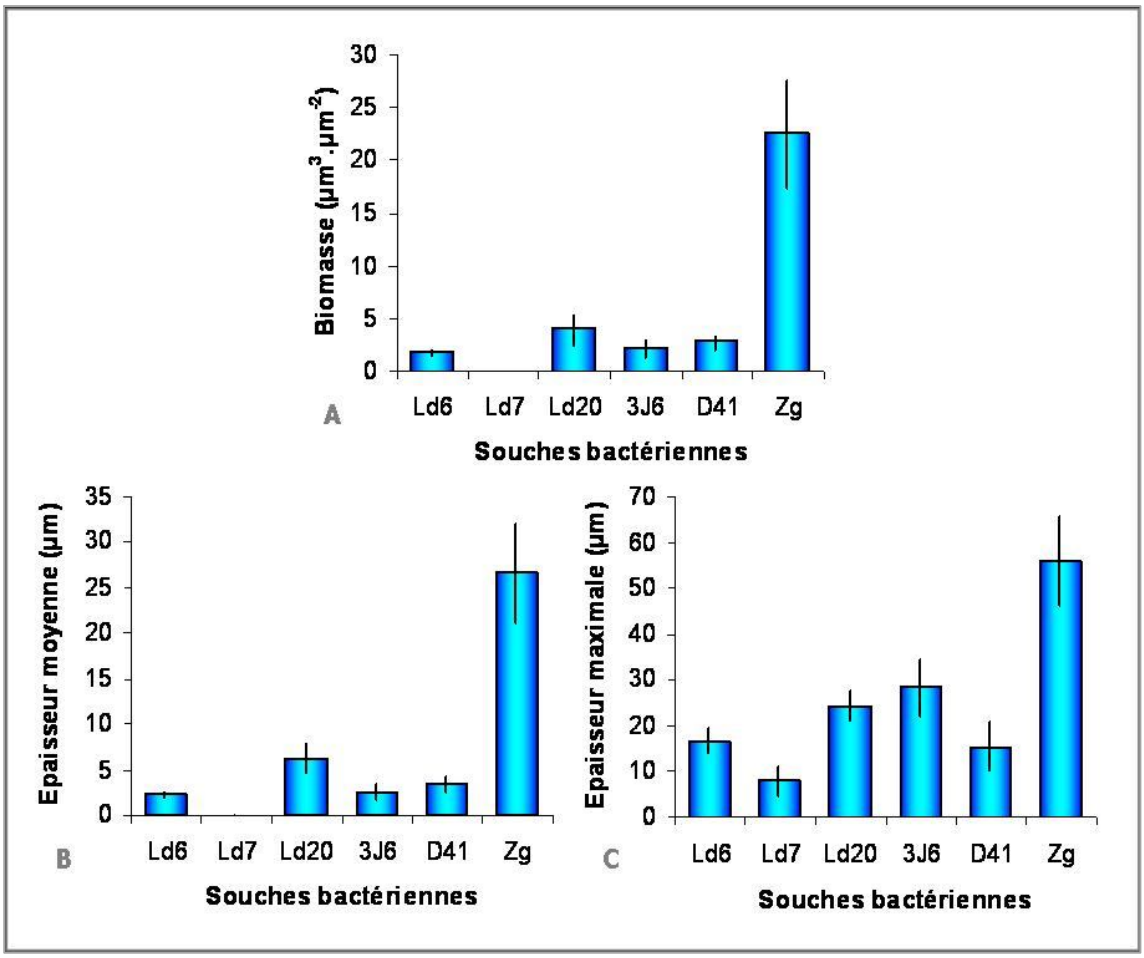


Figure 54 : Quantification des biofilms bactériens formés en chambre à flux pendant 24h en milieu de culture ZoBell.

(A) Biomasse du biofilm exprimée en $\mu m^3.\mu m^{-2}$
(B) Epaisseur moyenne du biofilm exprimée en µm
(C) Epaisseur maximale du biofilm exprimée en µm
Les souches bactériennes étudiées et représentées par des colonnes sont : *Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 pour les souches bactériennes isolées de *L. digitata*, et *Pseudoalteromonas* sp. D41 et 3J6, et *Zobellia galactanivorans* pour les souches bactériennes marines de références ; les barres correspondent aux erreurs-types.

Pour finir, la souche bactérienne *Z. galactanivorans* forme quant à elle un biofilm de biomasse bien plus importante que les autres souches bactériennes étudiées, s'élevant à 22,7 $\mu m^3.\mu m^{-2}$. L'épaisseur moyenne de son biofilm formé est de 26,6 µm, et son épaisseur maximale atteint les 56 µm de hauteur. Proportionnellement aux autres souches bactériennes, la différence entre les épaisseurs moyenne et maximale est faible, montrant ainsi une structure de biofilm plus homogène.

II.B - En présence d'exsudats de *L. digitata* (approche biomimétique)

Les biofilms décrits précédemment ont ensuite été formés en milieu de culture ZoBell enrichi avec des exsudats d'algues. Les exsudats libérés par l'algue ont une composition différente selon que l'algue est stressée ou non. Par conséquent, tester ces exsudats sur la formation de biofilm de souches bactériennes épiphytes et exogènes à cette algue pourrait permettre d'apporter les premiers éléments de réponse sur les interactions entre l'algue et les bactéries existantes à la surface de l'algue.

Pour chaque expérience, trois conditions (3 milieux de culture) sont testées en parallèle pour une même souche bactérienne : une condition « témoin » contenant uniquement du milieu de culture ZoBell (*(A)* sur les images de MCBL), une condition « algues » contenant du milieu ZoBell et des exsudats de *L. digitata* libérés naturellement dans l'eau de mer environnante (*(B)* sur les images de MCBL), et une condition « algues+GG » contenant du milieu ZoBell et des exsudats de *L. digitata* stressée (*(C)* sur les images de MCBL) **(Figure 55)**.

Les conditions « algues » diminuent la biomasse, l'épaisseur moyenne et maximale de la souche *Agrococcus* sp. Ld7, ou du moins, de ses bactéries adhérées au support de la FC. Les conditions « algues+GG » diminuent essentiellement leur biomasse. Les résultats obtenus en MCBL ne montrent pas de formation de biofilm.

Les exsudats EM+Alg±GG ont une influence sur les biofilms de *Pseudomonas* sp. Ld6 **(Figure 55)**. En effet, bien que l'épaisseur maximale ne soit pas modifiée en leur présence (témoin : 14,4 µm ; EM+Alg : 15,4 µm ; EM+Alg±GG : 11,2 µm), l'épaisseur moyenne et la biomasse sont quant à elles diminuées (épaisseur moyenne : 2,9 µm, 0,6 µm et 0,4 µm ; biomasse : 2,2 $\mu m^3.\mu m^{-2}$, 0,5 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ et 0,3 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ respectivement pour les témoins, EM+Alg et EM+Alg±GG) **(Figure 56)**.

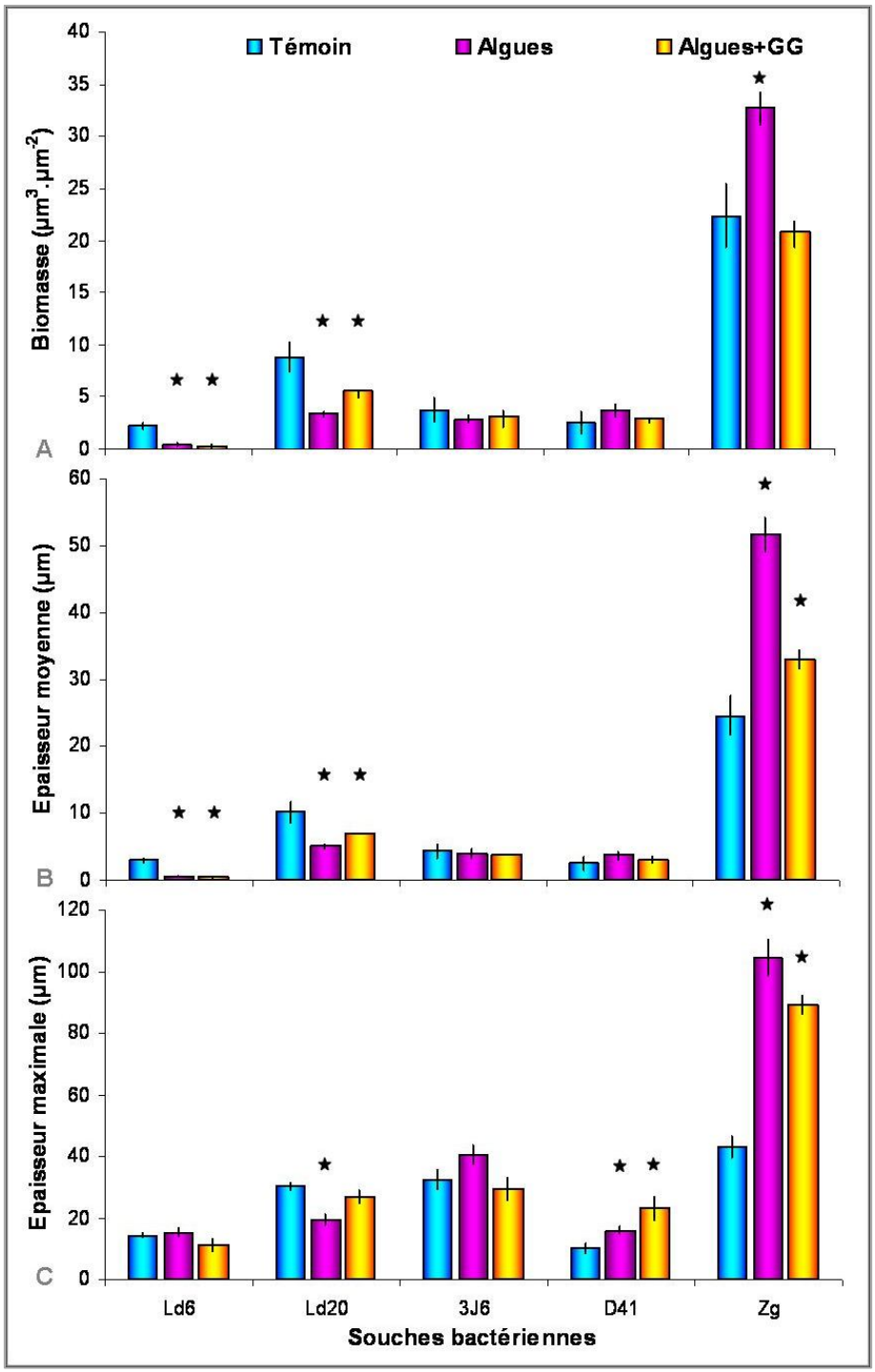


Figure 55 : Quantification des biofilms bactériens formés en chambre à flux en 24h, avec des exsudats de *L. digitata* dans le milieu de culture ZoBell.

(A) Biomasse du biofilm exprimée en $\mu m^3.\mu m^{-2}$
(B) Epaisseur maximale du biofilm exprimée en µm
(C) Epaisseur moyenne du biofilm exprimée en µm
Les souches bactériennes étudiées et représentées par des colonnes sont : *Pseudomonas* sp. Ld6 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 pour les souches bactériennes isolées de *L. digitata*, et *Pseudoalteromonas* sp. D41 et 3J6, et *Zobellia galactanivorans* pour les souches bactériennes marines de références ; Les barres correspondent aux erreurs-types ; Les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenus en présence d'exsudats d'algues par rapport aux témoins (soit $p < 0,05$) ; (▬) biofilm en miliru ZoBell ; (▬) biofilms en milieu ZoBell enrichi en exsudats d'algues (EM+Alg) ; (▬) biofilms en milieu ZoBell enrichi en exsudats d'algues stressées (EM+Alg+GG)

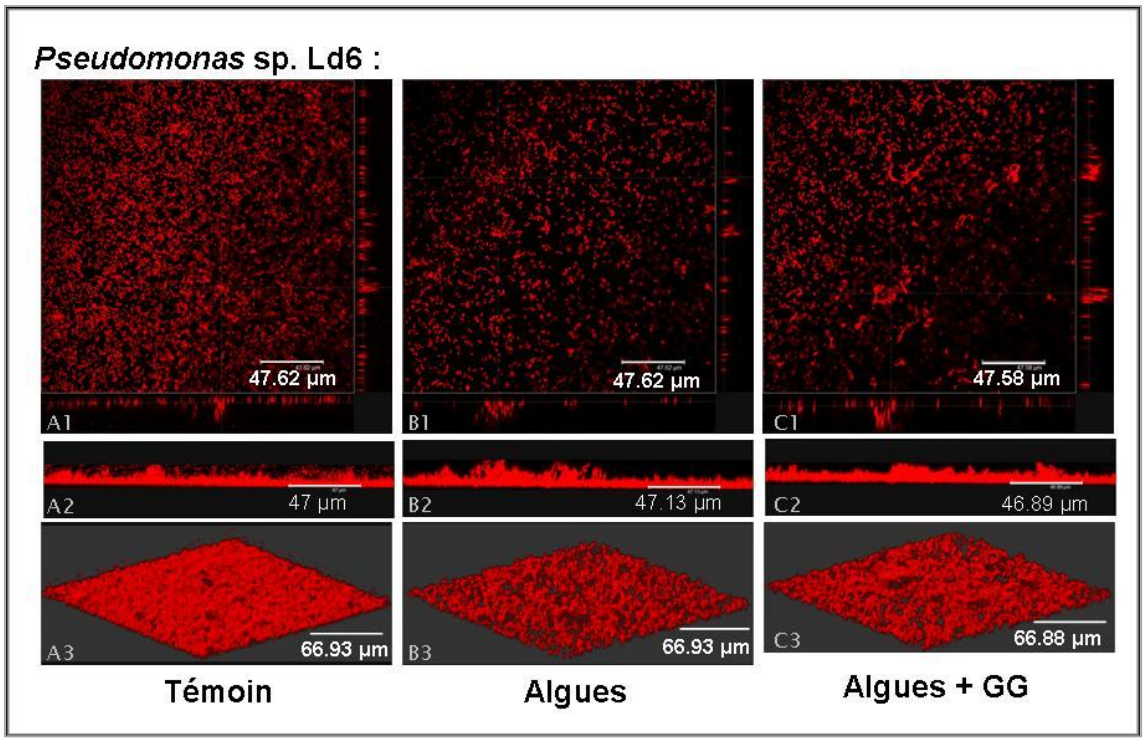


Figure 56 : Biofilms de *Pseudomonas* sp. Ld6 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata*
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata* élicitées aux GG
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

C'est également le cas pour la souche bactérienne *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 **(Figure 55)**. En effet, la biomasse du biofilm témoin est de 8,8 $\mu m^3.\mu m^{-2}$, alors que quand le biofilm est soumis à des exsudats de *L. digitata*, sa biomasse tombe à 3,4 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ en EM+Alg et à 5,6 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ en EM+Alg±GG. L'épaisseur moyenne est aussi diminuée en présence d'exsudats, passant de 10,1 µm en condition témoin à 5 et 6,9 µm d'épaisseur moyenne et maximale respectivement. Contrairement à *Pseudomonas* sp. Ld6, l'épaisseur maximale du biofilm de *Pseudomonas* sp. Ld20 est également diminuée en présence d'exsudats d'algues non élicitées, allant d'une épaisseur de 30 µm en milieu de culture ZoBell à 19,4 µm lorsque des exsudats de *L. digitata* sont ajoutés dans le milieu de culture (26,7 µm en présence d'exsudats de sporophytes élicités). Cette diminution est notamment visible avec les images du MCBL suivantes **(Figure 57)**.

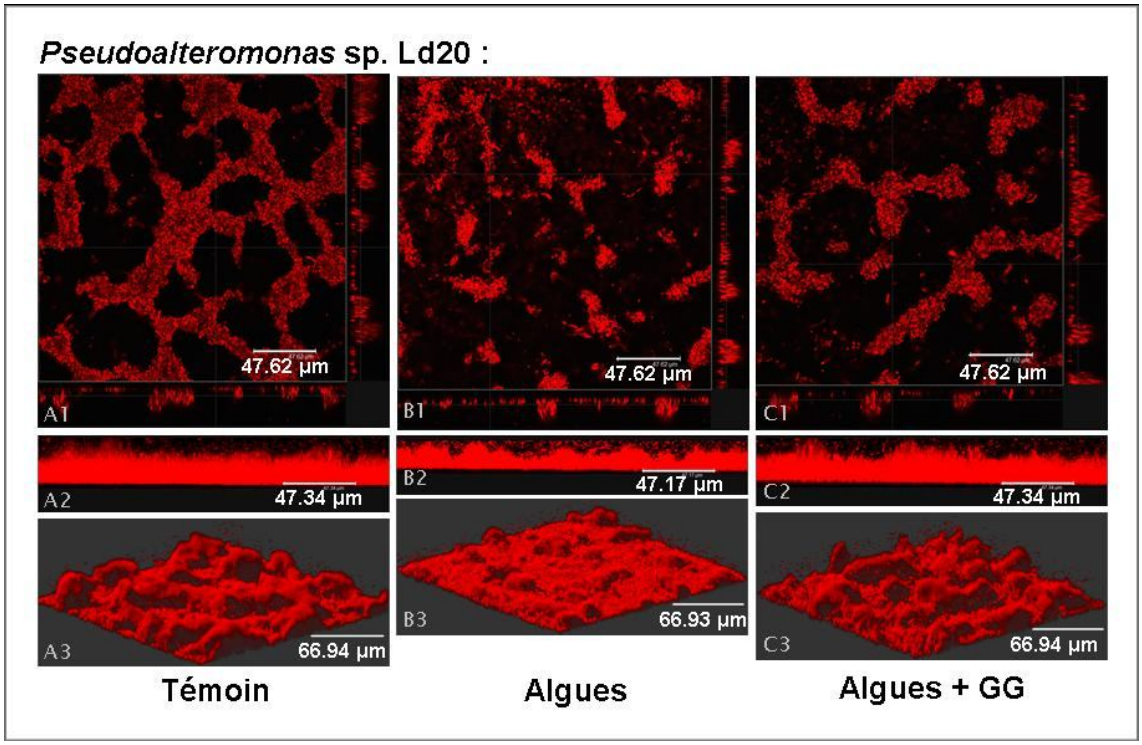


Figure 57 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata*
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata* élicitées aux GG
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

A l'inverse des biofilms précédents, le développement des biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. D41 et *Z. galactanivorans* semblent être favorisés en FC par les exsudats de *L. digitata* **(Figure 55)**.

Chez *Pseudoalteromonas* sp. D41, les exsudats de sporophytes élicités ou non aux GG semblent jouer uniquement sur l'épaisseur maximale des biofilms. En effet, la biomasse (autour des 3 $\mu m^3.\mu m^{-2}$) et l'épaisseur moyenne (aux environs des 3 µm) des biofilms restent plus ou moins constantes, sans différence statistique notable. En revanche, les épaisseurs maximales des biofilms sont augmentées en présence d'exsudats de *L. digitata* dans le milieu de culture ZoBell, passant ainsi à 10,1 µm d'épaisseur à 15,8 µm avec les exsudats EM+Alg et à 23,1 µm avec les exsudats EM+Alg±GG. L'augmentation de l'épaisseur maximale des biofilms est d'ailleurs visible sur les images prises au MCBL **(Figure 58)**.

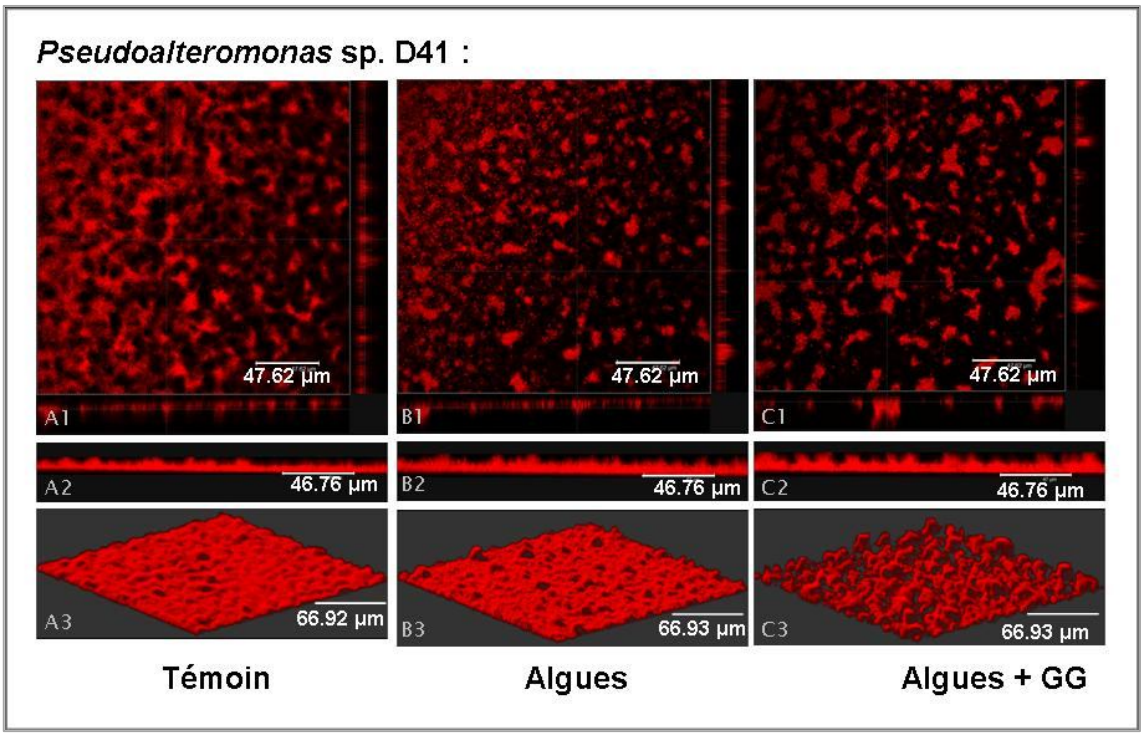


Figure 58 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. D41 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata*
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata* élicitées aux GG
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

Chez *Z. galactanivorans*, les biomasses et les épaisseurs moyennes et maximales des biofilms augmentent tous en présence des exsudats de *L. digitata*, excepté la biomasse des biofilms soumis aux exsudats EM+Alg±GG, où aucune différence statistique n'est notée (environ 21 $\mu m^3.\mu m^{-2}$), contrairement à ceux sujets aux exsudats EM+Alg avec une biomasse plus importante de 32,6 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ **(Figure 55)**. L'épaisseur moyenne passe ainsi de 24,5 µm à 51,7 µm en présence d'exsudats d'EM+Alg, et à 33 µm en présence d'EM+Alg±GG. L'épaisseur maximale de 43,2 µm en condition témoin est doublée en présence d'EM+Alg±GG (89 µm), et quasiment triplée en présence d'EM+Alg (104,5 µm). Par conséquent, les biofilms de *Z. galactanivorans* sont considérablement augmentés en présence d'exsudats de cette algue **(Figure 59)**.

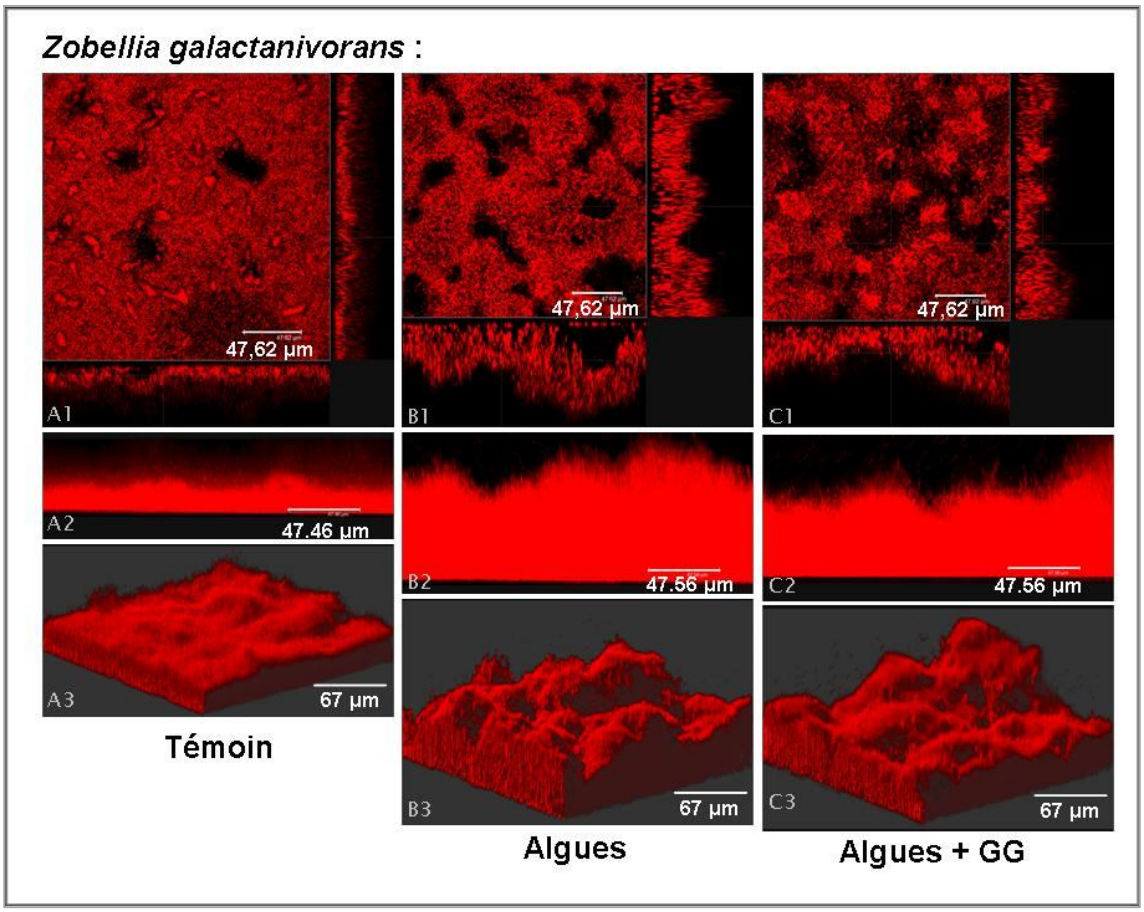


Figure 59 : Biofilms de *Zobellia galactanivorans* soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata*
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata* élicitées aux GG
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

Contrairement à toutes les souches bactériennes précédentes (sensibles à un ou aux deux types d'exsudats de *L. digitata*), les biofilms de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 exogène à cette algue ne semblent pas être modifiés **(Figure 55 et 60)**. Ainsi, les biomasses des biofilms oscillent entre 2,8 et 3,7 $\mu m^3.\mu m^{-2}$, les épaisseurs moyennes entre 3,7 et 4,3 µm, et les épaisseurs maximales entre 29,3 et 40,4 µm.

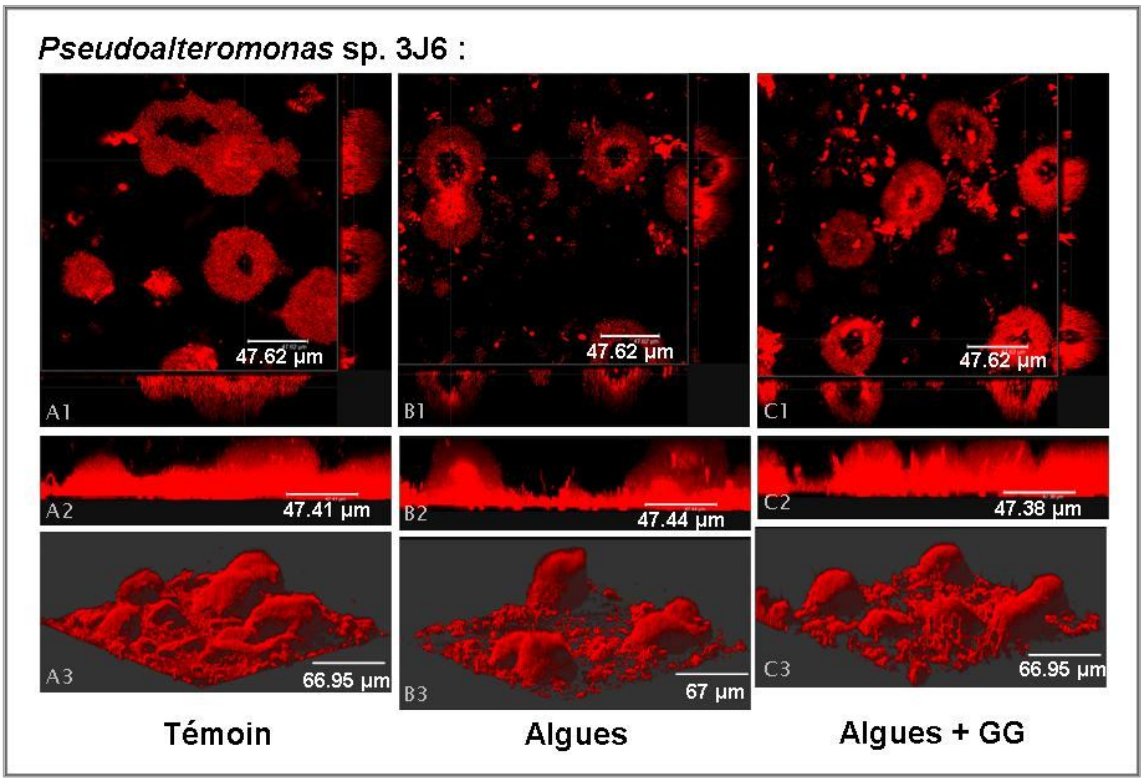


Figure 60 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 soumis à des exsudats de sporophytes de *L. digitata* élicités ou non aux GG.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata*
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en exsudats de *L. digitata* élicitées aux GG
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL

II.C - En présence de métabolites purs (approche individuelle)

Pour mieux comprendre la raison des éventuelles modifications de la structure des biofilms en présence d'exsudats d'algues, des métabolites purs ont été testés. Les biofilms ont donc été formés en 24h de flux contenant du milieu de culture ZoBell (pour le témoin toujours) et deux autres conditions : du milieu de culture ZoBell enrichi en mannitol et un autre enrichi en diiodométhane.

II.C.1 - Mannitol

Deux concentrations finales en mannitol dans les milieux de culture ZoBell ont été testées (2,5 µg.mL^{-1} et 250 µg.mL^{-1}), sur une souche isolée de *L. digitata* (*Pseudoalteromonas* sp. Ld20) et sur une souche de référence (*Z. galactanivorans*).

Les résultats obtenus sur les biofilms de *Pseudaolteromonas* sp. Ld20 montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents milieux de culture utilisés **(Figure 61)**. La biomasse des biofilms formés dans les trois types de milieu de culture oscille donc de 3,9 µm^3.µm^{-2} pour la condition témoin, à 5,4 µm^3.µm^{-2} pour le milieu contenant la plus faible concentration en mannitol. Cette différence n'est cependant pas assez importante pour être significative. Il en est de même pour l'épaisseur des biofilms : entre 4,9 et 6,4 µm de hauteur moyenne, et 29,8 à 36 ,6 µm d'épaisseur maximale. Le mannitol, aux concentrations utilisées et dans les conditions testées, n'influe donc pas sur la formation de biofilm **(Figure 62)**.

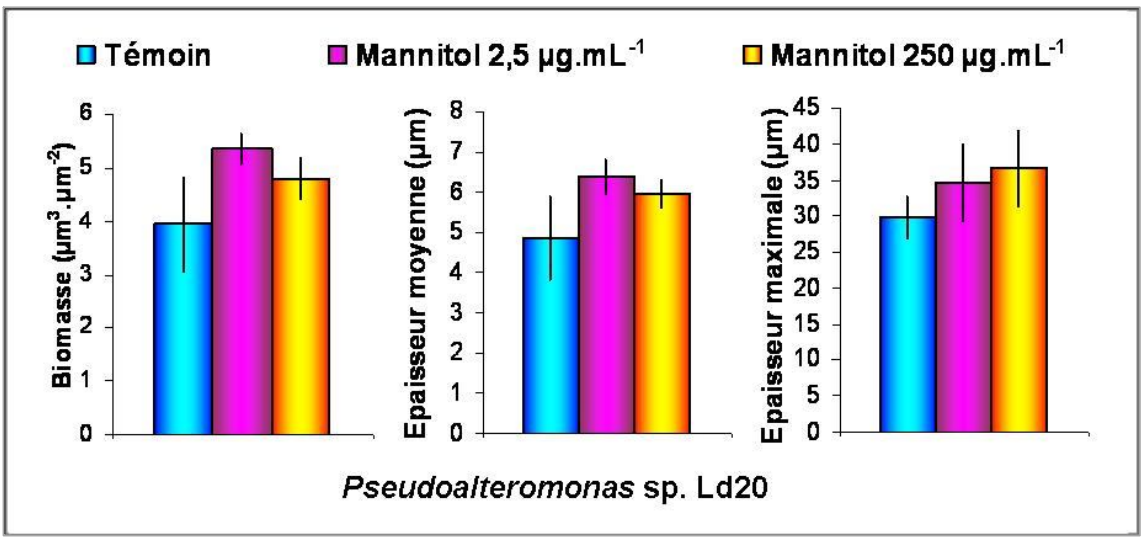


Figure 61 : Quantification des biofilms bactériens de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en FC en 24h, avec du mannitol à différentes concentrations dans le milieu de culture ZoBell.

(A) Biomasse du biofilm exprimée en µm^3.µm^{-2}
(B) Epaisseur maximale du biofilm exprimée en µm
(C) Epaisseur moyenne du biofilm exprimée en µm
Les différentes conditions de culture sont représentées par des colonnes : ( ) biofilms en milieu ZoBell ; ( ) biofilms en milieu ZoBell enrichi en mannitol à 2,5 µg.mL^{-1} ; ( ) biofilms en milieu ZoBell enrichi en mannitol à 250 µg.mL^{-1}. Les barres correspondent aux erreurs-types et les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenues en présence d'exsudats d'algues par rapport aux témoins (soit $p < 0,05$).

En revanche, les résultats obtenus chez *Z. galactanivorans* montrent que ses biofilms sont favorisés en présence de mannitol **(Figure 63)**. En effet, le milieu de culture ZoBell contenant du mannitol à une concentration de 250 µg.mL^{-1} induit la formation de biofilms plus importants. La biomasse passe de 29 µm^3.µm^{-2} (pour le témoin et la plus petite concentration de mannitol) à 46 µm^3.µm^{-2} quand le milieu est enrichi de mannitol à 250 µg.mL^{-1}. Au niveau de l'épaisseur moyenne, cela passe de 34 µm en moyenne, à 55 µm de hauteur, et pour l'épaisseur maximale, de 76 µm à 112 µm. Ces résultats confortent les observations réalisées en MCBL **(Figure 64)**, où la densité de bactéries est nettement plus importante en milieu de culture contenant du mannitol à 250 µg.mL^{-1}.

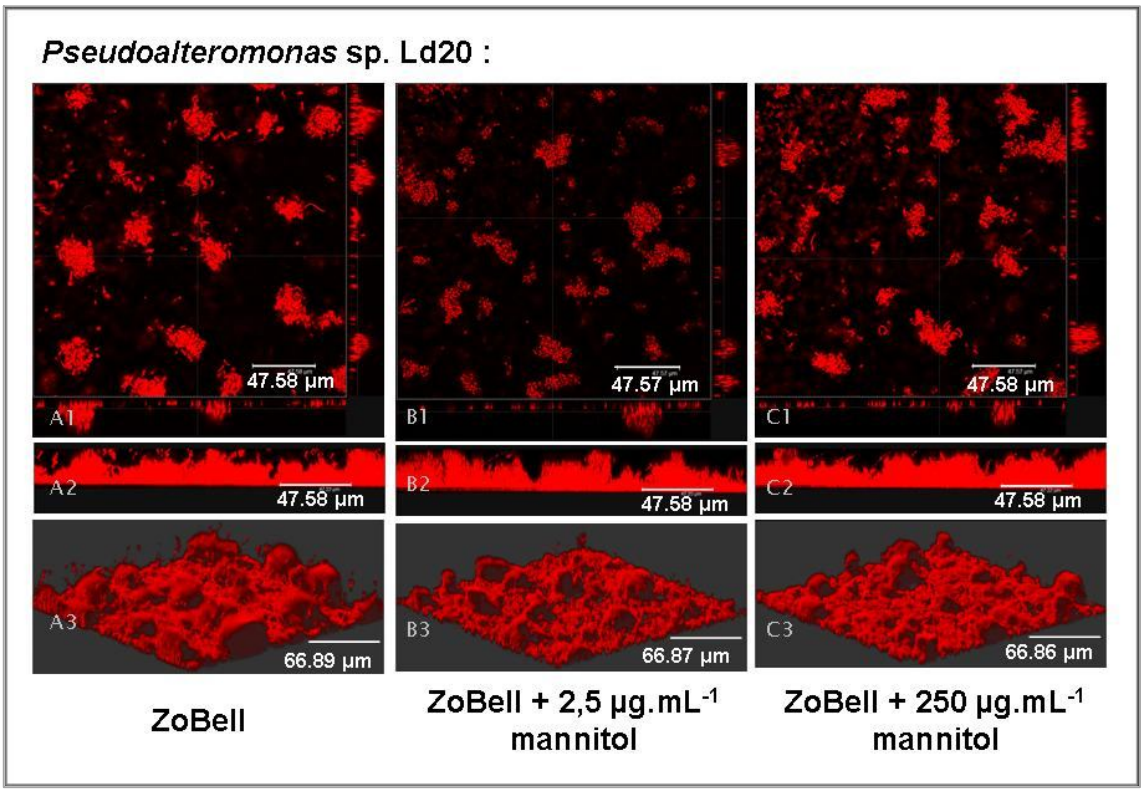


Figure 62 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en milieu de culture ZoBell plus ou moins enrichi en mannitol.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en mannitol à 2,5 µg.mL^{-1}
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en mannitol à 250 µg.mL^{-1}
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

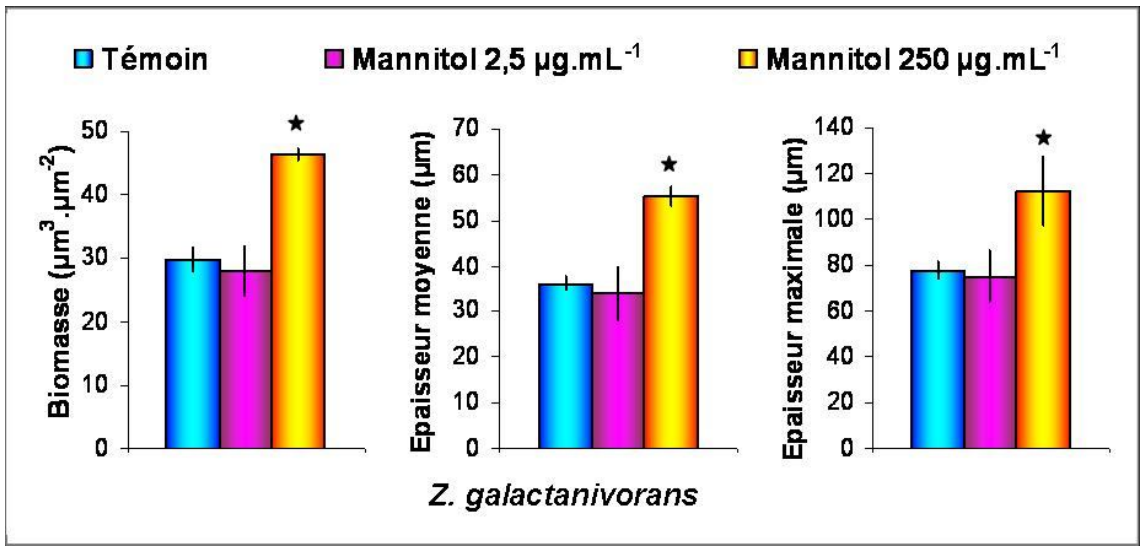


Figure 63 : Quantification des biofilms bactériens de *Z. galactanivorans* formés en chambre à flux en 24h, avec du mannitol à différentes concentrations dans le milieu de culture ZoBell.

(A) Biomasse du biofilm exprimée en $\mu m^3.\mu m^{-2}$
(B) Epaisseur maximale du biofilm exprimée en µm
(C) Epaisseur moyenne du biofilm exprimée en µm
Les différentes conditions de culture sont représentées par des colonnes : ( ) biofilms en milieu ZoBell ; ( ) biofilms en milieu ZoBell enrichi en mannitol à 2,5 $\mu g.mL^{-1}$; ( ) biofilms en milieu ZoBell enrichi en mannitol à 250 $\mu g.mL^{-1}$. Les barres correspondent aux erreurs-types et les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenues en présence d'exsudats d'algues par rapport aux témoins (soit $p < 0,05$).

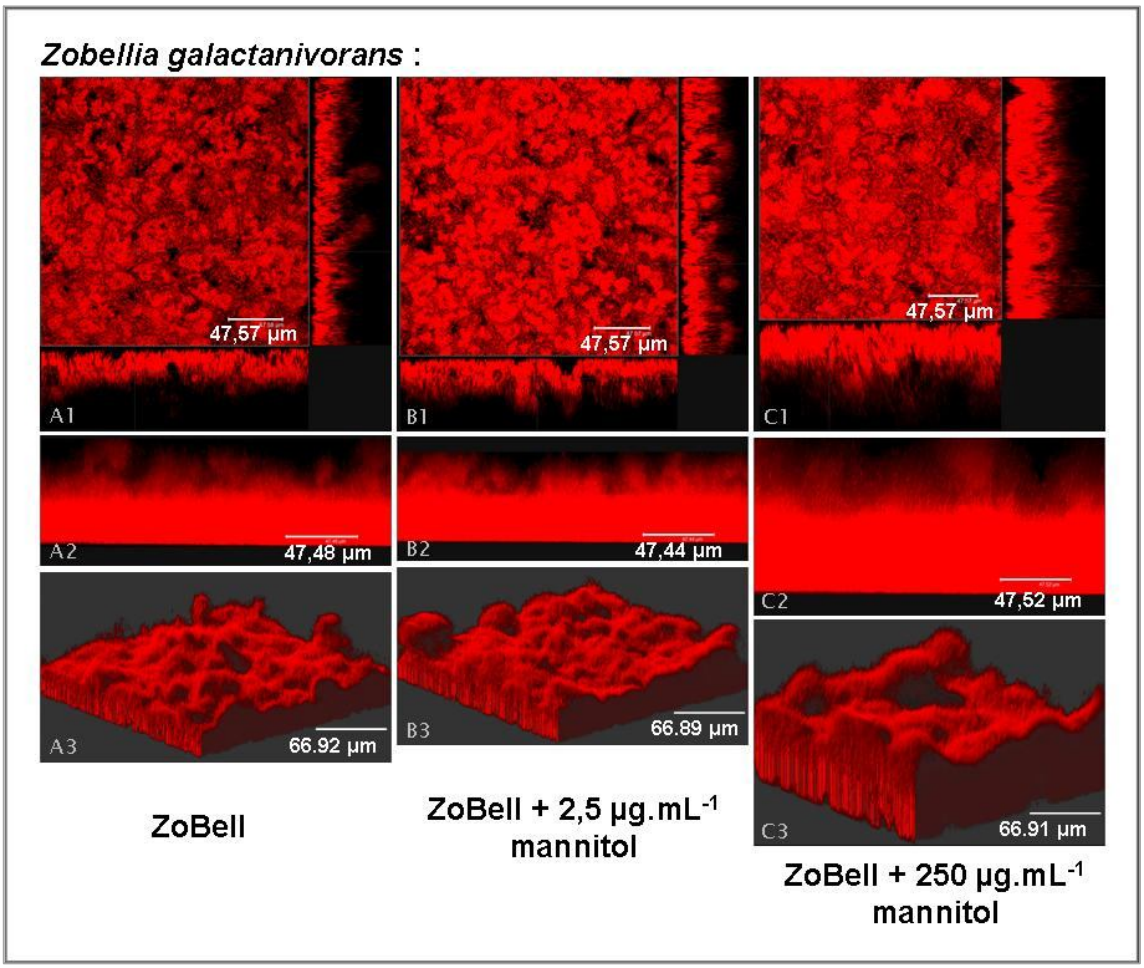


Figure 64 : Biofilms de *Z. galactanivorans* formés en milieu de culture ZoBell plus ou moins enrichi en mannitol.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en mannitol à 2,5 µg.mL^{-1}
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell enrichi en mannitol à 250 µg.mL^{-1}
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

II.C.2 - Diiodométhane

Le CH_2I_2 a été ajouté au milieu de culture ZoBell, en présence de 0,5 % de DMSO, et testé sur la formation de biofilm de trois des cinq souches bactériennes étudiées en FC : une souche isolée de *L. digitata*, *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 (celle formant le biofilm le plus important), et deux souches de référence : *Z. galactanivorans* (de par son métabolisme iodé important) et *Pseudoalteromonas* sp. D41.

Les résultats obtenus sur les biofilms de *Pseudaolteromonas* sp. Ld20 montrent que le CH_2I_2 favorise la formation de biofilm **(Figure 65)**. En effet, la biomasse du biofilm témoin est de 5,9 $\mu m^3.\mu m^{-2}$, tandis qu'avec les milieux de culture ZoBell enrichi en CH_2I_2, la biomasse augmente à 15,8 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour la 1ère série et à 11,9 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour la 2nde. Les épaisseurs des biofilms formés avec du CH_2I_2 dans les milieux de culture sont également plus importantes, excepté pour l'épaisseur moyenne de la 2ème série d'expérimentation, où il n'y a pas de différence significative de l'épaisseur du biofilm avec celui du témoin. Une augmentation est toutefois observée : de 8,1 µm pour le témoin à 15,5 µm pour le CH_2I_2. En revanche, les résultats de la 1ère série sont significativement bien différents de ceux des témoins, avec une épaisseur moyenne qui atteint les 22,8 µm. Les épaisseur maximales augmentent quant à elles de 38 µm pour la condition témoin, à 82,1 µm pour la 1ère série et à 56 µm pour la seconde. Cette augmentation est notamment visible sur les images du MCBL, où les colonies formées dans les conditions de culture enrichies en CH_2I_2 sont plus montantes que celles de la condition témoin **(Figure 66)**. Elles semblent également plus volumineuses, surtout pour les résultats de la 1ère série d'expérimentation.

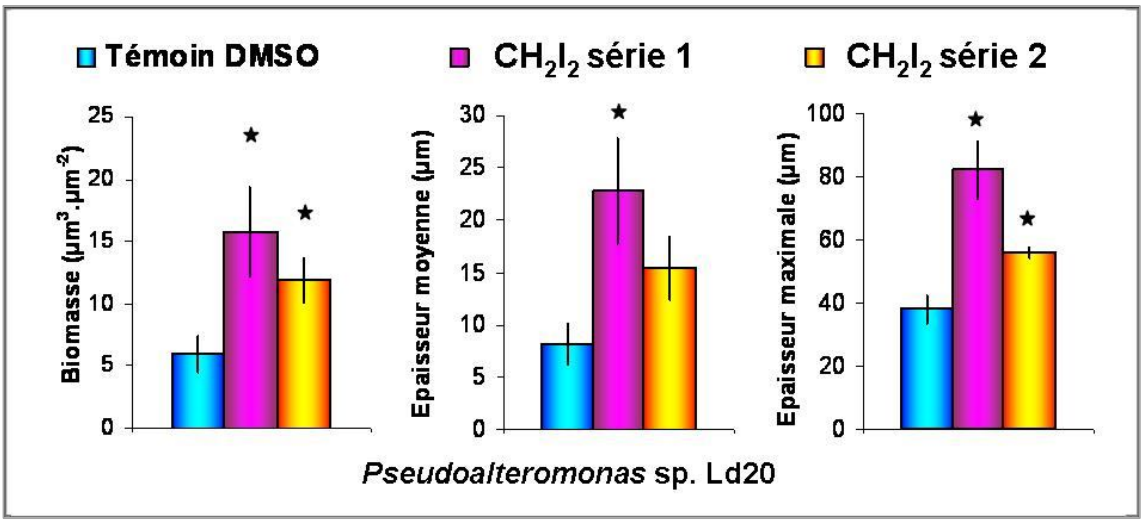


Figure 65 : Quantification des biofilms bactériens de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en chambre à flux en 24h, avec du diiodométhane dans le milieu de culture ZoBell.

(A) Biomasse du biofilm exprimée en $\mu m^3.\mu m^{-2}$
(B) Epaisseur maximale du biofilm exprimée en µm
(C) Epaisseur moyenne du biofilm exprimée en µm
Les différentes conditions de culture sont représentées par des colonnes : (■) biofilm en milieu ZoBell + 0,5 % DMSO ; (■) biofilm de la première série en milieu ZoBell enrichi en CH_2I_2 à 5 $\mu g.mL^{-1}$ (DMSO 0,5 %) ; (■) biofilm de la deuxième série en milieu ZoBell enrichi en CH_2I_2 à 5 $\mu g.mL^{-1}$ (DMSO 0,5 %). Les barres correspondent aux erreurs-types et les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenues en présence d'exsudats d'algues par rapport aux témoins (soit $p < 0,05$).

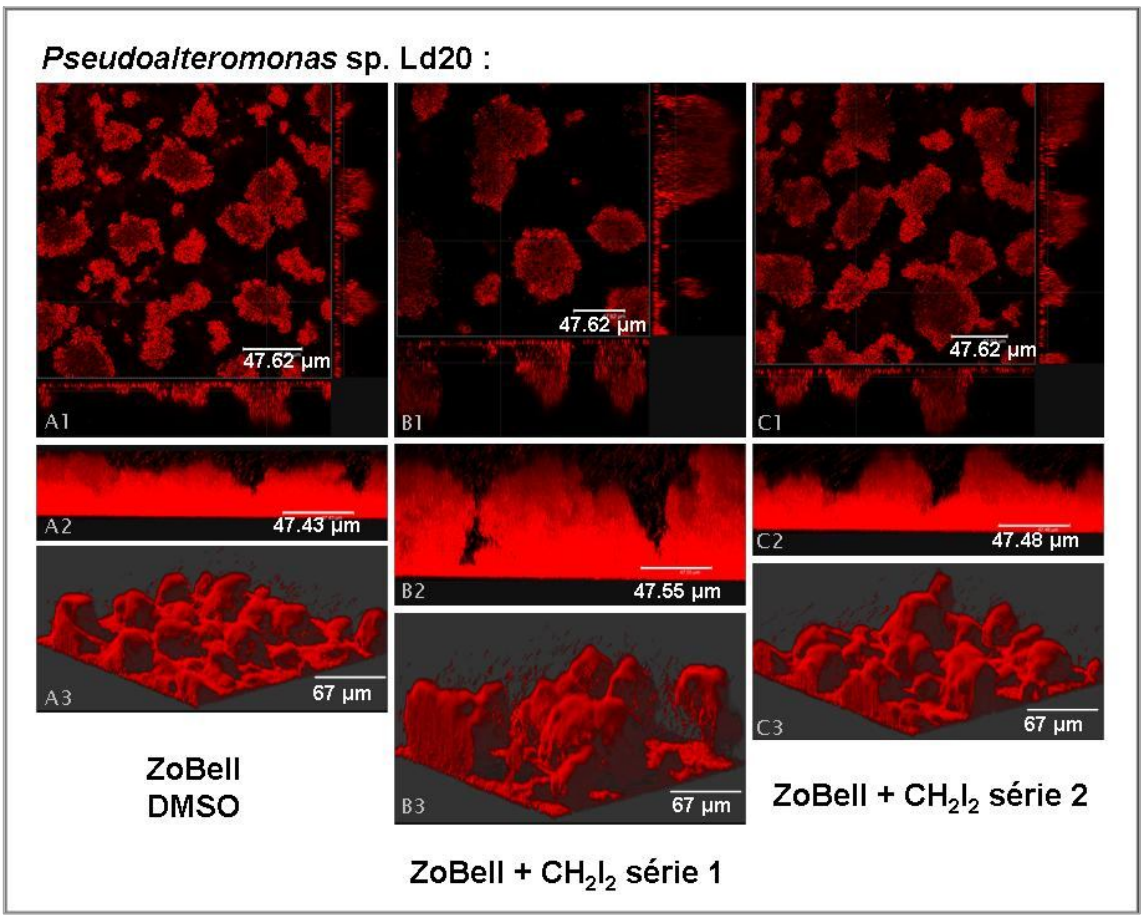


Figure 66 : Biofilms de *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 formés en milieu de culture ZoBell avec ou sans diiodométhane.

(A) Biofilm témoin formé en milieu de culture ZoBell
(B) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell + CH_2I_2 de la première série d'expérimentation
(C) Biofilm formé en milieu de culture ZoBell + CH_2I_2 de la deuxième série d'expérimentation
(1) coupes sagittales avec les vues de profils (x,y) en bas et (y,z) à droite ; (2) empilement des coupes transversales ; (3) visualisation du biofilm en 3D. Biofilms formés en 24h sous un flux à 0,8 rpm. L'ensemble des bactéries est coloré au Syto 61 Red avant d'être visualisé en MCBL.

Chez *Z. galactanivorans*, 2 séries d'expérimentation avec des milieux de culture enrichis en CH_2I_2 ont également été effectuées. Les résultats obtenus ont montré des différences de formation de biofilm uniquement pour la 2ème série d'expérimentation **(Figure 67)**. En effet, la biomasse du biofilm cultivé en condition témoin (ZoBell + DMSO 0,5 %) est de 13,7 $\mu m^3.\mu m^{-2}$, et de 13,1 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour la 1ère série de biofilm formé en présence de CH_2I_2, tandis qu'elle atteint 17,1 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ dans la 2ème série. Il en est de même pour les épaisseurs moyennes et maximales des biofilms. En condition témoin, le biofilm a une épaisseur moyenne de 18,5 µm et une épaisseur maximale de 72,6 µm, et en condition iodée lors de la 1ère série, le biofilm a une épaisseur moyenne de 16,9 µm et maximale de 67,8 µm, ce qui ne donne pas de différence significative

entre ces deux biofilms. A l'inverse, les épaisseurs mesurées lors de la 2ème série sont significativement plus importantes, avec une épaisseur moyenne de 23,4 µm et maximale de 88,2 µm.

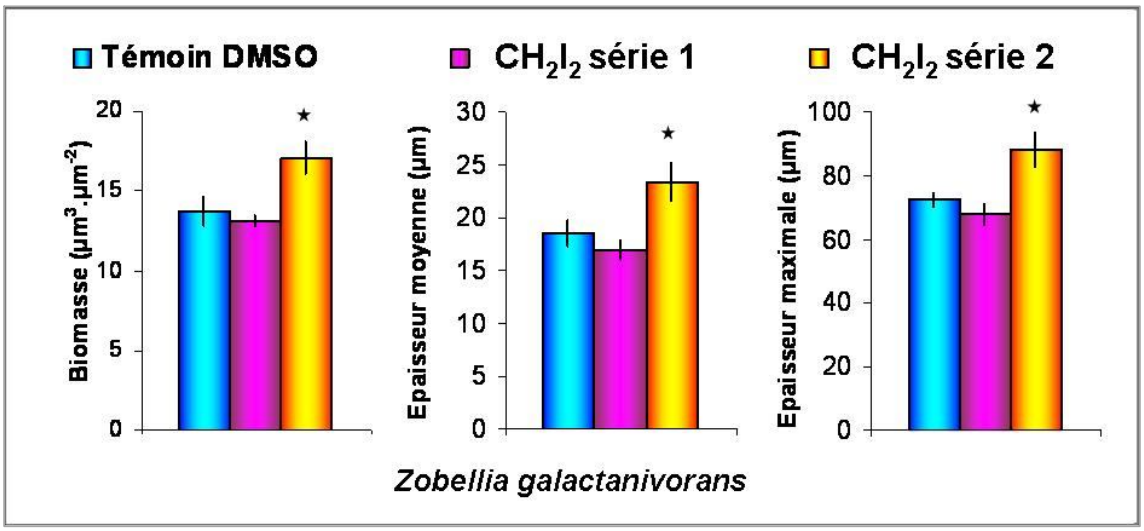


Figure 67 : Quantification des biofilms bactériens de *Z. galactanivorans* formés en chambre à flux en 24h, avec du diiodométhane dans le milieu de culture ZoBell.

(A) Biomasse du biofilm exprimée en $\mu m^3.\mu m^{-2}$
(B) Epaisseur maximale du biofilm exprimée en µm
(C) Epaisseur moyenne du biofilm exprimée en µm
Les différentes conditions de culture sont représentées par des colonnes : ( ) biofilm en milieu ZoBell + 0,5 % DMSO ; ( ) biofilm de la première série en milieu ZoBell enrichi en CH_2I_2 à 5 $\mu g.mL^{-1}$ (DMSO 0,5 %) ; ( ) biofilm de la deuxième série en milieu ZoBell enrichi en CH_2I_2 à 5 $\mu g.mL^{-1}$ (DMSO 0,5 %). Les barres correspondent aux erreurs-types et les étoiles signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenues en présence d'exsudats d'algues par rapport aux témoins (soit $p < 0,05$).

Enfin, la dernière souche bactérienne étudiée en condition iodée est la souche de référence *Pseudoalteromonas* sp. D41. Deux conditions témoins contenant du DMSO à 0,5 % et deux conditions iodées ont été effectuées. Les résultats obtenus n'ont pas été reproductibles pour les témoins. En revanche, ceux obtenus pour les milieux de culture enrichis en CH_2I_2 sont très reproductibles **(Figure 68)**.

En effet, le biofilm formé en condition témoin de la 2ème série est moins dense et moins épais que le biofilm obtenu dans les mêmes conditions de 1ère série. Par conséquent, si les deux autres séries d'expérimentation des milieux de culture enrichis en CH_2I_2 sont comparées au témoin DMSO 1, alors aucune différence significative n'est observée. A l'inverse, si les biofilms formés en conditions iodées sont comparés au témoin DMSO 2, alors des différences significatives sont observées, tant au niveau de la

biomasse qu'au niveau des épaisseurs moyennes et maximales. Ainsi, les biofilms formés en conditions iodées ont une biomasse d'environ 14,5 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ et 17, 7 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour la première condition témoin, contre 8,4 $\mu m^3.\mu m^{-2}$ pour la seconde condition témoin. Les épaisseurs moyennes des conditions iodées sont autour de 16,5 µm d'épaisseur, ce qui est un peu plus faible que l'épaisseur obtenue en condition témoin 1 (20 µm), et significativement plus importante que celle obtenue en condition témoin 2 (9,5 µm). Enfin, les épaisseurs maximales obtenues pour la condition témoin 1 ainsi que les 2 conditions enrichies en CH_2I_2 sont d'environ 50 µm, contre un petit 29 µm maximum pour la condition témoin 1.

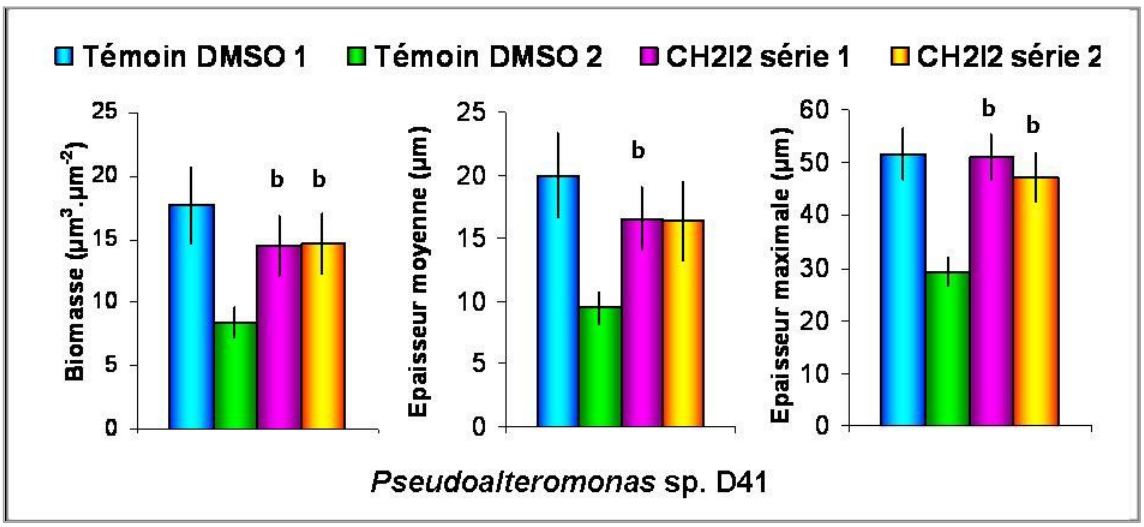


Figure 68 : Quantification des biofilms bactériens de *Pseudoalteromonas* sp. D41 formés en chambre à flux en 24h, avec du diiodométhane dans le milieu de culture ZoBell.

(D) Biomasse du biofilm exprimée en $\mu m^3.\mu m^{-2}$
(E) Epaisseur maximale du biofilm exprimée en µm
(A) Epaisseur moyenne du biofilm exprimée en µm
Les différentes conditions de culture sont représentées par des colonnes : (■) 1er biofilm formé en milieu ZoBell + 0,5 % DMSO ; (■) 2ème biofilm formé en milieu ZoBell + 0,5 % DMSO ; (■) biofilm de la première série en milieu ZoBell enrichi en CH_2I_2 à 5 $\mu g.mL^{-1}$ (DMSO 0,5 %) ; (■) biofilm de la deuxième série en milieu ZoBell enrichi en CH_2I_2 à 5 $\mu g.mL^{-1}$ (DMSO 0,5 %). Les barres correspondent aux erreurs-types, et les lettres signifient qu'il y a une différence statistique des valeurs obtenues en présence de diiodométhane par rapport au témoin DMSO 1 (a) et au témoin DMSO 2 (b) (soit $p < 0,05$).

III - DISCUSSION GENERALE

L'étude de l'adhésion en EMSF sur microplaques en fond en verre a révélé des capacités d'adhésion différentes selon les souches bactériennes, allant d'une adhésion nulle ou très faible, à un fort pouvoir d'adhésion.

Ainsi les souches *Curtobacterium* sp. Ld4, *Arthrobacter* sp. Ld5, *Agrococcus* sp. Ld7, *Cobetia* sp. Ld8, *Paracoccus* sp. Ld10 et *Rhodococcus* sp. Ld17, toutes isolées à partir de crampons de *L. digitata*, ont une adhésion nulle ou très faible. Les souches *Pseudomonas* sp. Ld6 (*a priori* présente sur toutes les parties du thalle), *Kocuria* sp. Ld15 (isolée de crampons), *Paracoccus* sp. Ld16 (isolée de stipes), et les *Pseudoalteromonas* sp. Ld18 (isolée de crampons et lames) et Ld20 (isolée de méristèmes), ont quant à elles un pouvoir d'adhésion faible. Enfin, une forte adhésion sur les microplaques a été observée chez les souches bactériennes *Pseudoalteromonas* sp. Ld9 et Ld19, toutes deux isolées à partir de méristèmes, *Algibacter* sp. Ld11 et Ld13, *Cellulophaga* sp. Ld12, et *Curtobacterium* sp. Ld14, provenant toutes de crampons de *L. digitata*. Par conséquent, le pouvoir d'adhésion est propre à la souche bactérienne, et est indépendant de leur zone d'isolement sur les thalles de *L. digitata*. Les bactéries à Gram positif semblent toutefois être moins adhérentes que les bactéries à Gram négatif.

De plus, trois de ces souches associées à cette algue (*Pseudomonas* sp. Ld6, *Agrococcus* sp. Ld7 et *Pseudoalteromonas* sp. Ld20) ont été étudiées en cellules à flux (FC), afin d'observer la formation ou non d'un biofilm après 24h de flux de milieu de culture ZoBell. Il s'est avéré que seule la souche *Agrococcus* sp. Ld7 ne forme pas de biofilm dans ces conditions de culture, ne donnant lieu qu'à une adhésion irréversible et dispersée des cellules bactériennes **(Figure 53 p.169)**. Par conséquent, toutes les souches bactériennes ne sont pas capables de former de biofilm. Il se peut que cette souche soit une souche opportuniste, nécessitant la formation de biofilm par des souches bactériennes pionnières ou d'un substrat plus riche en nutriments (organique, comme la surface de l'algue), afin de pouvoir à son tour se développer sur la surface conditionnée à coloniser (Schneider & Marshall, 1994; Schneider *et al.*, 2006). De même, on estime entre 1 à 5 % la biodiversité bactérienne marine cultivable, le reste étant considéré « VBNC » (viable but not culturable). Par conséquent, les différences observées en FC

ne sont pas surprenantes, car sur les bactéries choisies, certaines sont peut-être à la limite entre le cultivable et le VBNC, et ne sont pas susceptibles de s'épanouir en biofilm. Les deux autres souches bactériennes sont quant à elles capables de former un biofilm sur verre en 24h et en milieu de culture ZoBell.

En ce qui concerne les souches bactériennes de référence, une adhésion nulle est observée uniquement pour la souche *Bacillus* sp. 4J6, isolée d'une lame de verre immergée en eau de mer, et la souche *P. haloplanktis*, isolée d'environnements marins. Le faible pouvoir d'adhésion de *Bacillus* sp. 4J6 avait été mis en évidence par les travaux de thèse de Dheilly (2007) utilisant des chambres à flux, tout comme l'adhésion faible à moyenne des souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J3 et 3J6, *Paracoccus* sp. 4M6, *Algibacter* sp. 1M6 et *Vibrio* sp. D01, toutes isolées à partir de surface en verre immergée en eau de mer. Ces souches bactériennes marines de référence ont également une adhésion faible à moyenne dans les tests réalisés dans l'étude d'adhésion en microplaques. Enfin, une forte adhésion a été observée chez *Pseudoalteromonas* sp. 3J6GFP, impliquant donc que l'ajout du plasmide pCJS10 marqué par un gène codant la protéine de fluorescence verte GFP pourrait modifier légèrement le pouvoir d'adhésion de la souche *Pseudoalteromonas* sp. 3J6. *Pseudoalteromonas* sp. D41, isolée d'une surface en Téflon immergée en eau de mer a également un fort pouvoir adhésif sur microplaques en fond en verre. Ce fort pouvoir d'adhésion avait déjà été démontré sur des supports en verre et en Téflon, comparé à l'autre souche de référence provenant d'Ifremer, *Vibrio* sp. D01 (Pradier *et al.*, 2005). De plus, *Cobetia marina*, *Zobellia galactanivorans* et *P. haloplanktis* sont des souches bactériennes principalement isolées d'algues, mais également présentes sur d'autres surfaces marines (préférentiellement organiques), et ont montré une forte capacité à adhérer en microplaques.

En présence de métabolites d'extraits de *L. digitata*, aucun effet n'a été observé sur l'adhésion des souches *Curtobacterium* sp. Ld4 et *Arthrobacter* sp. Ld5, toutes deux isolées de crampons de l'algue, et ayant également une très faible adhésion. De même, aucun effet n'a été noté chez les souches de référence *P. carrageenovora*, *P. haloplanktis*, *C. marina* et *Vibrio* sp. D01. En revanche, les autres souches testées ont eu leur adhésion modifiée par un ou plusieurs mélanges de métabolites extraits de l'algue.

De manière globale, les souches bactériennes isolées de *L. digitata* ont vu leur pouvoir d'adhésion diminuer en présence des métabolites extraits de l'algue, tandis que

les souches bactériennes marines de référence ont plutôt eu une augmentation de leur adhésion.

Toutes les souches associées à *L. digitata* et dont l'adhésion a été diminuée en présence de métabolites extraits de crampon, ont été isolées de cette même partie du thalle, le crampon. Toutefois, d'autres souches associées aux crampons de l'algue n'ont pas pour autant été sensibles à ces extraits.

De même, l'adhésion des souches associées à l'algue n'a pas été influencée par les métabolites extraits de stipes à l'acétate d'éthyle, qui ont en revanche augmenté l'adhésion des quelques souches de référence. Les souches associées à *L. digitata* et dont l'adhésion est diminuée par les métabolites de stipes extraits au méthanol, proviennent des quatre parties du thalle de l'algue : crampon, stipe, méristème et lame. Par conséquent, il semblerait que les métabolites extraits de stipes, principalement des métabolites polaires (extraits méthanoliques), soient plus actifs sur l'adhésion des souches associées à *L. digitata*, contrairement aux métabolites de polarité moyenne (extraits à l'acétate d'éthyle). Ils ont également un éventail d'action plus important que les métabolites extraits de crampons (limités aux souches associées aux crampons), en affectant des souches bactériennes présentes sur toutes les parties de la surface de l'algue. Cependant, ces deux types de métabolites extraits de stipes sont moins actifs que l'unique mélange de métabolites obtenus à partir d'extraits de lames au méthanol.

En effet, l'extrait de lames au méthanol est celui qui a le plus influé sur l'adhésion des souches bactériennes testées, avec une prédominance pour une diminution de l'adhésion, que ce soit chez les souches associées à cette algue ou chez les souches de référence. Seules les souches bactériennes *Paracoccus* sp. Ld16, *Pseudoalteromonas* sp. D41, *Algibacter* sp. Ld13 et 1M6 ont leur adhésion augmentée en présence de cet extrait. Une diminution de l'adhésion est quant à elle observée chez les souches *Pseudomonas* sp. Ld6, *Cobetia* sp. Ld8, *Pseudoalteromonas* sp. Ld9 et *Curtobacterium* sp. Ld14, en ce qui concerne les souches bactériennes associées à l'algue, et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6GFP, *Zobellia galactanivorans* et *Paracoccus* sp. 4M6 pour les souches de référence.

Par conséquent, les diverses réactions d'adhésion observées chez les souches bactériennes sont spécifiques à la souche. Les genres bactériens et les parties du thalle à l'origine de l'isolement bactérien ne semblent pas apporter un élément de réponse expliquant les différences de sensibilité de l'adhésion en présence de métabolites

extraits au méthanol et à l'acétate d'éthyles des différentes parties de l'algue. De plus, l'extrait de lame est le plus actif, ce qui pourrait expliquer pourquoi la lame reste dépourvue de macro-épiphytisme, à l'inverse du crampon dont la biodiversité bactérienne est la plus élevée par rapport aux autres parties du thalle. Enfin, il semblerait que les extraits de *L. digitata* favoriseraient l'adhésion des souches bactériennes de référence. Des études ont récemment montré que des extraits au MeOH de thalle de *L. digitata* inhibaient la croissance de bactéries marines pathogènes, mais beaucoup moins que des extraits à l'hexane qui pouvaient inhiber jusqu'à 100 % (Dubber & Harder, 2008). Les métabolites non volatils et apolaires extraits de différentes parties du thalle de laminaires avec des solvants organiques ne sont pas nécessairement diffusés dans l'hydrosphère immédiate de l'algue, et sont majoritairement stockés et sans activité en surface, dans l'algue vivante, ne se trouvant donc pas obligatoirement au contact en tant que tels avec les bactéries. Les résultats obtenus ne correspondent donc pas au contexte écologique dans laquelle la présence des métabolites actifs au contact des bactéries à la surface des algues, peut être très limitée, voire inexistante. Les bactéries peuvent être vraiment exposées à ces métabolites uniquement lorsqu'elles tentent de détruire les structures cellulaires. Les bactéries isolées à la surface de *L. digitata* pourraient être très sensibles à ces métabolites, ce qui favoriserait leur co-evolution, alors que des bactéries exogènes insensibles aux extraits ne seraient pas sélectionnées à la surface de *L. digitata* par l'influence d'autres facteurs, comme la compétition avec d'autres bactéries.

Dans ce travail de thèse, et afin de mieux mimer un contexte écologique, des exsudats de *L. digitata* ont été testés sur l'adhésion et la formation de biofilm de différentes souches bactériennes de référence et associées à *L. digitata*. Des études ont montré que lorsque l'algue est élicitée par des oligoguluronates, mimant la dégradation de la paroi de l'algue par des bactéries alginolytiques ou autres prédateurs, celle-ci émet dans son hydrosphère proche des composés différents de ceux émis constitutivement en condition normale (Küpper *et al.*, 2001; Küpper *et al.*, 2002; Potin *et al.*, 2002; Küpper *et al.*, 2006; Küpper *et al.*, 2008; Ritter *et al.*, 2008; Goulitquer *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, non publié). Par conséquent, ce sont des mélanges de tous ces composés libérés constitutivement (EM+Alg) ou sous l'action d'un stress (EM+Alg±GG) qui ont été testés.

Ainsi, la grande majorité des souches bactériennes associées à *L. digitata* sont sensibles aux deux types d'exsudats de cette algue, avec une dominance pour une diminution de l'adhésion et de la formation de biofilm. Seule l'adhésion de *Kocuria* sp. Ld15 semble être insensible aux exsudats. Comme cette souche bactérienne a été isolée à partir de crampons de cette algue, il se pourrait qu'elle soit, non pas associée à cette algue, mais aux autres micro- et/ou macro-organismes présents à la surface des crampons de cette laminaire (Blight & Thompson, 2008), ce qui expliquerait l'absence de modification de son adhésion en présence des deux types d'exsudats. En ce qui concerne les autres souches bactériennes associées à cette algue, la grande majorité d'entre elles ont une diminution de leur pouvoir d'adhésion lorsqu'elles sont en contact d'exsudats d'algues non stressées, excepté *Curtobacterium* sp. Ld4, *Cellulophaga* sp. Ld12, toutes deux également isolées de crampons. En revanche, en présence d'exsudats d'algues élicitées par des GG, l'adhésion de *Curtobacterium* sp. Ld4 augmente, tandis que celle de *Cellulophaga* sp. Ld12 diminue. Seule la souche bactérienne *Paracoccus* sp. Ld10 (isolée de crampons) voit également son pouvoir d'adhésion augmenter en présence d'EM+Alg+GG. Toutes les autres souches bactériennes testées ont eu une diminution de leur adhésion en présence des deux types d'exsudats. Ceci a également été observé lors de l'étude de la formation de biofilm de *Pseudomonas* sp. Ld6, *Pseudoalteromonas* sp. Ld20 et *Agrococcus* sp. Ld7 (même si cette dernière ne forme pas de biofilm après 2h d'adhésion en FC) en présence des exsudats EM+Alg±GG, avec une diminution significative de la biomasse et de l'épaisseur moyenne de leur biofilm. En revanche, l'épaisseur maximale de ces trois souches ne change pas en présence d'exsudats EM+Alg+GG, ni en présence d'exsudats EM+Alg chez *Pseudomonas* sp. Ld6.

Par conséquent, les résultats obtenus en adhésion et en formation de biofilm sur ces souches isolées de *L. digitata* sont cohérents, montrant un effet principalement inhibiteur des exsudats d'algues. Les algues sont capables de produire des molécules de défense chimique antimicrobiennes cibles, principalement des métabolites secondaires, favorisant leur résistance contre les microorganismes marins tels que les champignons (Kubanek *et al.*, 2003). De ce fait, la simple présence de thalles de *L. digitata* ou d'eau de mer conditionnée en contact de cette algue diminuerait la composition de la biodiversité de champignons et de bactéries planctoniques (Lam & Harder, 2007; Lam *et al.*, 2008a; Lam *et al.*, 2008b). Des expériences avec des thalles de *L. digitata* ont également montré que son système de HPO est capable de désactiver les molécules de

communication de la bactérie marine *Chromobacterium violaceum* CV026 (les AHL du quorum sensing), illustrant ainsi le mécanisme naturel de défense de cette algue pour empêcher la formation de biofilm à sa surface (Borchardt *et al.*, 2001). Par conséquent, il se pourrait que la communication entre les bactéries des souches isolées de *L. digitata* soit perturbée par les divers composés présents dans ces exsudats d'algues stressées ou non. Il se pourrait également que ces composés aient une activité bactéricide, permettant ainsi à l'algue de contrôler son épiphytisme bactérien, en diminuant l'adhésion et la formation de biofilm des souches bactériennes présentes à sa surface.

En ce qui concerne les souches bactériennes marines de référence, aucun effet des deux types d'exsudats de l'algue n'a été observé sur leur adhésion, excepté pour *Z. galactanivorans*, où l'adhésion est diminuée en présence d'exsudats EM+Alg+GG, mais uniquement dans la deuxième série d'expérimentation. En effet, dans la première série, l'adhésion n'est pas modifiée. En revanche, lorsque cette souche bactérienne est cultivée en présence de ces deux types d'exsudats, les biofilms formés voient leur biomasse, leur épaisseur moyenne et maximale augmenter. Par conséquent, les exsudats de *L. digitata* EM+Alg±GG influent uniquement sur la formation de biofilm de cette souche. Cette souche bactérienne, isolée à partir de l'algue rouge *Delesseria sanguinea* (Barbeyron *et al.*, 2001), semble donc trouver dans les exsudats de cette algue brune, des composés favorisant la formation de son biofilm. C'est pourquoi, l'adhésion et la formation de cette souche ont par la suite été observées en présence de composés purs, potentiellement émis par l'algue en condition de stress ou non : le diiodométhane (CH_2I_2), le mannitol, et un acide hypobromeux (HOBr) présent dans le produit commercial Stabrex ST40® (uniquement en adhésion pour ce dernier composé).

Ainsi, les deux composés mannitol et CH_2I_2 favorisent l'adhésion, tandis qu'une seule concentration de HOBr la diminue. De même, des concentrations de 250 $\mu g.mL^{-1}$ de mannitol et de 5 $\mu g.mL^{-1}$ de CH_2I_2 dans le milieu de culture ZoBell favorisent le développement de son biofilm, et ce aussi bien en augmentant sa biomasse que son épaisseur moyenne et maximale. Le mannitol, qui est un sucre diol exsudé continuellement par l'algue à sa surface, fourni à *Z. galactanivorans* une source de carbone semblable à celle de l'algue rouge sur laquelle cette bactérie a été isolée. Le mannitol favorisait donc son adhésion et son développement en biofilm à la surface de cette algue brune. Il est d'ailleurs bien connu que les cellules bactériennes se fixent généralement sur des surfaces riches en nutriments, ce qui permet aux bactéries d'être

plus résistantes en cas d'appauvrissement organique du milieu environnant, et d'être par la même occasion protégées au sein du biofilm formé (Costerton *et al.*, 1981; Kjelleberg *et al.*, 1982; Branda *et al.*, 2005). De plus, une souche bactérienne très proche de *Z. galactanivorans* a été isolée de spores d'Ulves, causant une inhibition de l'adhésion de ces spores lorsque le biofilm est néoformé (1,5 à 3h), et à l'inverse, favorisant l'établissement des spores lorsque le biofilm est plus âgé (48h) (Patel *et al.*, 2003; Silva-Aciares & Riquelme, 2008). Ainsi, cette souche bactérienne pourrait être présente sur les trois lignées d'algues (verte, rouge et brune), et donc être présente sur notre modèle d'étude *L. digitata*. De même, cette bactérie fait l'objet d'une étude génomique au sein de plusieurs équipes de la SBR. Ces équipes ont mis en évidence un métabolisme iodé important (Michel *et al.*, résultats non publié) qui pourrait expliquer la résistance et même l'apport bénéfique que ce CHV, le CH_2I_2, libéré en grande quantité par l'algue suite à l'application de GG, apporte à cette souche bactérienne marine de référence.

L'adhésion et la formation de biofilm d'une autre souche bactérienne de référence ont été étudiées en présence des exsudats de *L. digitata*. Il s'agit de la souche modèle de l'Ifremer, *Pseudoalteromonas* sp. D41. Bien que son adhésion ne soit pas modifiée par la présence d'exsudats, la formation de son biofilm est quant à elle modifiée. En effet, quelque soit le type d'exsudats testé, aucun effet n'est observé sur la biomasse ou l'épaisseur moyenne de son biofilm. En revanche, son épaisseur maximale est augmentée. Par conséquent, la structure du biofilm est modifiée, formant des amas bactériens plus hauts, mais gardant un biofilm d'une épaisseur moyenne et d'une biomasse identiques à celles obtenues en culture ZoBell. *Pseudoalteromonas* sp. D41 a été isolée sur une surface en téflon au bout de 24h d'immersion en eau de mer (Rubio, 2002), donc sur une surface inorganique. Ses caractéristiques métaboliques ne sont pas encore connues. Il est cependant bien connu que les bactéries du genre *Pseudoalteromonas* sont régulièrement rencontrées en association avec des organismes marins, tels que les invertébrés et les algues (Bowman, 2007). Par conséquent, cette souche pourrait potentiellement être trouvée à la surface de thalles de *L. digitata*.

Tout comme *Z. galactanivorans*, trois composés purs ont été testés sur l'adhésion, mais seul le CH_2I_2 a été testé sur la formation de biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. D41. Seule la concentration de 250 $\mu g.mL^{-1}$ de mannitol permet l'augmentation de l'adhésion de cette souche en microplaques, les autres concentrations n'ayant aucun effet. Même l'ajout de Stabrex ST40® (un bactéricide puissant utilisé pour nettoyer les piscines) à des concentrations en HOBr allant de 10^{-5} à 2.10^{-4}, n'ont

aucun effet sur son adhésion. En revanche, à partir d'une concentration en HOBr de 10^{-3}, l'adhésion est diminuée. Le biofilm n'est quant à lui pas influencé par l'ajout de CH_2I_2 dans le milieu de culture, montrant la résistance de cette souche bactérienne marine de référence aux composés halogénés bromés et iodés.

Conclusion et Perspectives

Chapitre V Conclusion et perspectives

I - CONCLUSION

Ce travail de thèse avait plusieurs objectifs. Le premier était de développer des nouveaux outils pour étudier la microflore bactérienne associée à *L. digitata*, dans le but de mettre au point des techniques rapides d'études bactériennes taxonomique et physiologique. Cette algue brune est un modèle d'étude de choix depuis plusieurs années à la Station Biologique de Roscoff, de par son métabolisme halogéné très particulier. Par conséquent, le second objectif de ce travail de thèse était d'étudier les réponses métaboliques de l'algue permettant ou décourageant l'adhésion bactérienne et/ou la formation de biofilm à sa surface.

Dans un premier temps, la mise au point de nouveaux outils pour étudier la microflore associée à l'algue a nécessité l'isolement et la culture de souches bactériennes associées aux thalles de l'algue. L'étude phylogénétique d'une vingtaine de ces souches isolées a permis de mettre en évidence la présence de bactéries à Gram positif et négatif, représentées respectivement par les phylum des *Actinobacteria* et des *Firmicutes*, et des *Proteobacteria* et des *Flavobacteria*. Ces phyla sont caractéristiques des populations bactériennes trouvées en association avec les surfaces d'autres algues brunes, telles que *Saccharina latissima* (Staufenberger *et al.*, 2008).

Le travail de mise au point de deux techniques spectroscopiques a alors pu débuter à partir de cellules entières et vivantes de ces souches bactériennes associées à *L. digitata*, ainsi que de douze souches bactériennes supplémentaires dites « de référence ». Pour la première fois, j'ai pu montrer que ces deux techniques spectroscopiques différentes, que sont la RMN ^{1}H HR-MAS et la MALDI-ToF MS, peuvent être utilement associées à la taxonomie moléculaire sur des populations bactériennes marines. Une identification rapide a pu être effectuée directement à partir de cellules bactériennes entières, fournissant une empreinte métabolique qui peut être comparée à une base de données de profils spectraux construites avec des bactéries cultivées dans des conditions de culture strictement identiques et préalablement caractérisées par leur séquence d'ADNr 16S. Ainsi, les profils spectraux obtenus en MALDI-ToF MS ont un intérêt taxonomique certain, avec des empreintes hautement reproductibles, indépendantes de l'âge de la culture et du milieu de culture (dans les

limites de cette étude). De plus, les empreintes spectrales MALDI-ToF peuvent être associées aux études protéomiques et à l'expression de glycopolymères dans les études d'adhésion. Les spectres RMN ^{1}H HR-MAS ont quant à eux montré un intérêt taxonomique indicatif, si et seulement si les cultures sont effectuées dans les mêmes conditions. En revanche, ils ont un fort intérêt dans le suivi des réponses d'adaptation spécifiques des souches bactériennes aux différentes conditions de culture. C'est pourquoi, la combinaison des méthodes moléculaires et spectroscopiques a un fort potentiel dans l'étude de la biologie des bactéries cultivables.

D'autre part, une première approche de la diversité microbienne totale a été effectuée pour développer de nouveaux outils d'extraction d'ADN environnemental, dans l'étude des interactions de cette algue brune avec les bactéries marines. Ce travail a permis d'aboutir a un ADNr 16S global des bactéries présentes à la surface de *L. digitata*, et exempt de contamination d'ADNr 16S de l'hôte, grâce à des digestions enzymatiques spécifiques. La construction d'une banque de clones reste encore inachevée pour le moment.

Dans un deuxième temps, les mêmes souches bactériennes étudiées précédemment ont été utilisées pour étudier leur capacité d'adhésion et de formation de biofilm, avec pour objectif de comprendre les interactions biochimiques pouvant exister entre ces bactéries marines et l'algue à sa surface. Pour cela, des mélanges d'exsudats de sporophytes de *L. digitata* en condition ou non de stress, ainsi que des métabolites extraits de cette algue et des métabolites purs ont été appliqués aux différentes souches bactériennes étudiées. Ces expériences ont été réalisées à 2h d'adhésion en microplaques, et à 24h de formation de biofilm en chambre à flux.

Ce travail a permis de révéler des capacités d'adhésion en EMSF et de formation de biofilm en milieu de culture ZoBell différentes selon les souches bactériennes. Ainsi, une adhésion nulle ou très faible à un fort pouvoir d'adhésion, et la non formation de biofilm à un biofilm dense et épais ont pu être observés. Les métabolites extraits avec des solvants organiques ont permis de montrer les premiers éléments de réponse du comportement d'adhésion de bactéries marines en présence de substances de cette algue. Certaines souches sont plus sensibles que d'autres, et indépendant de leur provenance (associées ou non à *L. digitata*). Des exsudats d'algues stressées ou non ont ensuite été testés, correspondant à des mélanges de métabolites susceptibles d'être en contact direct avec les bactéries à la surface de l'algue. Ceci, dans le but de mieux

comprendre les interactions pouvant exister entre les bactéries et l'algue hôte, dans un contexte biomimétique. Il s'est avéré que les souches bactériennes associées à l'algue ont été plus sensibles aux exsudats que les souches bactériennes marines de référence, avec un effet majoritairement négatif. Ce résultat a également été obtenu en chambre à flux, avec une diminution de la biomasse et de l'épaisseur moyenne observée chez les bactéries associées, et une augmentation de la biomasse, de l'épaisseur moyenne et maximale, uniquement chez la souche de référence *Z. galactanivorans*. L'épaisseur maximale du biofilm de *Pseudoalteromonas* sp. D41 a également augmenté avec la présence d'exsudats. Suite à cela, des métabolites purs connus pour être émis par l'algue ont été testés sur une sélection de souches bactériennes associées et de référence. La souche *Cobetia* sp. Ld8 associée à *L. digitata* n'a pas son adhésion modifiée en présence de mannitol (diol sécrété en continue à la surface des thalles de l'algue), ni en présence de CH_2I_2, un CHV libéré par l'algue lorsque celle-ci en soumise à une élicitation par des oligoguluronates. En revanche, en présence de HOBr, son adhésion est fortement diminuée à partir d'une concentration de 10^{-4}. L'adhésion de l'autre souche associée, *Pseudoalteromonas* sp. Ld20, diminue à partir d'une concentration de 25 $\mu g.mL^{-1}$ en mannitol, 10 $\mu g.mL^{-1}$ en CH_2I_2, 10^{-4} en HOBr. Son biofilm n'est pas influencé par la présence de mannitol dans le milieu de culture, en revanche, lorsque 5 $\mu g.mL^{-1}$ son incorporé au milieu, la formation de biofilm est favoraisée. En ce qui concerne la souche de référence *Pseudoalteromonas* sp. 3J6, de faibles concentrations en mannitol augmentent son adhésion, tandis qu'à des concentrations plus fortes, son adhésion est diminuée. Son adhésion est également diminuée en présence de CH_2I_2, voire inexistente en présence de HOBr. *Z. galactanivorans* a un pouvoir d'adhésion qui augmente en présence de mannitol et de CH_2I_2, et présente également un biofilm plus dense et plus épais avec l'incorporation de ces deux métabolites purs dans le milieu de culture. Le diol n'a aucun effet sur l'adhésion de *Pseudoalteromonas* sp. D41, le CH_2I_2 diminue son adhésion à partir de 20 $\mu g.mL^{-1}$ mais n'a aucun effet sur la formation de son biofilm. A l'inverse, l'adhésion est favorisée en présence de HOBr, sauf avec la plus forte concentration (10^{-3}).

II - PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'apporter des nouveaux outils de travail pour étudier les bactéries épiphytes de l'algue brune *L. digitata*. Il a également permis d'acquérir les premiers éléments de réponse sur les interactions pouvant exister à l'interface de l'algue et des bactéries marines associées ou non, avec une étude ciblée sur l'adhésion et la formation de biofilm de ces souches bactériennes marines en présence de divers métabolites appartenant à l'algue. Suite aux nombreux résultats exposés dans ce manuscrit, de nouvelles questions se sont naturellement posées, permettant l'introduction d'approches originales qui pourront être abordées durant les prochaines années.

L'avantage des études spectroscopiques et taxonomiques de la diversité globale sur des échantillons environnementaux n'a pas encore pu être exploité dans le cadre de ma thèse. Le développement de ces techniques demeure un défi majeur pour la compréhension des interactions algues-procaryotes.

Ainsi, l'amélioration des techniques moléculaire telles que la DGGE, voire la D-HPLC (système similaire à la DGGE, mais plus rapide, car sur colonne plutôt que sur gel) avec les produits PCR 16S ou la ARISA avec les produits ITS, permettraient d'étudier la diversité globale des populations bactériennes présentes sur des thalles sauvages. Ces techniques permettront l'obtention d'empreintes moléculaires qui pourront être comparées à celles obtenues après élicitation des sporophytes avec des GG ou des LPS bactériens. La sélection de la communauté bactérienne associée à la surface des thalles de *L. digitata* pourrait alors être suivie, en fonction de l'état physiologique de l'algue. Les développements possibles pour visualiser et quantifier la formation de biofilm à la surface de l'algue peuvent également impliquer la mise au point de la technique du CARD-FISH sur une algue brune (Tujula *et al.*, 2006b). L'autofluorescence de l'algue nécessitera des développements techniques sur l'usage des filtres les plus adaptés. Mais c'est surtout le développement de sondes de plus en plus spécifiques des taxons rencontrés à la surface des laminaires qui représente un travail très conséquent. Une autre technique d'observation en plein développement est l'ESEM (Environmental scanning electron microscopy). Elle permet d'observer des structures hydratées dans un vide peu poussé, permettant de s'affranchir du traitement réfléchissant de surface. Il sera ainsi possible d'observer des biofilms bactériens

directement sur leur substrat naturel (surface d'algues par exemple avec comparaison saisonnière et de site sur l'algue). Des expériences d'axénisation de surface et de recolonisation sont envisageables. Cette approche permettra de complémenter utilement les observations faites en MEB classique sur des biofilms expérimentaux. Des mesures ponctuelles en microspectrométrie à infrarouge pourraient compléter utilement ces observations en caractérisant les biopolymères dominants ces différences structurales.

De même, les réponses physiologiques des souches bactériennes marines pourraient être étudiées en RMN HR-MAS, par l'ajout de métabolites provenant de l'algue dans le milieu de culture gélosé. Ces métabolites seraient préférentiellement des composés de surface, potentiellement en contact direct avec les bactéries. Ceci permettrait de rester dans un contexte plus écologique et biomimétique, plutôt qu'une simple recherche de composés bactéricides ou bactériostatiques à des fins biotechnologiques (anti-fouling par exemple). La base de données développée en MALDI-ToF devrait être enrichie avec de nouvelles souches bactériennes marines. Ceci permettrait de développer cet outil non plus à l'échelle d'une étude particulière, mais à toutes les problématiques concernant des bactéries marines cultivables, aussi bien planctoniques qu'en association avec des surfaces organiques et/ou inorganiques. Non seulement la validation de cette technique serait définitivement incontestable, mais elle serait également une aide supplémentaire avec un gain de temps non négligeable dans l'identification de souches bactériennes d'études, si bien sûr celles-ci sont déjà présentes dans la base de données, auquel cas, elles devront être identifiées par les techniques moléculaires traditionnelles. Des études plus poussées du protéome membranaire et du secrétome de certaines bactéries marines modèles sont lancées dans le cadre de la collaboration qui a débuté au cours de ma thèse (Programme Biofilms du GIS Europôle Mer). Elles pourraient permettre d'identifier des marqueurs de l'adhésion ou des interactions bactériennes dans le biofilm, qui seront alors avantageusement utilisées dans l'étude des interactions avec les eucaryotes.

De nombreuses études sur la capacité d'adhésion et de formation de biofilm en présence de métabolites extraits d'organismes marins existent. Elles concernent essentiellement la recherche de composés dits actifs, potentiellement utilisables comme molécules anti-fouling (bactéricides ou bactériostatiques) ou d'intérêt thérapeutique. Mon étude est par conséquent un travail original, se situant dans une problématique

d'écologie chimique, de biomimétisme des interactions pouvant exister entre les bactéries marines cultivables et l'algue à sa surface.

Les expériences d'adhésion réalisées ont permis de tester un plus grand nombre de souches bactériennes et de métabolites provenant de la Phéophycée que l'étude en biofilm. Ces expériences ont également apporté les premières réponses de comportement d'adhésion (première étape essentielle à la formation d'un biofilm) en présence de métabolites d'algues. De nouveaux métabolites pourraient donc être testés, afin d'obtenir un éventail plus diversifié des molécules chimiques émises par l'algue et interférant dans le processus d'adhésion des bactéries marines. De plus, les mélanges d'exsudats ou de métabolites extraits pourraient être plus amplement étudiés, lorsqu'une capacité d'adhésion est modifiée. Ceci permettrait par la suite de cibler plus particulièrement la ou les molécules responsables de ce changement. Notamment, la recherche de molécules impliquées dans le quorum sensing, avec un dosage des HSL en présence ou absence d'exsudats. Les extraits non solubles (tels que l'extrait à l'acétate d'éthyle de lames de sporophytes) pourraient être testés sur boîte de Petri, en adsorption sur filtre déposé sur le milieu de culture, préalablement ensemencé de souches bactériennes à étudier. La croissance ou non des bactéries plutôt que l'adhésion ou la formation de biofilm serait alors étudiée, mettant en évidence un halo d'inhibition lorsque l'extrait à un effet négatif. Il sera aussi possible de compléter les observations faites sur des biofilms de souches référencées soumis à des molécules de défenses d'eucaryotes marins (algues en particulier) par des observations parallèles en mode planctonique. La coloration vitale permettant d'obtenir rapidement des données complémentaires sur la mortalité, grâce aux techniques de cytométrie en flux.

Le biomimétisme effectué en chambre à flux peut encore être amélioré. En effet, il serait intéressant d'envisager un revêtement d'alginate sur la surface de la lamelle à l'intérieur de la FC, qui renfermerait une haloperoxydase à vanadium, enzyme impliquée dans les réponses de défense de *L. digitata*. Cette enzyme serait activée par l'ajout de H_2O_2 et de NaBr ou de NaI (sustrats de l'enzyme) dans le milieu de culture, et la formation de biofilm des souches bactériennes étudiées pourraient alors être observées sur cette surface. Ainsi on se rapprocherait encore plus des conditions réelles existantes à la surface de l'algue. Ces expériences ont déjà fait l'objet de quelques tests, mais des problèmes de conditionnement de surface des lamelles ont empêché l'établissement d'un revêtement d'alginate homogène. Une technique biophysique

complémentaire sur cette approche pourrait être la microbalance à cristal de quartz (Olofsson *et al.*, 2005) pour obtenir des mesures de la viscoélasticité du biofilm.

A moyen terme, les développements de la génomique vont également modifier nos possibilités d'approches des interactions procaryotes-eucaryotes. La rapidité du séquençage massif (Roche 454, Illumina, Solexha) et la démocratisation relative de son utilisation vont multiplier exponentiellement à la fois les génomes complets de bactéries marines, mais aussi les données de séquences dans l'environnement, y compris à l'échelle du transcriptome de procaryotes ou d'eucaryotes (Monier *et al.*, 2009). L'exploitation de ces données massives pourra guider des approches métaboliques ou cellulaires visant à identifier de nouvelles cibles impliquées dans l'adhésion bactérienne et le contrôle positif ou négatif des biofilms.

Toutes ces perspectives mettent en évidence le pouvoir encore grandissant des nombreux outils de travail disponibles pour étudier les bactéries marines et aborder les interactions entre hôte et procaryote. Certes ces outils nécessitent des mises au point de protocoles fiables et adaptés à ce type d'étude, mais ils ont ici permis d'effectuer la première approche écologique en mimant les interactions entre l'algue brune *Laminaria digitata* et les bactéries marines. L'amélioration des techniques développées dans ce travail de thèse, ainsi que la recherche de nouveaux outils permettront dans un avenir proche de mieux comprendre la complexité d'interactions entre les procaryotes et la surface de l'algue hôte, dotée d'un métabolisme de défense particulier.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abrahamsson, K., Choo, K.-S., Pedersen, M., Johansson, G. and Snoeijs, P. (2003) Effects of temperature on the production of hydrogen peroxide and volatile halocarbons by brackish-water algae. *Phytochemistry* **64**, 725-734.

Aguayo, J.B., Gamcsik, M.P. and Dick, J.D. (1988) High Resolution Deuterium NMR studies of bacterial Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 25.

Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y. and Yamasato, K. (1992) *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**, 621-627.

Akakabe, Y., Matsui, K. and Kajiwara, T. (2003) 2,4-Decadienals are produced via (R)-11-HPITE from arachidonic acid in marine green alga *Ulva conglobata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11**, 3607-3609.

Amico, V., Cunsolo, F., Oriente, G., Piattelli, M. and Ruberto, G. (1984) Cystoketal, a new metabolite from the brown alga *Cystoseira balearica*. *Journal of Natural Products* **47**, 947-952.

Amico, V., Cunsolo, F., Piattelli, M. and Ruberto, G. (1987) Prenylated O-methyltoluquinols from *Cystoseira stricta Phytochemistry* **26**, 1719-1722.

Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S. and Mayol, L. (1978) Caulerpenyne, an unusual sequiterpenoid from the green alga caulerpa prolifera. *Tetrahedron Letters* **19**, 3593-3596.

Amsler, C.D. and Fairhead, V.A. (2006) Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. *Advances in Botanical research* **43**, 1–91.

Amsler, C.D., Fairhead, V.A. and Callow, J.A. (2005) Defensive and sensory chemical ecology of brown algae. In *Advances in Botanical Research*. pp.1-91: Academic Press.

Andrews, J.H. (1976) The pathology of marine algae. *Biological Reviews* **51**, 211-252.

Andrews, J.H. (1977) Observations on the pathology of seaweeds in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany* **55**, 1019-1027.

Ar Gall, E., Küpper, F.C. and Kloareg, B. (2004) A survey of iodine content in *Laminaria digitata*. *Botanica Marina* **47**, 30-37.

Arahal, D.R., Castillo, A.M., Ludwig, W., Schleifer, K.H. and Ventosa, A. (2002) Proposal of *Cobetia marina* gen. nov., comb. nov., within the family *Halomonadaceae*, to include the species *Halomonas marina*. *Systematic and Applied Microbiology* **25**, 207-211.

Armstrong, E., Rogerson, A. and Leftley, J.W. (2000b) Utilisation of seaweed carbon by three surface-associated heterotrophic protists, *Stereomyxa ramosa*, *Nitzschia alba* and *Labyrinthula* sp. *Aquatic Microbial Ecology* **21**, 49-57.

Armstrong, E., Yan, L., Boyd, K.G., Wright, P.C. and Burgess, J.G. (2001) The symbiotic role of marine microbes on living surfaces. *Hydrobiologia* **461**, 37-40.

Arnold, R.J., Karty, J.A., Ellington, A.D. and Reilly, J.P. (1999) Monitoring the growth of a bacteria culture by MALDI-MS of whole cells. *Analytical Chemistry* **71**, 1990-1996.

Arnold, T.M. and Targett, N.M. (2003) To grow and defend: lack of tradeoffs for brown algal phlorotannins. *Oikos* **100**, 406-408.

Arnold, T.M., Targett, N.M., Tanner, C.E., Hatch, W.I. and Ferrari, K.E. (2001) Evidence of methyl jasmonate-induced phlorotanin production in *Fucus vesiculosus* (Phaeophycea). *Journal of Phycology* **37**, 1026-1029.

Baier, R.E. (1972) Organic films on natural waters: their retrieval, identification, and modes of elimination. *Journal of Geophysical Research* **77**.

Baldauf, S.L. (2003) The deep roots of Eukaryotes. *Nature* **300**, 1703-1706.

Baldauf, S.L. (2008) An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *Journal of Systematics and Evolution* **46**, 263-273.

Baldridge, C.W. and Gerard, R.W. (1932) The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology* **103**, 235-236.

Barak, J.D., Gorski, L., Naraghi-Arani, P. and Charkowski, A.O. (2005) *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5685-5691.

Barbeyron, T., L'Haridon, S., Corre, E., Kloareg, B. and Potin, P. (2001) *Zobellia galactanovorans* gen. nov., sp. nov., a marine species of *Flavobacteriaceae* isolated from a red alga, and classification of [*Cytophaga*] *uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Zobellia uliginosa* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 985-997.

Bates, P., Blunt, J.W., Hartshorn, M.P., Jones, A.J., Munro, M.H.G., Robinson, W.T. and Yorke, S.C. (1979) Halogenated metabolites of the red alga *Plocamium cruciferum*. *Australian Journal of Chemistry* **32**, 2545-2554.

Baynham, P.J., Ramsey, D.M., Gvozdyev, B.V., Cordonnier, E.M. and Wozniak, D.J. (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV *pili*. *Journal of Bacteriology* **188**, 132-140.

Behrends, V., Ebbels, T.M.D., Williams, H.D. and Bundy, J.G. (2009) Time-resolved metabolic footprinting for non-linear modelling of bacterial substrate utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.01742-01708.

Bennett, R.F. (1996) Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* ed. De Mora, S.J. pp.21-61: Cambridge University Press.

Bianciotto, V., Andreatto, S., Balestrini, R., Bonfante, P. and Perotto, S. (2001) Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European Journal of Histochemistry* **45**, 39-49.

Blight, A.J. and Thompson, R.C. (2008) Epibiont species richness varies between holdfasts of a northern and a southerly distributed kelp species. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* **88**, 469-475.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.-P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. (2007) Marine natural products. *Natural Product Reports* **24**, 31-86.

Boonprab, K., Matsui, K., Akakabe, Y., Yoshida, M., Yotsukura, N., Chirapart, A. and Kajiwara, T. (2006) Formation of aldehyde flavor (n-hexanal, 3Z-nonenal and 2E-nonenal) in the brown alga, *Laminaria angustata*. *Journal of Applied Phycology* **18**, 409-412.

Boonprab, K., Matsui, K., Akakabe, Y., Yotsukura, N. and Kajiwara, T. (2003) Hydroperoxy-arachidonic acid mediated n-hexanal and (Z)-3- and (E)-2-nonenal formation in *Laminaria angustata*. *Phytochemistry* **63**, 669-678.

Borchardt, S.A., Allain, E.J., Michels, J.J., Stearns, G.W., Kelly, R.F. and McCoy, W.F. (2001) Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3174-3179.

Boschin, F., Boutigny, H. and Delcourt-Debruyne, E. (2004) Maladies gingivales induites par la plaque. *EMC - Dentisterie* **1**, 462-480.

Bouarab, K., Adas, F., Gaquerel, E., Kloareg, B., Salaün, J.-P. and Potin, P. (2004) The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiology* **135**, 1838-1848.

Bouarab, K., Kloareg, B., Potin, P. and Correa, J.A. (2001) Ecological and biochemical aspects in algal infectious diseases. *Cahiers de biologie marine* **42**, 91-100.

Bouarab, K., Potin, P., Correa, J.A. and Kloareg, B. (1999) Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. *The Plant Cell* **11**, 1635-1650.

Bowman, J.P. (2007) Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs* **5**, 220-241.

Boyd, A. and Chakrabarty, A.M. (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2355-2359.

Brading, M.G., Jass, J. and Lappin-Scott, H.M. (1995) Dynamics of bacterial biofilm formation. In *Microbial biofilms* ed. Press, C.U. pp.46-63: H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton.

Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R. and Kolter, R. (2006) A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology* **59**, 1229-1238.

Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* **13**, 20-26.

Broberg, A. (1998) Structural and quantitative studies of metabolites in red algae. In *Chemistry*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.

Bryers, J.D. (2008) Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **100**, 1-18.

Burke, C., Kjelleberg, S. and Thomas, T. (2009) Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 252-256.

Buxton, T.B., Horner, J., Hinton, A. and Rissing, J.P. (1987) In vivo glycocalyx expression by *Staphylococcus aureus* phage type 52/52A/80 in *S. aureus osteomyelitis*. *The Journal of infectious diseases* **156**, 942-946.

Callow, M. (1986) A world-wide survey of slime formation on antifouling paints. In *Algal biofouling (Studies in environmental science)* ed. Hoagland, K.D. pp.1-20. New-York.

Callow, M.E. and Callow, J.A. (2000) Substratum location and zoospore behaviour in the fouling alga *Enteromorpha*. *Biofouling* **15**, 49 - 56.

Cao, J.G. and Meighen, E.A. (1989) Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 21670-21676.

Carpenter, L.J., Hebestreit, K., Platt, U. and Liss, P.S. (2001) Coastal zone production of IO precursors: a 2-dimensional study. *Atmospheric Chemistry and Physics* **1**, 9-17.

Carpenter, L.J., Malin, G., Liss, P.S. and Küpper, F.C. (2000) Novel Biogenic Iodine-Containing Trihalomethanes and Other Short-Lived Halocarbons in the Coastal East Atlantic. *Global Biogeochemical Cycles* **14**.

Carpenter, L.J., Sturges, W.T., Penkett, S.A., Liss, P.S., Alicke, B., Hebestreit, K. and Platt, U. (1999) Short-lived alkyl iodides and bromides at Mace Head, Ireland: Links to biogenic sources and halogen oxide production. *Journal of Geophysical Research* **104**, 1679-1689.

Castresana, J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 540-552.

Chandra, S., Heinstein, P.F. and Low, P.S. (1996) Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiology* **110**, 979-986.

Characklis, W.C. and Marshall, K.C. (1990) Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In *Biofilms* ed. Marshall, W.G.C.a.K.C. pp.3-17. New York: John Whiley and Sons.

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

Chauton, M.S., Optun, O.I., Bathen, T.F., Volent, Z., Gribbestad, I.S. and Johnsen, G. (2003b) HR MAS ^{1}H NMR spectroscopy analysis of marine microalgal whole cells. *Marine Ecology - Progress Series* **256**, 57-62.

Chauton, M.S., Størseth, T.R. and Johnsen, G. (2003a) High-resolution magic angle spinning ^{1}H NMR analysis of whole cells of *Thalassiosira pseudonana* (*Bacillariophyceae*): Broad range analysis of metabolic composition and nutritional value. *Journal of Applied Phycology* **15**, 533-542.

Christensen, B.B., Haagensen, J.A.J., Heydorn, A. and Molin, S. (2002) Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2495-2502.

Clare, A.S. (1996) Marine natural product antifoulants: status and potential. *Biofouling* **9**, 211 - 229.

Cobet, A.B., Wirsen, C. and Jones, G.E. (1970) The effect of nickel on a marine bacterium, *Arthrobacter marinus* sp. nov. *Journal of General and Applied Microbiology*.

Colin, C. (2004) Caractérisation biochimique et moléculaire des haloperoxydases dépendantes du vanadate chez l'algue brune *Laminaria digitata*. Roscoff: Université de Paris VI

Colin, C., Leblanc, C., Michel, G., Wagner, E., Leize-Wagner, E., Van Dorsselaer, A. and Potin, P. (2005) Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **10**, 156-166.

Collén, J., Hervé, C., Guisle-Marsollier, I., Léger, J.J. and Boyen, C. (2006) Expression profiling of *Chondrus crispus* (Rhodophyta) after exposure to methyl jasmonate. *Journal of Experimental Botany* **57**, 3869-3881.

Compère, C. (1999) Biofilms en milieu marin. *Techniques Sciences Méthodes* **11**, 48-54.

Compère, C., Bellon-Fontaine, M.N., Bertrand, P., Costa, D., Marcus, P., Poleunis, C., Pradier, C.M., Rondot, B. and Walls, M.G. (2001) Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling* **17**, 129 - 145.

Conway, B.-A. and Greenberg, E.P. (2002) Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *Journal of Bacteriology* **184**, 1187-1191.

Corbett, J. and Fischbank, F. (1997) Emissions from ships. *Science* **278**, 823-824.

Corre, S. and Prieur, D. (1990) Density and morphology of epiphytic bacteria on the kelp *Laminaria digitata*. *Botanica Marina* **33**, 515-523.

Correa, J.A. (1996) Diseases in seaweeds: an introduction. *Hydrobiologia* **326-327**, 87-88.

Correa, J.A. and Sánchez, P.A. (1996) Ecological aspects of algal infectious diseases. *Hydrobiologia* **326-327**, 89-95.

Cosse, A. (2007) Analyse du transcriptome des réponses de défense de l'algue brune *Laminaria digitata*. Roscoff: Institut National Agronomique Paris-Grignon

Cosse, A., Leblanc, C., Potin, P., Kader, J.-C. and Delseny, M. (2007) Dynamic defense of marine macroalgae against pathogens: from early activated to gene-regulated responses. In *Advances in Botanical Research*. pp.221-266: Academic Press.

Cosse, A., Potin, P. and Leblanc, C. (2009) Patterns of gene expression induced by oligoguluronates reveal conserved and environment-specific molecular defense responses in the brown alga *Laminaria digitata*. *New Phytologist* **182**, 239-250.

Costa-Ramos, C. and Rowley, A.F. (2004) Effect of extracellular products of *Pseudoalteromonas atlantica* on the edible crab *Cancer pagurus*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 729-735.

Costerton, J.W. (1995) Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **15**, 137-140.

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

Costerton, J.W., Irvin, R.T. and Cheng, K.J. (1981) The Bacterial Glycocalyx in Nature and Disease. *Annual Review of Microbiology* **35**, 299-324.

Costerton, J.W. and Lappin-Scott, H.M. (1995) Introduction to microbial biofilms. In *Microbial biofilms* ed. Press, C.U. pp.1-14: H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton.

Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.

Courtois, B. (1813) Découverte d'une substance nouvelle dans le Varech. *Annales de Chimie* **88**, 304-310.

Cowan, S.E., Gilbert, E., Liepmann, D. and Keasling, J.D. (2000) Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4481-4485.

Craigie, J.S., McLachlan, J., Majak, W., Ackman, R.G. and Tocher, C.S. (1966) Photosynthesis in algae: II. Green algae with special reference to *Dunaliella* spp. and *Tetraselmis* spp. *Canadian Journal of Botany* **44**, 1247-1254.

Crews, P., Kho-Wiseman, E. and Montana, P. (1978) Halogenated alicyclic monoterpenes from the red algae *Plocamium*. *Journal of Organic Chemistry* **43**, 116–120.

Cucarella, C., Tormo, M.A., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, I., Foster, T.J. and Penades, J.R. (2002) Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and Immunity* **70**, 3180-3186.

Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., D'Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G.E., Berman, A.E., Bilan, M.I., Usov, A.I., Ustyuzhanina, N.E., Grachev, A.A., Sanderson, C.J., Kelly, M., Rabinovich, G.A., Iacobelli, S. and Nifantiev, N.E. (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **17**, 541-552.

d'Ippolito, G., Iadicicco, O., Romano, G. and Fontana, A. (2002) Detection of short-chain aldehydes in marine organisms: the diatom *Thalassiosira rotula*. *Tetrahedron Letters* **43**, 6137-6140.

Dalisay, D.S., Webb, J.S., Scheffel, A., Svenson, C., James, S., Holmstrom, C., Egan, S. and 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**, 2875-2883.

Dangeard, P. (1957) L'iode des algues, les ioduques, l'iodovolatilisation. *Le Botaniste* **41**, 187-207.

Daniels, R., Vanderleyden, J. and Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 261-289.

Danise, B., Minale, L., Riccio, R., Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S. and Mayol, L. (1977) Further perhydroazulene diterpenes from marine organisms. *Experientia* **33**, 413–415.

Davey, M.E., Caiazza, N.C. and O'Toole, G.A. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **185**, 1027-1036.

Davey, M.E. and O'Toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 847-867.

Davies, D.G., Chakrabarty, A.M. and Geesey, G.G. (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1181-1186.

Davies, D.G. and Geesey, G.G. (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 860-867.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998) The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm. *Science* **280**, 295-298.

de Nys, R., Givskov, M.C., Kumar, N., Kjelleberg, S. and Steinberg, P.D. (2006) Furanones: Progress in molecular and subcellular biology. Subseries marine molecular biotechnology. In *Antifouling Compounds* eds. Fusetani, N. and Clare, A.S. Berlin/Heidelberg: Springer Verlag.

de Nys, R. and Steinberg, P.D. (2002) Linking marine biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 244-248.

de Nys, R., Steinberg, P.D., Willemsen, P., Dworjanyn, S.A., Gabelish, C.L. and King, R.J. (1995) Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling* **8**, 259 - 271.

Debashish, G., Malay, S., Barindra, S. and Joydeep, M. (2005) Marine enzymes. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* ed. Springer. pp.189-218. Berlin.

Debnath, M., Paul, A.K. and Bisen, P.S. (2007) Natural bioactive compounds and biotechnological potential of marine bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **8**, 253-260.

DeFlaun, M.F., Oppenheimer, S.R., Streger, S., Condee, C.W. and Fletcher, M. (1999) Alterations in adhesion, transport, and membrane characteristics in an adhesion-deficient Pseudomonad. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 759-765.

Delpassand, E.S., Chari, M.V., Stager, C.E., Morrisett, J.D., Ford, J.J. and Romazi, M. (1995) Rapid identification of common human pathogens by High-Resolution Proton Magnetic Resonance spectroscopy. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 1258-1262.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M. and Gascuel, O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**, W465-469.

Dheilly, A. (2007) Biofilms bactériens marins multi-espèces : mise en évidence d'un effet antagoniste. Lorient: Université de Bretagne Sud.

Dobretsov, S., Teplitski, M. and Paul, V. (2009) Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* **25**, 413-427.

Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8**.

Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167-193.

Dring, M.J. and Callow, J.A. (2005) Stress Resistance and Disease Resistance in Seaweeds: The Role of Reactive Oxygen Metabolism. In *Advances in Botanical Research*. pp.175-207: Academic Press.

Dubber, D. and Harder, T. (2008) Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. *Aquaculture* **274**, 196-200.

Ebel, J. and Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**, 335-348.

Egan, S., James, S., Holmstrom, C. and Kjelleberg, S. (2001) Inhibition of algal spore germination by the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *FEMS Microbiology Ecology* **35**, 67-73.

Egan, S., James, S., Holmström, C. and Kjelleberg, S. (2002) Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environmental Microbiology* **4**, 433-442.

Egan, S., Thomas, T., Holmstrom, C. and Kjelleberg, S. (2000) Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacterial epiphytes from the marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology* **2**, 343-347.

Egan, S., Thomas, T. and Kjelleberg, S. (2008) Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 219-225.

Ellertsdóttir, E. and Peters, A.F. (1997) High prevalence of infection by endophytic brown algae in populations of *Laminaria* spp. (Phaeophyceae). *Marine Ecology - Progress Series* **&'-**, 135-143.

Falcieri, E., Vaudaux, E., Huggier, D., Lew, D. and Waldvogel, F. (1987) Role of bacterial exopolymers and host factors on adherence and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in foreign body infection. *The Journal of infectious diseases* **155**, 524-531.

Farge, P. (1998) Données récentes sur l'étiopathogénie de la carie *Archives de Pédiatrie* **5**, 1140-1144.

Federle, M.J. and Bassler, B.L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **112**, 1291-1299.

Felsenstein, J. (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.

Fenical, W., Howard, B., Gifkins, K.B. and Clardy, J. (1975) Irieol A and iriediol, dibromoditerpenes of a new skeletal class from *Laurencia*. *Tetrahedron Letters* **46**, 3983–3986.

Filloux, A. and Vallet, I. (2003) Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine/Sciences* **19**, 77-83.

Foster, T.J. and Höök, M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* **6**, 484-488.

Franks, A., Haywood, P., Holmström, C., Egan, S., Kjelleberg, S. and Kumar, N. (2005) Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Molecules* **10**, 1286-1291.

Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* **10**, 16-22.

Fukuzawa, A., Kurosawa, E. and Tobetsu, I. (1979) Constituents of marine plants. XXXVI. Laurallene, new bromoallene from the marine red alga *Laurencia nipponica* Yamada. . *Tetrahedron Letters* **30**, 2797–2780.

Fukuzawa, A. and Masamune, T. (1981) Laurepinnacin and isolaurepinnacin, new acetylenic cyclic ethers from the marine red alga *Laurencia pinnata* Yamada. *Tetrahedron Letters* **22**, 4081–4084.

Fuller, R.W., Cardellina, J.H., Kato, Y., Brinen, L.S., Clardy, J., Snader, K.M. and Boyd, M.R. (1992) A pentahalogenated monoterpene from the red alga *Portieria hornemannii* produces a novel cytotoxicity profile against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of Medicinal Chemistry* **35**, 3007-3011.

Fuqua, C., Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annual Review of Genetics* **35**, 439-468.

Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* **176**, 269-275.

Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Stoodley, P. (2004) Survival strategies of infectious biofilms *Trends in Microbiology* **13**, 34-40.

Gachon, C.M.M., Küpper, H., Küpper, F.C. and Setlík, I. (2006) Witnessing effects of a pathogen on photosynthesis of its host at the cellular level: chlorophyll fluorescense kinetic microscopy of *Pylaiella littoralis* (Phaeophyceae) infected by *Chytridium polysiphoniae* (Chytridiomycota). *European Journal of Phycology* **41**, 395-403.

Gao, X., Matsuo, Y. and Snider, B.B. (2006) Synthesis of *ent*-Thallusin. *Organic Letters* **37**.

Gaquerel, E., Hervé, C., Labrière, C., Boyen, C., Potin, P. and Salaün, J.-P. (2007) Evidence for oxylipin synthesis and induction of a new polyunsaturated fatty acid hydroxylase activity in *Chondrus crispus* in response to methyljasmonate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**, 565-575.

Garrett, E.S., Perlegas, D. and Wozniak, D.J. (1999) Negative control of flagellum synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the alternative sigma factor AlgT (AlgU). *Journal of Bacteriology* **181**, 7401-7404.

Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen, R. (1995) Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **45**, 755-761.

Gauthier, M.J. (1982) Validation of the name *Alteromonas luteoviolacea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **32**, 82-86.

Gauthier, M.J. and Breittmayer, V.A. (1979) A new antibiotic-producing bacterium from seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **29**, 366-372.

Gayral, P. and Cosson, J. (1973) Exposé synoptique des données biologiques sur la laminaire digitée *Laminaria digitata Synopsis FAO sur la pêche* **89**.

Geiselman, J.A. and McConnell, O.J. (1981) Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *Journal of Chemical Ecology* **7**, 1115–1133.

Genest, R. and Bérard, A. (2008) Les Beaux Jardins, le magazine d'actualité horticole

Gerwick, W.H., Proteau, P.J., Nagle, D.G., Wise, M.L., Jiang, Z.D., Bernart, M.W. and Hamberg, M. (1993) Biologically active oxylipins from seaweeds. *Hydrobiologia* **260-261**, 653-665.

Gonzalez, J.E. and Keshavan, N.D. (2006) Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**, 859-875.

Goulitquer, S. (2008) Identification et dosage de dérivés oxydés d'acides gras ployinsaturés dans les milieux biologiques par une approche métabolomique ciblée. In *Biologie et Santé*. Brest: Université de Bretagne Occidentale.

Goulitquer, S., Ritter, A., Thomas, F., Ferec, C., Salaün, J.-P. and Potin, P. (2009) Release of volatile aldehydes by the brown algal kelp *Laminaria digitata* in response to both biotic and abiotic stress. *ChemBioChem* **10**, 977-982.

Grasland, B. (2002) Etude du rôle des interactions énergétiques et des communications intercellulaires dans la formation de biofilms bactériens en milieu marin. Nantes: Université de Bretagne Sud.

Grasland, B., Mitalane, J., Briandet, R., Quemener, E., Meylheuc, T., Linossier, I., Vallée-Réhel, K. and Haras, D. (2003) Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling* **19**, 307-313.

Greenberg, E.P. (2003) Bacterial communication: Tiny teamwork. *Nature* **424**, 134-134.

Gribble, G.W. (1999) The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chemical Society Reviews* **28**, 335 - 346.

Grosse-Damhues, J. and Glombitzka, K.W. (1984) Antibiotics from algae. Part 30. Isofuhalols, a type of phlorotannin from the brown alga *Chorda filum*. *Phytochemistry* **23**, 2639–2642.

Guindon, S. and Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Society of Systematic Biologists* **52**, 696-704.

Goulitquer, S., Ritter, A., Thomas, F., Ferec, C., Salaün, J-P. and Potin, P. (2009) Release of volatile aldehydes by the brown algal kelp Laminaria digitata in response to both biotic and abiotic stress. *ChemBioChem* **10**, 977-982

Hahn, M.W. and Höfle, M.G. (2001) Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **35**, 113-121.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 95-108.

Hamann, M.T., Otto, C.S., Scheuer, P.J. and Dunbar, D.C. (1996) Kahalalides: bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis* sp. *Journal of Organic Chemistry* **61**, 6594-6600.

Hanefeld, U., Floss, H.G. and Laatsch, H. (1994) Biosynthesis of the marine antibiotic Pentabromopseudilin. 1. The benzene ring. *Journal of Organic Chemistry* **59**, 3604-3608.

Haras, D. (2005) Biofilms et altérations des matériaux : de l´analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux et Techniques* **93**, s.27-s.41.

Harper, M.K., Bugni, T.S., Copp, B.R., James, R.D., Lindsay, B.S., Richardson, A.D., Schnabel, P.C., Tasdemir, D., Van Wagoner, R.M., Verbitski, S.M. and Ireland, C.M. (2001) Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In *Marine Chemical Ecology* eds. McClintock, J.B. and Baker, B.J. pp.3-67: CRC Press.

Hastings, J.W. and Nealson, K.H. (1977) Bacterial Bioluminescence. *Annual Review of Microbiology* **31**, 549-595.

Haug, A. and Jensen, A. (1954) *Seasonal variations in the chemical composition of Alaria esculenta, Laminaria saccharina, Laminaria hyperborea and Laminaria digitata from northern Norway*: Norwegian Institute of Seaweed Research

Hay, M.E. and Fenical, W. (1992) Chemical mediation of seaweed-herbivore

interactions. In *Plant-Animal Interactions in the marine benthos* eds. John, D.M., Hawkins, S.J. and Price, J.H. pp.319-337. New York: Oxford University Press.

Heesch, S. and Peters, A.F. (1999) Scanning electron microscopy observation of host entry by two brown algae endophytic in *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycological Research* **47**, 1-5.

Henke, J.M. and Bassler, B.L. (2004) Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology* **14**, 648-656.

Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J. and Moore, B.S. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4431-4440.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, Mark A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M.,

Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby N. and Givskov, M. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. The EMBO Journal **22**, 3803-3815

Hervé, C., Tonon, T., Collén, J., Corre, E. and Boyen, C. (2006) NADPH oxidases in Eukaryotes: red algae provide new hints! *Current Genetics* **49**, 190-204.

Heydorn, A., Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. and Molin, S. (2002) Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: Impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2008-2017.

Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K. and Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**, 2395-2407.

Hicks, R.E., Amann, R.I. and Stahl, D.A. (1992) Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. . *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2158–2163.

Hjeresen, D.L. (2001) Green chemistry and the global water crisis. *Pure and Applied Chemistry* **73**, 1237-1241.

Högberg, H.-E., Thomson, R.H. and King, T.J. (1976) The cymopols, a group of prenylated bromohydroquinones from the green calcareous alga *Cympolia barbata*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1**, 1696-1701.

Holden, M.T.G., McGowan, S.J., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. and Salmond, G.P.C. (1998) Cryptic carbapenem antibiotic production genes are widespread in *Erwinia carotovora*: facile trans activation by the carR transcriptional regulator. *Microbiology* **144**, 1495-1508.

Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S. and Kjelleberg, S. (2002) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* **41**, 47-58.

Holmström, C. and Kjelleberg, S. (1999) Marine *Pseudoalteromonas* species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 285-293.

Ianora, A., Miralto, A., Poulet, S.A., Carotenuto, Y., Buttino, I., Romano, G., Casotti, R., Pohnert, G., Wichard, T., Colucci-D'Amato, L., Terrazzano, G. and Smetacek, V. (2004) Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature* **429**, 403-407.

Irie, T., Suzuki, M., Kurosawa, E. and Masamune, T. (1966) Laurinterol and debromolaurinterol, constituents from *Laurencia intermedia*. *Tetrahedron Letters* **17**, 1837-1840.

Ista, L.K., Fan, H., Baca, O. and López, G.P. (1996) Attachment of bacteria to model solid surfaces: oligo(ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment. *FEMS Microbiology Letters* **142**, 59-63.

Ivanova, E.P., Flavier, S. and Christen, R. (2004) Phylogenetic relationships among marine *Alteromonas*-like proteobacteria: emended description of the family *Alteromonadaceae* and proposal of *Pseudoalteromonadaceae* fam. nov.,

Colwelliaceae fam. nov., *Shewanellaceae* fam. nov., *Moritellaceae* fam. nov., *Ferrimonadaceae* fam. nov., *Idiomarinaceae* fam. nov. and *Psychromonadaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1773-1788.

Iwamoto, K. and Shiraiwa, Y. (2005) Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Marine Biotechnology* **7**, 407-415.

Jefferson, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Ecology* **236**, 163-173.

John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Walden, R. and Schell, J. (1997) Cell signalling by oligosaccharides. *Trends in Plant Science* **2**, 111-115.

Johnson, L.R. (2008) Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology* **251**, 24-34.

Kane, M.D., Poulsen, L.K. and Stahl, D.A. (1993) Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 682–686.

Kannan, N., Taylor, S.S., Zhai, Y., Venter, J.C. and Manning, G. (2007) Structural and functional diversity of the microbial kinome. *PLoS Biology* **5**, e17.

Kazlauskas, R., Murphy, P.T., Quinn, R.J. and Wells, R.J. (1977) A new class of halogenated lactones from the red alga *Delisea fimbriata*. *Tetrahedron Letters* **1**, 37–40.

Kjelleberg, S., Humphrey, B.A. and Marshall, K.C. (1982) Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **43**, 1166-1172.

Kjelleberg, S. and Steinberg, P.D. (2001) Surface warfare in the sea. *Microbiology Today* **28**, 134-135.

Kladi, M., Vagias, C. and Roussis, V. (2004) Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochemistry Reviews* **3**, 337-366.

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV *pili* mutants **48**, 1511-1524.

Kloareg, B. and Quatrano, R.S. (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology* **26**, 259-315.

Kocianova, S., Vuong, C., Yao, Y., Voyich, J.M., Fischer, E.R., DeLeo, F.R. and Otto, M. (2005) Key role of poly-dl-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 688-694.

Kolter, R. and Greenberg, E.P. (2006) Microbial sciences: The superficial life of microbes. *Nature* **441**, 300-302.

Kong, M.K. and Chan, K.-Y. (1979) A study on the bacterial flora isolated from marine algae. *Botanica Marina* **22**, 83-97.

Krishnan, P., Kruger, N.J. and Ratcliffe, R.G. (2005) Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany* **56**, 255-265.

Kubanek, J., Jensen, P.R., Keifer, P.A., Sullards, M.C., Collins, D.O. and Fenical, W. (2003) Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **100**, 6916-6921.

Kubanek, J., Prusak, A.C., Snell, T.W., Giese, R.A., Hardcastle, K.I., Fairchild, C.R., Aalbersberg, W., Raventos-Suarez, C. and Hay, M.E. (2005) Antineoplastic diterpene-benzoate macrolides from the Fijian red alga *Callophycus serratus*. *Organic Letters* **7**, 5261-5264.

Kumar, C.G. and Anand, S.K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 9-27.

Küpper, F.C., Carpenter, L.J., McFiggans, G.B., Palmer, C.J., Waite, T.J., Boneberg, E.-M., Woitsch, S., Weiller, M., Abela, R., Grolimund, D., Potin, P., Butler, A., Luther, G.W., Kroneck, P.M.H., Meyer-Klaucke, W. and Feiters, M.C. (2008) Iodide accumulation provides kelp with an inorganic antioxidant impacting atmospheric chemistry. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **105**, 6954-6958.

Küpper, F.C., Gaquerel, E., Boneberg, E.-M., Morath, S., Salaün, J.-P. and Potin, P. (2006) Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation cascades. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1991-1999.

Küpper, F.C., Gaquerel, E., Cosse, A., Adas, F., Peters, A.F., Müller, D.G., Kloareg, B., Salaün, J.-P. and Potin, P. (2009) Free fatty acids and methyl jasmonate trigger defense reactions in *Laminaria digitata*. *Plant and Cell Physiology* **50**, 789-800.

Küpper, F.C., Kloareg, B., Guern, J. and Potin, P. (2001) Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiology* **125**, 278-291.

Küpper, F.C. and Müller, D.G. (1999) Massive occurrence of the heterokont and fungal parasites *Anisolpidium*, *Eurychasma* and *Chytridium* in *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae). *Nova Hedwigia* **69**, 381-389.

Küpper, F.C., Müller, D.G., Peters, A.F., Kloareg, B. and Potin, P. (2002) Oligoalginate recognition and oxidative burst play a key role in natural and induced resistance of sporophytes of laminariales. *Journal of Chemical Ecology* **28**, 2057-2081.

Küpper, F.C., Schweigert, N., Ar Gall, E., Legendre, J.M., Vilter, H. and Kloareg, B. (1998) Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide. *Planta* **207**, 163-171.

La Barre, S. and Haras, D. (2007) Rencontres avec les bactéries marines. *Journal de la Société de Biologie* **201**, 281-289.

Lam, C., Grage, A., Schulz, D., Schulte, A. and Harder, T. (2008a) Extracts of North Sea macroalgae reveal specific activity patterns against attachment and proliferation of benthic diatoms: a laboratory study. *Biofouling* **24**, 59-66.

Lam, C. and Harder, T. (2007) Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity. *Journal of phycology* **43**, 874-881.

Lam, C., Stang, A. and Harder, T. (2008b) Planktonic bacteria and fungi are selectively eliminated by exposure to marine macroalgae in close proximity. *FEMS Microbiology Ecology* **63**, 283-291.

Lau, S.C.K. and Qian, P.Y. (1997) Phlorotannins and related compounds as larval settlement inhibitors of the tube-building polychaete *Hydroides elegans*. *Marine Ecology - Progress Series* **159**, 219-227.

Laycock, R.A. (1974) The detrital food chain based on seaweeds. I. Bacteria associated with the surface of Laminaria fronds. *Marine Biology* **25**, 223-231.

Leblanc, C., Colin, C., Cosse, A., Delage, L., Barre, S.L., Morin, P., Fiévet, B., Voiseux, C., Ambroise, Y., Verhaeghe, E., Amouroux, D., Donard, O., Tessier, E. and Potin, P. (2006) Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie* **2634**.

Lee, C.E. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 386-391.

Lee Wong, A.C. (1998) Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science* **81**, 2765-2770.

Leroy, C. (2006) Lutte contre les salissures marines : approche par procédés enzymatiques. Toulouse: SEVAB (Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries).

Leroy, C., Delbarre-Ladrat, C., Ghillebaert, F., Rochet, M.J., Compère, C. and Combes, D. (2007) A marine bacterial adhesion microplate test using the DAPI fluorescent dye: a new method to screen antifouling agents. *Letters in Applied Microbiology* **44**, 372-378.

Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P. and Sokol, P.A. (1999) Quorum Sensing in *Burkholderia cepacia*: Identification of the LuxRI Homologs CepRI. *journal of Bacteriology* **181**, 748-756.

Lewis, J.R. (1964) *The ecology of rocky shores*. London.

Little, B.J. and Zsolnay, A. (1985) Chemical fingerprinting of adsorbed organic materials on metal surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **104**, 79-86.

Loeb, G.I. and Neihof, R.A. (1975) Marine conditioning films. *Advances Chemical Series (1975)* **145**, 319–335.

Longford, S., R., Tujula, N.A., Crocetti, G.R., Holmes, A., J. , Holmstrom, C., Kjelleberg, S., Steinberg, P.D. and Taylor, M.W. (2007) Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquatic Microbial Ecology* **48**, 217-229.

Lovelock, J.E. (1975) Natural halocarbons in the air and in the sea. *Nature* **256**, 193-194.

Lowell, F.M. (1966) The structure of a bromine rich antibiotic. *Journal of the American Chemical Society* **88**.

Maeyama, R., Mizunoe, Y., Anderson, J.M., Tanaka, M. and Matsuda, T. (2004) Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. *Journal of Biomedical Materials Research* **70A**, 274-282.

Mai-Prochnow, A., Webb, J.S., Ferrari, B.C. and Kjelleberg, S. (2006) Ecological advantages of autolysis during the development and dispersal of *Pseudoalteromonas tunicata* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5414-5420.

Maier, I., Parodi, E., Westermeier, R. and Müller, D.G. (2000) *Maullinia ectocarpii* gen. et sp. nov. (Plasmodiophorea), an intracellular parasite in *Ectocarpus siliculosus* (Ectocarpales, Phaeophyceae) and other filamentous brown algae *Protist* **151**, 225-238.

Makin, S.A. and Beveridge, T.J. (1996) The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* **142**, 299-307.

Manefield, M., de Nys, R., Naresh, K., Roger, R., Givskov, M., Peter, S. and Kjelleberg, S. (1999) Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology* **145**, 283-291.

Manley, S.L. and Dastoor, M.N. (1987) Methyl halide (CH_3X) production from the giant kelp, *Macrocystis*, and estimates of global CH_3X production by kelp. *Limnology and Oceanography* **32**, 709-715.

Manley, S.L. and Dastoor, M.N. (1988) Methyl iodide (CH_3I) production by kelp and associated microbes. *Marine Biology* **98**, 477-482.

Mascheck, J.A. and Baker, B.J. (2008) The chemistry of algal secondary metabolism. In *Algal Chemical Ecology*. pp.1-24.

Martinelli, D., Grossmann, G., Séquin, Brandl, H. and Bachofen, R. (2004) Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology* **4**.

Matsui, K., Minami, A., Hornung, E., Shibata, H., Kishimoto, K., Ahnert, V., Kindl, H., Kajiwara, T. and Feussner, I. (2006) Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry* **67**, 649-657.

Matsukawa, M. and Greenberg, E.P. (2004) Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology* **186**, 4449-4456.

Matsuo, Y., Imagawa, H., Nishizawa, M. and Shizuri, Y. (2005) Isolation of an algal morphogenesis inducer from a marine bacterium. *Science* **307**, 1598.

Mattick, J.S. (2002) Type IV *pili* and twitching motility. *Annual Review of Microbiology* **56**, 289-314.

Matz, C., McDougald, D., Moreno, A.M., Yung, P.Y., Yildiz, F.H. and Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **102**, 16819-16824.

Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., Steinberg, P. and Kjelleberg, S. (2008) Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS ONE* **3**, e2744.

Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J. and Flemming, H.-C. (1999) The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules* **26**, 3-16.

Mazure, H.G.F. and Field, J.G. (1980) Density and ecological importance of bacteria on kelp fronds in an upwelling region. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **43**, 173-182.

McFiggans, G. (2005) Atmospheric science: Marine aerosols and iodine emissions. *Nature* **433**, E13-E13.

McFiggans, G.B., Coe, H., Burgess, R., Allan, J., Cubison, M., Rami Alfarra, L., Saunders, R., Saiz-Lopez, A., Plane, J.M.C., Wevill, D., Carpenter, L., Rickard, A.R. and Monks, P.S. (2004) Direct evidence for coastal iodine particles from *Laminaria* macroalgae – linkage to emissions of molecular iodine. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussion* **4**, 939-967.

Meusnier, I., Olsen, J.L., Stam, W.T., Destombe, C. and Valero, M. (2001) Phylogenetic analyses of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) and of its associated bacterial microflora provide clues to the origin of the mediterranean introduction. *Molecular ecology* **10**, 931-946.

Mignot, T., Shaevitz, J.W., Hartzell, P.L. and Zusman, D.R. (2007) Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* **315**, 853-856.

Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**, 165-199.

Monier, A., Pagarete, A., de Vargas, C., Allen, M.J., Read, B., Claverie, J.-M. and Ogata, H. (2009) Horizontal gene transfer of an entire metabolic pathway between a eukaryotic alga and its DNA virus. *Genome Research* **19**, 1441-1449.

Moore, R.E., Pettus, J.A., Jr. and Doty, M.S. (1968) Dictyopterene A, an odoriferous constituent from algae of the genus *Dictyopteris*. *Tetrahedron Letters* **46**, 4787-4790.

Moore, R.E. and Pettus, J.A.J. (1971) Isolation and structure determination of dictyopterenes C' and D' from *Dictyopteris*. Stereospecificity in the cope rearrangement of dictyopterenes A and B. *Journal of the American Chemical Society* **93**, 3087–3088.

Moore, R.E. and Yost, G. (1973) Dihydrotropones from *Dictyopteris*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **24**, 937–938.

Morán, A.C., Hengst, M.B., De la Iglesia, R., Andrade, S., Correa, J.A. and Gonzalez, B. (2008) Changes in bacterial community structure associated with coastal copper enrichment. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*.

Motta, A., Romano, I. and Gambacorta, A. (2004) Rapid and sensitive NMR method for osmolyte determination. *Journal of Microbiological Methods* **58**, 289-294.

Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U.G., Bowler, C., Valentin, K. and Bhattacharya, D. (2009) Genomic footprints of a cryptic plastid endosymbiosis in diatoms. *Science* **324**, 1724-1726.

Müller, D.G., Kapp, M. and Knippers, R. (1998) Viruses in marine brown algae. *Advances in Virus Research* **50**, 49-67.

Munro, M.H.G. and Blunt, J.W. (2005) MarinLit, a marine chemical literature database, version 12.5. *Marine Chemistry Group, University of Canterbury, Christchurch, NZ.*

Mur, L.A.J., Kenton, P. and Draper, J. (1997) Something in the air: Volatile signals in plant defence. *Trends in Microbiology* **5**, 297-300.

Nealson, K.H. (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. *Archives of Microbiology* **112**, 73-79.

Nealson, K.H., Platt, T. and Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology* **104**, 313-322.

Negri, A.P., Webster, N.S., Hill, R.T. and Heyward, A.J. (2001) Metamorphosis of broadcast spawning corals in response to bacteria isolated from crustose algae. *Marine Ecology - Progress Series* **223**, 121-131.

O'Brien, P.J., Siraki, A.G. and Shangari, N. (2005) Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology* **35**, 609-662.

O'Dowd, C.D., Jimenez, J.L., Bahreini, R., Flagan, R.C., Seinfeld, J.H., Hameri, K., Pirjola, L., Kulmala, M., Jennings, S.G. and Hoffmann, T. (2005) Atmospheric science: Marine aerosols and iodine emissions (Reply). *Nature* **433**, E13-E14.

O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* **30**, 295-304.

Ochi, M., Watanabe, M., Miura, I., Taniguchi, M. and Tokoroyama, T. (1980) Amijiol, isoamijiol, and 14-deoxyamijiol, three new diterpenoids from the brown seaweed *Dictyota linearis. Chemistry Letters* **10**, 1229–1232.

Olofsson, A.C., Hermansson, M. and Elwing, H. (2005) Use of a quartz crystal microbalance to investigate the antiadhesive potential of N-acetyl-L-cysteine. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2705-2712.

Palmer, C.J., Anders, T.L., Carpenter, L.J., KÃ¼pper, F.C. and McFiggans, G.B. (2005) Iodine and halocarbon response of *Laminaria digitata* to oxidative stress and links to atmospheric new particle production. *Environmental Chemistry* **2**, 282-290.

Parsek, M.R. and Fuqua, C. (2004) Biofilms 2003: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of Bacteriology* **186**, 4427-4440.

Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* **13**, 27-33.

Pasmore, M. and Costerton, J.W. (2003) Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**, 407-413.

Patel, P., Callow, M., Joint, I. and Callow, J.A. (2003) Specificity in the settlement - modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. *Environmental Microbiology* **5**, 338-349.

Paul, N.A., de Nys, R. and Steinberg, P.D. (2006b) Seaweed–herbivore interactions at a small scale: direct tests of feeding deterrence by filamentous algae. *Marine Ecology - Progress Series* **323**, 1-9.

Paul, V.J., Arthur, K.E., Ritson-Williams, R., Ross, C. and Sharp, K. (2007) Chemical defenses: from compounds to communities. *The Biological Bulletin* **213**, 226-251.

Paul, V.J. and Fenical, W. (1983) Isolation of halimedatrial: chemical defense adaptation in the calcareous reef-building alga *Halimeda*. *Science* **221**, 747-749.

Paul, V.J. and Puglisi, M.P. (2004) Natural product reports. *21*.

Paul, V.J., Puglisi, M.P. and Ritson-Williams, R. (2006a) Marine chemical ecology. *Natural Product Reports* **23**, 153-180.

Paul, V.J., Sun, H.H. and Fenical, W. (1982) Udoteal, a linear diterpenoid feeding deterrent from the tropical green alga *Udotea flabellum*. *Phytochemistry* **21**, 468-469.

Paul, V.J. and Van Alstyne, K.L. (1992) Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **160**, 191-203.

Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A. and Per, Å. (1997) Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology - Progress Series* **157**, 139-146.

Perez, R. (1970) Teneur en acide alginique et degré de polymérisation de ce produit au cours de la vie de *Laminaria digitata* (L.) Lamour. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **34**, 351-361.

Peters, A.F. and Schaffelke, B. (1996) *Streblonema* (Ectocarpales, Phaeophyceae) infection in the kelp *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae) in the western Baltic. *Hydrobiologia* **326-327**, 111-116.

Plouguerné, E., Ioannou, E., Georgantea, P., Vagias, C., Roussis, V., Hellio, C., Kraffe, E. and Stiger-Pouvreau, V. (2009) Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt *Marine Biotechnology* In press

Pohnert, G. (2000) Wound-activated chemical defense in unicellular planktonic algae. *Angewandte Chemie* **39**, 4352-4354.

Pohnert, G. (2004) Chemical defense strategies of marine organisms. In *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals I*. pp.179-219.

Pohnert, G. (2005) Diatom/copepod interactions in plankton: the indirect chemical defense of unicellular algae. *ChemBioChem* **6**, 946-959.

Potin, P. (2008) Oxidative burst and related responses in biotic interactions of algae. In *Algal Chemical Ecology*. pp.245-271.

Potin, P., Bouarab, K., Küpper, F. and Kloareg, B. (1999) Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 276-283.

Potin, P., Bouarab, K., Salaun, J., Pohnert, G. and Kloareg, B. (2002) Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 308-317.

Pradier, C.M., Rubio, C., Poleunis, C., Bertrand, P., Marcus, P. and Compère, C. (2005) Surface characterization of three marine bacterial strains by Fourier transform IR, X-ray photoelectron spectroscopy and time-of-flight secondary-ion mass spectrometry, correlation with adhesion on stainless steel surfaces. *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 9540-9549.

Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I *pili*. *Molecular Microbiology* **30**, 285-293.

Prieur, D., Gaill, F. and Corre, S. (1993) Complex epibiotic bacterial communities on marine organisms: fouling or interactions ? In *Trends in Microbial Ecology* ed. Pedrós-Alió, G.R.C. pp.207–212. Barcelona: Spanish Society for Microbiology.

Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P. and Dorel, C. (2001) Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *Journal of Bacteriology* **183**, 7213-7223.

Provasoli, L. and Pintner, I.J. (1980) Bacteria induced polymorphism in an axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). *Journal of phycology* **16**, 196-201.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. and Glockner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* **35**, 7188-7196.

Pullaiah, K.C., Surapaneni, R.K., Rao, C.B., Albizati, K.F., Sullivan, B.W., Faulkner, D.J., He, C.H. and Clardy, J. (1985) Dictyoxetane, a novel diterpene from the brown alga *Dictyota dichotoma* from the Indian Ocean. *Journal of Organic Chemistry* **50**, 3665–3666.

Qian, P.Y., Lau, S., Dahms, H.U., Dobretsov, S. and Harder, T. (2007) Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology* **9**, 399-410.

Ragan, M.A. and Glombitza, K.-W. (1986) Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research* **4**, 129-241.

Rao, D., Webb, J.S. and Kjelleberg, S. (2005) Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**, 1729-1736.

Reed, R.H. and Stewart, W.D.P. (1985) Osmotic adjustment and organic solute accumulation in unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Marine Biology* **88**, 1-9.

Reise, K., Gollasch, S. and Wolff, W.J. (1999) Introduced marine species of the north sea costs. *Helgolander meeresunters* **52**, 219-234.

Ritter, A., Goulitquer, S., Salaün, J.-P., Tonon, T., Correa, J.A. and Potin, P. (2008) Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *New Phytologist* **180**, 809-821.

Roche, J. and Yagi, Y. (1952) Sur la fixation de l'iode radioactif par les algues et sur les constituants iodés des Laminaires. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie* **146**, 642–645.

Roeder, V., Collèn, J., Rousvoal, S., Corre, E., Leblanc, C. and Boyen, C. (2005) Identification of stress gene transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *Journal of Phycology* **41**, 1227-1235.

Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **51**, 365-379.

Rubio, C. (2002) Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. In *Métallurgie et Matériaux*. Paris: Université de Paris VI.

Ruelle, V., El Moualij, B., Zorzi, W., Ledent, P. and De Pauw, E. (2004) Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 2013-2019.

Saenko, G.N., Kravtsova, Y.Y., Ivanenko, V.V. and Sheludko, S.I. (1978) Concentration of lodine and bromine by plants in the seas of Japan and Okhotsk. *Marine Biology* **47**, 243-250.

Santiago-Vazquez, L.Z., Bruck, T.B., Bruck, W.M., Duque-Alarcon, A.P., McCarthy, P.J. and Kerr, R.G. (2007) The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirrhipathes lutkeni*. *ISME J* **1**, 654-659.

Sauer, F.G., Barnhart, M., Choudhury, D., Knight, S.D., Waksman, G. and Hultgren, S.J. (2000) Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Current opinion in structural biology* **10**, 548-556.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology* **184**, 1140-1154.

Sauvageau, C. (1918) *Recherche sur les laminaires des côtes de France*. Paris.

Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M.M., Yumoto, I., Ezura, Y. and Christen, R. (1998) *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a marine bacterium that is the causative agent of red spot disease of *Laminaria japonica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **48**, 769-774.

Sawabe, T., Tanaka, R., Iqbal, M.M., Tajima, K., Ezura, Y., Ivanova, E.P. and Christen, R. (2000) Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162(T) and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and the extended description of the

species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 265-271.

Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and sugnal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 305-310.

Schneider, R.P., Chadwick, B.R., Pembrey, R., Jankowski, J. and Acworth, I. (2006) Retention of the Gram-negative bacterium SW8 on surfaces under conditions relevant to the subsurface environment: Effects of conditioning films and substratum nature. *FEMS Microbiology Ecology* **14**, 243-254.

Schneider, R.P. and Marshall, K.C. (1994) Retention of the Gramnegative marine bacterium SW8 on surfaces - effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2**, 387-396.

Schoenwaelder, M.E.A. (2002) The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia* **41**, 125-139.

Schweder, T., Markert, S. and Hecker, M. (2008) Proteomics of marine bacteria. *Electrophoresis* **29**, 2603-2616.

Schrauwers, A. (2003) Irregular biofilms are predictable Website: http://www.delftoutlook.tudelft.nl/info/indexe0ee.html?hoofdstuk=Article&ArtID=5116

Sekimoto, T., Beakes, G.W., Gachon, C.M.M., Müller, D.G., Küpper, F.C. and Honda, D. (2008) The development, ultrastructural cytology, and molecular phylogeny of the basal oomycete *Eurychasma dicksonii*, infecting the filamentous phaeophyte algae *Ectocarpus siliculosus* and *Pylaiella littoralis*. *Protist* **159**, 299-318.

Selosse, M.-A. (2006) Animal ou végétal? Une distinction obsolète. *Pour La Science, Biologie* **350**, 66-72.

Shah, M., Wuilloud, R.G., Kannamkumaratha, S.S. and Carusow, J.A. (2005) Iodine speciation studies in commercially available seaweed by coupling different chromatographic techniques with UV and ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **20**, 176-182.

Shen, B., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J. (1997a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiology* **113**, 1177-1183.

Shen, B., Jensen, R.G. and Bohnert, H.J. (1997b) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* **115**, 527-532.

Shibata, T., Hama, Y., Miyasaki, T., Ito, M. and Nakamura, T. (2006) Extracellular secretion of phenolic substances from living brown algae. *Journal of Applied Phycology* **18**, 787-794.

Sieburth, J.M. (1969) Studies on algal substances in the sea. III. The production of extracellular organic matter by littoral marine algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **3**, 290-309.

Sieburth, J.M. and Conover, J.T. (1965) *Sargassum* tannon, an antibiotic which retards fouling. *Nature* **208**, 52–53.

Silva-Aciares, F. and Riquelme, C.E. (2008) Inhibition of attachment of some fouling diatoms and settlement of *Ulva lactuca* zoospores by film-forming bacterium and

their extracellular products isolated from biofouled substrata in Northern Chile. *Electronic Journal of Biotechnology* **11**

Sims, J.J., Fenical, W., Wing, R.M. and Radlick, P. (1971) Marine natural products. I. Pacifenol, a rare sesquiterpene containing bromine and chlorine from the red alga, *Laurencia pacifica Journal of the American Chemical Society* **93**, 3774–3775.

Sims, J.J., Lin, G.H.Y. and Wing, R.M. (1974) Marine natural products. X. Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. *Tetrahedron Letters* **39**, 3487–3490.

Somssich, I.E. and Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* **3**, 86-90.

Spiro, M.D., Ridley, B.L., Eberhard, S., Kates, K.A., Mathieu, Y., O'Neill, M.A., Mohnen, D., Guern, J., Darvill, A. and Albersheim, P. (1998) Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* **116**, 1289-1298.

Sriramulu, D.D., Lunsdorf, H., Lam, J.S. and Romling, U. (2005) Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 667-676.

Stanley, N.R. and Lazazzera, B.A. (2005) Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-dl-glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology* **57**, 1143-1158.

Stapper, A.P., Narasimhan, G., Ohman, D.E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Hoiby, N. and Mathee, K. (2004) Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology* **53**, 679-690.

Staufenberger, T., Thiel, V., Wiese, J. and Imhoff, J.F. (2008) Phylogenetic analysis of bacteria associated with *Laminaria saccharina*. *FEMS Microbiology Ecology* **64**, 65-77.

Steinberg, P.D. and de Nys, R. (2002) Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *Journal of phycology* **38**, 621-629.

Steinberg, P.D., Schneider, R. and Kjelleberg, S. (1997) Chemical defenses of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation* **8**, 211-220.

Stewart, P.S. and Costerton, J.W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* **358**, 135-138.

Stratmann, K., Boland, W. and Müller, D.G. (1992) Pheromones of marine brown algae; A new branch of the eicosanoid metabolism **31**, 1246-1248.

Suzuki, M., Matsuo, Y., Takahashi, Y. and Masuda, M. (1995) Callicladol, a novel cytotoxic bromotriterpene polyether from a Vietnamese species of the red algal genus *Laurencia*. *Chemistry Letters* **11**, 1045-1046.

Svensson, J.R., Nylund, G.M., Cervin, G., Thot, G. and Pavia, H. (2009) Japanese macroalgae use chemical warfare to invade sweden. *Phycologia* **48**, 127.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.

Targett, N.M. and Arnold, T.M. (1998) Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *Journal of Phycology* **34**, 195–205.

Targett, N.M. and Arnold, T.M. (2001) Effects of secondary metabolites on digestion in marine herbivores. In *Marine Chemical Ecology* eds. McClintock, J.B. and Baker, B.J. pp.391-411: CRC Press.

Tatewaki, M., Provasoli, L. and Pintner, I.J. (1983) Morphogenesis of *Monostroma oxyspermum* (Kutz.) Doty (Chlorophyceae) in axenic culture, especially in bialgal culture. *Journal of phycology* **19**, 409-416.

Taylor, G.T., Zheng, D., Lee, M., Troy, P.J., Gyananath, G. and Sharma, S.K. (1997) Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters. *Biofouling* **11**, 31 - 57.

Taylor, M.W., Radax, R., Steger, D. and Wagner, M. (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**, 295-347.

Teas, J., Pino, S., Critchley, A. and Braverman, L.E. (2004) Variability of iodine content in common commercially available edible seaweeds. *Thyroid* **14**, 836-841.

Thomas, W.E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V. and Sokurenko, E.V. (2002) Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* **109**, 913-923.

Tolker-Nielsen, T. and Molin, S. (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology* **40**, 75-84.

Ton-Hat, H. and Schneewind, O. (2004) Assembly of *pili* in Gram-positive bacteria. *Trends in Microbiology* **12**, 228-234.

Tringali, C., Piattelli, M. and Nicolosi, G. (1984) Structure and conformation of new diterpenes based on the dolabellane skeleton from a *Dictyota* species. *Tetrahedron* **40**, 799–803.

Tujula, N.A. (2006a) Analysis of the epiphytic bacterial community associated with the green alga Ulva australis. Sydney: University of New South Wales

Tujula, N.A., Holmstrom, C., Mumann, M., Amann, R., Kjelleberg, S. and Crocetti, G.R. (2006b) A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae. *Journal of Microbiological Methods* **65**, 604-607.

Uchida, M., Maeda, T. and Shiba, T. (2002) Phylogenic analysis of three marine bacteria that have an ability to decompose *Laminaria japonica*. *Fish Sci* **68**, 703-705.

Uchida, M., Nakayama, A. and Abe, S. (1995) Distribution and characterization of bacteria capable of decomposing brown-algae fronds in waters associated with *Laminaria* vegetation. *Fish Sci* **61**, 117-120.

Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A. and Filloux, A. (2001) The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **98**, 6911-6916.

Van den Ackerveken, G., Marois, E. and Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**, 1307-1316.

Vardi, A., Formiggini, F., Casotti, R., De Martino, A., Ribalet, F., Miralto, A. and Bowler, C. (2006) A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms. *PLoS Biol* **4**, e60.

Vargha, M., Takats, Z., Konopka, A. and Nakatsu, C.H. (2006) Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of Microbiological Methods* **66**, 399-409.

Verhaeghe, E., Fraysse, A., Guerquin-Kern, J.-L., Wu, T.-D., Devès, G., Mioskowski, C., Leblanc, C., Ortega, R., Ambroise, Y. and Potin, P. (2008) Microchemical imaging of iodine distribution in the brown alga *Laminaria digitata* suggests a new mechanism for its accumulation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **13**, 257-269.

Wahl, M. (1989) Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology - Progress Series* **58**, 175-189.

Wai, S.N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S.-I. and Yoshida, S.-I. (1998) *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3648-3655.

Wang, G., Shuai, L., Li, Y., Lin, W., Zhao, X. and Duan, D. (2008) Phylogenetic analysis of epiphytic marine bacteria on Hole-Rotten diseased sporophytes of *Laminaria japonica*. *Journal of Applied Phycology* **20**, 403-409.

Waters, C.M. and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**, 319-346.

Watnick, P.I. and Kolter, R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* **34**, 586-595.

Webb, J.S., Givskov, M. and Kjelleberg, S. (2003) Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 578-585.

Weinberger, F. (2007) Pathogen-induced defense and innate immunity in macroalgae. *Biological Bulletin* **213**, 290-302.

Weinberger, F. and Friedlander, M. (2000a) Endogenous and exogenous elicitors of a hypersensitive response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) *Journal of Applied Phycology* **12**, 139-145.

Weinberger, F. and Friedlander, M. (2000b) Response of *Gracilaria conferta* (Rhodophyta) to oligoagars results in defense against agar-degrading epiphytes. *Journal of Phycology* **36**, 1079-1086.

Weinberger, F., Friedlander, M. and Hoppe, H.-G. (1999) Oligoagars elicit a physiological response in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* **35**, 747-755.

Weinberger, F., Leonardi, P., Miravalles, A., Correa, J.A., Lion, U., Kloareg, B. and Potin, P. (2005) Dissection of two distinct defense-related responses to agar oligosaccharides in *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and *Gracilaria conferta* (Rhodophya). *Journal of Phycology* **41**, 863-873.

Weinberger, F., Richard, C., Kloareg, B., Kashman, Y., Hoppe, H.-G. and Friedlander, M. (2001) Structure-activity relationships of oligoagar elicitors toward *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* **37**, 418-426.

Whitchurch, C.B., Hobbs, M., Livingston, S.P., Krishnapillai, V. and Mattick, J.S. (1991) Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene* **101**, 33-44.

Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. and Salmond, G.P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **25**, 365-404.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**, 860-864.

Wichard, T., Poulet, S.A., Halsband-Lenk, C., Albaina, A., Harris, R., Liu, D. and Pohnert, G. (2005) Survey of the chemical defence potential of diatoms: screening of fifty species for α,β,γ,δ-unsaturated aldehydes. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 949-958.

Williams, P. (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**, 3923-3938.

Williamson, J.D., Stoop, J.M.H., Massel, M.O., Conkling, M.A. and Pharr, D.M. (1995) Sequence analysis of a mannitol dehydrogenase cDNA from plants reveals a function for the pathogenesis-related protein ELI3. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **92**, 7148-7152.

Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**, 681-692.

Wolff, J. (2001) Iodure, le système de transport actif et les flux d'iodure dans la thyroïde. In *La thyroïde - Des concepts à la pratique clinique, 2ème édition* ed. Elsevier. pp.15-22. Paris.

Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J.O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A. and Parsek, M.R. (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **100**, 7907-7912.

Yamada, K., Tan, H. and Tatematsu, H. (1979) Isolation and structure of dictyoprolene, a possible precursor of various undecanes in brown algae from *Dictyopteris prolifera*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **13**, 572–573.

Yamaguchi, T., Ikawa, T. and Nisizawa, K. (1966) Incorporation of radioactive carbon from H14CO3-into sugar constituents by a brown alga *Eisenia bicyclis*, during photosynthesis and its fate in the dark. *Plant and Cell Physiology* **7**, 217-229.

Yaphe, W. (1957) The use of agarase from *Pseudomonas atlantica* in the identification of agar in marine algae (Rhodophyceae). *Canadian Journal of Microbiology* **3**, 987-993.

Yaphe, W. and Morgan, K. (1959) Enzymic hydrolysis of fucoidin by *Pseudomonas atlantica* and *Pseudomonas carrageenovora*. *Nature* **183**, 761-762.

Yebra, D.M., Kiil, S. and Dam-Johansen, K. (2004) Antifouling technology--past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* **50**, 75-104.

Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D.B., Halpern, A.L., Williamson, S.J., Remington, K., Eisen, J.A., Heidelberg, K.B., Manning, G., Li, W., Jaroszewski, L., Cieplak, P., Miller, C.S., Li, H., Mashiyama, S.T., Joachimiak, M.P., van Belle, C., Chandonia, J.-M., Soergel, D.A., Zhai, Y., Natarajan, K., Lee, S., Raphael, B.J., Bafna, V., Friedman, R., Brenner, S.E., Godzik, A., Eisenberg, D., Dixon, J.E., Taylor, S.S., Strausberg, R.L., Frazier, M. and Venter, J.C. (2007) The Sorcerer II global ocean sampling expedition: expanding the universe of protein Families. *PLoS Biology* **5**, e16.

Zobell, C.E. (1943) The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology* **46**, 39-56.

Zobell, C.E. and Allen, E.C. (1935) The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of bacteriology* **29**, 239-251.

ZoBell, C.E. and Upham, H.C. (1944) A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bulletin of the Scripps Institution of Oceanography* **5**, 239-292.

Annexes

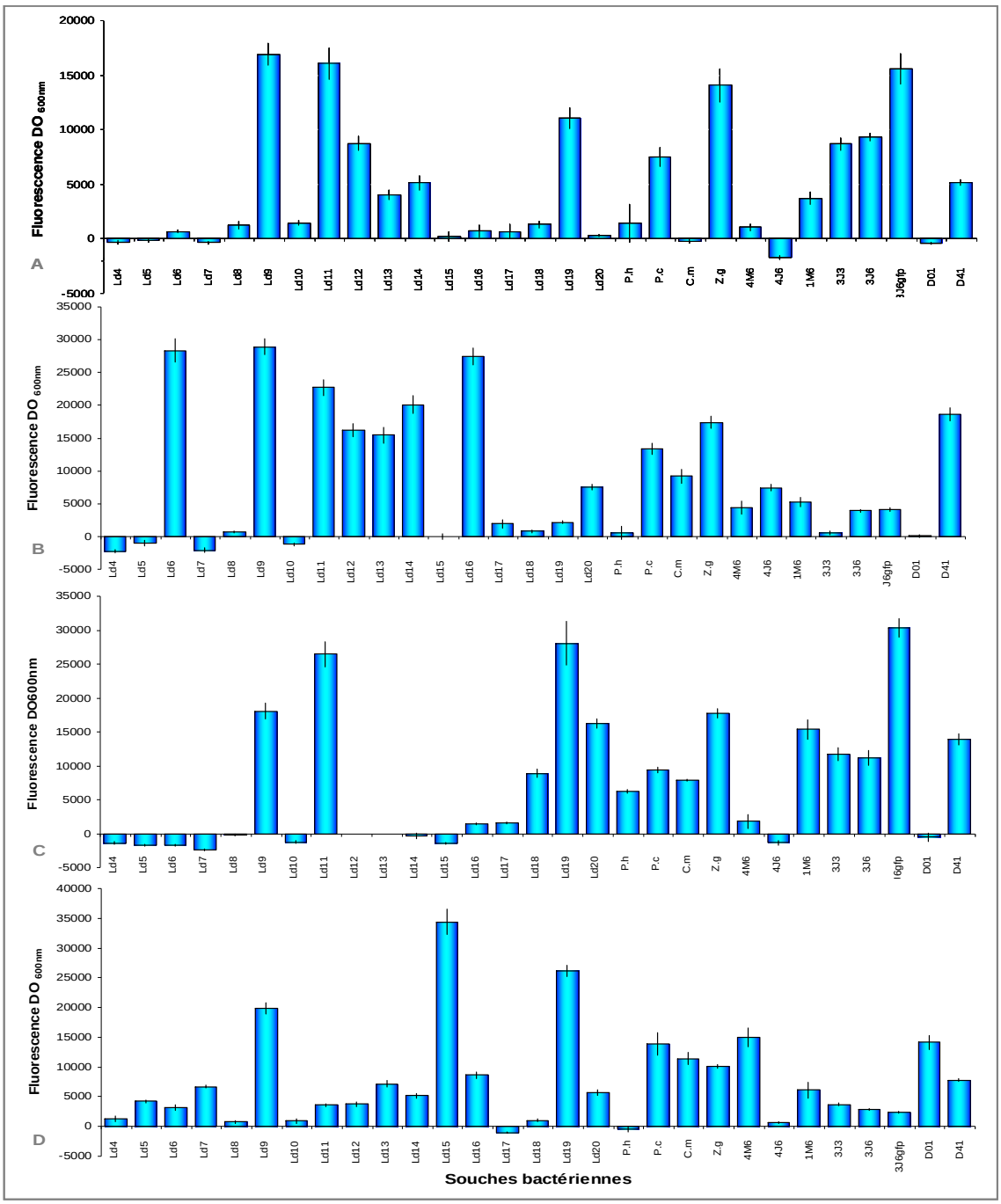
ANNEXE 1

Récapitulatif des différentes souches bactériennes étudiées durant cette thèse

	Souches	Isolement	Genre bactérien	Famille	Ordre	Classe	Phylum	Gram
Isolées de *L. digitata*	Ld 1	*L. digitata* Crampon	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 4	*L. digitata* Crampon	*Curtobacterium*	*Microbacteriaceae*	*Actinomycetales*	*Actinobacteria*	*Actinoacteria*	Gram positif
	Ld 5	*L. digitata* Crampon	*Arthrobacter*	*Micrococcacacae*	*Actinomycetales*	*Actinobacteria*	*Actinoacteria*	Gram positif
	Ld 6	*L. digitata* Partout	*Pseudomonas*	*Pseudomonadaceae*	*Pseudomonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 7	*L. digitata* Crampon	*Agrococcus*	*Microbacteriaceae*	*Actinomycetales*	*Actinobacteria*	*Actinoacteria*	Gram positif
	Ld 8	*L. digitata* Crampon	*Halomonas/ Cobetia*	*Halomonadaceae*	*Oceanospirillales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 9	*L. digitata* Méristème	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 10	*L. digitata* Crampon	*Paracoccus*	*Rhodobacteraceae*	*Rhodobacterales*	*α - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 11	*L. digitata* Crampon	*Algibacter*	*Flavobacteriaceae*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteria*	*Bacteroidetes*	Gram négatif
	Ld 12	*L. digitata* Crampon	*Cellulophaga*	*Flavobacteriaceae*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteria*	*Bacteroidetes*	Gram négatif
	Ld 13	*L. digitata* Crampon	*Algibacter*	*Flavobacteriaceae*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteria*	*Bacteroidetes*	Gram négatif
	Ld 14	*L. digitata* Crampon	*Curtobacterium*	*Microbacteriaceae*	*Actinomycetales*	*Actinobacteria*	*Actinoacteria*	Gram positif
	Ld 15	*L. digitata* Crampon	*Kocuria*	*Micrococcacae*	*Actinomycetales*	*Actinobacteria*	*Actinoacteria*	Gram positif
	Ld 16	*L. digitata* Stipe	*Paracoccus*	*Rhodobacteraceae*	*Rhodobacterales*	*α - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 17	*L. digitata* Crampon	*Rhodococcus*	*Nocardiaceae*	*Actinomycetales*	*Actinobacteria*	*Actinoacteria*	Gram positif
	Ld 18	*L. digitata* Crampon Lame	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 19	*L. digitata* Méristème	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Ld 20	*L. digitata* Méristème	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
LBCM	1M6	t=6h	*Algibacter*	*Flavobacteriaceae*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteria*	*Bacteroidetes*	Gram négatif
	4M6	t=6h surfaces de verre	*Paracoccus*	*Rhodobacteraceae*	*Rhodobacterales*	*α - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	4J6	t=6h surfaces de verre	*Bacillus simplex*	*Bacillaceae*	*Bacillales*	*Bacilli*	*Firmicutes*	Gram positif
	3J6GFP	bactérie modifiée	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	3J6	t=6h surfaces de verre	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	3J3	t=3h surfaces de verre	*Pseudoalteromonas*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
SBR	P. c	ATCC 43555, algues	*Pseudoalteromonas carrageenovora*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	P. h	ATCC 14393	*Pseudoalteromonas haloplanktis*	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	C. m	ATCC 25374, eau de mer	*Cobetia marina*	*Halomonadaceae*	*Oceanospirillales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	Z. g	*Delesseria sanguinea*	*Zobellia galactanivorans*	*Flavobacteriaceae*	*Flavobacteriales*	*Flavobacteria*	*Bacteroidetes*	Gram négatif
Ifremer	D41	t=24h surfaces de Téflon	*Pseudoalteromonas* sp. nov.	*Pseudoalteromonadaceae*	*Alteromonadales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif
	D01	t=6h surfaces de verre	*Vibrio vulnificus*	*Vibrionaceae*	*Vibrionales*	*γ - proteobacteria*	*Proteobacteria*	Gram négatif

ANNEXE 2

Adhésion des souches bactériennes en EMSF sur les microplaques Costar



L'adhésion de toutes les souches bactériennes isolées de *L. digitata*, excepté *Pseudoalteromonas* sp. Ld1, a été testée en EMSF, ainsi que toutes les souches bactériennes marines de référence, soit au total 29 souches bactériennes marines. Les histogrammes montrent les moyennes des 8 réplicats des valeurs de fluorescence par souches bactériennes, après déduction de la valeur moyenne du blanc (EMSF). Les barres correspondent aux erreur-types des 8 réplicats ; *(A)* 1ère série d'adhésion, *(B)* 2ème série, *(C)* 4ème série et *(D)* 5ème série d'adhésion.

ANNEXE 3

Liste des travaux et ouvrages, communications et publications durant la thèse

Congrès nationaux et internationaux (avec actes) :

- Colloque national : Les Algues et leur Importance actuelle, Biodiversité, environnement, exploitation et santé - Concarneau – du 9 au 10 décembre 2008
Session 8 : Interactions biotiques, allélopathie
Présentation orale : L'algue brune *Laminaria digitata* et ses bactéries associées
Salaün S., La Barre S., Bazire A.

- Colloque national : Les Algues et leur Importance actuelle, Biodiversité, environnement, exploitation et santé - Concarneau – du 9 au 10 décembre 2008
Session 8 : Interactions biotiques, allélopathie
Présentation orale : La RMN des tissus vivants et des cellules entières : ses applications en métabolomique et dans les interactions algues-microbes
La Barre S., Salaün S., Kervarec N, Potin P.

- Congrès international : Second International Symposium on Antimicrobial Peptides : Food, Veterinary, Medical and Novel Applications – Saint-Malo, France – du 17 au 19 juin 2009
Présentation affiche :Anti-biofilm activity of a proteinaceous compound secreted by the marine bacterium strain *Pseudoalteromonas haloplanktis* 3J6
Soum-Soutéra E., Dheilly A., Klein G., Salaün S., Bazire A. and Dufour A.

- Congrès international : FEMS 2009 3rd Congress of European Microbiologists ; Microbes and Man – interdependence and future challenges – Gothenburg, Suède – du 28 juin au 2 juillet 2009
Poster Session 2 : Environmental Microbiology
Présentation affiche : Influence of exudates of the kelp *Laminaria digitata* on adhesion and biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes
Salaün S., Bazire A., Potin P., La Barre S.

- Symposium international : 6th European Conference on Marine Natural Products – Porto, Portugal – du 19 au 23 Juillet 2009
Présentation orale : NMR and MS techniques for rapid characterization of prokaryote - eukaryote associations: spectroscopic fingerprints of marine algae and of their associated microflora
La Barre S., Salaün S., Kervarec N., Dittami S., Le Bail A., Tonon T., Charrier B., Potin P.

Congrès nationaux et internationaux (sans actes) :

- Journées des Doctorants en Science de la Mer - Villefranche-sur-mer - du 6 au 8 février 2008
Session 3 : Interactions biologiques et physiques
Présentation orale : La macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses bactéries associées

- Congrès national : Troisièmes journées thématiques du Réseau National Biofilm - VVF du Dourdan – du 24 au 25 juin 2008
Biofilms: approches expérimentales et moléculaires
Session 1: biofilm : approche expérimentale
Comment les cultiver au laboratoire, les prélever sur le terrain, les caractériser ?
Mots clés: biomasse, biodiversité, activité, physiologie, structure physique, "flow-cells", réacteur, échantillonnage, modèle biologique
Présentation orale : Les bactéries marines cultivables associées à la macroalgue brune *Laminaria digitata*
Salaün, S., Pennanec, X., Kervarec, N., Potin, P., Haras, D., La Barre, S.

Production scientifique :

- General occurrence of the glucosinolate glucocochlearin within *Cochlearia* genus
*Dauvergne X., Cérantola S., Salaün S., Magné C., Kervarec N., Bessières M-A., Deslandes E. (*2006) Carbohydrate Research, Volume 341, Issue 12 : 2166-2169

- Whole-cell spectroscopy is a convenient tool to assist molecular identification of cultivable marine bacteria and to investigate their adaptive metabolism - an analysis of selected bacteria associated with the algal kelp *Laminaria digitata*
Salaün S., Kervarec N., Potin P., Haras D., Piotto M. and La Barre S. (2010) Talanta, Volume 80, Issu 5 : 1758-1770

“Interactions entre la macroalgue brune *Laminaria digitata* et ses épiphytes bactériens : Etudes moléculaire et spectroscopiques, et capacité d’adhésion et de formation de biofilm’’

Résumé

Il est désormais admis que toute surface immergée en eau de mer est rapidement couverte d’un biofilm marin, suivi pour certaines de macrosalissures, essentiellement composées d’organismes marins vivants. Les thalles de macroalgues fournissent des surfaces importantes à la formation de biosalissures. Cependant, leur surface reste la plupart du temps exempt de macrosalissures, peut-être en relation avec leur succès évolutif, montrant leurs multiples stratégies de cohabitation avec leurs colonisateurs. Les macroalgues sont donc des modèles naturels de choix, susceptibles d’inspirer des solutions originales aux problèmes causés par les biofilms marins.

Dans cette étude sur les bactéries associées aux thalles de l’algue brune *Laminaria digitata*, connue pour avoir un métabolisme halogéné particulier, nous avons isolé 18 souches bactériennes épiphytes, séquencé leur ADNr 16S et construit l’arbre phylogénétique correspondant. Puis nous les avons caractérisées par des méthodes spectroscopiques et étudié leur comportement d’adhésion et de formation de biofilm en présence de composés provenant de l’algue. Douze souches bactériennes marines de référence (Gram$^+$ *Firmicutes*, et Gram$^-$ *α-proteobacteria, γ-proteobacteria* et *Bacteroidetes*) ont été traitées de la même manière.

La taxonomie moléculaire des souches associées à *L. digitata* a révélé des bactéries à Gram$^+$ *Actinobacteria* et à Gram$^-$ *α-proteobacteria, γ-proteobacteria* et *Bacteroidetes*. Une base de données de profils spectraux des 30 souches a été construite en spectrométrie de masse MALDI-ToF à partir de cellules bactériennes entières. La signature spectrale propre à chaque souche bactérienne s’est révélée être un outil rapide et fiable à des fins taxonomiques. Les profils spectraux obtenus en RMN HR-MAS, également à partir de cellules entières, s’est avérée moins discriminante taxonomiquement que la MALDI-ToF. Cependant, les signatures spectrales variant en fonction du milieu de culture utilisé, la RMN HR-MAS s’est révélée être un outil utile dans l’étude des réponses d’adaptation physiologique bactérienne à l’environnement.

Les souches bactériennes ont montré un pouvoir d’adhésion en microplaques en eau de mer filtrée stérile et de formation de biofilm en milieu ZoBell spécifique à la souche. Ces pouvoirs d’adhésion et de formation de biofilm pouvaient être plus ou moins sensible (augmenté ou diminué) lorsque des métabolites extraits et des exsudats de l’algue ont été co-incubés avec les souches. Les bactéries associées à *L. digitata* ont été plus sensibles aux exsudats d’algue que les bactéries de référence, avec un effet majoritairement négatif sur l’adhésion et la formation de biofilm. Les métabolites extraits avec des solvants organiques, présents à la surface et dans l’algue, ont un effet majoritairement négatif sur l’adhésion de bactéries associées à l’algue, et positif sur l’adhésion des bactéries de référence. Enfin, des métabolites purs ont également été testés sur ces différentes souches, impliquant des réponses d’adhésion et de formation de biofilm propre à chaque souche.

Mots clefs : *bactéries marines ;* Laminaria digitata *; spectrométrie de masse MALDI-ToF ; RMN HR-MAS ; taxonomie ADNr 16S ; adaptation physiologique ; adhésion ; biofilm ; chambre à flux ; interaction algue-bactéries*

“Interactions between the brown algae *Laminaria digitata* and its bacterial epiphytes : molecular and spectroscopics studies, and adhesion and biofilm formation capacities’’

Abstract

Once immersed in natural seawater, any surface will be rapidly colonized by biofilm forming bacteria, which tend to favour the establishment of sessile invertebrates, algae and protists as assemblages that cause macrofouling. Macrophytic algae represent very large surfaces for potential colonization by microbial and fouling epibionts. Yet actively growing parts are conspicuously devoid of visible epiphytism – presumably as a consequence of their evolutionary success based on a life long history of cohabitation with marine bacteria and other colonizers. As such, algae represent choice models upon which original antifouling biotechnologies may find inspiration.

Our study is centered on the kelp *Laminaria digitata* which enjoys a unique metabolism featuring iodine and bromine processing haloperoxidases, and on its bacterial epiflora. We have isolated 18 cultivatable epiphytic strains of bacteria from selected surfaces of the thallus, we have sequenced their ADNr 16S, and we have built the corresponding phylogenetic tree from matches with online databases. Then, we characterized each strain from intact cell preparations by recording their proteome and their metabolome signature spectra, and finally we studied the adhesion and biofilm forming capabilities of selected strains when exposed to metabolites produced by their *L. digitata* host. Twelve marine reference strains isolated from inert surfaces (Gram$^+$ *Firmicutes*, and Gram$^-$ *α-proteobacteria*, *γ-proteobacteria* and *Bacteroidetes*) were treated accordingly as controls.

Molecular taxonomy of bacterial strains associated with *L. digitata* revealed Gram$^+$ *Actinobacteria* and Gram$^-$ *α-proteobacteria*, *γ-proteobacteria* and *Bacteroidetes*. A spectral databank of 30 strains was built from MALDI-ToF mass spectra from entire cell preparations and the resulting individual signatures were found reliable and fast as taxonomic markers at the strain level. Spectral signatures obtained by proton HR-MAS NMR from intact cell preparations was less discriminative than MALDI-ToF in terms of attribution but quite informative as regards to variations in cultivation parameters and associated physiological responses on behalf of the bacteria.

Adhesion and biofilm formation studies on selected strains showed that these processes are strain-specific under standard experimental conditions. Adhesion and biofilm could be modulated (up or down) by addition of exudates and metabolite extracts from *L. digitata* that were solubilized in the medium of bacterial strains. Strains naturally associated with *L. digitata* were more responsive to exposure to exudates than the environmental reference strains, the global effect being negative. Surface and tissue organic extracts had a globally negative effect on adhesion of bacteria naturally associated with *L. digitata*, but showed a positive effect on the adhesion of reference bacteria. Finally, individual metabolites were tested with these bacterial strains, involving strain-specific responses of adhesion and biofilm formation.

Keywords : *marine bacteria ;* Laminaria digitata *; MALDI-TOF MS ; HR-MAS NMR ; 16S rDNA taxonomy ; physiological adaptation ; adhesion ; biofilm ; flow cells ; alga-bacteria interaction*