

Actualités techniques et industrielles

Recherche

De nouvelles voies d'inhibition des biofilms Des micro-organismes producteurs de nouvelles molécules actives

Par **Géraldine L. Klein**^{1,2}, **Alain Dufour**² et **Chantal Compère**¹

¹ Service Interfaces et Capteurs, Département Recherche et Développement Technologiques, IFREMER, BP 70, 29280 Plouzané, France

² Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines, EA 3884, Université de Bretagne-Sud, UEB, BP 92116, 56321 Lorient Cedex, France

Contact : chantal.compere@ifremer.fr

Lors d'une immersion en eau de mer, tous les matériaux et structures sont rapidement colonisés par des salissures d'origine biologique : des biofilms. La transformation des propriétés de surface du matériau et la présence de micro- ou macro-organismes (bactéries, algues, balanes, larves) engendrent des risques accrus de corrosion localisée, la biodétérioration des matériaux immergés, le blocage des fonctions mécaniques... Afin de contrôler le dépôt et le développement de ces biofilms, la méthode privilégiée est l'application de peintures anti-salissures. Cependant ces revêtements sont généralement toxiques pour l'environnement. C'est pourquoi, les travaux menés actuellement visent à isoler de nouvelles molécules, produites par les bactéries marines, dans le but de développer des moyens de luttes écologiques et non toxiques contre les biofilms indésirables.

Les biofilms sont le résultat de la fixation et du développement de micro-organismes (bactéries, microalgues, ...) sur des surfaces biologiques ou synthétiques. Les micro-organismes fixés synthétisent une matrice polymérique et forment ainsi un film de quelques micromètres à quelques millimètres d'épaisseur possédant différentes architectures et organisations (films planes et homogènes, formation de structures en champignon, présence de canaux de circulation ou de microcolonies réparties de façon hétérogène sur la surface). Au sein des biofilms, les micro-organismes développent des caractéristiques spécifiques : modifications phénotypiques des micro-organismes, surproduction d'exopolymères, favorisation des communications chimique intra-espèce et inter-espèces, résistance accrue aux antibiotiques et aux détergents...

Vers une nouvelle microbiologie

La formation de biofilms par des bactéries est un phénomène qui n'est étudié que depuis relativement peu de temps. Les microbiologistes ont néanmoins rapidement réalisé l'importance de ce phénomène et du fait que la vie en biofilm est le mode de vie principal des bactéries aquatiques et terrestres, représentant 90 à 99 % de la biomasse bactérienne.

Les biofilms sont ubiquitaires : ils favorisent la colonisation des milieux terrestres et aquatiques (eau douce et milieu marin), des déserts, des végétaux, d'autres organismes. Dans certains secteurs, les effets positifs des biofilms sont recherchés : implication dans la colonisation du tractus gastro-intestinal ou de la surface des racines des végétaux, agent géochimiques agissant dans la lixiviation, probiotiques, piles électriques, traitements des déchets et dépollution. Dans d'autres secteurs cependant, ils sont identifiés comme une source de lourds problèmes :

- environnementaux : les biofilms concentrent des éléments toxiques comme le mercure, le sélénium ou l'arsenic, et créent des zones pauvres en oxygène dans les lacs, les rivières et les zones côtières provoquant une eutrophisation des milieux ;
- médicaux : les infections nosocomiales développées à partir de sutures, lentilles de contact, cathéters, prothèses orthopédiques sont liées à l'établissement de biofilms (environ 60 % des infections nosocomiales), ils sont aussi à l'origine d'infections chroniques comme la mucoviscidose, les ostéomyélites, les endocardites ou les infections urinaires ; les biofilms augmentent également l'incidence de maladies comme le choléra, la maladie de Lyme, ... ;
- industriels : les biofilms formés sur les parois des réseaux d'eau chaude et de conditionnement d'air sont le lieu privilégié d'accumulation d'espèces pathogènes (*Legionella*, amibes...) qui peuvent

ensuite contaminer l'environnement, ils sont responsables des dégradations des installations immergées, de la formation de bio-salissures, de risques de corrosion accrus, de la contamination des équipements en agroalimentaire et des réseaux de distribution d'eau...

Les biofilms et l'environnement marin

En milieu marin, la formation de biofilms bactériens est considérée comme étant une des premières étapes du «biofouling» (Fig. 1). Ces salissures marines ont de multiples conséquences : risques accrus de corrosion, augmentation du poids des navires, bouées et équipements flottants, colmatage de canalisations, dérive des mesures des capteurs, pertes de charge, augmentation des forces de frottement induisant une augmentation de la consommation de carburant et des émissions de CO₂.



▲ Figure 1 : Sonde SMATCH CTD après 3 mois d'immersion en milieu marin (photo : Elodie Loaec, IFREMER).

Les revêtements antisalissures, utilisés pour limiter la prolifération des salissures marines, agissent la plupart du temps par relargage de produits toxiques incorporés dans un liant, et certaines peintures, notamment à base de dérivés organiques de l'étain, se sont révélées extrêmement toxiques pour l'environnement. Des réglementations récentes de l'Organisation Maritime Internationale et de la Communauté européenne interdisent désormais l'usage de certains composés (organostanniques). Afin de développer de nouveaux moyens de lutte non toxiques vis-à-vis de l'environnement, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes d'adhésion des bactéries sur des surfaces solides et de développement des biofilms.

Peu de bactéries marines ont été étudiées et les études portant sur leurs biofilms restent rares, même si l'étude de bactéries marines du genre *Vibrio* a révélé l'existence de phénomènes de grande importance, tels que des mécanismes de communications inter-bactériennes (quorum sensing) permettant aux bactéries d'agir de façon concertée (comportement de population). Afin d'étudier l'adhésion de bactéries marines et la formation de biofilms, il est nécessaire de disposer d'organismes modèles bien caractérisés.

Un matériel vivant pour la protection des équipements en mer

La plupart des études portant sur l'inhibition du «biofouling» décrivent de nouvelles activités antibactériennes et antibiofilms produites uniquement par des bactéries marines et non par des bactéries terrestres. Les études réalisées par les équipes de S. Kjelleberg

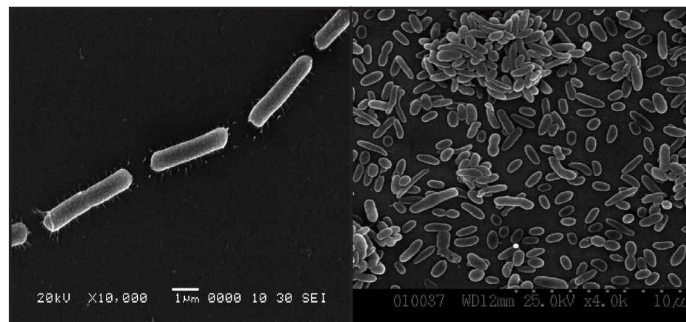
[1], S. K. Pandian [2] et par le Service Interfaces et Capteurs (IFREMER) et le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (Université de Bretagne-Sud) [3] sont trois exemples illustrant l'importance des bactéries marines dans la recherche de nouvelles molécules antisalissures.

Les travaux de l'équipe de S. Kjelleberg, en Australie, ont révélé en 2002 le potentiel antisalissures de certaines bactéries appartenant au genre *Pseudoalteromonas*. Ce genre bactérien est commun en milieu marin. Il contient à ce jour environ 30 espèces présentes dans la colonne d'eau ou associées à des organismes supérieurs tels que des algues, des éponges ou du corail. Ainsi *P. tunicata* produit une protéine (AlpP) possédant une activité antibactérienne (c'est-à-dire tuant les bactéries ou inhibant leur croissance) ; *P. aurantia*, *P. rubra* et *P. luteoviolacea* produisent des molécules inhibant la respiration bactérienne. Cependant tous les essais biologiques ont été réalisés de manière à rechercher une activité antibactérienne vis-à-vis de bactéries planctoniques (en milieu liquide) plutôt qu'une activité spécifiquement antibiofilm.

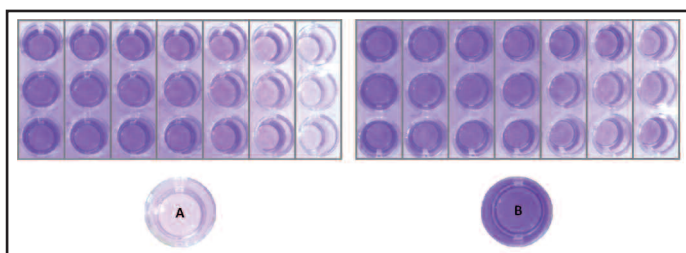
L'équipe de S.K. Pandian a travaillé à partir de bactéries associées aux coraux. Parmi les 43 bactéries isolées, 9 ont montré une activité antibiofilm, réduisant la formation du biofilm de la bactérie pathogène *Streptococcus pyogenes* jusqu'à 80 %, en inhibant la formation de microcolonies lors de l'attachement des bactéries à la surface. Dans cette étude menée à partir d'extraits de bactéries marines, les molécules produites ne possèdent pas d'activité antibactérienne même à forte concentration, mais inhibent seulement la formation de biofilm de *S. pyogenes*. Ces propriétés en font un bon candidat pour développer des composés antibiofilm.

Suite aux problématiques liées aux salissures marines, nous avons développé un projet visant à isoler de nouvelles molécules antisalissures ciblées sur les bactéries ayant une croissance en biofilm. Des souches de bactéries pionnières de l'adhésion ont été isolées sur différents matériaux inertes après quelques heures d'immersion en eau de mer sur le littoral côtier breton et leurs propriétés physico-chimiques ont été déterminées. Parmi ces bactéries, deux ont montré des propriétés particulièrement intéressantes et originales d'inhibition de formation de biofilms d'autres espèces (Fig. 2) ; *Pseudoalteromonas* sp. D41 (isolée par le service Interfaces et Capteurs de l'IFREMER) et *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (isolée par le LBCM de l'Université de Bretagne-Sud).

▼ Figure 2 : Images MEB des bactéries *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 (× 10000, 2 h de contact sur lame de verre) à gauche et *Pseudoalteromonas* sp. D41 (× 4000, 3 h de contact sur acier inoxydable) à droite. Images : C. Guéguan (LBCM, Université de Bretagne-Sud) et C. Rubio (IFREMER).



D'abord mis en évidence dans des biofilms multi-espèces, il a été démontré que l'effet inhibiteur de la formation de biofilm provient de composés actifs sécrétés dans le milieu par les deux souches de *Pseudoalteromonas*. L'activité de ces deux souches a été testée contre 20 souches appartenant à des genres et des espèces très différentes. L'évaluation de l'activité anti-biofilm a été faite suivant un protocole en microplaque 96 puits suivi d'une coloration au cristal violet (une souche bactérienne est cultivée de façon à former un biofilm dans un puits en présence ou non du composé bioactif, puis les bactéries ayant formé le biofilm sont quantifiées par la fixation de cristal violet). Ce colorant est ensuite resolubilisé par de l'alcool et la quantité de colorant est déterminée par spectrophométrie) (Fig. 3).

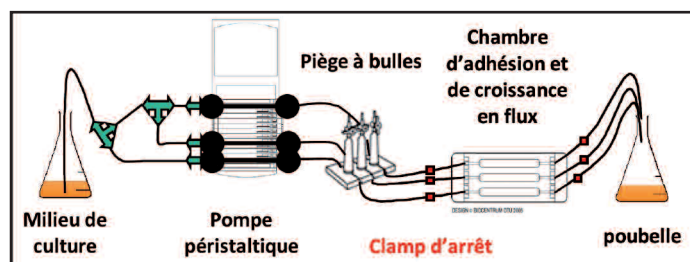


▲ Figure 3 : Évaluation de l'activité anti-biofilm de molécules produites par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 sur différentes souches en triplicat par colonnes. A montre un effet inhibiteur très marqué (réduction du développement de biofilm de 80 % par rapport au contrôle), B ne montre aucune activité (contrôle).

Une autre méthode consiste à former des biofilms par adhésion de bactéries sur un support inerte (Fig. 4) en appliquant un flux de milieu de culture, et à les observer par microscopie confocale à balayage laser après ajout de marqueurs. Cette technique permet d'obtenir des biofilms en conditions dynamiques et d'avoir accès à des informations importantes comme l'architecture en 3 dimensions de cette structure, la densité des micro-organismes dans le film formé ou encore la proportion de micro-organismes morts en utilisant différents marqueurs fluorescents pour visualiser les bactéries.

Le spectre d'action des molécules sécrétées par les souches *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41, sécrétant ces activités inhibitrices, est très large. Les molécules anti-biofilm des deux souches inhibent la formation de biofilms d'un grand nombre de bactéries testées, sauf celles des genres *Pseudoalteromonas* et *Alteromonas*. Il existe néanmoins une exception car les molécules sécrétées par D41 réduisent l'adhésion et la formation du biofilm de 3J6, cependant D41 n'est pas sensible aux molécules sécrétées par 3J6. L'action anti-biofilm de 3J6 n'est pas limitée aux bactéries d'origine marine, puisque trois souches apparte-

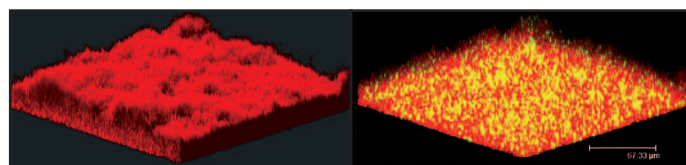
▼ Figure 4 : Schéma du montage permettant la formation de biofilms en conditions dynamiques.



nant à des espèces pathogènes pour l'homme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* et *Escherichia coli*, y sont sensibles.

L'originalité de ces molécules réside dans leur action ciblée sur les micro-organismes se développant au sein des structures formées lors d'une croissance en biofilms. En effet, les molécules sécrétées par *Pseudoalteromonas* sp. 3J6 et D41 n'ont aucun effet antibactérien sur les bactéries libres en solution. L'activité de ces molécules se traduit par une diminution du développement de biofilm à la surface de matériaux, tels que le verre et le polystyrène (PS), de 20 % à 98 % par rapport aux contrôles réalisés (Fig. 5). En plus de cette inhibition de la formation du biofilm, nous avons observé une augmentation d'un facteur 3 à 225 du pourcentage de bactéries non viables à l'intérieur du biofilm formé. Les composés actifs sécrétés par 3J6 ont donc deux effets notables indépendants l'un de l'autre. Cependant un seul des deux effets peut se produire sur certaines souches de bactéries, tandis que les deux effets se combinent pour produire un effet radical contre certaines autres bactéries : le développement de biofilms sur PS ou verre devient alors quasiment impossible dans les conditions testées (Fig. 5).

▼ Figure 5 : Images au microscope à balayage laser de biofilms de *Algibacter* sp. 1M6 après une croissance en chambre de flux pendant 48 h sous un flux laminaire de milieu de culture en absence de molécules actives (à gauche) et en présence de molécules actives (à droite). Barre d'échelle : 67,33 µm.



Évolutions et perspectives

La purification et l'identification des composés bioactifs sont en cours. Ces étapes nécessiteront la mise en place de méthodes chromatographiques pour séparer les molécules actives des autres composés du milieu. Ensuite, l'identification pourra se faire par spectrométrie de masse et comparaison aux bases de données. L'étude de ces composés et de leurs modes d'action en conditionnement de surface sur des matériaux de différentes nature devrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms en général, et plus particulièrement contre les salissures marines.

Remerciements :

Nous remercions le GIS Europôle Mer, le Conseil Général de Bretagne et l'IFREMER pour leur soutien financier.

Références bibliographiques :

- [1] C. Holmström, S. Egan, A. Franks, S. McCloy and S. Kjelleberg, *FEMS Microbiology Ecology* 41, 47-58 (2002)
- [2] R. Thenmozhi, P. Nithyanand, J. Rathna J. and S.K. Pandian, 2009. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 57, 284-294 (2009)
- [3] A. Dheilly, E. Soum-Soutéra, G.L. Klein, A. Bazire, C. Compère, D. Haras and A. Dufour, *Applied and Environmental Microbiology* 76, 3452-3461 (2010)