

Rencontres avec les bactéries marines

par Stéphane La Barre* & Dominique Haras†

* UMR 7139 Végétaux marins et Biomolécules, Station Biologique de Roscoff, place Georges Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex. E-mail : labarre@sb-roscoff.fr

† Université de Bretagne-Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines EA3884, BP 92116, 56321 Lorient. E-mail : dominique.haras@univ-ubs.fr

Reçu le 22 juin 2007

RÉSUMÉ

Différents aspects de la vie sociale des bactéries marines sont présentés ici, à la lumière de la recherche publiée dans les dix dernières années sur les mécanismes adaptatifs de l'adhérence bactérienne et de la formation du biofilm, et sur leur importance dans les écosystèmes à tous les niveaux. Des modèles éco-

logiques « durables », comme les associations entre les grandes algues et la microflore marine, doivent être développés parallèlement pour intégrer les observations déjà réalisées *in vitro* sur des modèles simplifiés, dans un contexte spatio-temporel naturel stabilisé depuis des millions d'années.

SUMMARY Encounters with marine bacteria

Various aspects of the social life of bacteria are exposed here, in the light of recently published discoveries on the adaptive mechanisms of bacterial adhesion and biofilm formation, and on their importance at all ecological levels. There is now a need for

studying models such as macrophytic algae and their associated microbial flora in order to integrate observations on simple laboratory models into the spatio-temporal perspective afforded by evolutionarily stable biocenoses.

INTRODUCTION

Les bactéries sont présentes partout sur le globe. Dans la mer, elles sont associées aussi bien aux processus de destruction et de recyclage de la matière organique et même minérale, qu'à tous les niveaux de la construction du vivant, du plus petit eucaryote aux écosystèmes planétaires eux-mêmes, en passant par des communautés souvent « spécialisées », comme celles rencontrées au voisinage des sources hydrothermales profondes. L'influence des bactéries dans la production de méthane ou de diméthyl sulfoxyde dans l'atmosphère et la spéciation des métaux lourds avec leur incorporation dans les chaînes alimentaires (grâce à la transméthylation par des bactéries sédimentaires) sont des thèmes récurrents dans les nouvelles orientations de la recherche. Actrices majeures de l'équilibre biologique, les bactéries marines sont au carrefour de toutes les préoccupations actuelles des spécialistes de la mer : biodiversité, recyclage des déchets et polluants, rémédiation des sites pollués, matériaux durables et même énergies renouvelables, ajoutées aux secteurs plus classiques du médical et de la biotechnologie.

La pathogénicité apparaît liée non seulement à la présence de gènes spécifiques, mais aussi à leur activation « contextuelle », particulièrement en mode biofilm (Fig. 1).

La biocorrosion et même la biominéralisation sont initiées par des assemblages d'abord bactériens, précédant généralement le recrutement d'eucaryotes pour former des biosaisures (*biofouling*). Les stratégies visant à empêcher la sédentarisation de particules bactériennes sur un substrat (adhésion irréversible), et par conséquent à empêcher la production de biofilm, ou celles permettant de le détruire, se substituent progressivement aux molécules biocides classiques, non spécifiques (métaux lourds et environnements portuaires) ou « contournables » (antibiotiques et multi-résistances bactériennes). Ces nouvelles approches « ciblées », respectueuses de l'environnement et non-toxiques, s'articulent donc autour de deux événements clés : l'*adhésion* au sens large, et le *biofilm*, aussi bien en interférant avec la « machinerie cellulaire » bactérienne et ses systèmes de communication, que par l'élaboration de surfaces texturées ou fonctionnalisées de sorte à décourager l'adhésion du bactérioplancton, ou la structuration d'un biofilm par les souches pionnières.

Toutefois il est admis que, dans une biocénose stabilisée en milieu marin, l'implication des bactéries dans des interactions structurantes ou dans des processus entropiques est équilibrée et va, sinon dans le sens d'une plus grande biodiversité globale, tout au moins permet le maintien spatio-temporel des communautés et des écosystèmes. Ces interactions structurantes permettent par

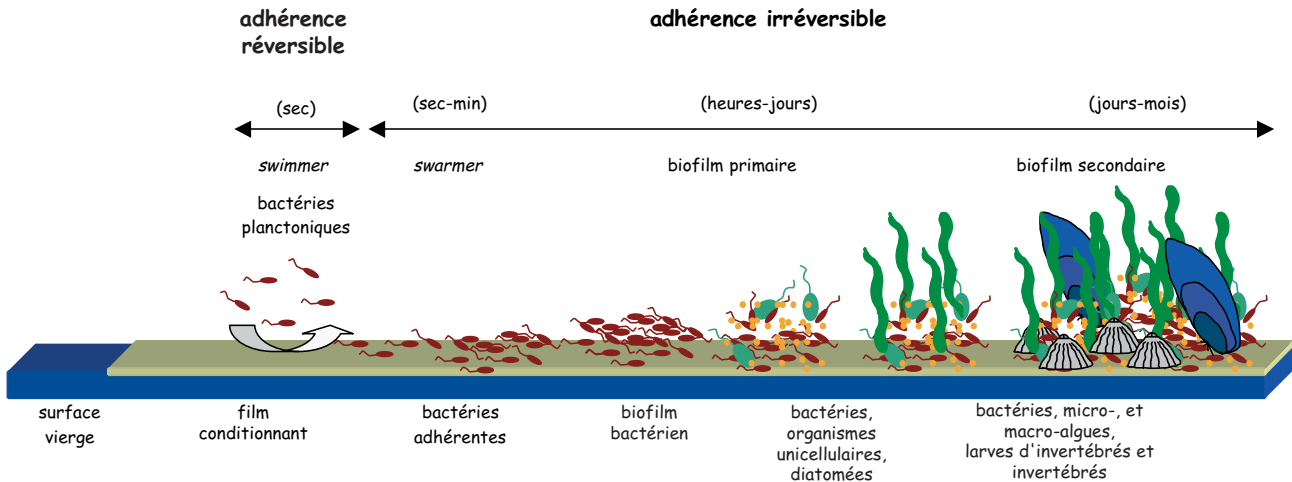


FIG. 1. – Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm en milieu marin (Haras, 2005).

exemple le recyclage « intelligent » de déchets métaboliques chez les métazoaires en les transformant en molécules de défense (revue dans Kornprobst, 2006), ou interviennent positivement dans la fixation et la métamorphose d'invertébrés marins sessiles ou encore permettent une forme de croissance optimale de l'algue hôte, comme décrit dans le présent article. Sur une échelle de temps suffisamment grande, ces associations bactéries-hôte eucaryote peuvent participer à l'évolution, par le biais de transferts de gènes ou encore d'intégration progressive de fonctions (Margulis & Sagan, 2002). Au quotidien, la coexistence de macro-organismes marins et d'une microflore bactérienne associée est inévitable, et les bénéfices ou inconvénients ne sont discernables que lorsqu'un déséquilibre se produit (introduction d'une bactérie exogène opportuniste, vieillissement des tissus de l'hôte, influence anthropique, événement climatique brusque...).

Il apparaît donc important, pour bien comprendre les mécanismes d'adhésion et de biofilm bactérien, et de les étudier dans leur milieu naturel en association avec des organismes-hôtes. Ainsi, l'algue brune *Laminaria digitata*, appartenant à une lignée très ancienne et ayant conservé de nombreux caractères ancestraux, a « survécu » à de nombreux changements climatiques et à quantité d'interactions et agressions de toutes sortes dans son histoire. En l'absence apparente de microflore spécialisée ou symbiotique, les tissus jeunes de cette algue maintiennent un taux contrôlé d'épiphytisme bactérien, et sont quasiment exempts d'endophytisme, grâce à des stratégies adaptées qui sont à présent à l'étude. De tels modèles peuvent inspirer des solutions biomimétiques et non polluantes au contrôle bactérien.

LA PHASE PLANCTONIQUE

A l'échelle de la bactérie, le milieu aqueux apparaît très visqueux, le nombre de Reynold est très petit et la pesanteur n'importe pas (Donlan & Costerton, 2002).

Ainsi le flagelle axial a-t-il été sélectionné par la nature comme mode de propulsion pour permettre aux bactéries de s'accommoder d'un flux « laminaire » (c'est-à-dire non-diffusif) à cette échelle. Le flagelle est animé de mouvements périodiques très rapides. En fait, le flagelle est composé d'un remarquable moteur moléculaire membranaire rotatif (pompe à protons), prolongé à l'extérieur par un crochet (*hook*) pilotant le flagelle lui-même (environ 10 fois la longueur de la bactérie). Le mouvement est hélicoïdal, comparable à celui d'un fil semi-rigide qui prolongerait la mèche tordue d'une perceuse électrique tournant à 20000 rpm. Le sens de rotation (+ ou -) du flagelle peut s'inverser instantanément en fonction des molécules perçues comme attractives (par exemple l'acide aspartique) ou répulsives (molécules allélopathiques). Dans le sens (+) la bactérie procède par à-coups et change de direction, dans le sens contraire (-) le mouvement est uniforme et la direction maintenue, contrastant ainsi la phase exploratoire d'approche de la phase locomotrice purement stochastique (Berry & Armitage, 1999). Des variantes de ce modèle simple comportant des flagelles fonctionnant en tandem et autres *pili* multiples, axiaux ou latéraux, accomplissent les mêmes fonctions de mobilité selon le mode de vie planctonique adopté par chaque sorte de bactérie.

L'ADHÉRENCE BACTÉRIENNE

Initialement, la compréhension des phénomènes d'adhérence et de colonisation bactériennes a beaucoup bénéficié des recherches médicales sur l'adhérence de pathogènes tels les coques Gram positif *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ou *S. epidermidis* sur des implants, fortement influencée par la composition du milieu plasmatique et ses protéines d'adhésion (fibronectine, vitronectine, laminine), et par les protéines d'adhésion émises par les bactéries elles-mêmes. D'autres modèles favorisés sont : *Vibrio fischeri*, *V. harveyi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens*.

ciens, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Serratia liquefaciens... Le modèle Gram négatif le plus étudié, *P. aeruginosa*, est à la fois très adaptable dans l'environnement naturel (présent dans tous les milieux aqueux, sol, plantes), et très opportuniste car associé à des pathologies polymorphes dès lors qu'une faiblesse immunitaire de l'hôte se présente. En outre, *P. aeruginosa* produit des polymères extracellulaires (dont l'acide alginique) susceptibles d'altérer les surfaces et de favoriser leur colonisation par d'autres pathogènes alors capables d'exprimer leur virulence : les stratégies d'assainissement des surfaces dans les filières agroalimentaires, ou celles associées aux échangeurs thermiques de toute nature tiennent invariablement compte de cette flore d'altération.

En milieu marin, l'adhérence bactérienne est la fixation de particules bactériennes planctoniques sur des substrats immergés. Schématiquement, elle fait intervenir : *a)* les propriétés de surface intrinsèques du substrat, modifiées localement par le film conditionnant, la présence éventuelle d'organismes primo-adhérés, et la présence de molécules diffusibles susceptibles d'attirer ou de repousser les bactéries approchantes, *b)* celles de la surface membranaire bactérienne et *c)* l'influence du milieu (eau et solutés marins) aux interfaces (Fig. 2).

Le phénomène d'adhésion est donc complexe, avec toutefois des étapes bien identifiées et suffisamment caractérisées pour élaborer des stratégies antibactériennes ciblées sur des mécanismes-clés de l'adhésion. Ces étapes sont illustrées dans le schéma de la figure 1.

Le film conditionnant

Le film conditionnant (qui n'est pas un biofilm) résulte de l'adsorption spontanée de molécules organiques et d'ions dans les premiers instants suivant l'immersion. Cette adsorption hétérogène est capable de neutraliser partiellement la charge nette et l'énergie libre de surface, et d'influencer défavorablement le comportement des bactéries approchant ces surfaces, ou au contraire de créer des micro-niches favorables à l'adhésion et aux interactions spécifiques.

En conditions statiques (flux nul ou réduit), on considère qu'à plus de 10 mm de séparation, les interactions sont faibles. La particule bactérienne et le substrat, s'ils portent des charges électrostatiques nettes globalement identiques (généralement négatives), ajoutées aux interactions de type van der Waals, ont tendance à se repousser. À une distance moindre, des interactions électrostatiques sont plus fortes mais peuvent devenir attractives de par l'hétérogénéité de distribution des charges autour de la bactérie, en particulier du glycocalyx avec sa viscoélasticité et sa capacité à adsorber différenciellement des ions du milieu.

Le contact forcé des bactéries avec une surface est favorisé par un flux élevé et turbulent (nombre de Reynolds élevé, parfois supérieur à 5000) en milieu ouvert comme dans les conduites d'eau etc., par contraste avec les conditions statiques favorisant la locomotion autonome en mode planctonique (Thomas *et al.*, 2002).

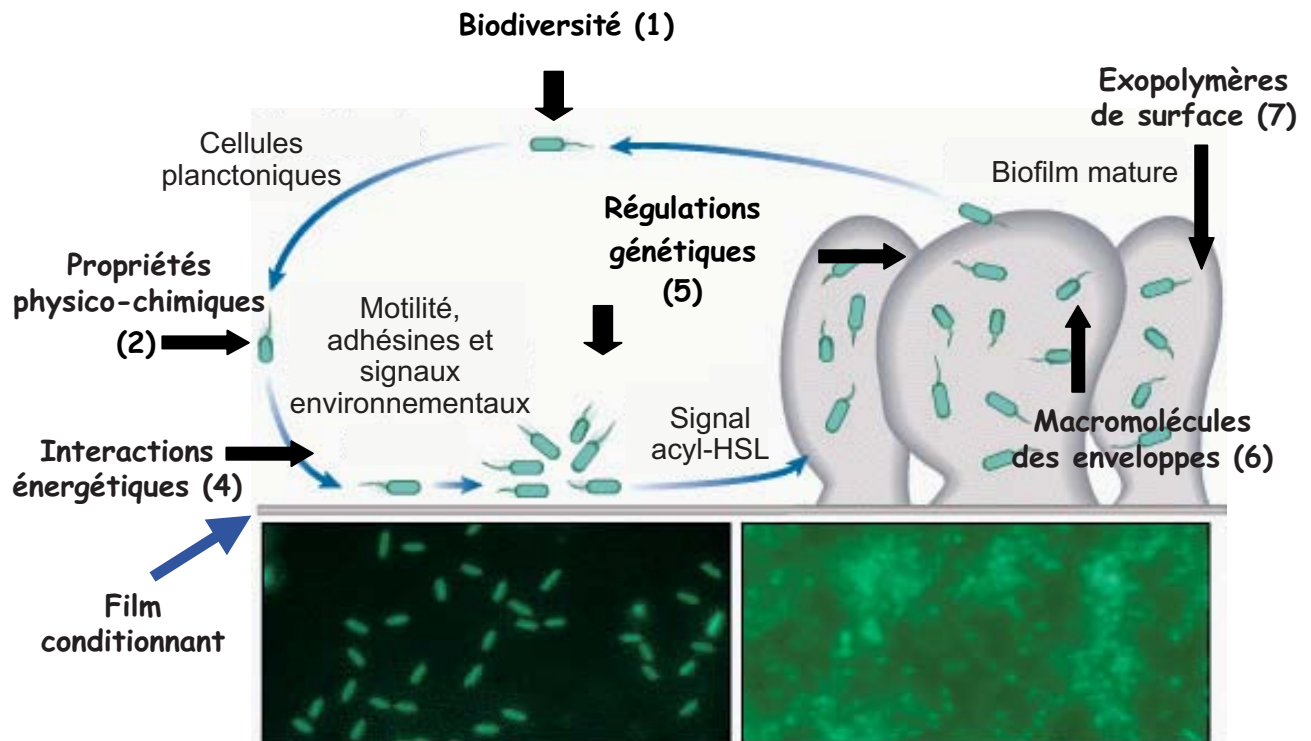


FIG. 2. – Paramètres impliqués dans la bioadhérence bactérienne, la maturation et la structure des biofilms bactériens (Haras, 2005).

L'adhérence réversible

Le contact établi, les interactions spécifiques entre le substrat conditionné et les macromolécules de la surface bactérienne permettent l'adhérence. Celle-ci est initialement réversible, la bactérie pouvant se détacher tant que le flux ne tend pas vers zéro. La bactérie se réoriente de sorte à établir un contact optimal selon son axe longitudinal, puis explore la surface vers les zones où une interaction forte entre ses molécules de surface et celles du substrat peut survenir. Ce *swarming* (grouillement) collectif est dû à un comportement exploratoire de surface encore mal compris. Mignot *et al.* (2007) décrivent chez la bactérie *Myxococcus xanthus* un mouvement exploratoire (*gliding*) qui consiste en de rapides roulades du bâtonnet sur lui-même, l'adhérence se faisant par rapport à un point focal fixe, (protéine AglZ), associé à un « rail » hélicoïdal à la face membranaire interne, permettant le mouvement de rotation-translation indépendant des organelles de propulsion (flagelles ou *pili*). Un point focal ne se forme qu'en situation de contact, disparaît lorsque la bactérie en réorientation se plie (*bending*), un autre se formant pour assurer un appui. D'autres variantes plus « classiques » du *gliding* impliquent l'utilisation de *pili* contractiles, mais d'une manière générale, les mutants inaptes au *gliding* ne seront pas convenablement adhérents ni formateurs de biofilm.

L'adhérence irréversible

Diverses molécules (adhésines fimbriales ou membranaires), des glycoconjugués et autres récepteurs de surface permettent de telles interactions, et sont impliquées dans l'adhérence, dans la formation de microcolonies par multiplication et dans l'initiation du biofilm qui l'accompagne. Différents appendices bactériens sont nécessaires à l'adhésion des bactéries tout en n'étant pas indispensables au maintien du biofilm. Par exemple, les *pili* de type I et les flagelles sont essentiels à l'attachement initial à la surface et les *pili* de type IV ont un rôle dans le déplacement de la bactérie sur la surface. Des souches mutantes pour les gènes codant pour ces structures, *pilA*, *fliC*, *fliM*, *motA*..., ont toutes montré un défaut d'adhésion *in vitro*.

Les *pili* de type IV de la souche PA01 de *P. aeruginosa* sont les organites fimbriaux porteurs d'adhésines participant à l'adhésion et accompagnant la division cellulaire, mais indispensables à l'initiation du biofilm ; l'absence du *gene cluster cupA* codant pour les *pili* de type IV permet l'adhésion d'un mutant incapable de développer de biofilm (Vallet *et al.*, 2001). D'autres *gene clusters* sont associés aux divers événements de la phase biofilm, correspondant à la grande adaptabilité dans la manifestation des ces événements face à des conditions environnementales changeantes. Des structures fibrillaires externes, les *curli*, sont impliquées dans l'adhésion de *P. aeruginosa* sur des surfaces inertes de toute nature (Vidal *et al.*, 1998) et expliquent partiellement la grande capacité colonisatrice de cette bactérie. Curieusement, les bactéries « sauvages » colonisent tous les types de

substrats, et celles issues de lignées cultivées tendent à perdre la capacité d'adhérer sur des surfaces lisses.

LE BIOFILM EST UN TISSU SOCIAL

La définition actuelle

Le biofilm bactérien n'a été étudié que depuis 1975. Son importance biologique n'est apparue que progressivement, et il représente une révolution comparable à celle des découvertes de Louis Pasteur par rapport aux connaissances antérieures sur les bactéries. La définition actuelle de Donlan & Costerton (2002) tient compte des connaissances acquises par les milliers de publications de médecins, d'écologistes, de microbiologistes, de spécialistes des matériaux, d'industriels de l'agroalimentaire et de biotechnologistes qui lui ont été consacrées en trente ans.

« Un biofilm est une communauté sédentaire d'origine bactérienne, caractérisée par des cellules attachées de manière non réversible à un substrat, à une interface ou l'une à l'autre, qui sont conditionnées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires produites par elles, et qui présentent un phénotype altéré par rapport à la croissance et à la transcription de leurs gènes ». Cette description élimine les *colony forming units* (CFU) développées à la surface de l'agar des boîtes de Pétri, clonales, non différenciées et sans les expressions de résistance qui caractérisent le biofilm. Par contre, les fragments détachés des biofilms, et dont les cellules ont conservé dans leurs pérégrinations plasmiques leurs caractéristiques antérieures, restent des biofilms.

La vie en biofilm

Le mode de vie en biofilm est maintenant considéré comme le mode de vie naturel primaire des bactéries, dans pratiquement 100 % des cas.

La production de polymères extracellulaires (EPS) constituant la matrice monospécifique est réalisée par les bactéries adhérentes en état de division cellulaire, le biofilm représentant l'ensemble des matrices, hétérogène en milieu naturel (Branda *et al.*, 2005). Une matrice-type est un film viscoélastique d'EPS généralement dominé par des polysaccharides (parfois des protéines), et dont la résistance au décrochement sera d'autant plus grande qu'il aura été formé en conditions de flux plus important (*high shear stress*).

Les EPS sont issus de la dégradation des bactéries mais aussi synthétisées et sécrétées par la bactérie lors de sa croissance en biofilm. Leur production est donc sous contrôle génétique.

L'exemple de *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie pathogène opportuniste, est illustratif du phénomène. Davies & Geesey (1995) ont montré que le gène *algC* codant pour une phosphomannomutase, impliquée dans la synthèse des alginates (exopolysaccharides), est surexprimé quelques minutes après l'adhérence à une surface solide. L'emploi d'une fusion transcriptionnelle entre le pro-

moteur de ce gène et un gène rapporteur a permis de montrer que l'expression de ce gène est plus fortement induite dans des cultures de *P. aeruginosa* en biofilm qu'en suspension.

La formation de microcolonies à partir de bactéries adhérentes, puis l'établissement d'autres bactéries colonisatrices, sont accompagnés de la différenciation du biofilm en une structure tridimensionnelle, dont les parties fongiformes les plus élevées entretiennent des canaux circulants permettant l'oxygénation des microcolonies.

Ces zones sommitales sont donc habitées par les bactéries en mode de division actif, et dont le phénotype se modifie en fonction de l'activation de gènes de pathogénicité, ou de résistance aux antibiotiques par exemple. De temps à autre, aidés par le flux du milieu, des fragments de biofilm contenant des bactéries phénotypiquement altérées se détachent et essaient – une stratégie de colonisation très efficace. Par contre, la « semelle basale » du biofilm, peu ou pas oxygénée, est occupée par des bactéries en état de dormance, mais davantage protégées de la diffusion d'éventuels toxiques de l'extérieur par un glycocalyx protecteur. Par exemple, les produits d'entretien ménager, s'ils éradiquent efficacement les bactéries récentes, n'atteignent pas celles en état de sommeil métabolique et protégées par un cocon anoxique et les cavités du substrat. La protection contre les prédateurs bactériophages, les amibes phagocytrices, et les substances antibiotiques de toute nature, est l'avantage le plus généralement cité dans la littérature scientifique traitant des biofilms.

Le biofilm offre non seulement la protection, mais également l'accès aux éléments essentiels pour la croissance. L'alimentation en oxygène dépend du flux entourant et perméant le biofilm, avec l'apport des nutriments et oligoéléments obtenus « passivement » mais surtout par la transformation du substrat (oxydation de métaux, dégradation de substrats organiques) dans l'environnement ou par l'exploitation offensive de l'hôte eucaryote (étapes d'invasion, pathogénèse, colonisation interne, métabolisme altéré).

Le troisième avantage majeur de cette vie communautaire est l'adaptabilité, par exemple avec le transfert latéral de gènes (transposons) et/ou de protéines par les bactéries compétentes vers d'autres bactéries du biofilm, ou vers l'hôte, par contact et transfection ou à distance par sécrétion ou par infection virale (phages). Cinq systèmes de sécrétion ont été identifiés chez les Gram⁻, dont le type IV avec ses effecteurs, utilisé dans le but de pénétrer l'espace intracellulaire de l'hôte pour obtenir les nutriments recherchés par détournement métabolique (Lavigne *et al.*, 2006), ou afin d'acquérir les gènes de résistance, par exemple aux antibiotiques. Ainsi, dans le milieu marin, *Vibrio splendidus* est capable de modifier l'environnement cellulaire de son hôte (mollusque) afin de déjouer ses défenses immunitaires et de le pénétrer, ainsi que d'acquérir ou d'éliminer rapidement tel ou tel gène nécessaire ou redondant pour son adaptabilité, dans la zone « superintégron » de son chromosome principal.

Au niveau de la simple expression phénotypique, Sauer *et al.* (2002) ont montré que pas moins de 50 %

du protéosome de *P. aeruginosa* (800 protéines) présente un niveau d'expression fortement accru par *upregulation* génique, entre la phase planctonique et le biofilm mature, entraînant une grande variabilité et adaptabilité phénotypique sur les aspects de la mobilité, de l'adhésion et du *quorum-sensing* (Déziel *et al.*, 2001).

L'essaimage par libération de fragments de biofilms contenant des bactéries phénotypiquement modifiées ou de formes nageantes ayant « régressé » vers le mode de vie planctonique survient à la maturité du biofilm. La mort cellulaire induite par un phage résident de *P. aeruginosa* peut amener à la destruction partielle du biofilm et à la sélection de microcolonies résistantes, l'ensemble étant considéré comme une stratégie avantageant la dispersion de la bactérie (Webb *et al.*, 2003).

Dispersion du biofilm

La perte de cellules d'un biofilm n'est pas restreinte au dernier stade de son développement. Elle 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. Plusieurs mécanismes passifs conduisant à la perte de cellules intactes ont été décrits : la limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, les forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques et la diminution de nutriments disponibles et la modification de leurs compositions. La diminution de biomasse d'un biofilm peut aussi 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).

La biocorrosion

Au cours de la croissance bactérienne en biofilm, se produisent des modifications métaboliques dues à la coordination des bactéries, conséquences de la synthèse et de la sécrétion de molécules de communications interbactériennes. Parmi ces modifications, la synthèse et la sécrétion de substances polymériques qui participent à la structure du biofilm et confèrent à la microcolonie un environnement particulier tel qu'une zone dépourvue en oxygène. C'est au sein de telles zones que des bactéries utilisant d'autres molécules que l'oxygène pour respirer vont se développer. C'est le cas des bactéries sulfato-réductrices et des bactéries méthanogènes qui utilisent respectivement les sulfates et le méthane pour leur respiration. Au contact d'une surface métallique, ces bactéries vont accélérer les processus de corrosion électrochimique. Les stratégies de prévention reposent sur le choix des matériaux, leurs traitements de surface, leurs mises en œuvre et leurs systèmes de protection (électrochimique, revêtements de surfaces...).

Le sujet de la biocorrosion marine est traité de façon approfondie par Haras (2005), avec en particulier une analyse de la corrosion anoxique par les bactéries sul-

fato-réductrices et un descriptif des approches destinées à remplacer les peintures et revêtements toxiques encore utilisés pour enrayer la formation de macrosalissures génératrices de biocorrosion.

La communication chimique

Le biofilm offre donc un véritable espace de vie sociale aux micro-organismes, par la formation de consortiums avec échanges de signaux chimiques *intra-* et *inter-*microcolonies et transferts latéraux de gènes. Pour certains évolutionnistes, l'hétérogénéité génétique et biochimique d'un biofilm environnemental caractérisé par des échanges communautaires significatifs peut s'effacer pour évoluer en véritable «superorganisme», dès lors qu'une véritable intégration fonctionnelle eucaryote-procaryote est observée. Pour les biofilms monospécifiques cultivés en cellules à flux, l'image d'«organe» sera toutefois plus appropriée, avec ses cellules jeunes et bien oxygénées, ses cellules basales en état de quiescence, ses cellules prêtes à l'essai.

La densité de ces populations bactériennes est auto-régulée chez les Gram⁻ par l'émission de molécules dites de *quorum-sensing* (QS) de la famille chimique des acyl-homosérines lactones, qui ont fait l'objet de recherches assidues avec l'objectif de «tromper» les bactéries adhérentes en les empêchant de développer le biofilm et d'exprimer leur pathogénicité. Ces recherches incluent aussi bien des molécules de synthèse (de Nys *et al.*, 2006; Dobretsov *et al.*, 2007), que des analogues naturels tels les furanones halogénés d'algues rouges qui les produisent en tant qu'agents antisalissures naturels, en particulier *Delisea pulchra*, (Kjelleberg *et al.*, 1997). D'autres molécules de communication, comme le furanosyl butyrate diester (Gram⁻ et Gram⁺), ou des oligopeptides modifiés (G⁺) ont des fonctions semblables chez les bactéries invasives (Konaklieva & Plotkin, 2006). Une démonstration très élégante a permis de trancher sur l'origine de la structure du biofilm, stochastique ou génétique. Davies *et al.* (1995) ont montré qu'un mutant de *P. aeruginosa* incapable de synthétiser des molécules de communication inter-bactériennes, les N-acyl-homosérine lactones (HSL), formait un biofilm radicalement différent de celui de la souche sauvage et que les bactéries avaient perdu leur capacité à résister à un traitement de désinfection au SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). La complémentation de la culture par des HSL exogènes permettait de restaurer le phénotype sauvage. Une revue récente des recherches est proposée par Schauder & Bassler (2001), comparant les systèmes de communication LuxI/luxR «AHL dépendants» des bactéries G⁻, avec ceux des bactéries G⁺ dépendant des oligopeptides, puis les systèmes mixtes ou universels développés par certains *Vibrio* marins «polyglottes».

Steinberg *et al.* (2002) offrent une révision bibliographique guidée de la colonisation des surfaces marines par des messagers chimiques, et expliquent l'importance du biofilm bactérien dans ce processus. Dans le milieu marin, les surfaces dites «inertes», *i.e.* exemptes de colonisation par des algues ou des organismes sessiles, ne le sont

jamais, fût-ce par la présence de l'ubiquiste biofilm bactérien. Le rôle du biofilm bactérien dans le contrôle «positif» (facteurs de recrutements des larves de toutes sortes d'invertébrés et de spores d'algues, ou inducteurs de métamorphose) sur ces surfaces est de plus en plus étudié, contribue à expliquer le lien entre le «simple» biofilm bactérien et les macrosalissures (*biofouling*) et ouvre des perspectives «écologiquement correctes» de traitement des matériaux immergés contre l'encrassement et ses conséquences.

Les bactéries antibactériennes

La capsule saccharidique, qui est la couche péricellulaire la plus externe en mode biofilm chez de nombreuses bactéries dont *Escherichia coli*, peut, lorsqu'elle est sécrétée par des formes virulentes (*group II capsule*), inhiber la formation de biofilm chez un grand nombre de bactéries G⁺ et G⁻ (Valle *et al.*, 2006) sur des surfaces diverses. Cette recherche offre d'importantes perspectives dans la prévention de la colonisation d'implants, dans le traitement des infections urinaires, et peut-être dans des applications environnementales. D'autres bactéries produisent des pigments et toxines allélopathiques. Ainsi *Pseudoalteromonas tunicata*, en produisant un pigment bactéricide, appauvrit la biodiversité du biofilm bactérien sur les thalles d'*Ulva* et la capacité du biofilm de recruter des larves d'invertébrés encroûtants (Egan *et al.*, 2002).

Le biofilm utile

Comme le soulignent Steinberg & de Nys (2002) à propos de la colonisation des surfaces vivantes par les bactéries, une approche globale s'impose en incluant les avantages et inconvénients mutuels, en séparant les critères physicochimiques des surfaces en contact des caractères purement chimiques de la communication par diffusion de molécules. Il en ressort qu'outre la production de bioactifs et d'enzymes inspirés par ces organismes, les biofilms et les bactéries adhérentes elles-mêmes présentent un intérêt biotechnologique. L'approche physico-chimique des biofilms, qui permet leur caractérisation en tant que «matériau», est complémentaire de l'approche écologique lorsqu'il est question de les utiliser – une excellente mise à jour des méthodes analytiques est proposée par Denkhaus *et al.*, (2007).

Pissavin-Castillo *et al.* (2006) proposent des applications au contrôle des bactéries par les bactéries dans les domaines agroalimentaire et anticorrosion, comme alternatives, respectivement, aux agents de désinfection et aux traitements *antifouling*s classiques. Thomas *et al.* (2003) montrent que la protéine d'adhésion bactérienne FimH renforce l'adhésion de *E. coli* sur le substrat dès qu'une force extérieure tente de la décrocher, et proposent de développer, à partir de cette observation, des détecteurs sensibles aux forces d'arrachement à l'échelle nanométrique. L'observation de la circulation d'électrons entre les zones oxygénées et anoxiques des biofilms marins a inspiré l'idée d'accumulateurs biologiques

basés sur l'énergie microbienne, en association avec le recyclage des eaux usées (Logan & Regan, 2006).

Le biofilm dans la nature

La communication chimique liée au mode de vie en biofilm permet aux bactéries résidentes une vie sociale que le mode de vie planctonique ne leur permet pas, ainsi que d'influer sur la colonisation secondaire par les eucaryotes invertébrés et végétaux. Ce sont ces derniers autour desquels des communautés complexes (*e.g.* benthiques, coralliennes, mangroves) se construisent pour former des écosystèmes entiers de grande biodiversité (récifs tropicaux) et dont l'expansion est limitée par les facteurs physico-chimiques. En vérité, l'importance globale des bactéries dans le milieu océanique ne se « limite » pas seulement à être un maillon trophique de la chaîne alimentaire ; le mode de vie en biofilm pourrait être essentiel à la construction des écosystèmes.

ALGUES ET BACTÉRIES COMME MODÈLES D'ÉTUDE

Les algues, de par leur très longue histoire évolutive et leurs multiples stratégies de cohabitation avec les bactéries marines, sont des modèles naturels de choix susceptibles d'inspirer des solutions originales aux problèmes causés par les biofilms marins. Les thalles des macroalgues offrent une surface importante à la colonisation bactérienne, leurs exsudats fournissant des nutriments ou des molécules servant à l'osmoprotection. Les parties métaboliquement fonctionnelles des algues sont généralement bien armées pour résister à la pénétration par les endophytes bactériens. Par contre, les tissus des parties distales plus âgées ou abîmées sont pénétrés et détruits par des bactéries opportunistes dégradant les sucres pariétaux pour les utiliser comme source de carbone, à l'aide d'enzymes très adaptées.

Certaines algues semblent particulièrement adaptées à cette cohabitation, grâce à des stratégies particulièrement complexes, incluant la destruction d'espèces opportunistes et pathogènes, la prévention de l'adhérence et du développement du biofilm ou la destruction de celui-ci, l'antibiose interbactérienne, l'interférence métabolique et même le gain en capacité métabolique de défense. Quelques exemples illustrent bien cette adaptabilité.

Chlorophytes (algues vertes)

L'algue verte *Ulva australis* est colonisée par une microflore peu biodiverse et dominée par *Roseobacter gallaeciensis*, qui facilite à son tour l'établissement sélectif de *Pseudoalteromonas tunicata*, qui répond sélectivement au mannose algal par un *pilus* porteur d'une hémagglutinine sensible (Dalisay *et al.*, 2006). Les deux bactéries utilisant une stratégie différente : *R. gallaeciensis* envahit et déstructure les biofilms des compétiteurs à l'exception de *P. tunicata* et cette dernière profite de son « immunité » pour proliférer face à une compéti-

tion qu'elle ne peut gérer seule (Rao *et al.*, 2006). La présence de *P. tunicata* aboutit à la présence de microcolonies spatialement séparées, et allélopathiquement dominantes face aux autres souches bactériennes pour les nutriments exsudés de l'algue hôte en faible quantité. Le bénéfice net pour *U. australis* est un contrôle métaboliquement peu coûteux du biofilm bactérien sur sa surface.

Une stratégie originale contre le ver polychaète *Hydroides elegans* et le bryzoaire *Bugula neritina* encroûtant son thalle a été décrite chez *Ulva reticulata* (Harder *et al.*, 2004) : en l'absence de métabolites secondaires non solubles utilisés par d'autres algues, *U. reticulata* produit des glycoprotéines larvicides mais concentrées par les biofilms bactériens pour en limiter la diffusion en surface. Une autre étude sur cette même algue indique son potentiel antibactérien jusque-là insoupçonné, avec l'émission de glycolipides (avec acides gras et esters méthyliques) souche-dépendante selon l'agent infectieux (Vairappan & Suzuki, 2000). Le ramassage saisonnier de ces algues polluantes sur les côtes et l'extraction de ces composés hydrosolubles pourrait offrir une solution originale au contrôle des biofilms bactériens sensibles sur les surfaces de traitement dans les filières agro-alimentaires. La fixation, la métamorphose de spores et même la forme de croissance habituelle de nombreuses algues vertes nécessitent la présence de bactéries dans le milieu de culture (révision chez les genres *Ulva* et *Enteromorpha*, Nakanishi *et al.*, 1999) ou la présence de biofilms naturels.

Rhodophytes (algues rouges)

Le métabolisme secondaire halogéné de certaines Rhodophycées est très performant (*efficient*), tant par sa productivité que par la variété des molécules produites. *Falkenbergia (Asparagopsis) armata* est essentiellement épiphyte (non invasif) d'algues fixées comme l'algue verte *Ulva*, et produit un cocktail « à la carte » d'hydrocarbures halogénés volatiles parmi un répertoire géographiquement invariant (Roussis, communication personnelle) de plusieurs dizaines de molécules identifiées, dont certaines sont très toxiques (révision des métabolites des Bonnemaisoniaceae dans Kladi *et al.*, 2004). L'hydrosphère immédiate est ainsi « protégée » au bénéfice de l'algue verte porteuse, elle-même dépourvue de métabolites secondaires antibactériens.

Delisea pulchra, une algue rouge des eaux tempérées australiennes, produit des furanones bromés, non-toxiques, mimant ainsi les acyl-homoserine lactones (AHL) qui sont les molécules impliquées globalement dans le contrôle de la densité de population (*quorum sensing*). L'activité de ces fimbrolides n'est pas taxonomiquement spécifique, et reflète sans doute différents modes d'action, ce qui inspire toujours la recherche de molécules facilement synthétisables, non toxiques et susceptibles d'enrayer la colonisation des surfaces par un grand nombre de bactéries Gram⁻. (de Nys *et al.*, 2006)

Phaeophytes (algues brunes)

La laminaire *Laminaria digitata* est une algue brune pérenne, robuste, remarquable de par sa capacité à

contrer l'iode de l'eau de mer et à l'utiliser de diverses manières (Leblanc *et al.*, 2006), dont le contrôle de l'épiphytisme bactérien (Potin *et al.*, 2002). Ce contrôle implique la reconnaissance de produits de dégradation pariétale par des bactéries ayant infecté un tissu lésé, l'élicitation d'une bouffée oxydante avec la suractivation d'haloperoxydases extracellulaires à vanadium, lesquelles orchestreront la production d'halocarbonés volatiles et d'acides hypohalogénés toxiques, et participeront à la reconstruction cuticulaire des tissus endommagés. Les acides hypohalogénés, outre leur action biocide bien connue sur les particules bactériennes, peuvent dégrader les AHL bactériens selon un schéma de dégradation élucidé (action sur les β keto amides, Daniels *et al.*, 2000) et exploitable en industrie, et pourrait expliquer la présence importante de bactéries Gram⁺ fixées sur les thalles alors qu'elles sont peu représentées ailleurs. Une étude en cours à la Station Biologique de Roscoff vise à identifier les mécanismes de contrôle de l'épiphytisme bactérien chez *L. digitata*, en particulier les aspects liés à l'adhérence et à la prolifération.

CONCLUSIONS

Les nombreuses études sur le biofilm avec ses modèles bactériens favorisés, ubiquistes ou spécialisés, pathogènes ou environnementaux, ont abouti à la description d'un grand nombre de mécanismes générateurs répondant à des stratégies adaptives reposant sur la plasticité phénotypique et la circulation « latérale » de gènes. Les modèles médicaux ont été mieux étudiés que les modèles environnementaux, avec des différences notables entre les deux modèles. Si les bactéries pathogènes présentent des stratégies « manipulatrices » à l'encontre des cellules-hôtes en déjouant leurs réponses immunitaires, ou en acquérant des gènes de résistance aux antibiotiques exogènes (Donlan & Costerton, 2004), l'adhésion en milieu plasmatique est loin de subir les fluctuations physico-chimiques du milieu marin. Dans la mer, les pressions biotiques pour l'occupation du substrat sont fonction de la biodiversité et dans un écosystème en bonne santé, la vie microbienne est elle-même biodiverse avec de nombreuses niches écologiques et ses associations hôtes-bactéries spécialisées. Le blanchiment climatique des coraux dans les récifs tropicaux, par exemple, conduit à l'effondrement de cette biodiversité bactérienne et son remplacement par quelques souches opportunistes.

Les biofilms marins sont donc le reflet exact de la diversité écologique, chacun représentant un « paysage » particulier (*landscape*, Battin *et al.*, 2007) résultant de la somme des capacités adaptatives de ses habitants dans un contexte extérieur donné. La modélisation de ces paysages bactériens permettra d'identifier les facteurs-clés aux échelles micro- et macroscopiques et de les intégrer dans la durée, comme on modélise actuellement un champ d'algues. Le paramétrage de ces facteurs-clés

permettra ensuite de prédire puis de contrôler utilement ce paysage microbien. Les modèles communautaires offerts par les grandes algues et leurs bactéries associées apparaissent très utiles pour comprendre leur « vie cachée ».

BIBLIOGRAPHIE

- Battin T. J., Sloan W. T., Kjelleberg S., Daims H., Head I. M., Curtis T. P. & Ebert L. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5, 76-81.
- Berry R. M. & Armitage J. P., The bacterial flagella motor. *Adv. Microb. Physiol.*, 1999, 41, 291-337.
- Branda S. S., Vik A., Friedman L. & Kolter L., Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology*, 2005, 13 (1), 20-26.
- Dalisay D. S., Webb J. S., Scheffell A., Svenson C., James S., Holmström C., Egan S. & Kjelleberg S., A mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA)-like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva australis*. *Microbiology*, 2006, 152, 2875-2883.
- Daniels R. V., Vanderleyden J. & Michiels J., Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, 28, 261-289.
- Davies D. G. & Geesey G. G., Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 860-867.
- Denkhaus E., Meisen S., Telgheder U. & Wingender J., Chemical and physical methods for characterization of biofilms. *Microchim. Acta*, 2007, 158, 1-27.
- de Nys R., Givskov M., Kumar N., Kjelleberg S. & Steinberg P. D., Furanones, in : Progress in molecular and subcellular biology subseries marine molecular biotechnology Fuse-tani N., Clare A. S. (Eds.): Antifouling Compounds Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- Déziel E., Comeau J. & Villemur R., Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J. Bacter.*, 2001, 123 (4), 1195-1204.
- Dobretsov S., Dahms H.-U., Yili H., Wahl M. & Qian P.-Y., The effect of quorum-sensing blockers on the formation of marine microbial communities and larval attachment. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2007, 60, 177-188.
- Donlan R. M. & Costerton J. W., Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiological Reviews*, 2002, 15 (2), 167-193.
- Egan S., James S., Holmström S. & Kjelleberg S., Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicata*. *Environmental Microbiology*, 2002, 4 (8), 433-442.
- Haras D., Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention *Matériaux & Techniques*, 2005, 93, 27-41 (Hors série).
- Harder T., Dobretsov S. & Qian P.-Y., Waterborne polar macromolecules act as algal antifoulants in the seaweed *Ulva reticulata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2004, 274, 133-141.
- Kjelleberg S., Steinberg P., Givskov M., Gram L., Manfield M. & de Nys R., Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquat. Microbiol. Ecol.*, 1997, 13, 85-93.
- Kladi M., Vagias C. & Roussis V., Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochemistry Reviews*, 2004, 3, 337-366.

- Konaklieva M. I. & Plotkin B. J., Chemical communication - do we have a quorum? *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2006, 6 (7), 817-825.
- Kornprobst J.-M., ch. 7 et 8, Les Eubactéries dans : Substances naturelles d'origine marine, vol. 1, pp. 125-202, Lavoisier, Paris (2006), 598 p.
- Lavigne J.-P., Botella E. & O'Callaghan D., Les systèmes de sécrétions de type IV et leurs effecteurs Type IV secretion system and their effectors: an update. *Pathologie Biologie*, 2006, 54, 296-303.
- Leblanc C., Colin C., Cosse A., Delage L., La Barre S., Morin P., Bruno Fiévet B., Voiseux C., Ambroise Y., Verhaeghe E., Amouroux D., Donard O., Tessier E. & Potin P., Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie*, 2006, 88 (11), 1773-1785.
- Logan B. E. & Regan J. M., Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells. *TRENDS in Microbiology*, 2006, 14 (12), 512-518.
- Margulis L. & Sagan D., Acquiring genomes: the theory of the origins of the species. Perseus Publishing (2002), 240 p.
- Mignot T., Shaevitz J. W., Hartzell P. L. & Zusman D. R., Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science*, 2007, 315, 853-856.
- Nakanishi K., Nishijima M., Nomoto A. M., Yamazaki A. & Saga N., Requisite morphologic interaction for attachment between *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and symbiotic bacteria. *Mar. Biotechnol.*, 2006, 1, 107-111.
- Pissavin-Castillo C., Haras D., La Barre S., Potin, P. & Lerat Y., Biofilm: ennemi ou allié? *Algorithme*, 2006, 74, 1-6.
- Potin P., Bouarab K., Salaun J.-P., Pohnert G. & Kloareg B., Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5 (4), 308-317.
- Rao D., Webb J. S. & Kjelleberg S., Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 71 (4), 1729-1736.
- Sauer K., Camper A. K., Erlich G. D., Costerton J. D. & Davies G. D., *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as biofilm. *J. Bacter.*, 2002, 124 (4), 1140-1154.
- Schauder S. & Bassler B., The languages of bacteria. *Genes and Development*, 2001, 15 (12), 1468-1480.
- Steinberg P. D. & De Nys R., Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *J. Phycol.*, 2002, 38, 621-629.
- Steinberg P. D., De Nys R. & Kjelleberg S., Chemical cues for surface colonization, *Journal of Chemical Ecology*, 2002, 28, 1935-1951.
- Thomas W. E., Trintchina E., Forero M., Vogel V. & Sokurenko E. V., Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell*, 2002, 109 (99), 913-923.
- Thomas W. E., Sokurenko E. V. & Vogel V., The FimH adhesion protein as a nanoscale mechanical switch. *2003 Summer Bioengineering Conference*, June 25-29 2003, Sonesta Beach Resort in Key Biscayne, Florida online at: <http://www.tulane.edu/~sbc2003/pdfdocs/0011.PDF>
- Vairappan C. S. & Suzuki M., Dynamics of total surface bacteria and bacterial species counts during desiccation in the Malaysian sea lettuce, *Ulva reticulata* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycological Research*, 2001, 48, 55-61.
- Valle J., Da Re S., Henry N., Fontaine T., Balestrino D., Latour-Lambert P. & Ghigo J. M., Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *PNAS*, 2006, 103 (33), 12558-12563.
- Vallet I., Olson J. W., Lory S., Ladzunski A. & Filloux A., The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cyp*) and their involvement in biofilm formation. *PNAS*, 2001, 98 (12), 6911-6916.
- Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M. & Lejeune P., Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.*, 1998, 180, 2442-2449.
- Webb J. S., Thompson L. S., James S., Charlton T., Tolker-Nielsen T., Koch B., Givskov M. & Kjelleberg S., Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (15), 4585-4592.