

THÈSE
UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
École doctorale des sciences exactes et leurs applications

par **Arantxa CAMUS ETCHECOPAR**

Soutenue publiquement le 28 novembre 2014

pour obtenir le grade de docteur
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS
DANS LA FORMATION DE BIOFILM À
L'INTERFACE EAU-COMPOSÉS ORGANIQUES
HYDROPHOBES**

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- Pr Marc CROUZET
- Pr Laurence VAN MELDEREN

ENSTBB / Université de Bordeaux
IBMM / Université Libre de Bruxelles

EXAMINATEURS

- Dr Murielle NAÏTALI
- Dr Pierre SIVADON

MICALIS / AgroParisTech
EEM / Université de Pau et des Pays de l'Adour

DIRECTEURS

- Pr Philippe GOULAS
- Dr Régis GRIMAUD

EEM / Université de Pau et des Pays de l'Adour
EEM / Université de Pau et des Pays de l'Adour



Remerciements

Maintenant que le chapitre 'Thèse' se termine, il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue et entourée pendant ces trois années. Toutes les personnes que je vais citer (en espérant n'oublier personne tant la liste est longue), ont joué un rôle majeur tant au niveau scientifique que moral pour me permettre de mener à bien ce projet jusqu'au bout avec force.

Je tiens tout d'abord à remercier les rapporteurs de ce travail, le Pr Laurence VAN MELDEREN de l'Université Libre de Bruxelles et le Pr Marc CROUZET de l'Université de Bordeaux, ainsi que les examinateurs, le Dr Murielle NAÏTALI de l'Institut AgroParisTech et le Dr Pierre SIVADON de l'UPPA, d'avoir accepté de juger mes travaux.

Je remercie le Pr Robert DURAN, directeur de l'Equipe Environnement et Microbiologie de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, pour m'avoir accueillie dès mon stage de Master 2.

Merci également aux membres de l'équipe MICALIS de l'INRA/AgroParisTech qui ont participé à ce travail, et plus particulièrement à Priscilla BRANCHUT et Alexis CANETTE pour avoir réalisé les images de microscopie confocale et de microscopie électronique à balayage.

Mes sincères remerciements vont également à mes deux directeurs de thèse, le Pr Philippe GOULAS et le Dr Régis GRIMAUD ainsi qu'au Dr Pierre SIVADON pour m'avoir encadrée tout au long de cette thèse, pour leur disponibilité ainsi que pour les compétences et les connaissances qu'ils m'ont transmises. Merci à toi Régis, pour ta patience, ton humour, ta passion pour la recherche, ton éternel enthousiasme et surtout ton optimisme face aux problèmes auxquels j'ai dû être confrontée lors de la manipulation génétique de marino et des analyses phénotypiques des mutants. Je n'oublierai jamais tous ces moments passés à discuter sur toutes les solutions possibles et inimaginables à tester pour comprendre les raisons pour lesquelles certaines expériences ne fonctionnaient pas. Philippe, merci encore pour vos précieux conseils dont j'ai pu bénéficier lors de la rédaction de ce manuscrit et du temps que vous avez consacré pour la correction de mon manuscrit et de mes présentations orales. Pierre, je tiens à te remercier de m'avoir aidé lors des nombreux casse-tête concernant la construction de mutants. Contrairement à cette apparence d'ours des Pyrénées béarnaises que tu donnes au premier abord, à chaque fois qu'on s'aventure dans ta caverne, tu prends toujours le temps de répondre à nos questions avec clarté et rigueur et à donner des conseils avisés qui nous permettent d'avancer.

Malgré votre léger « manque de tact » auquel il a fallu que je m'habitue, j'ai beaucoup appris à vos côtés, et grâce à vous j'ai su développer un raisonnement scientifique adéquat et développer un regard critique sur mes travaux afin d'être le plus rigoureux possible.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire pour leur sympathie, leurs conseils et leur aide. Je remercie tout particulièrement Florence, qui m'a aidé aussi bien techniquement que moralement concernant les petits tracas inhérents à la thèse. Merci aussi à Stéphanie pour son soutien et ses bavardages et à Maryse pour son aide.

Comment ne pas remercier les camarades (ex)thésards, post-doc, ATER et masters sans qui la vie au labo aurait été plus difficile à supporter. Merci aux camarades du bureau (numéro combien déjà Vanessa ??), Mathou, Vanessa, Elisabeth, Théo et Romain pour toutes ces conversations passionnantes et marrantes qu'on a eues sur nos travaux de recherche mais pas seulement (!!). Merci aux gens du bureau d'à côté qui ont également participé à la bonne ambiance du labo, grâce aux solo de Jérôme, aux blagues et craquages de Tony et au soutien moral de Mag R. Merci aussi aux camarades du deuxième bureau des thésards, Fonfec, Tom, Boussy et Justine pour ces moments de délires et d'échappatoires et plus particulièrement aux thésards bisounours de ma promo, Johanne, Fanny et Fabien avec qui on s'est bien serré les coudes grâce à des craquages dépourvus de sens. Je tiens à remercier la fine équipe « team marino », Moumoune, Pollito et Habiba, avec qui on a créé une ambiance de travail hors du commun et une amitié forte. Moumoune, toi qui as été recruté comme thésarde un an avant moi, ton expérience d'ainé m'a été très précieuse. Merci pour tous les craquages, les karaokés, les casse-tête sur la génétique de marino, et ton rire qui pourrait concurrencer le mien ! Habiba, je n'oublierai jamais ton soutien, ta discrétion et ton besoin de vouloir te plier en quatre pour rendre service. Ah Pollito ! Qu'est-ce qu'on serait devenu sans toi ! Ta venue a permis de renforcer le moral des troupes. Derrière ta tête d'ange se cache un petit diabolotin toujours prêt à piéger des proies faciles !! Merci pour tes rébus ou petits messages sur ma paillasse, les bons points, les giggs, les pouloum pouloum et les PPP. Merci aussi à Sara MEDINA FERNANDEZ, qui m'a permis de découvrir la joie de l'encadrement, qui m'a apporté une grande aide lors de son stage de Master 2, et qui a su contribuer à la bonne humeur de notre « team marino ».

Merci aussi à mes boulets préférés, Cha, Clémy, Marly, Yohann et PiZatiBi, dont chaque retrouvaille passée auprès de vous me recharge le moral à bloc grâce à un retour au passé, en plein milieu de notre période de débilité optimale des années de prépa toulousaines.

Eskerrik hanitx à mes copines du groupe Amaren Alabak de m'avoir soutenu et d'avoir su gérer mes contraintes de thésard avec patience pour que je puisse continuer à assurer les spectacles de chants. Eskerrik hanitx au spectacle Hostoak et à chacun des membres, qui eux aussi m'ont permis de m'aérer l'esprit, et de marquer une parenthèse agréable à chaque représentation.

Enfin, j'adresse mes derniers et mes plus grands remerciements à ceux qui me sont les plus proches : les membres de ma famille. Merci à aita eta ama, à mes sœurs, aitani ta amama, mes oncles/tantes, cousins/cousines, ma nièce et filleule, mes bofs, ma belle-famille, qui, bien que mes travaux n'étaient que du chinois pour eux, m'ont toujours soutenu sans relâche. Un immense merci à Bettan qui a subi mes baisses de moral en première ligne, mais qui a toujours su me remotiver, me soutenir, m'écouter et me rassurer. Si j'ai réussi à tenir jusqu'au bout c'est aussi en partie grâce à lui.

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux et figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Le cycle du carbone en milieu marin	7
1.1. Le cycle du carbone dans les milieux océaniques	7
1.2. L'origine et le devenir de la matière organique dans l'océan	9
1.2.1. <i>Le carbone organique dissous (DOC), le carbone organique particulaire (POC) et leur recyclage</i>	<i>10</i>
- Le carbone organique dissous	10
- Le carbone organique particulaire	11
1.2.2. <i>Les POC : sites privilégiés de l'activité bactérienne dans le milieu océanique</i>	<i>13</i>
- La phycosphère : une source importante de matière organique.....	13
- La matière organique particulaire morte	14
1.2.3. <i>Les composés organiques hydrophobes de la matière organique particulaire.....</i>	<i>14</i>
- Les lipides	14
- Les hydrocarbures	15
1.3. Biodégradation des HOC par des bactéries hétérotrophes spécialisées.....	16
1.3.1. <i>Problème de biodisponibilité des HOC.....</i>	<i>17</i>
- Solubilité des HOC dans l'eau	17
- Concept de biodisponibilité	19
1.3.2. <i>Les bactéries hydrocarbonoclastes (HCB)</i>	<i>20</i>
1.3.3. <i>Stratégies développées par les bactéries hydrocarbonoclastes pour survivre à la toxicité des HOC</i>	<i>22</i>
- Modification de la composition membranaire	23
- Les pompes d'efflux de type RND : une stratégie efficace pour maintenir une concentration en HOC tolérable.....	24
1.3.4. <i>L'assimilation des HOC.....</i>	<i>29</i>
- Systèmes de transports à travers les membranes externe et interne.....	29
- Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures.....	30

	- Mécanismes de biodégradation des lipides	33
2.	Principales stratégies bactériennes pour augmenter la faible biodisponibilité des HOC	35
2.1.	Chimiotactisme :.....	35
2.1.1.	<i>Mobilité flagelle-dépendante</i>	36
2.1.2.	<i>Mobilité flagelle-indépendante</i>	38
2.1.3.	<i>Chimiotactisme : stratégie comportementale pour accéder aux HOC</i>	42
2.2.	Production de biosurfactants	43
2.2.1.	<i>Généralités</i>	43
2.2.2.	<i>Rôles dans l'assimilation des HOC</i>	43
	- La pseudo-solubilisation des HOC	43
	- Modification des propriétés de surface bactérienne	45
2.3.	L'adhésion bactérienne à une surface/interface.....	46
2.3.1.	<i>Approche physico-chimique de l'adhésion : la théorie DLVO</i>	47
2.3.2.	<i>Les modifications de surface cellulaire bactérienne favorisant l'adhésion à une surface</i>	48
	- Modification des structures de surface cellulaires favorisant l'hydrophobicité.....	48
	- Les adhésines et les nanofibres protéiques d'adhésion bactérienne	49
2.3.3.	<i>Adhésion et biodisponibilité des HOC</i>	51
2.4.	Formation de biofilm sur une surface/interface.....	52
2.4.1.	<i>Les avantages écologiques du mode de vie en biofilm</i>	53
2.4.2.	<i>La formation spatio-temporelle du biofilm : adhésion, maturation et détachement</i>	53
	- Etapes de maturation du biofilm.....	54
	- La dispersion.....	56
2.4.3.	<i>La formation de biofilm : réponse adaptative pour l'assimilation des HOC.</i>	57
3.	Etude de la formation de biofilm aux interfaces eau-HOC par la souche modèle <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17.....	59
3.1.	Position taxonomique et écologie du genre <i>Marinobacter</i>	59
3.2.	La souche <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17	60
3.2.1.	<i>Etude physiologique de la formation de biofilm sur HOC</i>	60
3.2.2.	<i>Etude spatio-temporelle du développement du biofilm à l'interface eau-HOC</i>	62
	- Analyse physico-chimique de l'interaction des cellules avec l'interface..	62
	- Etude de l'architecture et des intermédiaires de développement du biofilm.	63

- La diversité physiologique des cellules lors du développement du biofilm ..	65
3.2.3. Mise en place de stratégies et d'outils génétiques pour l'étude des mécanismes moléculaires intervenant dans la formation de biofilm sur HOC.....	67
- Séquençage du génome de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17.....	67
- Etudes protéomiques	68
- Etudes transcriptomiques	71
- Développement d'outils génétiques pour comprendre les mécanismes moléculaires de formation de biofilm sur HOC.....	74
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	75
1. Culture de souches bactériennes.....	77
1.1. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> , <i>Marinobacter adhaerens</i> et <i>Marinobacter aquaeolei</i>	77
1.1.1. Croissance planctonique	77
1.1.2. Protocole de contact des cellules à divers composés.....	79
- Adhésion à un HOC	79
- Contact des cellules avec des extrait d'algues	79
1.1.3. Culture en biofilm sur composés organiques hydrophobes (HOC).....	79
1.1.4. Suivi de la formation du biofilm par dosage au cristal violet et par dosage des protéines totales	80
- Substrat solide.....	80
- Substrat liquide	81
1.1.5. Tests de toxicité vis-à-vis de divers composés	81
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide ..	81
- Toxicité vis-à-vis des composés insolubles	82
- Toxicité vis-à-vis du <i>n</i> -hexadécane pseudo-solubilisé dans du Brij 58	82
1.2. <i>Alcanivorax borkumensis</i>	82
1.2.1. Culture planctonique.....	82
1.2.2. Obtention des mutants spontanés <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 <i>Nal^R</i> et <i>Rif^R</i>	83
1.3. <i>Escherichia coli</i>	84
2. Techniques de biologie moléculaire.....	85
2.1. Extraction d'ADN génomique et plasmidique.....	85
2.2. Extraction d'ARNs et rétro-transcription.....	85
2.3. PCR et purification des amplicons.....	86
2.3.1. PCR classique	86

2.3.2.	<i>Purification des amplicons d'ADN</i>	87
2.4.	PCR en temps réel	87
2.5.	Electrophorèse sur gel d'agarose	88
2.6.	Clonage de fragments d'ADN	88
2.6.1.	<i>Vecteurs de clonages</i>	89
	-pGEM [®] -T Easy	89
	-pUC18T-mini-Tn7T-Gm.....	89
	-pKAS32, pKOMKm et pKOMCat.....	90
	-pBBR1MCS-5	91
2.6.2.	<i>Digestion de restriction des produits PCRs et de fragments d'ADN plasmidiques</i>	91
2.6.3.	<i>Purification des produits de digestion</i>	91
2.6.4.	<i>Ligature</i>	92
2.6.5.	<i>Transformation des plasmides dans une souche hôte d'E.coli</i>	93
	- Transformation chimique	93
	- Transformation par électroporation.....	93
	- Transformation au TSS	93
2.6.6.	<i>Séquençage</i>	94
2.7.	Conjugaison entre <i>E.coli</i> et <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	94
2.7.1.	<i>Conjugaison bipartite pour mutation d'un gène cible chez JM1</i>	94
2.7.2.	<i>Conjugaison bipartite pour insertion d'un plasmide répliatif chez Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	95
2.7.3.	<i>Conjugaison quadripartite pour insertion d'un mini-Tn7 au site attTn7 de M. hydrocarbonoclasticus</i>	96
3.	Création de mutants « knock-out » par deux techniques chez JM1	97
3.1.	Par insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique	97
3.1.1.	<i>Principe de la technique</i>	97
3.1.2.	<i>Construction du vecteur suicide pKOMKm</i>	99
3.1.3.	<i>Construction du vecteur suicide pKOMCat et sélection des mutants</i>	100
3.2.	Par délétion en phase d'une partie ou de toute la région cible	102
3.2.1.	<i>Principe de la technique</i>	102
3.2.2.	<i>Construction du vecteur suicide et sélection des mutants</i>	102
4.	Techniques de microscopie à contraste de phase, à épifluorescence, et à confocale	106
4.1.	Observation des cellules adhérees à un HOC solide par microscopie à épifluorescence	106
4.1.1.	<i>Adhésion des cellules à un HOC solide</i>	106
4.1.2.	<i>Expérience de mort cellulaire</i>	106

4.2.	<i>Observation du phénomène de twitching sur une surface au microscope à contraste de phase.....</i>	107
4.2.1.	<i>Expériences de twitching sur agar mou.....</i>	107
4.2.2.	<i>Expériences de twitching sur HOC.....</i>	107
4.1.	Observation des cellules adhérees et de biofilm par microscopie à confocale	107
PREAMBULE.....		109
CHAPITRE III: Caractérisation fonctionnelle du gène <i>MARHY2686</i> de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>		115
1. Etudes bioinformatique et bibliographique de <i>MARHY2686</i>		117
1.1.	Expression du gène <i>MARHY2686</i> en condition d'adhésion et de biofilm sur HOC	117
1.2.	Le locus du gène <i>MARHY2686</i>	118
2. Caractérisation fonctionnelle du gène <i>MARHY2686</i>		128
2.1.	Le gène <i>MARHY2686</i> est impliqué dans la formation de biofilm sur alcanes....	128
2.2.	Exploration des fonctions potentielles d'efflux de <i>MARHY2686</i>	135
2.2.1.	<i>Importance des pompes d'efflux de type RND dans la formation de biofilm de JMI</i>	135
2.2.2.	<i>Exploration de la fonction de résistance à des composés toxiques exogènes.</i>	138
2.2.3.	<i>Exploration des fonctions d'élimination de métabolites toxiques issus de la dégradation des alcanes.....</i>	141
2.2.4.	<i>Exploration des fonctions de sécrétion de facteurs importants pour l'assimilation des n-alcanes ou la formation de biofilm.....</i>	142
2.3.	Arguments en faveur d'un rôle dans l'assimilation des HOC	143
3. Complémentation fonctionnelle de la mutation		145
3.1.	Complémentation du mutant AC1	145
3.2.	Constructions génétiques du mutant <i>MARHY2686</i> non polaire et complémentation.....	146
3.2.1.	<i>Mutation de <i>MARHY2686</i> par délétion et insertion d'une cassette kanamycine (<i>aphA</i>) transcrite dans le même sens que <i>MARHY2686</i></i>	146
3.2.2.	<i>Mutation de <i>MARHY2686</i> par délétion en phase d'une région de sa séquence codante.....</i>	148
CHAPITRE IV: Etude du rôle du flagelle et des pili dans l'adhésion et la formation de biofilm aux interfaces eau-HOC		151
1. Introduction.....		153

2.	Etude sur le rôle du flagelle dans la formation de biofilm sur HOC	154
3.	Etude sur le rôle des pili de type IV dans la formation de biofilm sur HOC	160
3.1.	Expression des gènes de pili de type IV en condition d'adhésion et de biofilm sur HOC	160
3.2.	Les pili de type IV et la formation de biofilm sur les HOC	162
3.3.	Les pili de type IV interviennent dans l'adhésion aux HOC	171
3.4.	Les pili de type IV et le twitching	180
3.5.	Complémentation fonctionnelle des mutants des gènes de pili	183
4.	Le rôle du pilus de type MSHA dans la formation de biofilm sur les HOC.....	185
5.	Le facteur de transcription RpoN régule potentiellement la mobilité flagelle- pili-dépendante.	189

CHAPITRE V: Etudes sur le rôle du T6SS dans la formation de biofilm aux interfaces eau-HOC..... 193

1.	Introduction	195
2.	Etude du rôle du système de sécrétion de type VI (T6SS) dans la formation de biofilm sur les HOC	196
2.1.	Expression des gènes du T6SS lors de la formation de biofilm sur HOC....	196
2.2.	Le T6SS et la formation de biofilm sur HOC.....	199
2.3.	Etude sur l'interaction potentielle entre JM1 et des microalgues.....	202
2.4.	Etude sur la compétition entre JM1 et <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 vis-à-vis du <i>n</i> -hexadécane	205

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 207

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 217

ANNEXES..... 241

Annexe 1 : Article soumis dans FEMS Microbiology Ecology

Marinobacter hydrocarbonoclasticus SP17 forms oleolytic biofilms on various hydrophobic

Annexe 2 : Article « RNB info n°5 »..... 277

Liste des tableaux et figures

CHAPITRE I. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1 : Le cycle de la matière organique (carbone organique) dans les océans.....	8
Figure I.2 : La distribution selon la taille de la matière organique dans les océans (Azam et Malfatti, 2007).....	10
Tableau I.1 : LogKow, toxicité et solubilité de différents HOC dans de l'eau milliQ à 25 °C (d'après Heipieper and Martínez, 2010).	18
Figure I.3 : Processus de biodégradation des HOC et le concept de biodisponibilité.....	20
Figure I.4 : Organisation des systèmes de pompe d'efflux de type RND (Murakami and Yamaguchi, 2003; Pos, 2009; Hinchliffe et al., 2013).	26
Figure I.5 : Schéma du modèle d'efflux rotatif d'AcrB	28
Figure I.6 : Voie métabolique de la dégradation des alcanes chez <i>Pseudomonas putida</i> GPo1 (modifiée et redessinée d'après van Beilen et al., 2001).....	32
Figure I.7 : Etapes d'activation des hydrocarbures saturés et aromatiques.....	33
Figure I.8 : Le système d'assemblage du flagelle et le système de chimiotactisme régulant le sens de rotation (modifié d'après Porter et al., 2011).....	37
Figure I.9 : Systèmes d'assemblage du pilus de Type IV et du système de chimiotactisme chp chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et leur organisation supposée au niveau de l'enveloppe cellulaire (modifié d'après Burrows, 2012).....	41
Figure I.10 : Structure de trois exemples de biosurfactants et bioémulsifiants.....	44
Tableau I.2 : Exemples de différents composés et appendices protéiques intervenant dans l'adhésion bactérienne à une surface (Lejeune, 2003).	47
Figure I.11 : Augmentation de la biodisponibilité des HOC par adhésion à l'interface HOC-eau.....	51
Figure I.12 : Mécanismes potentiels de la mobilisation des HOC au sein d'un biofilm à l'interface eau-HOC.	57
Figure I.13 : Cinétiques de la formation du biofilm de <i>M.hydrocarbonoclasticus</i> SP17 à l'interface eau-hexadécane (gauche) et de la dégradation de cet alcane (droite) (Klein et al., 2008).....	61
Figure I.14 : <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 s'adsorbe à l'interface eau-hexadécane puis produit un composé aux propriétés tensio-actives qui reste à l'interface.....	63

Figure I.15 : Projection tridimensionnelle et sections verticales d'un biofilm formé autour d'une gouttelette d'hexadécane (à gauche) et grossissement d'une région de la gouttelette (Grimaud, 2010b).....	64
Figure I.16 : Développement du biofilm de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 sur eicosane (Vaysse, 2009) (A) et paraffine (B) suivi par microscopie confocale.	64
Figure I.17 : Images en microscopie électronique en transmission de la structure des inclusions lipidiques formées dans les cellules de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 du biofilm sur <i>n</i> -hexadécane (A), dans les cellules détachées (B) et dans les cellules planctoniques en croissance sur acétate (C) (Klein et al., 2008).	66
Figure I.18 : Modèle de développement du biofilm de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 à l'interface eau-alcane.	66
Figure I.19 : Caractéristiques générales du génome de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 (A) et organisation des gènes du métabolisme et de dégradation des alcanes (B).....	68
Figure I.20 : Comparaison des profils d'expressions protéiques entre les quatre types physiologiques de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 (Vaysse et al., 2011).	70
Figure I.21 : Comparaison des profils d'expression géniques entre les conditions physiologiques.	72

CHAPITRE II. MATERIEL ET MÉTHODES

Tableau II.1 : Liste des souches des souches de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> et <i>M.adhaerens</i> utilisées et construites, leurs caractéristiques et leur utilisation.....	78
Tableau II.2 : Liste des souches des souches de <i>A. borkumensis</i> utilisées et construites, leurs caractéristiques et leur utilisation.	83
Tableau II.3 : Liste des souches des souches <i>E. coli</i> utilisées, leurs caractéristiques et leur utilisation.....	84
Figure II.1 : Cartes de restriction des plasmides pGEM®-T Easy (à gauche) et pUC18T-mini-Tn7T-Gm (à droite).	90
Figure II.2 : Carte du plasmide pBBR1MCS-5.	91
Figure II.3 : Schéma de la stratégie adoptée pour la construction de mutants «knock-out» par remplacement d'allèle chez JM1. Exemple du gène <i>MARHY2686</i>	98
Figure II.4 : Schéma de la construction du vecteur de clonage pKOMKm.....	100
Figure II.5 : Schéma de la construction du vecteur de clonage pKOMCat	101

Figure II.6 : Stratégie n°1 adoptée pour la construction de mutants « in frame » chez JM1.
Exemple avec le gène *MARHY2686*..... 104

Figure II.7 : Stratégie n°2 adoptée pour la construction de mutants « in frame » chez JM1.
Exemple avec le gène *MARHY2686*..... 105

Tableau II.4 : Liste des gènes sélectionnés pour la caractérisation fonctionnelle et leur donnée d'expression 113

CHAPITRE III. Caractérisation fonctionnelle du gène *MARHY2686* de *M.*

hydrocarbonoclasticus

Figure III.1 : Profil d'expression du gène *MARHY2686*..... 117

Figure III.2 : Profil d'expression des gènes *MARHY2687* (A) et *MARHY2685* (B)..... 118

Figure III.3 : Structure du locus du gène *MARHY2686* et les différents éléments prédits.
..... 119

Figure III.4 : L'alignement deux à deux des protéines *MARHY2686* de JM1 et AdeT
d'Acinetobacter baumannii. 120

Tableau III.1 : Distribution phylogénétique des bactéries possédant des homologues de
MARHY2686. 124

Tableau III.2 : Distribution phylogénétique des bactéries possédant des homologues de
MARHY2685. 126

Tableau III.3 : Distribution phylogénétique des bactéries possédant des homologues de
MARHY2687. 127

Figure III.5 : Cinétiques de croissance planctonique sur deux substrats solubles, DL-
lactate (A) et acétate (B)..... 128

Figure III.6 : Cinétique de croissance en biofilm sur différents HOC..... 130

Figure III.7 : Croissance des souches JM1 (A et C) et AC1 (B et D) sur milieu EMS agar
exposé à des vapeurs d'hexadécane (A et B) ou sur milieu EMS agar DL-lactate (C et D).. 131

Figure III.8 : Observation de cellules de la souche sauvage *M. hydrocarbonoclasticus*
JM1 et de la souche mutante AC1 adhérentes et formant un biofilm à l'interface solide
paraffine-eau..... 133

Figure III.9 : Comparaison des analyses de biovolumes (A) et de pourcentage de
recouvrement (B) de la surface de la paraffine lors de la formation de biofilm de la souche
sauvage *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 et de la souche mutante AC1..... 133

Figure III.10 : Observation au microscope à épifluorescence des cellules sauvages et AC1
adhérentes à la paraffine par coloration au Syto9..... 134

Figure III.11 : Observation au microscope à épifluorescence des cellules sauvages (A) et AC1 (B) adhérées à la paraffine par coloration au rouge Nile.....	135
Figure III.12 : La structure de l'inhibiteur de pompe d'efflux phényl-arginine- β -naphtylamide (pA β N).	136
Figure III.13 : Effets de l'addition de l'inhibiteur de pompe d'efflux pA β N sur la formation de biofilm de JM1 sur paraffine (A) et sur la croissance planctonique de JM1 sur lactate (B).	137
Figure III.14 : Toxicité des souches JM1 (A) et AC1 (B) vis-à-vis de l'hexadécane vapeur.	138
Figure III.15 : Croissance planctonique des souches JM1 et AC1 sur le <i>n</i> -hexadécane (0.2 %) pseudo-solubilisé par du Brij 58 (4 mM).	139
Tableau III.4 : Détermination des MIC de JM1 et AC1 sur différents composés.....	140
Tableau III.5 : Tests de toxicité vis-à-vis de certains composés hydrophobes.	140
Tableau III.6 : Tests de toxicité vis-à-vis des vapeurs de certains composés.	141
Figure III.16 : L'effet du surnageant de biofilm de JM1 sur la cinétique de croissance en biofilm sur paraffine des souches JM1 et AC1.	143
Figure III.17 : Schéma de la construction du mutant « knock-out » AC1 (+) par la technique de remplacement d'allèle.....	146
Figure III.18 : Structure secondaire de la région de l'ARNm chevauchant la région <i>MARHY2686</i> et <i>MARHY2685</i> (A) ainsi que la région <i>aphA</i> et <i>MARHY2685</i> (B).	148
Figure III.19 : Les deux stratégies adoptées pour la construction des mutants « in frame » chez JM1.	149
Figure III.20 : Cinétiques de croissance sur paraffine des mutants de délétion en phase AC2 et AC3 (A) et du mutant complémenté AC15.	150

CHAPITRE IV. Étude du rôle du flagelle et des pili dans l'adhésion et la formation de biofilm sur HOC

Figure IV.1. : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine de JM1 et des souches dérivées de <i>M. adhaerens</i> HP15.	155
Figure IV.2. : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine des souches de JM1 et du mutant <i>fleR</i>	156
Figure IV.3 : Les séquences codantes des gènes <i>fliH</i> de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 (en haut) et de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> VT8 (en bas).....	157

Figure IV.4 : Photographie d'une cellule de JM1 obtenue par microscopie électronique à transmission en coloration négative. Ref expliquer le type coloration	158
Figure IV.5 : Mobilité bactérienne sur du milieu EMS semi-solide à 0.2 % (A) et à 0.4 % agar (B).....	158
Figure IV.6 : Organisation des gènes codant pour la biogénèse (A) et la mobilité des pili de type IV (B) chez <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17 (en haut) et <i>P. aeruginosa</i> (en bas).	160
Figure IV.7 : L'expression différentielle des gènes de pili de type IV en condition d'adhésion (A) et de biofilm (B) sur hexadécane (HEX) et trioléine (TRI).	161
Figure IV.8 : Cinétique de croissance planctonique sur acétate à 20 mM de la souche sauvage et des mutants des gènes de pili.....	163
Figure IV.9 : Cinétiques de croissance en biofilm sur différents HOC des mutants des gènes de pili et de la souche sauvage <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> JM1.	164
Figure IV.10 : Suivi de la biomasse planctonique contenue dans le surnageant du biofilm sur hexadécanol.	168
Figure IV.11 : Comparaison de la biomasse totale, sessile et planctonique obtenues lors de la croissance sur hexadécanol de la souche sauvage JM1 (A), et des mutants des gènes de pili, <i>pilA</i> (B) et <i>pilQ</i> (C).	169
Figure IV.12 : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine de la souche sauvage JM1 et des mutants <i>pilH</i> et <i>pilV</i>	171
Figure IV.13 : Observation des cellules de JM1 (WT) et <i>pilA</i> adhérees à la paraffine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.	173
Figure IV.14 : Observation des cellules de <i>pilQ</i> et <i>pilH</i> adhérees à la paraffine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.....	174
Figure IV.15 : Pourcentages de couverture des cellules adhérees à la paraffine (A) et à la tripalmitine (B).	175
Figure IV.16 : Quantification du nombre d'objets de chaque catégorie de taille d'objets en condition d'adhésion sur paraffine (A) et tripalmitine (B).....	176
Figure IV.17 : Observation des cellules de JM1 (WT) et <i>pilA</i> adhérees à la tripalmitine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.	178
Figure IV.18 : Observation des cellules de <i>pilQ</i> et <i>pilH</i> adhérees à la tripalmitine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.	179

Figure IV.19 : Images de microscopie à contraste de phase de la zone d'expansion de la colonie de JM1 (A), *pilA* (B) et *pilQ* (C) observées à l'interstice entre l'agar à 1 % et la lamelle de verre. 182

Figure IV.20 : Suivi de la biomasse planctonique contenue dans le surnageant du biofilm sur hexadécanol. 184

Figure IV.21 : Organisation des gènes codant pour les pili de type MSHA chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 (en haut) et *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor N16961 (en bas). 185

Figure IV.22 : L'expression différentielle des gènes de pili de type MSHA en condition d'adhésion (A) et de biofilm (B) sur les interfaces HOC-eau. 186

Figure IV.23 : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine des souches dérivées de *M. hydrocarbonoclasticus* JM1. 188

Figure IV.24 : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine de la souche sauvage JM1 et du mutant *rpoN* 191

CHAPITRE V. Étude sur le rôle du T6SS dans la formation de biofilm aux interfaces eau-HOC

Figure V.1 : Structure (A) et activation du T6SS au contact d'une cellule hôte (Silverman et al., 2012). 197

Figure V.2 : Organisation et expression des gènes de système de sécrétion de type IV. 198

Figure V.3 : Rapport d'expression du gène *MARHY3635* chez JM1 en condition biofilm sur *n*-hexadécane et trioléine. 199

Figure V.4 : Cinétique de croissance en biofilm sur différents HOC. 200

Figure V.5 : Rapport d'expression du gène *MARHY3635* chez JM1 au contact avec du glycolate, de l'extrait et du surnageant d'*Alexandrium catenella* 203

Figure V.6 : Pourcentage de cellules de *M. adhaerens* HP15 et de JM1 attachées aux cellules de *T. weissflogii* en phase stationnaire de croissance. 205

Liste des abréviations

(par ordre alphabétique)

ADN/DNA : acide désoxyribonucléique
ADNc/cDNA : ADN complémentaire
Amp^R, Amp^S : résistant (R), sensible (S) à l'ampicilline
ARN/RNA : acide ribonucléique
ARNm/mRNA : ARN messenger
ARNr/rRNA : ARN ribosomique
ATP : adénosine-5'-triphosphate
ATPase : adénosine triphosphatase
b : base
bar : unité de mesure de pression (*équivalent à 10⁵ pascals*)
BCA : bichinoninic acid (*acide bichinoninique*)
BLAST: basic local alignment search tool
Bet : bromure d'éthidium
BSA : bovine serum albumin (*albumine de sérum bovin*)
BTEX : benzène toluène ethylbenzène xylène
°C : degré Celsius
Ci : Curie
cm : centimètre
CMC : concentration micellaire critique
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CoA : coenzyme A
Ct/Cq : cycle seuil en PCR en temps réel
Da : dalton
DEPC : diéthylpyrocarbonate
di-GMPc : di-guanosine monophosphate cyclique
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNase : désoxyribonucléase
dNTP : désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
DO : densité optique
DOC/DOM : dissolved organic carbon or matter (*carbone/matière organique dissoute*)
eau milliQ : eau ultra-pure (Type 1) de résistivité de 18,2 MΩ.cm à 25 °C
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique
EMS : eau de mer synthétique/synthetic sea water
EPI : efflux pump inhibitor (*inhibiteur de pompe d'efflux*)
EPS : exo-polysaccharide *ou* extracellular polymeric substance (*substance polymérique extracellulaire*)
EYFP : enhanced yellow fluorescent protein
FAD : Flavine adénine dinucléotide
FMN : Flavine mononucléotide

g : gramme
GFP : Green Fluorescent Protein
Gm^R : résistant à la gentamycine
h : heure
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HCB : hydrocarbonoclastic bacteria (*bactérie hydrocarbonoclaste*)
HMN : Heptaméthylnonane
HOC : hydrophobic organic compound (*composé organique hydrophobe*)
Hz : Hertz
IP : Iodure de propidium
IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
k : kilo
Km^R, Km^S : résistant (R), sensible (S) à la kanamycine
L : litre
LB : milieu Luria-Bertani
LCFA : long chain fatty acid (*acide gras à longue chaîne*)
LPS : lipopolysaccharides
m : milli
m : mètre
M : méga
MCP : Methyl-accepting Chemotaxis Proteins
MDR : Multi-Drug Resistance
MFP : Membrane Fusion Protein
min : minutes
mol : mole
MSC/MCS : multi-site de clonage/multi-cloning site
MSHA : Mannose-sensitive hemagglutinin
m/v : poids à volume
n : nano
N : normalité d'une solution aqueuse
NADH/NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NALP : Non Aqueous Liquid Phase (*phase liquide non aqueuse*)
Nal^R : résistant à l'acide nalidixique
NCBI : National Center for Biotechnology Information
Ω : ohm
OMP : Outer Membrane Protein
p : pico
pAβN : phényl-arginine-β-naphtylamide
pb : paire de bases
PCI : phénol-chloroforme-alcool isoamylique
PCR : polymerase chain reaction
pH : potentiel hydrogène
ppb : partie par milliard; ($1 \text{ ppb} = 0,000\ 000\ 001 = 10^{-9}$)

POC/POM : Particulate organic carbon or matter (*carbone/matière organique particulaire*)
RBS : ribosome binding site (*site de fixation du ribosome*)
RNase : ribonucléase
RND : Resistance/Nodulation/Cell division
rpm : rotations par minute
RR : régulateur de réponse
RT : rétro-transcription
TRAP transporter : Tripartite ATP-independent periplasmic transporter
TXSS : Type X secretion system (*système de sécrétion de type X*)
s : seconde
S : Svedberg (unité de mesure du taux de sédimentation)
SAC : surface active compound (*composé actif de surface*)
SDS : sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (*électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante*)
Sm^R, Sm^S : résistant (R), sensible (S) à la streptomycine
Taq : ADN polymérase isolée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*
Tet^R : résistant à la tétracycline
T4P : Type IV pili (*pili de type IV*)
Tris : trishydroxyméthylaminométhane
TBE : Tris borate EDTA
TSS : transformation & storage solution (*solution de transformation et de stockage*)
U : unité
μ : micro
UV : rayonnements ultra-violets
V : volt
vol : volume
v/v : volume à volume
W : watt
WT : Wild-type
X : facteur de concentration / facteur de grandissement (microscopie)
× g : unité d'accélération
X-gal : bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside
% : pour cent

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Le milieu marin couvre 71 % de la surface de la Terre et représente 90 % de la biosphère avec une plus grande diversité biologique que dans les écosystèmes terrestres et d'eau douce. De par leur abondance, leur pouvoir d'adaptation, leurs capacités métaboliques et leur versatilité biochimique, les bactéries hétérotrophes jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du cycle du carbone et par conséquent dans le fonctionnement des écosystèmes marins. Une part non négligeable de la matière organique se trouve sous la forme de composés organiques hydrophobes (HOC), incluant principalement les hydrocarbures et les lipides. Leur hydrophobicité influe sur leur devenir dans l'environnement, où ils vont se retrouver essentiellement adsorbés à des particules organiques ou minérales, ou alors dissous dans des phases liquides non aqueuses. De plus, un certain nombre d'entre eux sont considérés comme étant des contaminants majeurs des écosystèmes marins car ils peuvent en modifier les équilibres, la dynamique et la structure des populations ou bien être toxiques pour la santé humaine. Outre l'implication des HOC dans le cycle du carbone, leur biodégradation a également des enjeux sanitaires et environnementaux.

Bien que les HOC représentent une source importante d'énergie pour les bactéries, leur caractère hydrophobe constitue un obstacle important à leur biodisponibilité (**Chapitre I**). Néanmoins, un certain nombre de bactéries marines, appartenant au groupe des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB), sont capables d'utiliser ces composés comme source de carbone et d'énergie, grâce à la mise en place de fonctions cellulaires spécifiques permettant d'augmenter la fraction assimilable de ces HOC, leur transport puis leur métabolisation (**Chapitre I**). La formation de biofilms à l'interface eau-HOC est une des stratégies permettant d'améliorer la biodisponibilité des HOC en augmentant leur transfert de masse de la phase apolaire vers la surface cellulaire (**Chapitre I**). Les souches formant des biofilms sur HOC tendent à former préférentiellement, voire exclusivement des biofilms sur des substrats hydrophobes, suggérant que le déterminisme du biofilm serait régulé par la présence d'une interface nutritive et que, en conséquence, les cellules possèderaient des systèmes de reconnaissance de ces surfaces. Ainsi, le HOC sert à la fois de support (substratum) et de substrat pour ce mode de croissance sessile. L'assimilation des HOC par la formation de biofilm est un comportement bactérien original encore très peu connu qui le différencie du modèle de biofilm se développant sur les surfaces inertes.

Ma thèse réalisée au sein de l'Equipe Environnement et Microbiologie de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux (UMR 5254), s'inscrivait dans le projet ANR Blanc 2011 AD'HOC dont l'objectif est de comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et physico-chimiques responsables de l'adhésion, la détection de l'interface et l'augmentation de la biodisponibilité des HOC au travers la formation de biofilm. La description de l'architecture tridimensionnelle et supramoléculaire de ces biofilms fait également partie intégrante de ce programme. L'ambition première est de mettre en exergue les aspects originaux de ces biofilms, qui jusqu'à présent n'ont été que très peu étudiés. Depuis les années 2000, *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, bactérie formant des biofilms monospécifiques sur une grande variété de supports hydrophobes nutritifs, a été choisi comme modèle d'étude dans le laboratoire. Dès lors, des études physiologiques ont mis en évidence le développement de biofilms de cette bactérie aux interfaces eau-HOC et des protéines intervenant potentiellement dans ce mode de vie ont d'ores et déjà été identifiées (**Chapitre I**). Plus récemment, des études transcripomiques sur différents HOC ont permis de compléter les études précédentes en identifiant les gènes intervenant possiblement dans les étapes précoces d'adhésion et de reconnaissance du statut nutritif de l'interface, et dans l'assimilation des HOC (**Chapitre I** et **Annexe 1**).

Mon travail consistait à améliorer la compréhension du processus d'adhésion et du fonctionnement des biofilms sur les HOC à travers la caractérisation fonctionnelle de 10 gènes candidats ciblés au cours des analyses d'expression en protéomique et en transcriptomique. Les résultats obtenus ont été répartis en trois chapitres. Le **Chapitre III** correspond à l'étude fonctionnelle de la protéine MARHY2686, l'une des protéines les plus abondantes détectée en protéomique en condition de biofilm sur *n*-hexadécane, et qui possède 36 % d'identité peptidique avec un composant des pompes d'efflux de type RND. Le **Chapitre IV** se focalise sur des gènes codants pour des composants de structures cellulaires protéiques, le flagelle et les pili de type IV, potentiellement impliquées dans les étapes précoces de formation de biofilm. Enfin, l'implication d'un système de sécrétion de type VI (T6SS) lors de la formation de biofilm a été étudiée (**Chapitre V**). Ce travail de recherche a pu être mené à bien grâce à l'utilisation, la mise au point et l'optimisation de protocoles décrits dans le **Chapitre II**.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le cycle du carbone en milieu marin

1.1. Le cycle du carbone dans les milieux océaniques

Dans les écosystèmes naturels, le carbone organique est synthétisé par les organismes autotrophes, qualifiés de producteurs primaires, qui transforment le CO₂ en matière organique via la photosynthèse. Les producteurs primaires en milieux terrestres sont principalement les plantes vasculaires, en milieux pélagiques ce sont les microorganismes phytoplanctoniques, alors que dans les zones côtières ou estuariennes ce sont des macrophytes, macroalgues et des microalgues benthiques (Figure I.1). Le phytoplancton est défini comme étant un groupe d'organismes photosynthétiques polyphylétiques de la colonne d'eau, généralement microscopique et unicellulaire qui piège le CO₂ dissous pour former de la matière organique dans la couche euphotique (50-100 premiers mètres de la colonne d'eau). Il comprend les microalgues (phytoplancton eucaryotes tels que les diatomés, dinoflagellées ...) et les cyanobactéries (bactéries photosynthétiques aérobies). Bien qu'il ne représente que 1 % de la biomasse photosynthétique planétaire, il est responsable de la moitié de la production primaire globale (Field et al., 1998; Lauro et al., 2009). Il a été estimé que la photosynthèse marine produit entre 20 et 240 x 10¹⁵ g de carbone organique chaque année (Middelburg et al., 1993). Une partie de la matière organique provient également d'apports terrestres, elle représenterait entre 0.4 et 0.9 x 10¹⁵ g de carbone par an, soit 1 % de la production totale annuelle (Middelburg et al., 1993; Griffith et al., 2012; Nebbioso and Piccolo, 2013). Contrairement aux systèmes terrestres où le carbone s'accumule dans les organismes à durée de vie longue (arbres), dans les océans le turnover du carbone est très rapide, et son accumulation dans les organismes vivants reste faible, seulement 1 % du carbone total (Kepkay, 2000).

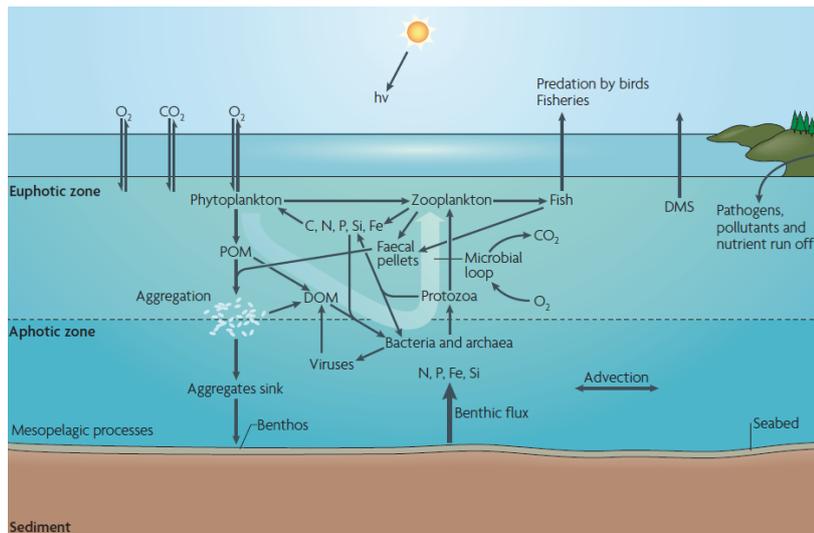


Figure I.1 : Le cycle de la matière organique (carbone organique) dans les océans (Azam and Malfatti, 2007). Une grande fraction de la matière organique synthétisée par les producteurs primaires se retrouve sous forme de matière organique dissoute. Celle-ci est principalement prise en charge par les bactéries qui vont respirer une partie en dioxyde de carbone et ré-introduire l'autre partie dans la chaîne alimentaire classique (phytoplancton-zooplancton-poissons). La matière organique particulaire peut rentrer dans la chaîne alimentaire classique mais également être prise en charge par la boucle microbienne. La matière organique qui a échappé à la biodégradation dans la colonne d'eau se retrouve dans les sédiments des fonds marins. Elle pourra soit être prise en charge par la communauté benthique soit séquestré pour des millions d'années. POM : Matière organique particulaire ; DOM : Matière organique dissous ; DMS : Diméthylsulphide.

Le carbone organique comprend des composés produits par les producteurs primaires et consommateurs qu'ils soient sécrétés ou non, ainsi que des produits de décomposition de ces organismes. Cette source de carbone et d'énergie peut se retrouver sous une grande variété de formes physiques : à l'état dissous, agrégée, adsorbée à de la matière inorganique ou encore sous forme d'organismes vivants. Le long de la colonne d'eau, ce carbone organique subit différentes séries de transformations par dissolution, désagrégation, minéralisation ou assimilation. Ces phénomènes expliqueraient pourquoi seulement 1 % de la matière organique produite au sein de la zone euphotique se retrouve dans le sédiment (Lee et al., 1998) et séquestré pour des millions d'années (Raven and Falkowski, 1999). Avant les années 70, la transformation de la matière organique était conceptualisée par un flux de carbone et d'énergie à travers une chaîne alimentaire simple et linéaire. Il était admis que l'échange carboné se faisait entre le phytoplancton, le zooplancton, puis les autres organismes supérieurs (Ryther, 1969). Cette vision de la chaîne trophique impliquait un recyclage de la matière organique par la prédation seulement, en omettant le devenir de la part soluble de la matière. Ce n'est qu'à partir des années 80 que les microorganismes et notamment les bactéries ont été reconnues pour leur implication dans la décomposition et la reminéralisation de la matière organique (Pomeroy et al., 2007) (Figure I.1). De par leur abondance (Whitman

et al., 1998; Stocker and Seymour, 2012), leur pouvoir d'adaptation, leurs capacités métaboliques et leur diversité génétique et biochimique, ils jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement du cycle du carbone et par conséquent dans le fonctionnement des écosystèmes marins. Ainsi, l'énergie et le carbone véhiculés via la boucle microbienne se retrouvent à la base de la chaîne alimentaire et vont être orientés vers les niveaux trophiques supérieurs (Figure I.1).

Dans les écosystèmes aquatiques, la majorité du carbone organique produit est dissout par le biais de différents processus au sein de la chaîne alimentaire (Druffel et Bauer, 2000). Cette part de la production primaire est exclusivement accessible par les bactéries hétérotrophes. Par ailleurs, l'autre partie de matière organique n'est pas dissoute dans l'eau. Ce réservoir de carbone comprend essentiellement des agrégats de molécules de haut poids moléculaire tels que des polysaccharides ou des protéines mais également des composés organiques hydrophobes (HOC) peu solubles voire insolubles dans l'eau tels que les lipides et les hydrocarbures. Cette classe particulière de la matière organique oblige les bactéries à adopter des stratégies comportementales et biochimiques afin d'accéder à cette source de carbone et d'énergie.

Dans ce mémoire, après un état des lieux des différentes sources et du devenir de la matière organique présente dans les écosystèmes marins, nous nous intéresserons plus particulièrement aux HOC, et notamment aux mécanismes adoptés par les bactéries pour les inclure dans le cycle du carbone dans les océans.

1.2. L'origine et le devenir de la matière organique dans l'océan

Dans les écosystèmes marins, la matière organique produite par la production primaire est communément divisée en deux catégories : la matière/carbone organique particulaire (POM/POC), et la matière/carbone organique dissoute(s) (DOM/DOC). Pour différencier ces deux catégories de matière organique, une séparation à travers des filtres de 0.1 à 0.45 μm de porosité est traditionnellement utilisée. Toutefois, cette séparation physique est arbitraire, car il existe un continuum entre le carbone organique réellement dissout, les phases colloïdales, les petites particules et pour finir les particules de tailles macroscopiques (Middelburg et al., 1993; Ogawa and Tanoue, 2003) (Figure I.2).

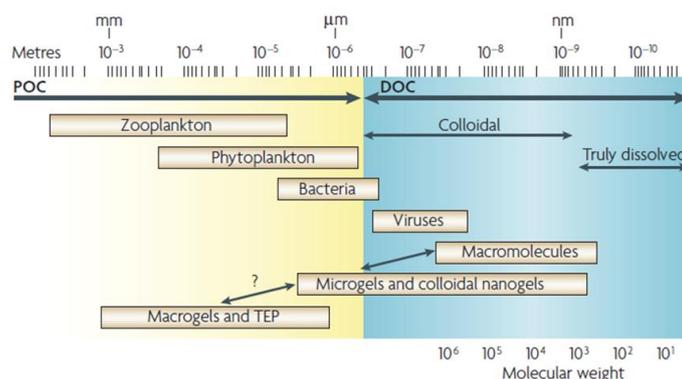


Figure I.2 : La distribution selon la taille de la matière organique dans les océans (Azam et Malfatti, 2007).

POC : Carbone organique particulaire ; DOM : Carbone organique dissous ; TEP : particules d'exopolymères transparentes.

1.2.1. Le carbone organique dissous (DOC), le carbone organique particulaire (POC) et leur recyclage

- Le carbone organique dissous

Le DOC est le plus grand réservoir de carbone organique dans l'océan. Il représente entre 500 et 1600 x 10¹⁵ g de carbone (Middelburg et al., 1993; Druffel and Bauer, 2000) avec un apport terrestre négligeable (inférieur à 5 %) (Opsahl and Benner, 1997). Comme abordé plus haut, le terme 'DOC' a été établi arbitrairement selon une séparation à travers un filtre. Ainsi, le terme 'DOC' ne désigne pas seulement la partie réellement dissoute dans le milieu marin, elle comprend aussi une partie colloïdale (Figure I.2). Pour la caractérisation chimique des DOC, les scientifiques divisent communément les DOC en deux fractions selon leur poids moléculaire : les LMW pour les molécules de faible poids moléculaire (< 1kDa), et les HMW pour les molécules de haut poids moléculaire (> 1kDa) (Ogawa and Tanoue, 2003; Sulzberger and Durisch-Kaiser, 2009; Nebbioso and Piccolo, 2013). Il est généralement admis que le DOC contient 25 à 50 % de protéines, 5 à 25 % de lipides et 40 % de polysaccharides (Nebbioso and Piccolo, 2013).

Depuis l'optimisation de la méthode de mesure des DOC par oxydation chimique en 1964, il a pu être observé que la concentration en DOC était plus élevée dans la zone supérieure de la colonne que dans la zone profonde. Cette découverte a permis de suggérer que le DOC est fourni par la production biologique à la surface de la colonne d'eau et qu'elle subit des étapes de dégradation le long de la colonne d'eau. Des données plus récentes ont

rapporté que la concentration en DOC à la surface de l'océan était comprise entre 60 et 80 μM alors qu'elle était de 40 μM en profondeur (Ogawa and Tanoue, 2003).

La partie réellement soluble dans l'eau est constituée de composés tels que des métabolites intermédiaires, des acides organiques, des monomères et des petits oligomères. Ils forment alors une seule phase avec l'eau. Avec un pourcentage compris entre 65 et 80 %, la majorité du DOC se retrouve sous forme LMW, mais elle paraît être résistante à la décomposition biologique. Cette fraction est dite réfractaire et représente la majorité du DOC séquestrée dans les profondeurs océaniques (Ogawa and Tanoue, 2003). Cette dernière ne contribue pas au cycle global du carbone mais joue un rôle potentiel dans la séquestration du carbone organique dans les océans et dans la régulation du réchauffement global climatique. Cependant, la nature chimique de ces composés n'a pas encore été clairement établie.

Bien que la fraction colloïdale ne représente que 20 à 40 % du DOC (Ogawa and Tanoue, 2003), elle est beaucoup plus bioréactive que la LMW. Les polysaccharides en sont un des éléments majeurs (Benner et al., 1992; Ogawa and Ogura, 1992; Kepkay, 2000). Une part non négligeable de colloïdes, soit 10 % de la matière organique présente en surface, s'auto-assemble par des liaisons hydrophobes et électrostatiques pour former des hydrogels de tailles variables allant de l'ordre du nm au μm . Ces nano- et micro-gels, constitués de protéines, lipides et polysaccharides (Chin et al., 1998), peuvent continuer à s'auto-assembler pour former des macrogels tels que les particules d'exopolymères transparentes (TEP) (Figure I.2). Le TEP est macroscopique, il fait partie de la fraction particulaire de la matière organique. Les hydrogels ainsi que le TEP, forment des microenvironnements privilégiés pour la colonisation par les microorganismes.

- Le carbone organique particulaire

Le réservoir de POC est moins important que le réservoir de DOC, il n'est cependant pas négligeable puisqu'il représente 6 à 30 $\times 10^{15}$ g de carbone (Middelburg et al., 1993).

Le terme POC englobe les organismes vivant ainsi que la fraction biodétritique. Ils possèdent un large spectre de tailles, formes, et de réactivités (Volkman and Tanoue, 2002). Les particules les plus fines, de 0.5 à 10 μm , comprennent les cellules microalgales, les cellules bactériennes, les virus, et les particules détritiques fines telles que les coccolites ou les squelettes des diatomées. Les particules comprises entre 10 et 100 μm incluent les microalgues les plus grosses telles que les diatomées, le zooplancton, des particules

détritiques mais également des particules fécales (Figure I.2). Enfin, les particules les plus grosses sont communément appelées ‘neige marine’ ou ‘marine snow’ en anglais (Volkman and Tanoue, 2002).

Les procaryotes sont ubiquitaires dans les environnements marins, ils représentent un total de 1.2×10^{29} cellules (Whitman et al., 1998). En plus de contribuer fortement à l’apport de matière organique sous forme particulaire, avec les virus et les protistes, ils sont essentiels pour initier la chaîne microbienne. En effet, le DOM produit par le phytoplancton est pris en charge par les bactéries, qui seront à leur tour broutées par les protistes et/ou infectées par les virus, puis recyclé en DOM. En moyenne, il a été estimé que chaque jour 10 à 20 % des cellules bactériennes hétérotrophes et 5 à 10 % de cyanobactéries sont détruites par lyse virale (Figure I.1) (Volkman and Tanoue, 2002). Les modèles suggèrent que 3 à 26 % de la production primaire dans les océans est recyclée en DOC par la lyse virale sous forme de composés plasmiques solubles et matériels membranaires (Volkman and Tanoue, 2002). De même, le broutage par les protistes intervient dans la dynamique du carbone. Cependant contrairement à la lyse cellulaire qui transfère le carbone vers la fraction dissoute, le broutage des protistes va essentiellement transférer la source de carbone vers le zooplancton puis vers les réseaux trophiques supérieurs.

D’un point de vue structural, les POC sont constitués de composés produits par les producteurs primaires tels que des pigments, des hydrocarbures, des lipides, des protéines et des polysaccharides. Wakeham et ses collègues, ont démontré que les protéines, les glucides et les lipides représentaient respectivement 67 %, 4 % et 15 % de la matière organique particulaire de surface (Wakeham et al., 2000). La chitine est le plus grand représentant du carbone organique particulaire et est souvent retrouvé dans la neige marine. C’est un biopolymère insoluble constitué d’une longue chaîne de N-acétylglucosamine, un dérivé du glucose. C’est un composant majeur des cuticules et des exosquelettes d’arthropodes et de mollusques ainsi qu’un élément essentiel de la paroi cellulaire de certaines algues (Keyhani et Roseman, 1999).

1.2.2. Les POC : sites privilégiés de l'activité bactérienne dans le milieu océanique

L'océan contient de faibles concentrations (du pM au nM) en nutriments qui sont soumis à des courants et des turbulences. Cependant, la concentration en nutriments dans les particules organiques peut excéder la concentration du milieu environnant (Stocker and Seymour, 2012). Le milieu océanique est un milieu hétérogène, avec un large spectre de niches particulières à coloniser ; le phytoplancton, les protistes, les animaux, les plantes aquatiques, les POC détritiques... Des études menées sur la distribution spatio-temporelle des bactéries ont montré que l'hétérogénéité de la distribution de matière organique allait de pair avec la distribution bactérienne de la colonne d'eau (Seymour et al., 2000). Les POC sont alors des sites de colonisations privilégiés des bactéries hétérotrophes, et par conséquent des « hotspots » de recyclage de la matière organique. En guise d'exemples, seules les niches créées par le phytoplancton et par les POC non vivants seront abordés.

- La phycosphère : une source importante de matière organique

Le phytoplancton exsude une large gamme de composés organiques pendant sa croissance, tels que des sucres, des acides aminés, des lipides, des hydrocarbures (Mykkestad, 1995; Raja et al., 2008; Matsunaga et al., 2009; Qin, 2010). Il en résulte un microenvironnement favorable pour une colonisation par des bactéries hétérotrophes. De nombreuses études ont mis en évidence l'importance des exsudats de microalgues pour la croissance des bactéries (Sapp et al., 2007; Amin et al., 2009). Ainsi, le concept de 'phycosphère' a été proposé pour définir le volume entourant les microalgues, occupé par les bactéries qui utilisent les exsudats des algues comme source de carbone et d'énergie (Sapp et al., 2007). Cette phycosphère est considérée comme un microenvironnement distinct de celui de l'eau de mer, de par la forte concentration en composés organiques qui s'y trouve. Une relation étroite entre le phytoplancton et le bactérioplancton apparaît, qui peut aller de la syntrophie au parasitisme. Alors que l'algue fournit un environnement riche en matière organique, les bactéries de la phycosphère peuvent stimuler la croissance des algues en leur fournissant en fer (Amin et al., 2009) ou en vitamine B12 (Croft et al., 2005). Elles peuvent également provoquer la lyse cellulaire des algues (Fukami et al., 1991).

- La matière organique particulaire morte

Les bactéries hétérotrophes marines exploitent le POC non vivant tels que les particules détritiques, les particules fécales, les particules colloïdales et la neige marine. Ce sont des sites privilégiés pour la croissance bactérienne en raison de leur forte concentration en matière organique, qui peut être de 2 à 4 fois supérieure à celle de la colonne d'eau environnante dans le cas de la neige marine (Stocker, 2012; Stocker and Seymour, 2012). Les bactéries utilisent un large panel d'ecto- ou exo-hydrolases attachées à leur surface telles que des protéases, lipases, chitinases, en vue d'hydrolyser les POC en DOC assimilables.

1.2.3. Les composés organiques hydrophobes de la matière organique particulaire

Les composés organiques hydrophobes (HOC) englobent une grande variété de molécules incluant les terpènes, les lipides, les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, et certains xénobiotiques tels que des pesticides, des solvants chlorés et des polychlorobiphényles (PCBs). Les HOC forment une famille de composés que l'on retrouve dans tous les écosystèmes où ils constituent une part importante de la matière organique. Les hydrocarbures et les lipides sont les deux familles de composés les plus représentatifs des HOC en milieu océanique, c'est pourquoi dans le présent mémoire, je vais plus particulièrement m'intéresser à ces deux types de molécules. Du fait de leur caractère hydrophobe ils représentent une part non négligeable du POC, et donc un site privilégié pour la croissance bactérienne.

- Les lipides

Les lipides jouent de nombreux rôles dans les organismes vivants. Ils sont très largement distribués, que ce soit dans le règne animal, végétal ou chez les microorganismes. Les lipides sont des molécules principalement constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et peuvent être classés en deux catégories : les lipides non polaires tels que les acylglycérols, stérols, acides gras, cires, et les lipides polaires comme les phosphoglycérides et les glycérides glycosilés. Les lipides polaires et les stérols ont un rôle structural membranaire primordial, et jouent un rôle de barrière cellulaire. Les lipides non polaires tels que les triglycérides et les cires, représentent des formes de stockage d'énergies et sont facilement catabolisables pour fournir de l'énergie (Guschina and Harwood, 2009).

Dans le milieu marin, on trouve une grande diversité de lipides aussi bien dans les sédiments que dans la colonne d'eau. Ils proviennent de la synthèse d'exsudats par le

phytoplancton, mais également de la sénescence des microorganismes vivants. Il a été estimé que les lipides représentent entre 25 et 40 % du carbone organique particulaire (Cunliffe et al., 2013 ; Nebbioso et Piccolo, 2013).

- Les hydrocarbures

Les hydrocarbures sont composés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène de formule brute du type C_nH_m , et se trouvent sous différentes formes chimiques. L'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) les classe en deux familles de composés : les hydrocarbures aliphatiques saturés ou insaturés, et les hydrocarbures aromatiques. Les hydrocarbures saturés englobent les alcanes linéaires, aussi appelés *n*-alcanes, de formule brute C_nH_{2n+2} , les alcanes ramifiés pouvant porter un ou plusieurs groupes méthyles ainsi que les cycloalcanes possédant un ou plusieurs cycles de formule brute C_nH_{2n} (Harayama et al., 1999). Dans le groupe des hydrocarbures insaturés on retrouve les alcènes, possédant une ou plusieurs doubles liaisons, et les alcynes, possédant une ou plusieurs triple liaisons. Les hydrocarbures monoaromatiques, contiennent un seul noyau benzénique, et rassemblent le benzène, toluène, éthylbenzène et xylène et sont regroupés sous le terme BTEX. Ils sont connus pour leur caractère toxique et cancérigène (Reineke et al., 2006; Paixoa et al., 2007). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) contiennent deux ou plusieurs noyaux aromatiques fusionnés.

La majeure partie de l'apport en hydrocarbures dans les milieux océaniques provient de suintements naturels de gisements pétroliers. Cet apport représente 47 % des hydrocarbures pétroliers présents dans les milieux marins. En effet, la matière organique principalement d'origine végétale enfouie dans les couches sédimentaires depuis plusieurs millions d'années, est soumise à des processus biologiques de maturation particuliers (diagénèse, catagénèse, métagénèse) et à de fortes températures et fortes pressions qui donnent naissance au pétrole et au gaz naturel. Ces hydrocarbures d'origine diagénétique d'une densité plus faible que la couche rocheuse environnante s'échappent vers la surface via des pores et des failles de la croûte terrestre et donnent lieu à des suintements naturels sous forme liquide et gazeuse. Une plus faible partie des hydrocarbures d'origine naturelle est synthétisée par de nombreux organismes vivants terrestres et marins. Chaque année, 500 à 600 x 10¹² g de méthane sont produits par des organismes vivants, majoritairement par des microorganismes (McInerney et al., 2010), et à moindre titre par des plantes supérieures (Keppler et al., 2006). Outre le méthane, Ladygina et ses collègues ont démontré que les bactéries étaient capables de

synthétiser un large spectre d'hydrocarbures allant de 10 à 33 atomes de carbone, ainsi que des hydrocarbures ramifiés tels que le pristane et le phytane dans le cas des bactéries phototrophes (Ladygina et al., 2006). Par ailleurs, ils ont également démontré que les microorganismes étaient capables d'excréter des alcanes à longue chaîne (C₁₄-C₂₅) ainsi que des hydrocarbures volatils comme l'éthane, le méthane, l'éthylène ou le propane. Les algues synthétisent des alcanes et alcènes linéaires avec une prédominance pour des *n*-C₁₅, *n*-C₁₇ et *n*-C₂₁ (Raja et al., 2008; Matsunaga et al., 2009; Qin, 2010). Enfin, les hydrocarbures synthétisés par les plantes supérieures peuvent également se retrouver dans les milieux marins par lessivage. Il s'agit par exemple de composés aromatiques ainsi que d'alcanes qui entrent dans la constitution des cires cuticulaires présentes à la surface des feuilles en vue d'une protection contre la dessiccation

Cependant, les hydrocarbures présents dans les milieux marins peuvent également avoir une origine anthropique. La pollution aux hydrocarbures des écosystèmes est due en partie à des pollutions d'origines accidentelles (marées noires), mais surtout à des rejets chroniques et d'origines multiples : rejets industriels et urbains, lixiviats, apports agricoles, combustion de carburants. Les hydrocarbures synthétisés en milieu terrestre se retrouvent dans les milieux aquatiques suite au lessivage des sols par les eaux de pluie (Farrington et Meyers, 1974). En 2002, le National Research Council a estimé que l'apport total de pétrole dans le milieu marin est de 1.3 milliards de tonnes par an.

Les hydrocarbures pétroliers déversés dans les écosystèmes marins sont soumis à des processus physiques, chimiques et biologiques qui conduisent à la transformation partielle ou complète des hydrocarbures. Alors que les processus physico-chimiques jouent un rôle de transfert, de dispersion des hydrocarbures, la dégradation biologique (biodégradation) (McGenity et al., 2012) conduit à leur élimination totale par oxydation des composés en CO₂. Cette biodégradation des hydrocarbures est effectuée par des bactéries hétérotrophes spécialisées de la colonne d'eau et des sédiments marins.

1.3. Biodégradation des HOC par des bactéries hétérotrophes spécialisées

Comme énoncé précédemment, les HOC constituent une part significative du POC. Dans ce contexte, la dégradation des HOC par les bactéries prend une importance particulière puisque le recyclage du carbone contenu dans les HOC dépend de la capacité des bactéries à assimiler ces composés. Cependant, le facteur principal limitant la biodégradation est la biodisponibilité du HOC. Ce facteur est régi essentiellement par le transfert des composés de

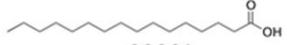
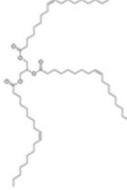
la phase organique hydrophobe vers la cellule (transfert de masse) et le potentiel métabolique des microorganismes (Haritash and Kaushik, 2009). La caractérisation biochimique et génétique de souches capables de dégrader les HOC a permis d'élucider les voies cataboliques et d'identifier les gènes codant pour les enzymes de ces voies. Une présentation non exhaustive de ces mécanismes est présentée dans la section 1.3.4. Au contraire, les connaissances des processus permettant aux bactéries de s'affranchir de la faible solubilité des HOC dans l'eau sont beaucoup moins vastes.

1.3.1. Problème de biodisponibilité des HOC

- Solubilité des HOC dans l'eau

Les HOC ont la particularité d'être hydrophobes. Cette caractéristique physique est due au fait que ces composés sont apolaires, et qu'ils ne peuvent pas former de liaisons hydrogène avec l'eau. Ils sont alors peu solubles voire très peu solubles dans l'eau mais auront une forte affinité pour les milieux ou les surfaces apolaires. La solubilité dans l'eau dépend de la masse moléculaire et de la structure chimique du composé considéré. En effet, cette caractéristique physique dépend du nombre de carbone, groupements fonctionnels, de cycles, d'insaturations et de ramifications dans la chaîne carbonée (Bocard, 2006; Wilkes and Schwarzbauer, 2010). Plus le nombre de carbone est grand et plus la solubilité dans l'eau décroît. Pour un même nombre d'atomes de carbone, la solubilité augmente s'il y a un ou plusieurs groupements fonctionnels. De même, les cycles, les insaturations et les ramifications augmentent la solubilité dans l'eau. Ainsi, à titre d'exemple, la solubilité des cycloalcanes, alcènes, et cycloalcènes est légèrement plus élevée que celle des hydrocarbures saturés de même poids moléculaire, ce qui reflète la légère différence de polarité entre ces composés. Le Tableau I.1 présente des exemples de solubilité de certains HOC. La solubilité dépend également de paramètres physico-chimiques, à savoir la pression, la température et la salinité (Wilkes and Schwarzbauer, 2010). En effet, pour un HOC donné, la solubilité a tendance à augmenter avec la température et la pression, alors qu'elle diminue avec la salinité. Ainsi, la solubilité des HOC dans l'eau de mer est plus faible que dans de l'eau douce. En revanche, lorsqu'un mélange d'hydrocarbures est en contact avec de l'eau, la quantité totale solubilisée n'est pas égale à la somme des solubilités de chacun des hydrocarbures purs. En effet, dans un mélange, la portion solubilisée de chaque constituant est inférieure à celle déterminée pour l'hydrocarbure pur (Bocard, 2006).

Tableau I.1 : LogKow, toxicité et solubilité de différents HOC dans de l'eau milliQ à 25 °C (d'après Heipieper and Martínez, 2010).

Composé Organique Hydrophobe	Formule Chimique	Solubilité dans l'eau (mg/L)	logKow	Toxicité
Benzène		23.0	2.13	+
Toluène		6.3	2.48	+
Naphtalène		3.30	0.240	-
Phenanthrene		0.006	4.46	-
n-Hexane		0.150	3.29	-
n-Decane		0.00035	5.61	-
Hexadécane		0.0000009	9.1	-
Acide palmitique		nulle	6.80	-
Trioléine		nulle	6	-

Le caractère hydrophobe d'un composé organique est souvent appréhendé par la valeur de son coefficient de partage entre l'octanol (phase modèle choisie pour mimer les compartiment lipophiles) et l'eau qui se décrit par le $\log K_{ow}$ qui correspond au $\log (C_{oct}/C_{eau})$ où C_{oct} est la concentration du composé dans l'octanol et C_{eau} sa concentration dans l'eau. Plus ce coefficient de partition est important, plus son hydrophobicité est importante. Lorsque $\log K_{ow} > 1$, le composé est dit hydrophobe. Les alcanes sont les HOC les plus hydrophobes avec par exemple un $\log K_{ow}$ de 5,61 pour le décane ($C_{10}H_{22}$), de 9,1 pour l'hexadécane ($C_{16}H_{34}$) (Tableau I.1). En conséquence, l'hydrophobicité a des répercussions sur le devenir des HOC dans les milieux naturels. Ils sont soit faiblement dissous dans la phase aqueuse, soit adsorbés sur des particules organiques ou minérales. S'ils sont présents en grandes quantités dans l'eau, les HOC forment des gouttelettes, créant ainsi une phase liquide non aqueuse (NALP, non aqueous liquid phase). Les molécules les plus hydrophobes seront retrouvées en grande partie adsorbées ou dans la NAPL.

- Concept de biodisponibilité

Le terme 'biodisponibilité' est utilisé par de nombreux scientifiques de différentes spécialités qui étudient l'interaction étroite entre les organismes vivants et les contaminants. Par conséquent, dans la littérature scientifique d'innombrables définitions du terme apparaissent avec des degrés de complexité variable, ce qui entraîne confusion et ambiguïté au sein de la communauté scientifique. Semple et al. (2004) se sont donc efforcés de donner une définition générale en définissant un composé biodisponible comme étant un composé capable de passer du milieu environnant vers le cytoplasme en traversant la membrane cellulaire à un instant t (Semple et al., 2004).

Dans le contexte de la biodégradation de HOC, le concept de biodisponibilité repose sur le postulat qu'une bactérie ne peut assimiler une molécule que si elle est solubilisée dans la phase aqueuse (Harms et al., 2010a). Un substrat n'est biodisponible que s'il est directement absorbable, c'est-à-dire solubilisé dans l'eau et directement accessible pour le transport à travers les enveloppes cellulaires. Cependant, dans les environnements naturels, du fait de leur hydrophobicité, les HOC sont adsorbés à la surface des particules non solubles, ou bien regroupés dans des phases solides ou liquides non aqueuses et seule une infime partie est dissoute dans la phase aqueuse.

Ainsi, la biodisponibilité des HOC pour les bactéries est limitée par deux principaux facteurs : le transfert de masse de la molécule de la phase organique hydrophobe (source) vers la cellule (le puits) et l'assimilation de cette molécule par la bactérie (Figure I.3). La première étape du transfert de masse consiste en des processus de désorption et solubilisation du composé dans la couche limite (couches d'eau stagnante entourant les particules ou les gouttelettes de HOC). Elle dépend de la concentration en cette molécule à l'interface eau-HOC, ainsi que de sa solubilité dans l'eau. Une fois le HOC dissout, il va diffuser à travers la couche limite selon la première loi de diffusion de Fick, générant ainsi un gradient de concentration, pour se retrouver dans la phase aqueuse libre où en raison des mouvements de convection du milieu sa concentration est homogène. Enfin, avant d'être pris en charge par la cellule bactérienne, il va devoir diffuser à travers la couche limite de la bactérie. Le taux de diffusion décrit par la loi de Fick dépend du coefficient de diffusion du composé et donc des propriétés physico-chimiques du composé (solubilité dans l'eau), de la surface d'échange, de la distance de diffusion séparant la bactérie de l'interface eau-HOC et de l'intensité du gradient de concentration qui se crée dans la couche limite selon le potentiel métabolique bactérien (Harms et al., 2010a). Pour ce qui est de l'assimilation, elle dépend de l'adsorption

et/ou absorption du substrat au niveau des constituants extracellulaires de la bactérie, de son transport au niveau de la membrane et de la capacité catabolique cellulaire (Köster and Leeuwen, 2004; Harms et al., 2010a).

D'un point de vue dynamique, la biodisponibilité est décrite par le rapport entre le taux de transfert de masse du substrat vers la surface de la cellule et le taux d'assimilation de la cellule. Si le taux de transfert de masse est supérieur au taux d'assimilation, le composé est dit biodisponible. Le processus global de biodégradation est alors contrôlé par les capacités de transport et métaboliques de la cellule. Or, dans le cas de la dégradation des HOC, le taux de transfert de masse d'un composé est le facteur limitant biodégradation, ce qui les rend faiblement biodisponibles (Johnsen et al., 2005; Semple et al., 2007). Cependant, certaines bactéries sont capables d'augmenter la faible biodisponibilité des HOC pour les dégrader à un taux beaucoup plus rapide que celui suggéré par leur taux de transfert de masse théorique.

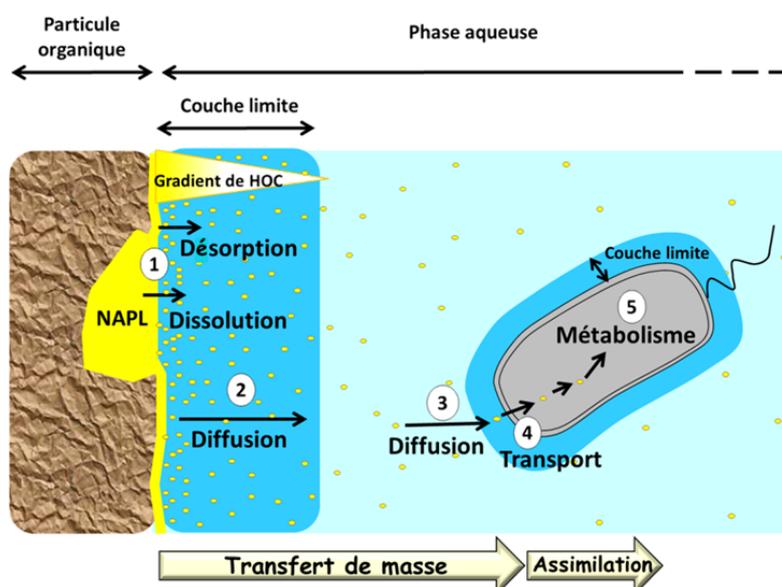


Figure I.3 : Processus de biodégradation des HOC et le concept de biodisponibilité.

1) Désorption et dissolution du HOC adsorbé sur une particule organique ou dissous dans une NAPL. 2) Diffusion à travers la couche limite entourant la particule. 3) Diffusion dans le milieu aqueux puis à travers la couche limite entourant la bactérie. 4) Capture et transport à travers les enveloppes cellulaires. 5) Métabolisme. Etapes 1 à 3 : transfert de masse du HOC vers la cellule. Etapes 4 et 5 : assimilation du HOC par la bactérie.

1.3.2. Les bactéries hydrocarbonoclastes (HCB)

Les risques pour les écosystèmes et la santé humaine ont motivé les efforts de recherche vers la compréhension de la dégradation des polluants par les bactéries. En 1946, Zobell a mis en évidence l'existence des bactéries utilisant les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie (Zobell, 1946). Depuis, de nombreuses souches dégradant divers types de HOC ont été isolées. Plus de 500 espèces de bactéries, cyanobactéries, mais aussi

d'algues et de champignons ont été isolées et décrites comme étant des microorganismes capables de dégrader des hydrocarbures (Prince et al., 2003; van Beilen et al., 2003; Head et al., 2006). Parmi les nombreuses bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures, un groupe taxonomiquement et physiologiquement nouveau a été identifié : les bactéries marines hydrocarbonoclastes (HCB), hautement spécialisées dans la dégradation d'hydrocarbures. Contrairement aux bactéries du sol dégradant les hydrocarbures qui sont capables d'utiliser un large spectre de substrats organiques, ce groupe utilise essentiellement les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ce sont des bactéries à Gram négatif, capables de pousser à des concentrations en NaCl entre 0.08 et 3.5 M (Golyshin et al., 2003). Les analyses des séquences de gènes de l'ARNr 16S (Acide Ribonucléique ribosomique) ont révélé que ces bactéries HCB sont affiliées essentiellement à la classe des Gammaprotéobactéria, et appartiennent à de nouveaux genres tels que *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus*, et *Oleispira* (Yakimov et al., 2007). Certaines réalisent une dégradation complète, le polluant est alors converti en CO₂ et en biomasse. D'autres dégradent seulement partiellement la molécule en composés plus ou moins toxiques qui peuvent être dégradés par d'autres microorganismes.

Les bactéries hydrocarbonoclastes occupent une niche trophique particulière parmi les bactéries hétérotrophes. Elles participent au cycle global du carbone dans les milieux marins en dégradant les hydrocarbures non utilisables par la plupart des bactéries. Ces bactéries possèdent des caractéristiques inhabituelles reflétant leur mode de vie peu commun, hautement spécialisé dans la dégradation d'hydrocarbures. En guise d'exemple, l'analyse du génome de la bactérie HCB modèle *Alcanivorax borkumensis* SK2, a révélé un large répertoire de déterminants génétiques impliqués dans la capture de substances minérales, comme l'azote et le phosphore, qui permettrait l'adaptation aux déséquilibres des rapports carbone/azote et carbone/phosphore qui surviennent lors d'un apport massif de carbone sous forme d'hydrocarbures (Yakimov et al., 2007). Cette capacité génétique expliquerait alors pourquoi des souches du genre *Alcanivorax* deviennent rapidement prédominantes lors d'un déversement massif d'hydrocarbures alors qu'elle est présente en faible quantité dans les eaux marines non polluées par les hydrocarbures.

La capacité des bactéries HCB à augmenter la faible biodisponibilité des hydrocarbures est une autre propriété critique pour leur prolifération dans les milieux marins pollués. En effet, bien que ces bactéries présentent les capacités métaboliques nécessaires leur permettant de dégrader les hydrocarbures, la biodisponibilité de ces substrats dépend aussi de

leur transfert de masse. Ainsi, les bactéries possèdent des stratégies pour augmenter le transfert de masse des HOC, de la phase organique vers la phase aqueuse. Pour connaître les stratégies ainsi évoquées se référer à la partie 2 de ce chapitre.

1.3.3. Stratégies développées par les bactéries hydrocarbonoclastes pour survivre à la toxicité des HOC

Un des questionnements très intéressants soulevé par l'utilisation des HOC comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes, est la manière dont ceux-ci arrivent à concilier croissance et toxicité des HOC. En effet, les HOC sont des composés hydrophobes et donc très lipophiles, par conséquent, ils sont capables de diffuser passivement à travers la membrane interne des bactéries et d'entraîner différents types de perturbations cellulaires. C'est pourquoi, les cellules capables de biotransformer ces molécules toxiques sont soumises à deux impératifs ; elles doivent assimiler assez de HOC pour assurer leur croissance, mais en même temps elles doivent limiter la concentration intracellulaire en composés à un niveau non toxique.

La fonction principale des membranes bactériennes est de former une barrière sélective en régulant le passage des solutés entre la cellule et le milieu extérieur environnant. Cette barrière permet de garder les métabolites essentiels dans le cytoplasme, de faire entrer les nutriments et d'empêcher l'entrée de certains solutés présents dans l'environnement. Ainsi, la flexibilité et la capacité d'adaptation de la membrane aux attaques néfastes environnementales déterminent la capacité de la bactérie à survivre à différents habitats et conditions environnantes. Chez les bactéries à Gram négatif, contrairement à la membrane externe, la membrane cytoplasmique est perméable à l'entrée des HOC. Elle est constituée d'une matrice phospholipidique dans laquelle sont incluses des enzymes et des protéines de transport et agit comme barrière pour les molécules polaires et chargées alors qu'elle laisse les composés lipophiles diffuser (Segura et al., 2010). L'interaction entre les composés hydrophobes et la bicouche phospholipidique entraîne des désorganisations structurales et fonctionnelles dramatiques des membranes plasmiques. En effet, les molécules lipophiles peuvent perturber les interactions entre les chaînes carbonées des phospholipides à l'origine d'une modification de la fluidité membranaire et par conséquent d'une perte de l'intégrité membranaire. L'étendue des effets toxiques est intimement liée à la concentration en composés lipophiles accumulés dans la membrane, et au type d'interactions qu'ils créent avec les composants membranaires (Sikkema et al., 1995; Mrozik et al., 2004). Cette perte

d'intégrité peut avoir deux effets dramatiques pour la survie des cellules bactériennes. D'une part, un déséquilibre dans le maintien du statut énergétique cellulaire apparaît. Il a été observé non seulement que l'augmentation de la perméabilité membranaire entraînait des fuites de molécules d'ATP, de protéines, d'ARN (Heipieper et al., 1991, 1994) mais également une dissipation d'ions et *in fine* une diminution des gradients ioniques. D'autre part, les interactions entre les phospholipides et les protéines membranaires sont déstabilisées. Cela entraînerait une mauvaise configuration conformationnelle des protéines membranaires qui ont des rôles clés dans la synthèse d'ATP, le transport, la transduction du signal, à l'origine d'une diminution des fonctions biologiques cellulaires.

La concentration d'un HOC dans la membrane dépend de son hydrophobicité mesurée par le $\log K_{ow}$. Une relation entre $\log K_{ow}$ du HOC et son accumulation dans la membrane plasmique a été établie par Sikkema et ses collègues (Sikkema et al., 1994). Les substances avec un $\log K_{ow}$ compris entre 1 et 4 sont généralement toxiques pour les cellules (Tableau I.1). Toutefois, la relation entre la toxicité et l'hydrophobicité du composé n'est valable que pour des $\log K_{ow}$ allant jusqu'aux alentours de 4. A plus forte hydrophobicité, le concept de biodisponibilité est mis en jeu. Du fait de leur faible solubilité dans l'eau, les HOC tels que les alcanes et les PAH, ne sont pas assez biodisponibles pour atteindre la concentration toxique (Heipieper and Martínez, 2010) (Tableau I.1). Cependant, il a été observé à plusieurs reprises que lors de la biodégradation de ces composés très hydrophobes des intermédiaires de dégradation s'accumulent dans la membrane et entraînent une toxicité (Chen, et al., 1995a; Chen, et al., 1995b; Heipieper et al., 1995).

Les études menées jusqu'à maintenant ont démontré que les bactéries possèdent une grande capacité à s'adapter aux effets néfastes des polluants hydrophobes. Les adaptations de défense mises en œuvre par les bactéries vont de la modification de l'enveloppe cellulaire à une évacuation de polluants toxiques par des systèmes de transport actif.

- Modification de la composition membranaire

La capacité que les bactéries ont à s'adapter aux changements de fluidité membranaire dus aux facteurs environnementaux s'appelle « l'adaptation homéovisqueuse ». Qu'elle soit due à un changement de température, de pH ou à la présence de composés toxiques comme les HOC, cette adaptation est obtenue par un changement dans la composition des acides gras de la bicouche phospholipidique. Les facteurs principaux affectant la fluidité membranaire

sont : les variations dans la longueur des acides gras, dans le degré d'insaturation, et dans le rapport cis/trans des acides gras insaturés (Heipieper et al., 2010b; Segura et al., 2010). Chez *Vibrio* et *Pseudomonas*, une augmentation de l'isomérisation des acides gras insaturés cis vers la configuration trans a été détectée en présence de phénols (Heipieper et al., 1992, 1994; Segura et al., 2010). Contrairement à la configuration cis qui entraîne une légère courbure de la chaîne carbonée à l'origine d'une plus forte fluidité de la bicouche phospholipidique, la configuration trans permet un réarrangement plus ordonné de la membrane et donc une accumulation moins importante des composés toxiques. De plus, en présence de composés tels que le benzène, il a été démontré qu'il y avait un enrichissement en acides gras saturés par rapport aux acides gras insaturés et une augmentation en phospholipides totaux (Sikkema et al., 1995). Ce processus pourrait s'expliquer par le fait que les acides gras saturés entraînent un degré d'ordre plus élevé et empêcheraient de ce fait une diffusion massive à travers la membrane plasmique.

- Les pompes d'efflux de type RND : une stratégie efficace pour maintenir une concentration en HOC tolérable

L'expulsion active des HOC est le mécanisme qui apporte la plus grande contribution dans la tolérance contre les effets toxiques des HOC (Krell et al., 2010).

Les pompes d'efflux sont des transporteurs ubiquitaires et largement représentés dans le monde bactérien qui permettent d'exporter de manière active certaines molécules du milieu intracellulaire vers l'extérieur. Les gènes codant les protéines de pompe d'efflux sont le plus souvent organisés en opéron, comprenant le régulateur transcriptionnel et les composants de la pompe (Schweizer, 2003). D'un point de vue physiologique, les bactéries utilisent ces pompes comme des mécanismes de détoxification et de défense vis-à-vis des composés toxiques environnementaux qui s'accumuleraient dans la cellule en vue de maintenir l'homéostasie cellulaire. Parmi les composés toxiques qu'elles excrètent on retrouve des métaux lourds, des solvants, des détergents, des solvants organiques, des antibiotiques, des molécules antimicrobiennes... Il est également admis que ces pompes d'efflux participent à l'élimination des métabolites endogènes qui seraient toxiques pour la bactérie, ou à l'excrétion de produits cellulaires (acides gras, toxines, autoinducteurs du Quorum Sensing...) (Li and Nikaido, 2004, 2009; Kumar and Schweizer, 2005; Martinez et al., 2009; Lennen et al., 2011, 2013). La présence de ces systèmes de pompe d'efflux aux rôles physiologiques très vastes permet aux bactéries de survivre dans différents types de milieux plus ou moins

contaminés, de coloniser de organismes vivants (plantes, cellules humaines...), d'entamer des processus de pathogénie (Martinez et al., 2009)...

Il existe 5 grandes familles de pompes d'efflux regroupés en deux superfamilles : la superfamille des ABC (ATP-binding-cassette) transporteurs, qui sont des transporteurs qualifiés de primaires puisqu'ils utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse d'ATP pour fonctionner, et la superfamille des transporteurs qui utilisent le potentiel électrochimique membranaire (gradient de protons ou de sodium). Dans cette dernière on classe les pompes des types SMR (Small Multidrug Resistance, MFS (Major Facilitator Superfamily), RND (Resistance/Nodulation/cell Division) et MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) (Kumar and Schweizer, 2005; Martinez et al., 2009).

Les pompes d'efflux impliqués dans l'excrétion des HOC découvertes jusqu'à maintenant appartiennent au transport de type RND. Plusieurs membres de cette famille de transporteurs sont impliqués dans la détoxification cellulaire vis-à-vis des antibiotiques et cette famille de transporteurs a été associée au phénotype de résistance multiple aux antibiotiques, dénommé MDR (Multi Drug Resistance). Du fait des enjeux importants des MDR dans le domaine médical, la majorité des études menées sur les pompes d'efflux de type RND se sont focalisées sur les mécanismes fonctionnels et physiologiques de la fonction d'exportation active d'antibiotiques. Toutefois, il est admis que l'exportation active des antibiotiques et des HOC se faisait de manière analogue (Krell et al., 2010).

Pour comprendre l'organisation et le fonctionnement des pompes d'efflux, des études de mutagenèse dirigée (Aires et al., 2002), de protéines chimériques (Elkins and Nikaido, 2002), et de reconstitution in vitro (Aires and Nikaido, 2005) ont été menées. Plus récemment, la structure tridimensionnelle d'un transporteur protéique a été obtenue par cristallographie (Li and Nikaido, 2009). La compilation de tous ces résultats a permis de montrer que les pompes d'efflux de type RND sont tripartites, c'est-à-dire constituées de trois composants protéiques : un composant de la membrane interne relié au composant de la membrane externe par un adaptateur protéique. Le prototype des pompes à efflux de type RND a été caractérisé chez *E. coli* avec le système AcrAB-TolC : AcrA étant l'adaptateur périplasmique (ou MFP pour « membrane fusion protéin »), AcrB la protéine de la membrane interne (appelé aussi transporteur RND) et TolC la protéine de la membrane externe (OMP pour « outer membrane protein ») (Figure I.4). Cette pompe avait été initialement décrite comme un transporteur de l'antiseptique acriflavine, d'où le nom Acr, mais il s'est avéré par la suite qu'elle excrétaient un large spectre de substrats (Nikaido, 1998). Les études sur ce système d'*E.*

coli ont permis de faire un pas en avant dans la compréhension structurale et fonctionnelle des systèmes de type RND.

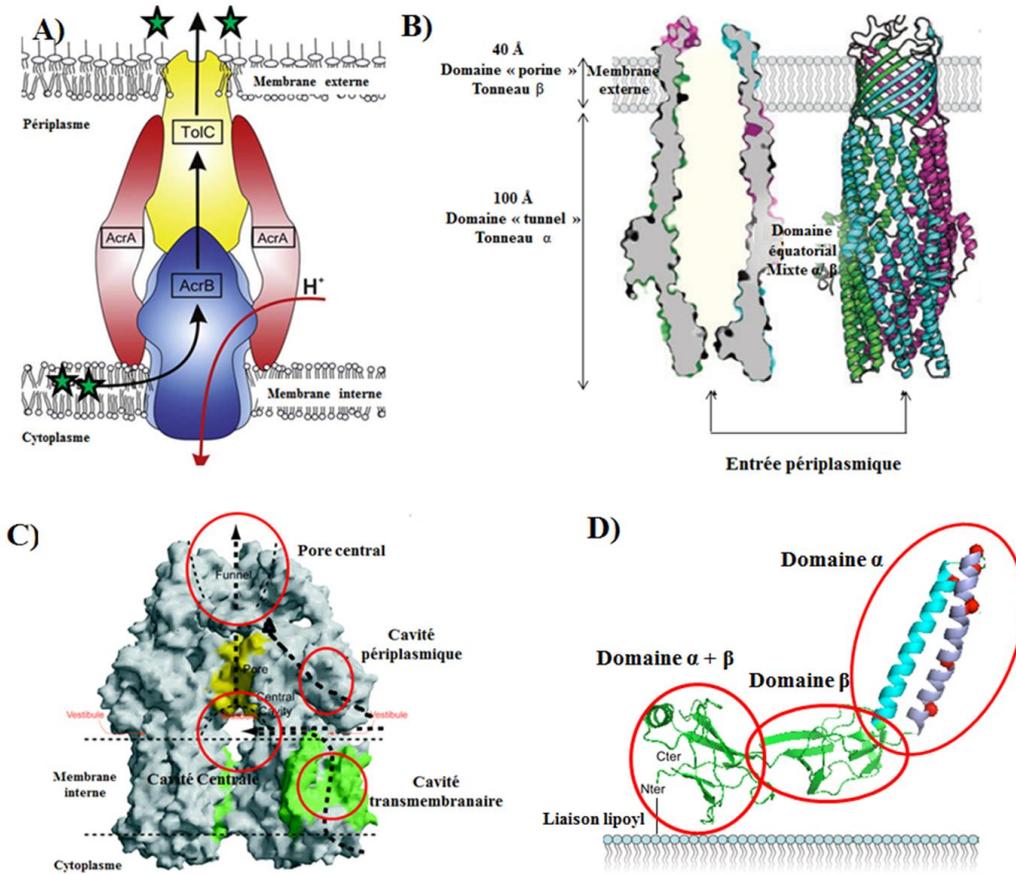


Figure I.4 : Organisation des systèmes de pompe d'efflux de type RND (Murakami and Yamaguchi, 2003; Pos, 2009; Hinchliffe et al., 2013).

A) Schéma représentant la pompe à efflux de type RND AcrAB-TolC d'*E.coli* ; les composés toxiques pris en charge par la pompe sont représentés par une étoile. B) Représentation transversale (à gauche) et structure en rubans (à droite) de TolC. C) Coupe transversale de la protéine AcrB ; les cavités d'interaction avec le composé sont entourées par un cercle rouge ; les voies hypothétiques du composé à travers AcrB sont représentées par des flèches en pointillées. D) Structure en rubans du monomère AcrA ; les trois domaines sont entourés par un cercle rouge.

Pour comprendre l'assemblage des pompes d'efflux de type RND, la première démarche à suivre était d'établir la structure de chacun des composants. La protéine TolC composée de 471 acides aminés, est une porine homotrimerique insérée dans la membrane externe et qui forme un canal qui se prolonge dans le périplasma (Figure I.4). La partie membranaire possède une structure en tonneau de 40 Å de long constituée de 12 brins β (4 brins par monomère) qui est ouverte constitutivement vers le milieu extérieur. Le domaine périplasmique s'organise en un tonneau allongé de 12 hélices α (4 par monomère) antiparallèles qui lui permet d'établir la connexion avec la membrane interne. Au niveau de l'entrée périplasmique de la protéine TolC, un anneau formé de résidus aspartate rétrécissent

le diamètre du pore à 3.9 Å, rendant le passage de substrats impossible. Il a été supposé que les deux autres partenaires soient nécessaires pour induire l'ouverture. Les extrémités N et C terminales de chaque monomère de conformation α/β forment le domaine équatorial qui est le site de fixation de la protéine de fusion périplasmique AcrA. La protéine AcrB est homotrimérique et possède trois domaines : un « domaine transmembranaire » inséré dans la membrane interne d'environ 50 Å de longueur, et deux domaines périplasmiques de 70 Å de long appelés « domaine d'amarrage pour TolC » et « domaine du pore » (Figure I.4). Le domaine transmembranaire possède 36 hélices α (12 hélices pour chaque protomère) et possède une cavité centrale ouverte vers le cytoplasme. C'est ce domaine qui permet le retour des protons du périplasma au cytoplasme pour activer l'efflux. Le « domaine d'amarrage pour TolC » est constitué de deux sous-domaines α/β et forme un entonnoir de mêmes dimensions que l'extrémité inférieure de TolC. Le « domaine du pore » de chaque protomère est constitué de 4 sous-domaines de conformations α/β et possède une crevasse perpendiculairement à la membrane. Cette dernière est supposée être le site d'interaction du substrat avec la protéine périplasmique AcrA. En effet, des analyses de protéines membranaires chimériques (en échangeant les segments transmembranaires et la partie périplasmique) ont montré que la spécificité de substrat dépendait du domaine périplasmique et que la pompe d'efflux expulsait le substrat du périplasma. Les expériences de co-cristallisation de AcrB avec différents ligands, généralement des analogues d'antibiotiques, ont permis de découvrir trois cavités d'interactions, les cavités « périplasmique » (au niveau du « domaine pore »), « centrale » (à la limite des « domaines transmembranaires ») et du « pore central » (au niveau du « domaine d'amarrage pour TolC ») (Murakami et al., 2006; Seeger et al., 2006; Sennhauser et al., 2007) (Figure I.4). Cette découverte a permis de proposer un modèle de trajectoire d'efflux des ligands au sein de l'antiport : le substrat entre dans la protéine membranaire par la « cavité périplasmique » et est acheminé vers le « pore central » puis dans le tunnel de la porine. Une quatrième cavité a été proposée pour expliquer l'efflux des substrats cytosoliques, la « cavité transmembranaire » (Figure I.4), mais aucune fixation de ligands n'a été observée jusqu'à maintenant. D'après les structures cristallisées de AcrB obtenues, le pore central observé est trop étroit pour permettre le passage des substrats vers TolC. Ce n'est qu'à partir de 2006, grâce à la cristallographie à haute résolution qu'il a été découvert qu'il existait une asymétrie entre les trois protomères. Un modèle d'efflux cyclique couplé au flux de proton a alors été proposé où chaque protomère adopte à son tour trois conformations différentes : une conformation « access » où l'entrée du « vestibule » est ouverte et laisse entrer les substrats,

une conformation « binding » où le substrat est bien fixé dans la cavité périplasmique puis enfin la conformation « extrusion » où le pore central s'ouvre en permettant l'efflux du substrat à travers la cavité centrale de l'antiport vers la porine (Murakami et al., 2006; Seeger et al., 2006; Sennhauser et al., 2007) (Figure I.5). Etant donné que l'interaction entre la membrane interne et externe est faible, l'adaptateur périplasmique est requis pour permettre d'établir et de stabiliser le contact entre ces deux constituants. La protéine périplasmique AcrA d'*E. coli* est ancrée dans la membrane plasmique via une liaison palmitoyl de la partie N-terminale et a une structure allongée d'une longueur de 100 Å environ (Figure I.4). Elle est constituée de 3 domaines : un domaine α qui présente deux super-hélices associées en épingle à cheveux, un domaine lipoyl formé de brins β antiparallèles, et un domaine mixte avec une hélice α , un tonneau β et des feuilletts β . Les domaines α et lipoyl/mixte $\alpha + \beta$ de l'adaptateur interagissent respectivement avec les domaines périplasmiques de la membrane externe et de la membrane interne.

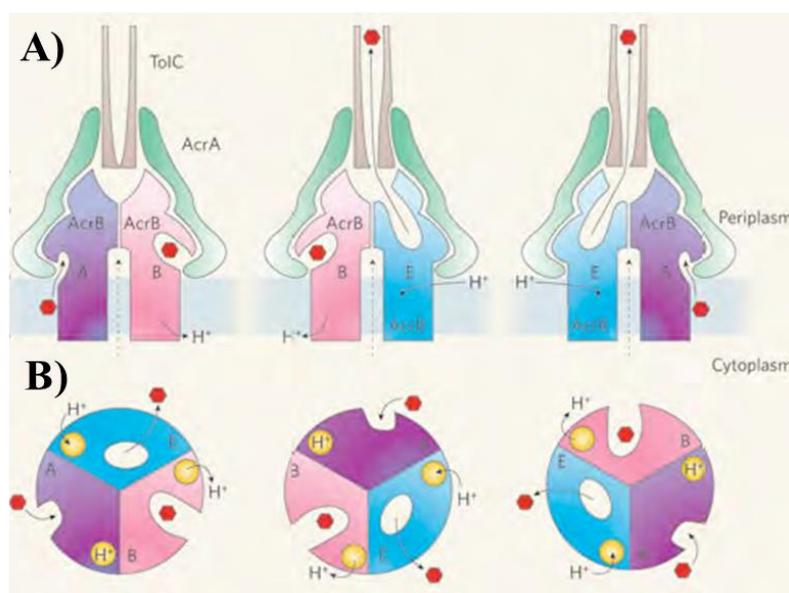


Figure I.5 : Schéma du modèle d'efflux rotatif d'AcrB (Schuldiner, 2006).

A) Vue latérale du complexe tripartite « AcrAB-TolC » d'*E. coli*. **B)** Vue transversale d'AcrB. Les conformations « access » (A), « binding » (B), « extrusion » (E) ; hexagone rouge : le substrat.

Grâce à l'obtention des structures cristallographiques des différents partenaires du système d'efflux AcrAB-TolC, plusieurs modèles d'assemblage ont été proposés. De plus, la reconstitution de pompes hybrides associant un ou deux éléments d'un système avec des protéines orthologues d'un autre système a permis de mettre en évidence l'existence possible d'une interchangeabilité des partenaires. Ainsi, il a été démontré que la protéine membranaire AcrF du système AcrEF-TolC d'*E. coli* pouvait interagir avec AcrA et TolC (Kobayashi et al.,

2001). De nombreuses bactéries possèdent plusieurs systèmes d'efflux différents pour augmenter le nombre de substrats à évacuer. Une analyse du génome de *Pseudomonas* a notamment mis en évidence la présence de 12 pompes d'efflux, dont 7 ont été caractérisées à ce jour : MexAB–OprM, MexCD–OprJ, MexEF–OprN, MexXY–OprM, MexJK–OprM, MexGHI–OpmD et MexVW–OprM (Kumar et Schweizer, 2005).

1.3.4. *L'assimilation des HOC*

La biodégradation des HOC par les microorganismes et notamment les bactéries est un processus naturel efficace qui permet non seulement un recyclage à travers le cycle du carbone dans les écosystèmes naturels, mais également un processus de biorémediation des écosystèmes pollués. Depuis la découverte des bactéries dégradant les composés hydrophobes il y a près d'un siècle, des recherches intensives sur leur métabolisme ont permis de caractériser les voies cataboliques ainsi que les enzymes impliquées.

- Systèmes de transports à travers les membranes externe et interne

Avant d'être pris en charge par le système catabolique cellulaire, les HOC doivent franchir les membranes plasmiques bactériennes qui contrôlent l'entrée de chaque molécule vers la cellule. Comme abordée précédemment (section 1.3.3), de par sa structure, la membrane cytoplasmique laisse passer les HOC. Au contraire, la membrane externe agit comme une barrière contre l'entrée des HOC. D'un point de vue structural, elle est différente de la membrane plasmique car en plus d'être composée de phospholipides, elle est également composée de lipopolysaccharides (LPS). De par la faible fluidité due à l'assemblage compact des acides gras saturés, aux interactions moléculaires fortes entre les LPS et de stabilisation par les cations divalents, la membrane externe constitue une barrière infranchissable pour les molécules hydrophiles ou hydrophobes. Ces dernières doivent donc être transportées par des systèmes protéiques efficaces et adaptées à leur nature chimique.

De manière générale, les transporteurs de la membrane externe sont classés en plusieurs catégories selon leur mode de transport pour permettre le passage contrôlé de petites et grosses molécules : les porines, les transporteurs substrat-spécifiques et les transporteurs actifs (van den Berg, 2005). Les porines telles que les OmpC et OmpF permettent un passage passif de solutés (< 600 Da) à travers la membrane selon leur gradient de concentration (Nikaido, 2003). A faible concentration en molécules, la diffusion passive n'est plus efficace et le transport se produit alors via des transporteurs substrat-spécifiques ou des transporteurs

actifs qui fixent leur substrat. Cependant, les substrats de ces trois catégories de transporteurs protéiques sont hydrophiles. Dans le cas des transporteurs qui facilitent le passage des substrats hydrophobes au travers de la membrane externe, seules deux familles de transporteurs spécifiques ont été caractérisées : les transporteurs des familles FadL (van den Berg, 2005) et OmpW (Touw et al., 2010). Le prototype de la famille FadL a été caractérisé avec la protéine FadL d'*E. coli* qui fut la première protéine décrite comme permettant de faciliter l'entrée dans la cellule d'acides gras à longue chaîne (van den Berg, 2005). Les transporteurs du toluène TbuX de *Ralstonia pickettii* PK01 et TodX de *Pseudomonas putida* F1 (Hearn et al., 2008) font également partie de cette famille. Dans la famille OmpW on trouve le transporteur d'alcanes AlkL de la membrane externe de *P. putida*.

- Mécanismes de biodégradation des hydrocarbures

D'un point de vue chimique, les hydrocarbures sont des molécules relativement stables. Cependant, ils sont énergétiquement riches et représentent des sources potentielles de carbone et d'énergie importantes pour les microorganismes, à condition qu'ils soient activés au préalable (Widdel and Musat, 2010). Cette étape initiale fait intervenir une grande diversité d'enzymes qui diminuent la barrière énergétique de la réaction. L'oxydation aérobie des hydrocarbures avec le dioxygène comme accepteur d'électron et co-substrat d'activation, fournit la plus grande quantité d'énergie d'un point de vue biochimique (Widdel and Musat, 2010). Cependant, depuis la fin des années 1980, de nombreuses bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques comme substrat de croissance en condition d'anoxie stricte ont été découvertes (Zeyer et al., 1986). Bien que la vitesse de croissance en anaérobiose soit plus faible que celle observée en aérobiose, avec un temps de doublement qui se situe entre 6 heures et quelques mois (Widdel et al., 2010), la dégradation anaérobie des hydrocarbures joue un rôle primordial dans le recyclage des hydrocarbures dans les écosystèmes (Spormann and Widdel, 2000; Widdel and Rabus, 2001).

En aérobiose, la dégradation s'effectue au cours d'une respiration qui utilise le dioxygène comme accepteur final d'électrons. L'étape activatrice fait intervenir des monooxygénases (dans le cas des hydrocarbures aliphatiques et quelques hydrocarbures aromatiques) et dioxygénases (dans les cas des hydrocarbures aromatiques) qui vont générer de l'oxygène réactif et par ce biais catalyser l'hydroxylation des hydrocarbures. Les alcools gras qui en résultent sont par la suite oxydés en aldéhydes par une alcool déshydrogénase pour être à nouveau oxydés en acides gras puis transformés en acyl-CoA par l'intermédiaire d'une

aldéhyde déshydrogénase et une acyl-CoA synthase. Les acyl-CoA vont subir une oxydation plus poussée via la voie catabolique de la β -oxydation pour générer des molécules d'acétyl-CoA qui vont intégrer le cycle de Krebs (Wentzel et al., 2007). Dans le cas des hydrocarbures cycliques et aromatiques, une étape supplémentaire de décyclisation est effectuée par les mono- ou di-oxygénases avant d'emprunter la voie de la β -oxydation.

Les oxygénases sont des systèmes à multiples composants : elles sont constituées d'un complexe protéique impliqué dans une chaîne de transport d'électrons et d'une hydroxylase. Le cofacteur nicotinique réduit, généralement NADH ou NADPH, cède 2 électrons à une flavoréductase à FAD ou FMN, qui transfère les électrons à une protéine fer-soufre de type rubrédoxine ou ferredoxine, électrons qui vont finalement être relayés à l'hydroxylase. Cette dernière, sous forme réduite, active le dioxygène, incorpore l'un des atomes d'oxygène au substrat pour former un alcool et réduit le deuxième atome d'oxygène en H₂O.

La voie catabolique des alcanes la mieux caractérisée est celle codée par le plasmide OCT de *Pseudomonas putida* GPo1. Elle comprend deux clusters de gènes séparés par une région de 9.7 kb : *alkBFGHJKL* et *alkST* (van Beilen et al., 2001). Le premier opéron code pour deux des trois composants de l'alcane monooxygénase AlkB (une hydroxylase à fer non hémique) et AlkG (une rubrédoxine) ainsi que pour les enzymes impliquées dans les différentes étapes du métabolisme. Le gène *alkL* code pour une protéine de la membrane externe impliquée dans le transport des alcanes (Julsing et al., 2012). Au deuxième locus, le gène *alkT* et *alkS* codent respectivement pour la rubrédoxine réductase et un régulateur des opérons *alkBFGHJKL* et *alkST*.

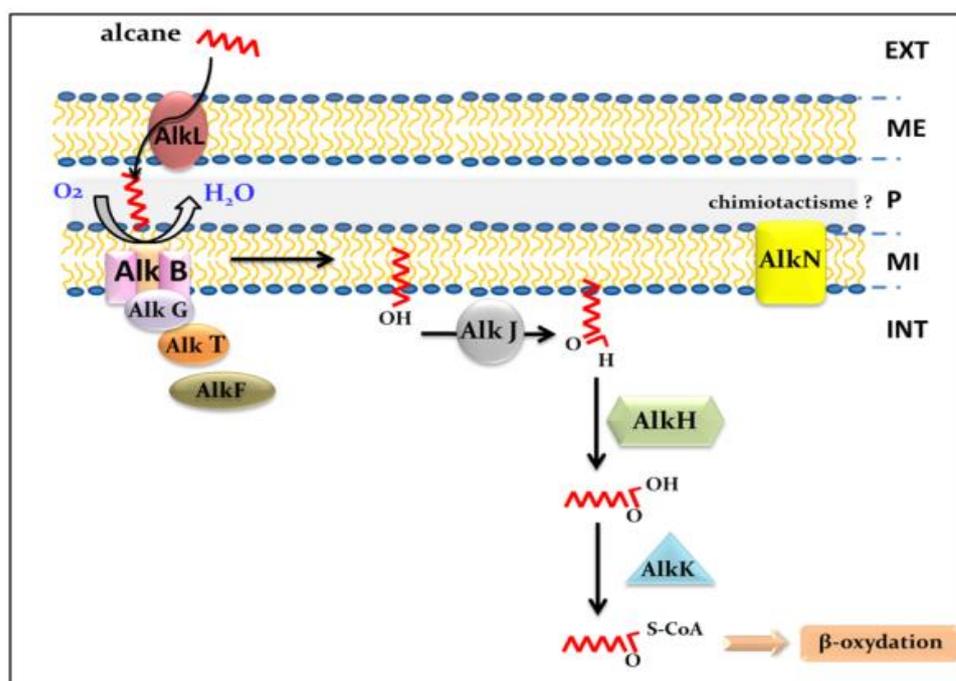


Figure I.6 : Voie métabolique de la dégradation des alcanes chez *Pseudomonas putida* GPo1 (modifiée et redessinée d'après van Beilen et al., 2001).

AlkB (alcane hydroxylase), AlkF et AlkG (rubrédoxines), AlkT (rubrédoxine réductase), AlkJ (alcool déshydrogénase), AlkH (aldéhyde déshydrogénase), AlkK (acyl-CoA synthétase), AlkL (transporteur), AlkN (protéine potentiellement impliquée dans le chimiotactisme), et AlkS (régule positivement l'expression de *alkBFGHJKL* et des gènes *alkST*). **EXT** : milieu extracellulaire ; **ME** : membrane externe ; **P** : périplasme ; **MI** : membrane interne ; **INT** : milieu intracellulaire.

En anaérobiose, les mécanismes d'activation doivent faire intervenir d'autres réactifs que le dioxygène afin d'introduire un groupement polaire. La biodégradation anaérobie des hydrocarbures a été très largement étudiée dans le cas du toluène (Chakraborty and Coates, 2004) puis des homologues ont été observées pour les autres types d'hydrocarbures. L'activation des composés mono-aromatiques substitués est effectuée par des benzyl-succinates synthases qui ajoutent le co-substrat fumarate au groupement alkyl du noyau benzénique, ce qui résulte en la formation de benzyl-succinates (Figure I.7) (Tierney and Young, 2010). Ces hydrocarbures activés vont subir une métabolisation plus poussée en benzoyl-coA. Enfin, ce dernier est clivé et subit à son tour des étapes de déshydrogénation et d'hydratation analogues à la β-oxydation des acides gras avant d'emprunter le cycle de Krebs. De manière analogue, le métabolisme de dégradation des alcanes est généralement activé par une addition carbone-carbone du fumarate dans une position dépendante de l'alcane mais généralement en position sub-terminale ou en position C3 (Rabus et al., 2001; Widdel and Rabus, 2001; Widdel and Grundmann, 2010), à l'origine d'un dérivé succinate (Figure I.7). Les alcanes activés vont ensuite subir une dégradation plus poussée jusqu'à la formation d'acétyl-coA via des étapes de deshydrogénation et d'hydratation. Les travaux de ces vingt

dernières années basés sur des analyses biochimiques ont permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes d'activation des hydrocarbures : par hydroxylation (par une molécule d'eau), carboxylation (par des carbonates), ou par méthylation suivie d'une addition de fumarate (Figure I.7) (Boll and Heider, 2010; Tierney and Young, 2010).

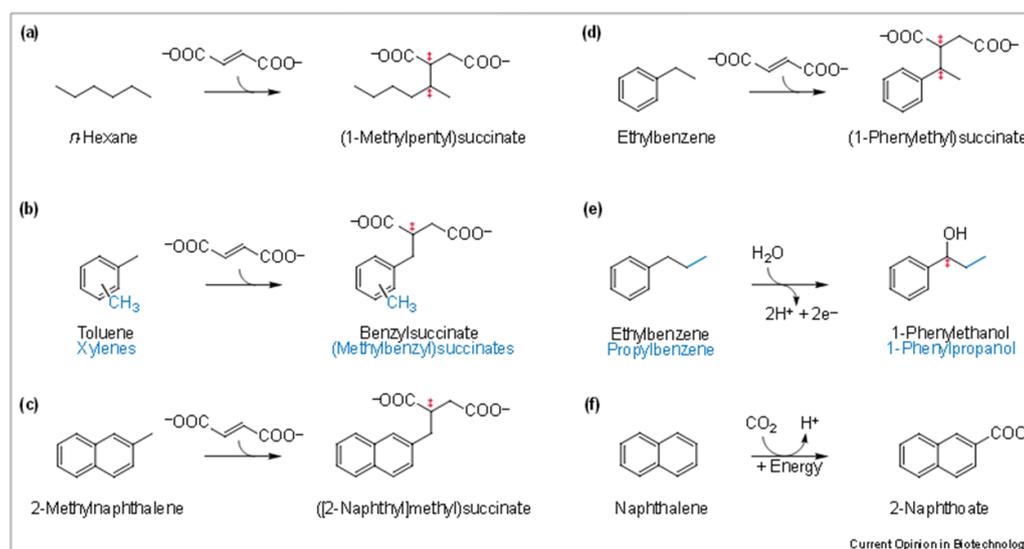


Figure I.7 : Etapes d'activation des hydrocarbures saturés et aromatiques.

(a-d) La réaction radicalaire des hydrocarbures par un fumarate à l'origine d'un succinate substitué est le mécanisme d'activation le plus observé chez les bactéries anaérobies. (e) L'éthylbenzène peut subir une activation par déshydrogénation pour donner un alcool secondaire. (f) Dans certains cas le naphthalène peut subir une carboxylation.

- Mécanismes de biodégradation des lipides

Les lipides, plus particulièrement les esters de glycérol et les acides gras à longue chaîne, constituent une source de carbone énergétiquement riche et compatible avec une croissance dans des environnements à faible potentiel redox. Malgré leur abondance aussi bien dans les écosystèmes naturels qu'industriels, les études sur les conditions de dégradation des lipides par les bactéries lipolytiques n'ont pas fait l'objet d'énormément d'études.

La biodégradation des lipides comporte deux étapes successives : la lipolyse (l'hydrolyse des lipides) extracellulaire qui fait intervenir une lipase et l'oxydation intracellulaire des produits qui en résultent. De nombreuses bactéries à Gram-négatif utilisent le système de sécrétion de type II pour sécréter une grande variété d'enzymes hydrolytiques dans le milieu extracellulaires ; c'est notamment le cas des lipases (Pauwels et al., 2007). Les lipases sont des triacylglycérols acylhydrolases qui catalysent l'hydrolyse des triacylglycérols en acides gras et glycérol mais qui possèdent également des activités phospholipases, cholestérol estérases... (Svendsen, 2000). Du fait de leur stabilité et de leurs propriétés

.....

multiples, les lipases sont utilisées dans de nombreux domaines tels que l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire, des détergents, en cosmétique ainsi que dans des processus de biorémediation (Seitz, 1974). Aussi la plupart des études menées sur la dégradation par les bactéries lipolytiques se sont-elles principalement focalisées sur la découverte de nouvelles lipases à propriétés industrielles intéressantes.

La lipolyse extracellulaire des lipides produit du glycérol et des acides gras saturés et insaturés, de moyenne ou longue chaîne. En ce qui concerne le glycérol, il est pris en charge par la glycolyse. Pour ce qui est des acides gras, ils peuvent être soit séquestrés par la cellule pour subir des processus de biosynthèse soit subir des étapes de dégradation. Le catabolisme des lipides a été largement étudié chez la souche modèle *E. coli* (DiRusso et al., 1999). Cette biodégradation qui fait intervenir le régulon *fad* comprend le transport à travers la membrane, l'activation du composé par une acyl-coA synthétase puis la dégradation séquentielle à travers le cycle de la β -oxydation et avec la libération d'acetyl-CoA. La biodégradation de ces composés gras a également été mise en évidence en anaérobiose (Campbell et al., 2003; Jarvis and Moore, 2010; Sousa et al., 2010). Campbell et ses collègues ont pu mettre en évidence qu'*E. coli* possédait un système métabolique anaérobie de dégradation des lipides qui est différent des enzymes Fad et qui utilise le nitrate, le fumarate, ou le triméthylamine-N-oxide comme accepteurs d'électrons (Campbell et al., 2003). Dans le rumen des ruminants, plusieurs bactéries lipolytiques anaérobies appartenant aux genres *Anaerovibrio*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, and *Propionibacterium* ont été isolées (Jarvis and Moore, 2010). Des bactéries sulfato-réductrices et des communautés méthanogènes via une coopération syntrophique sont également capables de dégrader les lipides en anaérobiose, après hydrolyse par d'autres bactéries anaérobies (Sousa et al., 2010).

2. Principales stratégies bactériennes pour augmenter la faible biodisponibilité des HOC

Les HOC présents dans les écosystèmes naturels ou anthropisés représentent une importante source de carbone et d'énergie pour la croissance des bactéries hétérotrophes. Cependant, leur caractère hydrophobe et par conséquent leur faible biodisponibilité sont des paramètres limitants leur prise en charge et leur biodégradation. De nombreuses études ont montré que certaines bactéries dégradent les HOC plus vite que ne le suggère le taux de transfert de masse en absence de celles-ci. Il en a été déduit que les bactéries devaient développer des stratégies et/ou des modes de croissance particuliers afin de surpasser l'obstacle d'hydrophobicité et puiser dans cette source de nutriments. Ces mécanismes adaptatifs particuliers sont primordiaux puisqu'ils permettent à ces bactéries de disposer d'une source de carbone et d'énergie dans des environnements où les substrats sont rares et ainsi de bénéficier d'un avantage pour occuper certaines niches écologiques.

Les recherches menées à ce jour sur les stratégies adaptatives permettant aux bactéries d'augmenter la faible solubilité des HOC dans l'eau sont peu nombreuses. Etant donné que le potentiel métabolique n'est généralement pas le facteur limitant la biodégradation, ces travaux se sont surtout attachés à comprendre les mécanismes que les bactéries utilisent pour augmenter le transfert de masse. Deux mécanismes principaux ont alors pu être identifiés : la production de biosurfactants et l'adhésion à l'interface eau-HOC qui peut évoluer vers la formation d'un biofilm. Dans certains cas ces deux stratégies peuvent être complémentaires l'une de l'autre.

Dans cette partie, les stratégies bactériennes de production de biosurfactants et d'adhésion seront détaillées. De plus, le mécanisme de chimiotactisme vers les HOC sera également abordé, car il est supposé être impliqué dans l'augmentation de la biodisponibilité.

2.1. Chimiotactisme :

Les milieux marins sont hétérogènes d'un point de vue de la répartition en nutriments (Stocker, 2012; Stocker and Seymour, 2012), et soumis à des incessantes variations environnementales. Certaines bactéries adaptent leur métabolisme pour survivre à de faibles concentrations en nutriments et à un changement environnemental quelconque, alors que d'autres migrent vers des conditions plus favorables pour leur croissance.

En 1683 Antony van Leeuwenhoek a observé pour la première fois le mouvement des bactéries (qu'il prénomait « animacules »), en examinant une plaque dentaire. Dès lors, la majorité des espèces bactériennes ont été identifiées comme mobiles pendant au moins une partie de leur vie (Fenchel, 2002). Deux siècles après la découverte de la mobilité bactérienne, Theodor Engelmann et Wihelman Pfeffer ont pu observer que cette mobilité ne s'effectuait pas de façon arbitraire ou aléatoire mais de manière orientée vers ou au contraire dans le sens opposé de certains stimuli (Engelmann, 1883; Pfeffer, 1884). Ce déplacement orienté est appelé « tactisme » ou « taxie ». Depuis, une grande variété de mouvements bactériens en réponse à divers stimuli externes a été identifiée : à la lumière (phototactisme), la température (thermotactisme), le champ magnétique (magnétotactisme), le pH (pH tactisme), l'oxygène (aérotactisme), la concentration en composés chimiques (chimiotactisme) (Wadhams and Armitage, 2004; Stocker and Seymour, 2012)... Ce dernier est de loin le plus étudié des types de déplacements, mais également le plus ubiquitaire. Par l'intermédiaire des chimiorécepteurs transmembranaires, la bactérie peut détecter la présence d'un gradient de concentration d'un ou plusieurs composé(s) et transmettre cette information via un système de phosphorelais histidine-aspartate pour déclencher ou non la mobilité. Cette réponse physiologique permet de diriger la bactérie vers un milieu riche en composés attractifs ou inversement, de l'écarter des produits répulsifs.

Deux catégories de mobilité bactérienne ont été identifiées : la mobilité flagelle-dépendante et flagelle-indépendante.

2.1.1. Mobilité flagelle-dépendante

La mobilité par l'intermédiaire d'un flagelle est la mobilité bactérienne qui a été la plus étudiée à ce jour. De nombreuses informations sur la structure flagellaire et son fonctionnement sont disponibles.

Le flagelle est caractérisé comme étant un long filament protéique présent à la surface cellulaire. Cet appendice permet à la bactérie de nager en milieu liquide (« swimming ») et dans certain cas de réaliser le « swarming » en milieu solide (Kearns, 2010). Trois structures principales composent le flagelle (Chevance and Hughes, 2008; Jarrell and McBride, 2008; Guttenplan and Kearns, 2013): le corps basal, qui inclut le moteur composé d'un stator (complexe protéique MotA/MotB) et d'un rotor (FliG), permet l'ancrage dans l'enveloppe de la bactérie ; un long filament en hélice composé d'une superposition de 20 000 sous-unités de flagellines (FliC) et terminé par une coiffe (FliD) indispensable pour le repliement et la

sécrétion des flagellines ; et un crochet, aussi appelé charnière, composé de 200 sous-unités structurales FlgE et qui permet de relier le filament au corps basal en donnant un angle de polarité au flagelle. La plupart des protéines structurales sont assemblées en dehors du cytoplasme, et doivent alors être exportées par le système de sécrétion de type III du corps basal (FliO/P/Q/R et FlhA/B). L'ATPase, composée des protéines solubles FliH/I/J, est nécessaire pour l'assemblage du flagelle. Au total cet appendice constitué de 30 protéines consomme 2 % des ressources métaboliques. En plus de ce coût énergétique, la mise en rotation du flagelle par l'intermédiaire du moteur nécessite l'énergie fournie par un gradient de proton.

L'assemblage de cette nanomachine complexe nécessite une organisation spatio-temporelle stricte qui est contrôlée par une régulation hiérarchique de l'expression des gènes (Chevance and Hughes, 2008; Guttenplan and Kearns, 2013). Ce système permet de contrôler le bon assemblage de l'appendice et de limiter des pertes d'énergies cellulaires conséquentes.

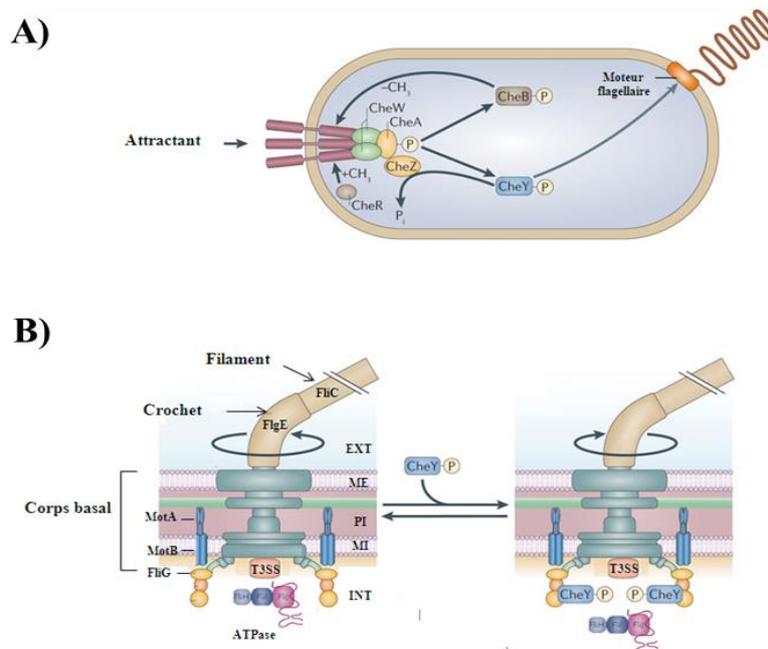


Figure I.8 : Le système d'assemblage du flagelle et le système de chimiotactisme régulant le sens de rotation (modifié d'après Porter et al., 2011).

A) Le système de chimiotactisme. La concentration en chémoeffecteurs est détectée par les chémorécepteurs membranaires. Le signal est par la suite véhiculé à travers CheW pour arriver à l'histidine kinase CheA. En réponse à une diminution en chémoattractant, les récepteurs membranaires activent l'autophosphorylation de CheA qui va, à son tour activer ses deux régulateurs de réponse CheY et CheB. CheY-P se fixe sur le moteur flagellaire et induit le changement rotation du flagelle, d'une rotation antihoraire à une rotation horaire. La méthylestérase CheB, en coordination avec la méthyltransférase constitutive CheR, régule la réponse du signal. CheZ est une phosphatase qui déphosphoryle CheY pour arrêter le signal rapidement.

B) Le système d'assemblage du flagelle et le changement de rotation flagellaire en réponse à CheY-P.

T3SS : Système de sécrétion de type 3 constituée des protéines FliOPQR et FlhAB.

Il a fallu 40 ans de travaux de recherches en laboratoire avant d'élucider le mécanisme moléculaire du chimiotactisme par le mouvement flagellaire. En règle générale ce type de transduction de signal nécessite trois éléments de base : des chimiorécepteurs qui détectent et réceptionnent le signal, des protéines impliquées dans la transduction de signal pour relayer l'information des récepteurs membranaires au moteur flagellaire, puis un système qui permet de réguler le signal (Lux and Shi, 2004). Cette machinerie complexe a été caractérisée en détail chez *E. coli* et repose sur l'existence de plusieurs composants: des chimiorécepteurs transmembranaires homodimériques, appelés MCP pour « Méthyl-accepting Chemotaxis Proteins », et qui sont très sensibles puisqu'ils sont capables de sentir des concentrations en composés allant du μM au nM (Lux and Shi, 2004) ; d'une protéine adaptatrice CheW qui aide à la fixation d'une histidine kinase CheA aux MCP ; d'une méthyltransférase constitutive (CheR) qui méthyle des résidus glutamates des récepteurs MCP à partir de S- adénosylméthionine, et de deux régulateurs de réponses (RR) (CheY et CheB) qui sont en compétition vis-à-vis de la fixation à CheA. Le RR CheY possède un domaine qui lui permet de se fixer au moteur du flagelle, alors que le CheB possède une activité méthylestérase qui permet de réguler la conformation des MCP. Chez les cellules soumises à un gradient de concentration en composés chimiques attractifs, ceux-ci se fixent aux MCP ce qui inhibe l'autophosphorylation de CheA. Dans cette condition CheY reste sous la forme inactivée ce qui ne modifie pas le sens de rotation du flagelle ; les bactéries contiennent leur déplacement vers le gradient favorable selon un sens de rotation antihoraire. Lorsque les composés chimiques arrivent à manquer, aucun ligand ne se fixe aux récepteurs MCP, l'autophosphorylation de CheA et le transfert de ce groupement phosphorylé à un résidu aspartate de CheY est alors stimulée. La méthylation des résidus glutamate par la méthyltransférase constitutive CheR permet d'améliorer l'activation de CheA. La forme phosphorylé CheY-P va se fixer au moteur flagellaire et induire le changement du sens de rotation dans le sens horaire, ce qui résulte en un changement directionnel. CheZ est une phosphatase qui déphosphoryle CheY-P pour arrêter rapidement le signal (Lux and Shi, 2004; Szurmant and Ordal, 2004; Wadhams and Armitage, 2004; Porter et al., 2011).

2.1.2. Mobilité flagelle-indépendante

Les cellules bactériennes ont développé une grande variété de machines moléculaires afin de se déplacer sur les différents types de surfaces présentes dans leur environnement naturel. Elles ont développé le « swarming » qui se fait par l'intermédiaire du flagelle, mais

également des systèmes de mobilité indépendantes de cet appendice tels que le « twitching » (mouvements convulsifs) et le « gliding » (mouvement par glissement). Le « twitching » est l'un des mécanismes de mobilité flagelle-indépendant qui a été le plus étudié, et plus particulièrement chez *Pseudomonas*, *Neisseria* et *Synechocystis* (McBride, 2001). L'hypothèse émise dès les années 80 par Bradley selon laquelle ce mouvement résultait d'une répétition d'extension, fixation et rétractation d'une longue fibre protéique appelée pili (signifie « poil » en latin) de type IV (T4P) s'est avérée être juste (Bradley, 1972). Cette fibre protéique fait partie de l'un des quatre groupes de pili connus à ce jour (Proft and Baker, 2009) et est subdivisé en deux classes : T4Pa et T4Pb. Les T4Pa sont relativement homogènes et très largement répartis chez les bactéries pathogènes de plantes et humains telles que *P. aeruginosa* et *Neisseria meningitis* (McBride, 2001; Pelicic, 2008) ainsi que chez des bactéries environnementales telles que *Myxococcus xanthus* et *Shewanella oneidensis* (Pelicic, 2008; Proft and Baker, 2009; Burrows, 2012). Les T4Pb représentent un groupe plus hétérogène qui sont généralement communs aux espèces entériques telles que *Vibrio cholerae* ou *E. coli* entéropathogénique (EPEC) (Proft and Baker, 2009; Burrows, 2012). Cette classe de T4P inclut également le groupe de pili monophylétique Tad, pour « Tight adherence », aussi appelé Flp ou Fap, initialement identifié chez *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Du point de vue structural, cet appendice de surface est un homopolymère de sous-unité de piline, de 6 à 9 nm de diamètre et de plusieurs microns de longueur, qui émerge du corps cellulaire de nombreuses bactéries à Gram négatif et quelques bactéries à Gram positif (Proft and Baker, 2009). C'est une structure en hélice qui permet d'être rigide et flexible à la fois, conférant des fonctions diverses : dans l'adhésion, le transfert d'ADN entre souches bactériennes lors d'une conjugaison, le transfert d'électrons, l'infection par des bactériophages, la formation de biofilm (McBride, 2001; Craig and Li, 2008; Proft and Baker, 2009)... Contrairement aux autres groupes de pili, la structure des T4P nécessite une vingtaine de protéines conservées au sein de diverses espèces qui vont former un complexe protéique ancrée dans la membrane interne et externe (Figure I.9). Certaines d'entre elles sont indispensables dans tous les systèmes de T4P et incluent : la sous-unité de piline, une pré-piline peptidase transmembranaire qui clive le peptide signal de la pré-piline pour que la piline puisse être transloquée vers le périplasme, une ATPase qui fournit l'énergie nécessaire pour l'assemblage, une protéine de la membrane plasmique qui recrute l'ATPase du cytoplasme, et une sécrétine encastré dans la membrane externe nécessaire à la sécrétion des

pilines et par conséquent à l'émergence du T4P à la surface cellulaire (Proft and Baker, 2009). Les études menées chez *P. aeruginosa* ont pu identifier l'implication de plus de 40 gènes dans la structure même du T4Pa ainsi que dans le « twitching » dont 20 gènes sont nécessaires pour la biogénèse du pilus (McBride, 2001; Bertrand et al., 2010). Le complexe protéique encasté dans la membrane interne est appelé le « complexe moteur » et est constitué d'une protéine cytoplasmique PilC sur lequel se fixent les protéines cytoplasmiques PilB, PilT et PilU. PilB est une ATPase hexamérique qui permet de convertir l'énergie chimique issue de l'hydrolyse d'ATP en énergie mécanique nécessaire pour la polymérisation du pilus. PilT et PilU sont des PilB-like ATP ases nécessaires pour la dépolymérisation. L'assemblage du pilus est alors dynamique, avec une extension et rétractation possible de l'appendice, à l'origine du « twitching ». Le « moteur » est physiquement connecté au système externe par l'intermédiaire du « complexe d'alignement », FimV-PilMNOP, et permet d'assurer la croissance correcte du pilus qui s'assemble à partir du périplasme. Le « complexe de la membrane externe » est constitué d'une sécrétine, composée de sous-unités PilQ, qui forme un canal à travers lequel l'appendice peut émerger de la cellule, et d'une pilotine PilF responsable de l'oligomérisation correcte de PilQ. Enfin, le dernier complexe protéique est le pilus lui-même, composé essentiellement de l'homopolymérisation de la sous-unité majeure PilA, mais également des sous-unités mineures telles que FimU-PilVWXE.

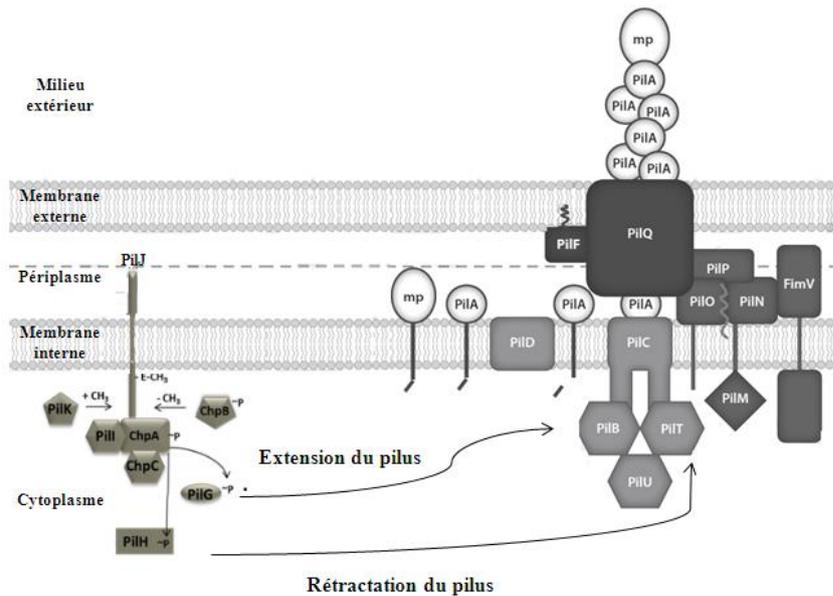


Figure I.9 : Systèmes d'assemblage du pilus de Type IV et du système de chimiotactisme chp chez *Pseudomonas aeruginosa* et leur organisation supposée au niveau de l'enveloppe cellulaire (modifié d'après Burrows, 2012).

Le système d'assemblage du T4P comprend 4 complexes protéiques qui interagissent entre eux. Le complexe de la membrane externe : PilF (la pilotine) et PilQ (la sécrétine) ; le complexe moteur de la membrane interne : PilB (polymérase de la piline), PilC (protéine de la plate-forme), PilD (pré-piline peptidase), PilT et PilU (dépolymérases de la piline) ; le complexe d'alignement : FimV-PilMNOP ; le complexe du pilus : les pilines mineures FimU-PilVWXE (mp) et la sous-unité principale de la piline PilA. Le système de chimiotactisme comprend ChpA (histidine-kinase) relié à PilJ (protéine MCP) par PilI et ChpC (protéines adaptatrices). Lors d'un stimulus externe, PilJ subit un changement de conformation qui entraîne l'autophosphorylation de ChpA qui active deux régulateurs de réponses PilG ou PilH qui à leur tour activent PilB ou PilT respectivement. La réponse adaptative du signal chimique perçu par PilJ est contrôlée par la compétition entre les protéines PilK (méthyltransférase constitutive) et ChpB (méthylestérase).

La régulation de la dynamique extension/rétraction du T4P est très complexe et fait intervenir le facteur de transcription RpoN (σ^{54}), des systèmes à deux composantes (PilS/PilR, FimS/AlgR) et un système de chimiotactisme putatif codé par les clusters de gènes *pilGHIJK-chpABC* appelé « système Chp » (Whitchurch et al., 2004; Bertrand et al., 2010). Ce dernier système est analogue au système de chimiotactisme Che qui contrôle la rotation flagellaire, mais est plus complexe. Son fonctionnement n'est pas encore aussi bien élucidé que le système Che. La protéine PilJ de *P. aeruginosa*, présente aux deux pôles bactériens, possède une forte homologie de séquence avec la protéine MCP d'*E. coli* et est potentiellement impliquée dans la détection d'un stimulus externe pour réguler la dynamique de polymérisation/dépolymérisation du pilus (DeLange et al., 2007). La protéine ChpA est une histidine kinase qui phosphoryle deux Che-Y like régulateurs de réponses PilG et PilH qui régulent respectivement l'extension ou la rétraction du pilus à travers l'activité de deux ATPases PilB et PilT (Whitchurch et al., 2004; Bertrand et al., 2010). Le modèle de

régulation du fonctionnement des pili de Type IV par le « système chp » est détaillé dans la figure I.9.

2.1.3. Chimiotactisme : stratégie comportementale pour accéder aux HOC

De nombreuses études suggèrent que le chimiotactisme est une réponse physiologique qui contribue à une biodégradation efficace des HOC en amenant les cellules au contact des composés à dégrader (Pandey and Jain, 2002; Parales and Harwood, 2002; Krell et al., 2013). Ce processus augmenterait par conséquent la biodisponibilité des HOC de faible solubilité mais également des composés qui ont tendance à s'adsorber à des particules.

Une chimioattraction a été observée vis-à-vis de très nombreux HOC : le toluène et ses dérivés, le naphthalène et ses dérivés, les chloroaromatiques, les hydrocarbures aliphatiques, les herbicides (Parales and Ditty, 2010)... *P. putida* F1 possède une réponse attractive à l'encontre de trois composés monoaromatiques qu'elle utilise comme source de carbone et d'énergie : le benzène, l'éthyl-benzène et le toluène (Parales et al., 2000). Cependant les chimiorécepteurs n'ont pas encore été identifiés. Smits et ses collègues (2003) ont pu observer que *P. aeruginosa* PAO1 est attirée par l'hexadécane (Smits et al., 2003). Le gène *tlpS* situé en aval du gène *alkB1*, codant pour une alcane hydroxylase, code pour une MCP putative qui pourrait intervenir dans le chimiotactisme vis-à-vis de l'hexadécane. Cependant aucune preuve expérimentale n'a été reportée. Les souches *P. putida* G7, *P. putida* RKJ1 et *Ralstonia* sp. qui utilisent le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie sont capables de sentir et migrer vers ce composé. Le gène codant pour le chimiorécepteur du naphthalène chez *P. putida* G7, annoté *NahY*, est situé sur le plasmide catabolique NAH7, en aval des gènes de dégradation du naphthalène. Des expériences de chimiotactisme réalisées dans un système hétérogène sur la souche sauvage et un mutant non chimiotactique *nahY* ont démontré que la mobilité orientée augmentait la biodégradation (Marx and Aitken, 2000). Une étude supplémentaire sur ces deux souches a démontré que le chimiotactisme permettait une meilleure dégradation du naphthalène dissous dans une phase liquide non aqueuse (NAPL) (Law and Aitken, 2003). Ces études démontrent que le chimiotactisme des bactéries est une stratégie comportementale qui favorise la biodégradation des HOC distribués de manière hétérogène ou adsorbés à des particules.

2.2. Production de biosurfactants

2.2.1. Généralités

Les biosurfactants (surfactant étant la contraction de « surface-active agent ») sont des molécules synthétisées par divers microorganismes. Les bactéries qui produisent ces molécules actives sont ubiquitaires, elles se trouvent aussi bien dans les milieux aqueux (mer, eau douce, aquifères...) que terrestres (sol, sédiments...) et poussent dans différentes conditions de température, pH et salinité (Maier, 2003; Perfumo et al., 2010). Les biosurfactants ont la particularité d'être amphiphile, comportant une « tête » hydrophile (sucre ou peptide) et une « queue » hydrophobe (une chaîne d'acides gras de 8 à 18 atomes de carbone) au sein de la même molécule (Neu, 1996; Maier, 2003). Cette propriété leur permet de s'adsorber aux interfaces et de diminuer la tension interfaciale entre deux composés immiscibles, solide-liquide, liquide-liquide ou gaz-liquide. De plus, le caractère amphiphile leur permet également d'augmenter la solubilité apparente des composés organiques, et de rendre la surface bactérienne plus hydrophobe pour favoriser son interaction avec des molécules hydrophobes.

La grande diversité des structures chimiques et des propriétés de surfaces des biosurfactants suggèrent qu'ils ont des rôles très diversifiés pour la croissance des bactéries et qui dépendent de la niche écologique dans laquelle elles se trouvent (Ron and Rosenberg, 2001). Certains fixent les métaux, d'autres sont utilisés par la bactérie comme des antibiotiques ou des antifongiques selon les cas (Neu, 1996; Ron and Rosenberg, 2001)... Par ailleurs, la production de biosurfactants est l'une des nombreuses stratégies développées par les bactéries afin d'augmenter le transfert de masse, la biodisponibilité des composés hydrophobes et *in fine* leur biodégradation. Bodour et ses collègues ont estimé entre 2 et 3 % le nombre de bactéries produisant des biosurfactants, contre 25 % dans les sols contaminés (Bodour et al., 2003). Au sein d'un consortium, il a pu être observé que les biosurfactants produits par certaines bactéries peuvent faciliter la biodégradation des HOC par des bactéries hydrocarbonoclastes (Osterreicher-Ravid et al., 2000).

2.2.2. Rôles dans l'assimilation des HOC

- La pseudo-solubilisation des HOC

Les biosurfactants peuvent être divisés en deux catégories : les molécules de faibles poids moléculaires qui sont généralement constituées de glycolipides et de lipopeptides, et les

molécules de hauts poids moléculaires composés de polysaccharides, protéines, lipopolysaccharides ou un mélange complexe de ces biopolymères.

En s'adsorbant aux interfaces, ils permettent d'augmenter la surface disponible pour les bactéries et d'augmenter leur solubilité apparente de deux manières différentes. D'une part, les biosurfactants de faible poids moléculaires sécrétés en monomères dans le milieu extérieur peuvent s'aggréger et s'accumuler sous forme de micelles lorsque le seuil critique de CMC (Concentration Micellaires Critique) est atteint, en incorporant ces composés au cœur de ces structures. Cela entraîne une pseudo-solubilisation micellaire dans la phase aqueuse, augmente leur solubilité apparente et par conséquent leur biodisponibilité. De même, dans le cas des HOC adsorbés, les biosurfactants stimulent leur désorption et solubilisation dans la phase aqueuse (Volkering et al., 1997; Mohanty and Mukherji, 2013). C'est par l'intermédiaire de rhamnolipides et de glycolipides que *P. aeruginosa* et *A. borkumensis* augmentent la solubilité des alcanes (Zhang and Miller, 1992; Yakimov et al., 1998) (Figure I.10).

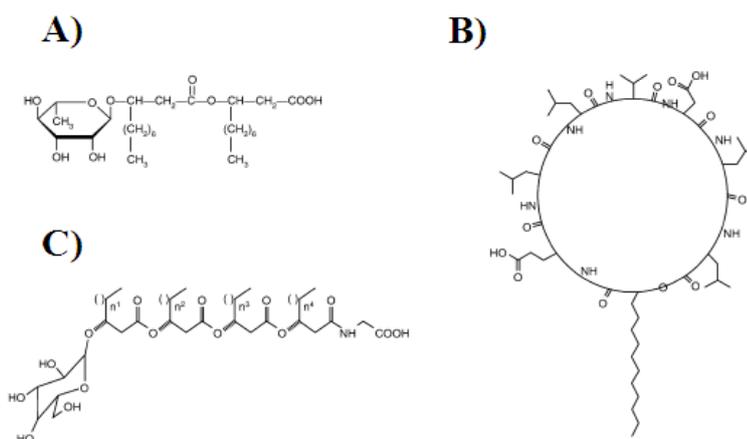


Figure I.10 : Structure de trois exemples de biosurfactants et bioémulsifiants (Perfumo et al., 2010). A) Le rhamnolipide L-rhamnosyl-3-hydroxydecanoyl-3-hydroxydecanoate de *Pseudomonas aeruginosa* ; B) l'émulsan d'*Acinetobacter* RAG-1 ; C) le glycolipide d'*Alcanivorax borkumensis*.

En ce qui concerne les biosurfactants de hauts poids moléculaires, ils ne sont pas aussi efficaces pour diminuer la tension interfaciale. De par leurs nombreux groupes fonctionnels, ils vont pouvoir s'adhérer fortement aux gouttelettes de HOC, éviter leur coalescence en favorisant les émulsions et par conséquent augmenter drastiquement leur solubilité apparente. Etant donné qu'ils stabilisent la dispersion d'un liquide dans un autre, ils sont souvent qualifiés de bioémulsifiants (Ron and Rosenberg, 2002). Les biosurfactants les plus étudiés de cette catégorie sont les bioémulsans produits par *Acinetobacter* (Rosenberg and Ron, 1998) et

notamment l'émulsan produit par la souche RAG-1. Ce dernier est un complexe constitué d'hétéropolysaccharides et de protéines associés à des acides gras par liaison ester ou amide (Perfumo et al., 2010) (Figure I.10). Les propriétés émulsifiantes de ces biosurfactants sont dues aux acides gras qui forment une couche enrobant les gouttelettes de HOC.

Acinetobacter radioresistens KA35 produit un bioémulsifiant de haut masse moléculaire appelé alasan de 1MDa, qui est un complexe constitué de polysaccharides et de protéines qui peut être soit sécrété, soit attaché à la paroi cellulaire. La particularité de cet émulsifiant est que le composé tensioactif réside dans une protéine AlnA de 45 kDa, qui appartient à la famille des protéines de la membrane externe OmpA des bactéries à Gram négatif. La protéine AlnA purifiée émulsifie une grande variété de HOC : les alcanes à longue chaîne, les PAH, paraffine... Elle permet entre autre d'augmenter jusqu'à 20 fois la solubilité apparente des PAH (Toren et al., 2002).

- Modification des propriétés de surface bactérienne

De nombreuses études ont démontré que les biosurfactants pouvaient également permettre à la bactérie de modifier les propriétés de leur surface cellulaire en la rendant plus hydrophobe. Cette propriété permet de favoriser le contact entre la cellule et une interface hydrophobe. Les rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* permettent non seulement une pseudo-solubilisation du substrat hydrophobe comme abordé précédemment, mais également une modification de la nature hydrophile de la membrane externe (Al-Tahhan et al., 2000). En effet, ces composés actifs induisent une libération des lipopolysaccharides (LPS) hydrophiles afin d'augmenter l'hydrophobicité de la surface cellulaire. Par conséquent, l'affinité des cellules pour les HOC en est augmentée, ce qui favorise le contact direct avec les gouttelettes dispersées de façon hétérogène. Le genre *Rhodococcus* a été observé comme produisant des biosurfactants afin de dégrader des HOC. Il a été estimé que 90 % des surfactants produits restaient attachés à la membrane externe médiant de ce fait l'accès aux substrats par contact direct (Perfumo et al., 2010). D'autre part, l'émulsan, le biosurfactant de haut poids moléculaire produit par *Acinetobacter* RAG-1 peut également se trouver fixé à la surface bactérienne. En formant des minicapsules, elle permet l'attachement des cellules aux interfaces hydrophobes (Perfumo et al., 2010).

Cependant, le rôle des biosurfactants dans la biodégradation des HOC dans l'environnement reste sujet à caution. La production de biosurfactants ne semble pas

essentielle pour stimuler la biodégradation des polluants hydrophobes étant donné que de nombreuses bactéries connues pour consommer efficacement les alcanes ou des HAP n'en produisent pas (Ron and Rosenberg, 2002). De plus, il a été observé dans de nombreuses études que la production en ces molécules actives n'est pas spécifiquement induite par la présence de composés hydrophobes. En effet, *P. aeruginosa* PA1 produit des rhamnolipides à un taux plus important lors de la croissance sur glycérol (Santa Anna et al., 2002), de même *Acinetobacter* RAG-1 synthétise de l'émulsan avec un meilleur rendement en présence de produits solubles tels que l'éthanol (Choi et al., 1996). Enfin, certains auteurs ont suggéré que la biodégradation par l'intermédiaire des biosurfactants n'est pas efficace car leur effet dépend de la possibilité d'atteindre la CMC, ce qui est difficile dans un environnement ouvert tel que le milieu marin, à cause du renouvellement de la masse d'eau.

2.3. L'adhésion bactérienne à une surface/interface

L'adhésion bactérienne à des surfaces hydrophobes est une stratégie très largement utilisée par les bactéries afin de surmonter la faible biodisponibilité des HOC (Bouchez Naïtali et al., 1999). Les observations d'un contact direct entre les cellules et les composés hydrophobes ont été réalisées par microscopie électronique et confocale sur des cultures de souches pures. C'est notamment le cas des bactéries dégradant les alcanes telles que *Rhodococcus equi* (Bouchez-Naïtali et al., 2001), *Acinetobacter venetianus* VE-C3 (Baldi et al., 1999), *Alcanivorax* sp. PA2 (Olivera et al., 2009), *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (Klein et al., 2008) et des bactéries dégradant les PAH telles que, *Mycobacterium* sp. LB501T (Wick et al., 2002). Bien que la présence de cellules adhérentes suggère qu'il y a croissance interfaciale, seules quelques études ont démontré une dégradation et une croissance de ces cellules sur les HOC. Ainsi l'adhésion à une surface hydrophobe ne signifie pas nécessairement qu'il y a assimilation.

Les bactéries peuvent atteindre ces surfaces hydrophobes par sédimentation due aux forces de gravité, par transport passif, par diffusion aléatoire par mouvement Brownien dû à l'agitation thermique, par une mobilité active (par l'intermédiaire du flagelle ou pili) ou par chimiotactisme (Lejeune, 2003). Une fois arrivées à proximité d'une surface, pour que l'adhésion aux HOC puisse se faire, les bactéries doivent posséder des propriétés de surface adéquates, à savoir une charge et une hydrophobicité convenable, ainsi que des appendices protéiques et des substances extracellulaires polymériques (EPS) (DeFlaun et al., 1999).

L'étape initiale de l'adhésion est un processus purement physico-chimique et réversible, énoncé par la théorie de la DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) de l'interaction entre les particules colloïdales et la surface. L'intensité de cette interaction dépend dans une deuxième étape de la modification des propriétés de surface bactérienne, des EPS, des adhésines protéiques et des appendices extracellulaires tels que les pili, qui permettent une adhésion irréversible (Tableau I.2). Les mécanismes d'adhésion seront détaillés dans cette partie, et le rôle de l'adhésion dans l'augmentation de la biodisponibilité sera développé.

Tableau I.2 : Exemples de différents composés et appendices protéiques intervenant dans l'adhésion bactérienne à une surface (Lejeune, 2003).

Species	Structure
<i>Escherichia coli</i>	Flagella Type I fimbriae Lipopolysaccharide Curli Conjugative fimbriae NpIE lipoprotein
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Type III fimbriae
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Flagella Type IV fimbriae Putative organelle (CupA)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Flagella
<i>Salmonella enterica</i>	Curli Flagella Lipopolysaccharide
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bap adhesin Teichoic acids
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AtlE autolysin SSP1 adhesin
<i>Streptococcus gordonii</i>	Peptidoglycan
<i>Vibrio cholerae</i>	Flagella Mannose-sensitive hemagglutinin fimbriae

2.3.1. Approche physico-chimique de l'adhésion : la théorie DLVO

Les bactéries ont en général une taille comprise entre 0.5 et 2 μm , elles sont proches de la gamme de taille des particules colloïdales. C'est pourquoi l'adhésion bactérienne est généralement décrite par la théorie de la DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek), qui prédit l'interaction des particules colloïdales avec une surface. Selon cette théorie le contact entre la cellule et l'interface est la résultante des forces d'attraction de van der Waals, et les forces de répulsion de Coulomb (Hori and Matsumoto, 2010).

Dans une solution aqueuse, la surface des cellules bactériennes est chargée négativement du fait de la présence de protéines et d'autres composants de la membrane externe. De même les surfaces non biologiques sont également chargées négativement. Ces charges négatives présentes en surface attirent des contre ions positifs de la solution environnante et forment une couche nommée « la double couche électrique ». Etant donné que

les surfaces électriques des deux composantes sont de la même charge, des forces de répulsions s'établissent lorsque la bactérie s'approche de la surface d'adhésion. Cependant, au fur et à mesure que la bactérie se rapproche de cette surface, des forces d'attraction de van der Waals se font de plus en plus fortes et peuvent attirer de ce fait la bactérie à proximité de la surface. A ce stade-là, une adhésion forte s'installe, que le mouvement brownien ne peut déstabiliser (Ishii et al., 2006; Hori and Matsumoto, 2010) et permet à la bactérie d'entamer l'adhésion irréversible via une modification des propriétés de surface cellulaire et la synthèse d'appendices... C'est la somme de la répulsion par la charge de la double couche électrique, et la force d'attraction de van der Waals décrit par la théorie DLVO qui prédit l'adhésion initiale à une surface.

Il a pu être observé que la force de répulsion créée par la double couche électrique dépendait de la force ionique du milieu : la force de répulsion augmente lorsque la force ionique diminue, puisque la barrière de protection électrique s'estompe, alors que les forces d'attraction restent constantes (Ishii et al., 2006; Hori and Matsumoto, 2010). Ainsi, à faible force ionique, la barrière énergétique à atteindre par la bactérie est trop grande pour pouvoir entamer le processus d'adhésion.

Cependant, l'adhésion bactérienne est un processus plus complexe qui dévie souvent de cette théorie de la DLVO. En effet, contrairement aux particules colloïdales, les surfaces bactériennes sont structurellement et chimiquement hétérogènes, et elles contribuent fortement à la mise en place d'adhésion irréversible, même lorsque les forces de répulsions sont importantes (An and Friedman, 1998; Ishii et al., 2006; Hori and Matsumoto, 2010).

2.3.2. *Les modifications de surface cellulaire bactérienne favorisant l'adhésion à une surface*

- Modification des structures de surface cellulaires favorisant l'hydrophobicité

De nombreuses bactéries qui dégradent les HOC sont naturellement hydrophobes. Cependant, un changement de l'hydrophobicité de surface peut être induit par la présence de HOC faiblement biodisponibles. Par exemple, *A. venetianus* RAG-1 est toujours hydrophobe, même dans la condition où aucun substrat hydrophobe n'a été ajouté dans le milieu de croissance. Au contraire, *A. venetianus* qui est naturellement hydrophile, devient hydrophobe en présence de *n*-alcanes (Baldi et al., 1999).

La présence des lipopolysaccharides (LPS) hydrophiles à la surface des bactéries à Gram-négatif a été démontrée comme intervenant dans l'adhésion aux HOC, en modulant l'hydrophobicité de surface. Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* capables de dégrader les alcanes augmentent l'hydrophobicité de la surface cellulaire en libérant des lipopolysaccharides (LPS) hydrophiles. Cette modification résulte en une meilleure adhésion bactérienne aux HOC et en une augmentation de l'efficacité de biodégradation (Al-Tahhan et al., 2000). De même, les souches d'*Acinetobacter* sont capables de créer un contact direct avec des gouttelettes d'hexadécane en modifiant la composition en LPS de leur membrane externe (Heipieper et al., 2010a).

Par ailleurs, l'hydrophobicité des bactéries conyformes, incluant les *Rhodococcus* spp. dégradant des hydrocarbures, dépend de la présence et de la longueur des acides mycoliques de la surface de la membrane externe (Bendinger et al., 1993). Ces molécules sont constituées d'une longue chaîne d'acide gras, allant de 60 à 90 atomes de carbone chez *Mycobacterium*, qui est hydroxylée et alkylée (Bendinger et al., 1993; Heipieper, et al., 2010a). En modifiant les propriétés physico-chimiques de leur paroi, les *Mycobacterium* sp. LB501T adhèrent 70 fois plus aux surfaces hydrophobes que celles qui poussent sur du glucose (Wick et al., 2002).

Les « substances extracellulaires polymériques » (EPS), aussi appelées « capsules » sont des complexes de biopolymères constituées de polysaccharides, protéines, et/ ou acides nucléiques qui sont fréquemment adsorbées à la surface de la membrane externe des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif. Elles peuvent être de différentes natures, plus ou moins attachées à la surface bactérienne, dominées par des polysaccharides ou des protéines, et ainsi avoir des effets différents quant à l'adhésion aux HOC (Abbasnezhad et al., 2011). Par exemple, chez des souches de *Sphingobium* et *Micrococcus*, contrairement à l'EPS riche en protéines et adsorbé faiblement à la surface cellulaire, il a été observé que l'EPS protéique fortement attaché n'avait pas d'effet sur l'adhésion bactérienne aux gouttelettes de phénanthrène (Zhang et al., 2011).

- Les adhésines et les nanofibres protéiques d'adhésion bactérienne

De nombreuses protéines sécrétées par la bactérie agissant seules ou sous forme de nanofibres protéiques telles que les pili ou fimbriae interviennent dans le phénomène d'adhésion bactérienne. Parmi toutes les molécules favorisant la colonisation des surfaces/interfaces biotiques et abiotiques, ce sont celles qui ont une plus grande diversité

fonctionnelle (Chagnot et al., 2013). C'est pourquoi, seuls quelques exemples types seront abordés dans cette partie.

Les appendices de surface tels que les pili de type IV (T4P), jouent un rôle primordial dans la colonisation bactérienne ainsi que dans les étapes précoces de la formation de biofilm (Burrows, 2012) (Pour plus d'information se référer aux sections 2.1.2 et 2.3). Ils permettent l'adhésion à une grande variété de surfaces abiotiques et biotiques. Des mutants de *P. aeruginosa* affectés dans la biogénèse du pilus, n'adhèrent que faiblement sur de l'acier inoxydable (Giltner et al., 2006) alors que des souches dérivées de *P. aeruginosa* 57RP présentant une hyperpilosité sont extrêmement adhérentes (Déziel et al., 2001). Chez *V. cholerae*, les pili de type IV appelés MSHA (Mannose-Sensitive Hemagglutinin) sont responsables de l'adhésion à du borosilicate et à de la cellulose, ceux appelés TCP (Toxin Co-regulated toxin Pilus) permettent la colonisation de cellules épithéliales de l'intestin à l'origine du cholera, et les ChiRP (Chitin-Regulated Pilus) permettent d'adhérer à la chitine (Watnick and Kolter, 1999; Watnick et al., 1999; Pruzzo et al., 2008). Chez la plupart des *E. coli* et notamment chez les souches uropathogènes (UPEC), les pili de type I permettent l'adhésion aux cellules épithéliales du système urinaire et sont à l'origine de cystites (Proft and Baker, 2009). Par ailleurs, le flagelle (T3SS) impliqué dans la mobilité cellulaire de type « swimming » ou « swarming », a été également répertorié comme étant impliqué dans l'adhésion bactérienne à des surfaces biotiques et abiotiques (Chagnot et al., 2013) (pour plus d'information se référer à la section 2.1.1).

Chez *Pseudomonas* la protéine LapA (Large Adhesion Protein) qui se trouve dans le milieu extracellulaire ou associée à la surface cellulaire, est responsable de son attachement irréversible à un support (Hinsa et al., 2003). Le transporteur ABC composé des protéines LapB, LapC et LapE participe à sa sécrétion. D'autre part, la protéine extracellulaire de colonisation GbpA (N-acétylglucosamine-binding protein A) de *Vibrio cholerae* permet l'adhésion à l'exosquelette de chitine des arthropodes et à la mucine de l'épithélium intestinal (Stauder et al., 2012).

Dans le cas des bactéries colonisant les surfaces hydrophobes, seule l'importance des appendices protéiques de type pili a été répertorié jusqu'à maintenant. L'implication des fimbriae dans l'adhésion d'*Acinetobacter venetianus* RAG-1 à l'hexadécane a été démontrée grâce à l'obtention d'un mutant non-adhérent, qui était à la fois dépourvu d'appendices protéiques et incapable de croître sur ce HOC (Rosenberg and Rosenberg, 1981; Rosenberg et

al., 1982). Chez les révertants, les fimbriae réapparaissent et l'adhésion est restaurée. De même, Bihari et ses collègues ont pu montrer qu'*Acinetobacter haemolyticus* AR-46 rentrait en contact avec les gouttelettes d'alcane par l'intermédiaire d'un long appendice (Bihari et al., 2007).

2.3.3. Adhésion et biodisponibilité des HOC

La capacité des bactéries à adhérer à une surface/interface n'est pas un phénomène exclusif aux bactéries qui dégradent les HOC. Toutefois, elle représente une stratégie communément utilisée par celles-ci pour améliorer l'assimilation des substrats faiblement biodisponibles. L'adhésion à une interface nutritive hydrophobe permet à la bactérie de modifier certains des paramètres régissant la loi de diffusion en faveur d'une augmentation de transfert de masse du composé hydrophobe, et *in fine* d'une biodisponibilité accrue (Figure I.11). D'une part, en restant au sein de la couche limite de diffusion entourant l'interface eau-HOC, la bactérie réduit la distance effective du transfert de masse et augmente alors le taux de transport vers la cellule. Par ailleurs, la prise en charge du HOC permet d'accentuer le gradient de concentration du composé dans la couche limite en augmentant le taux de diffusion et par conséquent sa désorption et sa dissolution. Enfin, un autre avantage de l'adhésion est qu'elle permet de stabiliser les émulsions de HOC dans l'eau, ce qui augmente la surface interfaciale accessible pour la colonisation bactérienne (Harms et al., 2010b; Abbasnezhad et al., 2011).

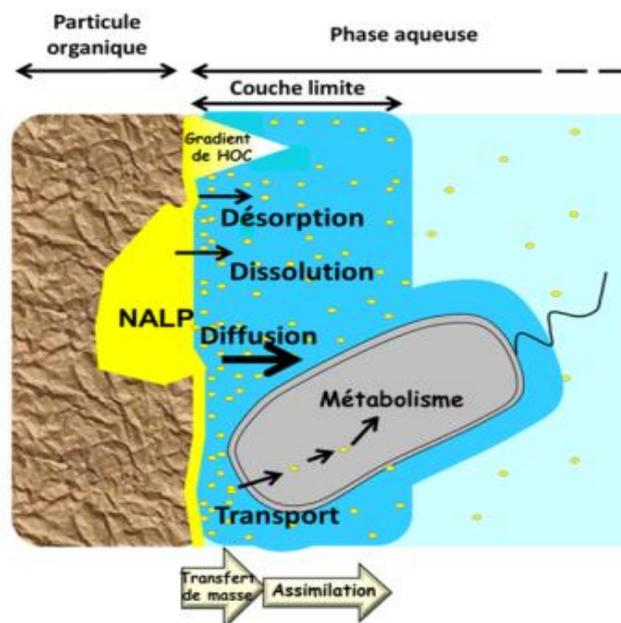


Figure I.11 : Augmentation de la biodisponibilité des HOC par adhésion à l'interface HOC-eau.

2.4. Formation de biofilm sur une surface/interface

Dans de nombreux cas, les bactéries hydrocarbonoclastes qui ont réussi à s'adhérer à l'interface eau-HOC se développent sous forme de biofilm. Deux observations principales ont amené à la conclusion que la formation de biofilm était une autre réponse adaptative développée par les bactéries afin de favoriser l'accès des substrats faiblement solubles dans l'eau. D'une part, il a été constaté qu'il existait une corrélation négative entre la solubilité du HOC dans l'eau et la formation du biofilm (Johnsen and Karlson, 2004). Plus le HOC est hydrophobe, et plus la croissance bactérienne se fait sous forme de biofilm à l'interface eau-HOC. D'autre part, l'argument le plus démonstratif en faveur d'une assimilation facilitée a été apporté par des études de cinétiques d'assimilation des substrats hydrophobes au sein d'un biofilm. Les mesures ont montré que la dégradation à l'interface était réalisée plus rapidement que ce que le transfert de masse du composé l'aurait suggéré en absence de bactéries (Bouchez-Naïtali et al., 2001).

Ces dernières années de nombreuses souches de bactéries dégradant les HOC et se développant sous forme de biofilm à leur surface ont été observées. C'est notamment le cas des bactéries dégradant les HAP telles que les Sphingomonades isolées du sol qui font un biofilm sur des cristaux de HAPs (Willison, 2004), des bactéries marines *Oleiphilus messinensis* ME102, *Alcanivorax burkomensis* SK2, *Novosphingobium* sp PP1Y, *Acinetobacter oleivorans* DR1 et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 qui forment des biofilms aux interfaces eau-HOC (Yakimov et al., 2007; Grimaud, 2010a; Jung et al., 2011; Notomista et al., 2011). Bien que l'existence d'autant de bactéries hydrocarbonoclastes se développant sous forme de biofilm sur des surfaces nutritives montre l'importance de ces structures bactériennes dans le recyclage de ces composés organiques, très peu d'études ont visé à établir une compréhension poussée de ces biofilms. Un rapide inventaire de la bibliographie montre que la plupart des publications relatives aux biofilms bactériens concernent les genres *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. De plus, les études ont été réalisées sur des surfaces inertes non nutritives telles que des plastiques, des métaux, du verre et des biomatériaux.

Dans cette partie, les connaissances générales sur les biofilms seront présentées, et les données concernant les processus spécifiques aux HOC seront différenciées.

2.4.1. *Les avantages écologiques du mode de vie en biofilm*

Un biofilm est une structure biologique constituée d'une communauté multicellulaire de microorganismes, englobés dans une matrice de substance exopolymériques, adhérant à la fois les uns autres et à une surface. Des traces de biofilm fossilisés datant de plus de 3.25 milliards d'années ont été répertoriées en Australie, indiquant que cette structure complexe est une caractéristique ancestrale du cycle de vie des microorganismes (Hall-Stoodley et al., 2004).

Les biofilms sont retrouvés de manière ubiquiste dans l'environnement. Il a été estimé à 90 % le pourcentage de bactéries environnementales qui vivent en biofilm (Petrova and Sauer, 2012). Il apparaît que ce mode de vie fournit à la bactérie des avantages écologiques. Cette structure complexe permet de créer un habitat favorable et stable à la croissance cellulaire en limitant les fluctuations des conditions physico-chimiques (température, pH, salinité...) auxquelles les cellules planctoniques sont perpétuellement soumises (Hall-Stoodley et al., 2004). Elle permet également une protection contre l'exposition aux UV, la dessiccation, les agents chimiques, les antibiotiques et les prédateurs (Donlan, 2002; Hall-Stoodley et al., 2004). Par ailleurs, en ce qui concerne les biofilms qui se développent sur les HOC, le mode de vie sous forme sessile présente l'avantage d'améliorer l'accessibilité à cette source de carbone pour les bactéries la dégradant en augmentant son transfert de masse (Bouchez-Naïtali et al., 2001; Wick et al., 2002).

2.4.2. *La formation spatio-temporelle du biofilm : adhésion, maturation et détachement*

L'observation microscopique du cycle de développement de biofilms bactériens mono-spécifiques sur des surfaces inertes a permis de mettre en évidence une croissance séquentielle. D'une manière générale, la croissance en biofilm est initiée par l'adhésion réversible puis irréversible des bactéries sur un support via une modification des propriétés de surface de la bactérie et une synthèse de structures adhésives (se référer à la section 2.3 de ce même chapitre) (Petrova and Sauer, 2012; Kostakioti et al., 2013). Les cellules adhérees synthétisent une matrice d'exopolymères, se multiplient et dans certains cas se regroupent grâce à leur mobilité de surface, pour former des microcolonies puis l'architecture tridimensionnelle du biofilm mature (Hall-Stoodley and Stoodley, 2002; Stoodley et al., 2002; Jeremy S Webb et al., 2003). Des cellules individuelles ou en amas peuvent se détacher pour

se fixer à leur tour à un support et lancer un nouveau cycle de développement de biofilm (Stoodley et al., 2002; Jeremy S Webb et al., 2003).

- Etapes de maturation du biofilm

Une fois adhérees au support, les cellules bactériennes sécrètent des substances exopolymériques (EPS) qui vont permettre de les immobiliser et les maintenir à proximité les unes des autres, favorisant les interactions étroites bactérie-bactérie telles que la communication intercellulaire et l'échange d'ADN (Flemming and Wingender, 2010; Tashiro et al., 2013). Dans la majorité des biofilms, les microorganismes représentent seulement 10 % de la matière sèche alors que la matrice représente plus de 90 % (Flemming and Wingender, 2010). La matrice est majoritairement constituée de polysaccharides, protéines et d'acides nucléiques.

❖ Les exopolysaccharides : se sont les constituants de la matrice les plus étudiés à ce jour. Ils représentent généralement la fraction la plus importante de la matrice (Donlan, 2002; Karatan and Watnick, 2009; Flemming and Wingender, 2010). Plusieurs types d'exopolysaccharides nécessaires à la formation de biofilm ont été identifiés. On peut citer par exemple le PNAG, un homoglycane linéaire de poly-N-acetylglucosamine présent chez *E. coli* ; la cellulose, constituant majeur de la matrice de *E. coli* et de certaines espèces de *Salmonella* et de *Pseudomonas* ; l'alginate, un hétéropolymère composé de résidus β -D-mannuronique et d'acide β -D-guluronique présents chez de nombreuses *Pseudomonades* ; Pel et Psl, qui correspondent respectivement à des polysaccharides riches en glucose et en mannose (Karatan and Watnick, 2009). Des gènes orthologues au locus *pel* ont été retrouvés dans le génome de nombreuses bactéries tels que *Geobacter metallireducens*, *Burkholderia cenocepacia* et *M. hydrocarbonoclasticus* suggérant que le polysaccharide correspondant est largement utilisé dans le monde bactérien comme constituant de la matrice des biofilms (Lee et al., 2007).

❖ Les protéines extracellulaires : les appendices protéiques extracellulaires tels que les pili, fimbriae et les flagelles permettent de stabiliser la matrice en créant des interactions avec d'autres substances exopolymériques. Chez les bactéries à Gram-négatif, des vésicules membranaires dérivant de la membrane externe sont également présentes dans la matrice extracellulaire. Elles contiennent de l'ADN cellulaire et une large gamme d'enzymes qui

altèrent les propriétés de la matrice et dans certains cas ciblent des cellules bactériennes lors de la compétition entre organismes du biofilm (Tashiro et al., 2013).

❖ L'ADN extracellulaire (ADNe) : bien que l'ADN extracellulaire ait été initialement considéré comme un élément résiduel provenant de la lyse des cellules sessiles, il est maintenant considéré comme partie intégrante de la matrice. Chez *P. aeruginosa*, l'ADNe forme une structure en forme de grille alors que chez l'isolat aquatique F8, il forme un réseau filamenteux (Allesen-Holm et al., 2006; Böckelmann et al., 2006). Il a été postulé que la structure en grille permettait de guider *P. aeruginosa* via un mouvement cellulaire pili-dépendant. Chez *P. aeruginosa* et *P. putida* l'ADNe est identique à l'ADN génomique, alors que l'ADNe de la souche F8 possède quelques différences (Böckelmann et al., 2006; Karatan and Watnick, 2009). Dans le biofilm formé par *Salmonella epidermidis*, l'ADNe provient de la lyse cellulaire provoquée par une autolysine (Biswas et al., 2006). Toutefois, la libération de l'ADN par la lyse cellulaire ne semble pas être la seule source en ces constituants de la matrice ; une sécrétion active d'ADN n'est pas à exclure (Karatan and Watnick, 2009; Flemming and Wingender, 2010).

La structure tridimensionnelle du biofilm mature dépend des conditions physiques environnantes, tels que les paramètres hydrodynamiques d'écoulement du milieu, ainsi que des facteurs biologiques. D'un point de vue architectural deux grands types de biofilms peuvent être distingués :

- Les biofilms présentant une structure tridimensionnelle irrégulière, avec un agencement des microcolonies en forme de champignon ou de pilier, séparés par des réseaux de canaux dans lesquels circulent les fluides permettant l'apport de nutriments, de donneur/accepteur d'électrons et l'évacuation des déchets.
- Les biofilms de structure homogène, compacte et plate, constitués de plusieurs couches cellulaires.

Les principaux facteurs biologiques contrôlant l'architecture du biofilm sont la composition du milieu et notamment la source de carbone, la présence de surfactants, le quorum sensing et la mobilité cellulaire (Karatan and Watnick, 2009). La mobilité de surface de type twitching par l'intermédiaire des pili de type IV joue un rôle clé chez certaines bactéries pour la structuration tridimensionnelle du biofilm mature. Dans certaines conditions environnementales, *P. aeruginosa* peut se mouvoir sur la surface du support où les bactéries

ont préalablement adhérees ainsi que sur des amas cellulaires à l'origine de la formation de microcolonies conduisant à une maturation du biofilm vers une architecture en champignon (O'Toole and Kolter, 1998). Dans d'autres conditions de culture, cette même espèce bactérienne est capable de former des microcolonies indépendamment des pili de type IV, par une multiplication clonale selon une division binaire des cellules adhérees (Klausen et al., 2003a). Lorsqu'une cellule se divise, les cellules filles s'étendent vers l'extérieur ou vers le haut du site d'adhésion, d'une manière similaire à la formation de colonies sur de l'agar (Stoodley et al., 2002; Hall-Stoodley and Stoodley, 2005). Enfin, les pili de type IV ont également été démontrés comme intervenant dans la formation de biofilms homogènes (Klausen et al., 2003b; Conrad et al., 2011).

- La dispersion

La forte densité cellulaire et la matrice créent des gradients de substrats, solutés et d'oxygène. Cette hétérogénéité au sein du biofilm, entraîne une différenciation et une spécialisation cellulaire à l'intérieur du biofilm à travers l'acquisition d'une diversité de voies métaboliques et d'activités cellulaires (Stewart and Franklin, 2008). Au fur et à mesure que le biofilm augmente en taille, les cellules résidant dans les structures les plus internes peuvent ne plus avoir accès aux nutriments, et peuvent être confrontées à une forte accumulation de produits métaboliques toxiques. Ce microenvironnement qui au départ était avantageux peut devenir défavorable pour la survie bactérienne. De plus, lors d'un changement des conditions environnementales (carence en oxygène, augmentation ou diminution d'une source de carbone...), le mode de vie en biofilm peut également devenir un frein pour la croissance bactérienne (Karatan and Watnick, 2009). Dans les deux cas de figure, les cellules se détachent du biofilm entraînant le retour des bactéries au mode de vie planctonique. Toutefois, les cellules qui se détachent présentent un phénotype différent de celui des cellules sessiles et des cellules planctoniques (Vaysse et al., 2011).

Les mécanismes impliqués dans la dispersion des cellules incluent la synthèse d'enzymes qui dégradent les structures adhésives et les composants de la matrice, le retour à la mobilité et la production de surfactants (Jeremy S Webb et al., 2003; Boles et al., 2005; Karatan and Watnick, 2009; McDougald et al., 2012). De plus, chez certaines espèces, le mécanisme de détachement des cellules du biofilm peut être induit par un programme de mort cellulaire. La lyse cellulaire entraîne des espaces vides au sein du biofilm mature dont profite une sous-population de cellules pour se différencier et de détacher. Chez *P. aeruginosa*,

l'induction d'un bactériophage filamenteux pf4 est à l'origine de la mort cellulaire précédant la dispersion (Jeremy S. Webb et al., 2003) alors que chez *Pseudoalteromonas tunicata*, c'est la synthèse d'une protéine autotoxique AlpP qui est impliquée dans ce phénomène (Mai-Prochnow et al., 2006).

2.4.3. La formation de biofilm : réponse adaptative pour l'assimilation des HOC

Au sein d'un biofilm, les cellules se retrouvent typiquement à proximité de l'interface nutritive (à moins d'1 μm). En consommant les HOC directement dans la couche de diffusion, les bactéries augmentent l'intensité du gradient de concentration et accélèrent le transfert de masse du composé. Cependant, les mécanismes d'assimilation des HOC au sein des biofilms sont probablement multiples. Des mécanismes potentiels en rapport avec les caractéristiques du biofilm ont été proposés (Figure I.12). Les biopolymères de la matrice exopolymérique pourraient permettre d'augmenter la biodisponibilité des HOC en les adsorbant et les rendant ainsi plus accessibles pour un transfert direct vers la cellule, sans passer par les étapes de désorption et de diffusion. Bien qu'aucun relargage de biosurfactants dans le milieu de culture n'ait été observé chez les souches qui poussent au sein d'un biofilm, il est toutefois concevable que ces substances actives s'accumulent dans la matrice et participent dans la diffusion des HOC dans le biofilm. En effet, contrairement à un environnement naturel ouvert ; la matrice permettrait aux biosurfactants d'atteindre leur CMC ce qui permettrait la formation de micelles.

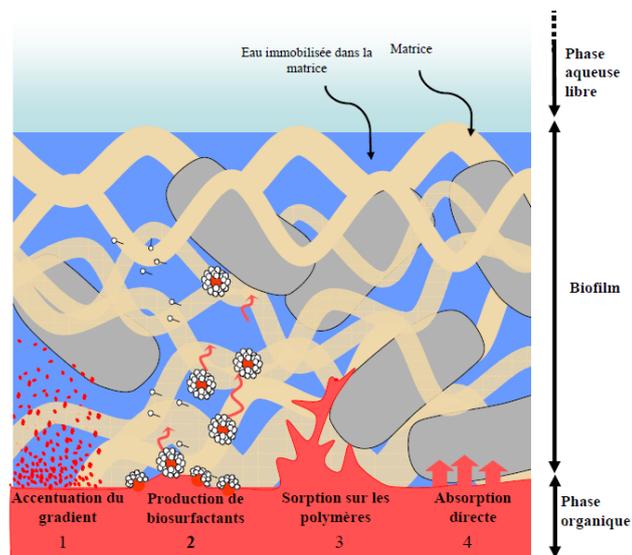


Figure I.12 : Mécanismes potentiels de la mobilisation des HOC au sein d'un biofilm à l'interface eau-HOC. 1- Solubilisation et diffusion dans la phase aqueuse immobilisée dans la matrice grâce à la création d'un gradient de concentration accentué. 2- Production de biosurfactants par les cellules et solubilisation des HOC dans des micelles. 3- Adsorption et diffusion des HOC sur les exopolymères de la matrice du biofilm. 4- Absorption directe des HOC par les cellules au contact de l'interface.

Les biofilms sur HOCs sortent des modèles classiques généralement utilisés pour étudier les biofilms. En effet, ces derniers se développent sur une interface nutritive qui fournit l'énergie et le carbone nécessaires à la croissance bactérienne, alors que les autres éléments (eau, O₂ par exemple) proviennent de l'autre face du biofilm, ce qui entraîne des gradients organiques et minéraux opposés qui influent nécessairement sur la dynamique morphologique et physiologique du biofilm. De plus, une autre originalité de ces biofilms est qu'ils ne se forment que sur des surfaces nutritives peu solubles. Cela impliquerait qu'il existe un déterminisme génétique qui permette à la bactérie de sentir la présence d'une surface, de sentir sa nature nutritive de s'adhérer puis de se développer sous forme de biofilm. Les biofilms sur les HOC sont certainement gouvernés par les mêmes principes que les biofilms qui se développent sur les surfaces inertes, mais les mécanismes moléculaires précis qui interviennent sont encore inconnus.

3. Etude de la formation de biofilm aux interfaces eau-HOC par la souche modèle *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17

Jusqu'à maintenant, seules quelques études poussées se sont intéressées à l'analyse de l'adaptation des bactéries hydrocarbonoclastes à travers la croissance en biofilm sur les HOC. Il s'agit par exemple des travaux menés sur les biofilms formés par *Acinetobacter oleivorans* DR1 et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 (Grimaud, 2010a; Jung et al., 2011). Comparé aux biofilms qui se développent sur des surfaces inertes, les connaissances rapportées sur les biofilms sur les HOC sont très faibles. De plus, il est difficile de corréliser les résultats obtenus sur les biofilms formés par différentes espèces bactériennes et sur différents substrats pour modéliser le fonctionnement de ces structures. Dans le but d'élargir les connaissances sur cet aspect encore très peu connu de la biologie des biofilms, le laboratoire étudie le mécanisme d'adaptation de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 depuis le début des années 2000. Cette souche bactérienne, isolée d'un sédiment contaminé, pour sa capacité à dégrader des alcanes, est capable de former des biofilms sur divers HOC et de les utiliser comme source de carbone et d'énergie, et représente un bon modèle pour étudier ce phénomène. Pour modéliser les mécanismes régissant cette stratégie bactérienne d'assimilation, les recherches sur ces biofilms ont pour objectifs de :

- Déterminer les modalités spatiales, temporelles et physiologiques de la croissance en biofilm sur les HOC
- Déterminer les mécanismes moléculaires qui permettent à la bactérie d'adhérer à une interface hydrophobe, sentir son statut nutritionnel pour ensuite se développer sous forme de biofilm.

3.1. Position taxonomique et écologie du genre *Marinobacter*

Le genre *Marinobacter* appartient à la classe gamma du phylum des *Proteobacteria*, à l'ordre des *Alteromonadales* et à la famille des *Alteromonadaceae*. Les bactéries de ce genre sont omniprésentes dans les environnements marins et possèdent des capacités métaboliques variées. Un total de 32 espèces différentes ont été décrites à ce jour, toutes provenant exclusivement d'environnements marins ou hypersalés tels que l'eau de mer, les sédiments marins, les glaces de l'Arctique et de l'Antartique, les sources marines hydrothermales, la banquise, le plancher océanique, les sols salés ou encore l'eau de production de puits de pétrole offshore (Duran, 2010; Grimaud, 2010b). Quelques espèces ont été trouvées associées au phyto ou zooplancton. Les bactéries de ce genre sont des bacilles à Gram-négatif aérobies,

mobiles, halophiles modérées, qui ne forment pas de spores. Elles ne sont pas fermentatives et la plupart d'entre elles peuvent respirer en utilisant le nitrate comme accepteur d'électrons en conditions anaérobies (Grimaud, 2010b). Comme d'autres bactéries marines hydrocarbonoclastes (HCB) (se référer à la section 1.3.2) appartenant aux genre *Alcanivorax*, *Cycloclasticus* et *Thalassolituus*, les *Marinobacter* jouent un rôle prépondérant dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers en milieu marin (Yakimov et al., 2007). C'est notamment le cas des souches *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 et *M. aquaeolei* VT8, désormais affiliée à l'espèce *M. hydrocarbonoclasticus*. Bien que l'utilisation des hydrocarbures soit une caractéristique fréquente du genre *Marinobacter*, elle n'est pas retrouvée chez toutes les espèces (Duran, 2010). Ces bactéries hydrocarbonoclastes utilisent une gamme de substrats restreinte aux hydrocarbures et leurs dérivés oxydés, aux lipides et aux petits acides organiques. Elles prolifèrent dans les eaux contaminées par du pétrole que plusieurs d'entre elles dégradent en formant un biofilm.

3.2. La souche *M. hydrocarbonoclasticus* SP17

3.2.1. *Etude physiologique de la formation de biofilm sur HOC*

La souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 a été isolée de sédiments marins du golfe de Fos sur Mer, aux abords d'une raffinerie de pétrole (Gauthier et al., 1992). Cette souche possède un flagelle polaire, une extrême halotolérance (jusqu'à 3.5 M de NaCl), est capable de croître entre 10 °C et 45 °C et tolère une variation de pH comprise entre 6 et 9.5. Sa croissance est optimale à une température de 32 °C pour un pH compris entre 7 et 7.5 et une concentration en NaCl de 0.6 M. En aérobiose, elle est capable de former des biofilms sur un large panel de HOC comme les alcanes de C₈ à C₂₈, les alcools gras, les cires et les triglycérides. Elle est par exemple capable de former un biofilm en 24 h à 30 °C sur du *n*-hexadécane et en moins de 3 jours sur des alcanes solides tels que l'eicosane (C₂₀) et l'octacosane (C₂₈). Ces molécules possèdent des températures de fusion et des solubilités variables qui autorisent la formation de biofilm sur des interfaces liquide/solide, liquide/liquide et liquide/gaz à température ambiante. Inversement, cette souche ne fait pas de biofilm sur des supports qu'elle ne peut pas métaboliser. C'est notamment le cas de l'heptaméthylnonane ou du pristane, des isomères ramifiés de l'hexadécane et du nonadécane, sur des substrats inertes comme le plastique ou le verre, même si de l'acétate est fourni comme source de carbone. La formation de biofilm par *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 serait donc spécifique des HOC nutritifs, ce qui sous-entend que le développement du biofilm est

soumis à des mécanismes de reconnaissance spécifique de l'interface en lien avec ses capacités métaboliques.

L'analyse des acides gras produits par *M. hydrocarbonoclasticus* lors de la métabolisation de divers hydrocarbures a permis de mettre en évidence la voie de dégradation des alcanes : elle commence par une oxydation en alcool primaire, une oxydation en aldéhyde puis en acide gras qui va par la suite être dégradé par la β -oxydation (Lattuari et al., 2002).

Alors que *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 forme un biofilm sur *n*-hexadécane lorsqu'elle est soumise à une faible agitation (50 rpm), à forte agitation le développement du biofilm est perturbé et la croissance bactérienne ainsi que le taux de dégradation de l'hexadécane sont fortement réduits (Klein et al., 2008) (Figure I.13). Le développement du biofilm est donc un facteur important pour améliorer l'assimilation de l'hexadécane. D'autre part, le temps de doublement des cellules du biofilm a été estimé entre 2 et 5 heures, suivant le stade de développement alors qu'il est de l'ordre de 3 h sur lactate (non publié). Le mode de développement en biofilm est donc un moyen très efficace pour la croissance et l'assimilation bactérienne des substrats quasi insolubles.

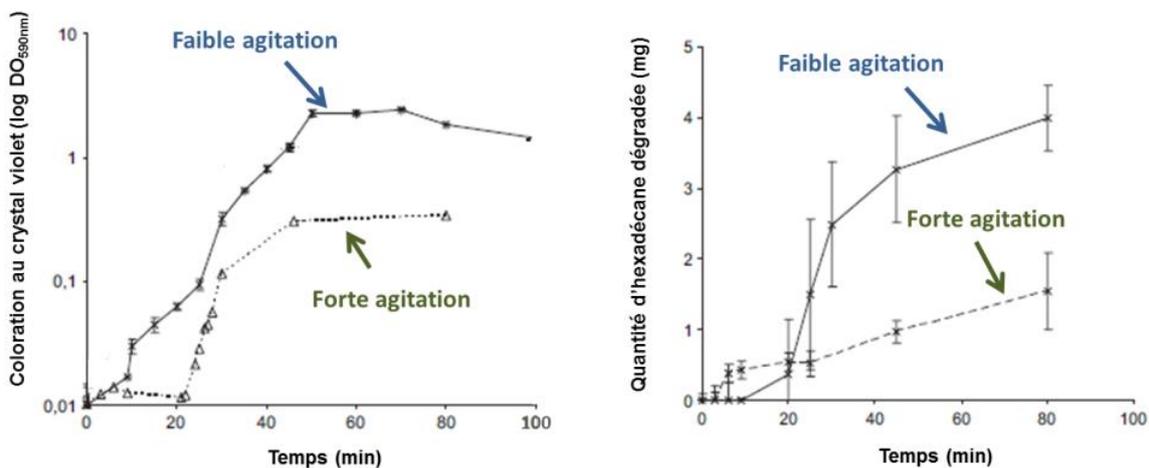


Figure I.13 : Cinétiques de la formation du biofilm de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 à l'interface eau-hexadécane (gauche) et de la dégradation de cet alcane (droite) (Klein et al., 2008).

La souche a été cultivée dans de l'eau de mer synthétique contenant 0,2 % (v/v) d'hexadécane, sous faible (50 rpm ; trait plein) ou forte (150 rpm ; trait en pointillés) agitation. La biomasse du biofilm a été mesurée par quantification au crystal violet des cellules retenues sur des filtres de 31 μ m.

3.2.2. Etude spatio-temporelle du développement du biofilm à l'interface eau-HOC

Les modalités spatio-temporelles du développement du biofilm de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sur les HOC ont pu être modélisées à travers divers travaux menés au laboratoire, en utilisant le *n*-hexadécane ($C_{16}H_{34}$ liquide à température ambiante), son isomère non métabolisable l'heptaméthylnonane, l'écicosane ($C_{20}H_{42}$, solide à température ambiante) et la paraffine (mélange d'alcane de C_{19} à C_{31} , solide à température ambiante).

- Analyse physico-chimique de l'interaction des cellules avec l'interface

Les étapes précoces de perception et d'adhésion à une surface sont primordiales pour initier le développement à l'état sessile. Pour explorer le processus d'adhésion, le comportement des cellules aux interfaces eau-alcane a été appréhendé en suivant les altérations mécaniques que subit l'interface via un tensiomètre dynamique à goutte (Klein et al., 2010) (Figure I.14). Il a été tout d'abord démontré que les cellules atteignent l'interface par une diffusion Brownienne et non par un mécanisme de mobilité active. Après adsorption, la baisse de la tension superficielle a montré que les bactéries relâchent un/des composé(s) tensioactif(s) (SAC) à la surface de la goutte dont la production dépend de la machinerie cellulaire de synthèse protéique. De plus, ces composés ne semblent pas être libérés hors de l'interface, car aucun effet lié à la présence d'un biosurfactant ou d'un émulsifiant n'a pu être détecté dans la phase aqueuse même après formation du biofilm mature. Ce comportement nous a conduits à proposer que ce/ces composé(s) pourraient être des substances polymériques précurseurs de la matrice du biofilm. A ce stade, les cellules ne semblent pas percevoir la nature de l'interface sur laquelle elles sont adsorbées, puisque le même comportement cellulaire est observé en présence de l'alcane ramifié non métabolisable, l'heptaméthylnonane. En revanche, la nature nutritive de l'interface contrôle le comportement cellulaire plus tardivement, car des regroupements en clusters ont été observés uniquement sur *n*-hexadécane, 2 h après le début de l'adsorption bactérienne. Par ailleurs, la présence dans la matrice d'un biofilm mature sur *n*-hexadécane de composés protéiques ayant une activité interfaciale a également été mise en évidence en tensiométrie dynamique. *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 secrèterait des protéines tensioactives dans la matrice extracellulaire durant la formation de biofilm (résultats non publiés).

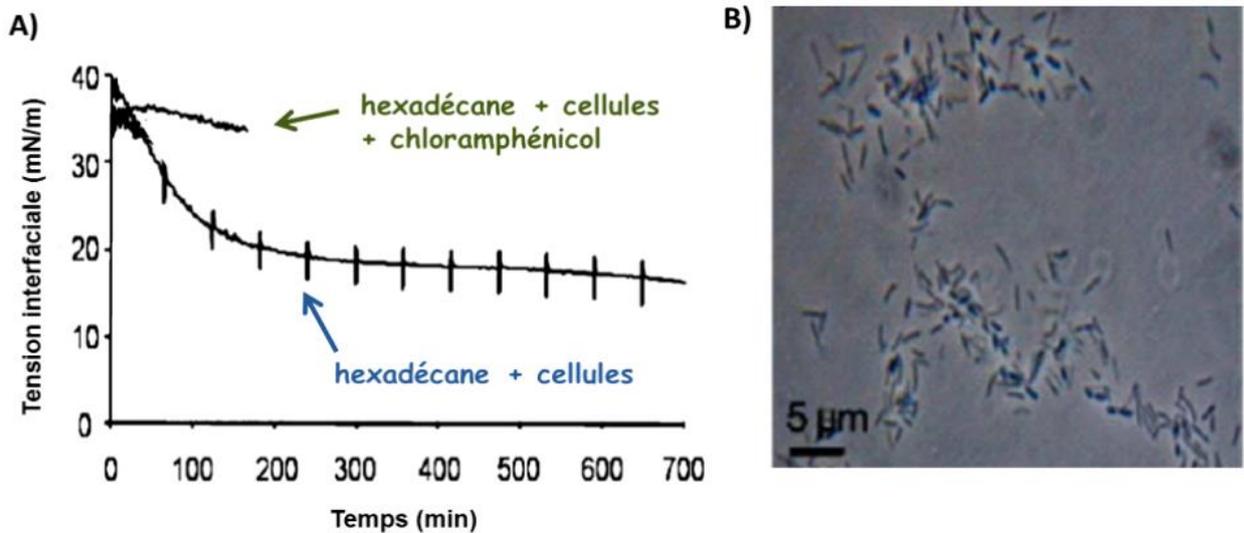


Figure I.14 : *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 s'adsorbe à l'interface eau-hexadécane puis produit un composé aux propriétés tensio-actives qui reste à l'interface.

A) Evolution de la tension interfaciale entre l'hexadécane et les cellules bactériennes en présence ou non de chloramphénicol. Les barres verticales représentent la réponse à la variation sinusoïdale du volume appliqué à la goutte. B) Image de microscopie à contraste de phase des cellules adsorbées à l'interface hexadécane-eau prise au bout de 240 min.

- Etude de l'architecture et des intermédiaires de développement du biofilm

L'observation de la structure des biofilms formés par *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 a été réalisée par microscopie confocale à balayage laser. La structure du biofilm mature formé autour d'une gouttelette d'hexadécane a tout d'abord été caractérisée (Figure I.15). Ce biofilm, d'environ 20 μm d'épaisseur, est hétérogène car il ne recouvre pas uniformément la surface de l'hexadécane. Il est constitué d'un ensemble de plusieurs couches de cellules englobées dans une matrice contenant un glycoconjugué, probablement un polysaccharide, mis en évidence par une lectine de PSA (lectines mannose-spécifiques).

Les différents stades de développement du biofilm ont pu être observés sur eicosane solide et paraffine solide (Figure I.16). En ce qui concerne le développement sur des cristaux d'éicosane (Figure I.16A), des cellules isolées adhérentes sont visibles. A 48 heures, les cellules sont regroupées en microcolonies, et une matrice est détectée par la lectine PSA. Les jours suivants, le biofilm se développe par l'expansion des microcolonies. A 120 heures, toute la surface de l'éicosane est recouverte par le biofilm. Pour ce qui est de la formation de biofilm sur paraffine (Figure I.16B), les cellules adhérentes sont visibles dès 15 minutes d'incubation, puis se développent sous forme de microcolonies. Un suivi de la formation de biofilm sur paraffine en ajoutant de la protéase et de la DNase a permis de mettre en évidence que les protéines ainsi que l'ADN extracellulaire ont des rôles importants dans la structure du biofilm.

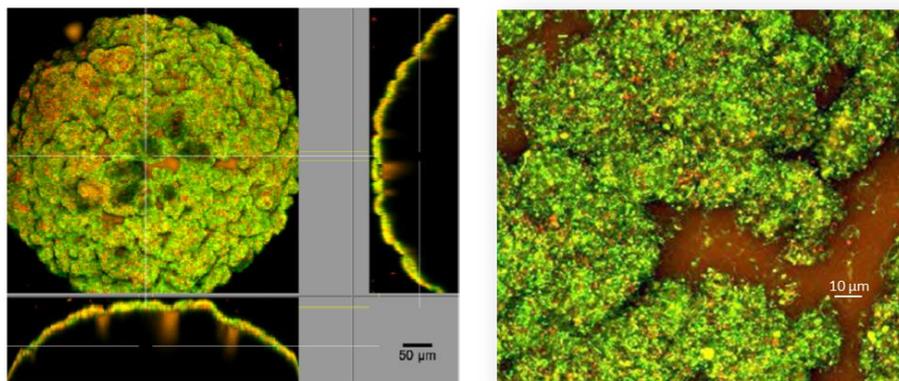


Figure I.15 : Projection tridimensionnelle et sections verticales d'un biofilm formé autour d'une gouttelette d'hexadécane (à gauche) et grossissement d'une région de la gouttelette (Grimaud, 2010b).

Images obtenues par microscopie confocale après 24 h d'incubation. L'hexadécane est marqué par le rouge Nile (orange) et la matrice d'exopolymère par la lectine PSA marquée par un fluorochrome vert.

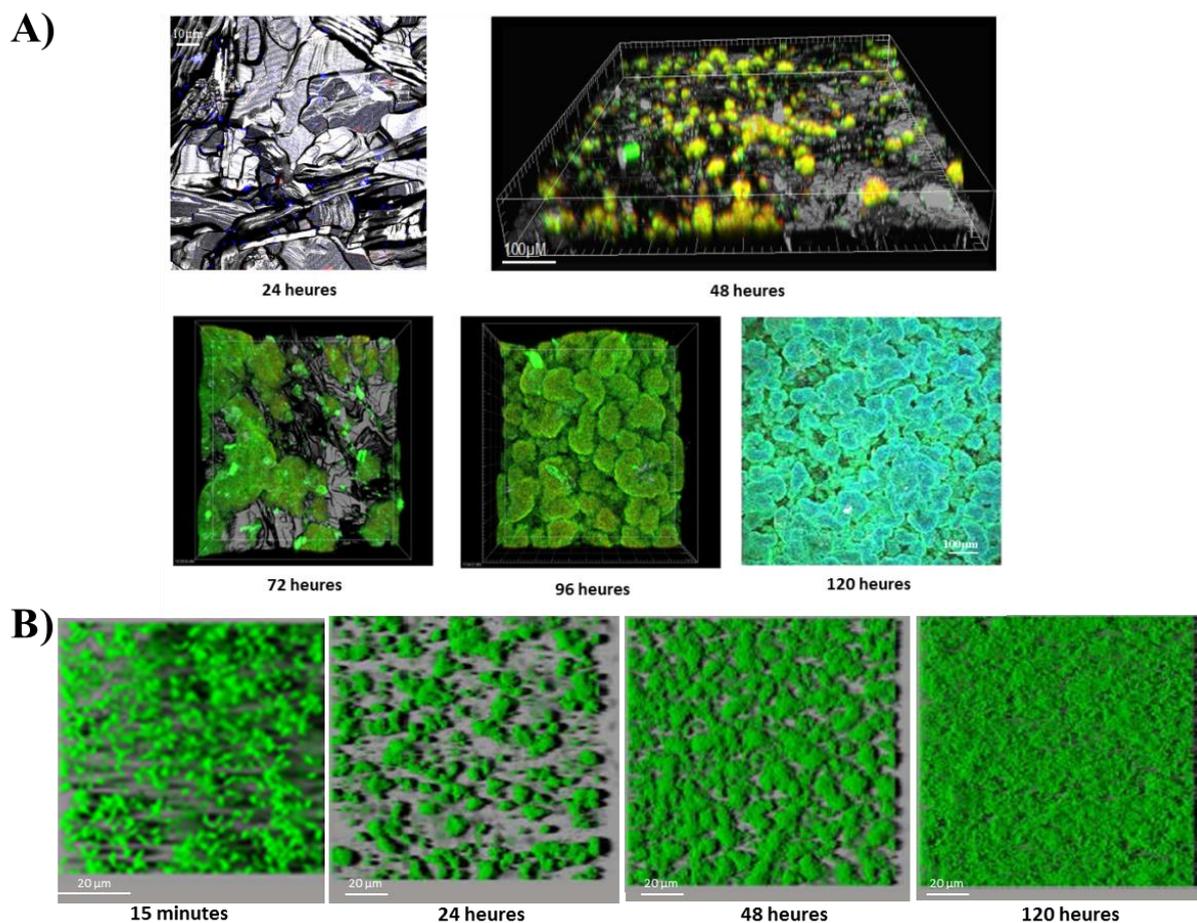


Figure I.16 : Développement du biofilm de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sur eicosane (Vaysse, 2009) (A) et paraffine (B) suivi par microscopie confocale.

Les surfaces des deux HOC visualisées par réflexion sont représentées en gris. Les bactéries sont mises en évidence par des marqueurs d'ADN : Syto 9 (vert) pour la paraffine et Syto 60 pour l'éicosane (rouge ou bleu). La matrice d'exopolymère est mise en évidence par la lectine PSA marquée par un fluorochrome vert.

Bien que les vitesses de formation du biofilm soient dépendantes de l'interface utilisée, les processus de développement semblent analogues. En effet, le biofilm formé après 24 h d'incubation sur des gouttelettes d'hexadécane ou sur paraffine, et au bout de 72 h sur eicosane, montrent la présence de microcolonies de formes comparables.

Enfin, quelque soit le HOC, le biofilm mature finit par se désagréger, pour une raison encore indéterminée. Une hypothèse est que les cellules au plus près de l'interface n'ont plus accès à suffisamment d'oxygène pour maintenir ce style de croissance.

- La diversité physiologique des cellules lors du développement du biofilm

Des cellules se détachent continuellement du biofilm, avant même que celui-ci n'ait atteint son stade mature (Klein et al., 2008). La croissance sur HOC donne alors lieu à la production de deux populations de cellules : cellules sessiles et détachées. Ces deux types cellulaires ont des caractéristiques physiologiques et morphologiques différentes. Les cellules du biofilm présentent de grosses inclusions lipidiques intra-cytoplasmiques de forme arrondie ou irrégulières alors que les cellules détachées possèdent des inclusions en forme de bâtonnets (Klein et al., 2008; Grimaud, 2010b) (Figure I.17). Si la composition en réserves lipidiques est similaire entre les deux populations de cellules avec une dominance pour l'hexadécylhexadécanoate, les cellules détachées contiennent 5 fois moins de cires que les cellules de biofilm (Klein et al., 2008). Bien que la quantité de cires des cellules détachées reste significative, elle ne semble pas permettre un apport suffisant en carbone et énergie pour soutenir la croissance de ces cellules qui n'ont plus accès à l'hexadécane, et qui de fait ne se divisent pas. La croissance bactérienne n'a lieu qu'au sein du biofilm. Cependant, les cellules détachées possèdent une quantité suffisante de carbone endogène pour leur assurer durant au moins 5 heures un taux de respiration comparable à celui des cellules en croissance (Vaysse, 2009).

Les cellules détachées présentent une tendance plus forte à se fixer à l'interface eau-hexadécane et forment un biofilm plus rapidement que des cellules en phase stationnaire ou en croissance exponentielle sur acétate (Vaysse et al., 2011). Cette particularité physiologique des cellules quittant le biofilm pourrait fournir un avantage écologique lors de la croissance sur HOC dans le milieu marin où réside *M. hydrocarbonoclasticus* SP17. Elle permettrait d'augmenter les chances de trouver une autre interface hydrophobe inoccupée afin de développer un biofilm dans un écosystème où la distribution en nutriments est rare et hétérogène.

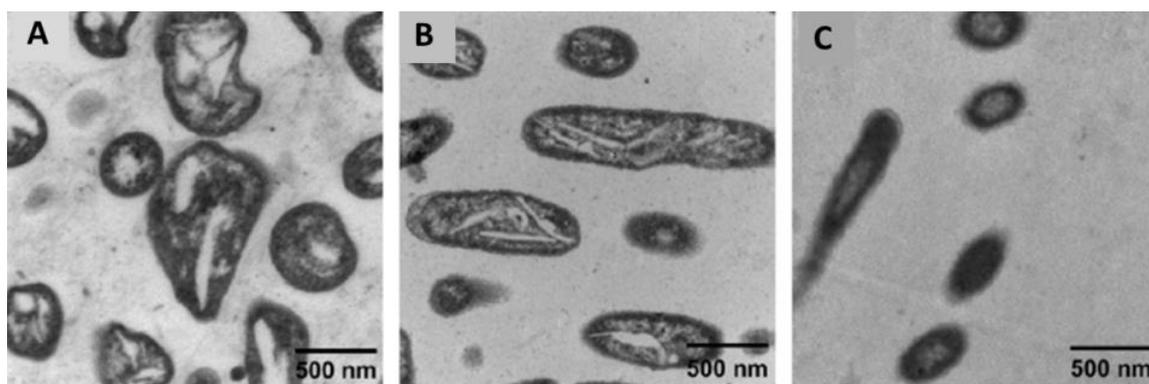


Figure I.17 : Images en microscopie électronique en transmission de la structure des inclusions lipidiques formées dans les cellules de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 du biofilm sur *n*-hexadécane (A), dans les cellules détachées (B) et dans les cellules planctoniques en croissance sur acétate (C) (Klein et al., 2008).

Ces différents travaux ont permis d'établir un modèle décrivant les différentes phases du développement du biofilm formé par *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sur une interface eau-HOC (Figure I.18).

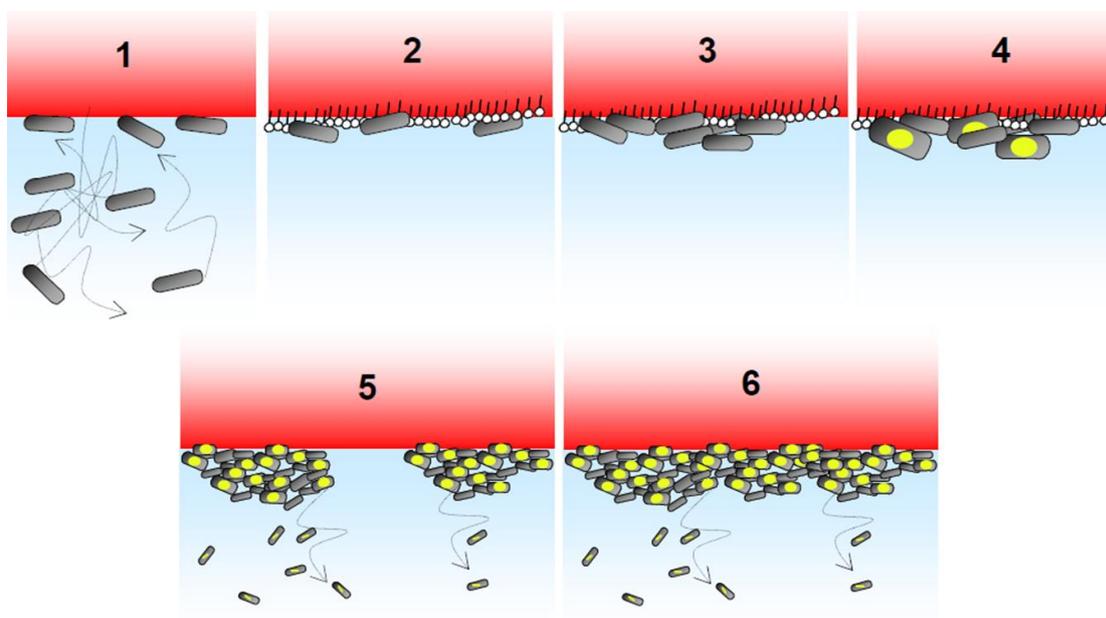


Figure I.18 : Modèle de développement du biofilm de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 à l'interface eau-alcane.

1) Les cellules atteignent l'interface par diffusion Brownienne. 2) Les cellules adsorbées libèrent un biosurfactant qui recouvre l'interface. 3) Formation d'amas cellulaire. 4) Accumulation de cires intracytoplasmiques dans les cellules adsorbées. 5) Formation de microcolonies et détachement de cellules. 6) Le biofilm recouvre la quasi-totalité de l'interface et le détachement de cellules se poursuit.

3.2.3. Mise en place de stratégies et d'outils génétiques pour l'étude des mécanismes moléculaires intervenant dans la formation de biofilm sur HOC

Suite à la description du développement physiologique et structural des biofilms à l'interface eau-alcane, une étude des mécanismes moléculaires de l'assimilation des HOC et de la formation de biofilm a été entreprise. La stratégie choisie consiste à identifier les gènes/protéines impliquées et ensuite à déterminer leurs activités et fonctions. Pour ce faire, les trois outils suivants ont été indispensables : 1) la séquence du génome de la souche modèle pour connaître l'ensemble des gènes; 2) un catalogue de gènes/protéines exprimés lors des étapes du développement du biofilm ; 3) des outils génétiques pour construire des souches mutées dans les gènes candidats.

- Séquençage du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17

Le séquençage du génome complet de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 a été réalisé par le GENOSCOPE dans le cadre d'un consortium de quatre laboratoires dont l'EEM de Université de Pau et des Pays de l'Adour (www.genoscope.cns.fr/spip/Marinobacter-hydrocarbonoclasticus,239.html) (Figure I.19A). Parmi les 3807 séquences codantes présentes sur les 3,99 Mb du génome, plusieurs codent des voies métaboliques potentiellement impliquées dans le catabolisme des alcanes (Grimaud et al., 2012). Cinq gènes d'enzymes de dégradation des alcanes ont été trouvés : deux alcane hydroxylases homologues de *alkB* et *alkM*, deux alcane hydroxylases de type cytochrome P450 de la famille CYP153 et une FAD-binding monooxygénase homologue à Alma (Figure I.19B). Les systèmes de transport d'électrons nécessaires au fonctionnement de ces enzymes sont également présents (Figure I.19B). Deux gènes d'alcool deshydrogénase et un d'aldéhyde deshydrogénase viennent compléter la gamme des gènes de la voie de dégradation des alcanes (Figure I.19B). Il est intéressant de noter la présence de deux gènes codant pour des enzymes de synthèse des cires, qui s'accumulent lors de la croissance sur l'hexadécane (Figure I.19B).

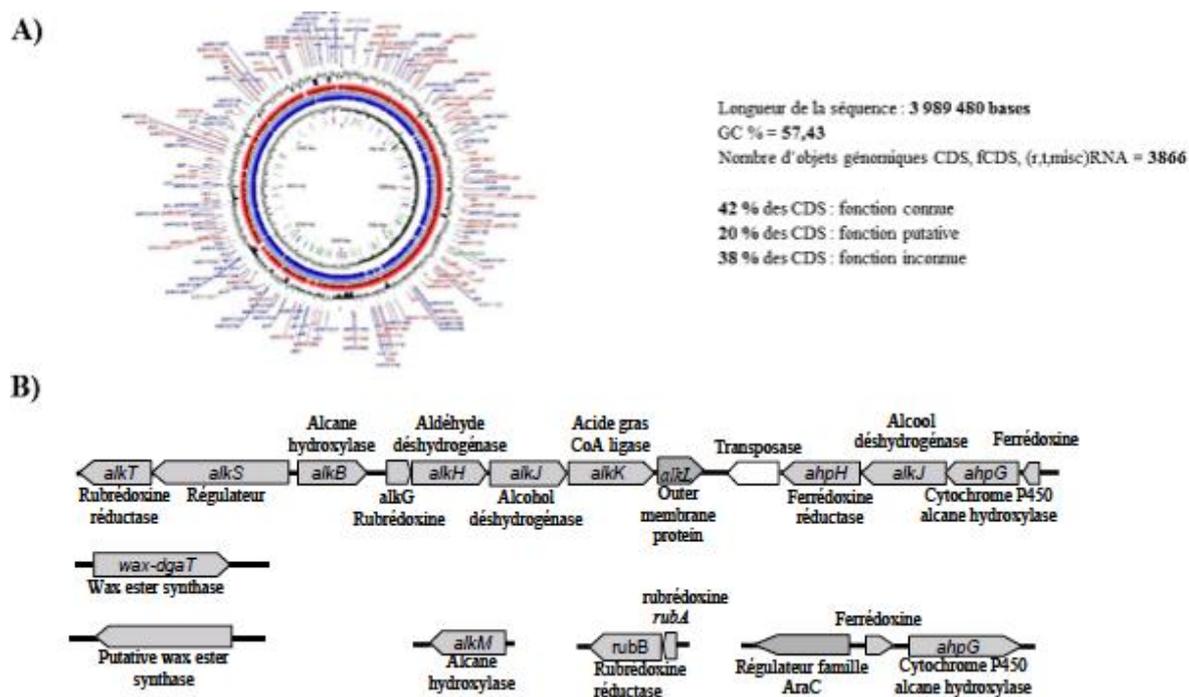


Figure I.19 : Caractéristiques générales du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (A) et organisation des gènes du métabolisme et de dégradation des alcanes (B).

Le génome contient également plusieurs gènes connus pour intervenir dans la formation des biofilms. Il existe deux régions contenant un grand nombre de gènes servant à la biosynthèse, l'export, la modification et la polymérisation des exopolysaccharides. Trois autres régions comprennent des gènes associés à la synthèse des pili, d'un flagelle et d'un système de quorum sensing. Sont également présentes 58 gènes codant des protéines contrôlant la concentration en GMP di-cyclique (diGMPc), un second messager considéré comme le régulateur central de la formation de biofilm et de l'alternance entre les croissances planctoniques et sessiles chez les bactéries à Gram-négatif. La fixation du di-GMPc sur ses effecteurs joue en particulier sur la régulation de l'adhésion, de la synthèse d'exopolysaccharides, de la formation ou du détachement des cellules du biofilm (Karatan and Watnick, 2009). *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 possède tous les gènes *lap*, connus pour contrôler l'adhésion et la formation de biofilm chez *P. fluorescens* (Hinsa et al., 2003). Enfin, cette bactérie possède de nombreux systèmes à deux composants, ce qui suggère qu'elle est susceptible de répondre à un grand nombre de stimuli extracellulaires.

- Etudes protéomiques

Grâce à la disponibilité du génome, une étude protéomique a pu être entreprise dans le but de dresser une liste de gènes impliqués dans la formation de biofilm sur HOC. Les

protéomes de quatre populations de cellules dans des états physiologiques distincts ont été comparés : des cellules du biofilm sur *n*-hexadécane, et de celles qui s'en sont détachées, cellules en phase exponentielle et stationnaire de croissance sur acétate.

Sur un total de 1144 protéines détectées par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide, 576 voient leur abondance modifiée en condition de biofilm sur hexadécane par rapport à la condition de croissance planctonique sur acétate (Vaysse et al., 2009). L'expression différentielle d'autant de protéines indique que la croissance sur hexadécane induit un changement important de la physiologie cellulaire impliquant de nombreuses fonctions cellulaires. Cinquante-huit de ces protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse. L'expression de nombreuses enzymes du métabolisme du carbone (cycle des acides tricarboxyliques et synthèse des acides gras) est modulée, avec une activation de la voie du glyoxylate et une inhibition de la synthèse des acides gras. Cette redirection du flux de carbone a été interprétée comme un mécanisme permettant le rééquilibrage entre l'assimilation du carbone, la production d'énergie et la synthèse d'acides gras lors de l'utilisation de l'hexadécane, une molécule hautement énergétique dont le catabolisme produit des acides gras.

Deux protéines codées par les gènes *MARHY0478* et *MARHY0477* sont fortement surproduites en condition biofilm sur hexadécane. Des analyses bioinformatiques de leur organisation génomique, de leur distribution phylogénétique et de leur conservation structurale suggèrent une implication dans la capture et le transport des alcanes à travers les enveloppes cellulaires.

Des composants d'un système de sécrétion de type VI (T6SS) sont également surexprimés par les cellules sessiles. Ce système de sécrétion était jusqu'alors uniquement connu pour intervenir dans la virulence de souches pathogènes ou dans des interactions symbiotiques avec des organismes hôtes. Les protéines de ce système font partie des protéines les plus surproduites de la condition sessile, avec la protéine *MARHY2686*, dont la fonction est inconnue. Inversement, la sous-unité majeure des pili de type IV, la piline *pilA*, est réprimé en condition de biofilm par rapport aux cellules en croissance exponentielle sur acétate. L'implication des pili de type IV a été démontrée dans de nombreux processus biologiques tels que l'adhésion, la formation de biofilm et la mobilité de type twitching. Le **Chapitre III**, **Chapitre IV** et le **Chapitre V** de ce mémoire sont respectivement consacrés à

l'étude du rôle de la protéine MARHY2686, des pili de type IV et du T6SS dans la formation de biofilm à l'interface eau-HOC.

Afin d'évaluer l'ampleur des changements d'expression des gènes survenant lors de la transition du mode biofilm au mode planctonique, le protéome des cellules détachées a été comparé à celui des cellules du biofilm et à celui des cellules planctoniques cultivées sur acétate, en phase de croissance exponentielle, et en phase stationnaire. Le profil d'expression protéique des cellules détachées n'est proche d'aucun des profils des autres états cellulaires choisis comme référence. Les cellules détachées possèdent un phénotype qui leur est propre, ne ressemblant pas à celui des cellules de biofilm ni à celui de cellules planctoniques non issues d'un biofilm. Néanmoins, la classification hiérarchique des profils d'expression regroupe les cellules détachées avec les cellules en phase stationnaire indiquant que les cellules détachées ont plus de traits communs avec des cellules en arrêt de croissance qu'avec celles du biofilm dont elles sont issues (Figure I.20). Ainsi l'ampleur du changement de l'expression des protéines mis en jeu lors de la transition du mode de vie biofilm vers le mode de vie planctonique est du même ordre de grandeur que celui observé pour la transition de l'état planctonique vers biofilm.

A)

	Cellules détachées	Cellules acétate phase expo.	Cellules acétate phase stat.
Biofilm hexadécane	731 (52%)	576 (41%)	692 (49%)
Cellules acétate phase stat.	374 (27%)	745 (53%)	
Cellules acétate phase expo.	792 (57%)		

B)

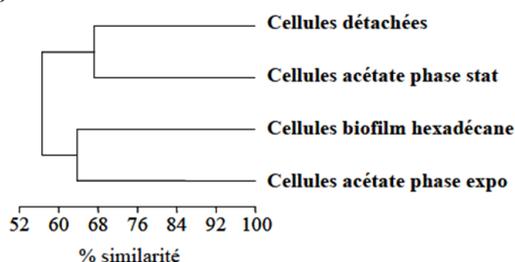


Figure I.20 : Comparaison des profils d'expressions protéiques entre les quatre types physiologiques de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (Vaysse et al., 2011).

A) Nombre de spots protéiques dont l'intensité varie entre les quatre conditions testées. **B)** Classification hiérarchique (Euclidienne) des états cellulaires basée sur l'analyse des données de protéomiques.

Deux protéines homologues de DsbA et CtpA sont détectées exclusivement dans les cellules détachées. CtpA est une protéase carboxy terminale, périplasmique responsable de la maturation de protéines destinées aux enveloppes cellulaires (Bandara et al., 2008). DsbA est une oxydoréductase qui catalyse la formation de ponts disulfures dans les protéines exportées. Les ponts disulfures sont importants car ils sont responsables de la stabilité et du repliement correct de transporteurs, de protéines de la membrane externe, d'adhésines, de la piline des pili de type IV, de protéines de système de sécrétion et d'enzymes sécrétées (Heras et al., 2009). L'expression accrue de CtpA et DsbA dans les cellules détachées suggère une importante translocation *de novo* de protéines vers le périplasme et/ou les enveloppes cellulaires. Le détachement des cellules du biofilm s'accompagnerait d'un remaniement de la composition protéique de leurs enveloppes. D'autres protéines impliquées dans le stress oxydatif, LsfA, dans la division cellulaire, MraZ, dans l'homéostasie du fer, Fur, ont été trouvée régulées de façon similaire dans les cellules détachées et dans les cellules en phase stationnaire de croissance sur acétate. Ces protéines sont caractéristiques de l'arrêt de croissance, il est tout à fait cohérent de les retrouver dans les cellules détachées qui sont en arrêt de croissance. Enfin, la sous-unité des pili de type IV, la piline pilA, est surproduite dans les cellules détachées par rapport aux autres états physiologiques. Ce phénomène aurait un avantage écologique, puisqu'il permettrait aux cellules détachées d'améliorer leur capacité à s'adhérer et recoloniser d'autres surfaces nutritives libres.

- Etudes transcriptomiques

Les études protéomiques ont permis d'identifier quelques protéines intervenant potentiellement dans le biofilm sur hexadécane. Cependant ces travaux se sont limités à l'étape de biofilm mature, en occultant les étapes d'adhésion, de reconnaissance du substrat et de développement précoce du biofilm. Les différences moléculaires qui peuvent distinguer des biofilms formés sur différents types de substrats n'ont pas non plus été prises en compte. Pourtant, tout autant que le développement du biofilm, la reconnaissance de l'interface et l'adhésion à cette interface sont des mécanismes fondamentaux pour l'assimilation des HOC.

Une étude de transcriptomique a alors été menée chez la souche modèle *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, en utilisant la technique des micropuces à ADN pour apporter une analyse comparative des profils transcriptionnels des cellules dans les conditions suivantes :

- 15 min et 3 h d'adhésion sur différentes interfaces hydrophobes nutritives (hexadécane, trioléine) ou non (heptaméthylnonane + acétate = HMNAc). Dans le cas du HMN, alcane non métabolisable par la souche, les cellules peuvent y adhérer mais ne peuvent pas le consommer et développer un biofilm à l'interface. L'ajout d'acétate en solution dans le milieu permet d'éviter de mesurer des effets liés à une carence carbonée.
- Un témoin réalisé sur les cellules servant à la cinétique d'adhésion permet d'avoir une référence équivalente au temps 0.
- Biofilm mature (20 h) sur hexadécane et trioléine.
- Un témoin correspondant à une croissance exponentielle planctonique sur acétate permettra de comparer ces résultats avec ceux obtenus par protéomique.

L'analyse des résultats transcriptomiques montre que sur les 3875 gènes codants ou non codants testés, 2693 ont leur expression affectée (toutes conditions confondues). La hiérarchisation des groupes d'expression se fait essentiellement selon la condition physiologique plutôt que selon la nature du HOC utilisée (Figure I.21). En effet, les profils d'expression obtenus dans les conditions de biofilm mature se regroupent entre eux et sont bien distincts des cellules adhérees.

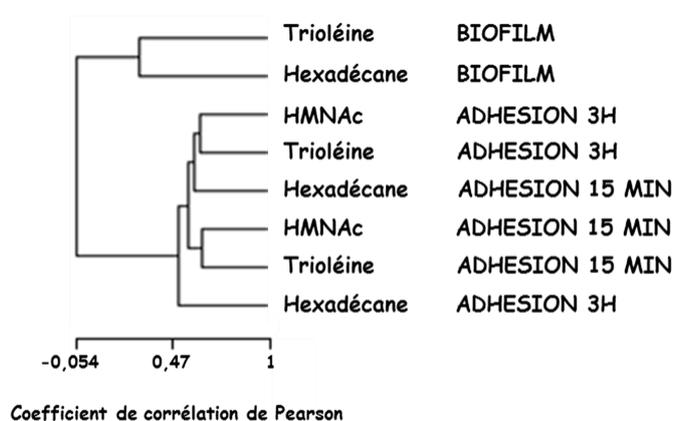


Figure I.21 : Comparaison des profils d'expression géniques entre les conditions physiologiques.

La clusterisation a été réalisée à l'aide de Mev. Les paramètres utilisés sont : coefficient de relation de Pearson et un rapport moyen.

Par ailleurs, l'analyse des profils d'expression a permis de noter que les gènes de fonctions inconnues représentent plus de la moitié du nombre total des gènes différemment exprimés quelle que soit la condition. Cela suggère que de nombreux

mécanismes cellulaires intervenant dans la détection spécifique de l'interface, l'adhésion puis la formation de biofilm sont encore inconnus, renforçant l'intérêt suscité pour cette recherche.

Les gènes connus pour intervenir dans le catabolisme des alcanes sont spécifiquement induits en présence d'hexadécane. Cette observation est d'un grand intérêt puisqu'elle permet de valider les résultats obtenus lors de cette étude de transcriptomique.

L'analyse comparative des profils d'expression obtenus lors de la formation d'un biofilm mature a fait l'objet d'un article auquel j'ai participé (Mounier et al., soumis, voir **Annexe 1**). Il a été soumis dans le journal FEMS Microbiology Ecology. C'est pourquoi, seuls quelques résultats les plus marquants détectés lors de l'adhésion aux différents HOC seront présentés.

Le gène codant une protéine d'adhésion homologue à LapA (Large Adhesive Protein) (se référer à la section 2.3.3) est surexprimé dès 15 min et 3 h de contact sur tous les substrats, alors qu'il est réprimé dans les cellules sessiles. Cela suggérerait que cette protéine soit impliquée dans l'adhésion irréversible de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 au support lors des premières étapes de la formation de biofilm. La majorité des gènes du T6SS sont surexprimés après 3 h d'adhésion sur trioléine et deux d'entre eux dans les cellules sessiles se développant sur hexadécane. Cette surexpression est cohérente avec les résultats protéomiques de Vaysse et al. (2009) (Pour plus d'information, se référer au **Chapitre V** qui est consacré à l'étude fonctionnelle des T6SS). Un autre groupe de gènes intéressants concerne ceux impliqués dans la mobilité et le chimiotactisme. Au total, 102 gènes annotés comme intervenant dans la mobilité et le chimiotactisme, soit par l'intermédiaire du pilus, du flagelle ou des systèmes de taxie montrent une modification de leur expression en conditions d'adhésion ou de biofilm. Ils sont généralement surexprimés lors des étapes précoces de la formation de biofilm alors qu'ils sont réprimés en condition de biofilm mature. Plus de détails sont présentés dans le **Chapitre IV** qui traite des travaux menés sur l'étude de l'implication des flagelles et des pili de type IV dans la formation de biofilm sur les HOC. Enfin, un autre résultat marquant a été de remarquer que le facteur de transcription RpoN est spécifiquement surexprimé en condition d'adhésion, dès 15 min de contact, suggérant qu'il puisse contrôler l'adhésion cellulaire aux interfaces HOC-eau. De plus, la plupart des gènes qu'il régule potentiellement sont différenciellement exprimés par les cellules de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 lors des étapes initiales et tardives de la formation de biofilm. Des informations supplémentaires sur le

facteur rpoN sont fournies dans le chapitre dédié à comprendre son rôle dans la formation de biofilm (**Chapitre IV**, partie 5).

- Développement d'outils génétiques pour comprendre les mécanismes moléculaires de formation de biofilm sur HOC

La mise au point d'outils génétiques est nécessaire afin d'appréhender les mécanismes moléculaires de la formation de biofilm sur les interfaces eau-HOC. Par la sélection de mutants affectés dans la formation de biofilm, ils permettent d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans ce processus. D'une part, l'inactivation d'un gène et l'analyse du phénotype qui en résulte permet d'obtenir des informations sur sa fonction. D'autre part, la sélection ou la construction de mutants ponctuels peut apporter de précieuses informations sur, par exemple, la relation structure-fonction d'une protéine ou encore sur la régulation d'un gène. Pour appliquer toutes ces analyses à la souche *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, il est indispensable de pouvoir manipuler génétiquement la bactérie en développant des outils génétiques adaptés. Certaines de ces méthodes ont été développées pendant cette thèse. Tout d'abord un protocole de conjugaison avec une souche d'*E. coli* (S17-1) portant les fonctions de transfert du plasmide à large spécificité d'hôte RP4 a été développé et optimisé pour introduire des plasmides suicides et répliatifs dans *M. hydrocarbonoclasticus* SP17. L'insertion aléatoire de miniTn5 ou de ses dérivés a également été mise au point, ce qui offre la possibilité de réaliser des mutagenèses aléatoires, des expériences de «promoter probing» ou de «gene activation tagging». De la même façon, *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 possède un site d'intégration du miniTn7. Cette option permet d'envisager l'approche de complémentation fonctionnelle ainsi que l'intégration stable de transgènes dans le génome dans une région non codante. Il a été ainsi possible d'exprimer de façon constitutive des gènes rapporteurs fluorescents dans un fond génétique sauvage. Enfin, l'inactivation de gènes par échange d'allèles où l'allèle sauvage peut être remplacé par une version inactivée par délétion ou par l'insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique a également été menée à bien en utilisant le plasmide suicide pKAS32. Cette méthode de construction de mutants, qui a nécessité des étapes d'optimisation, peut être utilisée pour déterminer la fonction de gènes identifiés au cours d'expériences de protéomique, transcriptomique et de mutagenèse aléatoire.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture de souches bactériennes

1.1. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Marinobacter adhaerens* et *Marinobacter aquaeolei*

1.1.1. Croissance planctonique

Les bactéries utilisées lors de cette étude sont des dérivés de la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 résistante à la streptomycine (JM1) qui est un mutant spontané obtenu au laboratoire à partir de la souche sauvage *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (souche ATCC 49840) (Gauthier *et al.*, 1992) (Tableau II.1). D'autres espèces du genre *Marinobacter* ont été également utilisées : *Marinobacter adhaerens* HP15 (Grossart *et al.*, 2004) et ses dérivés, ainsi que *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Huu *et al.*, 1999) (Tableau II.1).

Ces souches sont cultivées à 30°C sous forte agitation (200 rpm) dans un milieu minimum d'eau de mer synthétique (EMS) (NaCl 0,2 mol.L⁻¹, KCl 10 mmol.L⁻¹, Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 7,8, NH₄Cl 56 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 427 µmol.L⁻¹, FeSO₄ 8 µmol.L⁻¹, MgSO₄ 65 mmol.L⁻¹ et CaCl₂ 13 mmol.L⁻¹) (Gauthier *et al.*, 1992), et dans un milieu riche appelé (Halo) (NaCl 0,17 mol.L⁻¹, Na₃-citrate 11,6 mmol.L⁻¹, MgSO₄ 81,6 mmol.L⁻¹, K₂HPO₄ 3,4 mmol.L⁻¹, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 0,17 mmol.L⁻¹, protéose peptone 5 g.L⁻¹ et extrait de levure 1 g.L⁻¹). Ces souches sont cultivées en utilisant comme source de carbone l'acétate de sodium ou le lactate de sodium (20 mmol.L⁻¹). Selon les géotypes, les milieux ont été supplémentés avec streptomycine (100 µg/mL), kanamycine (100 µg/mL, 500 µg/mL ou 35µg/mL) chloramphénicol (25 µg/mL ou 35 µg/mL) et gentamycine (30 µg/mL). Les souches *Marinobacter sp.* et leurs dérivées sont maintenues sur milieu solide EMS agar 1.4 % supplémenté de 20 mM de lactate.

Tableau II.1 : Liste des souches de *M. hydrocarbonoclasticus* et *M.adhaerens* utilisées et construites, leurs caractéristiques et leur utilisation.

Souche	Génotype/caractéristiques	Utilisation/description	Référence/ origine
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17, ATCC 49840	type sauvage, <i>Mh</i> SP17 Sm ^S	isolat original	Gauthier et al., 1992
JM1	<i>rpsLK58T</i> , Sm ^R	mutant spontané résistant à la streptomycine ; souche considérée ici comme le type sauvage	cette étude
AC1	JM1, Δ <i>MARHY2686::aphA</i> ; Sm ^R , Km ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY2686</i> chez JM1	cette étude
AC1 (+)	JM1, Δ <i>MARHY2686::aphA(+)</i> ; Sm ^R , Km ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY2686</i> chez JM1	cette étude
AC2	JM1, Δ <i>MARHY2686 null</i> ; Sm ^R (stratégie1)	mutant "in-frame" du gène <i>MARHY2686</i> chez JM1	cette étude
AC3	JM1, Δ <i>MARHY2686</i> ; Sm ^R (stratégie2)	mutant "in-frame" du gène <i>MARHY2686</i> chez JM1	
AC4	JM1, Δ <i>fleR::aphA</i> ; Sm ^R , Km ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY1304 (fleR)</i> chez JM1	cette étude
HE1	JM1, <i>pilQ::miniTn5</i> ; Sm ^R , Km ^R	mutant d'insertion du miniTn5 dans le gène <i>MARHY0701 (pilQ)</i> chez JM1	Habiba Ennouri
AC5	JM1, Δ <i>pilA::aphA</i> ; Sm ^R , Km ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY2564 (pilA)</i> chez JM1	cette étude
AC6	JM1, Δ <i>pilH::cat</i> ; Sm ^R , Cm ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY3672 (pilH)</i> chez JM1	cette étude
AC7	JM1, Δ <i>pilV::cat</i> ; Sm ^R , Cm ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY0742 (pilV)</i> chez JM1	cette étude
AC8	JM1, Δ <i>mshJ::cat</i> ; Sm ^R , Cm ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY0617 (mshJ)</i> chez JM1	cette étude
AC9	JM1, Δ <i>rpoN::cat</i> ; Sm ^R , Cm ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY2599 (rpoN)</i> chez JM1	cette étude
AC10	JM1, Δ <i>MARHY2995::aphA</i> ; Sm ^R , Km ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY2995</i> chez JM1	cette étude
AC11	JM1, Δ <i>MARHY3635::aphA</i> ; Sm ^R , Km ^R	mutant "knockout" du gène <i>MARHY3635</i> chez JM1	cette étude
AC12	AC1, <i>attTn7::[mini-Tn7T-Gm-P_{A1/04/03}-MARHY2686]</i> ; Sm ^R , Km ^R , Gm ^R	AC1 portant le gène sauvage <i>MARHY2686</i> ; utilisé pour la complémentation	cette étude
AC12(+)	AC1(+), <i>attTn7::[mini-Tn7T-Gm-P_{A1/04/03}-MARHY2686]</i> ; Sm ^R , Km ^R , Gm ^R	AC1(+) portant le gène sauvage <i>MARHY2686</i> ; utilisé pour la complémentation	cette étude
AC13	JM1, <i>attTn7::[mini-Tn7T-Gm-eyfp]</i> ; Sm ^R , Gm ^R	JM1 marquée avec une protéine fluorescente jaune (eyfp)	cette étude
AC14	JM1, pMP7605	JM1 contenant le plasmide pBBR1MCS-5 portant le gène <i>mcherry</i> codant pour une protéine fluorescente sous le contrôle du Ptac	cette étude
AC15	AC3, <i>attTn7::[mini-Tn7T-Gm-P_{A1/04/03}-MARHY2686]</i> ; Sm ^R , Gm ^R	AC3 portant de gène <i>MARHY2686</i> ; utilisé pour la complémentation	cette étude
AC16	AC4, Δ <i>MARHY2564::aphA</i> ; <i>attTn7::[mini-Tn7T-Gm-P_{A1/04/03}-MARHY2564]</i> ; Sm ^R , Km ^R , Gm ^R	AC2 portant le gène sauvage <i>MARHY 2564</i> sous le contrôle du P _{A1/04/03} ; utilisé pour la complémentation	cette étude
<i>M. adhaerens</i>			
HP15 HP15- Δ <i>fliC</i>	type sauvage Δ <i>fliC</i> , Cm ^R	Isolat original mutant de délétion du gène <i>fliC</i>	Grossart et al., 2004 (Sonnenschein et al., 2011)

1.1.2. Protocole de contact des cellules à divers composés

- Adhésion à un HOC

Voir section 4.1.1.

- Contact des cellules avec des extraits d'algues

Les cellules sont cultivées en duplicatas dans 50 mL d'EMS supplémenté avec 20 mM d'acétate de sodium à 30°C sous agitation (150 rpm), jusqu'à la phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} comprise entre 0.3 et 0.5). Les cultures ont été centrifugées à $10\,000 \times g$ pendant 15 minutes à température ambiante et les culots cellulaires ont été repris dans 10 mL d'EMS frais. 4 ml d'EMS contenant une source de carbone (glycolate), un extrait cellulaire (algue ou *E. coli*), ou un exsudat de l'algue *Alexandrium catenella* ont été ajoutés à cette suspension cellulaire, qui a été ensuite incubée à 30°C pendant 1 h sous faible agitation (50 rpm). Les cellules ont été récupérées par centrifugation pendant 15 min à $13\,000 \times g$ à 30°C puis congelées à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN. Les extraits cellulaires et les exsudats d'*A. catenella* et de DH5 α λ pir ont été réalisés en centrifugeant les cultures à $10\,000 \times g$ pendant 15 min. Le surnageant de la culture d'algues considérée comme l'exsudat, a été utilisé comme tel pour l'expérience d'induction. Les culots cellulaires d'algues et d'*E. coli* ont été resuspendus dans de l'EMS puis soniqués 2 min à 35W et avec des pulses de 500 ms.s⁻¹ (Sonifier 450, Branson). Les extraits obtenus ont ensuite été ajoutés aux suspensions de JM1.

Alexandrium catenella est un dinoflagellé de l'étang de Thau qui nous a été gracieusement fourni par l'équipe ETDA 'L'équipe Efflorescences Toxiques, Diversité Algale' (ETDA) du laboratoire 'Ecologie des systèmes marins côtiers' (Ecosym) de l'Université Montpellier 2.

1.1.3. Culture en biofilm sur composés organiques hydrophobes (HOC)

Des cultures ont été réalisées en milieu EMS liquide supplémenté avec 20mM d'acétate de sodium et contenant les antibiotiques appropriés. Après incubation toute une nuit à 30°C sous forte agitation (200 rpm), les cellules en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} comprise entre 0.3 et 0.5) sont culottées (15 min à $10\,000 \times g$) et resuspendues dans du milieu frais sans source de carbone à une DO_{600nm} de 0.1.

Pour le suivi de la formation de biofilms sur des substrats hydrophobes liquides (hexadécane, trioléine), 0,2 % (v/v) de ces composés sont rajoutés et la culture est incubée à 30 °C sous faible agitation (50 rpm) pendant environ 24 h.

Dans le cas de la formation de biofilms sur des substrats solides, les composés tels que la paraffine (0,25 g), (tri)palmitate (0,28 g), hexadécanol (0,2 g) ou hexadécyl-hexadécanoate (0,2 g), sont déposés dans des puits de microplaques en polystyrène à 24 puits (Evergreen Scientific) Après 1 h à 90 °C, les composés sont liquéfiés, tapissant ainsi le fond des puits. Après solidification des substrats, l'inoculum (1,5 mL) en phase exponentielle et ramené à une DO_{600 nm} de 0.1 est ajouté dans les puits, puis les microplaques sont incubées à 30 °C et 100 rpm.

1.1.4. Suivi de la formation du biofilm par dosage au cristal violet et par dosage des protéines totales

La cinétique de formation de biofilms sur substrats solide et liquide est mesurée par deux méthodes différentes : soit par coloration au cristal violet, soit par un dosage des protéines totales contenus dans l'échantillon en utilisant le kit « QuantiPro BCA Asssay Kit ». En ce qui concerne la coloration au cristal violet, ce dernier se fixe sur le peptidoglycane des cellules restées fixées à la surface du substrat et permet alors d'estimer la biomasse présente au sein du biofilm. Dans le cas du dosage BCA (acide bicinchoninique), le dosage colorimétrique de solutions de BSA de concentrations connues est réalisé, pour établir une courbe d'étalonnage qui sert à évaluer la concentration en protéines dans l'échantillon à tester et par conséquent à estimer la biomasse totale obtenue.

- Substrat solide

Après incubation des inocula sur les puits des microplaques contenant le composé hydrophobe solide, le milieu de culture est délicatement aspiré avec une micropipette puis les cellules adhérentes à la surface du solide sont colorées pendant 3 min avec 400 µL de cristal violet à 1 % (m/v). Après deux lavages à l'eau milliQ (2 mL), le cristal violet est extrait avec 750 µL d'une solution de décoloration contenant 10 % (v/v) d'acide acétique et 50 % (v/v) d'éthanol. L'absorbance de cette solution est finalement mesurée à 590 nm. Quatre réplicats sont réalisés pour chaque dosage.

Le dosage des protéines totales en utilisant le kit « QuantiPro BCA Asssay Kit » est réalisé pour évaluer la biomasse contenue à la fois dans un échantillon de biofilm et dans le surnageant de celui-ci. Cette méthode est basée sur la formation de complexes protéine-ions cuivre Cu²⁺ en conditions alcalines suivie de la réduction des ions Cu²⁺ en ions Cu⁺. Le BCA

forme un complexe bleu-violet avec les ions Cu^+ dont le maximum d'absorbance est à 562 nm. Cette méthode permet de mesurer précisément des concentrations protéiques allant de 0,5 à 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Le dosage colorimétrique est réalisé selon le protocole du fabricant du kit. Il permet le dosage de solutions protéiques contenant jusqu'à 5 % (m/v) de SDS.

Pour obtenir les protéines des cellules détachées, 1 mL de surnageant est récupéré et centrifugé à $10\,000 \times g$ pendant 10 min à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 1mL de SDS 5%. Les cellules du biofilm sont récupérées par pipetage avec 1mL de SDS 5%. Les différentes concentrations en BSA pour la courbe d'étalonnage sont réalisées dans une solution de SDS à 5%. Trois dilutions ont été réalisées pour le dosage colorimétrique et ce pour chaque triplicat.

- Substrat liquide

Les cultures de biofilm sur substrats liquides sont réalisées en incubant 10 mL de suspension cellulaire dans un flacon penicilline de 50 mL contenant 0.2% (v/v) d'hexadecane ou de trioléine à 30°C sous agitation à 50 rpm. Pour chaque dosage la totalité de la culture a été filtrée sur membrane de nylon de 33 μm de porosité (Nitex[®]). Le biofilm retenu sur le filtre est coloré pendant 3 min avec 300 μL de cristal violet à 1 % (m/v), rincé deux fois avec 10 mL d'eau distillée puis le colorant est extrait avec 10 mL d'une solution de décoloration contenant 10 % (v/v) d'acide acétique et 50 % (v/v) d'éthanol. L'absorbance de la solution de décoloration a été mesurée à 590 nm. Trois réplicats sont réalisés pour chaque dosage.

1.1.5. Tests de toxicité vis-à-vis de divers composés

- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice en milieu liquide

Déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) signifie trouver la plus petite concentration de substance toxique (les antibiotiques, les solvants...) inhibant la croissance visible bactérienne. Elle permet de déterminer la vulnérabilité d'une bactérie vis-à-vis d'un produit toxique.

La CMI de JM1 a été déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide sur différentes substances toxiques : les antibiotiques (tétracycline et le chloramphénicol), sels biliaires, toluène, SDS. Une gamme de concentrations décroissantes de ces substances est réalisée par dilutions 1/2 successives (sauf spécifications contraires) à partir d'une solution mère : de 32 mg/mL à 1 mg/mL pour le chloramphénicol, de 1024 à 2 mg/mL pour la tétracycline, de 5000 à 5 ppm pour le toluène, de 500 $\mu\text{g/mL}$ à 15 $\mu\text{g/mL}$ pour le SDS et de

500 µg/mL, 750 µg/mL, 1000 µg/mL et 1250 µg/mL pour les sels biliaires. La CMI a été déterminée comme étant la concentration minimale en substance qui inhibait la croissance planctonique après incubation à 30 °C sous forte agitation (200 rpm).

- Toxicité vis-à-vis des composés insolubles

Pour tester la toxicité de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 vis-à-vis de certains composés hydrophobes, la détermination des CMI n'est pas applicable. Dans le cas du butanol et du dodécanol, la croissance des cultures bactériennes contenant 0.1 % (v/v) de ces composés et 20 mM d'acétate de sodium a été suivie à travers l'observation de la turbidité. La toxicité de vapeurs de *n*-hexadécane, d'héxane et du pétrole brut (Bilondo), a été testée en suivant chaque jour la croissance des souches JM1 et AC1 striées sur des boîtes EMS agar + DL-lactate et du papier wattman imbibé par 200 µL de chacun de ces composés hydrophobes.

- Toxicité vis-à-vis du *n*-hexadécane pseudo-solubilisé dans du Brij 58

Des cultures ont été réalisées en milieu EMS liquide supplémenté avec 20 mM d'acétate de sodium et 4 mM de Brij[®] 58. Après incubation à 30°C sous forte agitation (200 rpm), les cellules en phase stationnaire de croissance ($DO_{600\text{ nm}} \sim 0.7$) sont culottées (15 min à $10\,000 \times g$), lavées deux fois et resuspendues dans du milieu frais EMS contenant 4 mM de Brij[®] 58 à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.1 et 0.2 % (v/v) de *n*-hexadécane. Les cultures sont incubées à 30 °C et 200 rpm jusqu'à une $DO_{600\text{ nm}} \sim 0.7$ pour les pré-adapter au Brij[®] 58 et au *n*-hexadécane. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation (15 min à $10\,000 \times g$), lavées une fois avec du milieu EMS contenant 4 mM de Brij[®] 58 et resuspendues à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.1 dans du milieu frais EMS contenant 4 mM de Brij[®] 58, du *n*-hexadécane préalablement solubilisé pendant 72 h et 20 mM d'acétate de sodium. La croissance cellulaire a été suivie à $DO_{600\text{ nm}}$ en triplicats.

1.2. *Alcanivorax borkumensis*

1.2.1. *Culture planctonique*

La souche *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Yakimov et al., 1998) est cultivée à 30 °C sous forte agitation (200 rpm) dans de l'EMS (voir section 1.1.1.) supplémenté d'une solution d'éléments trace (EDTA 12.5 mmol.L⁻¹, MnSO₄ 22 µmol.L⁻¹, CaCl₂ 5 µmol.L⁻¹, CoCl₂ 2 µmol.L⁻¹, ZnSO₄ 2 µmol.L⁻¹, FeSO₄ 2 µmol.L⁻¹, CuSO₄ 0.26 µmol.L⁻¹, Na₂MoO₄ 0.35

$\mu\text{mol.L}^{-1}$, Na_2SeO_4 $0.53 \mu\text{mol.L}^{-1}$, Na_2WO_4 $0.27 \mu\text{mol.L}^{-1}$, NiCl_2 $0.46 \mu\text{mol.L}^{-1}$) avec 20 mM de pyruvate de sodium (Tableau II.2).

Tableau II.2 : Liste des souches de *A. borkumensis* utilisées et construites, leurs caractéristiques et leur utilisation.

Souche	Génotype/caractéristiques	Utilisation/description	Référence/ origine
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	type sauvage	Isolat original	(Yakimov et al., 1998)
AC17	SK2 Rif ^R	mutant spontané résistant à la rifampicine	cette étude
AC18	SK2 Nal ^R	mutant spontané résistant à l'acide nalidixique	cette étude

1.2.2. Obtention des mutants spontanés *Alcanivorax borkumensis* SK2 Nal^R et Rif^R

L'acide nalidixique et la rifampicine sont des antibiotiques bactériostatiques puisqu'ils modèrent la croissance bactérienne en interférant avec la synthèse d'acides nucléiques. L'acide nalidixique est un inhibiteur de l'ADN gyrase bactérienne. Elle bloque alors la réplication et la transcription. La rifampicine agit en se fixant à l'ARN polymérase et par conséquent elle inhibe la transcription bactérienne. Il s'agit alors d'obtenir des mutants dérivés d'*Alcanivorax borkumensis* SK2 qui auraient acquis la résistance en ces antibiotiques par une modification du site de fixation du composé toxique.

La première étape consiste à déterminer la vulnérabilité d'*Alcanivorax borkumensis* SK2 vis-à-vis de la rifampicine et de l'acide nalidixique en déterminant la CMI. La méthode de dilution sur milieu gélosé a été utilisée. Pour cela, 100 μL d'une culture planctonique contenant approximativement 10^3 bactéries d'*Alcanivorax borkumensis* SK2 sur EMS + éléments traces + 20 mM de pyruvate a été étalée sur un milieu gélosé d'EMS contenant les éléments traces, 20 mM de pyruvate et différentes concentrations en antibiotiques : 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ et 200 $\mu\text{g/mL}$ d'acide nalidixique, et 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ et 100 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicine.

Les bactéries spontanément résistantes à ces deux antibiotiques sont obtenues en étalant 100 μL d'une culture planctonique sur de l'EMS agar contenant les éléments traces, 20 mM de pyruvate et de la rifampicine ou de l'acide nalidixique à une concentration égale à la CMI déterminé dans l'étape précédente (Tableau II.2).

La stabilité des souches résistantes est vérifiée en les repiquant 3 fois sur du milieu de croissance sans antibiotique et en déposant 10 μL du troisième repiquage concentré et dilué au

10^{-2} , 10^{-4} et 10^{-6} à la fois sur un milieu agar EMS + éléments traces + 20 mM de pyruvate, et sur un milieu agar EMS + éléments traces + 20 mM de pyruvate contenant l'antibiotique.

1.3. *Escherichia coli*

Les souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Tableau II.3) ont été cultivées dans du milieu gélosé LB et Halo agar 1.4 % (m/v) et dans du milieu liquide LB (Luria Bertani) (Sambrook and Russell, 2000), ou Halo (voir section 1.1.1.) à forte agitation à 30 °C ou 37°C. Selon les génotypes, les cultures ont été supplémentées de kanamycine (35µg/mL), d'ampicilline (100µg/mL), et de gentamycine (30µg/mL).

Tableau II.3 : Liste des souches *E. coli* utilisées, leurs caractéristiques et leur utilisation.

Souche	Génotype/caractéristiques	Utilisation/description	Référence/origine
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^qZΔM15</i>]	Transformation du vecteur de clonage pGEM [®] -T Easy (Promega)	Promega
S17-1 (λ pir)	Tp ^R Sm ^R <i>recA, thi, pro, hsdR-M</i> RP4: 2-Tc:Mu:Km Tn7 λ pir	Transformation des vecteurs suicides pKAS32, pKOMKm et pKOMCat et du vecteur répliatif pBBR1MCS-5. Souche donneuse dans la conjugaison bipartite	Simon <i>et al.</i> , 1983
DH5 α	F' <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), λ^-	Transformation des vecteurs pUC18T-miniTn7T-Gm	(Hanahan, 1983)
SM10 (λ pir) / pTNS2	Km ^R , <i>thi-1, thr, leu, tonA, lacY, supE, recA::RP4-2-Tc::Mu, pir</i> pTNS2 (Amp ^R <i>oriR6K, tnsABCDE</i>)	Souche donneuse dans la conjugaison quadripartite	
HB101 / pRK2013	F' <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r_B^- m_B^-) <i>recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>glnV44 λ^-</i> pRK2013 (Km ^R <i>oriColE1 RK2-Mob⁺ RK2-Tra⁺</i>)	Souche assistante dans la conjugaison quadripartite	Choi et Schweizer, 2006

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1. Extraction d'ADN génomique et plasmidique

Les ADNs génomiques sont extraits à l'aide du kit « Ultraclean Microbial DNA Isolation » (MoBio) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit combine une lyse mécanique par broyage et une lyse chimique suivie d'une adsorption d'ADN plasmidique sur une membrane de silice.

Dans le but d'obtenir des préparations de plasmides compatibles avec une digestion enzymatique les ADNs plasmidiques sont extraits selon le protocole décrit par Sambrook et Russell (2001) à partir de 1,5 mL d'une culture bactérienne en milieu sélectif. Cette technique s'appuie sur la lyse alcaline en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS). Après extraction avec un mélange PCI phénol : chloroforme : alcool isoamylique (PCI) en proportion 25:24:1, l'ADN est précipité avec de l'isopropanol absolu. Selon la quantité d'ADN désirée, une mini- ou midi-préparation est réalisée.

Lors du screening de plasmide recombinant, la méthode d'extraction rapide d'ADN plasmidique de Birboim et Doly (1979) a été utilisée (Birboim and Doly, 1979). Cette technique s'appuie sur une lyse chimique par NaOH/SDS suivie d'une précipitation à l'isopropanol.

Lorsque les plasmides sont destinés au séquençage, le kit commercial « QIAprep[®] Spin Miniprep » (QIAGEN) est employé, qui utilise une lyse chimique par NaOH/SDS. Dans tous les cas, les ADNs sont remis en suspension dans de l'eau milliQ stérile puis conservés à -20 °C.

2.2. Extraction d'ARNs et rétro-transcription

L'extraction des ARNs a été réalisée à l'aide du kit EXTRACT-ALL[®] (EUROBIO) selon les recommandations du fournisseur, qui permet une extraction simultanée des ARNs, ADNs et protéines cellulaires. Le kit se base sur une extraction par l'intermédiaire du phénol et du chloroforme qui fait apparaître trois phases. Les ARNs qui se trouvent dans la phase aqueuse supérieure subissent une étape de précipitation à l'isopropanol. Le culot d'ARNs obtenu est ensuite resuspendu dans de l'eau milliQ traitée avec 0.1 % (vv/v) de DEPC puis conservé à -80°C.

La qualité des ARN totaux extraits a été vérifiée en observant l'état de dégradation des ARN ribosomiques (ARNr) 16S et 23S (Sambrook and Russell, 2000) après électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% contenant du bromure d'éthidium et observation aux UV. Le dosage

des ARNs totaux a été réalisé à l'aide du kit *Quant-iT RiboGreen® RNA Assay Kit* (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. L'émission de fluorescence a été détectée avec un lecteur de fluorescence sur microplaque (Mx3005P Real-Time PCR System, Stratagene). Afin d'éliminer les traces éventuelles d'ADN contaminant, 50 µL d'échantillon d'ARN ramenée à une concentration de 0.2 µg/µL ont été traités par le kit *TURBO DNA-free™ kit* (Applied Biosystems) selon les recommandations du fournisseur. La rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires (ADNc) a été réalisée sur 1.6 µg d'échantillon d'ARN à l'aide du kit *SuperScript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Elle est réalisée en duplicat en utilisant les amorces aléatoires fournies avec le kit. Les ADNc obtenus ont ensuite été dilués au tiers et conservés à -20°C avant de les utiliser en PCRq.

2.3. PCR et purification des amplicons

2.3.1. *PCR classique*

La PCR est une méthode permettant d'obtenir rapidement une quantité importante d'un segment précis d'ADN contenu dans une matrice complexe d'ADN génomique. Elle repose sur la dénaturation suivie de la synthèse enzymatique d'ADN selon un cycle de température défini à partir de deux amorces de polarité opposée encadrant le fragment à amplifier (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986). L'amplification du fragment d'ADN cible suit une courbe exponentielle. Les thermocycleurs automatisés Veriti, GeneAmp PCR System 9700 et 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) sont utilisés pour répéter des cycles de trois étapes: dénaturation de l'ADN (30 s à 95 °C ou 98 °C), hybridation des amorces à une température optimale puis synthèse du brin complémentaire grâce à une ADN polymérase thermostable avec un temps d'élongation propre à chaque taille d'amplicons à amplifier (72 °C). L'ensemble des cycles de PCR est précédé par une étape initiale de dénaturation de l'ADN (5 min à 95 °C ou 98 °C) et termine par une dernière étape d'élongation de 10 min à 72 °C.

La réaction de PCR est préparée dans un volume réactionnel de 50 µL contenant 10 ng d'ADN génomique, un couple d'amorces utilisées chacune à une concentration finale de 0,2 µmol.L⁻¹, 500 µmol.L⁻¹ de MgCl₂, 200 µmol.L⁻¹ de dNTPs (Eurobio), 2,5 U de *Taq* polymérase (Eurobio) ou 1 U d'ADN polymérase « i-Proof High Fidelity » (Bio-Rad) et le tampon réactionnel 1X fourni avec l'enzyme. La dénaturation de l'ADN s'effectue à 95 °C pour la première enzyme et à 98 °C pour la deuxième.

Dans certains cas, des PCR à partir de colonies bactériennes sont réalisées. Une colonie est prélevée avec un cure-dent stérile puis mise en suspension dans 30 µL d'eau milliQ stérile, chauffée 5 min à 100 °C puis centrifugée 2 min à 16 000 × g afin de récupérer l'ADN dans le surnageant. Cinq microlitres du surnageant sont ensuite utilisés pour réaliser la PCR qui se fait en présence de 2,5 % (v/v) de DMSO afin de faciliter l'amplification.

2.3.2. Purification des amplicons d'ADN

Les produits PCR en solution sont purifiés à l'aide du kit commercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Cette purification a pour but de séparer les fragments d'ADN amplifiés du milieu réactionnel de PCR (protéines, sels) ainsi que des autres acides nucléiques non désirés (amorces non utilisées, amplification des séquences non désirées). La qualité, la taille et la quantité des produits de PCR purifiés ont été vérifiées par électrophorèse sur gel 0.8 % (m/v) en suivant les mêmes conditions décrites en section 2.5.

2.4. PCR en temps réel

La PCRq permet une analyse dynamique de l'amplification de l'ADN au cours du temps, qui permet d'estimer la quantité initiale d'ADN dans l'échantillon. Dans le cas de la RT-PCRq, à partir d'un ARN messager spécifique préalablement rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc), la variation d'expression du gène ciblé est analysée.

Les couples d'amorces utilisés lors de la PCRq ont été construits à partir du logiciel Oligo Explorer 1.1.0. Chaque couple a été testé par PCRq pour déterminer les concentrations optimales de chacune des amorces pour lesquelles la meilleure efficacité d'amplification est obtenue.

La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 25 µL contenant 2.5 µL de chaque amorce de concentration établie par le test d'optimisation, 12.5 µL de réactif 2X « *Power SYBR Green PCR Master Mix* » (Applied Biosystems) contenant l'AmpliTaq Gold® ADN polymérase, 2,5 µL d'eau milliQ stérile et 5 µL d'échantillon d'ADNc. Les conditions de la réaction d'amplification réalisée sur un appareil Mx3005P (Stratagene) sont les suivantes : 10 min à 95°C, suivis de 40 cycles d'amplification consistant en 30 s à 95°C, 45 s à 60°C puis 1 min à 72°C. Un dernier cycle comprenant trois phases : 1 min à 95°C, 30 s à 60°C puis 30 s à 95°C complète la réaction. La qualité de l'amplification a été évaluée grâce à la courbe de dissociation et son efficacité a été estimée à l'aide du logiciel LinReg (Ramakers

et al., 2003) pour ne garder que les valeurs dont d'amplification atteint 90 à 110 % d'efficacité.

L'évaluation de l'expression génique a été réalisée par une approche de quantification relative. L'évaluation de l'expression d'un gène dans une condition nécessite d'utiliser un contrôle endogène à savoir un gène dont l'expression varie peu/pas entre les conditions et une condition de référence : ici, le gène de l'ARNr 16S a été choisi. Les valeurs de cycle seuil (Ct) obtenues à partir des courbes d'amplifications ont été moyennées, puis les écart-types ainsi que les variances ont été calculés. La valeur moyenne du Ct du gène d'intérêt a été ramenée au Ct moyen relevé pour l'ARNr 16S ($\Delta Ct = Ct_{\text{moyen gène cible}} - Ct_{\text{moyen ARNr 16S}}$). Puis, les valeurs ainsi calculées pour les deux gènes dans une condition α ont pu être ramenées à celles obtenues pour la condition de référence sur acétate pour les mêmes gènes ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condition } \alpha} - \Delta Ct_{\text{condition de référence}}$). Finalement, les rapports d'expression ont été évalués en utilisant la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) et l'erreur standard pour chaque condition et chacun des gènes ont été calculés.

2.5. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les acides nucléiques (ADNs, amplicons, fragments de restriction) sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose 0.8 % (m/v) préparé dans un tampon TBE 1X (Tris 90 mmol.L⁻¹, EDTA 2 mmol.L⁻¹, acide borique 90 mmol.L⁻¹) auquel 0,5 mg.mL⁻¹ de BET (bromure d'ethidium) est ajouté. La migration s'effectue dans un tampon d'électrophorèse TBE 0,5X sous une tension de 100 V durant 30 minutes en parallèle d'un marqueur standard de poids moléculaire (Smart ladder de 200 à 10000 pb et Smart ladder SF de 100 pb à 1000 pb, Eurogentec). Les ADNs sont chargés dans un tampon 6X contenant 0,25 % (m/v) de bleu de bromophénol, 30 % (v/v) de glycérol et 0,25 % (m/v) de xylène cyanol FF. Les gels ont ensuite été placés sous UV et les acides nucléiques sont visualisés par fluorescence. La taille ainsi que la quantité des fragments d'ADN est déterminée par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire. Dans certain cas, la quantité d'ADN utilisée a été également évaluée avec le kit « Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit » et le fluorimètre Qubit[®] (Invitrogen), en suivant les instructions du manuel d'utilisation.

2.6. Clonage de fragments d'ADN

Deux techniques de clonages ont été utilisées. D'une part, le clonage d'un produit de PCR en utilisant des kits commerciaux permettant un clonage efficace et rapide selon la

méthode du « TA cloning ». D'autre part, le clonage dit « traditionnel » qui consiste à cloner des produits de digestion dans des vecteurs plasmidiques.

2.6.1. Vecteurs de clonages

-pGEM[®]-T Easy

Le kit « pGEM[®]-T Easy Vector System » (Promega) est utilisé pour cloner facilement et avec un fort rendement des produits de PCR dans le plasmide pGEM[®]-T Easy (Figure II.1) selon la méthode du « TA cloning ». Le vecteur est fourni linéarisé de par la présence d'un nucléotide de thymidine dans les deux extrémités et permet l'insertion d'un fragment d'ADN au niveau de son MSC. Ce vecteur est présent en grand nombre de copies dans la souche hôte et porte les promoteurs des ARN polymérases des bactériophages T7 et SP6 de part et d'autre du MSC. Ce dernier se trouve au milieu du gène codant pour le fragment α de la β -galactosidase ce qui permet l'identification des clones recombinants selon le système blanc/bleu après transformation dans des cellules d'*E. coli* JM109 et étalement sur du milieu LB + ampicilline, X-gal (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Biosolve) et IPTG (40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Eurobio).

-pUC18T-mini-Tn7T-Gm

Ce plasmide dérivé du pUC18 porte un mini-Tn7 à l'intérieur duquel un fragment d'ADN peut être cloné dans le MSC (Figure II.1) (Choi and Schweizer, 2006). Ce système de mini-Tn7T possède un large spectre d'hôte et permet l'intégration d'une seule copie du gène cloné dans le chromosome bactérien à un locus naturel et neutre. Son insertion se produit de manière orientée à un site *attTn7* situé dans la majorité des cas en aval du gène conservé et essentiel *glmS* (glucosamine-6-phosphate synthase) qui lui est présent en unique copie chez certaines bactéries et notamment chez *M. hydrocarbonoclasticus*. Dans ce travail, ce vecteur a été utilisé pour la complémentation génique.

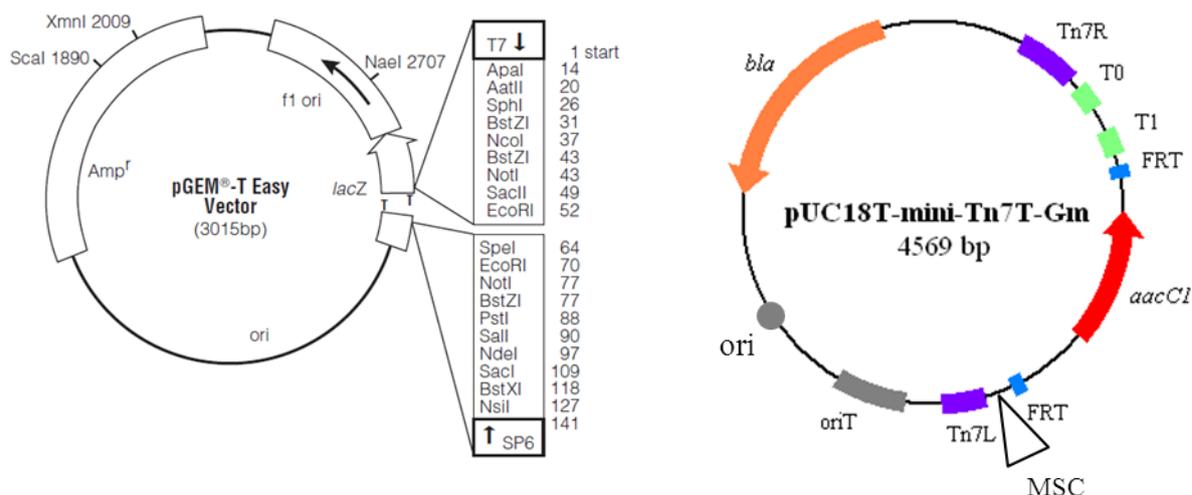


Figure II.1 : Cartes de restriction des plasmides pGEM®-T Easy (à gauche) et pUC18T-mini-Tn7T-Gm (à droite).

ori : origine de répllication ColE1 d'*E. coli* ; *Amp^r* : gènes conférant la résistance à l'ampicilline ; *lacZ* : gène codant pour le fragment α de la β -galactosidase ; *T7lac* promoteur : promoteur de l'ARN polymérase de T7 ; *f1 ori* : origine de répllication du phage F1 ; T7 : site d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase de T7, SP6 : site d'initiation de la transcription de l'ARN polymérase de SP6, *bla* : gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline ; *aacC1* : gène conférant la résistance à la gentamycine ; Tn7R et Tn7L : extrémités droite et gauche du transposon Tn7 ; T₀ et T₁ : terminateurs de transcription, du bactériophage λ et de l'opéron *rrnB* d'*E. coli* ; *FRT* : cible de la Flp recombinase ; MCS ou MCS : multi-site de clonage.

-pKAS32, pKOMKm et pKOMCat

Le pKAS32 (Skorupski and Taylor, 1996) et ses dérivés, le pKOMKm (cette étude) et le pKOMCat (cette étude), sont des vecteurs suicides utilisés pour la mutagenèse par échange d'allèles chez JM1, de par leur origine de répllication R6K qui ne leur permet de se maintenir que dans les souches produisant la protéine π (*E. coli* S17-1 (λ pir)). L'échange de l'allèle sauvage d'un gène présent sur le chromosome bactérien par un allèle muté présent dans le vecteur suicide peut se produire par recombinaison homologue, à condition d'y avoir préalablement inséré des régions homologues du gène cible. De plus, ces trois plasmides possèdent l'allèle sauvage du gène *rpsL* (ribosomal protein small) codant pour la protéine ribosomale S12, ce qui facilite la sélection positive des transconjuguants chez JM1 qui est spontanément *Sm^R*. En effet, la streptomycine est un antibiotique de type aminoglycoside qui inhibe la synthèse protéique en se fixant à la protéine ribosomale S12 de la sous-unité 30S du ribosome bactérien. La résistance à la streptomycine est provoquée par des mutations dans la protéine S12 encodée par le gène *rpsL*. Etant donné que le gène muté est récessif sur le gène *rpsL* sauvage, l'insertion du plasmide dans le génome peut alors compléter le phénotype des souches JM1 spontanément résistantes à la streptomycine (voir section 3.1.1.).

-pBBR1MCS-5

Ce plasmide dérivé du pBBR1MCS (Kovach et al., 1995) est un plasmide à large spectre d'hôte qui possède un MSC de 16 sites unique de restriction au sein du gène codant pour le fragment α de la β -galactosidase et le marqueur de sélection de résistance à la gentamycine. L'identification des clones recombinants peut alors se faire selon le système blanc/bleu. De plus, ce plasmide est mobilisable lorsque les fonctions de transfert du dérivé RP4 lui sont apportées en trans du gène *mob*, et il est compatible avec un large panel de groupe d'incompatibilité (Figure II.2).

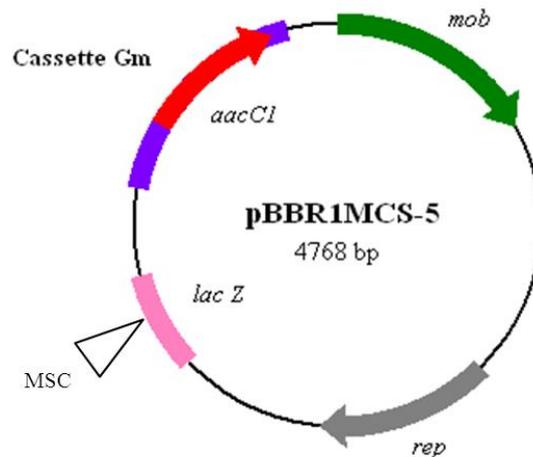


Figure II.2 : Carte du plasmide pBBR1MCS-5.

lacZ : gène codant pour le fragment α de la β -galactosidase ; *aacC1* : gène conférant la résistance à la gentamycine ; *rep* : gène nécessaire pour la répllication, *mob* : gène nécessaire pour la mobilisation du plasmide lorsque les fonctions de transfert sont apportées en trans ; Cassette Gm : cassette gentamycine, MSC ou MCS : multi-site de clonage.

2.6.2. Digestion de restriction des produits PCRs et de fragments d'ADN plasmidiques

La digestion des produits de PCR et des plasmides est effectuée par différentes enzymes de restriction commercialisées par New England Biolabs et Takara. La digestion s'effectue dans un volume réactionnel de 50 μ L pendant 3 h à 37 °C avec l' (les) enzyme(s) de restriction (1 U. μ g⁻¹ d'ADN), le tampon réactionnel 1X de(s) enzyme(s), de l'eau milliQ stérile et, si besoin, de la BSA à 100 μ g.mL⁻¹.

2.6.3. Purification des produits de digestion

Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose 0.8 % contenant du BET (voir section 2.3.) visualisé par une exposition brève aux UV pour

éviter la formation de dimères de thymine. Les bandes de gel contenant le fragment attendu sont découpées puis purifiées à l'aide du kit commercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare pour éliminer les morceaux d'ADN indésirables, le tampon réactionnel et l'(les) enzyme(s). La qualité, la taille et la quantité des produits de PCR purifiés ont été vérifiées par électrophorèse sur gel 0.8 % (m/v) en suivant les mêmes conditions décrites en section 2.5.

2.6.4. *Ligature*

La méthode du « TA cloning » est entreprise avec un fragment PCR purifié qui est synthétisé par une ADN polymérase thermostable à activité terminal transférase et ne possédant pas d'activité exonucléase 5' → 3'. Cette enzyme ajoute un résidu adénosine triphosphate aux extrémités 3' des deux brins du produit PCR. Le vecteur linéarisé utilisé possède une désoxythymine 3'-terminale aux deux extrémités, ce qui permet d'éviter la recircularisation du vecteur sur lui-même et une insertion efficace du produit PCR.

Pour le clonage dit « traditionnel », l'insert et le plasmide sont digérés par les mêmes endonucléases de restriction, créant ainsi des bouts cohésifs compatibles. L'utilisation d'extrémités cohésives différentes permet de cloner un insert de manière orientée dans le vecteur, ce qui est essentiel pour cloner un gène dans un vecteur d'expression. Pour certains cas, des endonucléases de restriction créant des bouts francs sont utilisées, ce qui entraîne un contrôle supplémentaire pour vérifier que l'orientation de l'insert est celle attendue, et que le plasmide ne s'est pas reliqué sur lui-même.

Les réactions de ligature, d'un volume total de 10 µL, sont réalisées en utilisant 3 U d'enzyme T4 DNA ligase (Promega) et 50 ng de vecteur dans le tampon réactionnel « 1X T4 DNA ligase reaction buffer » pour le clonage dit « traditionnel » (Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 7.5, MgCl₂ 10 mmol.L⁻¹, DTT 10 mmol.L⁻¹ et ATP 1 mmol.L⁻¹) et dans du « 1X Rapid ligation buffer » dans le cas du « TA cloning » (Tris-HCl 30 mmol.L⁻¹ pH 7.8, MgCl₂ 10 mmol.L⁻¹, DTT 10 mmol.L⁻¹, ATP 1 mmol.L⁻¹ et 5 % de polyéthylène glycol). L'insert est ajouté selon un ratio (vecteur:insert) de 1:1 ou 1:3. La réaction de ligature s'effectue à 4°C pendant une nuit.

2.6.5. Transformation des plasmides dans une souche hôte d'*E.coli*

- Transformation chimique

Cette transformation est réalisée avec les cellules chimio-compétentes JM109 fournies avec le kit de clonage « pGEM®-T Easy Vectors » (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Deux μL de la réaction de ligature sont ajoutés à 50 μL de cellules compétentes et incubées 20 min dans la glace. Les cellules sont ensuite « choquées » par un passage de 45 s à 42°C puis placées immédiatement dans la glace. 950 μL du milieu SOC (tryptone 2 % (m/v), extrait de levure 0,5 % (m/v), NaCl 10 mmol.L⁻¹, KCl 2,5 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 10 mmol.L⁻¹, MgSO₄ 10 mmol.L⁻¹, glucose 20 mmol.L⁻¹) est alors ajouté et la transformation est agitée à 150 rpm pendant 1 h. La sélection des cellules transformées est réalisée par étalement sur milieu LB contenant l'antibiotique approprié.

- Transformation par électroporation

Cette technique est utilisée dans le cas de clonages réalisés sans kits. Des cellules électro-compétentes d'*E. coli* DH5 α , S17-1 (λpir), ou JM109 sont préparées à partir d'une dilution au 1/100 d'une culture de nuit dans 1 L de LB et cultivée jusqu'à une DO_{600 nm} de 0,6. Les cellules sont centrifugées à 4 000 x g pendant 15 min à 4 °C puis resuspendues dans 1 L de glycérol à 10 % (v/v). Cette étape est répétée trois fois en resuspendant les culots dans un volume final de 500 mL, 250 mL et enfin 3 ou 4 mL de la solution de glycérol à 10 % (v/v) de sorte à obtenir une concentration cellulaire finale d'environ 1.10¹⁰ cellules.mL⁻¹. Les cellules ainsi obtenues sont réparties en aliquots de 50 μL puis conservées à -80 °C.

Une étape de dialyse des produits de ligature est réalisée contre de l'eau milliQ stérile pendant 1 h à température ambiante sur une membrane de 0,025 μm de porosité (Millipore). Pour l'électroporation, 2 μL d'ADN sont mélangés à cinquante microlitres de cellules électro-compétentes dans des cuvettes de 2 mm de largeur d'ouverture avec un pulse de 2,5 kV, 200 Ω et 25 μF (Gene Pulser® II Electroporation System (Bio-Rad)). Immédiatement après le choc électrique, 1 mL de LB préalablement chauffé à 37 °C est ajouté aux cellules qui sont ensuite incubées 1 h à 37 °C et 100 rpm. Les cellules transformées sont sélectionnées sur du milieu LB contenant l'antibiotique approprié.

- Transformation au TSS (Transformation and Storage Solution)

Avec la technique de transformation au TSS, les plasmides sont parfois changés de souche hôte. La transformation du plasmide purifié dans la souche hôte de notre choix est

réalisée dans du TSS 1X (85 % (v/v) LB, 10 % (m/v) polyéthylène glycol, 5 % (v/v) DMSO, 50 mmol.L⁻¹ MgCl₂ ; pH 6,5) selon la méthode décrite par Chung *et al.*(1989) (Chung *et al.*, 1989). Une culture d'une nuit d'*E. coli* est diluée au 1/100 puis incubée jusqu'à une DO_{600 nm} de 0,4. Un millilitre de cette culture est centrifugé pendant 10 min à 16 000 × g à 4 °C puis le culot est repris dans 100 µL de TSS 1X froid. Cent picogrammes d'ADN plasmidique sont ajoutés puis les cellules sont laissées 30 min dans la glace. Ensuite, 900 µL de LB sont ajoutés puis les cellules sont incubées à 37 °C pendant 1 h à 200 rpm. La transformation (1/10) est finalement étalée sur du milieu LB additionné de l'antibiotique approprié.

2.6.6. Séquençage

Les fragments d'ADN clonés dans les vecteurs de clonages sont séquencés chez GATC (GATC Biotech, Germany) afin de vérifier l'intégrité de la séquence. Le traitement des séquences brutes a été réalisé à l'aide du logiciel BioEdit.

2.7. Conjugaison entre *E.coli* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Deux conjugaisons différentes ont été employées. D'une part une conjugaison bipartite pour muter un gène cible dans le chromosome de JM1 et pour insérer un plasmide répliatif portant un gène d'intérêt chez JM1 et ses dérivées. Puis une conjugaison quadripartite pour insérer un mini-Tn7 portant un gène d'intérêt au niveau du site unique *attTn7* dans le chromosome de JM1. Les deux types de conjugaison ont été réalisés sur une surface solide en utilisant des souches/plasmides possédant les fonctions de transfert de type RP4. En effet, la présence de ce type de fonction de transfert permet la formation d'un pilus court et épais ce qui permet une bonne efficacité de transfert lorsque les cellules sont fixées sur une surface solide.

2.7.1. *Conjugaison bipartite pour mutation d'un gène cible chez JM1*

Les souches JM1 mutées sont obtenues par conjugaison entre la souche receveuse JM1 et la souche donneuse d'*E. coli* S17-1 (λ pir) qui porte le dérivé du plasmide RP4 présent dans le chromosome et qui contient le plasmide recombinant (pKAS32, pKOMKm et pKOMCAT) portant l'allèle muté. La souche lysogène S17-1 peut mobiliser le plasmide recombinant chez JM1 grâce au dérivé du plasmide RP4 qui fournit les fonctions conjuguatives en trans du site *mob* du plasmide.

Les souches donneuse et receveuse sont cultivées (5 mL) sur une nuit en milieu Halo + lactate supplémenté de l'antibiotique approprié. Cent microlitres de chaque culture sont mélangés dans un volume final de 1 mL de milieu Halo. Des contrôles avec 100 µL de la souche receveuse seule et 100 µL de la souche donneuse seule dans un volume total de 1 mL de Halo ont également été réalisés. Après 2 min de centrifugation à 7 000 x g à température ambiante, le culot est doucement remis en suspension dans 1 mL de Halo. Cette étape est répétée deux fois. Une dernière étape de centrifugation est réalisée, pour resuspendre le culot dans 30 µL de Halo. La suspension cellulaire est déposée sur une membrane d'acétate de cellulose de 0,45 µm de porosité (Millipore) stérile placée sur du milieu Halo + lactate agar. Après 24 h d'incubation à 30°C, les cellules sont remises en suspension dans 1 mL d'EMS, centrifugées pendant 2 min à 7 000 x g et le culot est de nouveau remis en suspension avec 200 µL d'EMS. 100 µL de suspension cellulaire sont étalés sur deux boîtes EMS + lactate contenant de la kanamycine (100 µg.mL⁻¹) et de la streptomycine (100 µg.mL⁻¹) puis incubés à 30°C jusqu'à apparition de colonies (environ 2 jours).

Les clones sont ensuite striés trois fois de suite sur le même milieu sélectif afin de les purifier. La résistance des colonies est testée en striant la même colonie sur de l'EMS + lactate additionnée d'ampicilline (200 µg.mL⁻¹), de streptomycine (100 µg.mL⁻¹) ou de kanamycine (100 µg.mL⁻¹) dans le cas d'une conjugaison par les plasmides pKAS32 et pKOMKm et chloramphénicol (35 µg.mL⁻¹) dans le cas du pKOMCat (en suivant cet ordre). Les clones ayant un phénotype Amp^S/Sm^R/Km^R ou Amp^S/Sm^R/Cm^R sont conservés pour la suite. L'insertion au bon locus dans le chromosome de JM1 de l'allèle muté ainsi que l'absence de l'allèle sauvage sont vérifiées par PCR, directement sur colonies (voir section 2.3.1).

2.7.2. Conjugaison bipartite pour insertion d'un plasmide répliatif chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Cette conjugaison nécessite également deux partenaires : la souche receveuse (JM1 et ses dérivés), et la souche donneuse d'*E. coli* S17-1 (λpir) contenant le plasmide répliatif (pBBR1MCS-5) portant le gène d'intérêt.

Le protocole suivi est identique à celui présenté dans la section 2.7.1., à l'exception que la suspension cellulaire obtenue après conjugaison est étalée sur de l'EMS + lactate additionnée de gentamycine (30 µg.mL⁻¹) et de streptomycine (100 µg.mL⁻¹).

2.7.3. Conjugaison quadripartite pour insertion d'un mini-Tn7 au site attTn7 de *M. hydrocarbonoclasticus*

Cette conjugaison met en jeu quatre partenaires. La souche receveuse (JM1, et ses dérivés) et la souche donneuse (*E. coli* DH5 α contenant le pUC18T-mini-Tn7T-Gm portant le gène d'intérêt à insérer chez la souche réceptrice, encore appelé le vecteur de libération suicide) d'une part, mais aussi deux souches assistantes d'*E. coli* : SM10 (λ pir) contenant le plasmide pTNS2 qui permet la transposition spécifique et orientée du mini-Tn7 grâce à l'opéron de la transposase *TnsABCD* et HB101 contenant le plasmide pRK2013 qui fournit le système protéique nécessaire au transfert d'ADN entre les souches (Choi and Schweizer, 2006). L'insertion du mini-Tn7 se produit de façon conservée à environ 25 nucléotides en aval du gène hautement conservé *glmS*, ce qui permet de vérifier par PCR l'insertion du mini-Tn7 au bon locus dans le chromosome de JM1.

Le protocole suivi est identique à celui présenté dans la section 2.7.1., à l'exception que la suspension cellulaire obtenue après conjugaison est étalée sur de l'EMS + lactate additionnée de gentamycine (30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et de streptomycine (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). L'insertion au bon locus du mini-Tn7 des clones ayant un phénotype Sm^R et Gm^R est vérifiée par PCR sur colonie (voir section 2.3.1.).

3. Création de mutants « knock-out » par deux techniques chez JM1

3.1. Par insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique

3.1.1. *Principe de la technique*

Pour construire des mutants par remplacement d'allèle chez JM1 la première étape a été de construire un plasmide recombinant suicide portant la résistance à l'ampicilline et contenant la cassette kanamycine provenant du pMKm (Murillo, 1994) qui porte le gène *aphA-3* (appelé *aphA* pour plus de commodités) ou la cassette chloramphénicol qui porte le gène *aacC1* provenant du pACYC184 (Chang and Cohen, 1978). Ces gènes de résistance possèdent leur propre promoteur mais ne possèdent pas de terminateur de transcription (Stuber and Bujard, 1981; Ortiz-Martín et al., 2006). Aux deux extrémités de ces cassettes les régions encadrant la séquence du gène à muter sont clonées. Le vecteur suicide pKAS32 a été utilisé comme vecteur suicide originel pour construire les mutants par remplacement d'allèles (Skorupski and Taylor, 1996). Les vecteurs pKOMKm et pKOMCat dérivés du plasmide pKAS32 ont par la suite été construits pour la construction des mutants « knock-out » (voir sections 3.1.2 et 3.1.3). Le pKAS32 est incapable de se répliquer chez *M. hydrocarbonoclasticus* car il ne possède que l'origine de répllication R6K mais il est transférable grâce à son *oriT* lorsque les fonctions de transfert RK2 sont apportées en trans. Il contient l'allèle sauvage du gène *rpsL* (*ribosomal protein small*) d'*E. coli* qui est transdominant sur l'allèle mutant ce qui lui confère la résistance à la streptomycine. Après conjugaison entre JM1 et la souche donneuse d'*E. coli* S17-1 (λ pir) contenant le plasmide recombinant, les exconjugants issus d'une double recombinaison homologue entre le gène sauvage et les régions encadrant la cassette kanamycine sont sélectionnés (Figure II.3A). La première recombinaison permet l'intégration du plasmide dans le chromosome de JM1, conférant à la bactérie les phénotypes $Km^R/Amp^R/Sm^S$ (Figure II.3B). La deuxième recombinaison homologue entraîne l'excision du plasmide qui emporte avec lui la version sauvage ou mutante du gène. Le phénotype de la bactérie obtenue devient ainsi $Km^R/Amp^S/Sm^R$ (Figure II.3C).

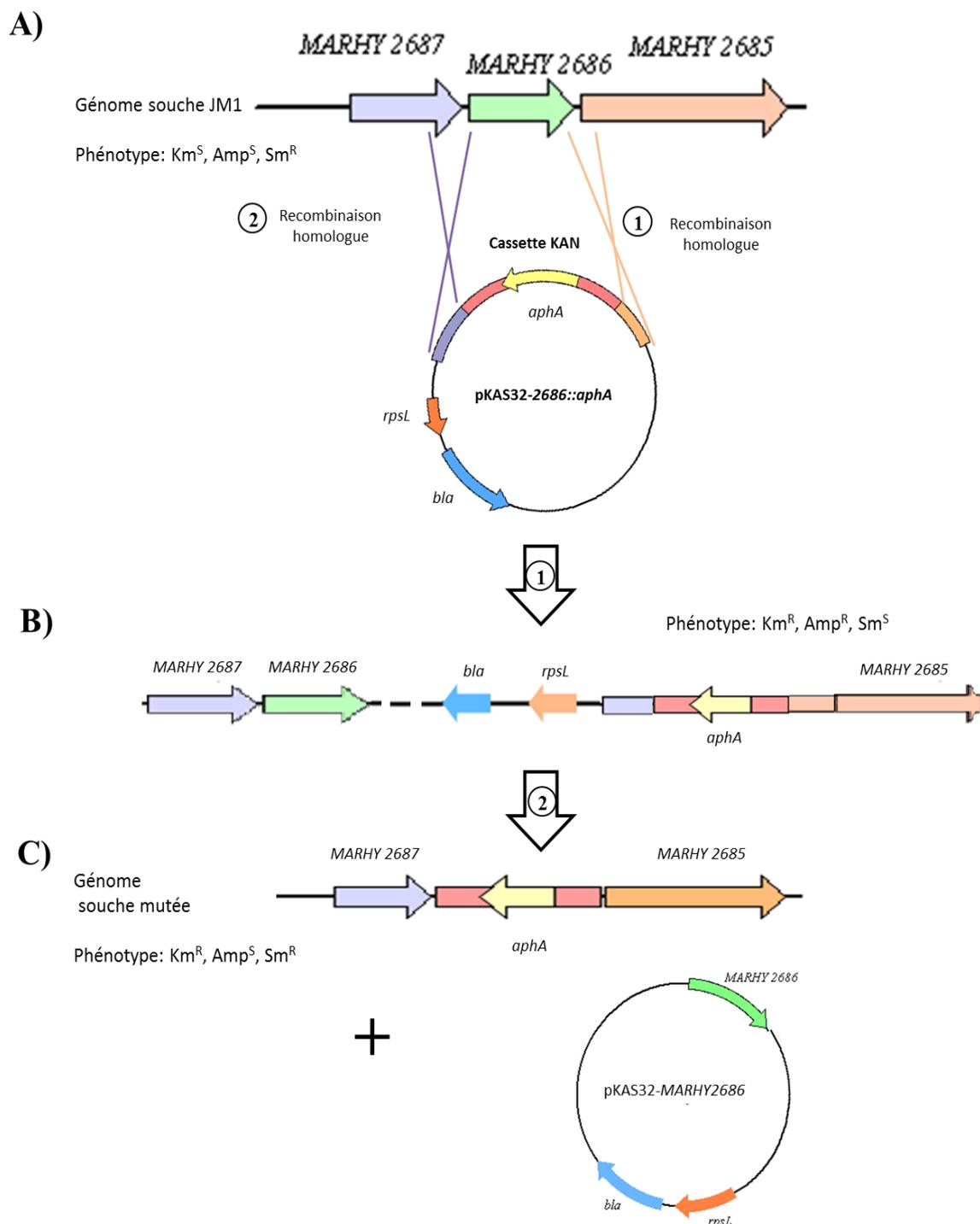


Figure II.3 : Schéma de la stratégie adoptée pour la construction de mutants «knock-out» par remplacement d'allèle chez JM1. Exemple du gène *MARHY2686*.

A) Schéma illustrant la technique de mutation avec la double recombinaison homologue qui s'opère entre le fragment d'ADN sauvage, localisé sur le chromosome de la souche, et la version mutée, portée par le plasmide recombinant. **B)** Schéma illustrant l'intégration du plasmide recombinant dans le chromosome de JM1 après la 1^{ère} recombinaison homologue. **C)** Schéma illustrant l'excision du plasmide avec la copie sauvage du gène *MARHY 2686*, laissant la copie mutée insérée dans le chromosome de JM1 après la 2^{ème} recombinaison homologue.

bla : gène conférant la résistance à l'ampicilline ; *rpsL* : gène conférant la sensibilité à la streptomycine ; *aphA* : gène conférant la résistance à la kanamycine. Cassette Kan : cassette kanamycine.

3.1.2. Construction du vecteur suicide pKOMKm

Le pKOMKm (*p* pour *plasmide*, *KO* pour *knock-out*, *M* pour *Marinobacter*, *Km* pour *kanamycine*) (Figure II.4) a été développé afin d'améliorer la sélection positive du deuxième événement de recombinaison en utilisant la résistance à la streptomycine. En effet, la complémentation entre l'allèle *rpsL* sauvage d'*E. coli* et l'allèle mutant de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 Sm^R (JM1) est partielle, ce qui conduit à un phénotype Sm^R partiel. Le gène *rpsL* de la souche *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 Sm^S a été amplifié avec des amorces possédant des sites de restriction *SalI* dans leur queue 5'. Après vérification par séquençage, ce gène a été cloné dans le pKAS32 à la place du gène *rpsL* d'*E. coli*. Enfin, la cassette kanamycine avec les MSC situés de part et d'autre de celle-ci récupérés sur le pMKm par digestion de restriction par *XbaI* a été cloné dans le pKAS32 modifié. Un nouveau MSC a alors été créé en ajoutant des sites de restriction au MSC originel du pKAS32.

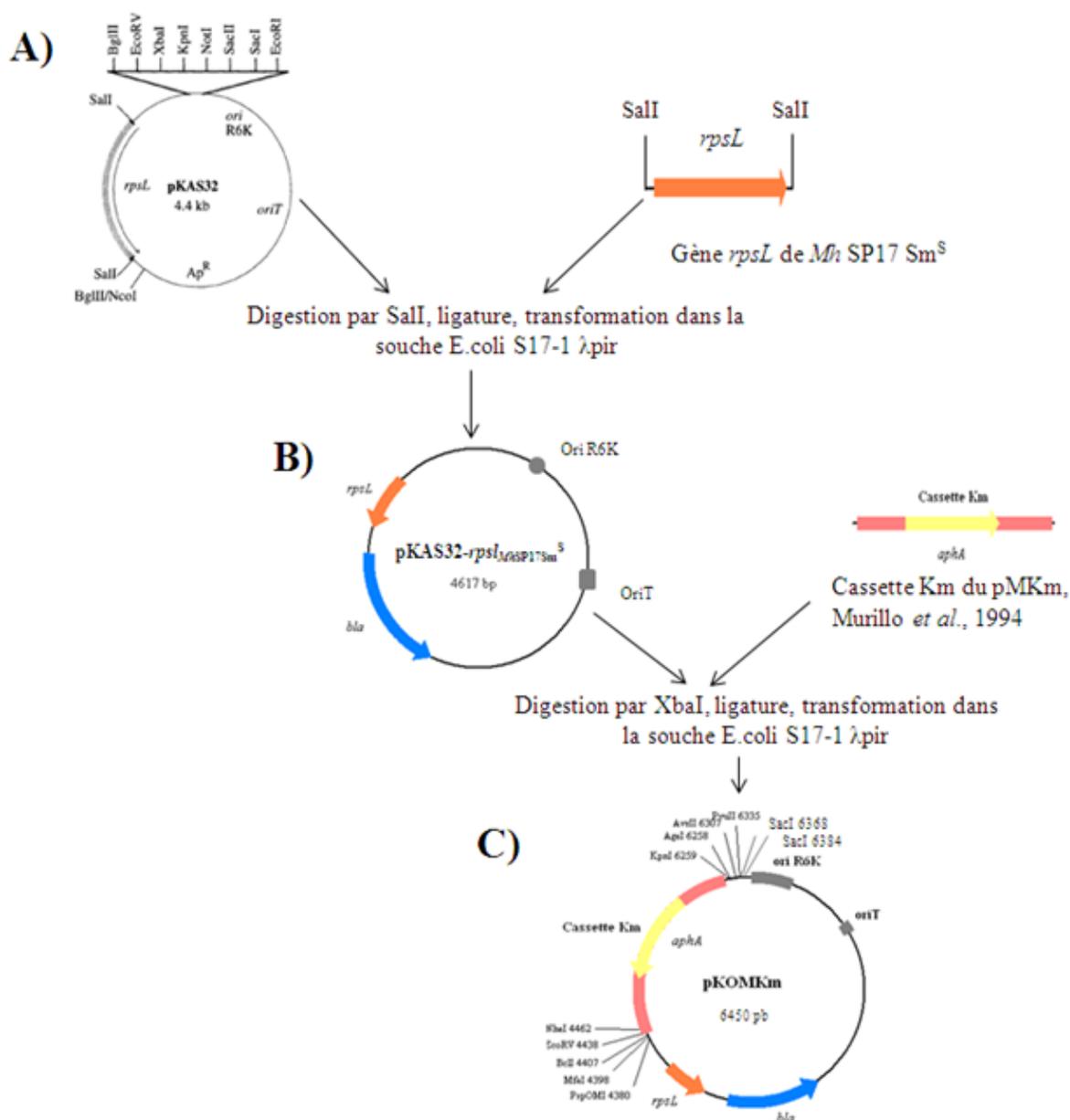


Figure II.4 : Schéma de la construction du vecteur de clonage pKOMKm

A) Schéma du clonage du gène *rpsL* de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 Sm^S dans le plasmide pKAS32. B) Schéma du clonage de la cassette kanamycine avec ajout de MSCs dans le pKAS32-*rpsLMh*. C) Carte de restriction du pKOMKm.

Ap^R : résistance à l'ampicilline ; *rpsL* et *rpsLMh* : respectivement, gènes d'*E. coli* et de *Mh* SP17 Sm^S conférant la sensibilité à la streptomycine ; *oriT* : origine de transfert; *oriR6K* : origine de répléation dépendante de la protéine π.

3.1.3. Construction du vecteur suicide pKOMCat et sélection des mutants

Un troisième vecteur a été construit car il a été soupçonné que la construction de mutants de délétion via le pKOMKm entraînait des effets polaires lorsqu'il s'agissait de muter des gènes d'un opéron. En effet, lors d'une étape de complémentation d'un gène d'un opéron, il s'est avéré que l'apport de la copie sauvage du gène chez le mutant « knock-out » ne rétablissait pas le phénotype sauvage. C'est pourquoi le pKOMCat (*p* pour *plasmide*, *KO* pour

knockout, *M* pour *Marinobacter*, *Cat* pour *chloramphénicol*) a été construit pour essayer de pallier à ce problème (Figure II.5). Pour cela, la cassette chloramphénicol a été amplifiée avec des amorces possédant des sites de restriction *KpnI* ou *NheI* dans leur queue 5'. Ce sont des enzymes judicieusement choisies afin de retirer la cassette kanamycine en entier du pKOMKm, sans trop déstabiliser les MSC présents de part et d'autre de celle-ci, et d'insérer la cassette chloramphénicol.

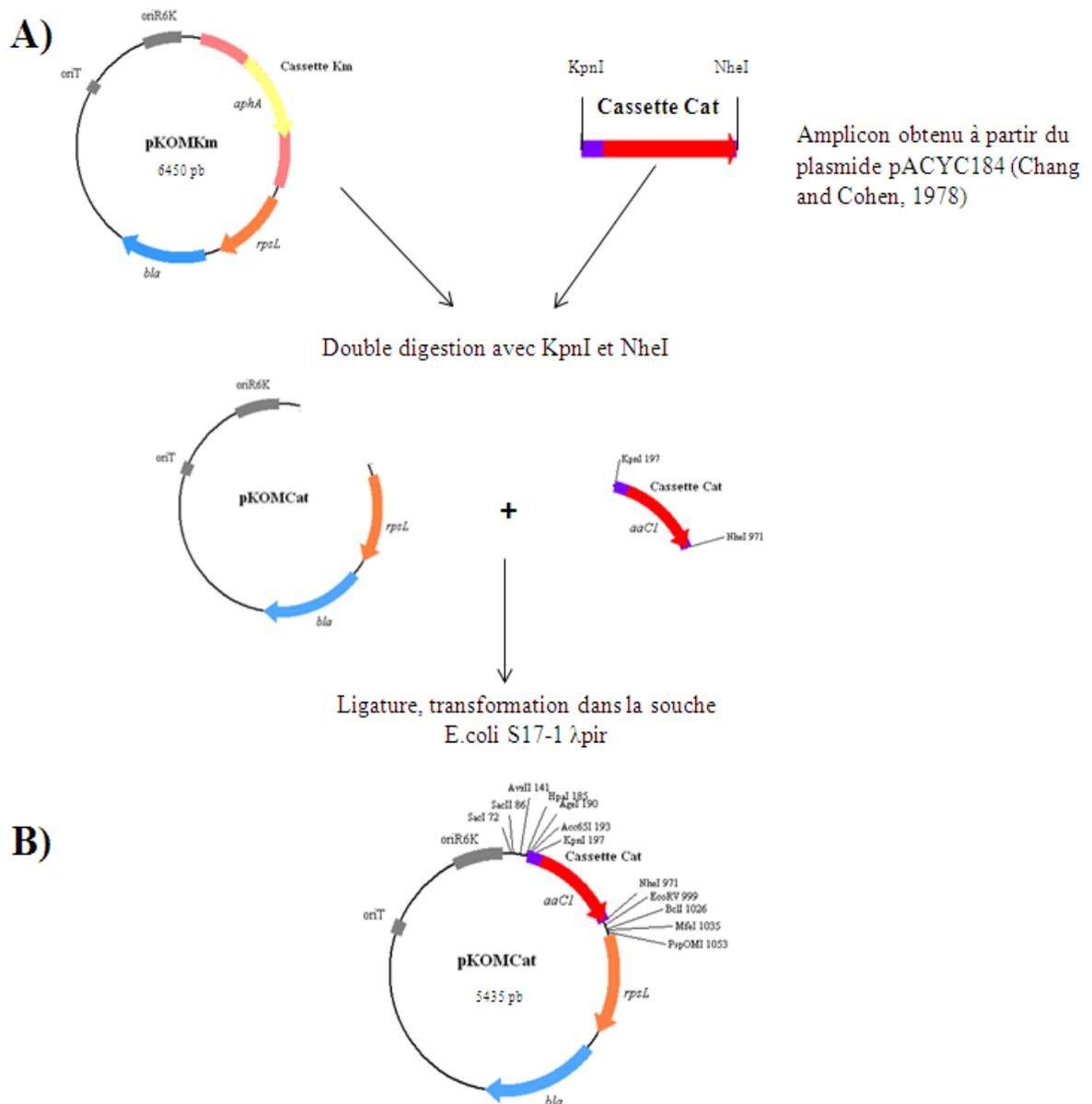


Figure II.5 : Schéma de la construction du vecteur de clonage pKOMCat

A) Schéma du clonage de la cassette chloramphénicol dans le pKOMKm. B) Carte de restriction du pKOMCat. *rpsL* : gène de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 Sm^S conférant la sensibilité à la streptomycine ; *cat* : gène conférant la résistance au chloramphénicol ; *bla* : gène conférant la résistance à l'ampicilline ; oriT : origine de transfert; oriR6K : origine de répllication dépendante de la protéine π .

3.2. Par délétion en phase d'une partie ou de toute la région cible

3.2.1. *Principe de la technique*

La mutation par la technique de délétion en phase d'une région de la séquence codante, aussi appelée mutation « in-frame », permet d'obtenir des mutants « knock-out » sans entraîner de décalage dans le cadre de lecture pour ne pas créer de mutation non sens entraînant l'arrêt prématuré de la traduction. Cette technique, tout comme la construction du pKOMCat, a été entreprise afin d'éviter un éventuel effet polaire.

3.2.2. *Construction du vecteur suicide et sélection des mutants*

Deux types de mutants « in frame » ont voulu être sélectionnés. Un mutant auquel le gène cible en entier a été enlevé, et un autre mutant qui ne conserve que 114 pb de la séquence codante sur les 1011 pb. Pour cela, deux vecteurs suicides différents ont été construits : le vecteur pKOMKm- Δ MARHY2686null qui contient 472 pb de la partie 3' de la séquence codante de MARHY2687, la région contenue entre les séquences codantes MARHY2687-MARHY2686, et 547 pb de la partie 5' de la séquence codante de MARHY2685 en amont de la cassette Kan (Figure II.6) ; et le vecteur pKOMKm- Δ MARHY2686 qui contient 472 pb de la partie 3' de la séquence codante de MARHY2687, la région contenue entre les séquences codantes MARHY2687-MARHY2686, le gène MARHY2686 délété, la région contenue entre les séquences codantes MARHY2686-MARHY2685 et 547 pb de la partie 5' de la séquence codante de MARHY2685 en amont de la cassette Kan (Figure II.7). Pour construire les vecteurs, un premier clonage dans le vecteur pKOMKm des fragments PCR « partie 3' de la séquence codante de MARHY2687- la région contenue entre les séquences codantes MARHY2687-MARHY2686 » dans le cas de la stratégie n°1 et du fragment « partie 3' de la séquence codante de MARHY2687- la région contenue entre les séquences codantes MARHY2687-MARHY2686 et les 51 pb de la partie 5' de la séquence codante du gène MARHY2686 » pour la stratégie n°2 obtenus avec des amorces possédant des sites de restriction *SacI* ou *SacII* dans leur queue 5' a été réalisé. Puis les fragments « la région 5' de la séquence codante de MARHY2685 » (Figure II.6) et « les 57 pb de la partie 3' du gène MARHY2686 la région contenue entre les séquences codantes MARHY2686-MARHY2685 et la partie 5' de la séquence codante MARHY2685 » (Figure II.7) obtenus avec des amorces possédant des sites de restriction *SacII* ou *NdeI* dans leur queue 5' ont été respectivement clonés dans les vecteurs intermédiaires de la stratégie n°1 et n°2.

Après conjugaison bipartite entre la souche parentale *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 et la souche donneuse *E. coli* S17-1 (λ pir) / pKOMKm- Δ MARHY2686 (section 2.7.1), la sélection des transconjugants ayant intégré le plasmide dans leur chromosome par recombinaison homologue a été effectuée sur du milieu EMS contenant du lactate et de la kanamycine à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Seize clones sont ensuite striés trois fois de suite sur le même milieu sélectif afin de purifier les clones. La résistance des colonies est testée en striant la même colonie sur de l'EMS + lactate additionnée de streptomycine ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), d'ampicilline ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de kanamycine ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (en suivant cet ordre). Deux clones $\text{Amp}^{\text{R}}/\text{Kan}^{\text{R}}/\text{Sm}^{\text{S}}$ (pour chaque stratégie) ont ensuite été repiqués en milieu liquide EMS contenant du lactate puis $100 \mu\text{L}$ d'une dilution au 10^{-5} de ces cultures denses obtenues au bout de 42 h de croissance ont été étalés sur le même milieu additionné de streptomycine à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La résistance de chaque clone qui a poussé a été testé en striant la même colonie sur de l'EMS + lactate additionnée de d'ampicilline ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), de kanamycine ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de streptomycine ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (en suivant cet ordre). Les clones de phénotype $\text{Amp}^{\text{S}}/\text{Kan}^{\text{S}}/\text{Sm}^{\text{R}}$ correspondent en théorie soit au type sauvage si le plasmide intégré s'est excisé sans qu'il y ait eu l'échange entre les allèles sauvage et mutant, soit au type mutant si l'échange entre allèles a eu lieu. Des clones de phénotype $\text{Amp}^{\text{S}}/\text{Kan}^{\text{S}}/\text{Sm}^{\text{R}}$ ont été vérifiés par PCR jusqu'à obtention d'un clone positif (voir section 2.3.1).

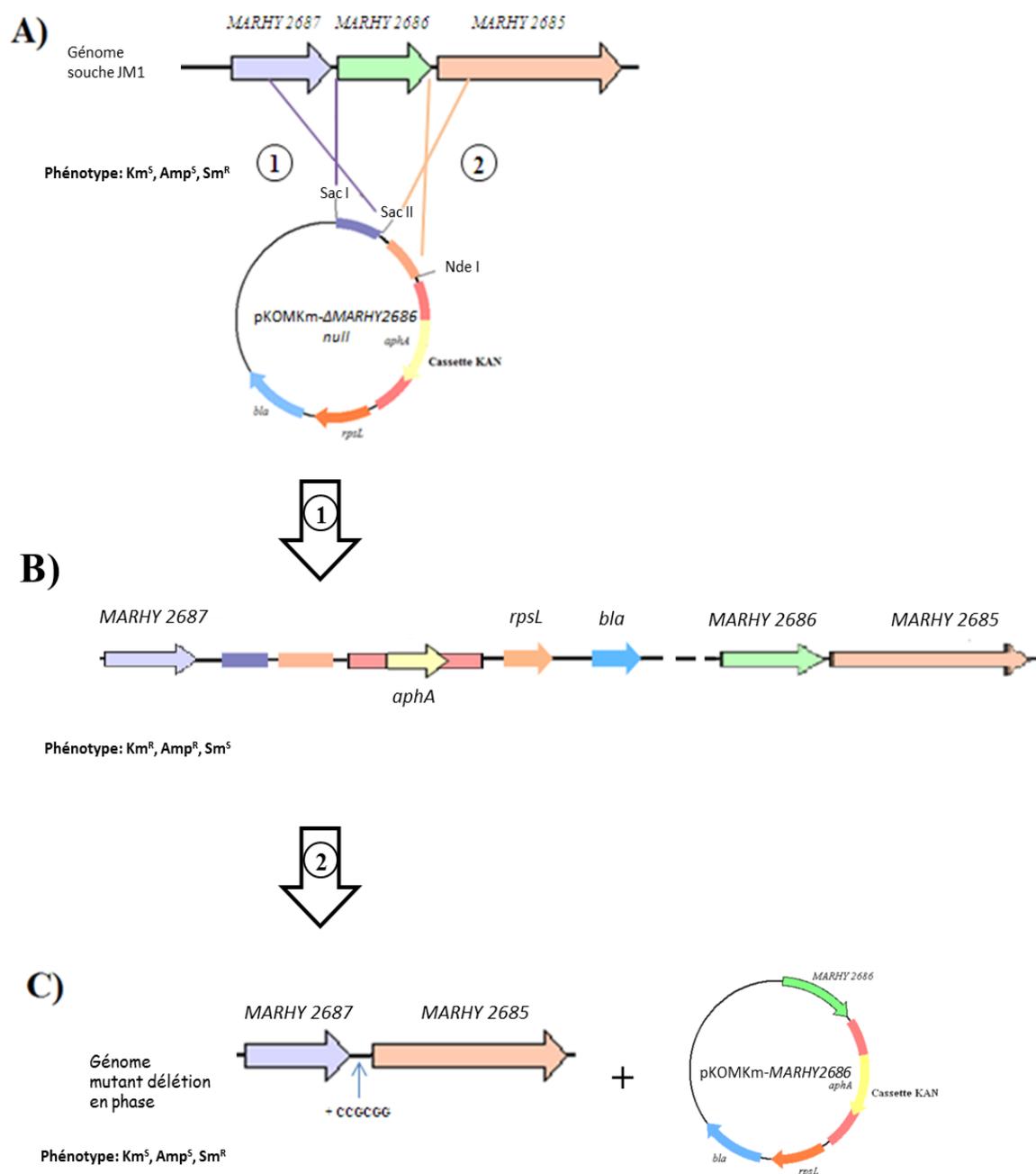


Figure II.6 : Stratégie n°1 adoptée pour la construction de mutants « in frame » chez JM1. Exemple avec le gène *MARHY2686*.

A) Schéma illustrant la technique de mutation avec la double recombinaison homologue qui s'opère entre le fragment d'ADN sauvage, localisé sur le chromosome de la souche, et la version mutée, portée par le plasmide recombinant. **B)** Schéma illustrant l'intégration du plasmide recombinant dans le chromosome de JM1 après la 1^{ère} recombinaison homologue. **C)** Schéma illustrant l'excision du plasmide avec les copies sauvages des gènes *MARHY 2687*, *MARHY 2686* et *MARHY 2685*, laissant la copie mutée insérée dans le chromosome de JM1 après la 2^{ème} recombinaison homologue.

bla : gène conférant la résistance à l'ampicilline ; *rpsL* : gène conférant la sensibilité à la streptomycine ; *aphA* : gène conférant la résistance à la kanamycine.

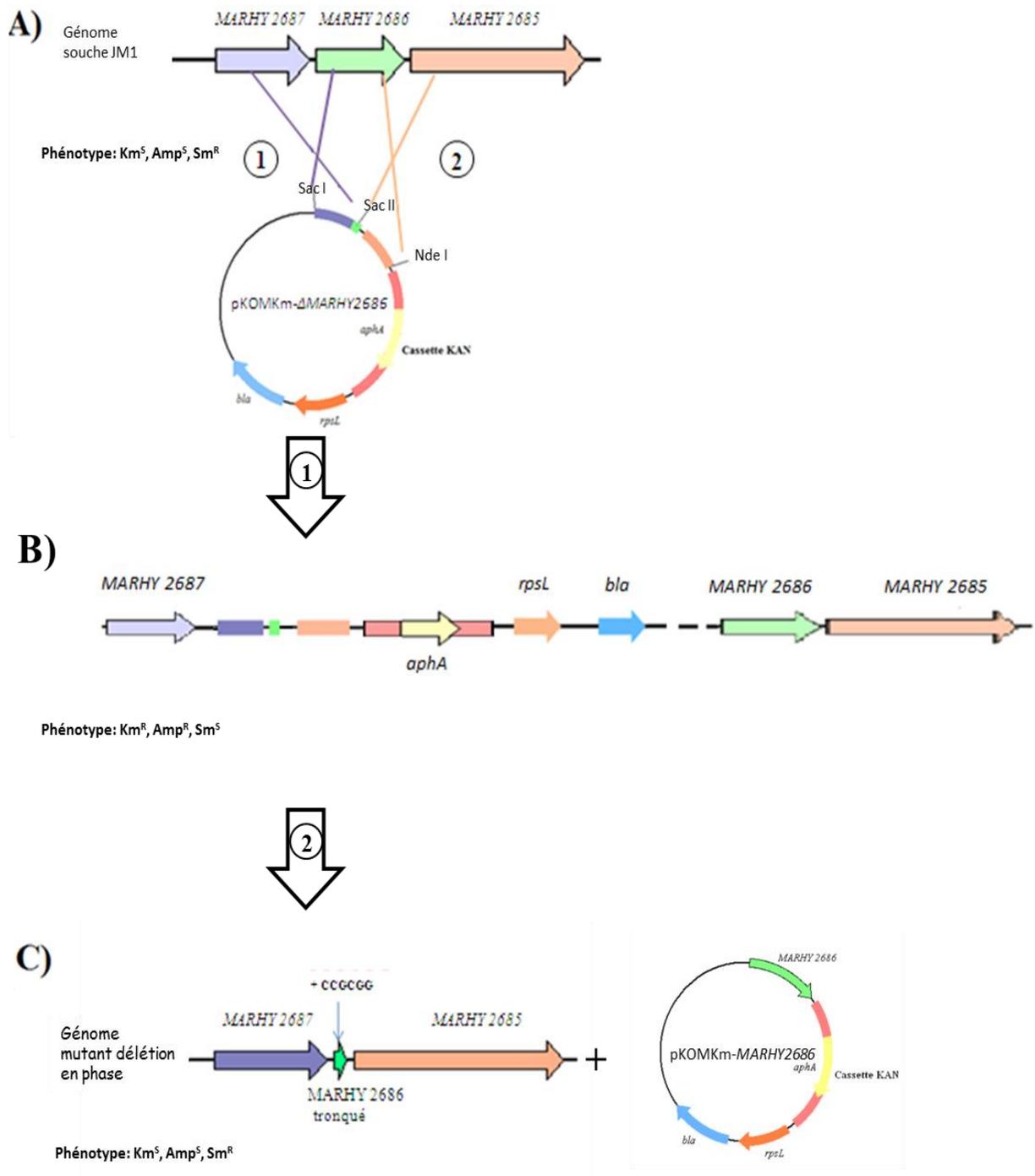


Figure II.7 : Stratégie n°2 adoptée pour la construction de mutants « in frame » chez JM1. Exemple avec le gène *MARHY2686*.

A) Schéma illustrant la technique de mutation avec la double recombinaison homologue qui s'opère entre le fragment d'ADN sauvage, localisé sur le chromosome de la souche, et la version mutée, portée par le plasmide recombinant. **B)** Schéma illustrant l'intégration du plasmide recombinant dans le chromosome de JM1 après la 1^{ère} recombinaison homologue. **C)** Schéma illustrant l'excision du plasmide avec les copies sauvages des gènes *MARHY 2687*, *MARHY 2686* et *MARHY 2685*, laissant la copie mutée insérée dans le chromosome de JM1 après la 2^{ème} recombinaison homologue.

bla : gène conférant la résistance à l'ampicilline ; *rpsL* : gène conférant la sensibilité à la streptomycine ; *aphA* : gène conférant la résistance à la kanamycine.

4. Techniques de microscopie à contraste de phase, à épifluorescence, et confocale

4.1. Observation des cellules adhérees à un HOC solide par microscopie à épifluorescence

4.1.1. *Adhésion des cellules à un HOC solide*

Les cellules sont cultivées dans 50 mL d'EMS supplémenté de 20 mM d'acétate jusqu'en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.3 et 0.5) puis centrifugées à 7000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les culots sont repris dans un volume d'EMS sans source de carbone de sorte à avoir une $DO_{600\text{ nm}}$ finale proche de 0.1.

En parallèle, les lames de microscope enrobées de paraffine sont préparées en faisant fondre une paillette de paraffine sur une plaque chauffante, et en la laissant se solidifier à température ambiante.

Les lames de microscopes enrobées de paraffine sont incubées en triplicats à 30°C sous faible agitation (50 rpm) dans un récipient stérile préalablement préchauffé, contenant la culture de la souche à tester. Après 30 minutes d'incubation, les lames de microscope sont lavées pendant 10 min à 30°C et 50 rpm dans un autre récipient contenant de l'EMS sans source de carbone. Les cellules adhérees à la paraffine sont colorées pendant 45 minutes à l'obscurité avec 8 ng/mL d'acridine orange, un colorant des acides nucléiques. Les lames sont observées au microscope inversé Axio Observer.Z1 (Zeiss, Allemagne), avec un objectif 40 × longue distance (LD) et des filtres d'excitation et d'émission bandes passantes de 450-490 nm et 500-550 nm respectivement. Les images sont prises avec une caméra CCD Zeiss AxioCam 506 ICc5 mono, un temps d'exposition de 750 ms et une intensité de 75 %. Les images obtenues sont retouchées à l'aide du logiciel Zeiss ZEN 2012. Les traitements d'images sont réalisés à l'aide du logiciel Image J/Fiji 1.46 (<http://imagej.nih.gov>).

4.1.2. *Expérience de mort cellulaire*

Les cellules sont cultivées dans 50 mL d'EMS supplémenté de 20 mM d'acétate jusqu'en phase exponentielle de croissance ($DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.3 et 0.5) puis centrifugées à 10000 × g pendant 15 minutes à température ambiante. Les culots sont repris dans un volume d'EMS sans source de carbone de sorte à avoir une $DO_{600\text{ nm}}$ finale proche de 0.1.

Les lames de microscopes recouvertes de paraffine sont incubées en duplicats à 30°C sous faible agitation (50 rpm) dans un récipient stérile préalablement préchauffé, contenant la culture de la souche à tester. Après 40 minutes d'incubation, les lames de microscope sont lavées dans de l'EMS sans source de carbone et mises à incuber à 30°C et 50 rpm dans un autre récipient contenant de l'EMS sans source de carbone. Après 6 h et 24 h d'incubation, les

cellules adhérees à la paraffine sont colorées pendant 15 minutes à l'obscurité avec une solution contenant 3 μM de iodure de propidium (un intercalant des acides nucléiques qui est incapable de diffuser à travers les membranes intactes), et 2 μM de Syto 9 (un colorant des acides nucléiques). Les lames sont observées au microscope Olympus BX60 contenant une lampe à mercure à l'aide du filtre d'excitation bande passante 380-385 nm et du filtre d'émission laissant passer les radiations de plus de 410 nm dans le cas de l'observation de la coloration à l'iodure de propidium, et les filtres d'excitation 460-490 nm et d'émission bandes passantes 513-542 nm dans le cas de la coloration au Syto 9.

4.2. Observation du phénomène de twitching sur une surface au microscope à contraste de phase

4.2.1. *Expériences de twitching sur agar mou*

L'expérience sur agar mou est inspiré des études réalisées par Darzins (1993) et l'équipe de Semmler (Darzins, 1993; Semmler et al., 1999).

Une colonie est prise avec un cure-dents stérilisé et déposée dans une boîte de Pétri contenant de l'EMS solide (agar 1 %), supplémenté de 20 mM de DL-lactate. Une lamelle est déposée sur la colonie. Après quatre jours d'incubation à 30°C la colonie est observée au microscope à contraste de phase avec un objectif 20 \times longue distance (LD) sur un microscope inversé Axio observer.Z1 (Zeiss, Allemagne). Les images ont été prises à l'aide d'une camera CCD AxioCam 506 ICc5 mono, avec un temps d'exposition de 38 ms.

4.2.2. *Expériences de twitching sur HOC*

En cours d'optimisation.

4.1. Observation des cellules adhérees et de biofilm par microscopie à confocale

Ces observations sont réalisées par l'équipe Micalis INRA/AgroParisTech à la plateforme de microscopie MIMA2 (<http://www6.jouy.inra.fr/mima2>).

Les cellules de *M.hydocarbonoclasticus* SP17 sont cultivées sur des lames de verre recouvertes d'une fine couche de paraffine (1 mm^2) obtenue à l'aide d'un microtome. Après 15 min, 3 h, 24 h et 72 h d'incubation, les cellules/biofilms sont colorées au Syto 9 (5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) (Invitrogen), et chaque échantillon est observé avec un microscope inversé confocal à balayage laser Leica SP2 AOBS (LEICA Microsystems). Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, les échantillons sont scannés à une fréquence de 400 Hz avec un objectif à eau 40 \times avec un zoom numérique de 4. Le Syto 9 est excité à 488 nm à l'aide d'un laser d'argon,

et seules les radiations de fluorescence comprises entre 500 nm et 600 nm émises sont observées. Cinq z-stack d'un pas de 1 μm ont été prises dans le plan horizontal pour chaque condition et chaque souche. Une reconstruction 3D par projection d'images des bactéries associées à la surface de la paraffine a été réalisée à l'aide du logiciel IMARIS v7.2 (Bitplane, Switzerland). Le calcul des volumes bactériens correspondant (biovolumes) ainsi que le pourcentage de recouvrement de la surface de la paraffine ont été calculées à l'aide de PHILIP Matlab.

PRÉAMBULE

Préambule

Mon travail de recherche avait pour but d'élargir les connaissances sur le déterminisme génétique impliqué dans la détection de l'interface eau-HOC, l'adhésion à celle-ci et l'assimilation des HOC au travers de la formation de biofilms en utilisant *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 comme modèle.

La transition d'un mode de vie planctonique à une croissance en biofilm implique une série temporelle d'événements, une acquisition de propriétés physiologiques cellulaires nouvelles et une mise en place d'une architecture complexe. Cette cascade de modifications qui répond à des signaux environnementaux et bactériens est orchestrée par l'expression séquentielle d'une série de gènes particuliers (Kuchma and O'Toole, 2000).

De manière générale, la compréhension de tout mécanisme moléculaire biologique requiert l'identification des gènes et des protéines impliqués. Nous avons pour cela choisi d'entreprendre une stratégie de génomique fonctionnelle qui visait dans un premier temps à sélectionner une liste de gènes/protéines candidats issus d'études protéomique et transcriptomique, pour ensuite déterminer leurs fonctions dans les différentes étapes de la formation de biofilm sur les HOC.

Pour mener à bien la caractérisation fonctionnelle des gènes/protéines candidats, une approche de génétique inverse a été adoptée. Elle consiste à inactiver ces gènes par différentes stratégies de mutagenèse pour ensuite analyser le phénotype des mutants. Pour ce faire, il a fallu optimiser les outils moléculaires déjà développés au laboratoire et mettre au point d'autres techniques car la manipulation génétique de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* s'est parfois avérée délicate. Cependant, il est utile de préciser que la surexpression d'un gène dans une condition donnée par rapport à une référence, sur quoi les analyses transcriptomiques et protéomiques sont basées, ne garantit pas que ce gène soit impliqué dans la condition étudiée. L'approche de génétique inverse permet donc de vérifier si les gènes candidats sont bien impliqués dans le processus étudié.

Les technologies « omiques », la protéomique et la transcriptomique, appliquées à la formation de biofilms ou à l'adhésion sur différents HOC, métabolisables (hexadécane, trioléine) ou non (heptaméthylnonane) par la bactérie modèle, nous ont permis de dresser une liste exhaustive de gènes potentiellement impliqués dans les processus considérés. Parmi ceux-ci, 10 gènes ont été classés prioritaires pour une caractérisation fonctionnelle. Dans un

premier temps, mes travaux de thèse se sont focalisés à caractériser le rôle de deux de ces gènes : le gène qui code pour la protéine de fonction inconnue MARHY2686, une des protéines les plus abondantes mise en évidence par protéomique en condition de biofilm sur *n*-hexadécane et MARHY3635, qui code pour une protéine impliquée dans le système de sécrétion de type VI (T6SS). Les tentatives d'élucidation du rôle de chacun de ces gènes ont demandé une étude fonctionnelle basée sur les démarches expérimentales propres à chacun. Cependant, après de multiples expériences pour valider les hypothèses postulées quant à leur(s) fonction(s), nous sommes arrivés à une impasse. Nous avons de ce fait décidé d'élargir notre champ d'étude en mutant les 8 autres gènes classés prioritaires afin d'augmenter la probabilité de tomber sur un gène intéressant quant à la formation de biofilm sur HOC et dont le rôle serait « plus facile » à caractériser. La caractérisation fonctionnelle d'un gène étant très fastidieux, nous avons décidé de nous focaliser sur ceux dont les mutants associés montrent un phénotype intéressant sur des expériences de biofilm sur HOC menées en routine sur des plaques 24 puits. A partir de ces premières observations phénotypiques, l'importance des gènes de mobilité a pu ainsi être mise en avant.

Les résultats de toutes les expériences obtenus sur chacun des gènes mutés ont été répartis dans trois chapitres distincts. Le **Chapitre III** décrit l'étude fonctionnelle qui a été menée sur le gène MARHY2686. L'étude sur le rôle du flagelle ou du pilus, dans la formation de biofilm sur HOC est présentée dans le **Chapitre IV** à travers des expériences menées sur un mutant du gène *flrR* (MARHY1304) un régulateur de l'expression des gènes du flagelle et les mutants de 5 différents gènes de pili de type IV (MARHY2564, MARHY0701, MARHY3672, MARHY0742, MARHY0617). Enfin, le **Chapitre V** regroupe les travaux menés sur la caractérisation fonctionnelle du gène MARHY3635, qui fait partie d'un cluster du T6SS.

L'étude fonctionnelle menée sur le gène MARHY2995 a posé problème. MARHY2995 est surexprimé en condition d'adhésion exclusivement et spécifiquement sur les HOC métabolisables. L'annotation indique que ce gène est homologue aux gènes *yeaG* d'*E. coli* et *prkA* de *B.subtilis* qui codent pour des sérine protéines kinases. Ce type de protéines intervient dans des systèmes de transduction de signaux chez les bactéries. Ces données nous intéressaient tout particulièrement car elles suggéraient que ce gène était potentiellement impliqué dans la détection de la nature nutritive du support. Malheureusement, le mutant « knock-out » de ce gène présentant une croissance faible sur des substrats solubles comparé au sauvage, il a été estimé qu'une éventuelle implication de ce gène dans l'adhésion et/ou la

formation de biofilm serait délicate à démontrer. Les recherches pour élucider l'implication de ce gène ont été abandonnées dans le cadre de cette thèse et ne seront donc pas présentées dans ce manuscrit.

Le tableau II.4 ci-dessous présente la liste des gènes candidats pour lesquels la caractérisation fonctionnelle a été entreprise ainsi que l'expression de ces gènes obtenus à partir d'une technique de transcriptomique et la surabondance des protéines associées obtenue par protéomique.

Tableau II.4 : Liste des gènes sélectionnés pour la caractérisation fonctionnelle et leur donnée d'expression

CDS	GENE	PRODUIT	DONNEES D'EXPRESSION
MARHY2686		protéine hypothétique conservée Protéine de fonction inconnue;	Surexprimé en présence de HOC métabolisables (T) Protéine identifiée comme une des plus abondantes en biofilm sur hexadécane (P).
MARHY2564	<i>pilA</i>	piline ; biogénèse du pilus type IV	Surexprimé en adhésion 3 h sur HOC (T). Réprimé en biofilm (P, T). Surexprimé dans les cellules détachées du biofilm (P).
MARHY0701	<i>pilQ</i>	sécrétine ; biogénèse du pilus type IV	Surexprimé en adhésion 15 min et 3h sur HOC (T) Réprimé en biofilm (T).
MARHY0742	<i>pilV</i>	piline mineure ; biogénèse du pilus type IV	Surexprimé en adhésion 3 h sur HOC (T) Réprimé en biofilm (T).
MARHY3672	<i>pilH</i>	régulateur impliqué dans la rétractation du pilus type IV	Surexprimé en adhésion 3 h sur HOC (T) Réprimé en biofilm (T).
MARHY0617	<i>mshJ</i>	biogénèse du pilus type IV (MSHA)	Réprimé en biofilm (T).
MARHY2599	<i>rpoN</i>	Facteur sigma 54 de l'ARN polymérase	Surexprimé en adhésion (15 min et 3h) sur HOC (T) Réprimé en biofilm (T)
MARHY1304	<i>fleR</i>	régulateur de réponse FleR régule l'expression de gènes de flagelle.	Surexprimé en adhésion (15 min et 3h) sur HOC (T).
MARHY3635		protéine putative du système de sécrétion de type VI	Surexprimé en adhésion à la trioléine (T) Surexprimé en biofilm sur hexadécane (P, T)
MARHY2995	<i>yeaG</i>	Sérine protéine kinase, similaire à <i>yeaG</i> d' <i>E.coli</i>	Surexprimé en adhésion aux HOC métabolisables (T).

CDS : CoDing Sequence

P : données obtenues par protéomique ; T : données obtenues par transcriptomique.

CHAPITRE III

Caractérisation fonctionnelle du gène *MARHY2686* de *M. hydrocarbonoclasticus*

1. Études bioinformatique et bibliographique de *MARHY2686*

1.1. Expression du gène *MARHY2686* en condition d'adhésion et de biofilm sur HOC

Les données obtenues par les technologies « omiques » nous ont amenés à considérer que la protéine *MARHY2686* représentait un candidat intéressant pour l'étude et la compréhension du développement des biofilms sur les HOC chez *M. hydrocarbonoclasticus*. En effet, lors d'une étude de protéomique visant à comparer le profil d'expression protéique de cellules en croissance planctonique sur un substrat soluble avec celui de cellules de biofilm en croissance sur de l'hexadécane (Vaysse et al., 2009), il a été observé que *MARHY2686* faisait partie des protéines les plus surproduites avec un facteur de surexpression de 22 en condition de biofilm sur hexadécane, et représentant approximativement 2 % des protéines totales du biofilm (Figure III.1.A).

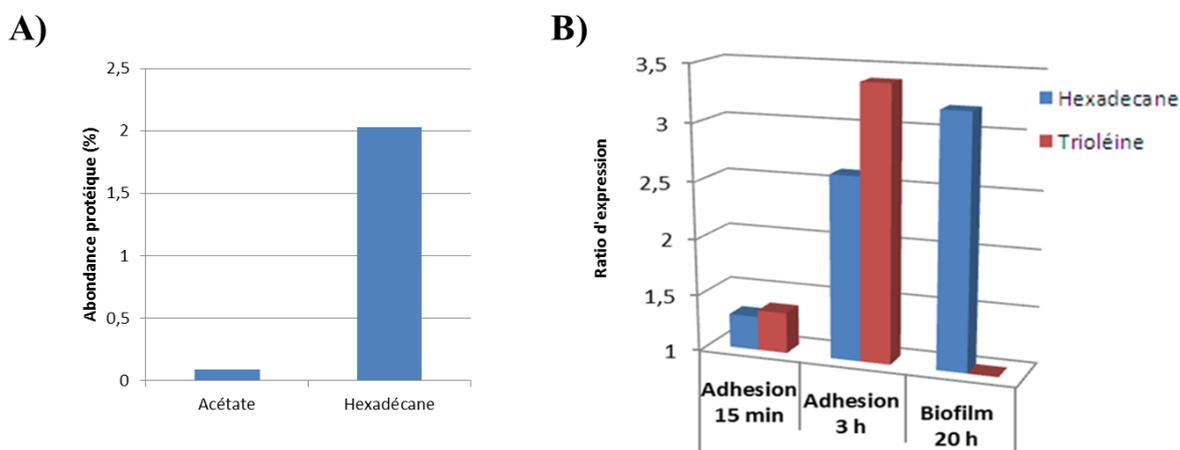


Figure III.1 : Profil d'expression du gène *MARHY2686*

A) L'abondance de la protéine *MARHY2686* en condition planctonique sur acétate et en condition de biofilm sur hexadécane. L'abondance protéique a été obtenue par protéomique et est donnée en pourcentage par rapport à la quantité totale de protéine détectée dans chaque condition (d'après (Vaysse et al., 2009).

B) Expression relative de *MARHY2686* obtenue par analyse de puces d'ADN sur des cellules adhérant aux HOC et sur des cellules de biofilms sur HOC. Les niveaux d'expression génique obtenus après 15 min et 3 h d'adhésion et de biofilm sur hexadécane et trioléine sont donnés sous forme de ratio d'expression par rapport à la condition de référence (la référence de croissance planctonique sur acétate pour les conditions biofilm et le T₀ pour les conditions d'adhésion) (d'après Mounier, 2013, et Mounier et al., soumis (Annexe 1)).

Les données d'expression du gène *MARHY2686* obtenues par protéomique sont en accord avec celles obtenues par transcriptomique qui apportent en plus les résultats d'expression en biofilm sur trioléine. Par ailleurs, cette analyse transcriptomique menée sur les étapes d'adhésion aux HOC nous a permis de constater que l'activation de *MARHY2686* est précoce, dès 15 min de contact avec les HOC (Figure III.1.A) ce qui suggère un rôle dès les premières étapes de la formation du biofilm. Il est intéressant de noter que cette réponse

précoce de l'expression du gène *MARHY2686* ne se fait que sur les HOC métabolisables par *M. hydrocarbonclasticus* et non sur HMN (heptaméthylnonane) (non montré), alcane non métabolisable, ce qui indique une réponse spécifique à une interface nutritive.

Le génome de *M. hydrocarbonclasticus* possède deux autres gènes similaires à *MARHY2686*, les gènes *MARHY1551* et *MARHY3663* qui ne sont pas différentiellement exprimés dans aucune des conditions testées en transcriptomique et qui n'ont pas été identifiés par protéomique.

Les données transcriptomiques montrent également que *MARHY2686* et les gènes adjacents *MARHY2685* et *MARHY2687* sont co-exprimés dans toutes les conditions testées. Les trois gènes *MARHY2687*, *MARHY2686* et *MARHY2685* feraient alors partie d'un même régulon et interviendraient potentiellement dans la même fonction biologique.

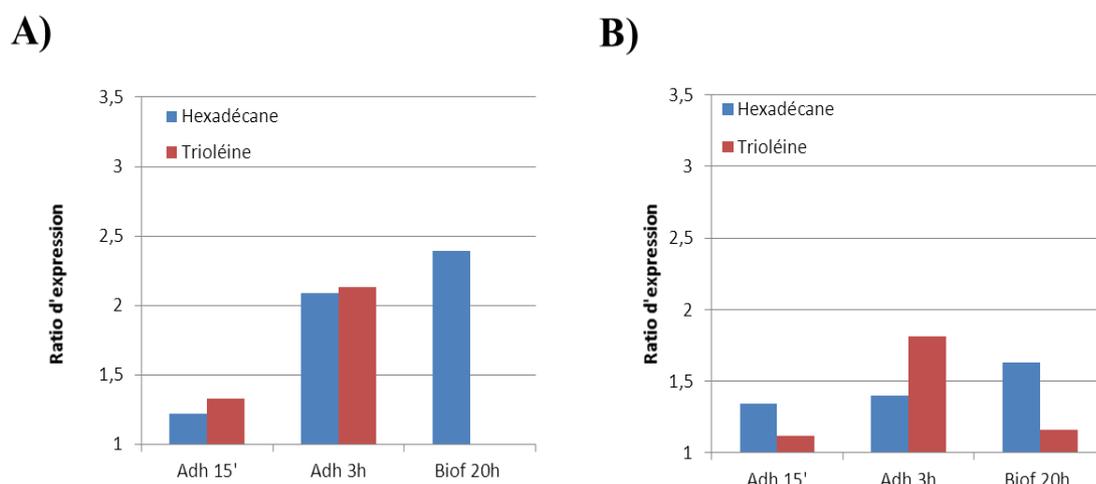


Figure III.2 : Profil d'expression des gènes *MARHY2687* (A) et *MARHY2685* (B).

Expression relative obtenue par analyse transcriptomique sur des cellules adhérant aux HOC et sur des biofilms sur HOC. Les niveaux d'expression obtenus en condition d'adhésion 15 min et 3 h (15' et 3h) et de biofilm (Biof) sur hexadécane et trioléine sont donnés sous forme de ratio d'expression par rapport à la condition de référence (la référence de croissance planctonique sur acétate pour les conditions biofilm et le T₀ pour les conditions d'adhésion).

1.2. Le locus du gène *MARHY2686*

Une analyse in silico a été menée pour caractériser le gène *MARHY2686* et son locus. *MARHY2686* et *MARHY2685* sont orientés dans le même sens de transcription et séparés par une région intergénique de 81 pb. Un promoteur en amont du gène *MARHY2686* et un terminateur de transcription rho-indépendant en aval du gène *MARHY2685* sont prédits suggérant un opéron. Les séquences codantes de *MARHY2686* et *MARHY2685* sont

constituées respectivement de 1011 et 1986 paires de bases (pb), codant respectivement des protéines de 336 et 661 acides aminés. A 63 pb en amont de l'opéron putatif se trouve le gène *MARHY2687* de la taille de 1065 pb qui produit une protéine de 354 acides aminés (Figure III.3).

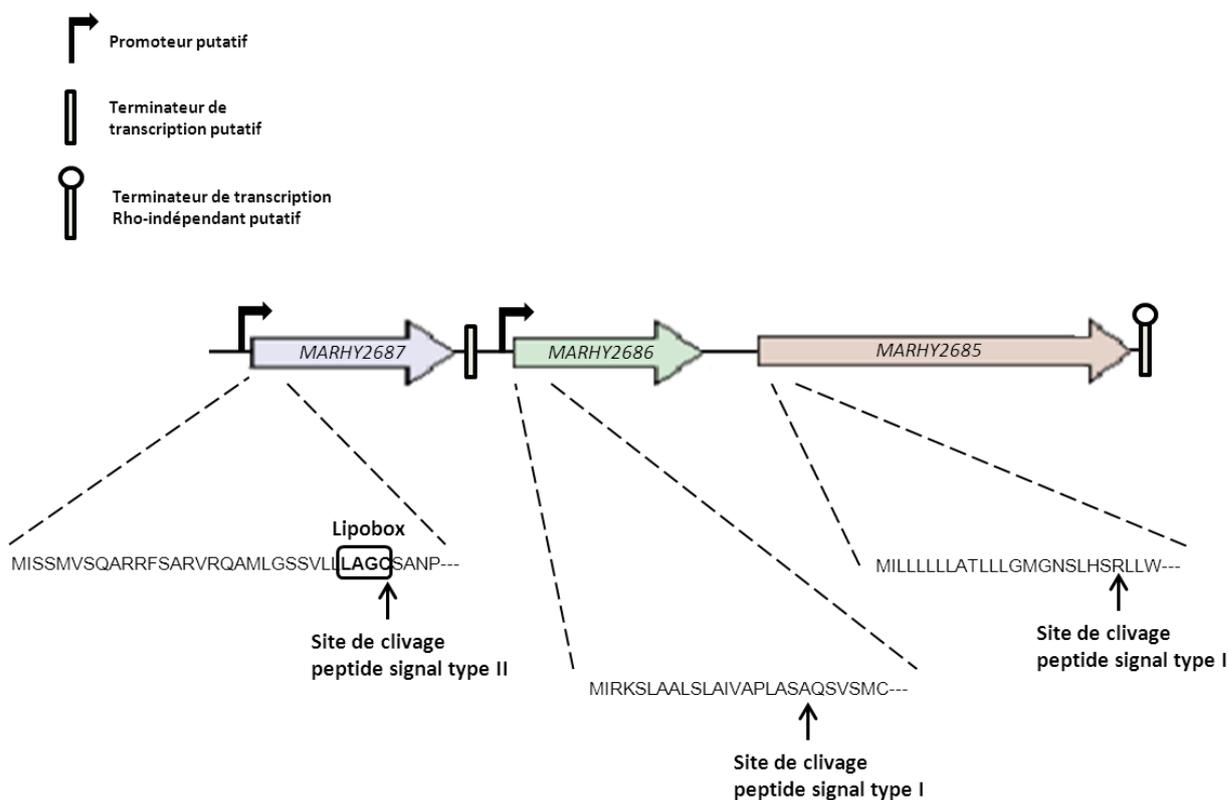


Figure III.3 : Structure du locus du gène *MARHY2686* et les différents éléments prédits.

La recherche de domaines et motifs dans *MARHY2686* par différents outils bioinformatiques disponibles sur le portail ExPASy (<http://www.expasy.org/proteomics>) (Artimo et al., 2012) a révélé qu'elle contient une séquence signal de 20 acides aminés (prédite par SignalP du portail) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2011) mais pas d'hélices transmembranaires (TMHM) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) (Sonnhammer et al., 1998) suggérant que cette protéine soit périplasmique, dans la membrane externe ou encore sécrétée (Figure III.3). *MARHY2686* ne possède pas de domaine conservé mais montre 36 % d'identité et 50 % de similarité avec une protéine périplasmique, AdeT, d'*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 (Figure III.4). Il a été montré expérimentalement que AdeT est un composant d'un système de pompe d'efflux de type RND (Srinivasan et al., 2011). Cette forte identité de *MARHY2686* avec AdeT suggère qu'elle soit aussi un composant d'un système d'efflux.

hélices transmembranaires. Les composés transportés à travers ce système de transport secondaire connus à ce jour sont notamment : l'acide sialique, la taurine, le gluconate, le malonate, le lactate (Mulligan et al., 2011)...

Le troisième gène du locus, *MARHY2687*, possède une séquence consensus de précurseurs des lipoprotéines LAGC au niveau de sa séquence signal, aussi appelée lipobox (Figure III.3). Le peptide signal des prélipoprotéines est clivé par des peptidases de type II qui reconnaissent la lipobox. Le premier résidu de la séquence clivée, à savoir la cystéine, est acylé pour donner la lipoprotéine mature qui va par la suite être adressée vers la membrane interne ou externe, selon la nature des acides aminés adjacents à la première cystéine (Narita et al., 2004; Zückert, 2014). D'après l'analyse *in silico* menée par le logiciel MetalocgramN (<http://genesilico.pl/MetaLocGramN/>) (Magnus et al., 2012), la lipoprotéine *MARHY2687* mature serait adressée vers la membrane externe.

D'une manière générale, les gènes codant les composants de pompes d'efflux de type RND font partie d'un même opéron (pour plus d'information se référer à la partie 1.3.3. du **Chapitre I**). Cependant, il a été observé dans de nombreux cas que les gènes codant pour les composantes de la membrane interne et du périplasma forment un opéron composé de deux gènes et que la porine du système est synthétisée par un gène isolé ou faisant partie d'un autre opéron de pompe d'efflux (Martinez et al., 2009). Comme présenté précédemment, le gène *MARHY2686* qui code pour une protéine possédant 36 % d'identité avec une protéine périplasmique d'un système d'efflux de type RND, forme un opéron putatif avec le gène *MARHY2685* qui code pour une protéine de la membrane interne possédant un domaine de type DctM de transporteur TRAP. De plus, les données transcriptomiques ont révélées que *MARHY2686*, *MARHY2685* et le gène *MARHY2687* codant pour une lipoprotéine de la membrane externe, font partie d'un même régulon, suggérant une implication potentielle dans la même fonction biologique. Il est envisageable que *MARHY2686* en association avec les deux protéines *MARHY2687* et *MARHY2685* qui n'ont pas de similarité avec les protéines d'efflux connues, fassent partie d'un système d'efflux. Si c'est le cas, ce système tripartite serait atypique, puisqu'il ne correspondrait à aucun des modèles de pompe tripartite de type RND répertoriés jusqu'à maintenant. Une autre possibilité est que *MARHY2685-2687* soient impliqués dans des fonctions de transport de nutriments.

Des recherches de similarité de séquence avec l'algorithme BLASTp nous ont permis de constater que MARHY2686 possède de nombreux homologues qui sont des protéines de fonctions inconnues ou bien annotées AdeT. Le Tableau III.1 présente la distribution phylogénétique des homologues de MARHY2686 ainsi que le nombre de copies présentes dans chaque organisme. Le nombre de génomes de souches d'*Acinetobacter* spp étant très largement surreprésentés dans la base de données, il a été décidé de les exclure de cette analyse. Les homologues de MARHY2686 chez *Acinetobacter* spp. sont très proches de AdeT d'*Acinetobacter baumannii* dont la fonction a été décrite ci-dessus. Des protéines similaires à MARHY2686 sont retrouvées dans la classe des *Gammaproteobacteria*, dans des genres *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Hahella*, *Thalassolituus*, *Alkanindiges*, *Acinetobacter* et *Pseudomonas*, alors que dans les classes des *Betaproteobacteria* et des *Spirochaetes*, elles ne sont respectivement retrouvées que dans les genres *Limnobacter* et *Leptospira* (Tableau III.1). Mis à part pour les genres *Pseudomonas*, *Leptospira* et *Lentisphaerae*, le gène *MARHY2686* est présent en mult copie dans les génomes bactériens et plus particulièrement chez le genre *Alcanivorax* dont certaines souches possèdent jusqu'à 7 copies de ce gène. Ces copies multiples de gènes peuvent être apparues à partir de plusieurs phénomènes de duplication intrachromosomique, elles sont alors considérées comme paralogues, ou par transfert horizontal, auquel cas elles sont qualifiées de xénologues (Treangen and Rocha, 2011). L'augmentation du nombre de copies d'un gène apparaît comme une réponse adaptative chez des bactéries qui ont été exposées à différentes pressions de sélection (Gogarten et al., 2002; Gevers et al., 2004). Si cette pression de sélection disparaît, les gènes peuvent rapidement être perdus. La conservation des gènes en copies multiples permettrait à la bactérie de tirer profit d'une augmentation de la production de la protéine vers une concentration plus avantageuse, ou d'assurer une redondance fonctionnelle dans le cas où une mutation affecterait le gène originel (Hahn, 2009). De nombreux exemples d'adaptation à une grande variété de conditions par l'acquisition de plusieurs copies d'un gène ont été répertoriés (Kondrashov, 2012) : adaptation à une limitation en nutriments en augmentant entre autre le nombre de copies de transporteurs, protection contre les métaux lourds et les antibiotiques par l'acquisition de plusieurs copies de systèmes d'efflux... L'analyse du génome d'une souche bactérienne tolérante aux métaux lourds, *Cupriavidus metallidurans* a révélé un grand nombre de copies de gènes responsables de l'efflux des métaux lourds acquis par transfert horizontal et par des phénomènes de duplication (von Rozycki and Nies, 2009). Enfin, la classification fonctionnelle de tous les gènes paralogues de 106 organismes menées par Gevers et ses

collègues (2004) a permis de rendre compte que la plus grande partie de ceux-ci interviennent dans 3 processus cellulaires principaux : la transcription, le métabolisme et le mécanisme de défense.

Tableau III.1 : Distribution phylogénétique des bactéries possédant des homologues de MARHY2686.

Classe	Genre	Espèce	Nombre de copies	
Gammaproteobacteria	<i>Marinobacter</i>	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	2	
		<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840	3	
		<i>Marinobacter</i> sp. EN3	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. EVN1	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. C1S70	3	
		<i>Marinobacter daepoensis</i>	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. ES-1	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. HL-58	2	
		<i>Marinobacter algicola</i> DG893	3	
		<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19	5	
		<i>Marinobacter manganoxydans</i> Mnl7-9	2	
		<i>Marinobacter santoriniensis</i> NKSG1	2	
		<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	3	
		<i>Marinobacter</i> sp. AK21	3	
		<i>Marinobacter nanhaiticus</i> D15-8	3	
	Sous-Total: 15 organismes 39 copies			
	<i>Oleispira</i>	<i>Oleispira antarctica</i> RB-8	4	
		Sous-Total: 1 organisme 4 copies		
	<i>Gamma proteobacterium</i>	<i>Gamma proteobacterium</i> HdN1	5	
		<i>Gamma proteobacterium</i> HTCC5015	4	
		Sous-Total: 2 organismes 9 copies		
	<i>Alcanivorax</i>	<i>Alcanivorax</i> sp. P2S70	7	
		<i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3	7	
		<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	6	
		<i>Alcanivorax</i> sp. 97CO-5	6	
		<i>Alcanivorax</i> sp. DG881	6	
		<i>Alcanivorax pacificus</i> W11-5	7	
		<i>Alcanivorax</i> sp. PN-3	7	
		<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	6	
		<i>Alcanivorax</i> sp. 43B_GOM-46m	5	
	Sous-Total: 9 organismes 53 copies			
	<i>Hahella</i>	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	2	
		<i>Hahella ganghwensis</i>	2	
		Sous-Total: 2 organismes 4 copies		
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	1	
		<i>Pseudomonas mendocina</i> EGD-AQ5	1	
Sous-Total: 2 organismes 2 copies				
<i>Thalassolituus</i>	<i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1	7		
	<i>Thalassolituus oleivorans</i> R6-15	7		
	Sous-Total: 2 organismes 14 copies			
<i>Perluclidibaca</i>	<i>Perluclidibaca piscinae</i>	6		
	Sous-Total: 1 organisme 6 copies			
<i>Alkanindiges</i>	<i>Alkanindiges illinoisensis</i>	5		
	Sous-Total: 1 organisme 5 copies			
<i>Salinisphaera</i>	<i>Salinisphaera shabanensis</i> E1L3A	2		
	Sous-Total: 1 organisme 2 copies			
TOTAL Gammaproteobacteria : 36 organismes 138 copies				
Betaproteobacteria	<i>Limnobacter</i>	<i>Limnobacter</i> sp. MED105	5	
	TOTAL Betaproteobacteria: 1 organisme 5 copies			
Spirochaetes	<i>Leptospira</i>	<i>Leptospira broomii</i> serovar Hurstbridge str. 5399	1	
		<i>Leptospira fainei</i> serovar Hurstbridge str. BUT 6	1	
		<i>Leptospira wolffii</i> serovar Khorat str. Khorat-H2	1	
		<i>Leptospira licerasiae</i> serovar Varillal str. VAR 010	1	
		<i>Leptospira licerasiae</i> str. MMD4847	1	
		<i>Leptospira</i> sp. B5-022	1	
		<i>Leptospira inadai</i> serovar Lyme str. 10	1	
		<i>Leptospira kmetyi</i> serovar Malaysia str. Bejo-Iso9	1	
TOTAL Spirochaetes : 8 organismes 8 copies				
Lentisphaeria	<i>Lentisphaerae</i>	<i>Lentisphaerae bacterium</i> SCGC AAA283-D08	1	
		TOTAL Lentisphaeria : 1 organisme 1 copie		

Paramètres de l'algorithme BLASTp : e-value < 10⁻⁶, pourcentage de recouvrement > 80 % et identité > 30 %.

MARY2687 et *MARHY2685* sont des protéines dont les fonctions sont inconnues. L'analyse de la distribution phylogénétique nous indique que les gènes associés à ces protéines sont retrouvés dans le génome des mêmes espèces bactériennes que les homologues de *MARHY2686* (Tableau III.2 et Tableau III.3). Contrairement à *MARHY2686*, les génomes bactériens possèdent moins de paralogues des gènes de *MARHY2687* et *MARHY2685*.

Les groupes de syntonie associés à *MARHY2686* ont été recherchés dans les génomes bactériens de la base de données GenBank. Chez *M. hydrocarbonoclasticus*, les trois gènes *MARHY2685*, *MARHY2686* et *MARHY2687* sont adjacents. La même organisation est retrouvée dans les génomes où ils sont présents à l'exception des génomes des genres *Leptospira*, *Acinetobacter* et *Alkanindiges*. Par exemple, *Oleispira antartica* et *Alcanivorax borkumensis* SK2 possèdent deux copies de ce cluster ainsi que d'autres paralogues de *MARHY2686* et *MARHY2685* isolés dans d'autres loci. La distribution phylogénétique similaire de ces trois gènes et la conservation de la syntonie suggèrent qu'ils sont impliqués dans le même processus biologique. D'autre part, ces trois gènes sont conservés exclusivement chez les bactéries capables d'utiliser les HOC comme source de carbone et/ou chez celles qui possèdent au moins une copie des gènes de dégradation d'alcane (Bogan et al., 2003; Yakimov et al., 2007; Nie et al., 2014). Il est intéressant de noter que les représentants du groupe des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) (se référer à la section 1.3. du **Chapitre II**) appartenant aux genres *Alcanivorax*, *Thalassolituus*, *Oleispira* et *Marinobacter*, hautement spécialisés dans la dégradation d'hydrocarbures (Yakimov et al., 2007) possèdent ce cluster de trois gènes.

Tableau III.2 : Distribution phylogénétique des bactéries possédant des homologues de MARHY2685.

Classe	Genre	Espèce	Nombre de copies	
Gammaproteobacteria	Marinobacter	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	2	
		<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. EN3	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. EVN1	3	
		<i>Marinobacter</i> sp. C1570	2	
		<i>Marinobacter daepoensis</i>	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. ES-1	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. HL-58	2	
		<i>Marinobacter algicola</i> DG893	2	
		<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19	3	
		<i>Marinobacter manganoxydans</i> Mnl7-9	2	
		<i>Marinobacter santoriniensis</i> NKS61	2	
		<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	3	
		<i>Marinobacter</i> sp. AK21	2	
		<i>Marinobacter nanhaiticus</i> D15-8	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. A3d10	2	
	Sous-Total: 16 organismes 35 copies			
	Oleispira	<i>Oleispira antarctica</i> RB-8	2	
		Sous-Total: 1 organisme 2 copies		
	Gamma proteobacterium	<i>Gamma proteobacterium</i> HdN1	4	
		<i>Gamma proteobacterium</i> HTCC5015	1	
		<i>Gammaproteobacteria bacterium</i> SCGC AAA003-E02	1	
	Sous-Total: 3 organismes 6 copies			
	Alcanivorax	<i>Alcanivorax</i> sp. P2S70	2	
		<i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3	1	
		<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	1	
		<i>Alcanivorax</i> sp. 97CO-5	1	
		<i>Alcanivorax</i> sp. DG881	3	
		<i>Alcanivorax pacificus</i> W11-5	2	
		<i>Alcanivorax</i> sp. PN-3	2	
		<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	2	
		<i>Alcanivorax</i> sp. 43B_GOM-46m	2	
	Sous-Total: 9 organismes 16 copies			
	Hahella	<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	1	
		<i>Hahella ganghwensis</i>	1	
		Sous-Total: 2 organismes 2 copies		
Pseudomonas	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	1		
	<i>Pseudomonas mendocina</i> EGD-AQ5	1		
	Sous-Total: 2 organismes 2 copies			
Thalassolituus	<i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1	3		
	Sous-Total: 1 organisme 3 copies			
Alkanindiges	<i>Alkanindiges illinoisensis</i>	1		
	Sous-Total: 1 organisme 1 copie			
Salinisphaera	<i>Salinisphaera shabanensis</i> E1L3A	1		
	Sous-Total: 1 organisme 1 copie			
TOTAL Gammaproteobacteria: 36 organismes 68 copies				
Betaproteobacteria	Limnobacter	<i>Limnobacter</i> sp. MED105	1	
		TOTAL Betaproteobacteria: 1 organisme 1 copie		
Spirochaetes	Leptospira	<i>Leptospira broomii</i> serovar Hurstbridge str. 5399	1	
		<i>Leptospira fainei</i> serovar Hurstbridge str. BUT 6	1	
		<i>Leptospira wolffii</i> serovar Khorat str. Khorat-H2	1	
		<i>Leptospira licerasiae</i> serovar Varillal str. VAR 010	1	
		<i>Leptospira licerasiae</i> str. MMD4847	1	
		<i>Leptospira</i> sp. B5-022	1	
		<i>Leptospira inadai</i> serovar Lyme str. 10	1	
		<i>Leptospira kmetyi</i> serovar Malaysia str. Bejo-Iso9	1	
		<i>Leptospira weilii</i> serovar Ranarum str. ICFT	1	
TOTAL Spirochaetes: 9 organismes 9 copies				

Paramètres de l'algorithme BLASTp : e-value < 10⁻⁶, pourcentage de recouvrement > 80 % et identité > 30 %.

Tableau III.3 : Distribution phylogénétique des bactéries possédant des homologues de MARHY2687.

Classe	Genre	Espèce	Nombre de copies	
Gammaproteobacteria	Marinobacter	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	2	
		<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. EN3	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. EVN1	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. C1S70	2	
		<i>Marinobacter daepoensis</i>	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. ES-1	1	
		<i>Marinobacter</i> sp. HL-58	2	
		<i>Marinobacter algicola</i> DG893	2	
		<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19	2	
		<i>Marinobacter manganoxydans</i> Mnl7-9	2	
		<i>Marinobacter santoriniensis</i> NKS1	2	
		<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	3	
		<i>Marinobacter</i> sp. AK21	2	
		<i>Marinobacter nanhaiticus</i> D15-8	2	
		<i>Marinobacter</i> sp. A3d10	2	
	<i>Marinobacter</i> sp. R9SW1	1		
	Sous-Total: 16 organismes 33 copies			
	Oleispira		<i>Oleispira antarctica</i> RB-8	2
			Sous-Total: 1 organisme 2 copies	
	Gamma proteobacterium		<i>Gamma proteobacterium</i> HdN1	3
			<i>Gammaproteobacteria bacterium</i> SCGC AAA003-E02	1
			Sous-Total: 2 organismes 4 copies	
	Alcanivorax		<i>Alcanivorax</i> sp. P2S70	1
			<i>Alcanivorax hongdengensis</i> A-11-3	1
			<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	1
			<i>Alcanivorax</i> sp. 97CO-5	1
			<i>Alcanivorax</i> sp. DG881	2
			<i>Alcanivorax pacificus</i> W11-5	2
			<i>Alcanivorax</i> sp. PN-3	1
			<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	1
			<i>Alcanivorax</i> sp. 43B_GOM-46m	1
	Sous-Total: 9 organismes 11 copies			
	Hahella		<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	1
			<i>Hahella ganghwensis</i>	1
			Sous-Total: 2 organismes 2 copies	
Pseudomonas		<i>Pseudomonas mendocina</i> EGD-AQ5	1	
		Sous-Total: 1 organisme 1 hit		
Thalassolituus		<i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1	1	
		<i>Thalassolituus oleivorans</i> R6-15	1	
		Sous-Total: 2 organismes 2 hits		
Perluclidibaca		<i>Perluclidibaca piscinae</i>	1	
		Sous-Total: 1 organisme 1 copie		
Salinisphaera		<i>Salinisphaera shabanensis</i> E1L3A	1	
		Sous-Total: 1 organisme 2 hits		
TOTAL Gammaproteobacteria : 36 organismes 68 hits				
Betaproteobacteria	Limnobacter	<i>Limnobacter</i> sp. MED105	2	
		TOTAL Betaproteobacteria: 1 organisme 2 copies		
Spirochaetes	Leptospira	<i>Leptospira broomii</i> serovar Hurstbridge str. 5399	1	
		<i>Leptospira fainei</i> serovar Hurstbridge str. BUT 6	1	
		<i>Leptospira wolffii</i> serovar Khorat str. Khorat-H2	1	
		<i>Leptospira licerasiae</i> serovar Varillal str. VAR 010	1	
		<i>Leptospira licerasiae</i> str. MMD4847	1	
		<i>Leptospira</i> sp. B5-022	1	
		<i>Leptospira inadai</i> serovar Lyme str. 10	1	
		<i>Leptospira kmetyi</i> serovar Malaysia str. Bejo-Iso9	1	
TOTAL Spirochaetes : 8 organismes 8 hits				

Paramètres de l'algorithme BLASTp : e-value < 10⁻⁶, pourcentage de recouvrement > 80 % et identité > 30 %.

2. Caractérisation fonctionnelle du gène *MARHY2686*

Les données d'expression génique et protéique ainsi que les études *in silico* menées sur *MARHY2686* et les gènes adjacents, fournissent un faisceau d'arguments en faveur d'un rôle de *MARHY2686* dans la formation de biofilm sur alcanes. L'étude fonctionnelle de ce gène a donc été entreprise.

2.1. Le gène *MARHY2686* est impliqué dans la formation de biofilm sur alcanes

Le mutant knock-out du gène *MARHY2686*, aussi appelé AC1 (cf. Tableau II.1 du **Chapitre II**), a été construit par la méthode d'échange allélique, en remplaçant une partie du gène par une cassette conférant la résistance à la kanamycine (pour plus d'informations sur la construction se référer à la section 3.1.1. du **Chapitre II**). A l'issue de cette construction, le mutant AC1 contient la cassette kanamycine, avec le gène *aphA* orientée dans le sens inverse de la transcription du gène *MARHY2686*.

Les analyses phénotypiques ont par la suite été menées afin de vérifier si ce gène intervient spécifiquement dans la formation de biofilm sur HOC. Des tests de croissance sur des substrats solubles ont tout d'abord été effectués. Sur les milieux minéraux solides, EMS acétate ou DL-lactate et le milieu solide riche Halo (voir section 1.1.1 du **Chapitre II**), les colonies du mutant et la souche sauvage montrent des morphologies identiques. En milieu EMS liquide acétate ou DL-lactate la souche sauvage ainsi que le mutant délété du gène *MARHY2686* suivent une même cinétique de croissance (Figure III.5).

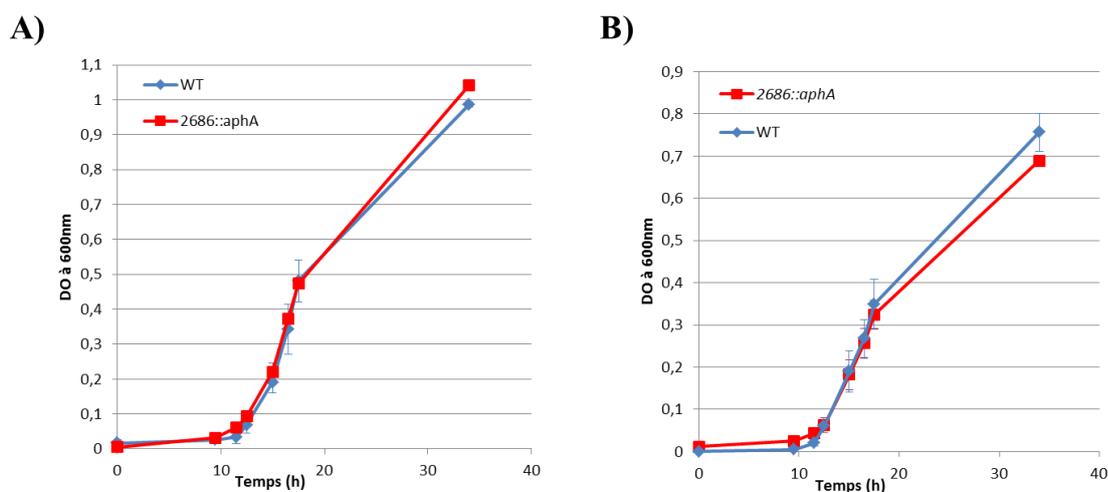


Figure III.5 : Cinétiques de croissance planctonique sur deux substrats solubles, DL-lactate (A) et acétate (B).

WT : souche sauvage JM1 ; *2686::aphA* : mutant « knock-out » AC1 (Δ *MARHY2686::aphA*). Croissance planctonique suivie par mesure de la DO à 600 nm.

Après avoir démontré que la délétion du gène n'entraîne aucun défaut de croissance sur des substrats solubles, la croissance des deux souches a été comparée sur différents types de HOC. Afin d'obtenir une information précise et complète de la croissance sous forme de biofilm, la cinétique de développement du biofilm a été quantifiée par coloration au cristal violet. Aucun défaut de croissance en biofilm n'a été observé sur des composés hydrophobes tels que le *n*-hexadécane-1-ol, l'acide palmitique ou encore la tripalmitine (Figures III.6A, B et C). Au contraire, le développement du biofilm du mutant AC1 sur des alcanes, tels que le *n*-hexadécane et la paraffine (mélange d'alcane de C₁₉ à C₃₁) est affecté par rapport au sauvage. En comparant les cinétiques de formation de biofilm sur la paraffine solide obtenues chez le mutant AC1 et la souche sauvage (Figure III.6D), il a pu être observé que le biofilm du mutant n'est détectable qu'à partir de 18 h d'incubation environ et qu'il accumule le tiers de la biomasse contenue dans le biofilm mature formé par la souche sauvage après 50 h d'incubation. Sur le *n*-hexadécane liquide, il ne semble pas qu'il y ait un retard significatif de formation de biofilm chez le mutant, mais le développement du biofilm s'effectue plus lentement que chez le sauvage JM1 (Figure III.6E). Bien que la cinétique de formation de biofilm sur *n*-hexadécane n'ait pas pu être menée jusqu'au plateau, des observations visuelles ont permis d'estimer que la biomasse contenue au sein du biofilm mutant n'atteignait pas celle du biofilm de type sauvage.

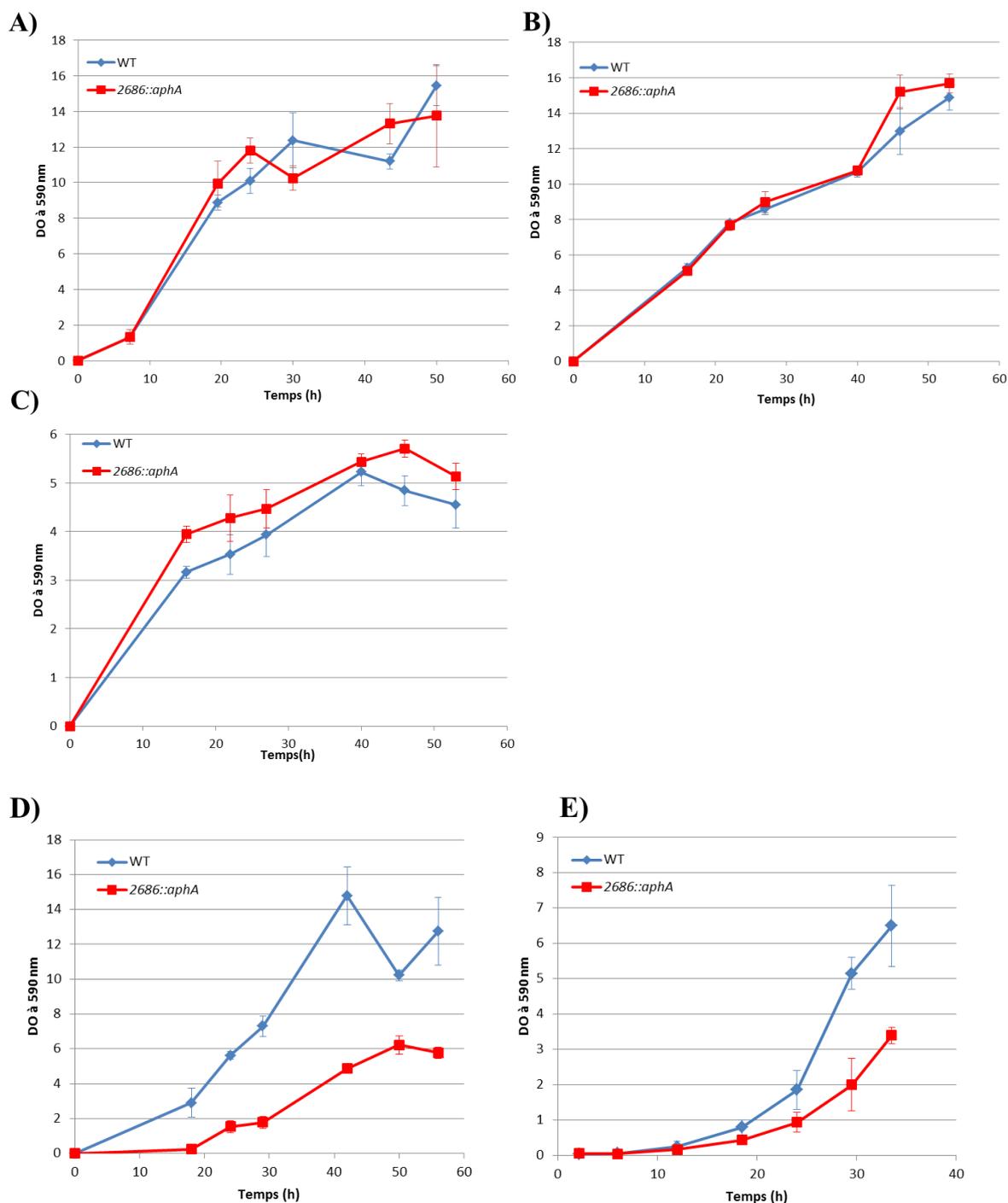


Figure III.6 : Cinétique de croissance en biofilm sur différents HOC.

A) Tripalmitine. B) Acide palmitique. C) *n*-hexadécane-1-ol. D) Paraffine. E) *n*-hexadécane. La formation de biofilm sur les 4 premiers HOC solides (A, B, C et D) a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant le HOC solide coulé en fond de puits. Le biofilm formé à l'interface *n*-hexadécane-eau (E) a été récupéré par filtration à travers une membrane de 33 μm de porosité et suivi dans le temps par coloration au cristal violet.

WT : souche sauvage JM1 ; 2686::aphA : mutant « knock-out » AC1 (*ΔMARHY2686::aphA*).

Un retard de croissance de la souche AC1 comparé à JM1 a également été mis en évidence lorsque le *n*-hexadécane est fourni sous forme de vapeur. Une colonie de chacune de

ces souches a été striée dans une boîte de Petri contenant du milieu EMS agar (sans source de carbone) et du papier Wattman imbibé par 200 µL de *n*-hexadécane, disposé dans le couvercle. Des contrôles sur du milieu EMS supplémenté de DL-lactate (20 mM), et sur EMS agar sans source de carbone ont été réalisés. Les boîtes de Petri ont été incubées à 30 °C et la croissance des colonies a été observée tous les jours. La figure III.7 présente les photographies obtenues au bout de 4 jours d'incubation. En présence de vapeur de *n*-hexadécane, les colonies de AC1 sont beaucoup plus petites que celles de la souche sauvage (Figure III.7A et B), alors que dans la condition contrôle contenant du DL-lactate les deux souches présentent une croissance identique (Figure III.7C et D). Aucune croissance bactérienne de JM1 ou AC1 n'a été observée pour les boîtes de Petri contrôles contenant de l'EMS agar seul (non montré). Ces observations montrent que le gène *MARHY2686* est nécessaire à l'utilisation de vapeur de *n*-hexadécane comme source de carbone.

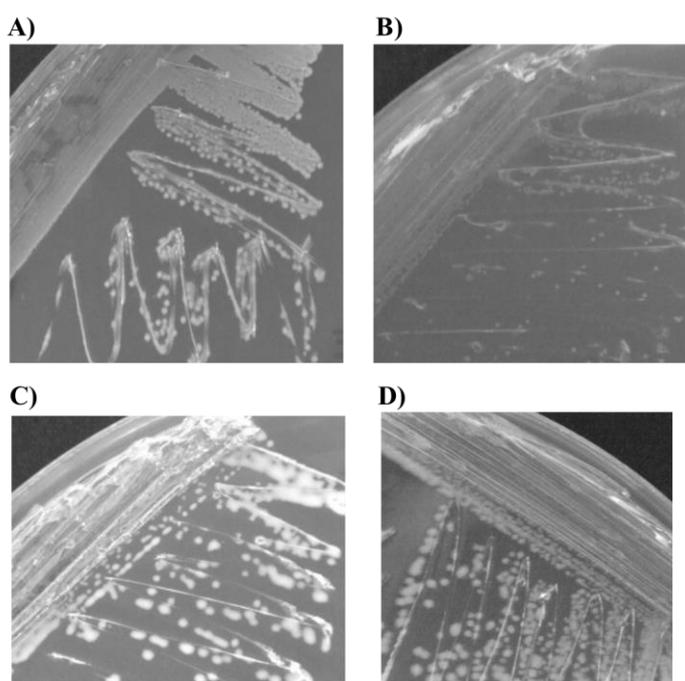


Figure III.7 : Croissance des souches JM1 (A et C) et AC1 (B et D) sur milieu EMS agar exposé à des vapeurs d'hexadécane (A et B) ou sur milieu EMS agar DL-lactate (C et D).
Les boîtes de Petri ont été incubées à 30°C pendant 4 jours.

Ces tests phénotypiques montrent que la mutation du gène *MARHY2686* affecte la croissance sur les *n*-alcanes présents à l'état liquide, solide ou vapeur. D'autre part, la croissance sur d'autres types de HOC appartenant aux classes des acides gras (acide palmitique), des alcools gras (*n*-hexadécane-1-ol) et des triglycérides (tripalmitine) n'est pas perturbée par cette mutation. Il serait intéressant de tester la croissance en biofilm sur un

spectre plus large d'alcane et de lipides, pour vérifier si cette tendance se généralise. Si c'est le cas, cette observation indiquerait que le rôle de *MARHY2686* est spécifique des *n*-alcane.

La mutation dans le gène *MARHY2686* n'affecte pas le développement du biofilm sur les substrats lipidiques, alors que les données de transcriptomique ont révélé que le gène est induit sur ce type de HOC. Bien que l'expression génique suggère l'implication du gène *MARHY2686* dans la formation de biofilm sur les HOC lipidiques, sa contribution serait moins essentielle que pour la formation de biofilm sur les *n*-alcane. Cette observation est un exemple concret qui montre comment la surexpression d'un gène dans une condition donnée par rapport à une référence, obtenue par des analyses transcriptomiques ne garantit pas forcément l'implication du gène dans la condition étudiée.

Les cellules des souches sauvage (JM1) et mutantes AC1 ont été observées par microscopie confocale à balayage laser afin de comparer l'architecture globale des biofilms formés à l'interface paraffine-eau à différents stades de développement du biofilm : au bout de 15 min, 3 h, 24 h et 72 h d'incubation (Figure III.8). Puisque l'induction de l'expression de *MARHY2686* par la trioléine ou le *n*-hexadécane se fait précocement (15 min), l'observation des étapes précoces du développement du biofilm a également permis de déterminer si l'étape d'adhésion était affectée chez le mutant AC1. L'étude a été réalisée par l'équipe B2HM, TGUMR 1319 Micalis INRA/AgroParisTech, partenaire du projet ANR Blanc AD'HOC, à partir de cellules préparées comme décrit dans la section 4.1 du **Chapitre II**. Ces images confirment que la souche mutante forme un biofilm moins confluent que la souche sauvage. Bien que la croissance de la souche AC1 soit plus lente, elle semble petit à petit accumuler autant de biomasse que la souche JM1, et former une architecture globale similaire à celle-ci, qui se traduit par la formation de microcolonies (Figure III.8).

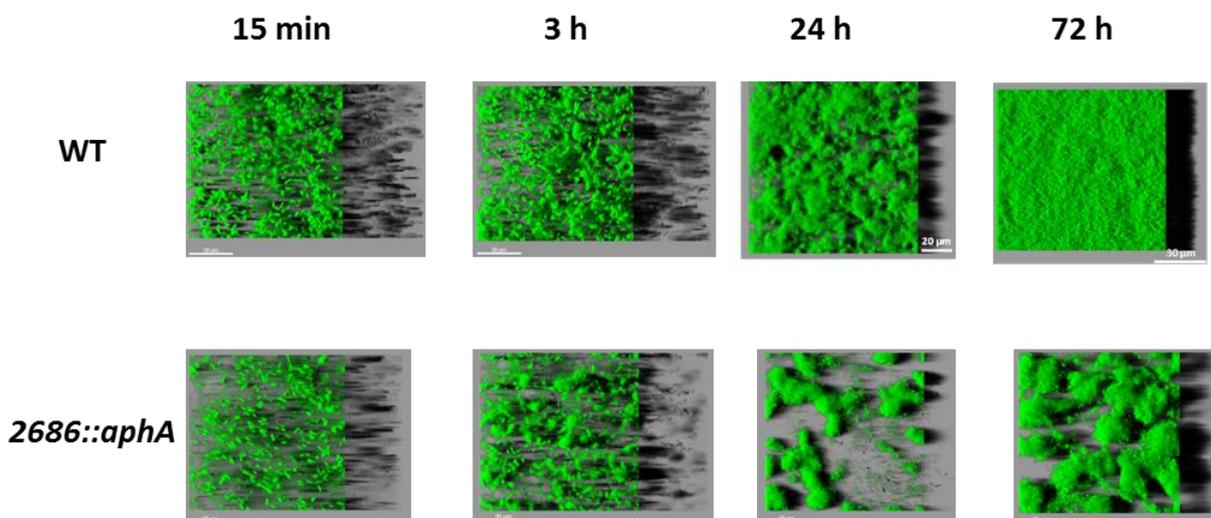


Figure III.8 : Observation de cellules de la souche sauvage *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 et de la souche mutante AC1 adhérées et formant un biofilm à l'interface solide paraffine-eau.

L'utilisation du Syto 9 permet de visualiser les cellules en vert. Images en projection 3D réalisées avec le logiciel IMARIS.

WT : souche sauvage JM1 ; *2686::aphA* : mutant « knock-out » AC1 (Δ *MARHY2686::aphA*).

Pour aller plus loin dans l'analyse, les volumes bactériens (biovolumes) ainsi que le pourcentage de recouvrement de la surface de la paraffine ont été calculées à partir des images obtenues par microscopie confocale pour chaque condition d'incubation (Figure III.9). Ces résultats quantitatifs vérifient que la souche AC1 est affectée dans la capacité à se développer sous forme de biofilm car elle accumule moins de biomasse que la souche sauvage (Figure III.9A) et qu'elle arrive à coloniser moins de surface de paraffine (Figure III.9B). Cependant, alors que le biofilm formé par la souche sauvage semble se démanteler au bout de 72 h d'incubation, la biomasse contenue chez la souche AC1 continue à s'accroître. Par ailleurs, les données obtenues aux temps précoces de la croissance sur paraffine, suggèrent que le mutant AC1 adhère légèrement moins vite à la surface hydrophobe.

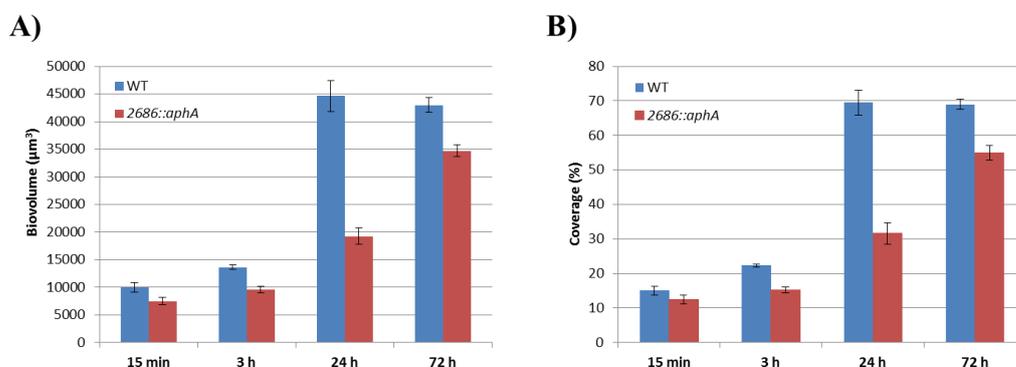


Figure III.9 : Comparaison des analyses de biovolumes (A) et de pourcentage de recouvrement (B) de la surface de la paraffine lors de la formation de biofilm de la souche sauvage *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 et de la souche mutante AC1.

WT : souche sauvage JM1 ; *2686::aphA* : mutant « knock-out » AC1 (Δ *MARHY2686::aphA*).

Une différence morphologique des cellules de JM1 et AC1 adhérees, préalablement marquées par un colorant d'acides nucléiques, a pu également être mise en évidence par microscopie à épifluorescence. Les cellules de JM1 (Figure III.10A) paraissent plus grosses que les cellules AC1 (Figure III.10B). Klein et al. ont démontré que *M. hydrocarbonoclasticus* accumule de grandes quantités de cires sous forme d'inclusions intracytoplasmiques arrondies ou irrégulières lors de l'assimilation des *n*-alcanes conférant ainsi à la bactérie un aspect arrondi (Klein et al., 2008). Il semblerait que le mutant « knock-out » possède moins de réserves lipidiques que la souche sauvage.

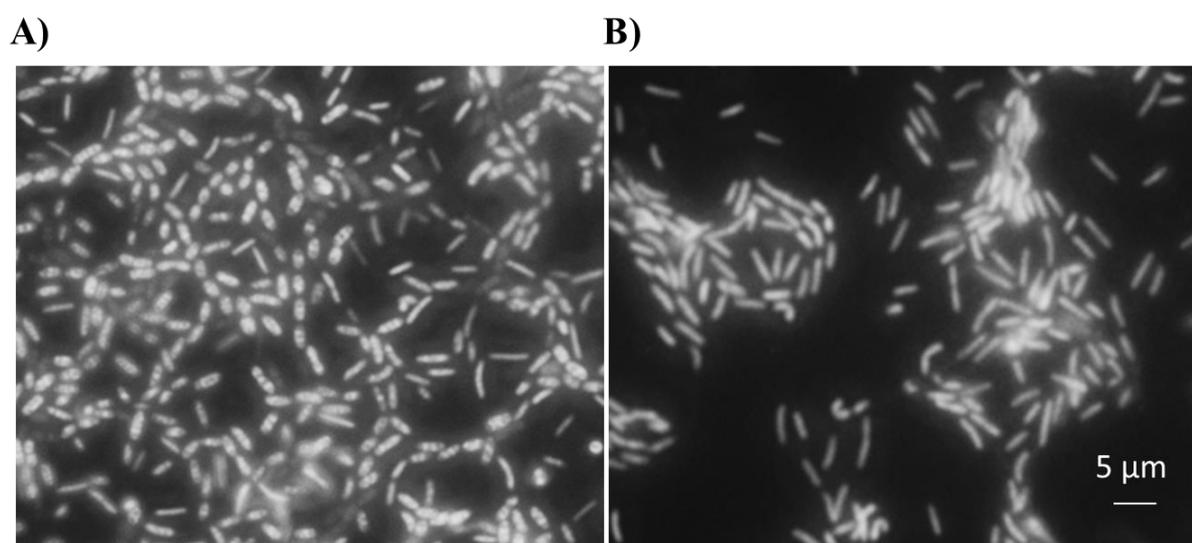


Figure III.10 : Observation au microscope à épifluorescence des cellules sauvages et AC1 adhérees à la paraffine par coloration au Syto9.

A) et B) : Photographies des cellules de JM1 et AC1 obtenues avec un objectif 100 × à immersion d'une ouverture numérique de 1.30.

Les cellules ont été incubées à 30 °C sous faible agitation (50 rpm) et mises au contact de lames de microscope recouvertes de paraffine pendant 40 minutes. Les lames sur lesquelles les cellules se sont adhérees ont été rincées, puis mises à incuber dans un milieu d'EMS frais sans cellule pendant 24 h. Les cellules adhérees à la paraffine ont été colorées pendant 15 minutes à l'obscurité avec 2 µM de Syto9 (colorant d'acides nucléiques) et observées au microscope à épifluorescence (Olympus BX60 contenant une lampe à mercure) à l'aide d'un filtre d'excitation et d'émission à bandes passantes de 470 nm-490 nm et 513 nm-542 nm respectivement.

L'accumulation des réserves intracellulaires de cires par les cellules sauvages et mutées AC1 a été évaluée par coloration avec un colorant lipophile, le rouge Nile. Pour cela, le même mode opératoire que précédemment a été suivi. Les inclusions intra-cytoplasmiques des cellules adhérees à la paraffine ont été révélées par coloration au rouge Nile (8 µg/mL) et observées au microscope à épifluorescence. Les cellules sauvages (Figure III.11A) et les cellules AC1 (Figure III.11B) apparaissent fluorescentes, indiquant que les deux souches bactériennes sont capables d'accumuler des cires intracytoplasmiques. Cependant, les cellules JM1 paraissent plus grosses que les cellules AC1. La quantification des inclusions

cytoplasmiques par chromatographie pourrait rendre compte de cette différence de manière chiffrée et plus fiable. Le mutant « knock-out » semble être affecté dans l'accumulation de cires cytoplasmiques.

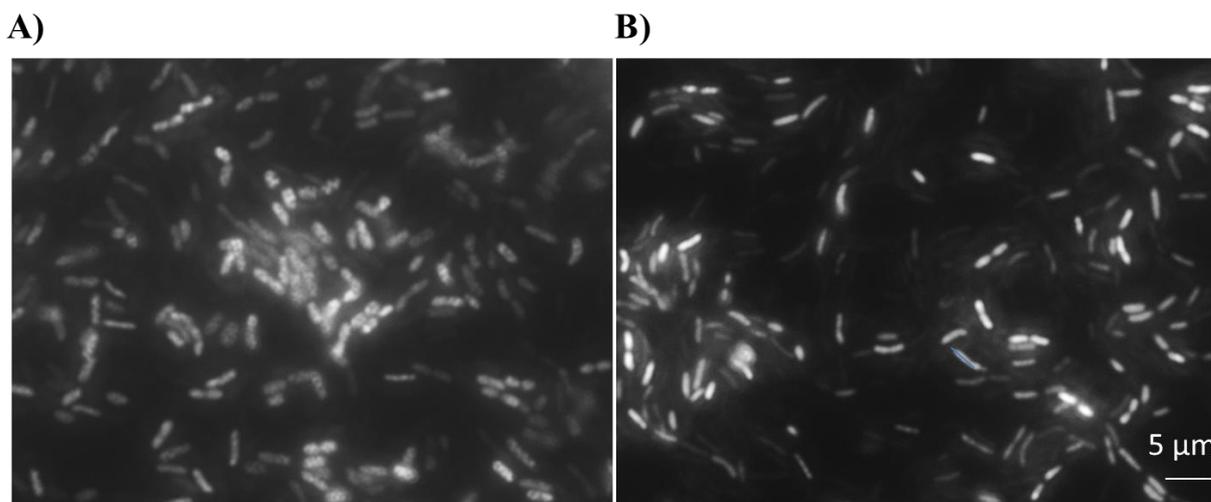


Figure III.11 : Observation au microscope à épifluorescence des cellules sauvages (A) et AC1 (B) adhérentes à la paraffine par coloration au rouge Nile.

Les cellules ont été incubées à 30 °C sous faible agitation (50 rpm) et mises au contact de lames de microscope recouvertes de paraffine pendant 40 minutes. Les lames sur lesquelles les cellules se sont adhérentes ont été rincées, puis mises à incuber dans un milieu d'EMS frais sans cellules pendant 24 h. Les cellules adhérentes à la paraffine ont été colorées pendant 15 minutes à l'obscurité avec 8 µg/mL de rouge Nile et observées au microscope à épifluorescence (Olympus BX60 contenant une lampe à mercure) à l'aide d'un filtre d'excitation et d'émission bandes passantes de 470 nm-490 nm et 513 nm-542 nm respectivement.

2.2. Exploration des fonctions potentielles d'efflux de *MARHY2686*

2.2.1. *Importance des pompes d'efflux de type RND dans la formation de biofilm de JM1*

Un examen complet du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* a permis d'observer que cette bactérie possède plusieurs autres copies de gènes codant pour des systèmes de pompe d'efflux : deux gènes paralogues à *MARHY2686* annotés comme codant pour une protéine similaire à AdeT (*MARHY1551* et *MARHY3663*) mais également 7 clusters de deux gènes ainsi que 6 gènes à priori isolés codant pour des homologues des composants de pompes d'efflux de type RND AcrA et AcrB d'*E.coli* et des systèmes d'efflux de type I. Cette observation préliminaire témoigne de l'adaptation que la bactérie a dû développer pour survivre aux effets toxiques de différents composés auxquels elle a à faire face dans son environnement naturel.

Les pompes d'efflux interviennent dans les mécanismes de détoxification et de défense bactériens vis-à-vis de composés toxiques environnementaux. Baugh et ses collègues

ont récemment démontré que certaines pompes d'efflux, dont AcrAB-TolC, jouent également un rôle dans la formation de biofilm de *Salmonella Typhimurium* (Baugh et al., 2012). De même, Kvist et al. ont pu démontrer que des gènes de pompes d'efflux sont surexprimés chez deux souches d'*E. coli* uropathogènes en condition de biofilm comparé à la condition planctonique (Kvist et al., 2008). Ils ont également montré que la formation de biofilm de divers mutants de pompe d'efflux est affectée chez *E. coli* et *Klebsiella*. En vue d'étudier d'autres mécanismes de traitement contre les infections causées par les biofilms, plusieurs études ont montré que l'addition d'inhibiteurs de pompe d'efflux inhibe la formation de biofilm en plus de diminuer la résistance aux antibiotiques (Kvist et al., 2008; Baugh et al., 2012; Lamers et al., 2013).

Afin de déterminer si chez *M. hydrocarbonoclasticus* les systèmes de pompe d'efflux jouent un rôle dans la formation de biofilm sur les HOC, l'effet d'un inhibiteur de pompe d'efflux (EPI) dans le développement de biofilm sur paraffine a été testé. L'EPI utilisé est un composé peptidomimétique nommé phényl-arginine- β -naphthylamide (pA β N) (Figure III.12), qui est un inhibiteur des pompes d'efflux de type RND. De la même manière que Baugh et ses collègues ont montré que l'ajout de 512 $\mu\text{g/mL}$ de pA β N inhibe drastiquement la formation de biofilm de *Salmonella enterica* sur des microplaques de polystyrène (Baugh et al., 2012), l'addition de 500 $\mu\text{g/mL}$ de pA β N diminue considérablement la formation de biofilm de JM1 sur paraffine (Figure III.13).

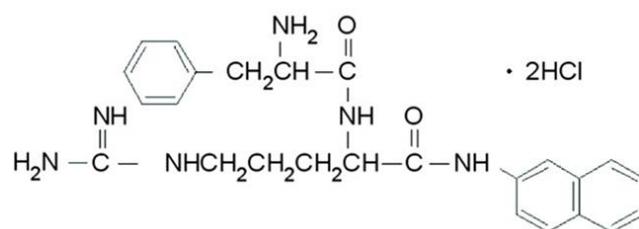


Figure III.12 : La structure de l'inhibiteur de pompe d'efflux phényl-arginine- β -naphthylamide (pA β N).

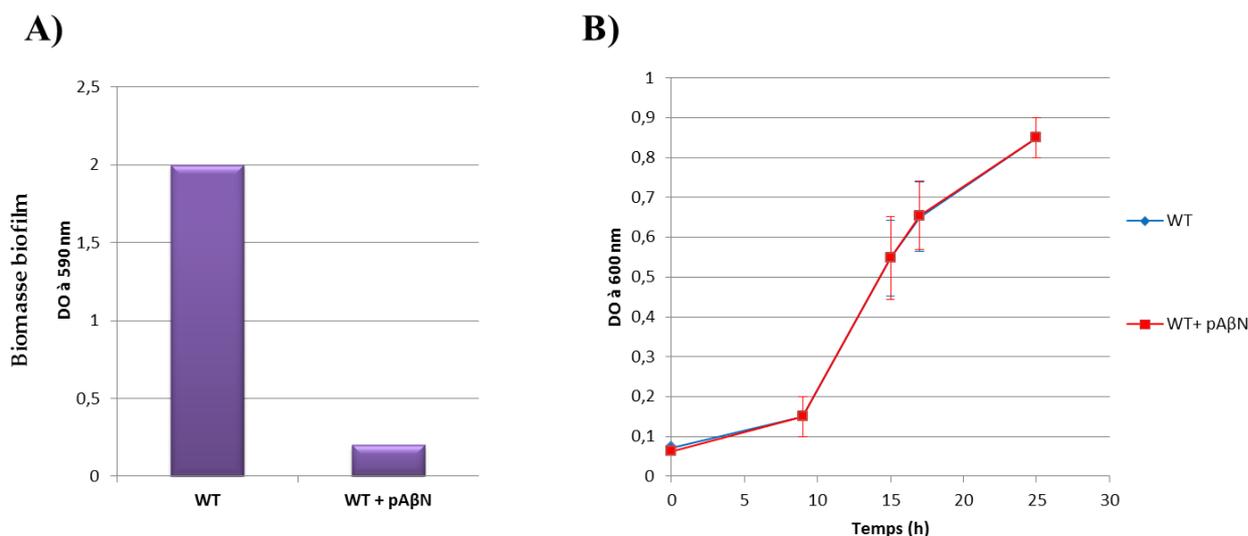


Figure III.13 : Effets de l'addition de l'inhibiteur de pompe d'efflux pAβN sur la formation de biofilm de JM1 sur paraffine (A) et sur la croissance planctonique de JM1 sur lactate (B).

Le biofilm formé sur des microplaques contenant la paraffine solide coulée en fond de puits après 21 h d'incubation à 30 °C et 100 rpm a été quantifié par coloration au cristal violet.

pAβN : phényl-arginine-β-naphtylamide ; WT : souche JM1.

Il a été vérifié que la concentration en pAβN utilisée n'est pas toxique pour la croissance bactérienne. La figure III.13B montre que les cinétiques de croissance bactérienne obtenues en ajoutant ou non l'inhibiteur de pompe d'efflux sont identiques.

Cette expérience montre que les systèmes de pompes d'efflux interviennent dans la formation de biofilm sur les HOC nutritifs chez *M. hydrocarbonoclasticus*. Le rôle exact de ces systèmes dans la formation de biofilm sur HOC ainsi que l'implication de la protéine MARHY2686 restent à démontrer.

Les études *in silico* menées sur la protéine MARHY2686 ont orienté nos recherches vers une éventuelle implication de cette protéine dans un système de pompe d'efflux de type RND. Des études ont pu mettre en évidence le rôle de systèmes d'efflux dans la sécrétion de facteurs importants (facteurs de virulence, auto-inducteurs du Quorum Sensing...) pour la croissance et la colonisation de surfaces. Leur importance pour la survie de la bactérie a également pu être observée à travers des processus de détoxification de composés extérieurs toxiques qui s'accumuleraient dans la cellule (métaux lourds, antibiotiques, solvants, composés antimicrobiens ...) ou encore des composés toxiques endogènes issus du métabolisme bactérien (Martinez et al., 2009). En transposant cet éventail de rôles physiologiques à notre étude, trois hypothèses possibles ont été formulées pour la fonction de MARHY2686 dans la formation de biofilm sur les *n*-alcanes :

- fonction de résistance à des composés toxiques exogènes
- fonction d'évacuation de métabolites des *n*-alcanes, tels que les acides gras, dont l'accumulation excessive serait toxique pour la croissance bactérienne.
- fonction de sécrétion de facteurs importants pour l'assimilation des *n*-alcanes ou la formation de biofilm.

2.2.2. Exploration de la fonction de résistance à des composés toxiques exogènes

L'inhibition de la formation de biofilm sur alcane en présence de pA β N, suggère que des pompes d'efflux sont requises pour la formation de biofilm et/ou la croissance sur *n*-alcanes. Les alcanes ou leurs métabolites pourraient être toxiques lorsqu'ils atteignent une concentration intracellulaire trop élevée. Les systèmes d'efflux seraient responsables de leur élimination pour maintenir une concentration en dessous du seuil de toxicité. La protéine MARHY2686 pourrait faire partie d'un système d'efflux impliqué dans la résistance aux *n*-alcanes.

Pour tester la toxicité des *n*-alcanes, la croissance du mutant sur milieu EMS supplémenté de DL-lactate ou acétate (20 mM) et de *n*-hexadécane sous forme vapeur ou pseudo-solubilisé dans des micelles ont été comparées à la croissance de la souche sauvage JM1.

La toxicité de vapeurs de *n*-hexadécane a été testée en suivant chaque jour la croissance des souches JM1 et AC1 striées sur des boîtes EMS lactate agar exposées à des vapeurs de *n*-hexadécane. Aucune déficience de croissance n'a été révélée pour aucune des souches testées (Figure III.14).

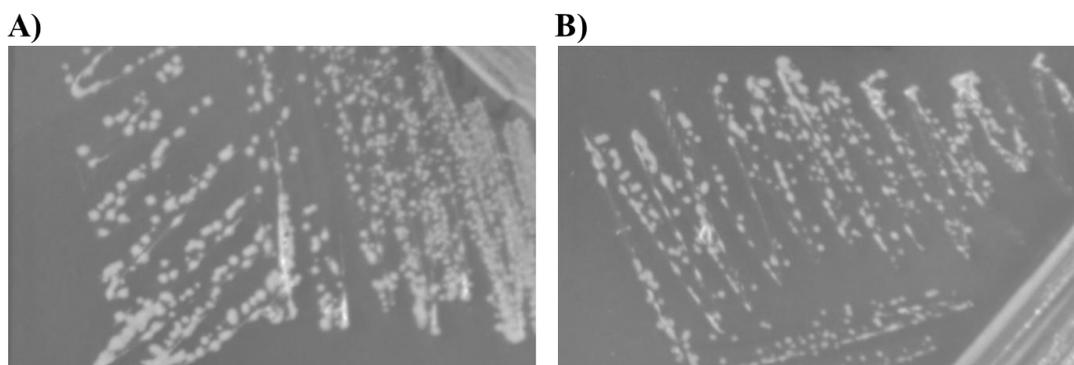


Figure III.14 : Toxicité des souches JM1 (A) et AC1 (B) vis-à-vis de l'hexadécane vapeur.

Une colonie de chacune de ces souches a été striée dans une boîte de Petri contenant du milieu EMS agar+DL-lactate et du papier wattman imbibé par 200 μ L d'hexadécane disposé dans le couvercle. Les photographies présentées ont été obtenues au bout de 4 jours d'incubation

La toxicité du *n*-hexadécane a été aussi testée sous forme pseudo-solubilisée dans des micelles de Brij 58 qui est un détergent non-ionique. Pour cela le Brij a été utilisé à une concentration de 4 mM qui est 50 fois supérieure à sa CMC (0.08 mM). Il a été montré au laboratoire que la souche JM1 n'utilise pas ce détergent comme source de carbone et qu'elle est capable d'assimiler le *n*-hexadécane pseudo-solubilisé par le Brij 58. Il a également été vérifié que la croissance planctonique sur milieu EMS contenant 20 mM d'acétate et 4 mM de Brij 58 est identique chez JM1 (Julie Mounier, communication personnelle). Les souches JM1 et AC1 montrent une croissance planctonique identique sur milieu EMS supplémenté d'une source de carbone soluble (acétate) et de *n*-hexadécane pseudo-solubilisé (Figure III.15). Aucune sensibilité n'a été observée vis-à-vis de l'hexadécane incorporé dans des micelles pour aucune des deux souches, suggérant que sous cette forme, il n'est pas toxique pour la croissance bactérienne.

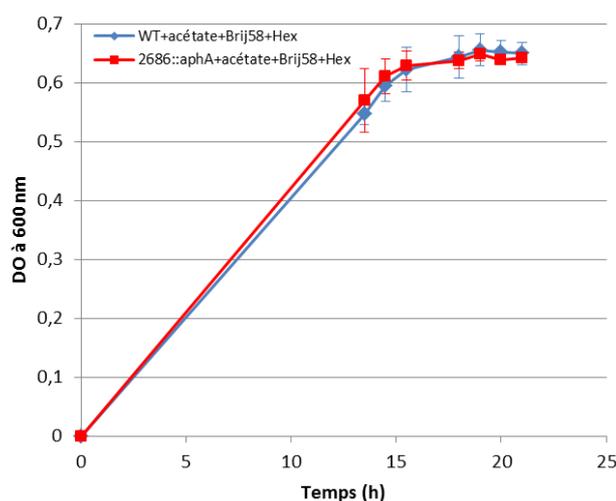


Figure III.15 : Croissance planctonique des souches JM1 et AC1 sur le *n*-hexadécane (0.2 %) pseudo-solubilisé par du Brij 58 (4 mM).

WT : souche sauvage JM1 ; 2686::*aphA* : mutant « knock-out » AC1 (Δ *MARHY2686::aphA*).

La sensibilité du mutant AC1 vis-à-vis d'un large spectre de composés a ensuite été testée. Pour cela, les concentrations minimales inhibant la croissance (CMI) du mutant AC1 et de JM1 ont été déterminées avec le détergent SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), le toluène, le propane-1-ol, les sels biliaires ainsi qu'avec la tétracycline ou le chloramphénicol, pour lesquels le mutant *adeT* d'*A. baumannii* ATCC 17978 démontre une sensibilité accrue (Srinivasan et al., 2011) (Tableau III.4). Des tests de croissance ont également été menés sur des composés hydrophobes tels que le butanol et le dodécanol (Tableau III.5), ainsi que sur de la vapeur d'hexane et d'un pétrole brut (Bilondo) (Tableau III.6). La délétion du gène

MARHY2686 n'entraîne aucune différence de sensibilité vis-à-vis de ce large éventail de composés testés.

Comme mentionné précédemment, l'observation du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* a révélé l'existence de plusieurs autres systèmes de pompe d'efflux de type RND. Il est admis que chaque système d'efflux peut sécréter une large gamme de substrat, avec des redondances possibles d'un système à un autre. Trois hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'absence de différence de sensibilité :

- les composés testés ne sont pas des substrats du système de type RND constitué de *MARHY2686*, et dans ce cas-là il faudrait élargir l'éventail de composés à tester pour augmenter les chances de trouver les substrats pris en charge par ce système.
- aucun des composés testés n'est spécifique du système d'efflux constitué de *MARHY2686* mais seraient à la fois des substrats de ce dernier et d'un ou de plusieurs autres systèmes d'efflux de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.
- *MARHY2686* n'est pas un composant d'un système d'efflux de composé toxique

Tableau III.4 : Détermination des MIC de JM1 et AC1 sur différents composés.

	Concentration minimale inhibant la croissance sur différents composés solubles					
	Chloramphénicol	Tétracycline	SDS	Sels Biliaires	Toluène	Propane-1-ol
WT	4 µg/mL	128 µg/mL	62,5 µg/mL	1000 µg/mL	500 ppm	1%
<i>2686::aphA</i>	4 µg/mL	128 µg/mL	62,5 µg/mL	1000 µg/mL	500 ppm	1%

Tableau III.5 : Tests de toxicité vis-à-vis de certains composés hydrophobes.

	Croissance sur 0,1 % de composés hydrophobes	
	Dodécanol	Butanol
WT	croissance	croissance
<i>2686::aphA</i>	croissance	croissance

Tableau III.6 : Tests de toxicité vis-à-vis des vapeurs de certains composés.

	Croissance sur vapeur		
	Hexane	Hexadécane	Pétrole Brut
WT	croissance	croissance	croissance
<i>2686::aphA</i>	croissance	croissance	croissance

WT : souche sauvage JM1 ; *2686::aphA* : mutant « knock-out » AC1 (Δ *MARHY2686::aphA*).

2.2.3. Exploration des fonctions d'élimination de métabolites toxiques issus de la dégradation des alcanes.

Pour tester si *MARHY2686* est impliquée dans l'évacuation du surplus de métabolites endogènes toxiques, nous nous sommes inspirés des travaux menés par Lennen et ses collègues (Lennen et al., 2011, 2013) . Cette équipe travaille avec une souche d'*E. coli* génétiquement modifiée pour produire une grande quantité d'acides gras internes en vue d'une application dans la synthèse de biofuel. Ils ont montré qu'une accumulation importante d'acides gras endogènes diminue la viabilité des cellules en perturbant l'intégrité de la membrane cytoplasmique, contrairement aux cellules s'alimentant d'acides gras extracellulaires. Pour survivre à une trop forte concentration intracellulaire d'acides gras, ils ont montré que la bactérie sécrète ces composés à travers les pompes d'efflux de type RND AcrAB-TolC majoritairement (Lennen et al., 2013).

De la même manière que Lennen et ses collègues, nous avons testé la viabilité des souches JM1 et AC1 lorsqu'elles étaient en contact avec des *n*-alcanes. La viabilité cellulaire a été évaluée par microscopie à épifluorescence en faisant une double coloration des cellules se développant sur paraffine avec du iodure de propidium (que l'on nommera PI pour Propidium Iodide pour plus de commodités), molécule qui fluoresce dans le rouge quand elle s'intercale entre les bases des acides nucléiques et qui est incapable de diffuser à travers les membranes intactes, et le Syto 9, molécule qui se fixe aux acides nucléiques et fluoresce dans le vert. Les cellules viables apparaissent en vert, et celles dont la membrane est endommagée fluorescent dans le rouge. En ce qui concerne le protocole expérimental, des cellules de WT ou de mutants ont été mises au contact des lames de microscopes recouvertes de paraffine en les incubant à 30°C et sous faible agitation (50 rpm) pendant 40 min. Ces lames ont été lavées puis remises à incuber à 30°C et 50 rpm dans du milieu EMS frais. Au bout de 6 h et 26 h d'incubation, les cellules ont été colorées avec 2 μ M de Syto 9 et 3 μ M de PI pendant 15

minutes. Après rinçage, les cellules ont été observées au microscope à épifluorescence. Toutes les cellules AC1 et 75 % des cellules sauvages qui ont été incubées pendant 6 h sont rouges (non montré). Après 26 h d'incubation, toutes les cellules JM1 et AC1 fluorescent dans le vert (non montré). Ces observations suggèrent que la croissance sur la paraffine est toxique pour *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* dans les étapes précoces de développement. De plus, la mutation dans le gène *MARHY2686* semblerait augmenter la proportion de cellules non viables. Avant de faire des conclusions hâtives sur cette expérience préliminaire, il serait important d'éclaircir le fait que les cellules JM1 soient endommagées et quelles deviennent étonnamment viables au bout de 26 h de développement sur paraffine.

2.2.4. Exploration des fonctions de sécrétion de facteurs importants pour l'assimilation des n-alcane ou la formation de biofilm.

MARHY2686 pourrait participer à la sécrétion de facteurs importants pour l'accession aux *n*-alcane (biosurfactants) ou la formation de biofilm (auto-inducteurs du QS). Dans ce cas, le surnageant de biofilm de JM1 contiendrait des molécules importantes pour la croissance à l'état sessile. Nous avons donc testé si le surnageant d'un biofilm de JM1 restaurait le phénotype sauvage chez le mutant AC1. Pour ce faire, le surnageant de biofilm de JM1 sur paraffine, obtenu au bout de 17 h d'incubation, a été filtré sur un filtre de 0.2 μm , et utilisé pour cultiver des biofilms de JM1 ou AC1 sur paraffine. La croissance de ces biofilms a été mesurée par coloration au cristal violet. Le surnageant du biofilm de JM1 qui sert de milieu de culture pour cette expérience, pouvant être appauvri en FeSO_4 et K_2HPO_4 , des cultures contrôles ont été réalisées dans lesquelles ces composés ont été rajoutées (Figure III.16). Cette expérience montre que le surnageant de JM1 ne restaure pas le phénotype sauvage chez le mutant AC1. Il est donc peu probable que MARHY2686 soit impliqué dans la sécrétion de facteurs de croissance. De plus, le fer et/ou le phosphate sont limitants lors de la formation de biofilm sur paraffine.

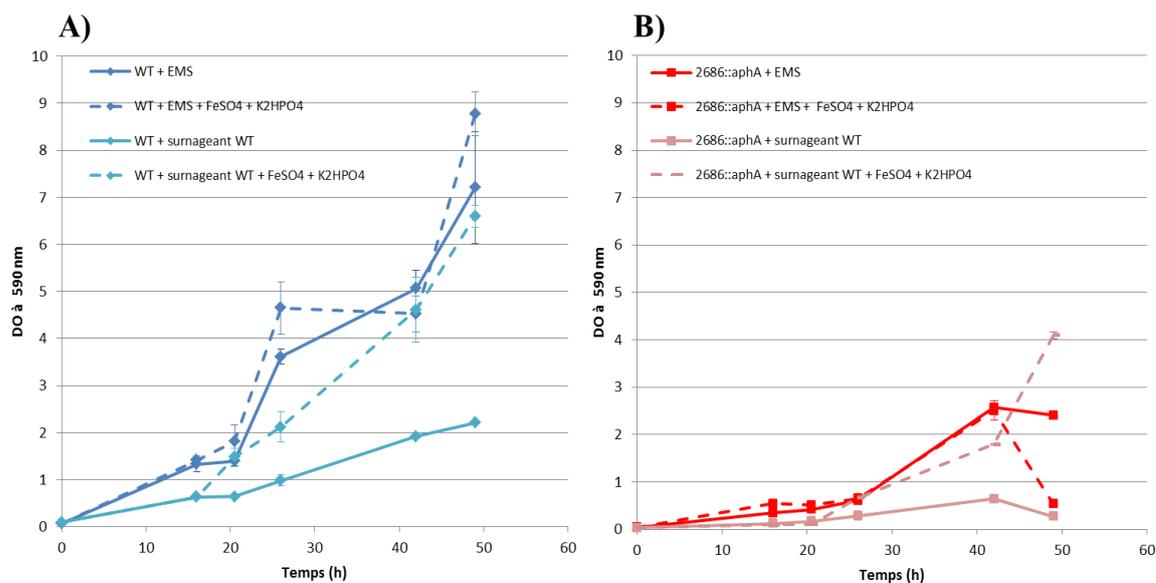


Figure III.16 : L'effet du surnageant de biofilm de JM1 sur la cinétique de croissance en biofilm sur paraffine des souches JM1 et AC1.

Le surnageant d'un biofilm de JM1 obtenu après 17 h d'incubation sur paraffine a été filtré et utilisé comme milieu de culture pour suivre le développement du biofilm sur paraffine des souches JM1 (A) et AC1 (B).

Dans certaines conditions, 427 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 et 8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de FeSO_4 ont été ajoutées.

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant la paraffine solide coulée en fond de puits.

WT : souche sauvage JM1 ; 2686::aphA : mutant « knock-out » AC1 ($\Delta\text{MARHY2686}::\text{aphA}$).

2.3. Arguments en faveur d'un rôle dans l'assimilation des HOC

Aucune des pistes explorées ci-dessus ne soutient l'implication de MARHY2686 dans un système de pompe d'efflux de type RND. D'autres possibilités pour la fonction de MARHY2686 ont donc été envisagées.

L'expérience de croissance sur milieu EMS agar en présence de *n*-hexadécane vapeur (Figure III.7 de la section 2.1) a mis en évidence une déficience de croissance de la souche AC1 comparée à JM1. A partir de ce résultat, il semblerait que l'implication de la protéine MARHY2686 est indépendante de la croissance en biofilm à l'interface eau-alcane, suggérant un rôle possible dans l'assimilation de l'hexadécane. De plus, l'analyse *in silico* de la séquence protéique de MARHY2685 dont le gène associé fait partie d'un opéron putatif avec *MARHY2686*, a mis en évidence la présence d'un domaine d'un composant de la famille des transporteurs de type TRAP qui interviennent dans le transport de différents types de composés dans la cellule bactérienne (Mulligan et al., 2011). Cette donnée suggère de l'implication possible des protéines MARHY2686 et MARHY2685 dans un système de transport des *n*-alcane lors de la formation de biofilm.

La différence de morphologie des cellules JM1 et AC1 présentée dans les figures III.10 et III.11 de la section 2.1 suggère l'implication du gène *MARHY2686* dans la synthèse de granules de cires. Deux cas de figure peuvent alors être proposés quant à la fonction du gène : soit il est directement impliqué dans la synthèse des cires intra-cytoplasmiques, soit il intervient dans le transport des *n*-alcanes et est de ce fait indirectement impliqué dans l'accumulation de réserves lipidiques. Dans l'hypothèse où le deuxième cas est vérifié, la redondance fonctionnelle des systèmes de transports, tel que la protéine AupA démontrée expérimentalement comme impliquée dans l'assimilation des HOC (Mounier, 2013), expliquerait pourquoi la différence d'accumulation de granules lipidiques observée n'est pas très prononcée. Il semblerait tout de même que ce nouveau système d'assimilation des HOC contribue fortement dans ce processus pour expliquer la raison pour laquelle seulement le tiers de la biomasse contenue dans le biofilm du WT s'accumule au sein du biofilm AC1.

Des expériences futures consistant à quantifier les inclusions cytoplasmiques par chromatographie, et à tester la capacité de transport du mutant *MARHY2686* par rapport à JM1 seront nécessaires, pour élucider le rôle de ce gène.

3. Complémentation fonctionnelle de la mutation

3.1. Complémentation du mutant AC1

Pour vérifier que les phénotypes observés sur paraffine et *n*-hexadécane sont directement dues à la mutation dans le gène *MARHY2686*, une étape de vérification par complémentation est indispensable. Cette dernière consiste à rajouter une copie sauvage du gène chez la souche mutée et vérifier que le phénotype sauvage est rétabli. Dans notre étude, le gène *MARHY2686* sauvage sous le contrôle du promoteur synthétique P_{A1/04/03} et porté par le mini-Tn7T a été introduit dans la souche mutante (souche AC12, pour la technique utilisée se référer à la section 2.7.3 du **Chapitre II**). La souche complémentée construite possède la même cinétique de croissance de biofilm sur paraffine que le mutant « knock-out » et non pas celle de la souche sauvage. L'absence de complémentation peut être due à une mutation à effet polaire si *MARHY2686* forme un opéron avec *MARHY2685* comme suggéré au paragraphe 1.2. Cet effet polaire peut avoir deux causes différentes : un défaut dans l'étape de transcription du gène en aval ou alors un défaut au niveau de la traduction (Snyder and Champness, 2003; Dale and Park, 2010). Dans la technique de mutation « knock-out » utilisée dans notre étude, nous avons volontairement introduit une cassette kanamycine ne contenant pas de terminateur de transcription afin d'éviter de créer des mutations à effet polaire du cistron suivant par une terminaison de transcription prématurée. L'effet polaire rencontré agirait vraisemblablement au niveau de l'étape de la traduction. Le mutant AC1 contient une cassette *aphA* transcrite dans le sens inverse à la transcription de *MARHY2686* ; le codon STOP de *aphA* ne se situe donc pas à proximité du codon d'initiation du gène *MARHY2685*. L'insertion de la cassette kanamycine a très certainement décalé le cadre de lecture et fait apparaître un codon stop entraînant l'arrêt prématuré de la traduction.

Nous avons voulu éliminer cet effet polaire en changeant le sens d'insertion du gène *aphA* et en construisant un mutant de délétion en phase de *MARHY2686*. Les deux techniques utilisées sont détaillées ci-après.

3.2. Constructions génétiques du mutant *MARHY2686* non polaire et complémentation

3.2.1. *Mutation de MARHY2686 par délétion et insertion d'une cassette kanamycine (aphA) transcrite dans le même sens que MARHY2686*

La même technique que celle utilisée pour construire le mutant « knock-out » AC1 a été adoptée. Un fragment de 580 pb contenant une partie de la séquence codante de *MARHY2686* et sa région flanquante en 5' et un fragment de 476 pb incluant une partie de sa séquence codante en 3' et sa région flanquante en 3' ont été clonés de part et d'autre de la cassette kanamycine. Grâce à la double recombinaison homologue, la délétion de 1035 pb dans le gène de *MARHY2686* a été remplacée par la cassette kanamycine de 1794 pb (Figure III.17) (pour plus d'informations se référer à la section 3.1.1 du **Chapitre II**). La souche obtenue est appelée AC1 (+) car contrairement à la souche AC1, la transcription du gène *aphA* s'effectue dans le même sens que le gène *MARHY2686*.

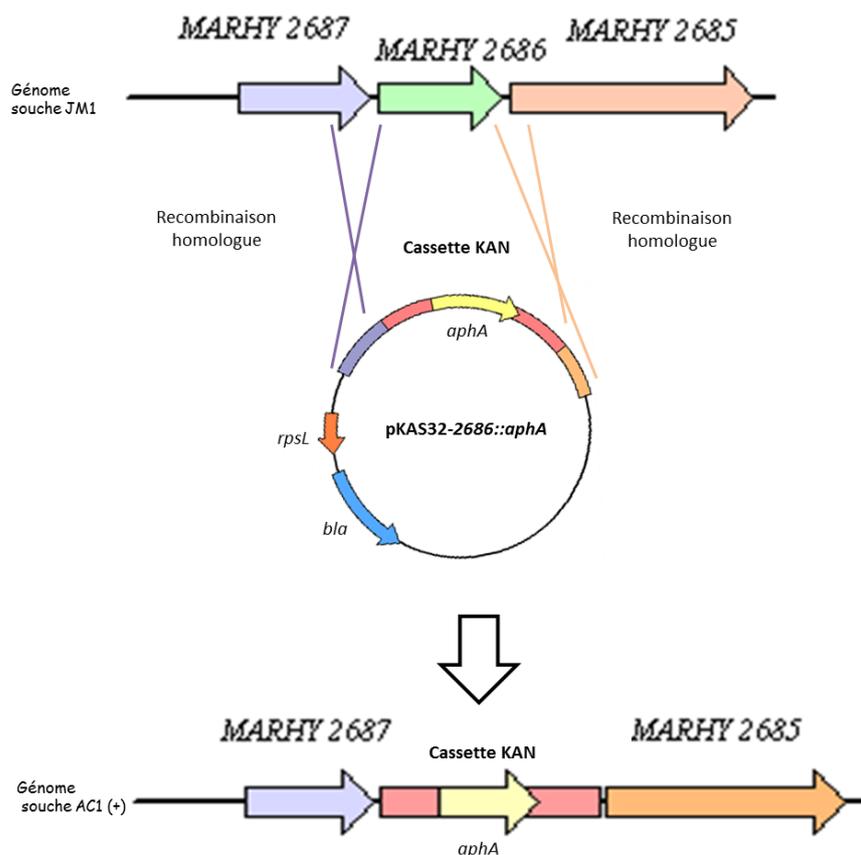


Figure III.17 : Schéma de la construction du mutant « knock-out » AC1 (+) par la technique de remplacement d'allèle.

bla : gène conférant la résistance à l'ampicilline ; *rpsL* : gène conférant la sensibilité à la streptomycine ; *aphA* : gène conférant la résistance à la kanamycine ; cassette KAN : cassette kanamycine.

La souche complémentée AC12 (+) a été construite en apportant le gène *MARHY2686* sauvage sous le contrôle du promoteur synthétique P_{A1/04/03} via le mini-Tn7T. Le phénotype de la souche « knock-out » AC1 (+) et de la souche « knock-out » complémentée du gène *MARHY2686* AC12 (+) ont été vérifiés en condition de croissance biofilm sur paraffine. Ces deux souches démontrent une déficience dans la formation de biofilm comparé à la souche sauvage JM1. Le sens de transcription du gène *aphA* n'empêche en rien l'apparition de l'effet polaire. Le problème de polarité rencontré dans ce cas peut être dû au fait que la synthèse des polypeptides du même ARNm polycistronique peuvent avoir leur traduction liée ; la traduction de la séquence codante en amont permet la traduction de celle d'après. En effet, dans certain cas, le codon d'initiation AUG du gène en aval est situé au niveau d'une épingle à cheveux et inaccessible pour la fixation du ribosome. C'est l'arrivée du ribosome au niveau du codon STOP du premier gène qui déstabilise cette structure secondaire et qui rend la traduction du gène en aval possible. Le repliement de l'ARNm provoqué par l'absence de fixation du ribosome peut également engendrer une terminaison prématurée de la transcription (Dale and Park, 2010).

La structure de l'ARNm polycistronique *MARHY2686-MARHY2685* a été calculée par l'intermédiaire du programme RNAfold accessible à partir de l'interface BiBiServ (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnafold/>) qui nous donne une information selon un langage de « parenthèses » et de « points », qui a été traduit par le logiciel VARNAv3-9.jar (Visualization Applet for RNA) (<http://varna.lri.fr/>) (Zuker and Stiegler, 1981; McCaskill, 1990; Hofacker et al., 1994; Darty et al., 2009). Nous avons pu identifier la présence d'une structure secondaire particulière entre les 2 cistrons de l'opéron, dans laquelle le codon d'initiation du gène en aval (*MARHY2685*) se situe au sein d'une structure en épingle à cheveux (Figure III.18A). L'accessibilité du codon d'initiation dépend potentiellement de la présence du ribosome sur l'ARNm, qui en arrivant au niveau du codon STOP de *MARHY2686* déstabiliserait les structures secondaires et rendrait l'initiation de la traduction de *MARHY2685* possible. Or, comme décrit sur la Figure III.18B, l'interruption de la séquence codante de *MARHY2686* par le gène de résistance à la kanamycine *aphA* rend l'accès à la séquence codante du deuxième cistron plus difficile car il y a un nouveau codon stop beaucoup plus éloigné de l'AUG de *MARHY2685*. L'insertion de cette cassette empêcherait le ribosome de défaire le repliement complexe de l'ARNm pour permettre la traduction de *MARHY2685*.

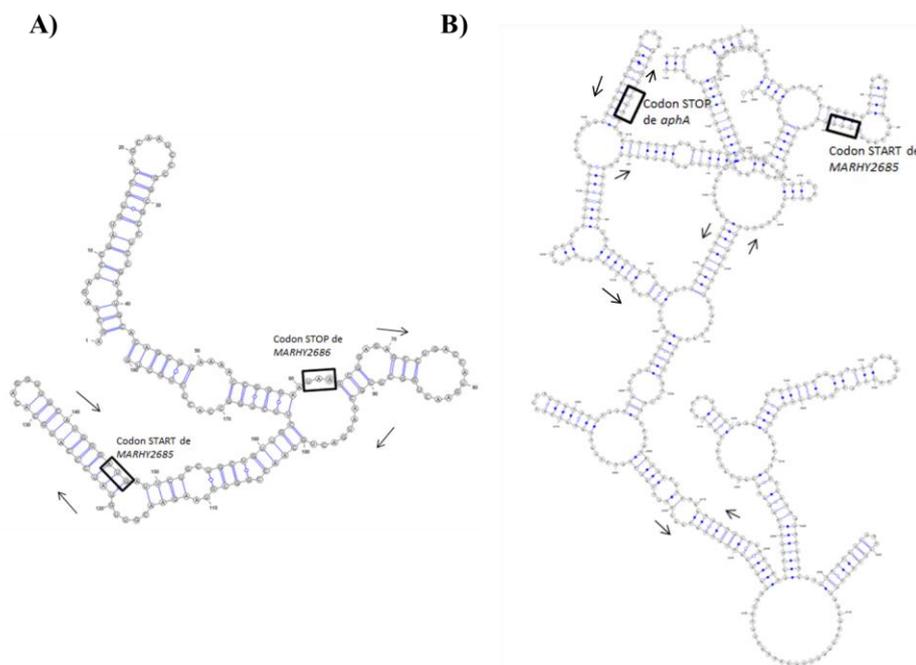


Figure III.18 : Structure secondaire de la région de l'ARNm chevauchant la région *MARHY2686* et *MARHY2685* (A) ainsi que la région *aphA* et *MARHY2685* (B). Les codons d'initiation et les codons STOP sont encadrés. Le sens de traduction est fléché.

Nous avons donc choisi de créer une délétion en phase dans *MARHY2686* qui ne perturberait pas l'expression du gène en aval.

3.2.2. Mutation de *MARHY2686* par délétion en phase d'une région de sa séquence codante

La délétion en phase consiste à enlever la totalité ou une partie du gène cible en prenant soin de ne pas décaler le cadre de lecture et ainsi conserver un codon stop correctement positionné vis-à-vis du gène aval.

Deux nouveaux plasmides ont été construits : le pKOMKm-*MARHY2686null* dans le but d'éliminer entièrement le gène *MARHY2686* et le pKOMKm- Δ *MARHY2686* qui permet de remplacer la séquence codante de *MARHY2686* par une séquence codante de 114 pb (contre 1011 pb pour le sauvage) (Figure III.19). Les différentes étapes des constructions sont détaillées dans la section 3.2.2. du **Chapitre II**. Les mutants de délétion qui résultent de la double recombinaison homologue entre le chromosome de JM1 et les plasmides pKOMKm-*MARHY2686null* et pKOMKm- Δ *MARHY2686* sont respectivement appelés AC2 et AC3.

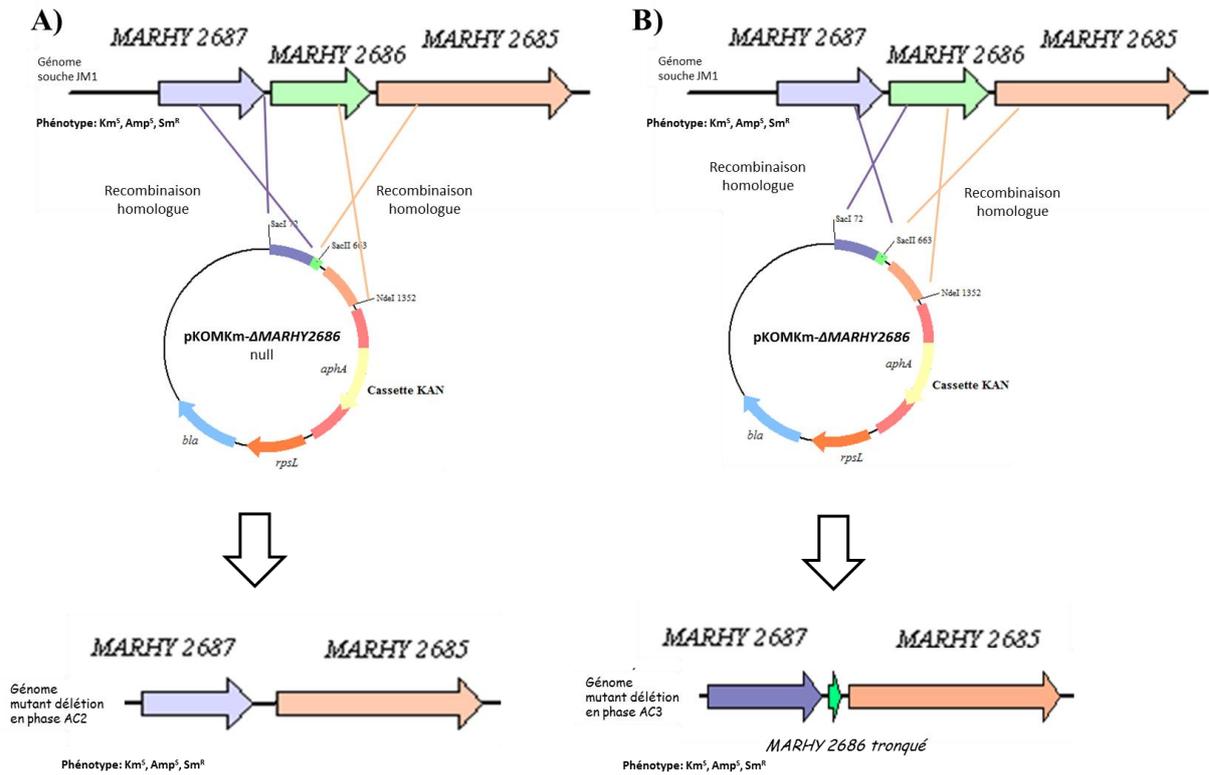


Figure III.19 : Les deux stratégies adoptées pour la construction des mutants « in frame » chez JM1.

bla : gène conférant la résistance à l'ampicilline ; *rpsL* : gène conférant la sensibilité à la streptomycine ; *aphA* : gène conférant la résistance à la kanamycine ; cassette KAN: cassette kanamycine.

Ces deux mutants de délétion possèdent la même déficience dans la formation de biofilm sur paraffine que le mutant AC1 (Figure III.20A).

La souche AC15 issue de la complémentation du gène *MARHY2686* chez le mutant AC3 a également pu être obtenue. Pour une raison inconnue, la complémentation du mutant AC2 n'a pas marché. Le suivi de formation de biofilm sur paraffine par dosage au cristal violet a pu démontrer que la complémentation rétablit le phénotype sauvage JM1 (Figure III.20B). Cela vérifie bien que la déficience de formation de biofilm est directement due à la mutation dans le gène *MARHY2686*.

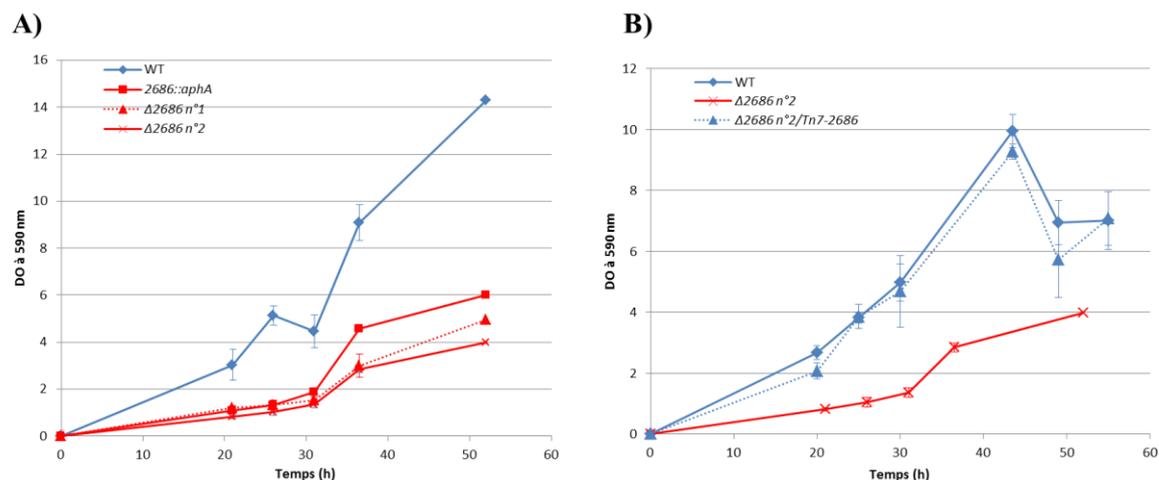


Figure III.20 : Cinétiques de croissance sur paraffine des mutants de délétion en phase AC2 et AC3 (A) et du mutant complétement AC15.

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant la paraffine solide coulée en fond de puits.

WT : souche sauvage JM1 ; $2686::aphA$: mutant « knock-out » AC1 ($\Delta MARHY2686::aphA$) ; $\Delta 2686$ n°1 : mutant de délétion en phase AC2 obtenu à l'aide du plasmide pKOMKm- $\Delta MARHY2686$ null ; $\Delta 2686$ n°2 : mutant de délétion en phase AC3 obtenu à l'aide du plasmide pKOMKm- $\Delta MARHY2686$; $\Delta 2686$ n°2 : mutant de délétion en phase obtenu à l'aide du plasmide pKOMKm- $\Delta MARHY2686$ et complétement par l'ajout du gène sauvage $\Delta MARHY2686$ (le mutant AC15 de génotype $\Delta MARHY2686;attTn7::[\text{mini-Tn7T-Gm-PA1/04/03-MARHY2686}]$).

CHAPITRE IV

**Étude du rôle du flagelle et
des pili dans l'adhésion et la
formation de biofilm aux
interfaces eau-HOC**

1. Introduction

Les données de transcriptomique ont révélé une possible implication des gènes de flagelle et de pili dans la formation de biofilm sur les HOC. Au total, 50 gènes de pilus ou du flagelle possèdent un même profil d'expression dans les étapes précoces (15 min et 3 h) et mature (24 h) du biofilm. La quasi-totalité de ces gènes sont surexprimés précocément au contact avec les HOC, quel que soit le substrat (métabolisables ou non), et 25 d'entre eux sont réprimés dans le biofilm mature, que ce soit sur hexadécane ou trioléine. Les données protéomiques confirment cette tendance pour la protéine PilA. En effet, lors de l'analyse de l'abondance de 58 protéines présentées par Vaysse et al. (2009), la répression du gène *pilA* a pu être observée en condition de biofilm par rapport à la condition planctonique. Ces résultats sont cohérents avec les données bibliographiques sur le rôle du flagelle et des pili dans la détection des surfaces et la formation de biofilm. L'étude phénotypique de mutants de *E. coli*, *P. aeruginosa* (PAO1) ou *V. cholerae* a ainsi montré que le flagelle et les pili permettent la colonisation des surfaces et l'agrégation des cellules au début du développement du biofilm (O'Toole and Kolter, 1998; Hall-Stoodley and Stoodley, 2002; Yamamoto et al., 2012). La nature de l'implication des appendices de type pili et flagelle dans la détection, l'adhésion et/ou dans la mobilité des cellules de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 aux interfaces eau-HOC a de ce fait été explorée par des expériences menées sur les mutants de 5 gènes de pili de type IV (*pilA*, *pilQ*, *pilH*, *pilV*, *mshJ*) et sur un mutant du gène *fleR* codant pour un régulateur de la synthèse du flagelle. Par ailleurs, la caractérisation fonctionnelle du gène codant pour le facteur de transcription RpoN (ou sigma 54) a également été entreprise car il est soupçonné d'être impliqué dans la régulation de l'expression génique propre à l'adhésion dont l'expression de certains gènes de mobilité (Dasgupta et al., 2003; da Silva Neto et al., 2008; Hao et al., 2012; Whitaker et al., 2014).

2. Étude sur le rôle du flagelle dans la formation de biofilm sur HOC

Les études transcriptomiques nous ont permis de mettre en lumière le rôle potentiel du flagelle dans l'étape précoce du développement du biofilm. 70 % des gènes intervenant dans la synthèse du flagelle sont différentiellement exprimés : ils sont surexprimés lors des étapes précoces de formation de biofilm sur les HOC et/ou réprimés en condition de biofilm mature. Ceux codant pour le système à deux composantes FleR/FleS qui contrôlent la transcription des gènes du flagelle de classe III (gènes du corps basal et du crochet) (Dasgupta et al., 2003) sont surexprimés après 15 min et 3 heures de contact à la trioléine et au *n*-hexadécane. Ces données suggèrent que cet appendice intervient précocement dans la formation du biofilm, éventuellement dans d'adhésion à l'interface hydrophobe, ou encore dans un mécanisme de mobilité sur celle-ci à l'origine de la formation de microcolonies et/ou d'une structure tridimensionnelle propre à *M. hydrocarbonoclasticus*.

Les résultats obtenus par l'équipe de Matthias Ulrich à l'Université Jacobs de Brême (Allemagne) sur la souche *Marinobacter adhaerens* HP15, ont également motivé notre étude sur le rôle des flagelles dans la formation de biofilm sur les HOC. *M. adhaerens* HP15 a été isolée à partir de particules en suspension dans les eaux de surface de la mer des Wadden en Allemagne par Grossart et ses collègues (Grossart et al., 2004). Des analyses d'attachement in vitro ont par la suite mis en évidence une association étroite entre la diatomée *Thalassiosira weissflogii* et la bactérie (Gärdes et al., 2010). Des études menées par Seebah et ses collègues (non publié) ont montré que le mutant du gène de la flagelline *fliC* ne forme plus de biofilm sur des surfaces de polypropylène et s'associent moins aux cellules de *T. weissflogii* que la souche sauvage.

Nous avons eu l'opportunité de tester ces souches de *M. adhaerens* dans les conditions de culture en biofilm sur HOC développées au laboratoire. Nos observations sur la formation de biofilm sur *n*-hexadécane et paraffine ont tout d'abord révélé que *M. adhaerens* HP15 est capable d'utiliser les alcanes en formant un biofilm d'une manière similaire à *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (Figure IV.1). D'autre part, des observations visuelles ont révélé que le mutant *fliC* de *M. adhaerens* HP15 est affecté dans sa capacité à former un biofilm sur *n*-hexadécane. Le développement du biofilm de ce mutant sur paraffine a également été suivi par coloration au cristal violet (Figure IV.1). En comparant les cinétiques de formation de biofilm sur la paraffine solide obtenues chez le mutant HP15- Δ *fliC* et la souche sauvage HP15, il a pu être observé que le biofilm du mutant n'est détectable qu'à partir de 22 h

d'incubation environ et qu'il accumule le tiers de la biomasse contenue dans le biofilm formé par la souche sauvage. Ces résultats indiquent que le flagelle intervient dans la formation de biofilm par *M. adhaerens* HP15 sur deux types de HOC, le *n*-hexadécane et la paraffine.

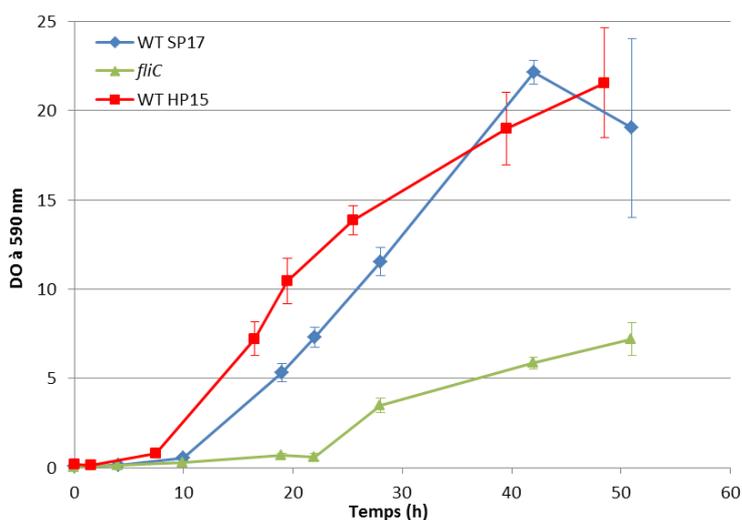


Figure IV.1. : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine de JM1 et des souches dérivées de *M. adhaerens* HP15.

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant de la paraffine solide coulé en fond de puits.

WT SP17 : souche sauvage *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 ; WT HP15 : souche sauvage *M. adhaerens* HP15 ; *fliC* : HP15- Δ *fliC*.

Les arguments apportés par les données de transcriptomique ainsi que les expériences réalisées sur *M. adhaerens* HP15 nous ont poussés à étudier le rôle du flagelle dans la formation de biofilm sur HOC. Le mutant *fleR* (Δ *fleR*::*aphA*, AC4) du gène codant pour le régulateur de réponse FleR a alors été construit. Ce mutant contient la cassette kanamycine avec le gène *aphA* orienté dans le même sens de transcription du gène *fleR* (*MARHY1304*). Le phénotype associé à cette mutation a par la suite été analysé. Le mutant *fleR* possède une même vitesse de croissance que la souche JM1 en culture liquide et solide sur les milieux supplémentés en substrats solubles tels que l'acétate ou de DL-lactate, ainsi que des colonies de morphologies identiques (non montré). Contre toute attente, aucune déficience de croissance en biofilm sur HOC n'a été mise en évidence chez le mutant *fleR* (Figure IV.2). Des analyses phénotypiques focalisées sur les étapes précoces du développement sur HOC ainsi qu'une observation microscopique de la structure du biofilm formé par le mutant *fleR* seraient intéressantes à entreprendre afin de vérifier si le flagelle a un rôle biologique important dans ce processus.

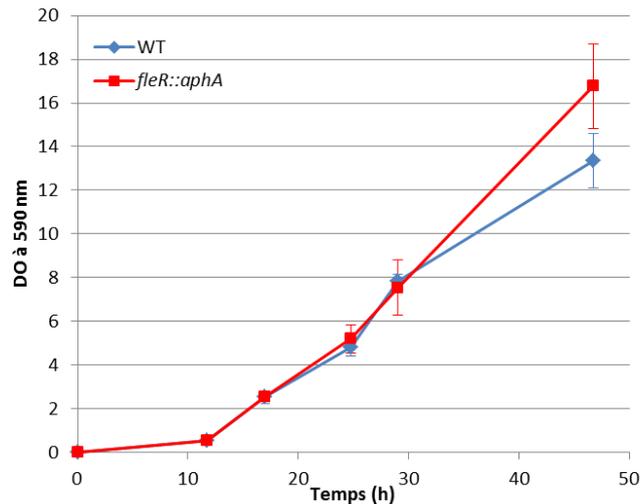


Figure IV.2. : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine des souches de JM1 et du mutant *fleR*.

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant de la paraffine solide coulé en fond de puits.

WT : souche sauvage *M. hydrocarbonoclasticus* JM1 ; *fleR::aphA* : mutant AC4 Δ *fleR::aphA*.

Lors de l'analyse du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, nous avons remarqué qu'il existait une aberration dans le gène *fliH* codant pour l'une des composantes du complexe ATPase du flagelle. En effet, il existe deux CDS adjacentes annotées *fliH*, que l'on nommera *fliH1* et *fliH2*, de longueurs inférieures au gène *fliH* complet retrouvé chez un autre isolat (souche VT8) de l'espèce *M. hydrocarbonoclasticus*. Les gènes *fliH1* et *fliH2* ont respectivement une longueur de 318 pb et 540 pb contre 891 pb pour le gène complet *fliH*. Les alignements de séquences nucléotidiques ont mis en évidence la présence d'une délétion de 34 pb chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, par rapport à la séquence nucléotidique *fliH* de *M. hydrocarbonoclasticus* VT8, à l'origine d'un décalage du cadre de lecture entraînant un codon STOP au niveau de l'ORF (Figure IV.3). La présence de la délétion du gène *fliH* de la souche JM1 mais aussi de souches de collection de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 provenant de l'Institut Méditerranéen d'Océanologie (MOI) de Marseille et de l'institut de Leibniz DSMZ a été vérifiée par PCR.

>Gènes *MARHY1308* et *MARHY1309 (fliH)* de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17
ATGAAAG**ATTCCGATCAGGACAGCAAG**CGCATACCGAAAGAACAGATGACCGCC
 TGGAAACGGTGGGAATTGCCTCTGCTTGATGAGCGCGAAACCAGTTGTTCGAG
 GAAGAGGAAAGTCAAGCCGCTGACCGCGAGGACGGTTTTTCAGGAGGGCCGGCAGG
 CTGTTACGCG**GAAGGCTTTGAGCAGGGT**C GCGCAGACGGGCACAAAGATGGCT
 ACGCCGCAAGGCGAGGCGGAGGGTCCGAGCGAGGGTGAGCAGCAGGCAGCGGAG
 CAGACGCGTACGGAAGTTGCCTCCCGATGGAACGGCTGGAGCAT**TGAT**TGGGT
 GAGCTGTTGTTGCCCATCGAACGCCATGAAGATGAGCTGGAAGCGGTGCTGGTCA
 ACCTCACTACCGTATTGCCCCGGCGGTGCTTCCGTGAGCTCAGCATTGATTCC
 TCCCAGATTCCGCAAGTGGTGGTCCGGCTCTGTCTGCTCACTGCCCTCTACCGCCG
 ACAATCTACGCATTATATTACCCCGACGATATCGAGCCGATACGGGAAGTCA
 AGAGCGCCTGGAATCACCGCGGTCTCATTGAGGACGACACTCTCATGCCTGGT
 GGCTGTAAAGTGAATCGCGCCATAGTCTGGTGGATTACCCGTGGAGAAGCGCT
 TCCAGCGGTGGTTCAGGGTATGCTGGAAGAACAGCTGGCGGAGCCCTGCCGGTC
 CCGTACAGGAGGCTGGCACCCAGTATGGGGAGCTGACCGATTTTACCGGG
 ATGTGCTGAGTGATTCCGGCATGACATCAACCACAGAATCCGAGTCTGACGAATT
 CAACGACCAGAGCCAGGACGATGACATCACGCCTGGC**TGA**

>*M.aqu* 1995 (*fliH*) de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8
ATGAAAG**ATTCCGATCAGGACAGCAAG**CGCATACCGAAAGAACAGATGACCGCC
 TGGAAACGGTGGGAATTGCCTCTGCTTGATGAGCGCGAAACCAGTTGTTCGAG
 GAAGAGGAAGTCAAGCCGCTGACCGCG**GCCGACCTGGAAGAGATTCCCGAGGCT**
GCCGCGAGGACGGTTTTTCAGGAGGGCCGGCAGGCTGGTTACGCG**GAAGGCTTT**
GAGCAGGGTC GCGCAGACGGGCACAAAGATGGCTACGCCGAGGCGAGGGCGGA
 GGGTCCGAGCGAGGGTGGAGCAGGACGCGGAGCAGACGCGTCAAGAAAGTTG
 CCTCCCGATGGAACGGCTGGAGCATCTGATGGGTGAGCTGTTGTTGCCCATCGA
 ACGCCATGAAGACGAGCTGGAAGCGGTGCTGGTCAACCTCACTACCGTATTGGCC
 CGGGCGGTGGTCTTCCGTGAGCTCAGCATTGATTCCCTCCAGATTCCGCAAGTGG
 TGCGTCCGGCTCTGTCTGCTCACTGCCCTTACCGCCGACAATCTACGCATTATATT
 CACCCGACGATATCGAGCCGGTACGGGAAGTCAAGAGCGCCTGGAATCACCG
 GCGTTTCTATTGAGGATGACTCTCTCATGCCTGGTGGCTGTAAAGTGAAGTCGC
 GCCATAGTCTGGTGGATTACCGTGGAGAAGCGCTTCCAGCGGTGGTTCCAGG
 TATGCTGGAAGAACAGCTGGCGGAGCCTGCCGTCCGGATCAGGAGGAGCTGGC
 ACCCAGTATGGGGAGCTGACCGATTTTACCGGGATGTGCTGAGTGATTCCGGC
 ATGACATCACCGCCAGAATCCGAGTCTGACGAATTCAACGACCAGGGCCAGGAC
 GATGACATCACGCCTGGC**TGA**

Figure IV.3 : Les séquences codantes des gènes *fliH* de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (en haut) et de *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 (en bas).

En jaune : codon d'initiation et codon STOP ; En jaune souligné : codon STOP apparu avec le décalage du cadre de lecture causé par une délétion de 34 pb ; en rouge : la séquence nucléotidique de 34 pb qui manque chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 ; en vert : les amorces qui ont servi à démontrer par PCR la présence d'une délétion chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17.

Gauthier et ses collègues (1992) ont décrit *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 comme étant flagellée et mobile. Les observations menées au microscope électronique à transmission par l'équipe B2HM, TGUMR 1319 Micalis INRA/AgroParisTech, partenaire du projet ANR Blanc AdHOC, ont confirmé la présence d'un flagelle polaire (Figure IV.4). Or, jusqu'à aujourd'hui, aucune mobilité bactérienne n'a pu être observée en culture liquide dans notre laboratoire. Plus récemment, nous avons vérifié que la souche *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 fournie par la collection DSMZ ne présente aucune mobilité planctonique. Des tests de mobilité sur une surface semi-solide ont été entrepris en ajoutant 5 µL de cultures denses de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8, *Marinobacter adhaerens* HP15, *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 fournie par DSMZ et de la souche JM1 sur des milieux EMS à 0.2 % et 0.4 % d'agar tous deux supplémentés de DL-lactate à 20 mM (Figure IV.5). Les deux souches *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 testées (photos 3 et 4) ne présentent pas de mobilité

sur aucun des deux milieux alors que les *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 et *M. adhaerens* HP15 sont mobiles sur l'une des deux conditions (photos 1 et 2).

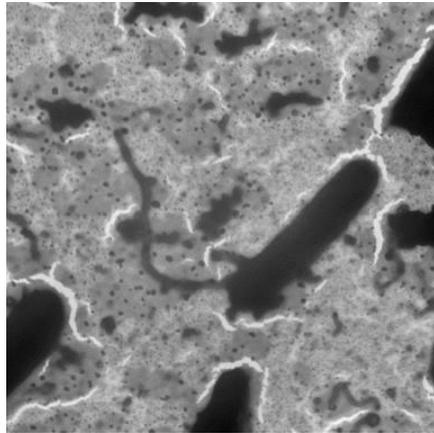


Figure IV.4 : Photographie d'une cellule de JM1 obtenue par microscopie électronique à transmission en coloration négative.

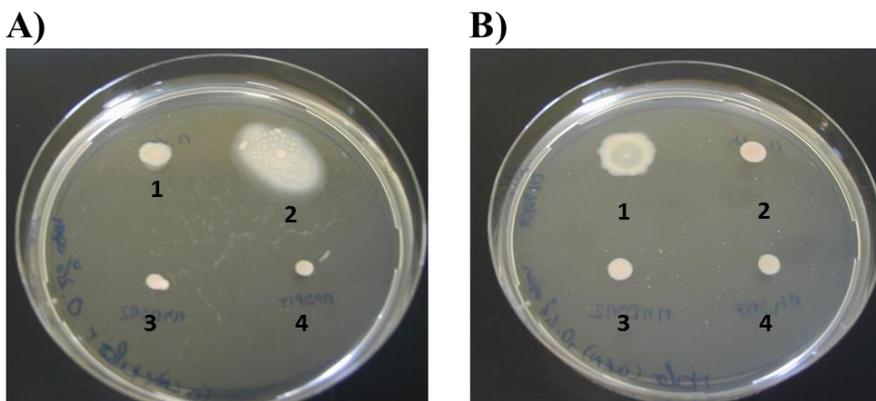


Figure IV.5 : Mobilité bactérienne sur du milieu EMS semi-solide à 0.2 % (A) et à 0.4 % agar (B).

1 : *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 ; 2 : *M. adhaerens* HP15 ; 3 : *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 fournie par la collection DSMZ ; 4 : JM1

Une analyse plus poussée du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 a permis de relever plusieurs autres mutations dans les gènes codant pour des composants flagellaires. Il a été observé sur de nombreuses espèces bactériennes que la culture en laboratoire entraînait une « domestication » des souches, provenant de l'apparition de mutations spontanées. Il s'est avéré que ces mutations altèrent certaines caractéristiques physiologiques non requises pour la croissance dans les conditions de laboratoire. Ainsi, des isolats frais de *Bacillus subtilis* non domestiqués sont capables de faire du « swarming » sur des surfaces et former des biofilms complexes, alors que les souches de cette même espèce cultivées en laboratoire ne démontrent aucune mobilité flagelle-dépendante sur une surface et ne sont capables que de former une

fine pellicule cellulaire. La domestication de *B. subtilis* a été démontrée comme étant due à une accumulation de 4 mutations et la perte d'un gène porté par un plasmide (Patrick and Kearns, 2009; McLoon et al., 2011). Une culture prolongée en laboratoire a également entraîné l'accumulation de trois mutations ponctuelles sur le gène de la flagelline *fliC* chez une souche d'*E. coli*. Ces mutations modifient légèrement la structure du flagelle comparé à la souche ancestrale sans entraîner de déficience de mobilité (Wang et al., 2012).

La culture en laboratoire de *M. hydrocarbonoclasticus* a probablement conduit à sa domestication se traduisant par des mutations spontanées dans les gènes de mobilité flagellaire. Au laboratoire, les bactéries sont nourries avec des milieux nutritifs contenant en excès tous les nutriments nécessaires à leur croissance rapide. Cependant, dans leur habitat naturel, les composés nutritifs sont plus rares et moins accessibles. La mobilité flagellaire est un processus qui donne la possibilité aux microorganismes d'explorer les écosystèmes dans lesquelles elles vivent à la recherche de nutriments. Dans le modèle selon lequel les bactéries cultivées en laboratoire n'ont pas de mal à accéder aux nutriments, la mobilité flagellaire ne serait plus aussi indispensable que dans leur habitat naturel. Des mutations spontanées sur les gènes de mobilité ont alors pu apparaître à l'origine d'une perte de la mobilité de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17.

Malgré les mutations des gènes de flagelles identifiées, la souche sauvage JM1 ainsi que le mutant *fleR* forment autant de biofilm que *M. adhaerens*. Du fait de la présence d'une trop grande quantité de mutations dans les gènes de flagelles, il nous a paru difficile d'élucider la raison pour laquelle ces gènes sont surexprimés au contact des HOC. C'est pourquoi, les recherches sur le rôle de cet appendice ont été abandonnées.

3. Étude sur le rôle des pili de type IV dans la formation de biofilm sur HOC

3.1. Expression des gènes de pili de type IV en condition d'adhésion et de biofilm sur HOC

Le génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 possède plusieurs clusters de gènes de pilus de type IV répartis dans différents loci dont les protéines associées possèdent des similarités de séquences avec les protéines de pili de type IV de *P. aeruginosa*. La Figure IV.6 rend compte de la forte similarité qui existe entre les protéines intervenant dans la synthèse des pili de type IV chez *P.aeruginosa* et *M. hydrocarbonoclasticus* SP17.

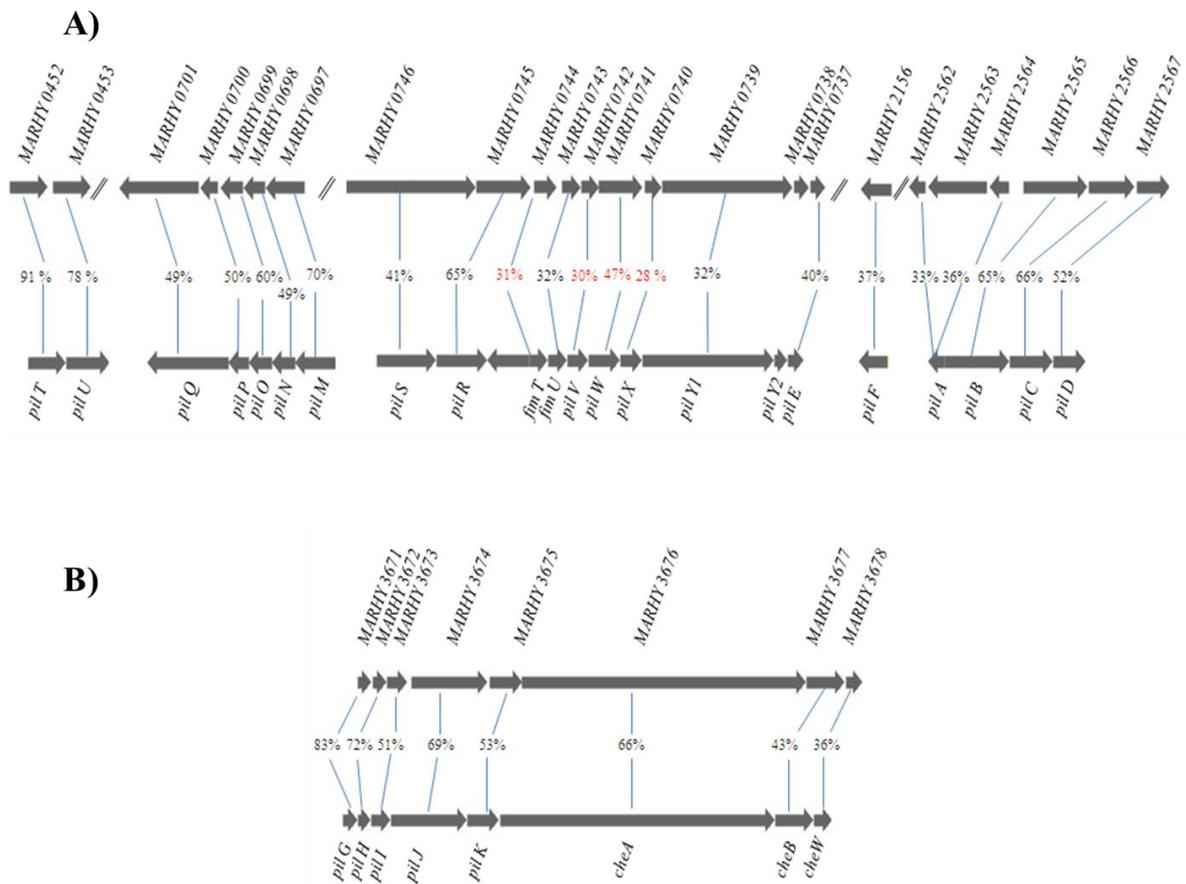


Figure IV.6 : Organisation des gènes codant pour la biogénèse (A) et la mobilité des pili de type IV (B) chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 (en haut) et *P. aeruginosa* (en bas). Les valeurs entre les gènes homologues représentent les pourcentages d'identité des séquences peptidiques des protéines associées. Celles représentées en rouge ont un taux de recouvrement compris entre 40 et 73% contrairement à ceux en noir entre 91 et 100 %.

Les données d'expression des gènes indiquent que de nombreux gènes de pili de type IV sont surexprimés dans les étapes précoces du biofilm (Figure IV.7A) alors qu'ils sont réprimés en condition de biofilm mature (Figure IV.7B ; Mounier et al., soumis voir Annexe 1). Cette réponse concerne majoritairement plusieurs gènes d'un même cluster et non pas les gènes isolés uniquement, ce qui suggère une co-régulation de l'ensemble des gènes de pili de

type IV pour intervenir spécifiquement dans les étapes précoces. Les clusters *pilMNOPQ* et *pilVWXYZ1* sont tout particulièrement concernés par cette tendance.

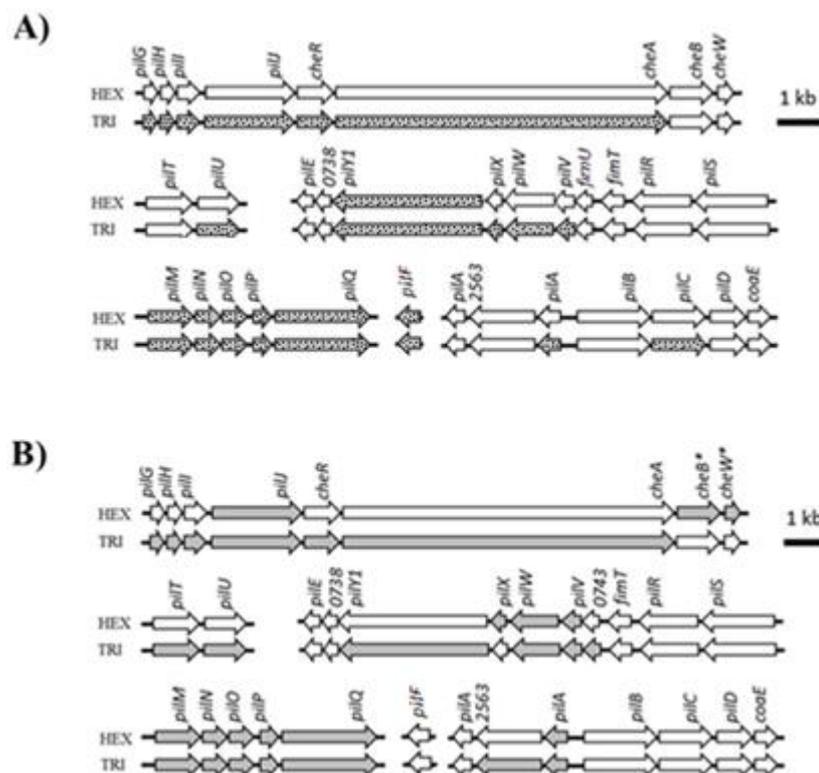


Figure IV.7 : L'expression différentielle des gènes de pili de type IV en condition d'adhésion (A) et de biofilm (B) sur hexadécane (HEX) et trioléine (TRI).

Les gènes surexprimés sont représentés en gris avec des pointillés ; les gènes réprimés sont représentés en blanc.

L'étude protéomique a permis de découvrir que l'abondance de la piline majeure des pili de type IV codée par le gène *pilA*, est plus faible en condition sessile que dans la condition planctonique confirmant cette tendance que les gènes de pili de type IV sont réprimés en condition de biofilm. A l'inverse, lors de l'analyse de l'abondance protéique sur des cellules détachées du biofilm formé sur le *n*-hexadécane en comparaison avec la condition planctonique sur acétate, il a été remarqué que cette protéine est surproduite. Cependant, pour rendre compte du profil d'expression particulier des gènes de pili de type IV, il est difficile de proposer un rôle précis de ce type d'appendice dans la croissance sur les HOC compte tenu de son implication dans d'innombrables processus biologiques : l'adhésion à une surface, l'agrégation cellulaire, la formation de biofilm (Giltner et al., 2012)... Les données transcriptomiques montrent qu'ils pourraient également intervenir dans la formation de biofilm sur les interfaces hydrophobes.

La recherche de gènes impliqués dans la formation de biofilm sur HOC par mutagenèse aléatoire, à l'inverse de la stratégie de mutagenèse dirigée sur des gènes candidats, a permis d'obtenir un mutant du gène de la sécrétine *pilQ* qui intervient dans la biogénèse des pili de type IV en sécrétant la sous-unité de la piline (pour plus d'informations sur la biogénèse des pili de type IV se référer à la section 2.1.2. du **Chapitre I**). Cette analyse a été menée par Habiba Ennouri une étudiante en thèse dans notre laboratoire. Brièvement, une population de cellules JM1 a été mutée par insertion aléatoire du transposon miniTn5 portant le gène de résistance à la kanamycine. Les clones résistants à cet antibiotique ont ensuite été sélectionnés pour leur impossibilité à former un biofilm sur paraffine et/ou trioléine. L'analyse d'environ 4 000 clones a permis d'isoler 24 souches qui possèdent des phénotypes intéressants. Le séquençage des régions voisines du site d'insertion du transposon a permis de révéler que l'un des clones déficient dans la capacité à former un biofilm sur paraffine était muté dans le gène *pilQ* (*MARHY0701*). Cette découverte nous a permis de vérifier que les pili de type IV interviennent dans la formation de biofilm sur les HOC et nous a également conforté dans notre choix d'élucider le rôle joué par ces appendices lors de la croissance de JM1 sur les interfaces hydrophobes.

L'étude fonctionnelle des pili de type IV a alors été entamée à travers des expériences menées sur le mutant d'insertion *pilQ* ::*miniTn5* (aussi nommé HE1 ou *pilQ*) et un mutant du gène de la piline (nommé AC5), *pilA*, construit par la stratégie d'échange allélique. Pour compléter les résultats obtenus et mieux comprendre le rôle des pili de type IV, des mutants supplémentaires des gènes intervenant dans la structure (*pilV*) ainsi que dans la mobilité (*pilH*), ont été construits plus tardivement.

3.2. Les pili de type IV et la formation de biofilm sur les HOC

La première étape de la caractérisation phénotypique a été de vérifier que la mutation des gènes *pilQ* et *pilA* n'entraîne aucun défaut de croissance sur des substrats solubles (Figure IV.8)

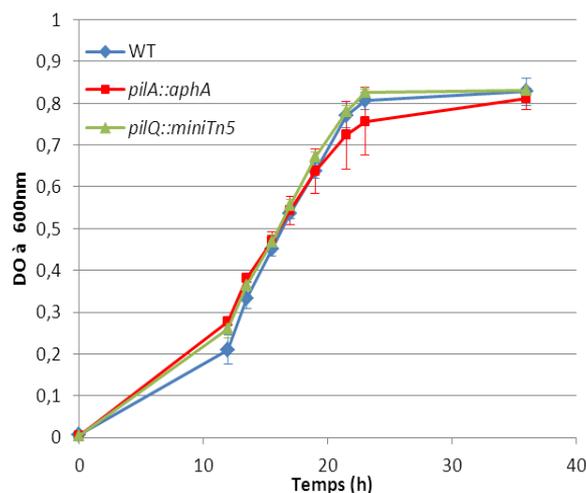


Figure IV.8 : Cinétique de croissance planctonique sur acétate à 20 mM de la souche sauvage et des mutants des gènes de pili.

WT : souche sauvage JM1 ; *pilQ::miniTn5* : mutant d'insertion HE1 ; *pilA::aphA* : mutant AC5 ($\Delta pilA::aphA$).

La croissance des deux mutants *pilQ* et *pilA* sur différents types de HOC appartenant aux classes des *n*-alcanes (paraffine), des acides gras (acide palmitique), des alcools gras (hexadécane-1-ol) et des triglycérides (tripalmitine) a été comparée à celle de JM1 (Figure IV.9A, B, C et D). Contre toute attente, les mutants des gènes de pili forment plus de biofilm que la souche sauvage. Le taux de formation de biofilm diffère selon le substrat considéré : sur la tripalmitine et l'acide palmitique, les trois souches testées forment plus de biofilm mais c'est sur l'hexadécanol où la différence phénotypique entre les mutants et la souche sauvage est la plus accentuée. En ce qui concerne la croissance sur paraffine, la différence de croissance des mutants *pilQ* et *pilA* est moins prononcée et apparaît plus tardivement que sur les composés lipidiques. Comme observé précédemment par Klein et al (2008), *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 montre une spécificité de substratum pour la formation de biofilm. En effet, cette bactérie forme préférentiellement des biofilms sur des HOCs métabolisables. La formation de biofilm en présence d'une source de carbone soluble sur support inerte tel que le polystyrène est souvent difficile à détecter. Cependant malgré les faibles niveaux de biofilm observés sur polystyrène, il semblerait que les mutants de pili produisent plus de biofilm que la souche sauvage (Figure IV.9E).

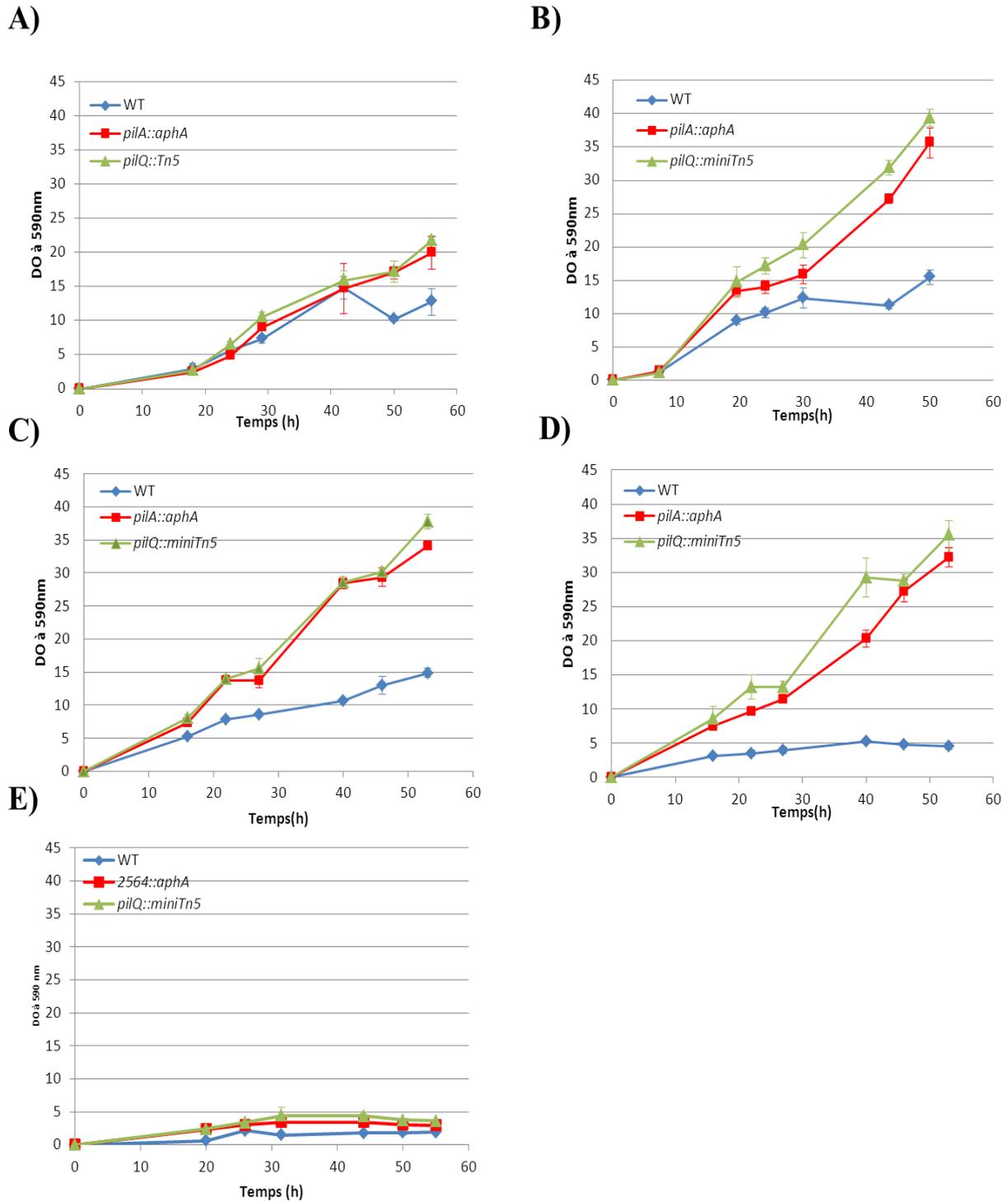


Figure IV.9 : Cinétiques de croissance en biofilm sur différents HOC des mutants des gènes de pili et de la souche sauvage *M. hydrocarbonoclasticus* JM1.

A) Paraffine. B) Tripalmitine. C) Acide palmitique. D) Hexadécane-1-ol. E) Plastique + acétate 20 mM. La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant le HOC solide coulé en fond de puits.

WT : souche sauvage JM1 ; *pilQ::miniTn5* : mutant d'insertion HE1 (*MARHY0701::miniTn5*) ; *pilA::aphA* : mutant « knock-out » AC5 (Δ *MARHY2564::aphA*).

Bien que les résultats transcriptomiques suggéraient une implication des pili dans les premières étapes de la formation de biofilm, aucune déficience de croissance à l'état sessile n'a été observée. A l'inverse, une formation de biofilm plus importante a été observée chez les mutants. Ces cinétiques de croissance sont contradictoires avec le phénotype originel qui avait permis de sélectionner le mutant d'insertion *pilQ* par la technique de mutagenèse aléatoire. A l'origine, il avait été mis en évidence pour sa déficience dans la formation de biofilm sur paraffine. Des expériences de croissance en biofilm sur paraffine en appliquant les mêmes conditions de culture que celles qui ont permis de sélectionner les mutants d'insertion aléatoire ont permis de vérifier qu'il n'y avait pas de différence phénotypique entre le mutant *pilQ* et la souche sauvage (non montré). Le changement de phénotype du mutant du gène *pilQ* reste à ce jour inexplicé. Cependant, le fait que les mutants de deux gènes indispensables pour la biogénèse du pilus obtenus par deux techniques de mutagenèse différentes, *pilQ* et *pilA*, aient des phénotypes identiques pour toutes les conditions testées, consolide les résultats intrigants obtenus pour le mutant *pilQ*.

Dans la littérature, les pili de type IV ont souvent été décrits comme étant impliqués dans des rôles biologiques très diversifiés : mouvement cellulaire de type twitching, adhésion à une surface biotique et abiotique, agrégation cellulaire, formation de microcolonies, formation de biofilm (Craig and Li, 2008; Burrows, 2012; Giltner et al., 2012). Aucune de ces activités cellulaires ne peut expliquer un phénotype de formation de biofilm accrue chez les mutant *pilA* et *pilQ* de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Les phages filamenteux utilisent généralement les pili de type IV comme récepteurs (Campos et al., 2003). Par ailleurs, les résultats de transcriptomique indiquent que deux gènes, *MARHY0506* et *MARHY0510*, appartenant à un prophage putatif de type pf4 prédit par le logiciel PHAST (<http://phast.wishartlab.com/>) (Zhou et al., 2011), sont spécifiquement surexprimés lors de la croissance à l'état sessile sur trioléine par rapport à la condition de référence sur acétate. Ce résultat suggère que ce prophage serait induit lors de la croissance sur trioléine. L'induction de prophages lors de la formation de biofilm a déjà été observée chez d'autres espèces bactériennes. Par exemple chez *Shewanella oneidensis* MR-1 et *Streptococcus pneumoniae*, la lyse cellulaire sous l'action d'un bactériophage permet de libérer de l'ADN extracellulaire favorisant la formation de biofilm (Carrolo et al., 2010; Gödeke et al., 2011). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, Whiteley et ses collègues (2001) ont

observé que les gènes d'un bactériophage filamenteux pf4 sont surexprimés en condition de biofilm. Le prophage pf4 est responsable de la lyse cellulaire facilitant la dispersion des cellules des microcolonies (Webb et al., 2004; Rice et al., 2008). De plus, ils ont montré que les pili de type IV et les flagelles sont des récepteurs de pf4 et indispensables pour l'induction de la lyse cellulaire précédant le détachement des cellules viables du biofilm. Cependant, l'infection par les bacteriophages filamenteux n'est généralement pas létale pour la bactérie : elle ralentit la croissance bactérienne sans provoquer de lyse cellulaire (Rakonjac et al., 2011). Les phages filamenteux ne forment donc pas de plages de lyse claires sur un tapis bactérien mais des plages turbides (Karlsson, 2004). De plus, il est généralement admis que les bactéries lysogènes sont immunes à une surinfection par un bactériophage du même type (Berngruber et al., 2010). Donc la lyse observée chez *P. aeruginosa* ne peut pas s'expliquer directement par l'action du phage pf4. Webb et ses collègues (2004) ont donc montré que les virions libérés du biofilm sont virulents, probablement apparus par une mutation, et capables de surinfecter les cellules lysogènes, à l'origine d'une lyse cellulaire précédant la dispersion des *P. aeruginosa* viables.

Un mécanisme similaire de lyse pourrait être envisagé chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17. En effet, la surexpression des gènes du bactériophage putatif en condition de biofilm sur trioléine suggère l'induction de ce prophage qui pourrait alors infecter et lyser les cellules du biofilm. Etant donné que l'infection dépend de la présence de pili, les mutants de pili seraient donc résistants au bactériophage ce qui expliquerait pourquoi ils forment plus de biofilm que la souche sauvage sur des composés gras tels que les alcools gras, acides gras et triglycérides.

Pour tester cette hypothèse nous avons tout d'abord vérifié si un prophage était induit lors de la formation de biofilm. La capacité des surnageants de biofilm se développant sur *n*-hexadécane ou trioléine à provoquer des plages de lyse sur des tapis bactériens de JM1, *M. adhaerens* HP15 et *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 a été testée. Pour ce faire, des cultures de biofilm mature en voie de dissociation obtenues sur *n*-hexadécane (incubation de 24 h) et trioléine (incubation de 24 h, 44 h et 72 h) ont été centrifugées puis filtrées à travers une membrane de 0.2 µm, et 5 µL de différentes dilutions de ces surnageants ont été déposés sur un tapis de différentes souches hôtes. Après incubation à 30°C et une observation régulière des tapis bactériens, aucune lyse cellulaire n'a été observée, pour aucune des souches hôtes testées. Deux explications sont possibles :

- Il n'y a pas de libération de prophages lors de la formation de biofilm sur les HOC,

- La souche JM1 lysogène est résistante à une surinfection, et les autres espèces bactériennes testées (*M. adhaerens*, *M. hydrocarbonoclasticus* VT8) ne font pas partie du spectre d'hôte de ce phage.

Pour aller plus loin, des expériences supplémentaires seraient intéressantes à réaliser afin de juger si une exploration plus poussée du rôle des phages vaut la peine d'être entreprise. D'une part, la construction d'un mutant JM1 dépourvu du prophage putatif permettrait de vérifier si cet élément génétique mobile intervient dans la formation de biofilm sur les HOC, comme postulé précédemment. D'autre part, nous pourrions essayer de détecter le phage par amplification PCR sur des surnageants de biofilms ou de cultures de JM1 traitées à la mitomycine C.

Une autre possibilité pour expliquer l'augmentation de biomasse obtenue lors des cinétiques de croissance des mutants *pil* sur les HOC, serait d'envisager l'implication des pili dans le processus de détachement. En effet, lors de la formation de biofilm de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sur les HOC, les cellules se détachent continuellement du biofilm, avant même que celui-ci n'ait atteint son stade mature (Klein et al., 2008). La biomasse accumulée dans le biofilm est donc la résultante du taux de croissance et du taux de détachement. Une diminution du taux de détachement sans modification du taux de croissance conduirait à une plus grande accumulation de biomasse dans le biofilm. Une déficience des mutants *pil* dans leur capacité à se détacher pourrait expliquer leur phénotype.

La capacité de détachement des cellules du biofilm formé sur hexadécanol a alors été estimée en suivant la cinétique de la biomasse planctonique chez les mutants *pilA* et *pilQ* et la souche sauvage JM1. Nous avons choisi de réaliser cette expérience sur l'hexadécanol, puisque c'est sur ce substrat que le phénotype des mutants pili était le plus accentué. La Figure IV.10 montre que la biomasse planctonique d'une culture de la souche sauvage augmente plus vite que celle des cultures des biofilms des mutants. Ce résultat indique que les cellules sauvages se détachent plus vite que les cellules des souches mutantes *pilA* et *pilQ* (Figure IV.10).

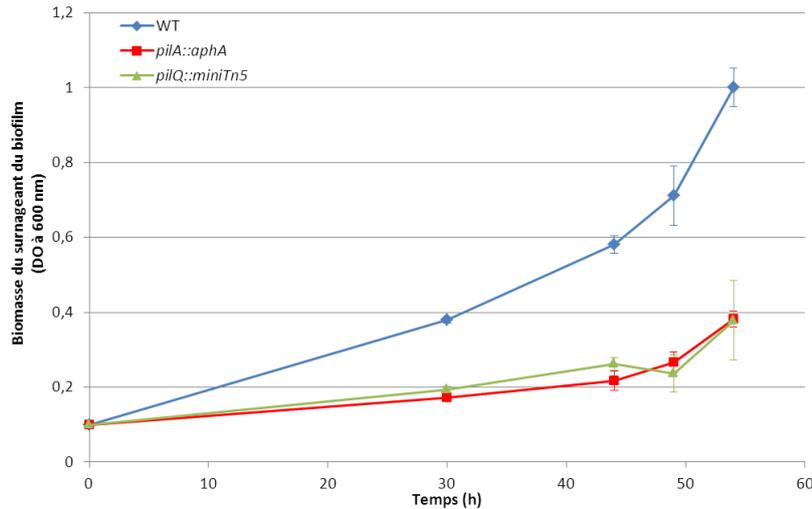


Figure IV.10 : Suivi de la biomasse planctonique contenue dans le surnageant du biofilm sur hexadécanol.

Le surnageant du biofilm formé sur les puits des microplaques contenant l'hexadécanol solide coulé en fond de puits à été mesurée par spectrométrie (DO à 600 nm).

WT : souche sauvage JM1 ; *pilQ::miniTn5* : mutant d'insertion HE1 (*MARHY0701::miniTn5*) ; *pilA::aphA* : mutant « knock-out » AC5 (*ΔMARHY2564::aphA*).

Cependant, la quantité de cellules contenues dans le biofilm formé sur hexadécanol et la quantité de cellules qui se détachent simultanément du biofilm n'ont pas été estimées à partir de la même méthode de mesure. Il est donc difficile de comparer et relier les deux résultats pour comprendre le phénomène qui a lieu. Afin d'avoir une quantification plus cohérente de ces deux biomasses, la quantité de protéines contenues dans ces deux types de cellules a été dosée. Pour ce faire, des cultures de chacune des trois souches ont été menées sur des plaques à 24 puits contenant de l'hexadécanol en fond de puits. A chaque temps de mesure, le surnageant du biofilm a été prélevé et centrifugé afin de récupérer les cellules planctoniques. Les cellules du biofilm ont été récupérées par lavage de la surface de l'hexadécanol avec une solution de SDS à 10 % (se référer à la section 1.1.4 du **Chapitre II**). Les protéines contenues dans ces deux types de cellules ont été quantifiées par dosage BCA. La Figure IV.11 confirme les résultats obtenus lors des expériences précédentes : la biomasse contenue au sein du biofilm de chaque mutant est supérieure à celle contenue dans le biofilm de la souche sauvage, alors que la biomasse des cellules détachées de cette dernière est supérieure à celle des mutants. D'autre part la quantité de biomasse totale dans la culture (planctonique + biofilm) est équivalente chez chacune des souches indiquant que les mutants présentent bien un taux de détachement inférieur au sauvage. La plus grande quantité de biofilm formée chez les mutants de pili résulte donc d'une déficience dans leur capacité à se détacher du biofilm.

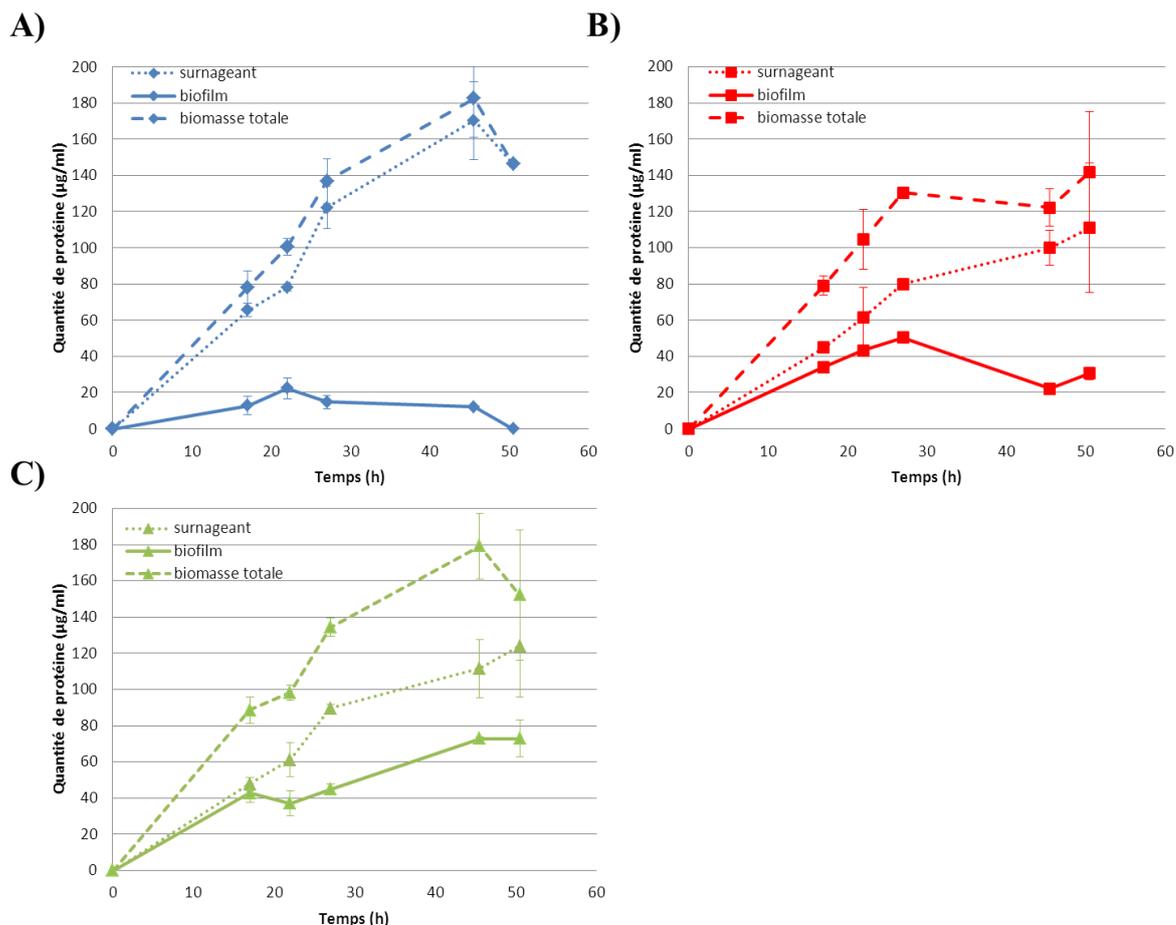


Figure IV.11 : Comparaison de la biomasse totale, sessile et planctonique obtenues lors de la croissance sur hexadécanol de la souche sauvage JM1 (A), et des mutants des gènes de pili, *pilA* (B) et *pilQ* (C).

Les souches ont été cultivées dans des microplaques contenant l'hexadécanol solide coulé en fond de puits. La biomasse de chaque compartiment a été estimée par un dosage protéique en utilisant le kit BCA. Les valeurs ont été obtenues par mesure colorimétrique (DO à 562 nm).

WT : souche sauvage JM1 ; *pilQ::miniTn5* : mutant d'insertion HE1 (*MARHY0701::miniTn5*) ; *pilA::aphA* : mutant « knock-out » AC5 (Δ *MARHY2564::aphA*).

L'étude menée par Conrad et ses collègues sur *P. aeruginosa* pourrait expliquer le phénomène observé lors de la formation de biofilm de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17. En comparant la trajectoire des cellules de *P. aeruginosa* sauvage à celles des mutants dépourvus de pili de type IV (*pilA*) ou de flagelles (*fliM*), cette équipe de recherche a montré que ces deux appendices extracellulaires interviennent non seulement dans le mouvement cellulaire sur une surface mais également dans un processus de détachement d'un support (Gibiansky et al., 2010; Conrad et al., 2011; Conrad, 2012). L'absence de ces appendices extracellulaires influence également la morphologie des biofilms formés par *P. aeruginosa*. Par exemple, contrairement à la souche sauvage qui forme un biofilm homogène sur toute la surface, le mutant *pilA* qui est incapable de se détacher et de bouger de l'endroit du support sur lequel il

s'est adhérent ne se développe que par multiplication clonale en formant des clusters de cellules distribués de façon hétérogène (Conrad et al., 2011). De la même manière que chez *P. aeruginosa*, le pilus de type IV de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 pourrait être impliqué dans le phénomène de détachement du biofilm sur les HOC.

Des mutants « knock-out » des gènes de *pilH* (mutant AC6), qui code pour une protéine impliquée dans la rétractation du pilus, et de *pilV* (mutant AC7), codant pour une piline mineure qui fait partie de la structure du pilus (Giltner et al., 2010; Burrows, 2012) ont été construits plus tardivement, pour améliorer notre compréhension du rôle du pilus de type IV dans la formation de biofilm sur les HOC. Le mutant *pilH*, déficient dans la mobilité cellulaire, permettrait d'observer si JM1 a recours à la mobilité dépendante des pili de type IV, dont le twitching, lors de la croissance sur les HOC. La piline mineure *pilV* a été estimée importante pour de nombreuses fonctions accomplies par les pili de type IV chez de nombreuses bactéries telles que dans l'adhésion des *Neisseria gonorrhoeae* aux cellules épithéliales humaines (Winther-Larsen et al., 2001; Takahashi et al., 2012), dans le phénomène de twitching chez *P. aeruginosa* (Giltner et al., 2010)... Comme présenté précédemment dans Figure IV.6A, parmi toutes les protéines de la biogénèse ou de la mobilité du pilus, seules les pilines mineures de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 possèdent une faible similarité de séquence protéique avec celles de *P. aeruginosa*. Cette caractéristique nous a d'autant plus intéressé à étudier l'implication de cette protéine dans le fonctionnement du pilus, dans l'espoir de trouver une spécificité propre aux pili de type IV de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17.

La caractérisation phénotypique des mutants *pilH* (AC6) et *pilV* (AC7) n'ont pas encore pu être menées pleinement. Seule la cinétique de croissance sur paraffine a pu être menée jusqu'à maintenant. Aucune différence notable dans le développement du biofilm n'apparaît (Figure IV.12). Des cinétiques de croissance sur l'acide palmitique, l'hexadécane-1-ol et la tripalmitine seront menées, afin de vérifier si le même phénotype que les mutants dépourvus de pili (*pilA* et *pilQ*) est observé.

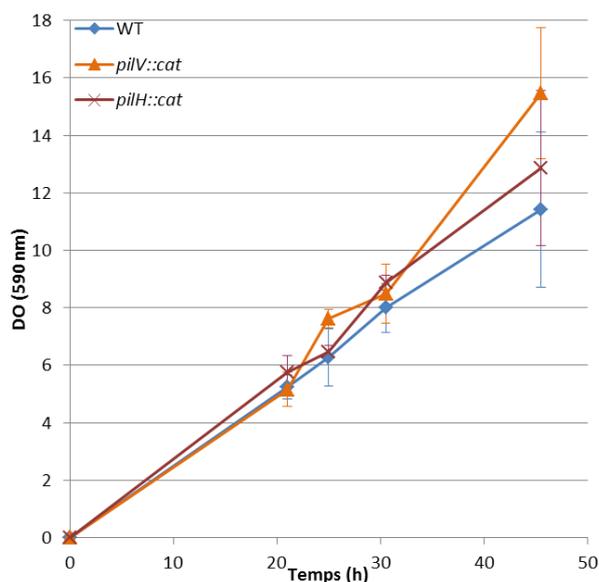


Figure IV.12 : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine de la souche sauvage JM1 et des mutants *pilH* et *pilV*.

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant la paraffine solide coulée en fond de puits.

WT : souche sauvage JM1 ; *pilH::cat*: mutant « knock-out » AC6 ($\Delta pilH::cat$), *pilV::cat*: mutant « knock-out » AC7 ($\Delta pilV::cat$).

3.3. Les pili de type IV interviennent dans l'adhésion aux HOC

De nombreuses études ont montrées l'importance des pili de type IV dans l'adhésion de plusieurs espèces bactériennes à un support. Chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, les gènes impliqués dans la synthèse du pilus de type IV étant surexprimés précocément lors de la croissance sur les HOC, nous avons étudié son rôle dans l'adhésion à des surfaces hydrophobes.

Afin d'observer et quantifier l'adhésion de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 à différents HOC par microscopie à épifluorescence, le gène codant pour la protéine EYFP sous le contrôle du promoteur synthétique $P_{A1/04/03}$ porté par le miniTn7 a dans un premier temps été introduit sur le site att du chromosome de JM1. Il s'est avéré que le marquage de JM1 (donnant la souche AC13) était trop faible pour pouvoir les observer sur une surface hydrophobe opaque (la paraffine), alors qu'elles sont très fluorescentes à l'état planctonique. Bien que l'intégration du miniTn7 soit stable, elle ne s'effectue qu'en une seule copie, ce qui peut expliquer la raison pour laquelle la fluorescence est trop faible pour distinguer les cellules sur les HOC. Pour améliorer le marquage, le plasmide pMP7605 (Lagendijk et al., 2010) dérivé du pBBR1MCS-5 (Kovach et al., 1995), se maintenant chez JM1, et portant le gène codant pour la protéine fluorescente mCherry sous le contrôle du promoteur inductible *ptac* a été introduit chez JM1 (donnant la souche AC14). Cependant, l'observation au

microscope à épifluorescence a montré que l'expression de la mCherry était trop faible pour le comptage. Pour pouvoir visualiser les cellules dans les tests d'adhésion sur les HOC, un dérivé du plasmide pBBR1MCS-5 contenant le gène EYFP sous le contrôle du promoteur constitutif P_{A1/04/03} est en cours de construction.

Pour mener à bien les expériences d'adhésion sans avoir recours à des souches fluorescentes, des tests de coloration des cellules adhérees à la paraffine ont été réalisés en utilisant différents colorants fluorescents se fixant sur les acides nucléiques : Hoechst 33258 (Life Technologies), l'acridine orange (Life Technologies) et le Syto 9 (Life Technologies). L'acridine orange s'est avéré être le colorant qui permettait le meilleur marquage avec le minimum de bruit de fond.

Des expériences d'adhésion ont été menées en triplicata en mettant une suspension de chaque souche, AC5 (*pilA* ::*aphA*), HE1 (*pilQ* ::*miniTn5*) et AC6 (*pilH* ::*cat*), au contact de lames de microscopes recouvertes de paraffine ou de tripalmitine pendant 30 minutes (voir le protocole suivi à la section 4.1.1. du **Chapitre II**). Les échantillons ont été observés au microscope à épifluorescence et un total de 30 photos ont été prises pour chaque souche. Pour chacune des souches testées, trois photographies sont présentées dans les conditions d'adhésion sur paraffine et tripalmitine. L'analyse qualitative des images obtenues sur paraffine (Figure IV.13 et Figure IV.14) montrent que les mutants dépourvus de pili (*pilA* et *pilQ*) adhèrent globalement moins que les cellules de JM1 sauvages et le mutant *pilH* déficient dans le mécanisme de rétractation (AC6). Ces deux dernières souches forment également des clusters de cellules, alors que les cellules des mutants *pilA* et *pilQ* sont majoritairement isolées. Sachant que le mutant *pilH* est muté dans un gène intervenant dans la mobilité cellulaire de type twitching, les amas de cellules formés par la souche sauvage et le mutant *pilH* (Figure IV.13 et Figure IV.14) se seraient probablement formés par un phénomène d'autoagrégation cellulaire via les pili de type IV précédant l'adhésion à la surface hydrophobe. L'hypothèse selon laquelle les amas cellulaires se formeraient par multiplication clonale est à exclure, car le temps d'incubation de 30 minutes est trop court pour permettre un nombre de division cellulaire important.

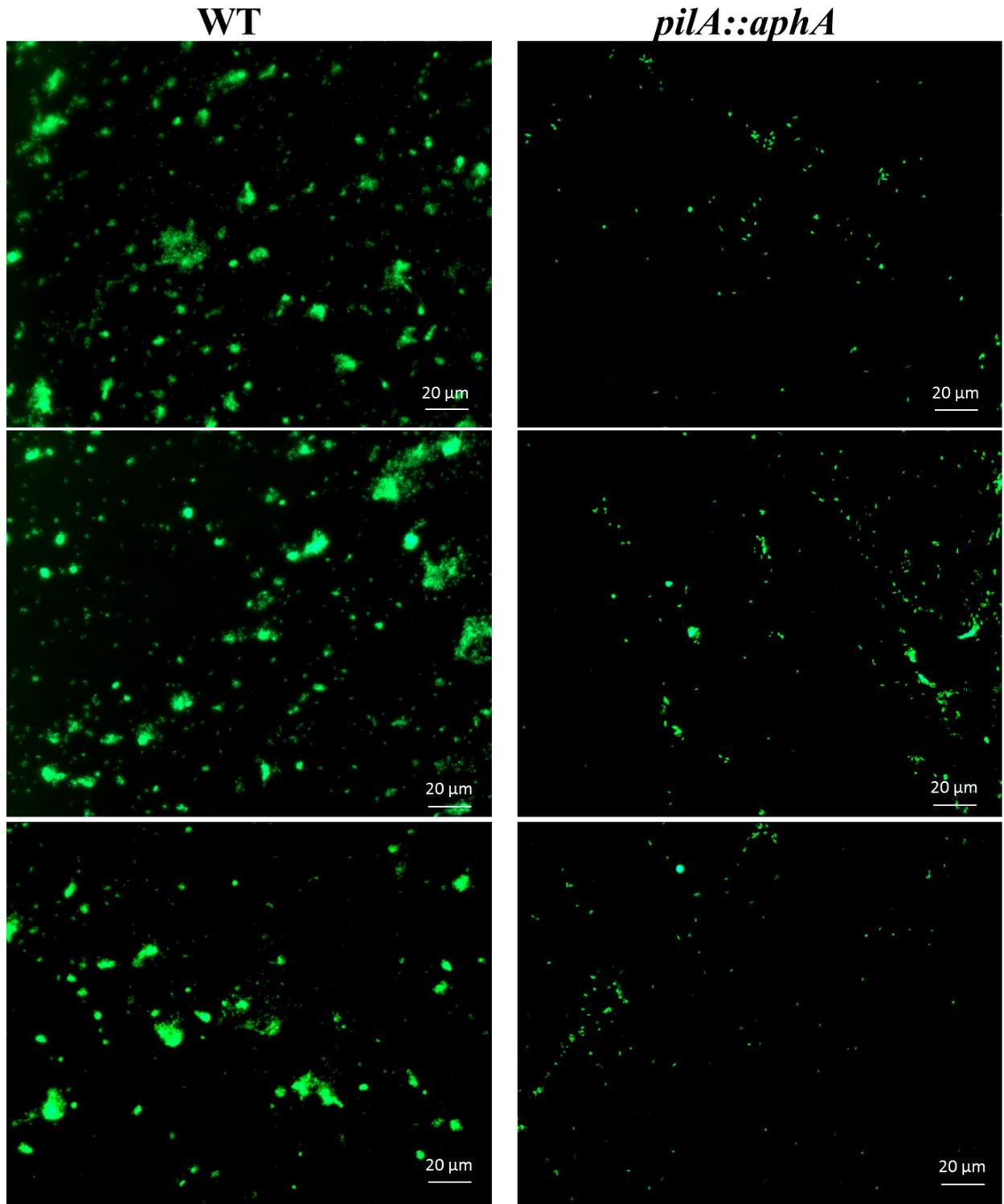


Figure IV.13 : Observation des cellules de JM1 (WT) et *pilA* adhérées à la paraffine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.

Les cellules adhérées aux HOC ont été colorées à l'acridine orange et observées au microscope à épifluorescence. Pour chaque souche, trois photographies sont présentées.

WT : souche sauvage JM1; *pilA::aphA* : mutant d'insertion AC5 (*ApilA::aphA*).

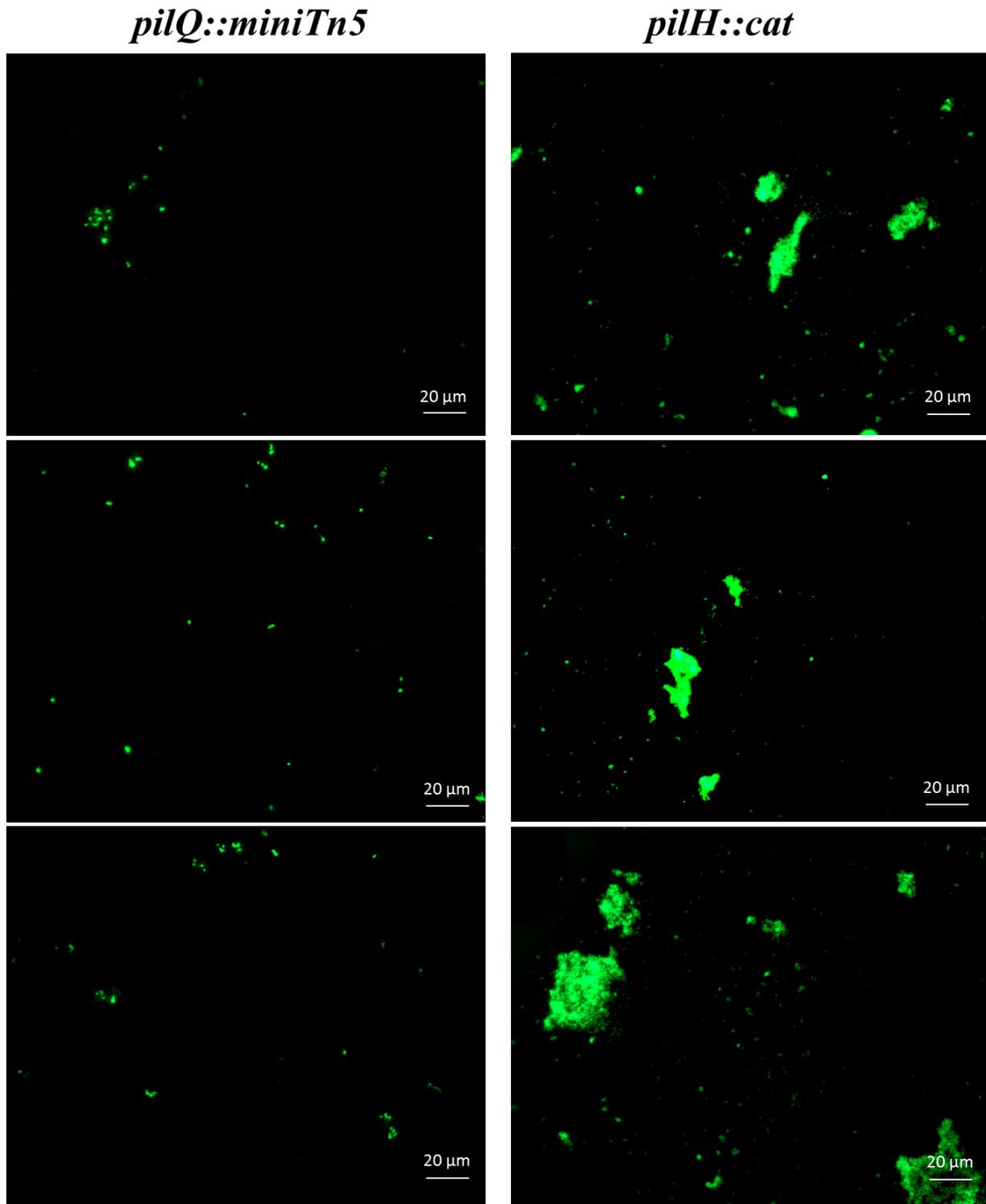


Figure IV.14 : Observation des cellules de *pilQ* et *pilH* adhérentes à la paraffine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.

Les cellules adhérentes aux HOC ont été colorées à l'acridine orange et observées au microscope à épifluorescence. Pour chaque souche, trois photographies sont présentées.

pilQ::miniTn5 : mutant d'insertion AC5 (*MARHY0701::miniTn5*) ; *pilH::cat* : mutant « knock-out » AC6: ($\Delta pilH::aphA$).

Le traitement à l'aide du logiciel Image J d'une trentaine d'images prises pour chaque souche a permis d'obtenir des données quantitatives du phénomène d'adhésion sur la paraffine (Figure IV.15, Figure IV.16). Le pourcentage de couverture de la surface de paraffine (Figure IV.15A), qui rend compte de la surface colonisée par la souche, a été calculé. Bien que les écarts-types se recoupent, les mutants *pilA* et *pilQ* adhèrent significativement moins bien que la souche sauvage (p-value < 0.05) alors que le mutant *pilH* se comporte de manière similaire à JM1 (p-value > 0.05). La quantification du nombre d'objets détecté pour chaque catégorie de taille d'objets confirme également que les mutants *pilA* et *pilQ* adhèrent moins que le mutant *pilH* et la souche sauvage et rend compte de la tendance des deux dernières souches à former plus d'amas cellulaires que les mutants *pilA* et *pilQ* (Figure 16A).

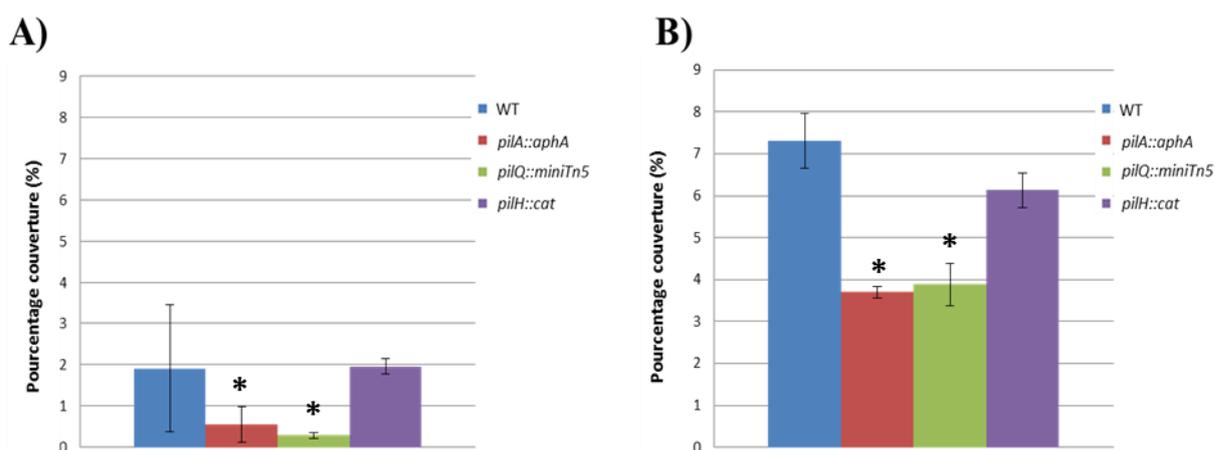


Figure IV.15 : Pourcentages de couverture des cellules adhérees à la paraffine (A) et à la tripalmitine (B).

La quantification de l'adhésion a été réalisée par le traitement des images à l'aide du logiciel Image J.

Pourcentage de couverture = somme des aires des objets / aire totale du champ.

Objets : cellule bactérienne isolée ou amas cellulaire.

WT : souche sauvage JM1 ; *pilQ::miniTn5* : mutant d'insertion HE1 (*MARHY0701::miniTn5*) ; *pilA::aphA* : mutant « knock-out » AC5 (Δ *MARHY2564::aphA*) ; *pilH::cat* : mutant « knock-out » AC6 (Δ *MARHY3672::cat*).

*: p-value < 0.05 (par rapport au WT)

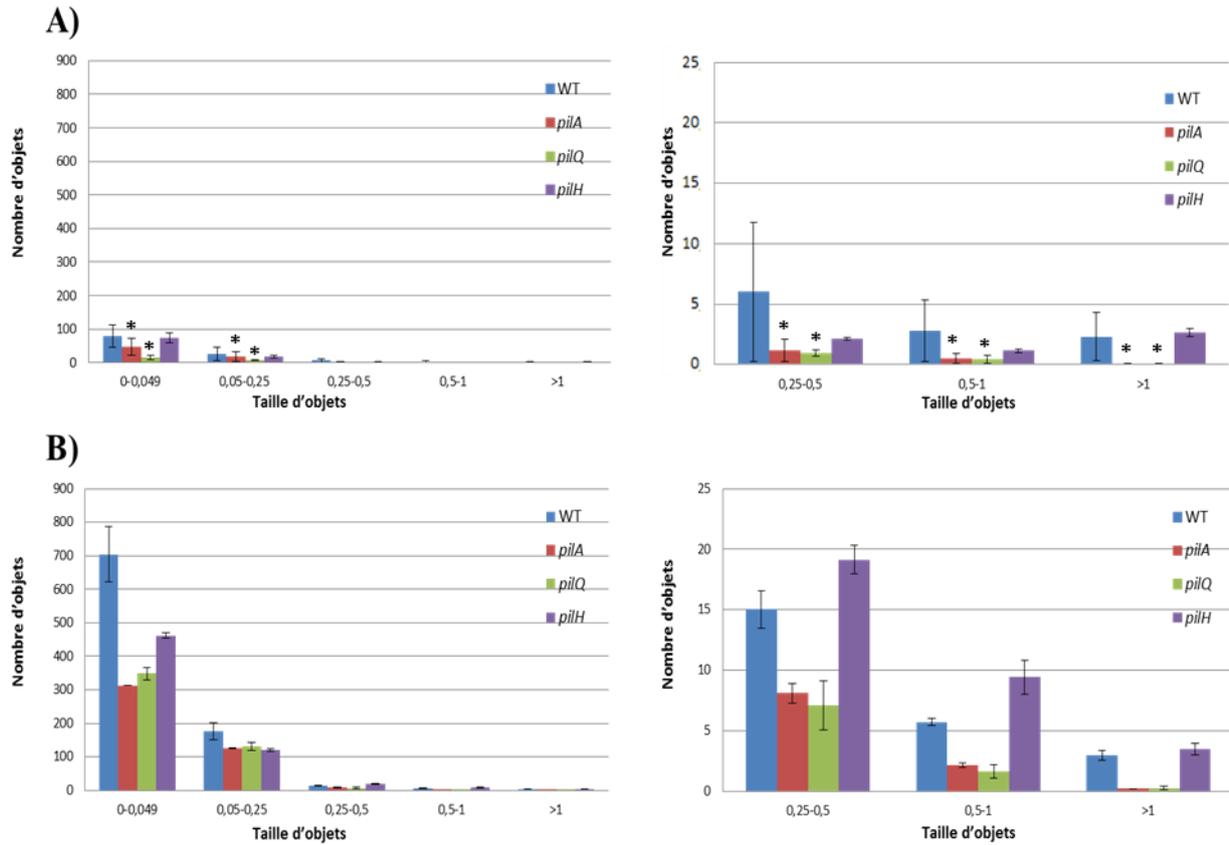


Figure IV.16: Quantification du nombre d'objets de chaque catégorie de taille d'objets en condition d'adhésion sur paraffine (A) et tripalmitine (B).

La quantification de l'adhésion a été réalisée par le traitement des images à l'aide du logiciel Image J.

Les objets (une cellule bactérienne isolée ou amas cellulaire) ont été triés arbitrairement en catégories de taille d'objets selon leur aire <0.05, 0.05-0.25, 0.25-0.5, 0.5-1, >1.

A gauche : le nombre d'objets obtenu pour chaque catégorie de taille d'objets, à droite : le nombre d'objets obtenu pour les catégories de taille d'objets 0.25-0.5, 0.5-1 et >1.

WT : souche sauvage JM1 ; *pilQ::miniTn5* : mutant d'insertion HE1 (*MARHY0701::miniTn5*) ; *pilA::aphA* : mutant « knock-out » AC5 (*ΔMARHY2564::aphA*) ; *pilH::cat* : mutant « knock-out » AC6 (*ΔMARHY3672::cat*).

Les tests statistiques ont été réalisés sur les résultats obtenus sur paraffine seulement.

*: p-value < 0.05 (par rapport au WT)

Les observations qualitatives de l'adhésion sur une surface solide de tripalmitine menées au microscope à épifluorescence montrent que toutes les souches testées adhèrent plus rapidement que sur la paraffine (Figure IV.17 et Figure IV.18). Cette observation concorde avec les résultats obtenus lors des cinétiques de croissance en biofilm révélés par coloration au cristal violet, où la souche JM1 et les mutants forment un biofilm plus précocement sur les composés lipidiques que sur la paraffine (Figure IV.9). La différence de colonisation de la surface nutritive hydrophobe lipidique entre les mutants *pilA* et *pilQ* et la souche sauvage JM1 est moins nette que dans le cas de la paraffine. Cependant, comme pour la paraffine, les cellules JM1 et *pilH* forment plus d'amas cellulaires que les mutants dépourvus de pili.

Que ce soit sur paraffine ou tripalmitine, les agrégats de cellules formés par JM1 semblent être plus éparpillés que ceux du mutant *pilH*. Contrairement au mutant *pilH* qui est déficient dans le mécanisme de rétractation du pilus responsable de la mobilité de type twitching, il est probable que les cellules des amas de JM1 formés avant l'adhésion au HOC se soient éparpillées du fait de cette mobilité lors du contact avec la surface. Un phénomène identique a été observé par Bieber et ses collègues (1998) chez une souche entéropathogène d'*E. coli*, où le pili de Type IV bfp (bundle-forming pili) intervient dans un mécanisme d'autoagrégation cellule-cellule, ainsi que dans la dispersion cellulaire post-adhésion de ces amas. Ces chercheurs ont observé que la mutation d'un gène de pili à l'origine d'une déficience dans la mobilité de type twitching inhibait également la dispersion cellulaire des agrégats alors que le mécanisme d'autoagrégation était intact (Bieber et al., 1998).

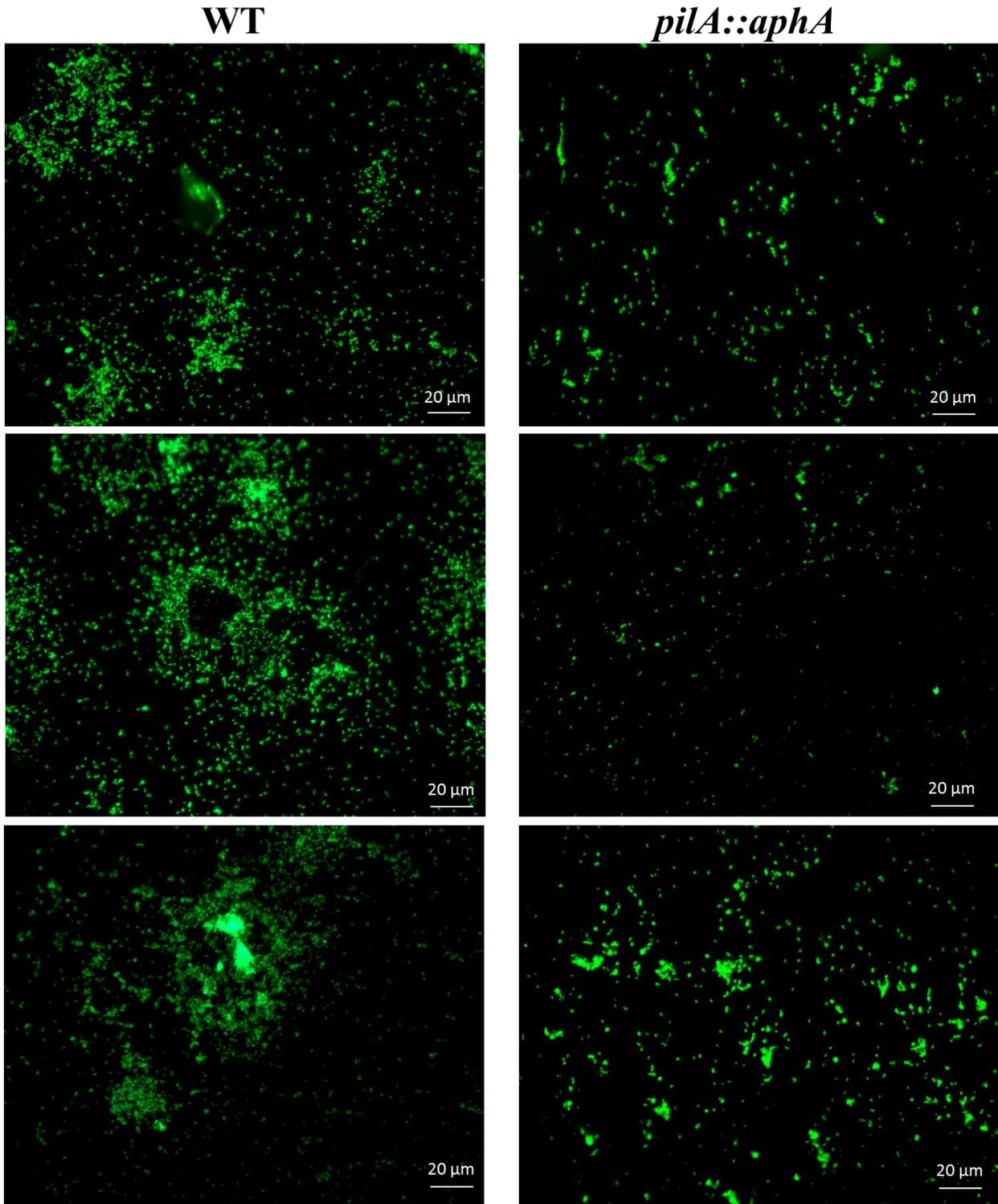


Figure IV.17 : Observation des cellules de JM1 (WT) et *pilA* adhérées à la tripalmitine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.

Les cellules adhérées aux HOC ont été colorées à l'acridine orange et observées au microscope à épifluorescence. Pour chaque souche, trois photographies sont présentées.

WT : souche sauvage JM1; *pilA::aphA* : mutant d'insertion AC5 ($\Delta pilA::aphA$).

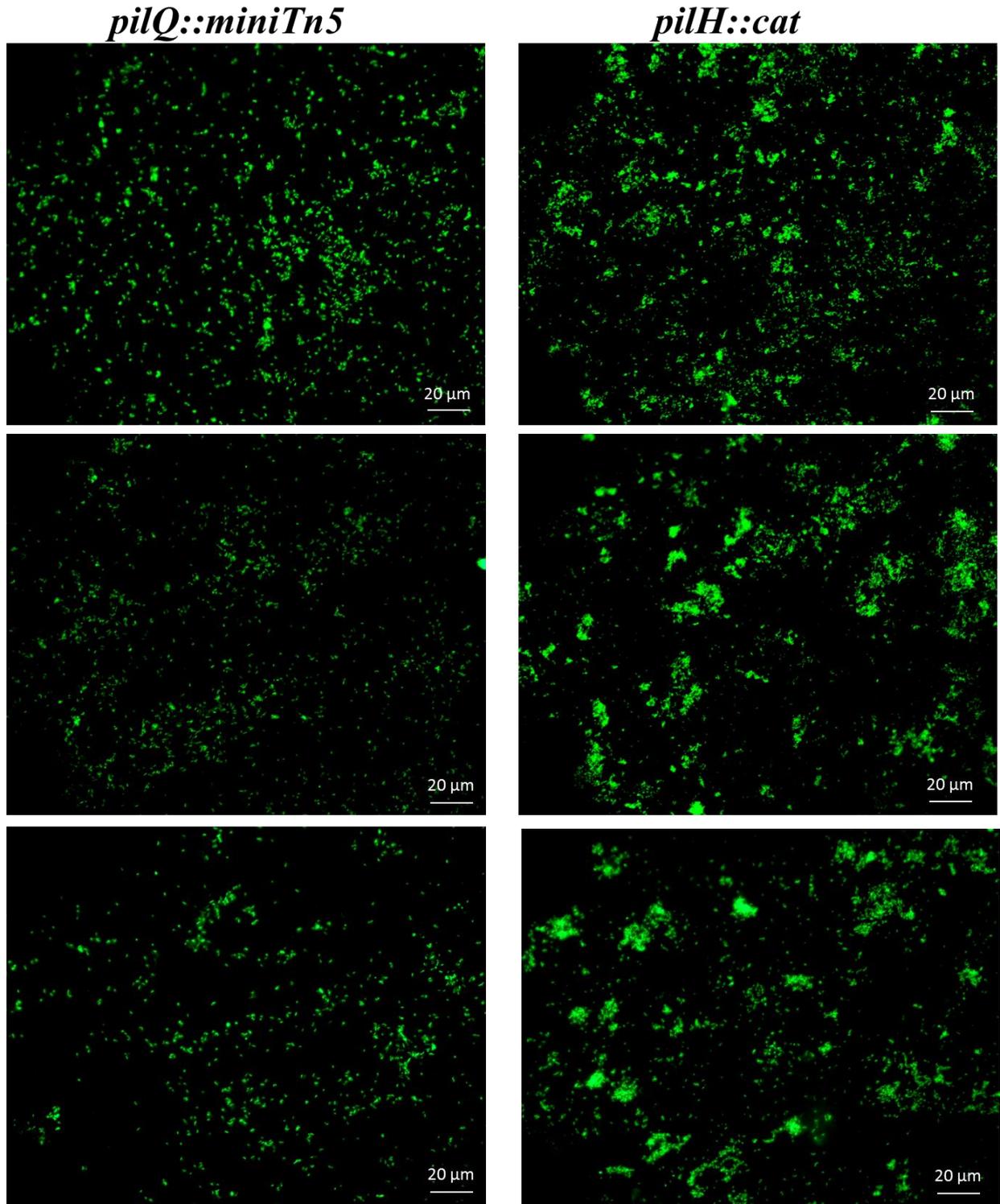


Figure IV.18 : Observation des cellules de *pilQ* et *pilH* adhérees à la tripalmitine par microscopie à épifluorescence après 30 minutes d'incubation.

Les cellules adhérees aux HOC ont été colorées à l'acridine orange et observées au microscope à épifluorescence. Pour chaque souche, trois photographies sont présentées.

pilQ::miniTn5 : mutant d'insertion AC5 (*MARHY0701::miniTn5*) ; *pilH::cat* : mutant « knock-out » AC6: (Δ *pilH::aphA*).

Les données quantitatives du phénomène d'adhésion sur tripalmitine par traitement des images a permis de confirmer la tendance observée (Figure IV.15B et Figure IV.16B). La souche sauvage et le mutant *pilH* adhèrent plus que les mutants *pilA* et *pilQ*. De plus, d'après l'analyse de la taille des objets adhérents, la souche sauvage et le mutant *pilH* forment de plus gros amas cellulaires que les mutants *pilA* et *pilQ* (Figure IV.16B). Par ailleurs, en comparant le nombre d'objets qui se retrouvent dans chaque catégorie de taille d'objets, on peut noter que la souche sauvage forme plus de petits amas cellulaires (< 0.25) que le mutant *pilH*, alors que ce dernier forme plus de gros clusters cellulaires (> 0.25) que la souche sauvage. Cette donnée quantitative va de pair avec la tendance observée qualitativement : contrairement au mutant *pilH*, la souche sauvage semble s'éparpiller des amas cellulaires par un mouvement surfacique, très certainement par twitching, ce qui se traduit par une diminution de la population cellulaire présente dans des gros amas cellulaires.

De manière étonnante, alors que les expériences d'adhésion ont révélé que les mutants des gènes de pili *pilA* et *pilQ* sont affectés dans la capacité d'adhésion sur des surfaces nutritives, les cinétiques de croissance par dosage au cristal violet (Figure IV.9) ont montré que les mutants pili arrivent à former un biofilm aussi rapidement voire plus rapidement que la souche sauvage. Il semblerait donc que les mutants arrivent à rattrapper le retard causé par leur déficience dans l'adhésion.

3.4. Les pili de type IV et le twitching

Le twitching est un type de mouvement cellulaire dépendant des pili de type IV qui permet à la bactérie de coloniser des surfaces. Le mouvement s'initie par l'extension du pilus, via un phénomène de polymérisation des sous-unités de piline, qui s'attache à la surface et se rétracte aussitôt, par un mécanisme de dépolymérisation de la piline, entraînant la bactérie. Depuis la découverte de cette mobilité bactérienne par Lautrop (1961), plusieurs méthodes pour la mettre en évidence ont été optimisées (Lautrop, 1961). De nombreuses bactéries capables de réaliser le twitching ont été découvertes en observant la mobilité bactérienne sur agar mou à 1 %. Des études menées plus récemment sur plusieurs espèces bactériennes et notamment sur *Pseudomonas aeruginosa*, ont montré que le phénomène de twitching est plus actif et donc plus visible lorsque les cellules sont placées entre l'agar et une lamelle de verre ou de plastique (Semmler et al., 1999). En se basant sur le protocole proposé par l'équipe de

Semmler (1999), nous avons testé si les pili de type IV de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 interviennent également dans la mobilité sur une surface. Pour cela, une colonie de chaque souche a été introduite entre du milieu EMS agar à 1 % supplémenté de DL-lactate à 20 mM et 0.05 % de TTC (triphényl tétrazolium chloride) et la boîte de petri. Le TTC est un colorant qui forme des cristaux rouge de formazan quand il est réduit par le métabolisme cellulaire. Il permet de mieux distinguer les zones d'expansion cellulaire dues au twitching. Un halo de 1 cm de diamètre se forme entre l'agar et plastique chez JM1 au bout de 10 jours d'incubations à 19°C alors que les mutants *pilA* et *pilQ* ne forment qu'un diamètre de 4 mm.

Le phénomène de twitching a également été observé par microscopie à contraste de phase selon la méthode utilisée par Darzins (1993) qui consiste à piquer une colonie à la surface d'un milieu agar à 1 % (ici EMS supplémenté de 20 mM de DL-lactate) puis de rajouter une lamelle de microscope par-dessus (Darzins, 1993). La morphologie de la bordure de la colonie de chacune des souches, qui correspond à la zone d'expansion due au twitching entre l'agar et la lamelle de verre, est différente entre la souche JM1 et les mutants *pilA* et *pilQ* (Figure IV.19). L'extrémité de la colonie sauvage contient des bactéries individuelles disposées de manière perpendiculaire à la direction d'expansion de la colonie, alors que les cellules *pilA* et *pilQ* sont disposées parallèlement au bord. Les phénotypes obtenus lors de ces expériences avec JM1 et ses mutants sont très atypiques des phénotypes qui ont été observés jusqu'à maintenant chez les autres espèces bactériennes cultivées en condition de twitching. Cependant, il est rassurant de voir une distinction morphologique entre la souche sauvage et les mutants pili. La disposition des cellules sauvages en brosse, perpendiculairement à la bordure d'expansion supposerait qu'elles sont sur le point ou en train de bouger à travers la surface, contrairement à la disposition couchée et désordonnée des mutants *pilA* et *pilQ* qui ne laisse présager aucun mouvement.

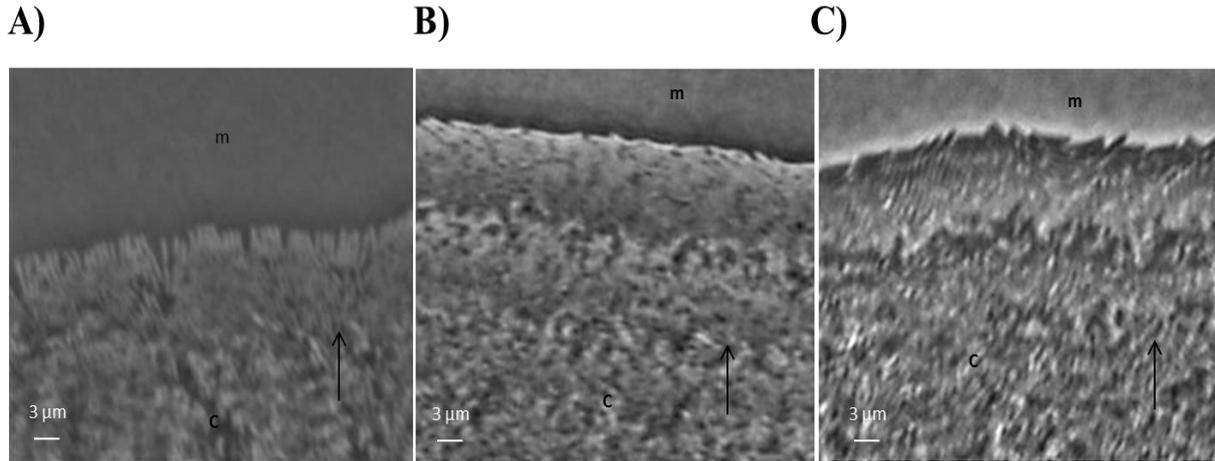


Figure IV.19 : Images de microscopie à contraste de phase de la zone d'expansion de la colonie de JM1 (A), *pilA* (B) et *pilQ* (C) observées à l'interstice entre l'agar à 1 % et la lamelle de verre.

Les photographies des bordures de chaque colonie ont été obtenues après 4 jours d'incubation à 30 °C.

« m » indique le milieu agar non colonisé ; « c » indique la colonie ; la flèche indique la direction radiale de l'expansion de la colonie.

D'après ces expériences de twitching il semblerait que *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 utilise les pili de type IV pour se mouvoir sur des surfaces solides. Cependant, des expériences de mobilité bactérienne sur des HOC sont nécessaires à mettre en œuvre afin de vérifier si le twitching est indispensable pour la structuration du biofilm sur ces types de surface. Lors de l'expérience d'adhésion présentée dans la section précédente, la présence d'un phénomène de twitching a été supposée pour expliquer la dispersion des cellules de JM1 des amas cellulaires. Cependant, des tests de mobilité sur HOC pour confirmer l'existence d'un phénomène de twitching n'ont pas encore été optimisés. En s'inspirant des travaux menés par l'équipe de Tolker-Nielsen, il a été envisagé de lancer des expériences de formation de biofilm sur paraffine en mélangeant les souches de JM1 et une souche de mutant pili (Klausen et al., 2003b). Une observation au microscope à épifluorescence permettrait de suivre le devenir de chaque type de cellule préalablement marqué par deux protéines fluorescentes différentes et de vérifier si la mobilité pili-dépendante intervient dans la morphologie du biofilm sur HOC. Pour le moment, les souches marquées sont en cours de construction. Il a été observé que l'expression du gène codant pour l'EYFP ou par la GFP porté par le miniTn7 et inséré en unique copie sur le génome de JM1 par transposition n'est pas assez intense pour distinguer les bactéries marquées sur les HOC. C'est pourquoi, des plasmides réplcatifs pBBR1MCS-5 contenant des gènes codant pour différentes protéines fluorescentes sous le contrôle d'un promoteur constitutif sont sur le point d'être construites, afin de tester l'intensité du marquage en condition de croissance sur les HOC.

3.5. Complémentation fonctionnelle des mutants des gènes de pili

Pour vérifier que les phénotypes des mutants des gènes de pili observés sur les HOC sont directement dus à la mutation dans les gènes considérés, une étape de vérification par complémentation est indispensable.

Pour le moment, seul le gène *pilA* sauvage sous le contrôle du promoteur P_{A1/04/03} et porté par le mini-Tn7T a été introduit dans la souche mutante (souche AC16, pour la technique utilisée se référer à la section 2.7.3 du **Chapitre II**). La cinétique d'appartition de la biomasse planctonique (surnageant du biofilm) lors de la croissance sur hexadécanol indique que la souche complémentée montre un phénotype mutant (Figure IV.20). L'absence de complémentation peut être due à un effet polaire dans le cas où *pilA* formerait un opéron avec les gènes localisés en aval (voir Figure IV.6 de la section 3.1). Comme discuté dans la section 3 du chapitre sur la caractérisation fonctionnelle du gène *MARHY2686* (**Chapitre III**), lors de la technique de mutation « knock-out » utilisée dans notre étude, nous avons volontairement introduit une cassette kanamycine ne contenant pas de terminateur de transcription afin d'éviter une terminaison de transcription prématurée. L'effet polaire rencontré agirait vraisemblablement au niveau de l'étape de la traduction. Cependant, un deuxième phénomène pourrait expliquer pourquoi la complémentation n'a pas marché. Les pili de type IV sont des structures protéiques complexes qui nécessitent une régulation fine pour éviter toute aberration structurale. Une expression constitutive d'un des gènes impliqués dans la biogénèse du pilus, dans notre cas *pilA*, pourrait entraîner un dysfonctionnement dans l'assemblage du pilus et empêcher la complémentation fonctionnelle. Pour palier à ce problème, le promoteur propre au gène devrait être cloné.

Dans tous les cas, étant donné que la complémentation fonctionnelle n'a pas encore été finalisée pour aucun des mutants des gènes de pili, les phénotypes observés pour chacun d'eux ne sont pas certifiés être dus à la mutation du gène considéré ; ils pourraient également être dus à des mutations des gènes en aval.

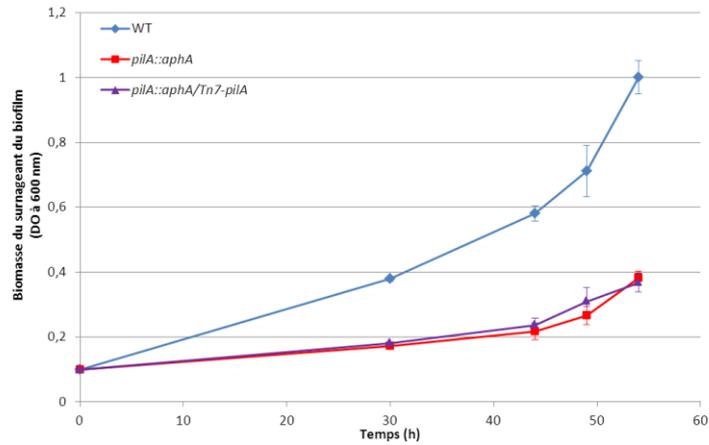


Figure IV.20 : Suivi de la biomasse planctonique contenue dans le surnageant du biofilm sur hexadécanol.

Le surnageant du biofilm formé sur les puits des microplaques contenant l'hexadécanol solide coulé en fond de puits à été mesurée par spectrométrie (DO à 600 nm).

WT : souche sauvage JM1 ; *pilA::aphA* : mutant « knock-out » AC5 (Δ MARHY2564::*aphA*) ; *pilA::aphA/Tn7-pilA* : mutant *pilA* complémenté AC16 (Δ MARHY2564::*aphA*; *attTn7::[mini-Tn7T-Gm- PA1/04/03-MARHY2564]*).

4. Le rôle du pilus de type MSHA dans la formation de biofilm sur les HOC

M. hydrocarbonoclasticus SP17 possède dans son génome un large cluster de 16 gènes transcrits dans le même sens qui s'avère être homologue au cluster de gènes codant pour le pilus de type mannose-sensible hémagglutinine (MSHA) de nombreuses bactéries à Gram-négatives. Le pilus MSHA fait également partie des pili de type IV et est retrouvé chez *V. cholerae* et plusieurs autres bactéries environnementales (Thormann et al., 2004; Dalisay et al., 2006; Giltner et al., 2012). Ce pilus a été initialement mis en évidence par sa capacité à entraîner l'hémagglutination des érythrocytes, phénomène qui est inhibé par l'addition du mannose, d'où le nom donné à ce pilus (Wooldridge, 2009). Il a été démontré comme intervenant dans l'adhésion et la formation de biofilm sur une grande variété de surfaces abiotiques et biotiques telles que le verre (Thormann et al., 2004), le polystyrène (Dalisay et al., 2006), la lamelle de verre (Shime-Hattori et al., 2006), des fibres de cellulose (Watnick et al., 1999), la surface de l'algue verte *Ulva australis* (Dalisay et al., 2006) et à l'exosquelette du zooplancton (Chiavelli et al., 2001). La figure IV.21 rend compte de la conservation de la syntonie qui existe entre le cluster de *M. hydrocarbonoclasticus* et de *V. cholerae* O1 biovar El Tor N16961, le locus des gènes du pilus MSHA le mieux caractérisé à ce jour (Marsh and Taylor, 1999).

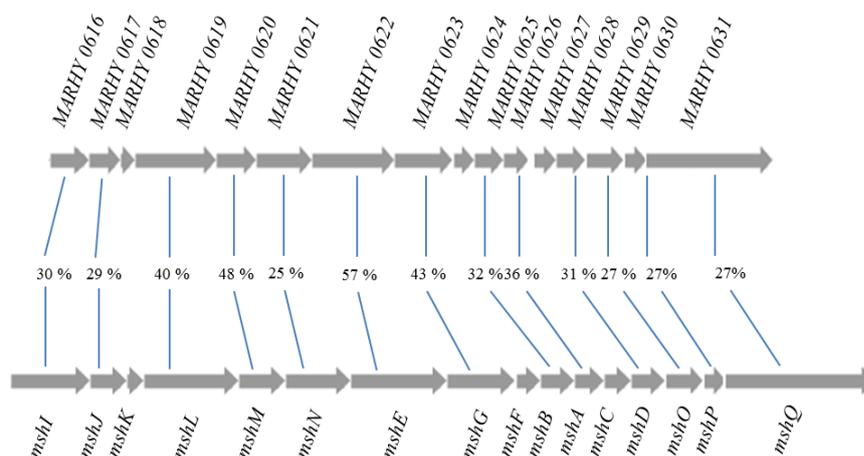


Figure IV.21 : Organisation des gènes codant pour les pili de type MSHA chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 (en haut) et *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor N16961 (en bas). Les valeurs entre les gènes homologues représentent les pourcentages d'identités des séquences peptidiques des protéines associées.

Les données transcriptomiques ont mis en avant la répression de 10 gènes du pilus MSHA sur 16 en condition de biofilm mature par rapport aux cellules planctoniques en

croissance sur acétate (Figure IV.22B, Mounier et al., soumis, voir **Annexe 1**), suggérant que le rôle de cet appendice n'est pas indispensable pour la formation de biofilm sur HOC. Bien que les résultats de transcriptomique ne laissent présager aucune implication nette des pili de type IV lors des étapes précoces du développement du biofilm (Figure IV.22A), la répression observée dans le biofilm mature par rapport aux cellules en croissance sur acétate pourrait présager la présence d'appendices à la surface des bactéries planctoniques pour permettre une éventuelle implication dans l'adhésion et dans la détection de surface.

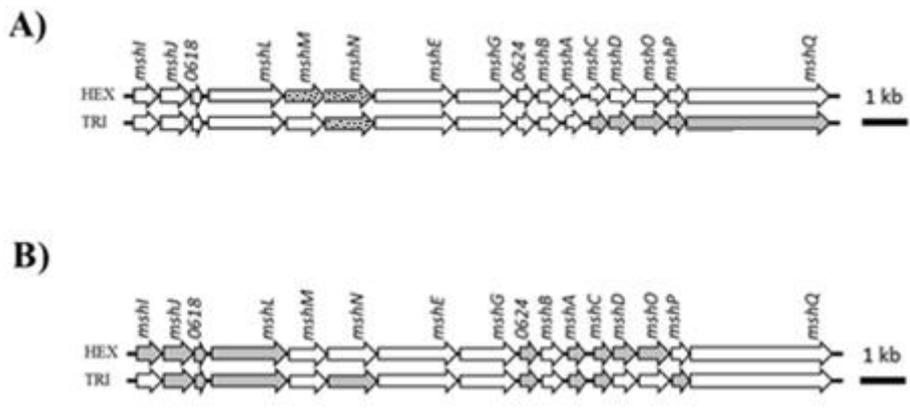


Figure IV.22 : L'expression différentielle des gènes de pili de type MSHA en condition d'adhésion (A) et de biofilm (B) sur les interfaces HOC-eau.

Les gènes surexprimés sont représentés en gris avec des pointillés ; les gènes réprimés sont représentés en gris.

Les études menées par Martin et ses collègues (1995) sur *V. cholerae* ont montré que la formation d'un pilus fonctionnel dépendait de l'expression de deux groupes de gènes : ceux impliqués dans la sécrétion et dans la structure de l'appendice. Des mutants de délétion dans les régions promotrices d'un gène de sécrétion *mshI* et d'un gène structural *mshB* abolissent l'assemblage du pilus MSHA (Martin et al., 1995). Plus récemment, Dalisay et al. (2006) ont montré par microscopie électronique à transmission que les cellules des mutants d'insertion dans le gène de sécrétion *mshJ* chez *Pseudoalteromonas tunicata* étaient non piliées contrairement à la souche sauvage. Nous avons de ce fait décidé de construire un mutant « knock-out » du gène *mshJ* (mutant AC8) impliqué dans la biogénèse du pilus dans le but d'étudier le rôle du pilus MSHA dans la formation de biofilm à l'interface HOC-eau.

Le suivi de la croissance du mutant *mshJ* à l'interface entre l'eau et la paraffine n'a mis en évidence aucune déficience dans la capacité à former un biofilm par rapport au WT (Figure IV.23). Le gène *mshJ* et de manière plus générale le pilus de type MSHA n'est pas essentiel pour la formation de biofilm. Cependant, la lecture de la bibliographie incite à

réaliser des expériences supplémentaires pour comprendre la contribution (si elle existe) du pilus MSHA dans l'adhésion aux interfaces hydrophobes et la comparer à celle du deuxième pilus de type IV présent dans le génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17. Chacun de ces deux différents appendices extracellulaires pourraient apporter une contribution spécifique dans le développement de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sous forme de biofilm. En effet, Watnick et ses collègues (1999) ont démontré que la fixation de *V. cholerae* par le pilus MSHA dépend de l'état nutritif de la surface de colonisation. Cet appendice permet l'adhésion de la bactérie responsable du choléra à des surfaces inertes non métabolisables telles que du borosilicate ou de la cellulose mais n'intervient pas dans l'adhésion à la chitine, surface nutritive utilisée par *V. cholerae* (Watnick and Kolter, 1999; Watnick et al., 1999). Ils ont également pu démontrer que contrairement au pilus de type IV appelé TCP (Toxin Co-regulated Pilus) qui est indispensable pour la colonisation des cellules intestinales, le pilus MSHA n'intervient pas dans l'adhésion à ces types de surfaces biotiques. Ainsi, les deux pili de type IV interviennent tous deux dans la formation de biofilm de *V. cholerae* mais sur des supports différents. De la même manière, une analyse de la formation de biofilm sur différents type de HOC, métabolisables ou non, serait intéressante à mener afin de vérifier si la contribution du pilus MSHA et du pili de type IV *pil* dépend de la nature du support. La validation d'une telle hypothèse serait d'un grand intérêt puisqu'elle permettrait de comprendre les stratégies que *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 met en place pour détecter la présence d'une surface, sentir sa nature nutritive pour enfin s'y adhérer.

Chez *V. parahaemolyticus* les deux pili de type IV dont le pilus MSHA contribuent de différentes manières à la formation de biofilm. (Shime-Hattori et al., 2006). Alors que le pilus MSHA permet à la bactérie de s'attacher à la surface d'une lamelle de microscope, les pili de type IV ChiRP (chitin-regulated pilus) interviennent dans l'agglutination bactérienne lors de la formation de biofilm sur ce support inerte. Des observations par microscopie confocale sur des cultures mixtes contenant les mutants du cluster pil et msha simultanément, marquées par deux protéines fluorescentes différentes, pourraient permettre d'élucider la nature de la contribution de chacun des deux pili de type IV dans la structuration du biofilm chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17.

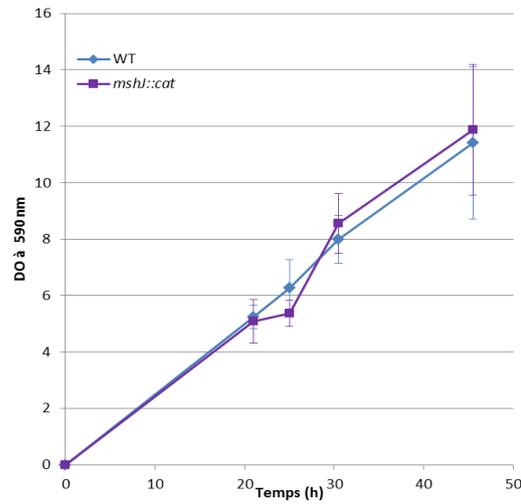


Figure IV.23 : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine des souches dérivées de *M. hydrocarbonoclasticus* JM1.

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant la paraffine solide coulée en fond de puits.

WT : souche sauvage JM1 ; *mshJ::cat* : mutant « knock-out » AC8 ($\Delta mshJ::cat$).

5. Le facteur de transcription RpoN régule potentiellement la mobilité flagelle- pili-dépendante.

Chez les bactéries, le cœur de l'ARN polymérase est très conservé et composé de deux copies de chaque sous-unité α , β , β' et ω . Il synthétise les molécules d'ARN et permet une terminaison correcte de la transcripton. Cependant, la reconnaissance des séquences promotrices ainsi que l'initiation de transcription nécessite la contribution d'un facteur sigma (σ). Toutes les espèces bactériennes possèdent des facteurs sigma dits de ménage, similaires au σ^{70} d'*E. coli* qui initient la transcription de la majorité des gènes, alors que certaines bactéries sont dépourvues de facteurs sigma dits alternatifs qui permettent la fixation de l'ARN polymérase sur des séquences promotrices particulières (Gruber and Gross, 2003). Les facteurs de transcription alternatifs contrôlent l'expression des régulons spécifiques des conditions de stress, des transitions de croissance bactérienne, de changements morphologiques et reflètent le mode de vie de la bactérie (Kill et al., 2005; Shingler, 2011). La majorité des facteurs sigma ont une séquence protéique et une structure similaire à σ^{70} . Cependant, de nombreuses bactéries ont également recours à un facteur non classique appelé σ^{54} , RpoN, ou sigma N, qui ne possède aucune homologie de séquence avec la famille σ^{70} , reconnaît des régions promotrices différentes et emploie une autre voie d'initiation de la transcription (Lee et al., 2012). Il a été initialement reconnu pour son rôle dans le métabolisme azoté. Il semble également intervenir dans la mobilité cellulaire, le métabolisme primaire (utilisation des sucres), l'assimilation de métabolites particuliers et de sources de carbone alternatives, la mise en place des systèmes de sécrétion de type III et VI (Francke et al., 2011; Lertsethtakarn et al., 2011; Leung et al., 2011; Shingler, 2011)... Il intervient aussi dans le développement du biofilm, puisqu'il a été montré qu'il intervenait dans l'adhésion à une surface et dans la synthèse de certains composés de la matrice (Francke et al., 2011; Shingler, 2011; Hao et al., 2012). Le rôle de RpoN dans l'adhésion des cellules à des surfaces a été démontré chez plusieurs espèces bactériennes comme *P. aeruginosa* qui s'attache à la mucine des cellules épithéliales (Ramphal et al., 1991, 1996; Arora et al., 1998), *Kingella kingae* lors de son adhésion aux cellules épithéliales respiratoires (Kehl-Fie et al., 2009), la bactérie pathogène *Xylella fastidiosa* qui adhère aux vaisseaux de xylèmes de nombreuses plantes (da Silva Neto et al., 2008), et *P. putida* qui colonise les surfaces de polystyrène et de verre (Duque et al., 2013). Dans de nombreuses études, ce facteur de transcription alternatif a été démontré contrôler la synthèse des pili de type IV ainsi que du flagelle. Il intervient par exemple dans l'expression des gènes qui codent pour la piline pilA, les pilines mineures ainsi

que les gènes de flagelles de classe II (composants du corps basal, des anneaux, du moteur, système d'export, la coiffe) chez *P. aeruginosa* (Strom and Lory, 1993; Mattick et al., 1996; Alm and Mattick, 1997; Arora et al., 1998; Dasgupta et al., 2003), dans la synthèse de la flagelline FliA chez *Campylobacter jejuni* (Hwang et al., 2010), dans la synthèse des pilines majeures chez *Myxococcus xanthus* et *Dichelobacter nodosus* (Wu and Kaiser, 1997; Parker et al., 2006)...

Les résultats transcriptomiques ont mis en avant le gène *rpoN*. Ce gène est d'autant plus intéressant qu'il est surexprimé dans les étapes précoces de la formation de biofilm, dès 15 min de contact avec le HOC, suggérant qu'il puisse être un régulateur de l'adhésion bactérienne aux surfaces hydrophobes.

La recherche des motifs consensus du site de fixation de *rpoN* en amont de toutes les séquences codantes du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* a révélée que 46 gènes seraient potentiellement régulés par ce facteur de transcription. Parmi ceux-ci, 36 montrent une expression altérée en transcriptomique, dont 8 sont uniquement surexprimés en condition de biofilm mature alors que 22 sont surexprimés lors des étapes précoces du développement sur les HOC (Mounier Thèse, 2013 ; Mounier et al., soumis, voir **Annexe 1**). Dix gènes de mobilité et de chimiotactisme sont surexprimés lors de l'initiation de la croissance à l'état sessile, dont 8 gènes sont impliqués dans la synthèse du flagelle et de la piline *pilA* (*MARHY2564*), suggérant que *rpoN* puisse réguler l'adhésion et la mobilité aux HOC à travers la synthèse de ces appendices.

L'effet de la mutation dans le gène *rpoN* (mutant « knock-out » AC9) dans la formation de biofilm sur les HOC a été testé sur paraffine uniquement (Figure IV.24). Aucune déficience de développement du biofilm n'a été relevée sur paraffine. Des cinétiques de développement sur d'autres types de HOC tels que la tripalmitine, le *n*-hexadécane-1-ol et l'acide palmitique seraient intéressantes à effectuer afin de déterminer si le phénotype du mutant *rpoN* agirait comme les mutants *pilQ* et *pilA*. De plus, la comparaison de l'expression du gène *pilA* (*MARHY2564*) chez JM1 et le mutant *rpoN* par RT-qPCR permettrait de vérifier si le facteur de transcription alternatif contrôle l'expression de la piline, et par conséquent la biogénèse du pilus.

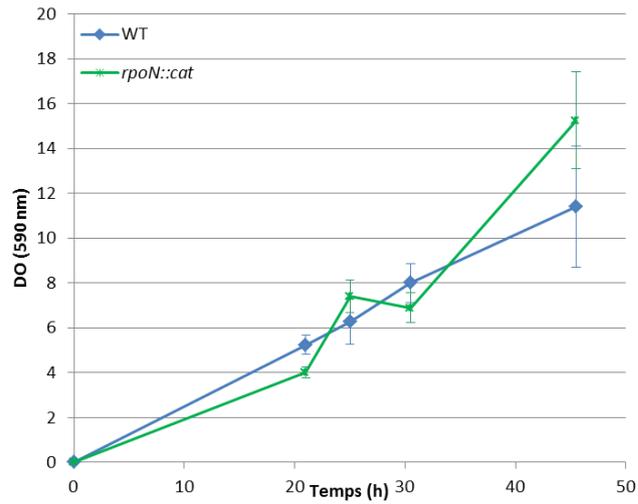


Figure IV.24 : Cinétique de croissance en biofilm sur paraffine de la souche sauvage JM1 et du mutant *rpoN*

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant la paraffine solide coulée en fond de puits.

WT : souche sauvage JM1 ; *rpoN::cat*: mutant « knock-out » AC9 ($\Delta rpoN::cat$).

CHAPITRE V

Étude sur le rôle du T6SS dans la formation de biofilm aux interfaces eau-HOC

1. Introduction

Lors de l'analyse des résultats de transcriptomique et de protéomique, une implication potentielle des T6SS dans la formation de biofilm sur HOC a pu être mise en évidence. Les T6SS sont des complexes protéiques principalement connus pour intervenir dans la virulence de souches pathogènes, dans la compétition entre cellules bactériennes et dans des interactions symbiotiques avec des organismes hôtes. La découverte de la production d'un tel système dans un biofilm mono-spécifique se développant sur des composés hydrophobes, où aucune cellule hôte n'est présente, est plutôt surprenante. C'est pourquoi, nous avons décidé d'élucider son implication à travers la caractérisation fonctionnelle d'un des gènes du cluster du T6SS, le gène *MARHY3635* (voir tableau II.4 du **Préambule**). Dans le chapitre qui suit, l'étude fonctionnelle menée sur ce gène va de ce fait être présentée.

2. Étude du rôle du système de sécrétion de type VI (T6SS) dans la formation de biofilm sur les HOC

2.1. Expression des gènes du T6SS lors de la formation de biofilm sur HOC

Les données obtenues en protéomique et en transcriptomique suggéraient que T6SS était potentiellement impliqué dans différentes étapes de la formation de biofilm sur les HOC métabolisables.

Le T6SS a été identifié en 2006 comme un nouveau système de sécrétion de protéines, bien que des études menées en 1996 sur la pathogénicité de *Vibrio cholerae* suggéraient déjà son existence (Mougous et al., 2006; Pukatzki et al., 2006). Les T6SS sont très largement distribués chez les bactéries à Gram-négatif et notamment chez les protéobactéries (Cascales and Cambillau, 2012; Zoued et al., 2014). En effet, des clusters de gènes putatifs codant pour des composants du T6SS ont été prédits dans 25 % des génomes de bactéries à Gram-négatif séquencés (Bingle et al., 2008). De nombreux génomes bactériens possèdent de 1 à 6 copies complètes des gènes de cet appareil de sécrétion, ainsi que des clusters incomplets voire des gènes isolés. Ces différents types de T6SS au sein d'une même souche pourraient avoir différentes fonctions (Leiman et al., 2009). Les T6SS sont principalement connus pour intervenir dans la virulence de souches pathogènes, dans la compétition entre cellules bactériennes et dans des interactions symbiotiques avec des organismes hôtes. Ce sont des complexes protéiques dont la structure ressemble à celle des bactériophages T et qui permettent le transport actif de protéines, à travers les membranes interne et externe bactériennes, vers une cellule cible (Schwarz, Hood, et al., 2010; Records, 2011; Cascales and Cambillau, 2012; Silverman et al., 2012). Les clusters de gènes de T6SS comprennent de 16 gènes chez *P. aeruginosa* et *Edwardsiella tarda* à plus de 38 gènes chez *Serratia marcescens* dont l'organisation sur le chromosome dépend des espèces (Zoued et al., 2014). Les expériences menées chez *E. tarda*, *V. cholerae* et *Agrobacterium tumefaciens* ont montré qu'un ensemble minimum de 13 gènes, nommé la structure cœur, était nécessaire pour assembler une structure de T6SS fonctionnelle (Zheng and Leung, 2007; Zheng et al., 2011; Zoued et al., 2014). Parmi ceux-ci, les gènes *hcp*, *vgrG*, *tssB*, *tssE* et *tssC* qui codent les composés du tube de sécrétion et de la gaine contractible, les gènes codant pour les protéines TssJ, TssL et TssM (similaires aux protéines IcmF/DotU et IcmH du système de sécrétion de type IVb) qui permettent d'encastrier cet appareil dans le périplasme et le gène *clpV* qui code l'ATPase impliquée dans le désassemblage du système (Cascales and Cambillau, 2012;

Silverman et al., 2012; Zoued et al., 2014) (Figure V.1). A partir des homologues de séquences et/ou structurales qui existent avec certains composants phagiques, il a été postulé que la contraction de la gaine (TssB/TssC) permettait d'injecter la queue (tube) (Hcp/VgrG) à travers les membranes de la cellule hôte. Le complexe VgrG-Hcp formerait un canal qui laisserait passer des protéines effectrices dans le cytosol de la cellule receveuse (Figure V.1). Certaines protéines VgrG possèdent un domaine C-terminal supplémentaire (Pukatzki et al., 2006) qui donnerait à la protéine une activité effectrice en empêchant par exemple la polymérisation de l'actine et déclenchant l'apoptose de la cellule hôte (Suarez et al., 2010).

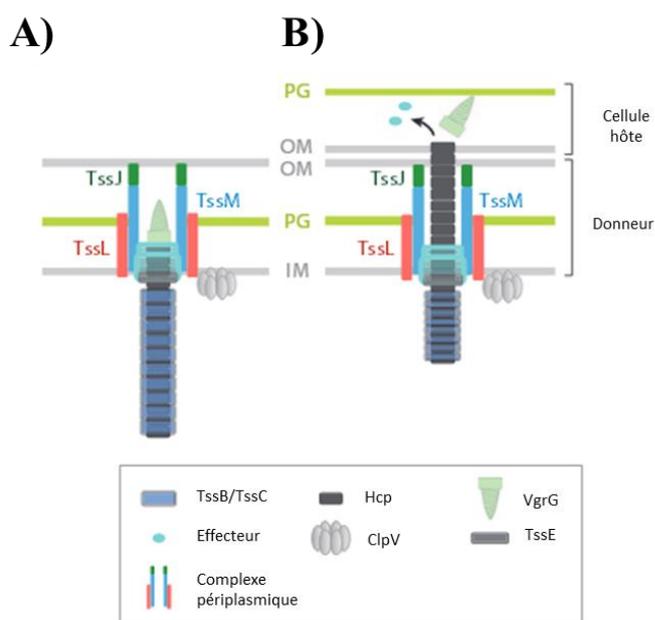


Figure V.1 : Structure (A) et activation du T6SS au contact d'une cellule hôte (Silverman et al., 2012).

L'analyse du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 révèle la présence d'un cluster de 16 gènes transcrits dans le même sens, ainsi que de trois autres gènes isolés dont les produits associés possèdent des similarités de séquences peptidiques avec des T6SS d'autres bactéries telles que *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, et *E. coli*. La figure V.2A montre la syntonie entre ce cluster et celui du T6SS caractérisé chez *V. cholerae* N16961. Des homologues de composants de T6SS qui ont été étudiés et caractérisés jusqu'à maintenant, Dot, IcmF et ClpV ont été retrouvés au sein du cluster du T6SS potentiel de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, sous le nom de MARHY3626, MARHY3621 et MARHY3625. Des similarités de séquences existent également avec les exoprotéines Hcp (MARHY0176) et Vgr (MARHY1076 et MARHY2494).



Figure V.2 : Organisation et expression des gènes de système de sécrétion de type IV.

A) Organisation des gènes codant pour le T6SS chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (en haut) et de *Vibrio cholerae* N16961 (en bas). Les valeurs entre les gènes homologues représentent les pourcentages d'identités des séquences peptidiques des protéines associées.

B) Représentation des gènes du T6SS différentiellement exprimés lors de la formation de biofilm sur HOC. Données obtenues par des études de transcriptomique et de protéomique. Les gènes surexprimés dans une condition donnée sont représentés en gris. Les gènes dont la surexpression a été montrée par protéomique sont marqués par un astérisque (*).

HEX : hexadécane ; TRI : Trioléine ; Adhésion : défini les étapes initiales de la formation du biofilm à savoir après 15 min et 3 h de contact.

Les données transcriptomiques ont révélé que la majorité des gènes du cluster de T6SS sont surexprimés seulement lors des étapes précoces de la formation de biofilm sur trioléine, et que 3 de ces 16 gènes sont surexprimés en condition de biofilm mature sur *n*-hexadécane (*MARHY3635*, *MARHY3634* et *MARHY0176*). De plus, *MARHY3635* et *MARHY3634* font partie des protéines les plus surproduites observées en protéomique, représentant approximativement 0.75 % et 0.2 % des protéines totales du biofilm mature sur *n*-hexadécane.

Le taux d'expression du gène *MARHY3635* a été évalué par RT-qPCR en condition de biofilm se développant sur *n*-hexadécane et sur un triglycéride, la trioléine. Ce gène est surexprimé dans les cellules de biofilm mature de 22 h, par rapport à la condition de référence sur acétate (Figure V.3), avec une expression différente selon le substrat considéré. En condition de biofilm sur *n*-hexadécane, la surexpression est de 8.8 fois contre 5.4 fois en condition de croissance sur trioléine. Cette surexpression en condition biofilm sur *n*-

hexadécane est cohérente avec les résultats obtenus lors de l'analyse protéomique réalisée par Vaysse et al. (2009) où une surproduction de la protéine MARHY3635 a été observée (Vaysse et al., 2009). Il serait intéressant d'étudier le profil d'expression du gène d'intérêt à différents stades du développement de biofilm, afin d'estimer le rôle potentiel de ce gène dans la cinétique de formation du biofilm, et de vérifier si les valeurs obtenues dans les étapes précoces concordent avec les valeurs obtenues par transcriptomique.

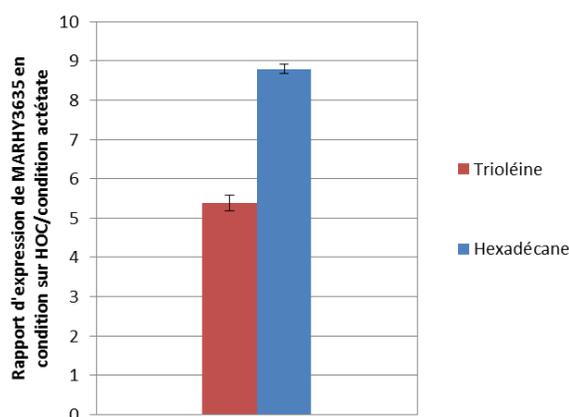


Figure V.3 : Rapport d'expression du gène *MARHY3635* chez JM1 en condition biofilm sur *n*-hexadécane et trioléine.

L'expression du gène *MARHY3635* a été analysée sur des cellules de JM1 en condition biofilm mature de 22 h. La RT a été réalisée en deux exemplaires pour les ARNm extraits de chaque triplicat de culture de JM1 en croissance en biofilm. Pour chaque ADNc obtenu, deux mesures ont été réalisées par PCRq. Les rapports d'expression ont été calculés selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$ en utilisant l'expression du gène de l'ARN 16S comme contrôle endogène et l'expression du gène de *MARHY3635* en condition acétate comme référence. Les erreurs standards sont présentées.

2.2. Le T6SS et la formation de biofilm sur HOC

Pour mener à bien l'étude fonctionnelle sur le T6SS lors du développement du biofilm sur les HOC, le mutant « knock-out » du gène *MARHY3635* a été construit par la stratégie d'échange allélique (mutant AC11). Après avoir vérifié que le mutant obtenu n'est pas affecté dans la croissance sur substrats solubles (non montré), des cinétiques de formation de biofilm ont été menées sur la paraffine, le *n*-hexadécane-1-ol, l'acide palmitique ou encore la tripalmitine (Figure V.4). Alors que la mutation de ce gène du T6SS n'affecte pas le développement du biofilm sur les composés gras testés, elle entraîne un retard de la formation du biofilm sur paraffine.

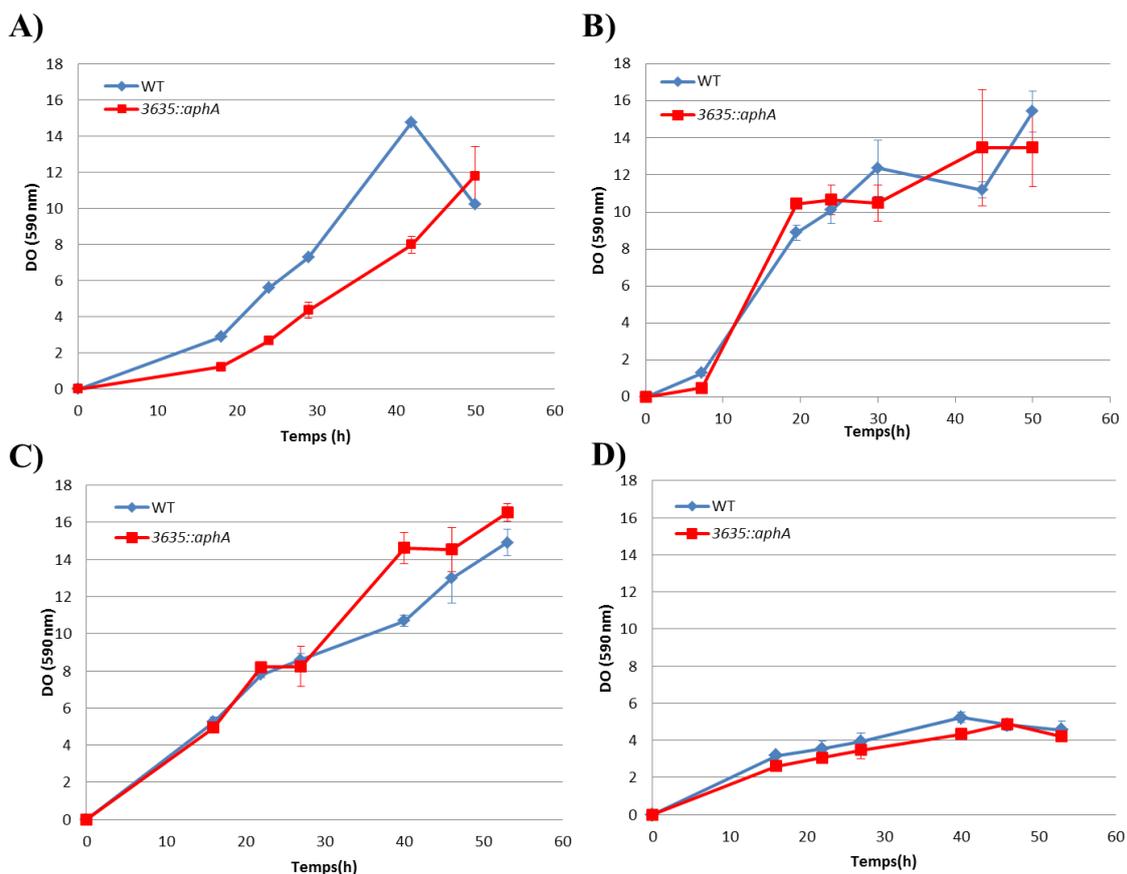


Figure V.4 : Cinétique de croissance en biofilm sur différents HOC.

A) Paraffine. B) Tripalmitine. C) Acide palmitique. D) *n*-hexadécane-1-ol.

La formation de biofilm a été suivie et quantifiée par coloration au cristal violet sur des microplaques contenant le HOC solide coulé en fond de puits.

WT : souche sauvage JM1 ; *3635::aphA* : mutant « knock-out » AC11 (*ΔMARHY3635::aphA*).

Ces résultats soulèvent la question du rôle du T6SS lors de la croissance de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sur *n*-alcanes. En effet, jusqu'à maintenant, les T6SS sont connus pour être impliqués dans des interactions bactérie-bactérie ou bactérie-eucaryote. Deux hypothèses peuvent être postulées quant à l'implication potentielle de ce système protéique :

- Plusieurs souches du genre *Marinobacter* ont été trouvées en association étroite avec de nombreuses espèces de micro-algues. Lors d'une étude visant à isoler des bactéries dégradant le *n*-hexadécane associées à diverses algues marines (diatomées, dinoflagellées et coccolithophores) des souches de *Marinobacter* sp. ont été retrouvées associées à 85 % des dinoflagellées et 87% des coccolithophores étudiées. Par ailleurs, de nombreuses souches phylogénétiquement proches de l'espèce *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ont été isolés de différents types de dinoflagellés, tels que *Alexandrium fundyense* (Rooney et Varga, unpublished), *Alexandrium tamarense* (Hold et al., 2001) et de coccolithophores tel que

Emiliana huxleyi. De même, une étude visant à isoler des bactéries associées à diverses microalgues marines et capables d'utiliser les alcanes a également mis en évidence la prépondérance de souches affiliées aux genres *Marinobacter* et *Alcanivorax* dans des cultures de dinoflagellés *Gimnodinium catenatum* (Green et al., 2004). Les données génomiques de *Marinobacter algicola* DG893 ainsi que d'autres bactéries associées aux algues montrent la présence des systèmes de sécrétion confortant l'idée que ces bactéries interagissent avec les algues (Worden et al., 2006). De nombreuses espèces de microalgues sont connues pour synthétiser et accumuler des hydrocarbures (alcanes et alcènes principalement), des stérols, acides gras, et des lipides (Raja et al., 2008; Matsunaga et al., 2009; Qin, 2010). La présence de HOC, en plus de constituer une source de carbone pour les bactéries, pourrait être perçue par les cellules bactériennes comme un signal indiquant la présence d'un hôte et induire la synthèse des systèmes de sécrétion impliqué dans l'interaction biotique entre les deux organismes.

-Il a été démontré récemment que les T6SS intervenaient dans les interactions entre cellules bactériennes (Hood et al., 2010; Jani and Cotter, 2010; Schwarz, Hood, et al., 2010; Kapitein and Mogk, 2013; Tashiro et al., 2013). Ces systèmes de sécrétion permettent à une espèce bactérienne d'entrer en compétition avec d'autres pour coloniser une même niche écologique. L'un des 5 T6SS présents dans le génome de *Burkholderia thailandensis* est impliqué dans l'interaction avec d'autres protéobactéries (Schwarz, West, et al., 2010). Contrairement à la souche sauvage qui arrive à former un biofilm mixte avec *Pseudomonas putida*, le mutant dépourvu de ce T6SS ne survit pas. Chez *P. aeruginosa*, ce système permet d'injecter des toxines comme le Tss2 à l'intérieur d'autres bactéries à Gram-négatif telles que *E. coli* ou *P. putida* pour inhiber leur croissance (Hood et al., 2010; Tashiro et al., 2013). Dans son habitat naturel, *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 est en interaction avec plusieurs espèces bactériennes qui peuvent également être capables de dégrader les HOC. Les apports en nutriments étant rares dans les écosystèmes marins, il est tout à fait probable que les cellules de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 rentrent en compétition avec d'autres cellules bactériennes pour pouvoir accéder à cette nourriture. La présence de nutriments hydrophobes déclencherait la synthèse du T6SS pour permettre aux cellules de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 de rentrer en compétition avec d'autres bactéries vis-à-vis des HOC.

2.3. Étude sur l'interaction potentielle entre JM1 et des microalgues

Pour vérifier si la présence de HOC mime la présence d'une cellule hôte eucaryote précédant une interaction, la première étape a été de déterminer si le contact avec, ou la proximité de microalgues affectent l'expression des gènes du T6SS (Figure V.5).

La proximité d'une cellule algale a été simulée en mettant JM1 en contact pendant 1 heure avec des substances provenant d'algues: le filtrat d'une culture d'*Alexandrium catenella*, un extrait cellulaire d'*A. catenella* obtenue par broyage des cellules algales ou encore du glycolate. Le glycolate (HOCH₂COOH) a été inclus dans cette étude car il est généré et excrété abondamment lors de la photorespiration par les organismes photosynthétiques. Il est estimé que le glycolate représente 10 à 50 % des DOC (Dissolved Organic Compounds) excrétés par le phytoplancton (Lau and Armbrust, 2006). De plus l'annotation du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 a révélé la présence de l'opéron complet de dégradation du glycolate suggérant que cette bactérie serait capable de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie. L'incubation en présence d'un broyat d'*E. coli* a été réalisé comme contrôle non-algale. L'expression du gène *MARHY3635* par RT-PCRq a été analysée en prenant l'incubation sur acétate comme référence.

Les données obtenues et présentées dans la Figure V.5 suggèrent qu'une inhibition de l'expression du gène *MARHY3635* existe en présence des différents composés dérivés d'algues alors que l'extrait d'*E. coli* n'induit pas de variation de l'expression. Il semblerait donc que les substances algales exercent une répression de l'expression des gènes de T6SS. Cependant, les erreurs standards témoignent d'une variabilité importante des résultats obtenus. Une conclusion ferme ne pourra être établie qu'avec un nombre de réplicats plus important.

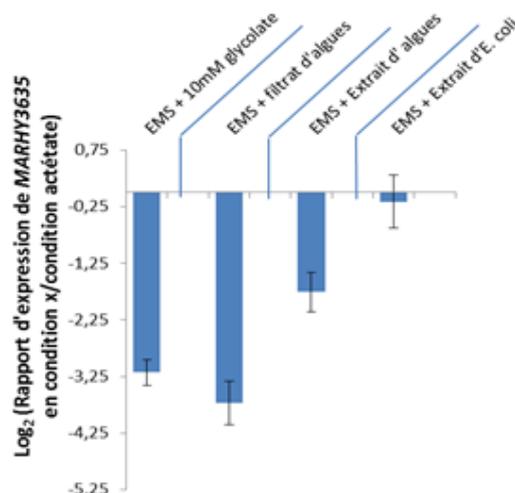


Figure V.5 : Rapport d'expression du gène *MARHY3635* chez JM1 au contact avec du glycolate, de l'extrait et du surnageant d'*Alexandrium catenella*. L'expression du gène *MARHY3635* a été analysée sur des cultures de JM1 mises au contact avec différents dérivés du dinoflagellé *Alexandrium catenella* et un extrait d'*E. coli*. La RT a été réalisée en un seul exemplaire pour les ARNm extraits de chaque duplicat de culture sur glycolate, extrait d'algue et extrait d'*E. coli*. Pour chaque ADNc obtenu, deux mesures ont été réalisées par PCRq. Les rapports d'expression ont été calculés selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en utilisant l'expression du gène de l'ARN 16S comme contrôle endogène et l'expression du gène de *MARHY3635* en condition acétate comme référence. Les erreurs standards sont présentées.

Nous avons voulu par ailleurs déterminer si *M. hydrocarbonclasticus* SP17 était capable d'interagir avec des microalgues grâce à la mise en place du T6SS. Il s'agissait dans un premier temps d'explorer la capacité de la souche bactérienne à s'associer à différentes espèces de micro-algues. Grâce à une collaboration avec l'équipe de Matthias Ulrich de l'université de Brême (Allemagne), des expériences d'attachement à une diatomée, *Thalassiosira weissflogii*, ont pu être lancées en modifiant le protocole de Gardes et al. (2011) (Gardes et al., 2011). 5×10^3 cellules par mL de *Thalassiosira weissflogii* en phase stationnaire de croissance ont été mises en coculture avec 1×10^6 par mL de cellules de JM1 dans du milieu f/2 à température ambiante et à l'obscurité. Après 48 h d'incubation, les cultures mixtes ont été filtrées par gravité à travers un tamis de 10 μ m de porosité, pour séparer les bactéries attachées aux cellules de diatomées des bactéries planctoniques. Les bactéries contenues dans chacune des deux fractions ont été énumérées par comptage sur milieu agar en utilisant la méthode de dilution et étalement. La figure V.6 représente le pourcentage de bactéries attachées aux microalgues par rapport à celles qui sont restées planctoniques. JM1 s'associe deux fois moins que la souche *M. adhaerens* HP15, précédemment caractérisée pour sa capacité à s'attacher aux cellules de *T. weissflogii*. La quantité de cellules de JM1 qui s'associent aux cellules microalgales est équivalente aux

mutants de deux gènes de flagelle dérivés de *M. adhaerens* HP15, HP15-*AfliC* et HP15-*fliG::Tn5*, construits au laboratoire de Matthias Ulrich (Sonnenschein et al., 2011) et considérés comme déficients dans le phénomène d'interaction avec la diatomée. Deux hypothèses peuvent être formulées quant au résultat obtenu :

- Comme abordé dans la section 2 du **Chapitre IV**, JM1 possède des mutations dans de nombreux gènes codant pour des composants du flagelle, et est flagellée mais non mobile. Etant donné que JM1 s'associe autant que les mutants des gènes du flagelle dérivés de la souche *M. adhaerens* HP15, il est envisageable que les mutations dans les gènes de la biogénèse du flagelle empêchent une interaction adéquate entre JM1 et *T. weissflogii*. En l'absence d'une interaction étroite algue-bactérie, l'implication du T6SS serait dans ce cas là difficile à mettre en évidence.

- De nombreuses études menées par différents laboratoires sur la compréhension des interactions qui se mettent en place entre les microalgues et les bactéries, ont montré que la phycosphère créée par l'algue constitue une niche écologique favorable pour la croissance d'espèces bactériennes spécifiques (Schäfer et al., 2002; Riquelme and Avendano-Herrera, 2003; Grossart et al., 2005; Jasti et al., 2005; Sapp et al., 2007). Il a été mis en avant que la structure de la communauté bactérienne adhérente dépend non seulement de l'espèce d'algue considérée, de sa croissance mais également de son état physiologique. La structuration spécifique de la communauté bactérienne dite « satellite » qui s'établit au sein de la phycosphère est supposée être modelée par la sécrétion algale de métabolites antibactériens qui inhibent la croissance de certaines espèces bactériennes (Desbois et al., 2008) et/ou par la nature des exsudats sécrétés par l'algue elle-même (Sapp et al., 2007; Sarmiento and Gasol, 2012). Bien que *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 soit phylogénétiquement proche de *M. adhaerens* HP15, il est possible qu'elle ne soit pas spécifique de *T. weissflogii*. Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le HOC serait perçu par la bactérie comme un signal de la présence d'une cellule hôte lors de la formation de biofilm, il est tout d'abord indispensable d'explorer si une éventuelle interaction existe avec au moins une espèce d'algue. Si une association existe, l'implication du T6SS pourra ensuite être évaluée.

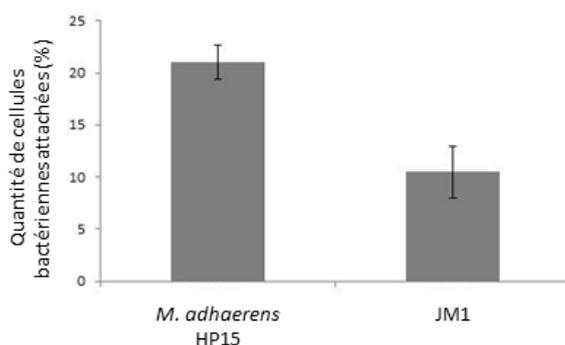


Figure V.6 : Pourcentage de cellules de *M. adhaerens* HP15 et de JM1 attachées aux cellules de *T. weissflogii* en phase stationnaire de croissance.

2.4. Étude sur la compétition entre JM1 et *Alcanivorax borkumensis* SK2 vis-à-vis du *n*-hexadécane

La présence de HOC, en plus de constituer une source de nourriture pour les bactéries hydrocarbonoclastes, pourrait être perçue par la cellule bactérienne comme un signal d'alerte déclenchant toute une cascade de systèmes de défense contre les bactéries compétitives d'une même niche écologique. La synthèse de T6SS pourrait être l'un des mécanismes mis en place par la bactérie pour tuer ses proies et prendre avantage.

Alcanivorax borkumensis SK2 qui fait partie du groupe des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) est capable de dégrader des alcanes linéaires et ramifiés. Elle est présente en faible quantité dans les eaux marines non polluées par les hydrocarbures et devient rapidement prédominante lors d'un déversement massif d'hydrocarbures. Elle peut faire partie de l'une des espèces bactériennes avec qui *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 rentre en compétition pour accéder aux sources de carbone et d'énergie hydrophobes.

Pour tester si une compétition entre *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 et *A. borkumensis* SK2 vis-à-vis d'un même substrat hydrophobe a lieu, et si elle fait intervenir le T6SS, des expériences de compétition ont été menées dans du milieu EMS supplémenté d'éléments traces (se référer à la section 1.2.1. du **Chapitre II** pour connaître la composition) et de 0.2 % de *n*-hexadécane. Des cultures mixtes de JM1 et *A. borkumensis* SK2 Rif^R (souche d'*A. borkumensis* spontanément résistante à la rifampicine, se référer à la section 1.2.2 du **Chapitre II**) ainsi que Δ MARHY3635 et *A. borkumensis* SK2 Rif^R ont été réalisées en ajoutant différents ratios de chacune des deux souches : 1, 1/10, et 1/100. Après 26 h d'incubation, le nombre de cellules de JM1, *A. borkumensis* SK2 Rif^R et Δ MARHY3635 contenu dans chacune des conditions a été déterminé par comptage du nombre de colonies obtenues après dilution et étalement dans les milieux EMS agar contenant l'antibiotique

nécessaire. Le dénombrement des cellules n'a relevé aucune différence significative entre le mutant *ΔMARHY3635* et JM1 qui rendrait compte d'une implication potentielle du T6SS dans l'interaction bactérie-bactérie.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Les études antérieures menées au laboratoire ont montré que la croissance de la souche modèle *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sur des HOC métabolisables conduit à la formation de biofilm à l'interface eau-HOC, ce qui favorise l'assimilation de ces composés faiblement solubles dans l'eau. La croissance en biofilm est contrôlée par la présence d'une interface hydrophobe nutritive ce qui implique que ce mode de vie est soumis à des mécanismes de reconnaissance spécifique de l'interface en lien avec les capacités métaboliques de la bactérie (Klein et al., 2008, 2010). Le développement de biofilms sur HOC implique donc la mise en œuvre de particularités fonctionnelles et structurales qui les distinguent des autres biofilms. L'analyse protéomique sur des cellules de biofilms (Vaysse et al., 2009), qui a été récemment complétée par une étude transcriptomique des cellules lors des différentes étapes du développement de ces biofilms (Mounier et al., soumis, **Annexe 1**) montrent qu'un grand nombre de fonctions cellulaires sont mises en jeu. Certaines sont connues et partagées par d'autres types de biofilm, comme l'adhésion et la mobilité dépendantes du flagelle et des pili de type IV. Cependant, les fonctions associées à un certain nombre de protéines fortement surexprimées en condition de biofilm restent encore inconnues. C'est notamment des fonctions où la protéine MARHY2686 est impliquée.

Les technologies «omiques» ont pu mettre en exergue une longue liste de gènes potentiellement impliqués dans la formation de biofilm sur HOC. Dix de ces gènes dont l'expression et l'analyse bioinformatique suggérait une implication dans la détection de l'interface, l'adhésion à celle-ci et l'assimilation des HOC au travers la formation de biofilm, ont été classés prioritaires pour une première étude fonctionnelle. En s'appuyant sur des outils génétiques mis au point ou développés lors de ma thèse et sur une caractérisation fonctionnelle propre à chaque gène, ces travaux ont permis d'entamer la recherche sur les mécanismes moléculaires sous-jacents aux fonctionnements singuliers des biofilms se développant sur des interfaces hydrophobes et nutritives.

Grâce à la disponibilité du génome de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 et aux techniques « omiques », une approche de génétique inverse par mutagenèse dirigée, qui consiste à muter des gènes candidats pour étudier par la suite leur phénotype, a été adoptée lors de mes travaux de recherche. Bien que la mise en place d'outils génétiques ait été un

facteur limitant lors de mon travail, elle était indispensable pour pouvoir manipuler génétiquement la souche et étudier les aspects moléculaires impliqués dans la formation de biofilm. Un protocole de conjugaison permettant de transférer le vecteur suicide pKAS32 ou ses dérivés pour inactiver les gènes cibles par remplacement allélique a été mis au point. Afin de rendre l'étape de sélection de transconjugants plus aisée, le pKAS32 a été amélioré pour donner le pKOMKm. La présence de sites multiple de clonage de part et d'autre de la cassette kanamycine, permet également de cloner les régions flanquantes du gène cible à muter. Cependant, cet outil de mutagenèse dirigée s'est avéré limitant lorsqu'il s'est agi de muter les premiers gènes d'un opéron, puisque leur mutation par échange d'allèle avait une incidence sur la transcription ou la traduction des gènes en aval. C'est pourquoi un autre plasmide suicide dérivé du pKOMKm a été développé, le pKOMCat, pour limiter la probabilité d'entraîner une mutation à effet polaire en perturbant la transcription/traduction du ou des gène(s) situé(s) en aval. La cassette chloramphénicol (cat), ne contenant pas de terminateur transcriptionnel, a été insérée de sorte à pouvoir cloner la région flanquante 3' du gène à muter directement après le codon STOP du gène de résistance à l'antibiotique. Toutefois, la fiabilité de ce plasmide pour la construction des mutants « knock-out » simples, sans perturber l'expression du gène en aval, n'a pas encore été vérifiée. La construction de mutants par délétion en phase est une autre technique qui permet d'éviter tout phénomène de mutation à effet polaire lorsque le gène cible fait partie d'un opéron. Cette technique a pu être mise au point et l'absence de mutation polaire a pu être vérifiée. Elle apparaît être une méthode fiable à entreprendre pour les futures constructions de mutants des gènes cibles, faisant partie d'un opéron ou pas. La manipulation de vecteurs d'expression est un outil moléculaire qui n'a pas encore été mis au point chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17. Le plasmide pBBR1 reste à ce jour un bon candidat, car il se maintient chez cette souche modèle. La complémentation génique ainsi que l'expression des gènes fluorescents par le promoteur P_{A1/04/03}, ont montré que ce dernier pouvait être utilisé pour exprimer un gène d'intérêt dans le vecteur d'expression. Ce promoteur constitutif porté par le vecteur répliatif pBBR1 pourra par exemple permettre d'effectuer de la complémentation fonctionnelle, de marquer la bactérie par une protéine fluorescente ou d'exprimer un gène rapporteur fluorescent dans un fond génétique sauvage. Enfin, pour contrôler l'expression d'un gène, les promoteurs inductibles tels que ceux dérivés de l'opéron lactose, ou la séquence promotrice de l'opéron de l'arabinose pBAD, doivent être testés chez *M. hydrocarbonoclasticus*.

Parallèlement à mes travaux menés par mutagenèse dirigée, une autre technique de génétique inverse, à savoir la mutagenèse aléatoire par transposition du miniTn5, a été mise au point par Habiba Ennouri, une étudiante en thèse au sein de notre laboratoire pour répondre aux mêmes questionnements. Bien que cette méthode requière un criblage fastidieux de milliers de clones, elle permet de sélectionner directement des mutants impliqués dans le phénotype considéré. En effet, sur 4 000 clones testés, 24 souches sont affectées dans la formation de biofilm sur différents HOC. L'identification des gènes impliqués dans la formation de biofilm par mutagenèse dirigée à partir des gènes ciblés par des stratégies « omiques » est techniquement plus facile à réaliser, mais reste tout de même discutable. Son inconvénient majeur est que la surexpression d'un gène dans une condition donnée et l'annotation de la protéine ne garantissent pas de trouver un phénotype intéressant chez le mutant. C'est notamment le cas des gènes de flagelle dont les données transcriptomiques suggéraient qu'ils étaient indispensables pour la formation de biofilm mais dont les mutants ne présentent aucune déficience de formation de biofilm. C'est également le cas du gène *MARHY2686* qui est surexprimé en condition de croissance sur trioléine, un triglycéride, mais dont le mutant n'a présenté aucune déficience de croissance sur des composés de même type, comme la tripalmitine. De plus, aucun des 10 mutants construits ne présente une diminution drastique de la formation de biofilm sur les HOC. Etant donné que le fonctionnement du biofilm se base sur l'intervention d'un réseau complexe de gènes, il est probable que plusieurs groupes de gènes oeuvrent pour une même fonction cellulaire. Cette redondance fonctionnelle expliquerait pourquoi la mutation d'un gène intervenant dans un processus cellulaire n'ait pas de répercussion drastique sur la formation de biofilm. Dans ce contexte-là, une mutation de plusieurs gènes au sein d'un même clone pourrait être envisagée pour s'assurer de l'importance de ces gènes pour le développement du biofilm sur les HOC.

La mutation du gène *MARHY2686* n'entraîne aucun défaut de croissance sur des composés appartenant aux classes des acides gras, des alcools gras et des triglycérides. Bien qu'elle affecte la croissance sur les *n*-alcanes, l'architecture générale du biofilm n'est pour ainsi dire pas modifiée, puisque les cellules mutantes arrivent tout de même à former des microcolonies. Le gène *MARHY2686* ne semblerait pas relever du processus de développement sous forme de biofilm à proprement parler.

Le gène *MARHY2686* et les gènes adjacents *MARHY2685* et *MARHY2687* sont co-exprimés dès 15 min de contact et sur les HOC nutritifs spécifiquement, suggérant leur

implication dans la même fonction biologique. En analysant la distribution phylogénétique des homologues de ces trois protéines, les gènes associés ont été retrouvés dans le génome des mêmes espèces bactériennes. De plus, dans la plupart des cas la syntonie est conservée, renforçant l'idée que ces trois gènes sont impliqués dans le même processus biologique. L'identité forte, de 36 %, qui existe entre la protéine MARHY2686 et une protéine périplasmique AdeT d'un système de pompe d'efflux tripartite d'*Acinetobacter baumannii* (Srinivasan et al., 2011) suggère que cette protéine, en association avec MARHY2687 et MARHY2685, puisse faire partie d'un système de ce type. En transposant l'éventail de rôles physiologiques pour lesquels les pompes d'efflux ont été répertoriées, à notre étude, trois hypothèses ont pu être formulées pour la fonction de MARHY2686 dans la formation de biofilm sur les *n*-alcanes : elle agirait comme un système de résistance contre une accumulation intracellulaire excessive en *n*-alcanes exogènes, ou en métabolites toxiques tels que les acides gras, ou bien dans l'excrétion des facteurs importants pour la formation de biofilm. Pour le moment, seule l'hypothèse de l'efflux des produits de dégradation n'a pas encore été rejetée. Pour tester si l'accumulation de produits de dégradation des alcanes, tels que les acides gras, peut inhiber la croissance en perturbant l'intégrité de la membrane cytoplasmique, une expérience de viabilité cellulaire qui se base sur la double coloration au Syto 9 et à l'iodure de propidium sera optimisée, et les cellules mutantes et sauvages viables seront dénombrées par comptage au microscope à épifluorescence. Pour aller plus loin, en se basant sur le principe de pulse/chase, via un apport en *n*-hexadécane radioactif pendant une période donnée suivie d'une étape de lavage pour se débarrasser de toute trace de radioactivité exogène, la quantification de composés radioactifs sécrétés par les cellules sauvages et mutantes pourraient permettre de mettre en évidence le rôle de cette protéine dans un éventuel efflux de produits de dégradation des *n*-alcanes.

L'implication de ce gène dans l'accumulation des réserves lipidiques intracellulaires ainsi que dans l'assimilation des *n*-alcanes a été envisagée pour expliquer la déficience dans la croissance sur les *n*-alcanes. Toutefois, ces deux hypothèses peuvent être liées, car il a été démontré que l'assimilation des HOC donnait lieu à une accumulation d'inclusions cytoplasmiques lipidiques (Klein et al., 2008; Grimaud, 2010b). Des expériences seraient intéressantes à mettre en place pour tester indépendamment les deux hypothèses. La quantification au cours du temps des cires intra-cytoplasmiques contenues dans les cellules par chromatographie par rapport à la biomasse totale estimée par dosage protéique, permettrait de comparer la cinétique de production de ses réserves chez la souche sauvage et

la souche mutée. Le rôle de MARHY2686 dans l'assimilation des *n*-alcanes pourra être élucidé en testant l'assimilation du *n*-hexadécane radioactif en quantifiant au cours du temps la radioactivité incorporée dans la cellule.

Il est intéressant de noter que les trois hypothèses proposées quant aux rôles potentiels accomplis par MARHY2686, concordent avec le fait que l'expression de ce gène et par conséquent son activité biologique soit spécifique d'une réponse à une surface nutritive.

Pour aller plus loin dans la caractérisation fonctionnelle, il serait intéressant de vérifier si MARHY2686 agit en association avec les protéines MARHY2687 et MARHY2685. La localisation cellulaire de chacune des trois protéines par fractionnement cellulaire et détection par immunotransfert permettraient dans un premier temps de vérifier si elles sont situées dans la paroi bactérienne, comme suggéré par les analyses *in silico*. D'autre part, la recherche d'une interaction physique entre les protéines via des expériences de « cross-link » et d'immunoprécipitation permettrait de vérifier si elles forment un complexe.

La distribution phylogénétique des gènes homologues à MARHY2686, MARHY2685 et MARHY2687 dans les génomes séquencés a permis de révéler la co-occurrence de ces gènes uniquement chez les bactéries caractérisées pour utiliser certains HOC comme source de carbone et d'énergie et/ou chez celles qui possèdent au moins un des gènes de dégradation des alcanes, *alkB*. Une étude plus approfondie dans les métagénomomes pourrait permettre d'avoir une vision plus large de la répartition des homologues en fonction du type d'écosystème, pollué par des apports d'hydrocarbures ou autre polluants, afin de percevoir si un lien existe entre ces gènes et la capacité des bactéries à survivre à de tels écosystèmes.

Le profil d'expression des gènes de pili lors des analyses transcriptomiques a révélé la surexpression de nombre d'entre eux dans les étapes précoces de formation du biofilm sur des HOC alors qu'ils sont réprimés en condition de biofilm mature, suggérant un rôle des pili de type IV dans l'adhésion aux interfaces eau-HOC. Le rôle de ces appendices protéiques a déjà été répertorié dans la formation de nombreux types de biofilms et ne semble donc pas être une caractéristique des biofilms se développant sur des interfaces eau-HOC. Cependant, nous avons voulu élucider la nature exacte de l'implication des pili de type IV dans la formation de ce type de biofilm.

La caractérisation fonctionnelle des mutants *pilA*, *pilQ* et *pilH* indique que *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 utilise les pili de type IV pour une grande variété de fonctions biologiques : le twitching sur agar mou, l'adhésion à des HOC tels que la

paraffine et la tripalmitine, et potentiellement dans un phénomène de détachement. La présence d'une mobilité de type twitching sur les HOC n'a pas encore été démontrée, bien que les phénotypes des amas cellulaires observés lors des expériences d'adhésion laissent sous-entendre son existence. En s'inspirant des travaux menés par l'équipe de Tolker-Nielsen (Klausen et al., 2003b), des expériences de croissance de biofilm sur paraffine seront lancées en mélangeant les souches sauvages et une souche de mutant pili, chacune marquée par une protéine fluorescente différente. Le mouvement bactérien en suivant à la trace la trajectoire d'une cellule cible par microscopie à épifluorescence, et la répartition des deux souches bactériennes dans un biofilm mature pourront permettre d'estimer l'importance des pili de type IV dans la structuration du biofilm.

De manière étonnante, les mutants *pilA* et *pilQ* sont affectés dans la capacité à adhérer à une interface hydrophobe, alors qu'ils forment autant (sur paraffine) voire plus (sur des composés gras) de biofilm que la souche sauvage. Bien que ces deux phénotypes semblent contradictoires, ce phénomène peut s'expliquer grâce à l'implication des pili de type IV dans dans le phénomène de détachement. Les pili pourraient, soit intervenir directement pour permettre à la bactérie de se détacher de la surface à laquelle elle s'est adhéree comme observé par Conrad et ses collègues (Conrad et al., 2011; Conrad, 2012), soit indirectement par l'action de bactériophages. La surexpression des gènes appartenant à un bactériophage filamentueux lors de la formation du biofilm sur trioléine (triglycéride) a permis d'envisager fortement l'implication de ce prophage dans ce processus. Des expériences supplémentaires pour vérifier si la lyse cellulaire par l'induction d'un bactériophage précéderait le détachement des cellules sont envisagées. Elles consisteront dans un premier temps à observer si une lyse cellulaire apparaît dans un biofilm mature prêt à se démanteler, grâce à l'expérience de viabilité cellulaire par la double coloration Syto9/PI. De plus, la construction d'un mutant dépourvu de bactériophage, permettrait d'analyser si le phénomène de détachement est également aboli.

Cependant, étant donné que les phénotypes des mutants observés n'ont pas pu être vérifié par complémentation fonctionnelle, les hypothèses formulées dans cette présentation quant au rôle biologique des pili de type IV doivent être maniées avec précaution. De plus une étape supplémentaire qui consiste à vérifier la présence ou l'absence des pili à la surface cellulaire de tous les mutants des gènes de pili construits est indispensable afin de conclure de l'implication précise de ces structures protéiques dans le processus testé. Des travaux en microscopie électronique à balayage en collaboration avec l'équipe B2HM, TGUMR 1319

Micalis INRA/AgroParisTech, partenaire du projet ANR Blanc AD'HOC, pour chaque mutant des gènes de pili obtenus (*pilA*, *pilQ*, *pilH* et *pilV*) sont actuellement en cours afin de déterminer si les mutants sont piliés ou pas.

Le rôle du T6SS, système connu jusqu'à maintenant pour être impliqué dans l'interaction entre bactérie-bactérie ou bactérie-cellule eucaryote, lors de la formation de biofilm mono-spécifique sur HOC, où aucun autre microorganisme que *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 n'est présent, n'a pas encore été éclairci. Etant donné que chez plusieurs espèces bactériennes les T6SS interviennent dans les interactions eucaryote-bactérie et que le genre *Marinobacter* a souvent été retrouvé parmi les bactéries associées aux microalgues, le HOC pourrait être perçu par la bactérie comme un signal indiquant la présence d'une cellule hôte. L'existence d'une éventuelle interaction entre *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 et *Thalassiosira weissflogii* a été testée sans succès. Cependant, étant donné qu'il existe une spécificité dans les associations bactérie-microalgue, avant d'analyser l'implication du T6SS, il faudrait élargir le spectre des espèces de cellules hôtes à tester pour arriver à trouver celle qui est spécifique à *M. hydrocarbonoclasticus* SP17. Par ailleurs, des tests de compétition vis-à-vis d'un même substrat hydrophobe, avec une autre HCB, *Alcanivorax borkumensis*, pour vérifier si le T6SS est produit par la souche modèle comme un système de défense contre d'autres espèces bactériennes n'ont pas non plus été concluants.

Les travaux menés sur *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 comme modèle d'étude, ont permis d'élargir les connaissances sur le fonctionnement des biofilms qui se forment aux interfaces eau-HOC. Toutefois, le rôle biologique de certains gènes n'a pas été caractérisé jusqu'au bout.

Toutes les analyses ont été menées sur un biofilm mono-spécifique cultivé dans les conditions optimales de croissance en laboratoire. Il faut garder à l'esprit que ces biofilms ne reflètent certainement pas le comportement que *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 adopte dans la colonisation d'interfaces hydrophobes dans un environnement naturel. En effet, la majorité des HOC retrouvés dans les écosystèmes marins sont associés à des particules organiques ou minérales et non sous la forme d'une nappe pure et homogène. Néanmoins, la présence dans son génome de nombreux gènes caractéristiques du mode de vie en biofilm qui ont dû être maintenus lors de multiples pressions de sélection, amène à penser que cette souche est également capable de former un biofilm dans son milieu naturel. Ainsi, il est tout à fait

envisageable que le changement du mode de vie de la bactérie déclenché par la présence d'une source de carbone hydrophobe lors de la culture en laboratoire de cette souche témoigne en partie de ce qui se passe dans son habitat naturel lorsqu'elle rencontre une source de carbone de ce type. *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, probablement en association avec d'autres espèces bactériennes, pourrait former un biofilm pour métaboliser les HOC. Dans ce contexte-là, certains comportements de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 observés et qui restent à ce jour inexplicés lors de la culture en biofilm mono-spécifique en laboratoire auraient certainement une explication dans les biofilms multi-espèces qu'elle formerait avec d'autres microorganismes sur des surfaces de son habitat naturel.

Dans des environnements où les sources de carbone et d'énergie sont rares et inégalement réparties à l'échelle microscopique et surtout présentes sous forme de particules non directement accessibles, la formation de biofilm permet à certaines espèces d'accéder à ces substrats. Bien que le mode de vie en biofilm est coûteux en termes de synthèses de macromolécules et de régulation de l'expression génique, la possibilité d'assimiler des substrats non-solubilisés et à fort potentiel énergétique peut être un puissant moteur de l'évolution du biofilm. Dans ce contexte, l'avantage sélectif conféré pourrait conduire à une évolution des biofilms dans de nombreuses lignées bactériennes et expliquer en partie l'omniprésence du biofilm dans de nombreux écosystèmes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- Abbasnezhad, H., Gray, M., and Foght, J.M. (2011) Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 653–675.
- Aires, J.R. and Nikaido, H. (2005) Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**: 1923–1929.
- Aires, J.R., Pechere, J.C., Van Delden, C., and Kohler, T. (2002) Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2169–2173.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., et al. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**: 1114–1128.
- Alm, R.A. and Mattick, J.S. (1997) Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **192**: 89–98.
- Amin, S.A., Green, D.H., Hart, M.C., Kuepper, F.C., Sunda, W.G., and Carrano, C.J. (2009) Photolysis of iron-siderophore chelates promotes bacterial-algal mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 17071–17076.
- An, Y.H. and Friedman, R.J. (1998) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **43**: 338–348.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., and Ramphal, R. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**: 1000–1007.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., Castro, E. de, et al. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* **40**: W597–W603.
- Azam, F. and Malfatti, F. (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 782–791.

B

- Baldi, F., Ivošević, N., Minacci, A., Pepi, M., Fani, R., Svetličić, V., and Zutić, V. (1999) Adhesion of *Acinetobacter venetianus* to Diesel Fuel Droplets Studied with In Situ Electrochemical and Molecular Probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2041–2048.
- Bandara, A.B., DeShazer, D., Inzana, T.J., Sriranganathan, N., Schurig, G.G., and Boyle, S.M. (2008) A disruption of *ctpA* encoding carboxy-terminal protease attenuates *Burkholderia mallei* and induces partial protection in CD1 mice. *Microb. Pathog.* **45**: 207–216.
- Baugh, S., Ekanayaka, A.S., Piddock, L.J.V., and Webber, M.A. (2012) Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**: 2409–2417.

- Van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M., and Witholt, B. (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.-Rev. Ifp Energ. Nouv.* **58**: 427–440.
- Van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., and Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* **147**: 1621–1630.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorf, K., and Zehnder, A.J.B. (1993) Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3973–3977.
- Benner, R., Pakulski, J., Mccarthy, M., Hedges, J., and Hatcher, P. (1992) Bulk Chemical Characteristics of Dissolved Organic-Matter in the Ocean. *Science* **255**: 1561–1564.
- Van den Berg, B. (2005) The FadL family: unusual transporters for unusual substrates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 401–407.
- Berngruber, T.W., Weissing, F.J., and Gandon, S. (2010) Inhibition of Superinfection and the Evolution of Viral Latency. *J. Virol.* **84**: 10200–10208.
- Bertrand, J.J., West, J.T., and Engel, J.N. (2010) Genetic Analysis of the Regulation of Type IV Pilus Function by the Chp Chemosensory System of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**: 994–1010.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y., Murray, W.J., Tobe, T., Fernandez, R., and Schoolnik, G.K. (1998) Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**: 2114–2118.
- Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 3–8.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513–1523.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U.K., Hentschel, P., Thumm, G., and Götz, F. (2006) Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**: 260–268.
- Bocard, C. (2006) Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures: enjeux environnementaux et traitement des pollutions Editions TECHNIP.
- Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T.R., Wecke, J., Lawrence, J.R., and Szewzyk, U. (2006) Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* **262**: 31–38.
- Bodour, A.A., Drees, K.P., and Maier, R.M. (2003) Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3280–3287.
- Bogan, B.W., Sullivan, W.R., Kayser, K.J., Derr, K.D., Aldrich, H.C., and Paterek, J.R. (2003) *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1389–1395.
- Boles, B.R., Thoendel, M., and Singh, P.K. (2005) Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.* **57**: 1210–1223.
- Boll, M. and Heider, J. (2010) Anaerobic Degradation of Hydrocarbons: Mechanisms of C–H-Bond Activation in the Absence of Oxygen. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1011–1024.
- Bouchez Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., and Vandecasteele, J.P. (1999) Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 421–428.

- Bouchez-Naïtali, M., Blanchet, D., Bardin, V., and Vandecasteele, J.-P. (2001) Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology* **147**: 2537–2543.
- Bradley, D. (1972) Evidence for Retraction of *Pseudomonas-Aeruginosa* Rna Phage Pili. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**: 142–&.
- Burrows, L.L. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 493–520.

C

- Campbell, J.W., Morgan-Kiss, R.M., and E. Cronan, J. (2003) A new *Escherichia coli* metabolic competency: growth on fatty acids by a novel anaerobic β -oxidation pathway. *Mol. Microbiol.* **47**: 793–805.
- Campos, J., Martínez, E., Suzarte, E., Rodríguez, B.L., Marrero, K., Silva, Y., et al. (2003) VGJ ϕ , a Novel Filamentous Phage of *Vibrio cholerae*, Integrates into the Same Chromosomal Site as CTX ϕ . *J. Bacteriol.* **185**: 5685–5696.
- Carrolo, M., Frias, M.J., Pinto, F.R., Melo-Cristino, J., and Ramirez, M. (2010) Prophage Spontaneous Activation Promotes DNA Release Enhancing Biofilm Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Plos One* **5**: e15678.
- Cascales, E. and Cambillau, C. (2012) Structural biology of type VI secretion systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**: 1102–1111.
- Chagnot, C., Zorgani, M.A., Astruc, T., and Desvaux, M. (2013) Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Microb. Physiol. Metab.* **4**: 303.
- Chakraborty, R. and Coates, J.D. (2004) Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 437–446.
- Chang, A. and Cohen, S. (1978) Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy Dna Cloning Vehicles Derived from P15a Cryptic Miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**: 1141–1156.
- Chen, Q., Janssen, D., and Witholt, B. (1995a) Growth on Octane Alters the Membrane Lipid Fatty-Acids of *Pseudomonas-Oleovorans* Due to the Induction of Alkb and Synthesis of Octanol. *J. Bacteriol.* **177**: 6894–6901.
- Chen, Q., Nijenhuis, A., Preusting, H., Dolfing, J., Janssen, D., and Witholt, B. (1995b) Effects of Octane on the Fatty-Acid Composition and Transition-Temperature of *Pseudomonas-Oleovorans* Membrane-Lipids During Growth in 2-Liquid-Phase Continuous Cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 647–652.
- Chevance, F.F.V. and Hughes, K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 455–465.
- Chiavelli, D.A., Marsh, J.W., and Taylor, R.K. (2001) The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3220–3225.
- Chin, W.C., Orellana, M.V., and Verdugo, P. (1998) Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* **391**: 568–572.
- Choi, J.W., Choi, H.G., and Lee, W.H. (1996) Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *J. Biotechnol.* **45**: 217–225.
- Choi, K.H. and Schweizer, H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: Example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* **1**: 153–161.

- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 2172–2175.
- Conrad, J.C. (2012) Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Res. Microbiol.* **163**: 619–629.
- Conrad, J.C., Gibiansky, M.L., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., et al. (2011) Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophys. J.* **100**: 1608–1616.
- Craig, L. and Li, J. (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**: 267–277.
- Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren, M.J., and Smith, A.G. (2005) Algae acquire vitamin B-12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438**: 90–93.
- Cunliffe, M., Engel, A., Frka, S., Gašparović, B., Guitart, C., Murrell, J.C., et al. (2013) Sea surface microlayers: A unified physicochemical and biological perspective of the air–ocean interface. *Prog. Oceanogr.* **109**: 104–116.

D

- Dale, J.W. and Park, S.F. (2010) *Molecular Genetics of Bacteria* John Wiley & Sons.
- Dalisay, D.S., Webb, J.S., Scheffel, A., Svenson, C., James, S., Holmström, C., et al. (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.
- Darty, K., Denise, A., and Ponty, Y. (2009) VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics* **25**: 1974–1975.
- Darzins, A. (1993) The Pilg Gene-Product, Required for *Pseudomonas-Aeruginosa* Pilus Production and Twitching Motility, Is Homologous to the Enteric, Single-Domain Response Regulator CheY. *J. Bacteriol.* **175**: 5934–5944.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **50**: 809–824.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 759–765.
- DeLange, P.A., Collins, T.L., Pierce, G.E., and Robinson, J.B. (2007) PilJ localizes to cell poles and is required for type IV pilus extension in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* **55**: 389–395.
- Desbois, A.P., Lebl, T., Yan, L., and Smith, V.J. (2008) Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 755–764.
- Déziel, E., Comeau, Y., and Villemur, R. (2001) 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. Bacteriol.* **183**: 1195–1204.
- DiRusso, C., Oncetta C., Black, P. and N., and Weimar, J. and Ames D. (1999) Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog. Lipid Res.* **38**: 129–197.

- Donlan, R.M. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881–890.
- Druffel, E.R.M. and Bauer, J.E. (2000) Radiocarbon distributions in Southern Ocean dissolved and particulate organic matter. *Geophys. Res. Lett.* **27**: 1495–1498.
- Duque, E., de la Torre, J., Bernal, P., Molina-Henares, M.A., Alaminos, M., Espinosa-Urgel, M., et al. (2013) Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* **15**: 36–48.
- Duran, R. (2010) Marinobacter. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1725–1735.

E

- Elkins, C.A. and Nikaido, H. (2002) Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominately by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.* **184**: 6490–6498.
- Engelmann, T. (1883) Bakterium photometricum. Ein Beitrag zur vergleichenden Physiologie des Licht- und farbensinnes. *Pfluegers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* **30**: 95–124.

F

- Fenchel, T. (2002) Microbial Behavior in a Heterogeneous World. *Science* **296**: 1068–1071.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., and Falkowski, P. (1998) Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* **281**: 237–240.
- Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 623–633.
- Forward, J.A., Behrendt, M.C., Wyborn, N.R., Cross, R., and Kelly, D.J. (1997) TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**: 5482–5493.
- Francke, C., Kormelink, T.G., Hagemeyer, Y., Overmars, L., Sluijter, V., Moezelaar, R., and Siezen, R.J. (2011) Comparative analyses imply that the enigmatic sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior. *Bmc Genomics* **12**: 385.
- Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., Doi, S., and Hata, Y. (1991) Distribution of Bacteria Influential on the Development and the Decay of *Gymnodinium-Nagasakiense* Red Tide and Their Effects on Algal Growth. *Nippon Suisan Gakkaishi* **57**: 2321–2326.

G

- Gardes, A., Iversen, M.H., Grossart, H.-P., Passow, U., and Ullrich, M.S. (2011) Diatom-associated bacteria are required for aggregation of *Thalassiosira weissflogii*. *ISME J.* **5**: 436–445.
- Gärdes, A., Kaoppel, E., Shehzad, A., Seebah, S., Teeling, H., Yarza, P., et al. (2010) Complete genome sequence of *Marinobacter adhaerens* type strain (HP15), a diatom-interacting marine microorganism. *Stand. Genomic Sci.* **3**: 97–107.

- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., and Bertrand, J.C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 568–576.
- Gevers, D., Vandepoele, K., Simillon, C., and Van de Peer, Y. (2004) Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol.* **12**: 148–154.
- Gibiansky, M.L., Conrad, J.C., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., et al. (2010) Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. *Science* **330**: 197.
- Giltner, C.L., Habash, M., and Burrows, L.L. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* Minor Pilins Are Incorporated into Type IV Pili. *J. Mol. Biol.* **398**: 444–461.
- Giltner, C.L., Nguyen, Y., and Burrows, L.L. (2012) Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 740–772.
- Giltner, C.L., van Schaik, E.J., Audette, G.F., Kao, D., Hodges, R.S., Hassett, D.J., and Irvin, R.T. (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol. Microbiol.* **59**: 1083–1096.
- Gödeke, J., Paul, K., Lassak, J., and Thormann, K.M. (2011) Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME J.* **5**: 613–626.
- Gogarten, J.P., Doolittle, W.F., and Lawrence, J.G. (2002) Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2226–2238.
- Golyshin, P.N., Dos Santos, V., Kaiser, O., Ferrer, M., Sabirova, Y.S., Lunsdorf, H., et al. (2003) Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *J. Biotechnol.* **106**: 215–220.
- Green, D.H., Llewellyn, L.E., Negri, A.P., Blackburn, S.I., and Bolch, C.J.S. (2004) Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**: 345–357.
- Griffith, D.R., McNichol, A.P., Xu, L., McLaughlin, F.A., Macdonald, R.W., Brown, K.A., and Eglinton, T.I. (2012) Carbon dynamics in the western Arctic Ocean: insights from full-depth carbon isotope profiles of DIC, DOC, and POC. *Biogeosciences* **9**: 1217–1224.
- Grimaud, R. (2010a) Biofilm Development at Interfaces between Hydrophobic Organic Compounds and Water. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1491–1499.
- Grimaud, R. (2010b) *Marinobacter*. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1289–1296.
- Grimaud, R., Ghiglione, J.-F., Cagnon, C., Lauga, B., Vaysse, P.-J., Rodriguez-Blanco, A., et al. (2012) Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *J. Bacteriol.* **194**: 3539–3540.
- Grossart, H.-P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005) Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environ. Microbiol.* **7**: 860–873.
- Grossart, H.-P., Schlingloff, A., Bernhard, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2004) Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**: 387–396.

- Gruber, T.M. and Gross, C.A. (2003) Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 441–466.
- Guschina, I.A. and Harwood, J.L. (2009) Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. In, Kainz, M., Brett, M.T., and Arts, M.T. (eds), *Lipids in Aquatic Ecosystems*. Springer New York, pp. 1–24.
- Guttenplan, S.B. and Kearns, D.B. (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 849–871.

H

- Hahn, M.W. (2009) Distinguishing Among Evolutionary Models for the Maintenance of Gene Duplicates. *J. Hered.* **100**: 605–617.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95–108.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**: 7–10.
- Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. (2002) Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 228–233.
- Hanahan, D. (1983) Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.
- Hao, B., Mo, Z.-L., Xiao, P., Pan, H.-J., Lan, X., and Li, G.-Y. (2012) Role of alternative sigma factor 54 (RpoN) from *Vibrio anguillarum* M3 in protease secretion, exopolysaccharide production, biofilm formation, and virulence.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K. (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 63–70.
- Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* **169**: 1–15.
- Harms, H., Smith, K.E.C., and Wick, L.Y. (2010a) Introduction: Problems of Hydrophobicity/Bioavailability. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1437–1450.
- Harms, H., Smith, K.E.C., and Wick, L.Y. (2010b) Microorganism-Hydrophobic Compound Interactions. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1479–1490.
- Head, I.M., Jones, D.M., and Röling, W.F.M. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 173–182.
- Hearn, E.M., Patel, D.R., and Berg, B. van den (2008) Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 8601–8606.
- Heipieper, H., Diefenbach, R., and Keweloh, H. (1992) Conversion of Cis Unsaturated Fatty Acids to Trans, a Possible Mechanism for the Protection of Phenol-Degrading *Pseudomonas-Putida* P8 from Substrate Toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1847–1852.
- Heipieper, H.J., Cornelissen, S., and Pepi, M. (2010a) Surface Properties and Cellular Energetics of Bacteria in Response to the Presence of Hydrocarbons. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1615–1624.
- Heipieper, H.J., Fischer, J., and Meinhardt, F. (2010b) Cis–Trans Isomerase of Unsaturated Fatty Acids: An Immediate Bacterial Adaptive Mechanism to Cope with Emerging Membrane Perturbation Caused by Toxic Hydrocarbons. In, Timmis, K.N. (ed),

- Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1605–1614.
- Heipieper, H.J. and Martínez, P.M. (2010) Toxicity of Hydrocarbons to Microorganisms. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1563–1573.
- Heipieper, H., Keweloh, H., and Rehm, H. (1991) Influence of Phenols on Growth and Membrane-Permeability of Free and Immobilized *Escherichia-Coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1213–1217.
- Heipieper, H., Loffeld, B., Keweloh, H., and Debont, J. (1995) The Cis/Trans Isomerization of Unsaturated Fatty-Acids in *Pseudomonas-Putida* S12 - an Indicator for Environmental-Stress Due to Organic-Compounds. *Chemosphere* **30**: 1041–1051.
- Heipieper, H., Weber, F., Sikkema, J., Keweloh, H., and Debont, J. (1994) Mechanisms of Resistance of Whole Cells to Toxic Organic-Solvents. *Trends Biotechnol.* **12**: 409–415.
- Heras, B., Shouldice, S.R., Totsika, M., Scanlon, M.J., Schembri, M.A., and Martin, J.L. (2009) DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 215–225.
- Hinchliffe, P., Symmons, M.F., Hughes, C., and Koronakis, V. (2013) Structure and Operation of Bacterial Tripartite Pumps. In, Gottesman, S. (ed), *Annual Review of Microbiology, Vol 67*. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 221–242.
- Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., and O’Toole, G.A. (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* **49**: 905–918.
- Hofacker, I.L., Fontana, W., Stadler, P.F., Bonhoeffer, L.S., Tacker, M., and Schuster, P. (1994) Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatshefte Für Chem. Chem. Mon.* **125**: 167–188.
- Hold, G.L., Smith, E.A., Rappé, M.S., Maas, E.W., Moore, E.R., Stroempl, C., et al. (2001) Characterisation of bacterial communities associated with toxic and non-toxic dinoflagellates: *Alexandrium* spp. and *Scrippsiella trochoidea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **37**: 161–173.
- Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., Guvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R.S., et al. (2010) A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host Microbe* **7**: 25–37.
- Hori, K. and Matsumoto, S. (2010) Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochem. Eng. J.* **48**: 424–434.
- Huu, N.B., Denner, E.B.M., Ha, D.T.C., Wanner, G., and Stan-Lotter, H. (1999) *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 367–375.
- Hwang, J.-K., Chae, M.J., Kim, J.W., Ku, B.K., and Lee, Y.J. (2010) Role of Flagella-Related rPoN and fliA Genes in *Campylobacter jejuni*. *J. Anim. Vet. Adv.* **9**: 3034–3038.

I

- Ishii, S., Unno, H., Miyata, S., and Hori, K. (2006) Effect of Cell Appendages on the Adhesion Properties of a Highly Adhesive Bacterium, *Acinetobacter* sp. Tol 5. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 2635–2640.

J

- Jani, A.J. and Cotter, P.A. (2010) Type VI Secretion: Not Just for Pathogenesis Anymore. *Cell Host Microbe* **8**: 2–6.
- Jarrell, K.F. and McBride, M.J. (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 466–476.
- Jarvis, G.N. and Moore, E.R.B. (2010) Lipid Metabolism and the Rumen Microbial Ecosystem. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 2245–2257.
- Jasti, S., Sieracki, M.E., Poulton, N.J., Giewat, M.W., and Rooney-Varga, J.N. (2005) Phylogenetic Diversity and Specificity of Bacteria Closely Associated with *Alexandrium* spp. and Other Phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3483–3494.
- Johnsen, A.R. and Karlson, U. (2004) Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 452–459.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., and Harms, H. (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* **133**: 71–84.
- Julsing, M.K., Schrewe, M., Cornelissen, S., Hermann, I., Schmid, A., and Bühler, B. (2012) Outer membrane protein alkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5724–5733.
- Jung, J., Noh, J., and Park, W. (2011) Physiological and metabolic responses for hexadecane degradation in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *J. Microbiol.* **49**: 208–215.

K

- Kapitein, N. and Mogk, A. (2013) Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**: 52–58.
- Karatan, E. and Watnick, P. (2009) Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**: 310–347.
- Karlsson, F. (2004) The biology of filamentous phage infection - implications for display technology.
- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 634–644.
- Kehl-Fie, T.E., Porsch, E.A., Miller, S.E., and StGeme, J.W. (2009) Expression of *Kingella kingae* Type IV Pili Is Regulated by σ_{54} , PilS, and PilR. *J. Bacteriol.* **191**: 4976–4986.
- Kepkay, P.E. (2000) Colloids and the ocean carbon cycle. *Mar. Chem.* **5**: 35–56.
- Keppler, F., Hamilton, J.T.G., Brass, M., and Rockmann, T. (2006) Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* **439**: 187–191.
- Keyhani, N.O. and Roseman, S. (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1473**: 108–122.
- Kill, K., Binnewies, T.T., Sicheritz-Ponten, T., Willenbrock, H., Hallin, P.F., Wassenaar, T.M., and Ussery, D.W. (2005) Genome update: sigma factors in 240 bacterial genomes. *Microbiol.-Sgm* **151**: 3147–3150.

- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003a) Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **50**: 61–68.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003b) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* **48**: 1511–1524.
- Klein, B., Bouriat, P., Goulas, P., and Grimaud, R. (2010) Behavior of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 cells during initiation of biofilm formation at the alkane–water interface. *Biotechnol. Bioeng.* **105**: 461–468.
- Klein, B., Grossi, V., Bouriat, P., Goulas, P., and Grimaud, R. (2008) Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane–water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Res. Microbiol.* **159**: 137–144.
- Kobayashi, K., Tsukagoshi, N., and Aono, R. (2001) Suppression of Hypersensitivity of *Escherichia coli* *acrB* Mutant to Organic Solvents by Integrational Activation of the *acrEF* Operon with the IS1 or IS2 Element. *J. Bacteriol.* **183**: 2646–2653.
- Kondrashov, F.A. (2012) Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* rspb20121108.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J. (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **3**: a010306.
- Köster, W. and Leeuwen, H.P. van (2004) Physicochemical Kinetics and Transport at the Biointerface: Setting the Stage. In, Leeuwen, H.P. van and Köster, W. (eds), *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–14.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven Hill, D., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175–176.
- Krell, T., Čadýrcý, B., Segura, A., García, V., Daniels, C., and Ramos, J.-L. (2010) Extrusion Pumps for Hydrocarbons: An Efficient Evolutionary Strategy to Confer Resistance to Hydrocarbons. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1585–1593.
- Krell, T., Lacal, J., Reyes-Darias, J.A., Jimenez-Sanchez, C., Sungthong, R., and Ortega-Calvo, J.J. (2013) Bioavailability of pollutants and chemotaxis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**: 451–456.
- Kuchma, S.L. and O’Toole, G.A. (2000) Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 429–433.
- Kumar, A. and Schweizer, H.P. (2005) Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**: 1486–1513.
- Kvist, M., Hancock, V., and Klemm, P. (2008) Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 7376–7382.

L

- Ladygina, N., Dedyukhina, E.G., and Vainshtein, M.B. (2006) A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochem.* **41**: 1001–1014.
- Lagendijk, E.L., Validov, S., Lamers, G.E.M., de Weert, S., and Bloemberg, G.V. (2010) Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in

- vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *Fems Microbiol. Lett.* **305**: 81–90.
- Lamers, R.P., Cavallari, J.F., and Burrows, L.L. (2013) The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PA β N) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE* **8**:
- Lattuati, A., Metzger, P., Acquaviva, M., Bertrand, J.-C., and Largeau, C. (2002) n-Alkane degradation by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain SP 17: long chain β -hydroxy acids as indicators of bacterial activity. *Org. Geochem.* **33**: 37–45.
- Lauro, F.M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T.J., Egan, S., Rice, S., et al. (2009) The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 15527–15533.
- Lautrop, H. (1961) *Bacterium anitratum* transferred to the genus *Cytophaga*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* **11**: 107–108.
- Law, A.M.J. and Aitken, M.D. (2003) Bacterial chemotaxis to naphthalene desorbing from a nonaqueous liquid. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5968–5973.
- Lee, C., Murray, D.W., Barber, R.T., Buesseler, K.O., Dymond, J., Hedges, J.I., et al. (1998) Particulate organic carbon fluxes: compilation of results from the 1995. *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* **45**: 2489–2501.
- Lee, D.J., Minchin, S.D., and Busby, S.J.W. (2012) Activating Transcription in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 125–152.
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Lory, S. (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**: 1474–1484.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., et al. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 4154–4159.
- Lejeune, P. (2003) Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trends Microbiol.* **11**: 179–184.
- Lennen, R.M., Kruziki, M.A., Kumar, K., Zinkel, R.A., Burnum, K.E., Lipton, M.S., et al. (2011) Membrane Stresses Induced by Overproduction of Free Fatty Acids in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 8114–8128.
- Lennen, R.M., Politz, M.G., Kruziki, M.A., and Pflieger, B.F. (2013) Identification of Transport Proteins Involved in Free Fatty Acid Efflux in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **195**: 135–144.
- Lertsethtakarn, P., Ottemann, K.M., and Hendrixson, D.R. (2011) Motility and Chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**: 389–410.
- Leung, K.Y., Siame, B.A., Snowball, H., and Mok, Y.-K. (2011) Type VI secretion regulation: crosstalk and intracellular communication. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 9–15.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* **25**: 402–408.
- Li, X.Z. and Nikaido, H. (2004) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**: 159–204.
- Li, X.-Z. and Nikaido, H. (2009) Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria An Update. *Drugs* **69**: 1555–1623.
- Lux, R. and Shi, W. (2004) Chemotaxis-guided Movements in Bacteria. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **15**: 207–220.

M

- Magnus, M., Pawlowski, M., and Bujnicki, J.M. (2012) MetaLocGramN: A meta-predictor of protein subcellular localization for Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1824**: 1425–1433.
- Maier, R.M. (2003) Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. In, *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 101–121.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5414–5420.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., et al. (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* **39**: D225–229.
- Marsh, J.W. and Taylor, R.K. (1999) Genetic and Transcriptional Analyses of the *Vibrio cholerae* Mannose-Sensitive Hemagglutinin Type 4 Pilus Gene Locus. *J. Bacteriol.* **181**: 1110–1117.
- Martinez, J.L., Sanchez, M.B., Martinez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., and Alvarez-Ortega, C. (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *Fems Microbiol. Rev.* **33**: 430–449.
- Marx, R.B. and Aitken, M.D. (2000) Bacterial chemotaxis enhances naphthalene degradation in a heterogeneous aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 3379–3383.
- Matsunaga, T., Matsumoto, M., Maeda, Y., Sugiyama, H., Sato, R., and Tanaka, T. (2009) Characterization of marine microalga, *Scenedesmus* sp. strain JPCG GA0024 toward biofuel production. *Biotechnol. Lett.* **31**: 1367–1372.
- Mattick, J.S., Whitchurch, C.B., and Alm, R.A. (1996) The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Gene* **179**: 147–155.
- McBride, M.J. (2001) BACTERIAL GLIDING MOTILITY: Multiple Mechanisms for Cell Movement over Surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 49–75.
- McCaskill, J.S. (1990) The equilibrium partition function and base pair binding probabilities for RNA secondary structure. *Biopolymers* **29**: 1105–1119.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., and Kjelleberg, S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 39–50.
- McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., and Sanni, G.O. (2012) Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.* **8**:
- McInerney, M.J., Hoehler, T., Gunsalus, R.P., and Schink, B. (2010) Introduction to Microbial Hydrocarbon Production: Bioenergetics. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 319–335.
- McLoon, A.L., Guttenplan, S.B., Kearns, D.B., Kolter, R., and Losick, R. (2011) Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *J. Bacteriol.* **193**: 2027–2034.
- Middelburg, J.J., Vlug, T., Jaco, F., and Van Der Nat, W.A. (1993) Organic matter mineralization in marine systems. *Glob. Planet. Change* **8**: 47–58.
- Mohanty, S. and Mukherji, S. (2013) Surfactant aided biodegradation of NAPLs by *Burkholderia multivorans*: Comparison between Triton X-100 and rhamnolipid JBR-515. *Colloids Surf. B-Biointerfaces* **102**: 644–652.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., et al. (2006) A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science* **312**: 1526–1530.

- Mounier, J. (2013) Caractérisation fonctionnelle de gènes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors du développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes. *Thèse Dr.*
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., and Labuzek, S. (2004) Cytoplasmatic bacterial membrane responses to environmental perturbations. *Pol. J. Environ. Stud.* **13**: 487–494.
- Mulligan, C., Fischer, M., and Thomas, G.H. (2011) Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 68–86.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**: 263–273.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006) Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**: 173–179.
- Murakami, S. and Yamaguchi, A. (2003) Multidrug-exporting secondary transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 443–452.
- Murillo, J. (1994) Characterization of pPT23B, the plasmid involved in syringolide production by *Pseudomonas syringae* pv. tomato PT23. *Plasmid* **31**: 275–287.
- Myklestad, S. (1995) Release of Extracellular Products by Phytoplankton with Special Emphasis. *Sci. Total Environ.* **165**: 155–164.

N

- Narita, S.-I., Matsuyama, S.-I., and Tokuda, H. (2004) Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **182**: 1–6.
- Nebbio, A. and Piccolo, A. (2013) Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**: 109–124.
- Neu, T.R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**: 151–+.
- Nie, Y., Chi, C.-Q., Fang, H., Liang, J.-L., Lu, S.-L., Lai, G.-L., et al. (2014) Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Sci. Rep.* **4**:
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 593–+.
- Nikaido, H. (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 516–523.
- Notomista, E., Pennacchio, F., Cafaro, V., Smaldone, G., Izzo, V., Troncone, L., et al. (2011) The Marine Isolate *Novosphingobium* sp PP1Y Shows Specific Adaptation to Use the Aromatic Fraction of Fuels as the Sole Carbon and Energy Source. *Microb. Ecol.* **61**: 582–594.

O

- Ogawa, H. and Ogura, N. (1992) Comparison of 2 Methods for Measuring Dissolved Organic-Carbon in Sea-Water. *Nature* **356**: 696–698.
- Ogawa, H. and Tanoue, E. (2003) Dissolved organic matter in oceanic waters. *J. Oceanogr.* **59**: 129–147.
- Olivera, N.L., Nievas, M.L., Lozada, M., del Prado, G., Dionisi, H.M., and Sineriz, F. (2009) Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains:

hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. *Res. Microbiol.* **160**: 19–26.

- Opsahl, S. and Benner, R. (1997) Distribution and cycling of terrigenous dissolved organic matter in the ocean. *Nature* **386**: 480–482.
- Ortiz-Martín, I., Macho, A.P., Lambersten, L., Ramos, C., and Beuzón, C.R. (2006) Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria. *J. Microbiol. Methods* **67**: 395–407.
- Osterreicher-Ravid, D., Ron, E.Z., and Rosenberg, E. (2000) Horizontal transfer of an exopolymer complex from one bacterial species to another. *Environ. Microbiol.* **2**: 366–372.
- O’Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**: 295–304.

P

- Paixoa, J.F., Nascimento, I.A., Pereira, S.A., Leite, M.B.L., Carvalho, G.C., Silveira, J.S.C., et al. (2007) Estimating the gasoline components and formulations toxicity to microalgae (*Tetraselmis chuii*) and oyster (*Crassostrea rhizophorae*) embryos: An approach to minimize environmental pollution risk. *Environ. Res.* **103**: 365–374.
- Pandey, G. and Jain, R.K. (2002) Bacterial Chemotaxis toward Environmental Pollutants: Role in Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5789–5795.
- Parales, R.E. and Ditty, J.L. (2010) Chemotaxis. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1529–1543.
- Parales, R.E., Ditty, J.L., and Harwood, C.S. (2000) Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4098–4104.
- Parales, R.E. and Harwood, C.S. (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 266–273.
- Parker, D., Kennan, R.M., Myers, G.S., Paulsen, I.T., Songer, J.G., and Rood, J.I. (2006) Regulation of type IV fimbrial biogenesis in *Dichelobacter nodosus*. *J. Bacteriol.* **188**: 4801–4811.
- Patrick, J.E. and Kearns, D.B. (2009) Laboratory Strains of *Bacillus subtilis* Do Not Exhibit Swarming Motility. *J. Bacteriol.* **191**: 7129–7133.
- Pauwels, K., Van Molle, I., Tommassen, J., and Van Gelder, P. (2007) Chaperoning Anfinsen: the steric foldases. *Mol. Microbiol.* **64**: 917–922.
- Pellicic, V. (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol. Microbiol.* **68**: 827–837.
- Perfumo, A., Smyth, T.J.P., Marchant, R., and Banat, I.M. (2010) Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1501–1512.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**: 785–786.
- Petrova, O.E. and Sauer, K. (2012) Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *J. Bacteriol.* **194**: 2413–2425.
- Pfeffer, W. (1884) Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. *Untersuchungen Aus Dem Bot. Inst. Tüb.* **1**: 363–482.

- Pomeroy, L., leB. Williams, P., Azam, F., and Hobbie, J. (2007) The Microbial Loop. *Oceanography* **20**: 28–33.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H., and Armitage, J.P. (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 153–165.
- Pos, K.M. (2009) Trinity revealed: Stoichiometric complex assembly of a bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 6893–6894.
- Prince, R.C., Lessard, R.R., and Clark, J.R. (2003) Bioremediation of marine oil spills. *Oil Gas Sci. Technol.-Rev. Ifp Energ. Nouv.* **58**: 463–468.
- Proft, T. and Baker, E.N. (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 613–635.
- Pruzzo, C., Vezzulli, L., and Colwell, R.R. (2008) Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* **10**: 1400–1410.
- Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., et al. (2006) Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 1528–1533.

Q

- Qin, J.G. (2010) Lipid-Containing Secondary Metabolites from Algae. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 3021–3030.

R

- Rabus, R., Wilkes, H., Behrends, A., Armstroff, A., Fischer, T., Pierik, A.J., and Widdel, F. (2001) Anaerobic Initial Reaction of n-Alkanes in a Denitrifying Bacterium: Evidence for (1-Methylpentyl)succinate as Initial Product and for Involvement of an Organic Radical in n-Hexane Metabolism. *J. Bacteriol.* **183**: 1707–1715.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., and Rengasamy, R. (2008) A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* **34**: 77–88.
- Rakonjac, J., Bennett, N.J., Spagnuolo, J., Gagic, D., and Russel, M. (2011) Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr. Issues Mol. Biol.* **13**: 51–76.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H.L., and Moorman, A.F.M. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**: 62–66.
- Ramphal, R., Arora, S.K., and Ritchings, B.W. (1996) Recognition of mucin by the Adhesin-Flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**: S170–S174.
- Ramphal, R., Koo, L., Ishimoto, K., Totten, P., Lara, J., and Lory, S. (1991) Adhesion of *Pseudomonas-Aeruginosa* Pilin-Deficient Mutants to Mucin. *Infect. Immun.* **59**: 1307–1311.
- Raven, J.A. and Falkowski, P.G. (1999) Oceanic sinks for atmospheric CO₂. *Plant Cell Environ.* **22**: 741–755.

- Records, A.R. (2011) The Type VI Secretion System: A Multipurpose Delivery System with a Phage-Like Machinery. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **24**: 751–757.
- Reineke, V., Rullkoetter, J., Smith, E.L., and Rowland, S.J. (2006) Toxicity and compositional analysis of aromatic hydrocarbon fractions of two pairs of undegraded and biodegraded crude oils from the Santa Maria (California) and Vienna basins. *Org. Geochem.* **37**: 1885–1899.
- Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., et al. (2008) The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J.* **3**: 271–282.
- Riquelme, C.E. and Avendano-Herrera, R.E. (2003) Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **76**: 725–736.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 249–252.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* **3**: 229–236.
- Rosenberg, E. and Ron, E.Z. (1998) Surface Active Polymers from the Genus *Acinetobacter*. In, Kaplan, D.D.L. (ed), *Biopolymers from Renewable Resources*, Macromolecular Systems — Materials Approach. Springer Berlin Heidelberg, pp. 281–291.
- Rosenberg, M., Bayer, E., Delarea, J., and Rosenberg, E. (1982) Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of *Acinetobacter-Calcoaceticus* Rag-1 on Hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 929–937.
- Rosenberg, M. and Rosenberg, E. (1981) Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *J. Bacteriol.* **148**: 51–57.
- Von Rozycki, T. and Nies, D.H. (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**: 115–139.
- Ryther, J. (1969) Photosynthesis and Fish Production in Sea. *Science* **166**: 72–&.

S

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350–1354.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2000) *Molecular Cloning* 3rd Revised edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S., Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santa Anna, L.M., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Pereira, N., and Freire, D.M.G. (2002) Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz. J. Chem. Eng.* **19**: 159–166.
- Sapp, M., Schwaderer, A.S., Wiltshire, K.H., Hoppe, H.-G., Gerdt, G., and Wichels, A. (2007) Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microb. Ecol.* **53**: 683–699.
- Sarmiento, H. and Gasol, J.M. (2012) Use of phytoplankton-derived dissolved organic carbon by different types of bacterioplankton. *Environ. Microbiol.* **14**: 2348–2360.
- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H., and Muyzer, G. (2002) Genetic diversity of “satellite” bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**: 25–35.
- Schuldiner, S. (2006) Structural biology - The ins and outs of drug transport. *Nature* **443**: 156–157.

- Schwarz, S., Hood, R.D., and Mougous, J.D. (2010) What is type VI secretion doing in all those bugs? *Trends Microbiol.* **18**: 531–537.
- Schwarz, S., West, T.E., Boyer, F., Chiang, W.-C., Carl, M.A., Hood, R.D., et al. (2010) Burkholderia Type VI Secretion Systems Have Distinct Roles in Eukaryotic and Bacterial Cell Interactions. *PLoS Pathog* **6**: e1001068.
- Schweizer, H.P. (2003) Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res. GMR* **2**: 48–62.
- Seeger, M.A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., and Pos, K.M. (2006) Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**: 1295–1298.
- Segura, A., Bernal, P., Pini, C., Krell, T., Daniels, C., and Ramos, J.-L. (2010) Membrane Composition and Modifications in Response to Aromatic Hydrocarbons in Gram Negative Bacteria. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1595–1603.
- Seitz, E.W. (1974) Industrial application of microbial lipases: A review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51**: 12–16.
- Semmler, A.B.T., Whitchurch, C.B., and Mattick, J.S. (1999) A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **145**: 2863–2873.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., and Harms, H. (2004) Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environ. Sci. Technol.* **38**: 228A–231A.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Wick, L.Y., and Harms, H. (2007) Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environ. Pollut.* **150**: 166–176.
- Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O., and Gruetter, M.G. (2007) Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors. *Plos Biol.* **5**: 106–113.
- Seymour, J.R., Mitchell, J.G., Pearson, L., and Waters, R.L. (2000) Heterogeneity in bacterioplankton abundance from 4.5 millimetre resolution sampling. *Aquat. Microb. Ecol.* **22**: 143–153.
- Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K.-S., Kodama, T., and Honda, T. (2006) Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**: 89–97.
- Shingler, V. (2011) Signal sensory systems that impact σ_{54} -dependent transcription. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**: 425–440.
- Sikkema, J., Debont, J., and Poolman, B. (1994) Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological-Membranes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8022–8028.
- Sikkema, J., Debont, J., and Poolman, B. (1995) Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59**: 201–222.
- Da Silva Neto, J.F., Koide, T., Abe, C.M., Gomes, S.L., and Marques, M.V. (2008) Role of σ_{54} in the regulation of genes involved in type I and type IV pili biogenesis in *Xylella fastidiosa*. *Arch. Microbiol.* **189**: 249–61.
- Silverman, J.M., Brunet, Y.R., Cascales, E., and Mougous, J.D. (2012) Structure and Regulation of the Type VI Secretion System. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**: 453–472.
- Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A. (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In vivo Genetic-Engineering - Transposon Mutagenesis in Gram-Negative Bacteria. *Bio-Technol.* **1**: 784–791.

- Skorupski, K. and Taylor, R.K. (1996) Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* **169**: 47–52.
- Smits, T.H.M., Witholt, B., and Beilen, J.B. van (2003) Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **84**: 193–200.
- Snyder, L. and Champness, W. (2003) Molecular genetics of bacteria ASM Press.
- Sonnenschein, E.C., Gärdes, A., Seebah, S., Torres-Monroy, I., Grossart, H.-P., and Ullrich, M.S. (2011) Development of a genetic system for *Marinobacter adhaerens* HP15 involved in marine aggregate formation by interacting with diatom cells. *J. Microbiol. Methods* **87**: 176–183.
- Sonnhammer, E.L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. ISMB Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **6**: 175–182.
- Sousa, D.Z., Balk, M., Alves, M., Schink, B., McInerney, M.J., Smidt, H., et al. (2010) Degradation of Long-Chain Fatty Acids by Sulfate-Reducing and Methanogenic Communities. In: Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 963–980.
- Spormann, A.M. and Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85–105.
- Srinivasan, V.B., Rajamohan, G., Pancholi, P., Marcon, M., and Gebreyes, W.A. (2011) Molecular cloning and functional characterization of two novel membrane fusion proteins in conferring antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 499–504.
- Stauder, M., Huq, A., Pezzati, E., Grim, C.J., Ramoino, P., Pane, L., et al. (2012) Role of GbpA protein, an important virulence-related colonization factor, for *Vibrio cholerae*'s survival in the aquatic environment. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**: 439–445.
- Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 199–210.
- Stocker, R. (2012) Marine Microbes See a Sea of Gradients. *Science* **338**: 628–633.
- Stocker, R. and Seymour, J.R. (2012) Ecology and Physics of Bacterial Chemotaxis in the Ocean. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 792–812.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187–209.
- Strom, M.S. and Lory, S. (1993) Structure-Function and Biogenesis of the Type IV Pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 565–596.
- Stuber, D. and Bujard, H. (1981) Organization of Transcriptional Signals in Plasmids Pbr322 and Pacyc184. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am.-Biol. Sci.* **78**: 167–171.
- Suarez, G., Sierra, J.C., Erova, T.E., Sha, J., Horneman, A.J., and Chopra, A.K. (2010) A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J. Bacteriol.* **192**: 155–168.
- Sulzberger, B. and Durisch-Kaiser, E. (2009) Chemical characterization of dissolved organic matter (DOM): A prerequisite for understanding UV-induced changes of DOM absorption properties and bioavailability. *Aquat. Sci.* **71**: 104–126.
- Svendsen, A. (2000) Lipase protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1543**: 223–238.
- Szurmant, H. and Ordal, G.W. (2004) Diversity in Chemotaxis Mechanisms among the Bacteria and Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 301–319.

T

- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., and Maier, R.M. (2000) Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3262–3268.
- Takahashi, H., Yanagisawa, T., Kim, K.S., Yokoyama, S., and Ohnishi, M. (2012) Meningococcal PilV Potentiates *Neisseria meningitidis* Type IV Pilus-Mediated Internalization into Human Endothelial and Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **80**: 4154–4166.
- Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2013) Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. *Microbes Environ.* **28**: 13–24.
- Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Pelletier, D.A., and Spormann, A.M. (2004) Initial Phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* **186**: 8096–8104.
- Tierney, M. and Young, L.Y. (2010) Anaerobic Degradation of Aromatic Hydrocarbons. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 925–934.
- Toren, A., Ron, E.Z., Bekerman, R., and Rosenberg, E. (2002) Solubilization of polyaromatic hydrocarbons by recombinant bioemulsifier AlnA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 580–584.
- Touw, D.S., Patel, D.R., and van den Berg, B. (2010) The Crystal Structure of OprG from *Pseudomonas aeruginosa*, a Potential Channel for Transport of Hydrophobic Molecules across the Outer Membrane. *PLoS ONE* **5**: e15016.
- Treangen, T.J. and Rocha, E.P.C. (2011) Horizontal Transfer, Not Duplication, Drives the Expansion of Protein Families in Prokaryotes. *PLoS Genet.* **7**:

V

- Vaysse, P.-J. (2009) Développement d'un biofilm bactérien (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17) à l'interface eau-hydrocarbure. *Thèse Dr*
- Vaysse, P.-J., Prat, L., Mangenot, S., Cruveiller, S., Goulas, P., and Grimaud, R. (2009) Proteomic analysis of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm formation at the alkane-water interface reveals novel proteins and cellular processes involved in hexadecane assimilation. *Res. Microbiol.* **160**: 829–837.
- Vaysse, P.-J., Sivadon, P., Goulas, P., and Grimaud, R. (2011) Cells dispersed from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm exhibit a specific protein profile associated with a higher ability to reinitiate biofilm development at the hexadecane-water interface. *Environ. Microbiol.* **13**: 737–746.
- Volkering, F., Breure, A.M., and Rulkens, W.H. (1997) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* **8**: 401–417.
- Volkman, J.K. and Tanoue, E. (2002) Chemical and Biological Studies of Particulate Organic Matter in the Ocean. *J. Oceanogr.* **58**: 265–279.

W

- Wadhams, G.H. and Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 1024–1037.
- Wakeham, S.G., Lee, C., and Hedges, J.I. (2000) Fluxes of major biochemicals in the equatorial Pacific Ocean. *Dyn. Charact. Mar. Org. Matter* **2**: 117–140.
- Wang, W., Jiang, Z., Westermann, M., and Ping, L. (2012) Three Mutations in *Escherichia coli* That Generate Transformable Functional Flagella. *J. Bacteriol.* **194**: 5856–5863.
- Watnick, P.I., Fullner, K.J., and Kolter, R. (1999) A Role for the Mannose-Sensitive Hemagglutinin in Biofilm Formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* **181**: 3606–3609.
- Watnick, P.I. and Kolter, R. (1999) Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* **34**: 586–595.
- Webb, J.S., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2003) Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 578–585.
- Webb, J.S., Lau, M., and Kjelleberg, S. (2004) Bacteriophage and Phenotypic Variation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* **186**: 8066–8073.
- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., et al. (2003) Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *J. Bacteriol.* **185**: 4585–4592.
- Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.-K., Zotchev, S.B., and Throne-Holst, M. (2007) Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 1209–1221.
- Whitaker, W.B., Richards, G.P., and Boyd, E.F. (2014) Loss of Sigma Factor RpoN Increases Intestinal Colonization of *Vibrio parahaemolyticus* in an Adult Mouse Model. *Infect. Immun.* **82**: 544–556.
- Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., et al. (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **52**: 873–893.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 6578–6583.
- Wick, L., Munain, A. de, Springael, D., and Harms, H. (2002) Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 378–385.
- Widdel, F. and Grundmann, O. (2010) Biochemistry of the Anaerobic Degradation of Non-Methane Alkanes. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 909–924.
- Widdel, F., Knittel, K., and Galushko, A. (2010) Anaerobic Hydrocarbon-Degrading Microorganisms: An Overview. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1997–2021.
- Widdel, F. and Musat, F. (2010) Energetic and Other Quantitative Aspects of Microbial Hydrocarbon Utilization. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 729–763.
- Widdel, F. and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 259–276.
- Wilkes, H. and Schwarzbauer, J. (2010) Hydrocarbons: An Introduction to Structure, Physico-Chemical Properties and Natural Occurrence. In, Timmis, K.N. (ed), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–48.

- Willison, J.C. (2004) Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. *Fems Microbiol. Lett.* **241**: 143–150.
- Winther-Larsen, H.C., Hegge, F.T., Wolfgang, M., Hayes, S.F., van Putten, J.P.M., and Koomey, M. (2001) Neisseria gonorrhoeae PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 15276–15281.
- Wooldridge, K. (2009) Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis Horizon Scientific Press.
- Worden, A.Z., Cuvelier, M.L., and Bartlett, D.H. (2006) In-depth analyses of marine microbial community genomics. *Trends Microbiol.* **14**: 331–336.
- Wu, S.S. and Kaiser, D. (1997) Regulation of expression of the pilA gene in Myxococcus xanthus. *J. Bacteriol.* **179**: 7748–7758.

Y

- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., and Timmis, K.N. (1998) Alcanivorax borkumensis gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 339–348.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 257–266.
- Yamamoto, K., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2012) Involvement of Flagella-Driven Motility and Pili in *Pseudomonas aeruginosa* Colonization at the Air-Liquid Interface. *Microbes Environ.* **27**: 320–323.
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., et al. (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**: 1608–1615.

Z

- Zeyer, J., Kuhn, E., and Schwarzenbach, R. (1986) Rapid Microbial Mineralization of Toluene and 1,3-Dimethylbenzene in the Absence of Molecular-Oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 944–947.
- Zhang, Y. and Miller, R. (1992) Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a Pseudomonas Rhamnolipid Surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3276–3282.
- Zhang, Y., Wang, F., Yang, X., Gu, C., Kengara, F.O., Hong, Q., et al. (2011) Extracellular polymeric substances enhanced mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons in the two-liquid-phase system for biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **90**: 1063–1071.
- Zheng, J., Ho, B., and Mekalanos, J.J. (2011) Genetic Analysis of Anti-Amoebae and Anti-Bacterial Activities of the Type VI Secretion System in *Vibrio cholerae*. *PLoS ONE* **6**: e23876.
- Zheng, J. and Leung, K.Y. (2007) Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Mol. Microbiol.* **66**: 1192–1206.

- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J., and Wishart, D.S. (2011) PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res.* gkr485.
- Zobell, C. (1946) Action of Microorganisms on Hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* **10**: 1–49.
- Zoued, A., Brunet, Y.R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., et al. (2014) Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**: 1664–1673.
- Zückert, W.R. (2014) Secretion of Bacterial Lipoproteins: Through the Cytoplasmic Membrane, the Periplasm and Beyond. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1843**: 1509–1516.
- Zuker, M. and Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**: 133–148.

ANNEXES

Annexe 1 : Article soumis dans FEMS Microbiology Ecology

TITLE PAGE

The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles.

Authors

Julie MOUNIER, Arantxa CAMUS, Isabelle MITTEAU, Pierre-Joseph VAYSSE, Philippe GOULAS, Régis GRIMAUD, Pierre SIVADON

Affiliation

Université de Pau et des Pays de l'Adour, Equipe Environnement et Microbiologie, UMR UPPA-CNRS 5254 IPREM, IBEAS - BP1155, 64013 Pau Cedex, France

Corresponding author: Pierre SIVADON

Université de Pau et des Pays de l'Adour, Equipe Environnement et Microbiologie, UMR UPPA-CNRS 5254 IPREM, IBEAS - BP1155, 64013 Pau Cedex, France

pierre.sivadon@univ-pau.fr; tel: +33 559 407 473; FAX: +33 559 407 494

Keywords: Carbon cycle; oceans; degradation of hydrophobic organic carbon; transcriptome

Running title: Gene expression in a microbial biofilm degrading oily carbon

ABSTRACT

Hydrophobic organic compounds (mainly lipids and hydrocarbons) represent a significant part of the organic matter in marine waters, and their degradation has an important impact in the carbon fluxes within oceans. However, because they are nearly insoluble in the water phase, their degradation by microorganisms occurs at the interface with water and thus requires specific adaptations such as biofilm formation. We show that *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 develops biofilms, referred to as oleolytic biofilms, on a large variety of hydrophobic substrates, including hydrocarbons, fatty alcohols, fatty acids, triglycerides and wax esters. Microarray analysis revealed that biofilm growth on *n*-hexadecane or triolein involved distinct genetic responses, together with a core of common genes that might concern general mechanisms of biofilm formation. Biofilm growth on triolein modulated the expression of hundreds of genes in comparison to *n*-hexadecane. The processes related to primary metabolism and genetic information processing were down-regulated. Most of the genes that were over-expressed on triolein had unknown functions. Surprisingly, their genome localization was restricted to a few regions identified as putative genomic islands or mobile elements. These results are discussed with regard to the adaptive responses triggered by *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 to occupy a specific niche in marine ecosystems.

INTRODUCTION

Hydrophobic organic compounds (HOCs), which include lipids and hydrocarbons, are ubiquitous in the marine environment. Their hydrophobic properties make them virtually absent in the water phase. They are instead represented in the particulate phase as living organisms, cell compartments such as membranes or carbon storage bodies, non-aqueous liquids, adsorbed onto inorganic or organic surfaces or embedded in organic gels. Lipids account for approximately 15% of the organic matter in the euphotic zone of the equatorial oceans (Wakeham *et al.*, 1997). They are among the most labile organic compounds in oceans because they are almost completely degraded in the upper 100 m, thus allowing some bacteria to degrade them efficiently (Wakeham *et al.*, 1997; Yoshimura & Hama, 2012). Considering that microorganisms are believed to take up substrates only as water-dissolved molecules, this suggests that some heterotrophic bacteria may have developed efficient strategies to adhere to these hydrophobic interfaces and to solubilize and transport hydrophobic substrates, making them more bioavailable (Harms *et al.*, 2010a).

To date, the characterization of marine bacterial species specialized in the degradation of HOCs has mostly been focused on hydrocarbon-degrading capabilities as they respond to social concerns toward the pollution of marine environments. These studies have focused on bacterial species that are highly specialized in hydrocarbon degradation, referred to as marine hydrocarbonoclastic bacteria (Yakimov *et al.*, 2007). These bacteria belong to only a few genera such as *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira* and *Thallassolituus*. However, their high substrate specificity most likely excludes them from being involved in the recycling of lipids produced in the euphotic zone of oceans.

In contrast to terrestrial hydrocarbon degraders, which tend to be metabolically versatile (Mara *et al.*, 2012), descriptions of marine bacteria that are able to degrade a wide range of lipids and hydrocarbons are very rare in the literature (Golyshin *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2010). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 was initially described as an hydrocarbonoclastic bacterium isolated from an oil-contaminated marine sediment (Gauthier *et al.*, 1992). This bacterium was further shown to form biofilms at the interface between water and *n*-alkanes (C₈ to C₂₈) or metabolizable *n*-alcohols (C₁₂ and C₁₆) (Klein *et al.*, 2008; Vaysse *et al.*, 2009; Grimaud *et al.*, 2012). *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 forms biofilms only on hydrophobic substrates that it can metabolize. No biofilm was observed on non-metabolizable HOCs such as branched alkanes (Klein *et al.*, 2008). This substrate specificity suggests that biofilm formation is determined by the presence of a nutritive

interface. Furthermore, the rate of *n*-hexadecane degradation decreased dramatically when the biofilm was disorganized, thus confirming that biofilm formation may constitute an efficient adaptive strategy for assimilating alkanes (Klein *et al.*, 2008). Such biofilms, which have been observed with many strains or consortia degrading aliphatic or aromatic hydrocarbons, are thought to provide bacteria with efficient mechanisms to access hydrocarbons. In a few studies, they have been shown to increase the rate of mass transfer of hydrocarbons by reducing the diffusion path of the substrate (Golyshin *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005; Grimaud, 2010; Harms *et al.*, 2010b; Jiménez *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2011; Notomista *et al.*, 2011; Tribelli *et al.*, 2012). A proteomic study was conducted on *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm growing on *n*-hexadecane (Vaysse *et al.*, 2009). It revealed that biofilm cells expressed a specific proteome in which 50% of the detected proteins had their quantity levels altered when compared to planktonic cells growing exponentially on acetate. The adaptation to alkane utilization as a carbon and energy source therefore involves a global change in cell physiology.

We conducted a phenotypic study, and the findings indicate that *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 can grow a biofilm on a larger variety of HOCs than suspected in previous studies. This result makes *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 one of the first marine bacterial strains described thus far that degrades both hydrocarbons and lipids. To obtain a more comprehensive picture of biofilm development on diverse HOCs, we compared whole-genome transcriptomic data obtained from *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilms growing on *n*-hexadecane or triolein and from planktonic cells growing exponentially on acetate. Gene expression patterns confirmed that biofilm growth on each HOC involved distinct genetic responses together with a core of common genes that might concern general mechanisms of biofilm formation. Taken together, the results presented in this paper shed light on bacterial cellular processes that may play a significant role in the recycling of a large fraction of the organic matter in the oceans.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth assays

The *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 (ATCC 49840) strain was initially described by Gauthier *et al.* (1992). *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 was cultivated in synthetic seawater (SSW) supplemented with 20 mM Na acetate (further referred to as SSW

acetate) as described by Klein *et al.* (2008). The *M. hydrocarbonoclasticus* MJ6-1 fluorescent strain derives from the SP17 strain. It was obtained by transformation of the spontaneous streptomycin-resistant JM1 strain (*rpsLK58T*, Sm^R) with the pUC18T-mini-Tn7T-Tp-eyfp plasmid (Choi & Schweizer, 2006, Mounier, 2013). The mini-Tn7 transposon integrated at the single Tn7 integration site of the *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome (Grimaud *et al.*, 2012). This transposon expresses the eYFP fluorescent protein due to the modified *E. coli* lac operon promoter PA1/04/03.

Biofilm growth on the HOC substrates that are solid at 30°C was tested in 24-well polystyrene plates (Evergreen Scientific). All the chemicals were purchased from Sigma Aldrich. Approximately 0.2 g of solid HOC were melted for 1 h at 90°C in wells and cooled at room temperature. Exponentially growing cells in SSW acetate were harvested by centrifugation at 10,000 g for 15 min at room temperature and suspended to a final OD_{600nm} of 0.1 in SSW medium. In total, 1.5 mL of the cell suspension was added to each HOC-coated well and incubated at 30°C at 100 rpm. A no-cell control was also performed with sterile SSW medium for each HOC. After 24 h of cultivation, the culture medium containing the planktonic cells was gently sucked out. Cells adhered to the solid substrate were stained for 3 min with 0.4 mL of crystal violet 1% (w/v). In these conditions, the adhesion of the cells to the polystyrene walls in comparison to the HOC substrates was negligible. After 2 washes with MilliQ water, crystal violet was extracted with 0.75 mL of acetic acid 10% (v/v)-ethanol 50% (v/v), and the absorbance was read at 595 nm. OD_{595 nm} from the no-cell controls were subtracted. All the measurements were performed in triplicate.

Biofilm growth on the HOC substrates that are liquid at 30°C was tested in 50-mL glass serum flasks at 30°C at 50 rpm (Klein *et al.*, 2008). The inoculation was carried out with 10 mL of the same cell suspension as described above. Each liquid HOC was then added at a final concentration of 0.2% (v/v). After 24 h of cultivation, the biofilms that formed at the water-HOC interfaces were retained on nylon membranes with a porosity of 33 µm (Nitex ®), stained for 3 min with 0.3 mL of crystal violet 1% (w/v) and washed twice with 10 mL of deionized water. Crystal violet was then extracted as described above and the OD_{595 nm} were determined. All the measurements were performed in triplicate.

Microscopy and imaging

Microscopic observations of *M. hydrocarbonoclasticus* biofilm cells were performed on the MJ6-1 strain grown in the same conditions as those used to prepare RNAs for

transcriptomic analyses, except that pyrene (Sigma Aldrich) was dissolved at 6 mg mL⁻¹ in *n*-hexadecane or triolein prior to inoculation. Biofilm samples were mounted on glass slides, and observations were made using an Axio Observer.Z1 inverted microscope (Zeiss, Germany) equipped with a 63x (Plan APO, N.A. 1.4, M 27) oil immersion lens. Differential interference contrast (DIC) observations were performed with the Zeiss PA 63x / 1.4 HR III optical component.

Epifluorescence microscopy was performed either by standard optical treatment or with the Zeiss ApoTome.2 attachment. Triolein or *n*-hexadecane particles stained with pyrene were visualized using epifluorescence illumination (excitation filter G365, Beamsplitter FT 395, emission BP 445/50). eYFP fluorescence was revealed with a BP 470/40 excitation filter and a Beamsplitter FT 495 and observed through a 445/50 emission filter. Images were acquired using a CCD Zeiss AxioCam 506 mono camera monitored by the Zeiss ZEN 2012 software. Image treatments were performed with ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

RNA preparation, cDNA synthesis and labeling

Exponentially growing planktonic cells or biofilm samples were prepared as previously described (Vaysse *et al.*, 2009). Total RNA from 50 mL of planktonic exponentially growing cells (OD_{600nm}~0.4) on SSW 20 mM acetate or from biofilm cells from 300 mL-biofilm cultures in 500-mL Erlenmeyer flasks were isolated using the Extract-All kit (Eurobio). RNA was extracted in triplicate from independent biological samples. Remaining traces of DNA were removed with DNase I (Invitrogen), and DNase-treated RNA were immediately processed on RNA Easy Clean Up columns (Qiagen). RNA quality and quantity were checked with an RNA 600 Nano kit on a BioAnalyser 2100 (Agilent) and a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Labtech). Five µg of total RNA was retro-transcribed using Superscript III enzyme and the first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) using random hexamers. cDNAs were eventually purified using the MinElute Reaction Cleanup kit (Qiagen). cDNA quality and quantity were checked as described for RNA. Cy3 labeling of cDNAs was performed with the One-Color DNA Labeling Kit (Roche NimbleGen) using Cy3-random nonamers. Quantities of Cy3-labeled cDNA were estimated at 240 nm.

***M. hydrocarbonoclasticus* SP17 whole genome microarray design, hybridization and image acquisition**

The assembled whole genome sequence of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 was shared into 59 non-coding RNA sequences (tRNAs and rRNAs), 1,739 intergenic regions longer than 60 bp and 3,807 coding sequences (Grimaud *et al.*, 2012). Probe design and microarray printing were performed by Roche NimbleGen. Six 45-60 mer oligonucleotides were designed for each of these genomic objects, three of them being in the forward direction and accompanied by their reverse complement (reverse strand). The oligonucleotides were chosen to span the 5' and 3' ends and an intermediate position. There were 182 genomic objects shorter than 300 bases for which only one or two probes could be selected (two or four probes if both strands are counted). Twenty-two groups of sequences sharing 100% of identity were represented by the same set of probes, and three genes were not represented. All probes were synthesized in duplicate together with 6,186 random sequences with no similarity to any *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sequence, leading to 72,546 features per hybridization zone. The array design is available in the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number A-MEXP-2398.

M. hydrocarbonoclasticus SP17 arrays were provided under the Roche NimbleGen 4x72k format. The cDNA labeling, microarray hybridization and scanning were all performed at the BioChip Platform (Toulouse, France) following the specifications provided in the NimbleGen Arrays User's Guide "Gene Expression Analysis". A NimbleGen Mixer was adhered to the 4x72k slides, and the Cy3-labeled cDNAs were loaded for hybridization onto the microarrays using the NimbleGen Hybridization System. The scanning of the 4x72k micro-arrays was performed on a Roche MS200 scanner using the NimbleScan software v2.6 protocol. The individual slide images were separated for further processing.

Data processing and statistical analysis

Three arrays hybridized from three independent biological samples generated a total of 36 raw values for each genomic object in each growth condition. The raw data are available in the ArrayExpress database under accession number E-MTAB-2593. Raw values obtained from intergenic sequences were not kept in the following analyses. Transcriptomic results were processed using the ANAIS software as follows (Simon & Biot, 2010). Array quality was assessed at the probe level. Robust Multi-Array Analysis background normalization and quantile normalization were performed for intra- and inter-array normalization, respectively

(Bolstad *et al.*, 2003; Irizarry *et al.*, 2003). Gene expression values were summarized by median polish of the corresponding normalized probe set values. A total of 3,839 genes with signal intensities above a 95% random threshold were kept for further studies. Gene differential expression (fold-change) was calculated as the ratio between the normalized gene expression value for each experimental condition and the referent experimental condition. Significant fold-changes were statistically determined using an ANOVA-FDR adjusted p -value ≤ 0.05 (Benjamini & Hochberg, 1995).

The ‘triangle plot’ representation (Figure 3) of expression ratios reduced three-valued expression points (A, B, C) to two dimensions by plotting $A/2 + B$ versus $A/(A + B + C)$. Location in the plot is based on proportionality among expression levels, ignoring magnitude. Genes whose expression was high in one condition and low in the other two lie near a specific corner of the triangle, genes that were high in two conditions and low in the third are plotted along one edge of the triangle, and genes that were roughly equally expressed in all conditions fall toward the center. All analyses were performed in the R environment (<http://www.r-project.org/>) with the ADE4 package for construction of the triangle plots.

Sequence analysis and data mining

Biological interpretation of the transcriptomic datasets at the biological process level was carried out by mapping genes of the different expression categories in the KEGG pathway database (Kanehisa *et al.*, 2013). Lists of genes were downloaded in the “search&color” advanced mapping tool (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway1.html) and compared to the KEGG annotation of the *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome available in the database.

Whole genome alignments were performed with the MAUVE 2.3.1 Java application using *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (GenBank ID: FO203363) and VT8 (formerly *M. aquaolei* VT8, (Márquez & Ventosa, 2005) (GenBank ID: CP000514.1) full genome sequences downloaded from the NCBI Microbial Genomes database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) (Darling *et al.*, 2004). Alignments were performed using default settings. The putative genomic islands in *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome were predicted by an integrated method using the IslandViewer program suite (Dhillon *et al.*, 2013). The results were visualized with the DNAPlotter Java application of the Artemis genome viewer software (Carver *et al.*, 2009). The results were exported as .svg files

which were further manipulated in INKSCAPE 0.48.4 (<http://inkscape.org>) to generate Figures 7 and 8.

RESULTS AND DISCUSSION

***Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 forms oleolytic biofilms on various hydrophobic organic compounds**

M. hydrocarbonoclasticus SP17 was previously shown to be able to degrade a wide range of *n*-alkanes (C₈ to C₂₈) and two *n*-alkanols (C₁₂ and C₁₆) through the formation of a biofilm at the HOC-water interface (Klein *et al.*, 2008). To further define the substrate range of this strain, biofilm formation was tested on a wider range of HOCs provided as the sole source of carbon and energy (Table 1; Figure 1). Biofilm growth was observed either on liquid or solid, saturated or unsaturated aliphatic compounds such as medium-chain alkanes, alkenes, fatty alcohols and acids, triglycerides or wax esters. Although *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 was initially recognized as a marine hydrocarbonoclastic bacterium and thus considered to play an important role in hydrocarbon degradation (Gauthier *et al.*, 1992; Yakimov *et al.*, 2007), its wide metabolic capacity indicates that it should instead be considered as a versatile degrader of oily organic substrates. As such, we propose to refer to *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm as an oleolytic biofilm. Its ability to grow as a biofilm on a wide range of poorly soluble HOCs makes this bacterium well adapted to the recycling of particulate hydrophobic organic carbon in the ocean (Volkman & Tanoue, 2002; Azam & Malfatti, 2007).

Biofilm formation on *n*-hexadecane or triolein involves different genetic programs

Considering the variety of the physical and chemical natures of the HOC-water interfaces listed in Table 1, we were interested in whether specific cellular processes are involved in the recognition of the nutritive status of the interface, the adhesion to the interface and the catabolic pathways that sustain substrate assimilation and biofilm growth on the different HOCs. A transcriptomic study using a microarray chip carrying the whole genome of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 was performed to identify genes regulated in response to biofilm formation on the alkane *n*-hexadecane and the unsaturated triglyceride triolein. These two compounds were chosen because they are representative of two substrate classes that *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 may degrade in the environment, *i.e.*, hydrocarbons of anthropogenic or biological origin and biogenic lipids. The expression profiles of the whole set of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genes were measured in cells from 24 h-biofilms

formed at the water-HOC interfaces and from planktonic cells growing exponentially on acetate. Microscopic observations on samples obtained with *M. hydrocarbonoclasticus* MJ6-1 YFP-tagged cells grown in the same conditions confirmed that mature biofilms were produced onto both types of HOCs in these conditions (Figure 2). Gene expression levels in these three conditions were then compared to each other (Supplemental Table 1).

A total of 1,222 genes were identified as differentially expressed in at least one biofilm condition, *i.e.*, on either *n*-hexadecane or triolein interface, in comparison to planktonic exponential growth on acetate (significant FDR(BH) p -val < 0.05) (Supplemental Table 2). The range of differential expression ratios between *n*-hexadecane or triolein and acetate conditions varied from -6.21 (*MARHY3166*; conserved hypothetical protein) to +4.61 (*MARHY2837*; Ferredoxin) and -7.05 (*MARHY3166*) to +2.48 (*MARHY1868*; hypothetical protein), respectively. This relatively low range of differential expression was expected as biofilms are known to gather cells of different physiological states that might correlate with distinct transcriptome profiles. One gene that is highly differentially expressed in one particular cell type should therefore see its expression signal lowered by the RNA produced in the other cell types. Nevertheless, the *MARHY3166* gene showed the strongest down-expression on both HOCs, thus indicating that its still unknown function is most likely rather necessary for planktonic growth than for biofilm growth.

Three groups of genes comprising six expression categories were defined according to relative gene expression levels between biofilm growth conditions on HOCs and planktonic growth on acetate (Figure 3A; Supplemental Table 2): the BF HEX group contained the genes that were over-expressed (HEX⁺ category, 66 genes) or down-expressed (HEX⁻ category, 119 genes) only in biofilms on *n*-hexadecane, the BF TRI group contained the genes that were over-expressed (TRI⁺, 442 genes) or down-expressed (TRI⁻, 409 genes) only in biofilms on triolein, and the BF COM group contained the genes that were over-expressed (HEX⁺TRI⁺, 59 genes) or down-expressed (HEX⁻TRI⁻, 127 genes) in biofilm conditions on both *n*-hexadecane and triolein. These results also show that biofilm growth on each HOC involved distinct genetic responses together with a core of common genes that might play a role in the general mechanism of biofilm formation on any HOC. One striking result is the large difference in the number of affected genes between the two HOC substrates. Although being assimilated by *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 through a common biofilm lifestyle, to grow as a biofilm on *n*-hexadecane seemed to require less genetic changes than on triolein when compared to exponential growth on acetate. Hexadecane may present bacterial cells with an interface of

different physico-chemical properties or nutritive status in comparison to triolein. Another explanation could be associated with the numerous sources of triglycerides that exist in the marine environment where they can be found, for example, in cell debris or as oil bodies, organelles or membranes in living vegetal, animal or prokaryotic cells. One could therefore consider that forming a biofilm on triolein may signify for the bacterial cells to modulate a larger panel of biological processes.

Biofilm growth on triolein strongly reduces primary metabolism and genetic information processing

Considering the large differences in gene number observed between the BF TRI and BF HEX groups, we were interested in whether these differences could correspond to the modulation of specific biological processes. The 1,222 genes of the BF TRI, BF HEX and BF COM groups were mapped into the KEGG PATHWAY resource using the annotated *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome provided in the KEGG genome database (Kanehisa *et al.*, 2013). Only 43 BF HEX, 48 BF COM and 258 BF TRI genes could be mapped; the remaining genes showed no significant sequence similarity to the genes mapped in the KEGG PATHWAY database (Supplemental Table 3). The KEGG PATHWAY module generated a list of 700 annotation terms related to biological processes. This number was higher than the number of genes, as many of them were annotated as involved in several biological processes.

We classified these 700 annotation terms under the limited number of the main biological processes of the KEGG PATHWAY map and represented them in association with the expression profiles of the corresponding genes (Figure 4). The main result that emerged from this analysis is that the TRI category provided a high proportion of the KEGG annotation terms. Half of the TRI genes (206 out of 409) were annotated by the KEGG module, whereas 387 of the 442 TRI⁺ genes (86%) were not mapped. This high proportion of genes with a remaining unknown function suggests that biofilm growth on triolein involves biological processes that still require characterization.

The biological processes whose gene expression seemed to decrease significantly in response to biofilm growth on triolein were carbon and energy metabolism and genetic information processing (Figure 4; Supplemental Table 3). More particularly, terms related to carbohydrate metabolism, fatty acid biosynthesis and degradation, nucleotide and amino acid metabolism, and translation were over-represented in the annotated down-expressed genes (Figure 3B to D; Figure 4). A schematic mapping of the genes involved in carbohydrate

metabolism shows that many of the genes involved in glycolysis, fermentation, the tricarboxylic cycle and the glyoxylate shunt were down-expressed with ratios ranging from -1.39 to -3.88 (Figure 5). Moreover, oxidative phosphorylation was also affected with six genes of the ATP synthase cluster (*MARHY3830-3835*; -2.67, -2.43, -2.47, -1.98, -2.07 and -2), the cytochrome c reductase (*MARHY0774-0776*; -2.11, -2.68 and -2.75) and the cytochrome oxidase complex (*MARHY0053, MARHY1519-1521*; -1.45, -2.87, -2.65, -2.93). The down-expression of genes involved in amino acid metabolism was consistent with those of the carbohydrate metabolic pathway, as these two metabolisms are directly linked. Amino acid precursors are intermediates of the carbohydrate metabolism. Furthermore, 45 ribosomal subunit protein genes (21 small subunit genes and 24 large subunit genes) were also significantly down-expressed, together with genes involved in transcription, translation and protein fate. Their down-expression ratios were the largest of this expression category (Figure 3D; Supplemental Table 2). Taken together, these results might signify that a major part of the cells enclosed in biofilm on triolein was less metabolically active than those on *n*-hexadecane or growing exponentially on acetate.

Gene expression in biofilms on *n*-hexadecane confirmed a role for proteins involved in alkane assimilation and the type VI secretion system

Genes involved in the primary steps of alkane oxidation provide one example of substrate-specific genes that are over-expressed only in biofilms on *n*-hexadecane. One gene encoding a terminal-1-alkane monooxygenase (*MARHY2735*) homologous to AlkM and a cluster of three genes expressing a cytochrome P450 alkane hydroxylase (*MARHY2838*, homologous to AhpG2), an alcohol dehydrogenase homologous to AlkJ (*MARHY2839*) and a ferredoxin (*MARHY2837*) were among the most over-expressed genes in this condition (HEX vs AC expression ratios of +3.51, +3.26, +2.51 and +4.61, respectively), with no significant differential expression on triolein in comparison to acetate (Figure 3E; Supplemental Table 2). Consistent with gene expression studies carried out on alkane biodegradation pathways in bacteria, this induction of alkane oxidation genes was expected (Rojo, 2009; Sabirova *et al.*, 2011). By contrast, *MARHY3758*, which is orthologous to *almA*, a flavin-binding monooxygenase gene involved in long-chain hydrocarbon (>32 carbons) degradation in *Acinetobacter* and *Alcanivorax* species, showed no change in expression (Wang & Shao, 2012). This specific expression of medium-chain hydrocarbon oxidizing enzymes in contrast

to the long-chain degrading enzyme Alma confirms that the transcriptomic results are relevant to the experimental culture conditions.

Interestingly, other genes belonging to this HEX⁺ category also confirmed notable results obtained from a previous proteomic study carried out on *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilms grown on *n*-hexadecane (Vaysse *et al.*, 2009). For instance, five genes showing specific, and among the most important over-expression on *n*-hexadecane produced proteins that had been described as being among the most abundant proteins detected in biofilms on *n*-hexadecane (Figure 3E, Supplemental Table 2). The *MARHY2686* gene (HEX vs AC ratio of +3.37) encodes a protein that was the most abundant in this condition. Interestingly, it forms a cluster with two other genes (*MARHY2685* and *MARHY2687*) that showed the same specific HEX⁺ expression pattern (+1.8 and +2.6, respectively) (Supplemental Table 2). The *MARHY3686* gene codes for a putative efflux pump. The four other genes are *MARHY3634* (+3.05) and *MARHY3635* (+2.19), two members of a type VI secretion system (T6SS) gene cluster, and *MARHY0478* (+2.04) and *MARHY0477* (+1.57), which present reduced alkane assimilation when mutated (Figure 3E) (Mounier, 2013). Such a consistent pattern of expression from two independent experimental strategies together with mutant phenotypes reinforces the probability for a role of these proteins in biofilm growth on *n*-hexadecane.

Chemotaxis and motility genes are down-regulated in biofilm conditions

Among the 133 genes annotated as being involved in chemotaxis and motility, 62 were differentially expressed in biofilm conditions with 73% of them being down-regulated (Figure 3F; Supplemental Table 4). The main processes that were affected concerned the chemosensory signaling pathways, type IV and MSHA pili formation, and to a lesser extent, flagellar assembly (Figure 6). Although the differential expression ratios were approximately two fold, the high proportion of genes differentially expressed in this particular biological process highlights its putative role in biofilm lifestyle on HOCs. As discussed above, gene expression ratios determined from whole mature biofilms are expected to be lower than their actual levels in individual biofilm cells as biofilms comprise cells in different physiological states and with different transcriptomes. Nonetheless, the flagellin gene *fliC* (*MARHY2517*; HEX vs AC ratio = -2.15, TRI vs AC ratio = -2.27), the pilin gene *pilA* (*MARHY2564*; -2.3 and -3.37) as well as *pilJ* (*MARHY3674*; -1.69 and -2.38) and *pilQ* (*MARHY0701*; -1.63 and -2.26) were among the most down-expressed genes of the HEX⁺TRI expression category (Figure 3F; Supplemental Table 4).

Chemotaxis controls motility apparatuses such as pili or flagella, to migrate toward favorable environments or away from detrimental environments. It is mediated by chemoreceptors that sense chemo-effectors by a specific receptor-ligand interaction that in turn activates intracellular signaling cascades to control cell movements (Krell *et al.*, 2011; Porter *et al.* 2011). The transcriptomic data show that the expression of a majority of the proteins of the chemosensory signaling cascades that control flagellum assembly and rotation (CheA/CheW) and pili-dependent twitching motility (ChpA/PilJ) was reduced during *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm growth on HOCs (Figure 6A).

Biofilm formation on HOCs also affected the expression of flagellum genes, although to a lesser extent than chemotaxis or pili genes. Indeed, even though more than 50 *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genes were annotated as being involved in flagellum assembly and rotation, only a putative *fliD* (MARHY2507) was specifically down-expressed in biofilms on *n*-hexadecane (HEX vs AC ratio of -1.46). Eight genes, *i.e.*, *fliC* (HEX vs AC ratio of -2.15 and TRI vs AC ratio of -2.27), *fliE* (-1.29 and -1.35), *flgC* (-1.79 and -1.85), *flgD* (-1.55 and -1.99), *flgF* (-1.45 and -1.26), *motA* (+1.26 and +1.32), *flhB* (+1.35 and +1.34) and a putative *flgL* (MARH2170; +1.33 and +1.42), were affected in their expression in biofilm conditions on both HOCs (BF COM group). Biofilm growth on triolein specifically modulated the expression of *fliM* (TRI vs AC ratio of -1.24), *fliQ* (+1.27), *flhF* (-1.64) and *fgtA* (+1.26). Interestingly, all these genes correspond mainly to the late-expressed genes that are involved in the export and assembly of the rod, hook and filament parts of the flagellum. Flagella have been involved in different steps of biofilm formation in many bacterial species such as cell swimming to attractive surfaces, cell sticking and swarming on surfaces and cell detachment (Sauer *et al.*, 2004; Conrad, 2012; Friedlander *et al.* 2013; Partridge & Harshey 2013). Consistently, flagellum motility is regulated during biofilm formation (Guttenplan & Kearns, 2013). Flagella and chemotaxis have been shown to play a role in biofilm formation in *Marinobacter adhaerens* because the *cheA*, *cheB*, *chpA* or *chpB* mutants are impaired in biofilm formation on abiotic surfaces (Sonnenschein *et al.*, 2012). Moreover, we observed that *M. adhaerens* formed biofilms on paraffin, whereas the *fliC* and *fliA* flagella mutants did not (unpublished results).

Type IV pili genes form clusters that are conserved across Proteobacteria phylum at different loci (Pelicic, 2008). The mapping of expression data in four clusters of type IV pili genes of the *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome showed that the down-regulation of gene expression was not restricted to individual genes but rather concerned gene clusters, thus

suggesting a co-regulation process aimed at reducing the role of the entire pili-mediated process. In particular, two pili gene clusters, *i.e.*, *pilMNOPQ* and *pilVWXYI*, were down-expressed in biofilms either on *n*-hexadecane or triolein, with expression ratios ranging from -1.38 to -2.26 (Figure 6B; Supplemental Table S4). Biofilm growth seemed to mainly regulate pili assembly genes. *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm cells are then expected to have a reduced amount of these two extracellular motility structures. Such a down-expression of pili biogenesis genes was also described in *A. borkumensis* growing on *n*-hexadecane (Sabirova *et al.*, 2011), although it concerned only four genes. Nevertheless, our study and the large number of genes affected could confirm that type IV pili down-expression might be considered as a characteristic feature of marine hydrocarbonoclastic bacteria growing at water-HOC interfaces. However, considering the variety of pilin sequences and roles, it is difficult to yield a hypothesis on the exact significance of such a down-expression in mature biofilms on HOCs.

The *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 genome also contains a characteristic single large cluster of genes encoding a mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) pilus, a type IV pilus found in *Vibrio cholerae* and other environmental bacteria (Marsh & Taylor, 1999; Thormann *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2008; Saville *et al.*, 2010). This MSHA pilus system has been involved in the adhesion of cells and biofilm formation onto a variety of abiotic and biotic surfaces such as glass (Thormann *et al.*, 2004), chitin (Shime-Hattori *et al.*, 2006), the cellulose-containing surface of the green alga *Ulva australis* (Dalisyay *et al.*, 2006) and zooplankton (Chiavelli *et al.*, 2001). It is therefore of interest to note that up to ten genes out of the 16 that form this cluster were down-regulated in biofilm conditions, with differential expression ratios ranging from -1.32 to -1.82. For instance, *mshA* that encodes the major pilin subunit showed an HEX vs AC ratio of -1.48 and a Tri vs AC ratio of -1.82.

The role of MSHA and type IV pili in promoting adherence to surfaces, cell aggregation and biofilm formation is well documented (Giltner *et al.*, 2012). Our results show that they may also mediate biofilm formation at HOC-water interfaces. As a down-expression in biofilm conditions signifies that these genes are rather over-expressed in planktonic cells growing on acetate, one can consider that their functions are less necessary in biofilms. This could support the hypothesis that they might be involved in the detection of and the adhesion to HOC-water interfaces. The validation of this hypothesis would be of great interest, as it would yield potential targets for future studies on HOC-water interface colonization in

association with carbon recycling in the marine environment or hydrocarbon bioremediation in polluted areas.

Biofilm growth on triolein induced the transcriptional activation of a putative 104 kb-genomic island

All the differentially expressed genes were mapped onto the genome of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 in association with their expression profiles (Figure 7). This graphical representation revealed that most of the genes that showed overexpression on triolein (TRI⁺, and to some extent, HEX⁻ categories) clustered in eight regions of the genome. On the other hand, very few genes overexpressed on *n*-hexadecane mapped to these regions. In particular, it pointed to a 168-kb genomic region located approximately between positions 1,877,000 and 2,045,000 (from *MARHY1803* to *MARHY2007*) (Grimaud *et al.*, 2012), which will be further referred to as the 2-Mb region. In total, 123 out of the 130 genes that were differentially expressed in this 203-gene-long 2-Mb region belonged to the TRI⁺ category (Figure 3G; Supplemental Table 2). This high density of similarly expressed genes at the same locus suggested the presence of a putative genomic island (GI). GIs are large (usually >8 kb) mobile genetic elements that are horizontally transferred between bacteria. They generally convey genetic information that influences traits such as pathogenicity, symbiosis, resistance to antibiotics and toxic compounds, fitness, and adaptation (Dobrindt *et al.*, 2004). The acquisition of GIs by bacteria is thought to provide genetic flexibility, particularly in environmental microorganisms that may be subjected to constant environmental changes. A recent study roughly estimated that more than 90% of the marine bacteria across the four major prokaryotic taxa in the oceans carry GIs in their genomes (Fernández-Gómez *et al.*, 2012).

We first took advantage of the development of bioinformatic tools to test the presence of a GI in the 2-Mb region (Langille *et al.*, 2010). Because bacteria gain a GI through horizontal gene transfer and can even lose it sporadically, the phyletic patterns of the GI and the host genomes may differ. We thus performed a genome comparative analysis between the *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 and VT8 strains using the MAUVE whole-genome sequence alignment tool (Figure 8)(Darling *et al.*, 2004; Márquez & Ventosa, 2005). This comparison confirmed that a 104 kb-long region starting at position 1,927,665 (end of *MARH1950*) and ending at position 2,031,430 (between *MARHY1992* and *MARHY1993*) was absent of the *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 genome, whereas the whole core genome of *M.*

hydrocarbonoclasticus SP17 was conserved (LCB weight of 7060). This region was also predicted as a putative GI by the IslandViewer tool, which combines three independent and accurate methods, that is IslandPath-Dimob, SIGI-HMM and IslandPick; these methods are based on sequence-composition and comparative-genome based analyses (Figure 7) (Dhillon *et al.*, 2013). IslandViewer predicted the presence of 18 putative GIs in the *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome (Supplemental Table 5). In particular, it delineated three close putative GIs in the 2-Mb region, between positions 1,926,444 (*MARHY1848*) and 2,032,417 (*MARHY1993*) on the genome. A large part of this zone was identified by all three methods, thus reinforcing its prediction. As underlined by the IslandPath-DIMOB program, this region presented both a bias in GC% content (52.47%) in comparison to flanking genomic regions (57.43% and 56.69%; the mean genome GC% being 57.43%) and the presence of 10 genes of the “mobile and extra-chromosomal elements” COG annotation category, within which were four transposases, three putative integrases, one resolvase and one reverse transcriptase genes. Another interesting feature that is commonly associated with GIs is the high percentage of genes of unknown function, a percentage that is approximately 55% in the 2-Mb region. This proportion is in accordance with percentages found in GIs in other marine bacteria (Fernández-Gómez *et al.*, 2012). Together with other features such as the presence of a tRNA gene close to the GI insertion site (*MARHYTRNA25-LEU* at position 1,885,807, between *MARHY1810* and *MARHY1811*) and flanking direct repeats (not shown), all these genomic data provide some confidence that this particular region is most likely a GI. Interestingly, *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 strain, which lacks this 2-Mb GI, produced biofilms with two-fold less biomass than SP17 strain on triolein (not shown), supporting a putative role for this 2-Mb region for biofilm growth on this substrate.

The relationship that exists between the overexpression of half of the genes of this 2-Mb region, other putative mobile elements and biofilm growth on triolein is unclear, particularly as to whether this corresponds to the production of proteins involved in biofilm formation. This relationship is even more difficult to determine because 86 out of the 137 differentially expressed genes have no known function. Furthermore, no clear bioprocess putatively involved in biofilm formation emerges from the gene annotation data, although functional categories seem conserved with other marine *Gammaproteobacteria* GIs (Fernández-Gómez *et al.*, 2012). Nevertheless, a cluster of genes (*MARHY1835* to *MARHY1843*; TRI vs AC ratios ranging from +1.28 to +1.58) is of particular interest as it concerns the metabolism of glycogen-like alpha-glucan polysaccharides. A similar cluster of genes in *E. coli* (*glgBXCAP*)

together with *glgS* were involved in glycogen biosynthesis. Interestingly, *E. coli* Δ *glgS* mutant cells produced less glycogen, were hyperflagellated and hyperfimbriated, displayed elevated swarming motility and displayed an increased ability to form biofilms on polystyrene surfaces, suggesting a link between glycogen production and biofilm formation (Rahimpour *et al.*, 2013).

The overexpression of this 2-Mb region could point to a more general response that would link biofilm growth on triolein and transcriptional activation of mobile DNA elements. Indeed, in addition to this 2-Mb region, a careful analysis of the results presented in Figure 7 shows that a systematic co-localization between all the IslandViewer predicted-GIs and genes overexpressed in biofilms on triolein appears to exist. Moreover, consistent with the expression profiles of the DNA mobility genes located within the 2-Mb region, 10 other genes of the same category dispersed within the core genome displayed the same over-expression on triolein (*MARHY0506*, *MARHY0510*, *MARHY0965*, *MARHY1124* & *MARHY1125*, *MARHY1129*, *MARHY1138* & *MARHY1139*, *MARHY3218*, and *MARHY3796*; TRI vs AC expression ratios of +1.42, +1.54, +1.42, +1.41, +1.74, +1.99, +1.75, +1.44, +2.06 and +1.49, respectively). Among these are two prophage-like genes (*MARHY0506* & *MARHY0510*) that are embedded in a putative Pf1-like prophage (Figure 7). This could suggest a putative role for phage-mediated lysis in *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm dynamics on HOCs. Such a role for prophages in biofilm formation has already been suggested in other environmental biofilm-forming bacteria. Cell lysis in *Shewanella oneidensis* MR-1 or in *Streptococcus pneumoniae* was shown to release biofilm-promoting factors such as e-DNA to mediate biofilm formation (Carrolo *et al.*, 2010; Goedeke *et al.*, 2011). The Pf4 phage is essential for several stages of the biofilm life cycle of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, particularly during the dispersal phase where it generates the typical hollow centers and cell detachment (Webb *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 2008). The putative role of phage-mediated lysis during *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm formation on HOCs is currently under investigation.

CONCLUSION

The wide range of oily organic substrates that are metabolized by *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 defines it as an oleolytic bacterium. Because they are not soluble in water, oily organic compounds form interfaces onto which *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 develops a biofilm that is necessary for their assimilation. The results obtained in this study

show that *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 oleolytic biofilms grown on *n*-hexadecane and triolein presented distinct gene expression profiles. The only well identified biological process that they shared was the down-expression of the type IV and MSHA pili, indicating that pili-mediated motility might be less important for cells embedded in biofilms than for those growing planktonically. New transcriptome profiling experiments performed on other stages of biofilm growth, *i.e.*, adhesion, micro-colony formation and cell detachment, will help to clarify pili role in the course of biofilm development. Biofilm growth on *n*-hexadecane modulated the expression of 185 genes in comparison to planktonic growth on acetate. The strongest over-expressions were measured for genes involved in the degradation of alkanes, as well as for an operon of two genes putatively involved in alkane assimilation. It also concerned a putative efflux pump and the type VI secretion system, thereby confirming results obtained from a previous proteomic study. Phenotypic analyses of mutant strains are currently underway to assess the role of these proteins in alkane degradation and the functioning of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 oleolytic biofilms. Surprisingly, biofilm growth on triolein involved the differential expression of many more genes than biofilm growth on *n*-hexadecane, with hundreds of genes being differentially expressed between these two biofilm conditions. Most of the differentially expressed genes with known functions described a general down-expression of the primary metabolism and translation machinery, suggesting a less active metabolic profile. A large majority of the genes that were over-expressed on triolein encoded putative proteins or had unknown functions, resulting in remaining questions about the biological processes involved in biofilm growth on this substrate. However, most of these genes clustered at a few loci that also systematically contained mobile and extra-chromosomal elements. The largest locus was identified as a putative genomic island of approximately 104 kb. Although we are still unable to draw a conclusion about the role of this GI, we could hypothesize that it is able to carry and transfer genes that are involved in biofilm growth on triolein. This GI is not present in the *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 strain that formed less biofilm on triolein than SP17 (not shown), thus strengthening its putative role in this process. Genetic manipulations leading to its inactivation in *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 and its transfer into VT8 genome will help to clarify its role.

We propose that *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 is well adapted for the degradation of lipids and hydrocarbons of anthropogenic and biological origins found in marine environments. Similar metabolic profiling carried out on bacteria isolated from marine

samples is now necessary to enlarge this group of marine oleolytic bacteria and to compare their metabolic properties to increase our knowledge of the overlooked process of hydrophobic carbon recycling in the oceans.

Acknowledgments

We are grateful to Lidwine Trouilh and Florence Hakil for their expert technical assistance in transcriptomics and molecular biology. We also thank Jean-Christophe Auguet for his very helpful expertise in R programming. J.M. was supported by a PhD fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was funded by the French national research agency (ANR) as part of the 2011 "AD'HOC" project and the 6th European Framework Program, Contract 018391 FACEIT.

REFERENCES

- Azam F & Malfatti F (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* 5: 782–791.
- Benjamini Y & Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach. *J Roy Stat Soc B Met* 57: 289–300.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Åstrand M & Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19: 185–193.
- Boyd JM, Dacanay A, Knickle LC, Touhami A, Brown LL, Jericho MH, Johnson SC & Reith M (2008) Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Infect Immun* 76: 1445–1455.
- Carrolo M, Frias MJ, Pinto FR, Melo-Cristino J & Ramirez M (2010) Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* DOI: 10.1371/journal.pone.0015678.
- Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M & Parkhill J (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics* 25: 119–120.
- Chiavelli DA, Marsh JW & Taylor RK (2001) The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl Environ Microbiol* 67: 3220–3225.
- Choi KH & Schweizer HP (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Prot* 1: 153–161.
- Conrad JC (2012) Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: implications for biofilm formation. *Res Microbiol* 163: 619–629.

- Dalisay DS, Webb JS, Scheffel A, Svenson C, James S, Holmstroem C, Egan S & Kjelleberg S (2006) A mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA)-like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva australis*. *Microbiol-SGM* 152: 2875–2883.
- Darling ACE, Mau B, Blattner FR & Perna NT (2004) Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14: 1394–1403.
- Dhillon BK, Chiu TA, Laird MR, Langille MGI & Brinkman FSL (2013) IslandViewer update: improved genomic island discovery and visualization. *Nucleic Acids Res* 41: 129–132.
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U & Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Micro* 2: 414–424.
- Fernández-Gómez B, Fernández-Guerra A, Casamayor EO, González JM, Pedrós-Alió C & Acinas SG (2012) Patterns and architecture of genomic islands in marine bacteria. *BMC Genomics* 13: 347.
- Friedlander RS, Vlamakis H, Kim P, Khan M, Kolter R & Aizenberg J (2013) Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *P Natl Acad Sci USA* 110: 5624–5629.
- Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P, Bertrand JC (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 42: 568–576.
- Giltner CL, Nguyen Y & Burrows LL (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol R* 76: 740–772.
- Goedeke J, Paul K, Lassak J & Thormann KM (2011) Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *ISME J* 5: 613–626.
- Golyshin PN, Chernikova TN, Abraham WR, Lünsdorf H, Timmis KN & Yakimov MM (2002) Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Micr* 52: 901–911.
- Grimaud R (2010) Biofilm development at interfaces between hydrophobic organic compounds and water. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Timmis KN, ed), pp. 1491–1499. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Grimaud R *et al.* (2012) Genome sequence of the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *J Bacteriol* 194: 3539–3540.
- Guttenplan SB & Kearns DB (2013) Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* 37: 849–871.
- Harms H, Smith K & Wick L (2010a) Introduction: Problems of Hydrophobicity/Bioavailability. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Timmis KN, ed), pp. 1437–1450. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Harms H, Smith K & Wick L (2010b) Microorganism-Hydrophobic Compound Interactions. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Timmis KN, ed), pp. 1479–1490. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B & Speed TP (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31: e15.

Jiménez V, Bravo V & Gutierrez LG (2011) Integral approach for improving the degradation of recalcitrant petrohydrocarbons in a fixed-film reactor. *Water Air Soil Poll* 220: 301–312.

Johnsen AR, Wick LY & Harms H (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* 133: 71–84.

Jung J, Noh J & Park W (2011) Physiological and metabolic responses for hexadecane degradation in *Acinetobacter oleivorans* DR1. *J Microbiol* 49: 208–215.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M & Tanabe M (2013) Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 42: 199–205.

Klein B, Grossi V, Bouriat P, Goulas P & Grimaud R (2008) Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane-water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Res Microbiol* 159: 137–144.

Krell T, Lacal J, Muñoz-Martínez F, Reyes-Darias JA, Cadirci BH, García-Fontana C & Ramos JL (2011) Diversity at its best: bacterial taxis. *Environ Microbiol* 13: 1115–1124.

Langille MGI, Hsiao WWL & Brinkman FSL (2010) Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. *Nat Rev Micro* 8: 373–382.

Mara K, Decorosi F, Viti C *et al.* (2012) Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel. *Res Microbiol* 163: 161–172.

Márquez MC & Ventosa A (2005) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier *et al.* 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen *et al.* 1999 are heterotypic synonyms. *Int J Syst Evol Micr* 55: 1349–1351.

Marsh JW & Taylor RK (1999) Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J Bacteriol* 181: 1110–1117.

Mounier J (2013) Functional characterization of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 genes involved in biofilm development on hydrophobic organic compounds. PhD Thesis. Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France

Notomista E, Pennacchio F, Cafaro V, Smaldone G, Izzo V, Troncone L, Varcamonti M & Donato A (2011) The marine isolate *Novosphingobium* sp. PP1Y shows specific adaptation to use the aromatic fraction of fuels as the sole carbon and energy source. *Microbial Ecol* 61: 582–594.

Partridge JD & Harshey RM (2013) Swarming: flexible roaming plans. *J Bacteriol* 195: 909–918.

Pelcic V (2008) Type IV pili: *e pluribus unum* ? *Mol Microbiol* 68: 827–837.

Porter SL, Wadhams GH & Armitage JP (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Micro* 9: 153–165.

Rahimpour M, Montero M, Almagro G *et al.* (2013) GlgS, described previously as a glycogen synthesis control protein, negatively regulates motility and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Biochem J* 452: 559–573.

Rice SA, Tan CH, Mikkelsen PJ, Kung V, Woo J, Tay M, Hauser A, McDougald D, Webb JS & Kjelleberg S (2008) The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J* 3: 271–282.

Rojo F (2009) Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol* 11: 2477–2490.

Sabirova JS, Becker A, Luensdorf H, Nicaud JM, Timmis KN & Golyshin PN (2011) Transcriptional profiling of the marine oil-degrading bacterium *Alcanivorax borkumensis* during growth on *n*-alkanes. *FEMS Microbiol Lett* 319: 160–168.

Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LAH, Davies DG & Gilbert P (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 186: 7312–7326.

Saville RM, Dieckmann N & Spormann AM (2010) Spatiotemporal activity of the *mshA* gene system in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 308: 76–83.

Shime-Hattori A, Iida T, Arita M, Park KS, Kodama T & Honda T (2006) Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 264: 89–97.

Simon A & Biot E (2010) ANAIS: Analysis of NimbleGen arrays interface. *Bioinformatics* 26: 2468–2469.

Sonnenschein EC, Syit DA, Grossart HP & Ullrich MS (2012) Chemotaxis of *Marinobacter adhaerens* and its impact on attachment to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Appl Environ Microb* 78: 6900–6907.

Tanaka D, Takashima M, Mizuta A, Tanaka S, Sakatoku A, Nishikawa A, Osawa T, Nogushi M, Aizawa SI & Nakamura S (2010) *Acinetobacter* sp. Ud-4 efficiently degrades both edible and mineral oils: isolation and characterization. *Curr Microbiol* 60: 203–209.

Thormann KM, Saville RM, Shukla S, Pelletier DA & Spormann AM (2004) Initial phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol* 186: 8096–8104.

Tribelli PM, Martino CD, López NI & Iustman LJR (2012) Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation* 23: 645–651.

Vaysse PJ, Prat L, Mangenot S, Cruveiller S, Goulas P & Grimaud R (2009) Proteomic analysis of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm formation at the alkane-water interface reveals novel proteins and cellular processes involved in hexadecane assimilation. *Res Microbiol* 160: 829–837.

Volkman JK & Tanoue E (2002) Chemical and biological studies of particulate organic matter in the ocean. *J Oceanogr* 58: 265–279.

Wakeham SG, Lee C, Hedges JI, Hernes PJ & Peterson ML (1997) Molecular indicators of diagenetic status in marine organic matter. *Geochim Cosmochim Acta* 61: 5363–5369.

Wang W & Shao Z (2012) Diversity of flavin-binding monooxygenase genes (almA) in marine bacteria capable of degradation long-chain alkanes. *FEMS Microbiol Ecol* 80: 523–533.

Webb JS, Thompson LS, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M & Kjelleberg S (2003) Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 185: 4585–4592.

Yakimov MM, Timmis KN & Golyshin PN (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotech* 18: 257–266.

Yoshimura K & Hama T (2012) Degradation and dissolution of zooplanktonic organic matter and lipids in early diagenesis. *J Oceanogr* 68: 205–214.

TABLES

Table 1: Biofilm growth ability of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 on various hydrophobic organic compounds

Substrates	Chemical class	Final concentration ^a	Biofilm growth ^b
1-phenyldecane	alkyl-substituted aromatic	0.2%	0.17 ± 0.02
pristane	branched alkane	0.2%	0
heptamethylnonane	branched alkane	0.2%	0
methyl-laurate	ester	0.2%	6.6 ± 0.8
<i>n</i> -hexadecane	<i>n</i> -alkane	0.2%	1.4 ± 0.3
<i>n</i> -tetradecane	<i>n</i> -alkane	0.2%	2 ± 0.1
<i>n</i> -dodecane	<i>n</i> -alkane	0.2%	0.3 ± 0.01
1-hexadecene	<i>n</i> -alkene	0.2%	0.6 ± 0.2
1-tetradecene	<i>n</i> -alkene	0.2%	0.2 ± 0.02
<i>n</i> -octanol	saturated fatty alcohol	0.2%	0
oleic acid	unsaturated fatty acid	0.2%	2.8 ± 0.8
triolein	unsaturated triglyceride	0.2%	0.5 ± 0.02
eicosane	<i>n</i> -alkane	solid	8.8 ± 0.2
dotriacontane	<i>n</i> -alkane	solid	0.2 ± 0.04
paraffin	<i>n</i> -alkanes (C ₁₉ to C ₃₁)	solid	9.8 ± 0.5
palmitic acid	saturated fatty acid	solid	11.7 ± 0.5
hexadecan-1-ol	saturated fatty alcohol	solid	6.6 ± 0.1
tripalmitin	saturated triglyceride	solid	12.5 ± 0.5
cetyl palmitate	wax ester	solid	8.9 ± 0.3

^a percentages are in v/v; ^b Biofilm growth relates to crystal violet staining intensity (OD_{595nm}; see materials and methods).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Biofilm growth phenotype of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 on various solid HOCs.

Biofilm formation was estimated by crystal violet staining after 24 h of growth on a medium-chain (eicosane, C₂₀) or a long-chain alkane (dotriacontane, C₃₂), on a mix of medium- and long-chain alkanes (paraffin, C₁₉ to C₃₁), on a saturated fatty acid (palmitic acid, C₁₆), on a saturated fatty alcohol (hexadecan-1-ol, C₁₆), on a saturated triglyceride (tripalmitin) and on a wax ester (cetyl palmitate, C₃₂). Growth tests were performed in triplicate (rep 1-3). A no-cell control that was initially inoculated with sterile SSW medium shows reference crystal violet staining.

Figure 2: Microscopy of *M. hydrocarbonoclasticus* biofilms on *n*-hexadecane and triolein.

M. hydrocarbonoclasticus SP17-derived MJ6-1 strain expressing eYFP was grown for 24 h in SSW medium supplemented with *n*-hexadecane (a, b) or triolein (c, d) labeled with pyrene.

(a) and (c) differential interference contrast (DIC) images of one focus plane showing mature biofilms at the water-HOC interface. (b) epifluorescence microscopy of the same focus plane observed in (a) with bacterial cells expressing eYFP (yellow fluorescence) onto *n*-hexadecane (blue fluorescence). (d) structured-illumination epifluorescence microscopy (ApoTome) of the same focus plane observed in (c) with bacterial cells expressing eYFP (yellow fluorescence) onto triolein (blue fluorescence).

Figure 3: “Triangle plot” of gene relative expression among the three culture conditions.

Every gene is represented by a point whose proximity to each of the substrate-labeled corners reflects the relative expression in that growth condition (see “Materials and Methods” for the numerical formula). Genes expressed in a single condition lie close to the corner, whereas those expressed equally in two conditions versus the third lie close to the triangle sides. Genes not significantly biased in any pair-wise comparison ($p\text{-val} > 0.05$) are not shown. The small gray triangle shows the position of the main triangle plot in a 1 x 1 x 1 side triangle. A) Genes of the HEX⁺, HEX⁻, TRI⁺, TRI⁻, HEX⁺TRI⁺ and HEX⁻TRI⁻ expression categories are highlighted as colored open circles (A). B) to D) triangles highlight genes of

the TRI⁺ category mapped in the KEGG PATHWAY database as involved in carbohydrate metabolism, amino acid metabolism and translation, respectively. Genes of the last category were shared between those coding ribosomal proteins (red dots) and those involved in other translation mechanisms (blue dots). E) Key genes of the HEX⁺ category. F) Genes annotated as involved in chemotaxis and motility. G) Genes of the 2-Mb region.

Figure 4: Classification and occurrence of the KEGG terms annotating the genes differentially expressed in biofilms on *n*-hexadecane and triolein.

The annotation terms obtained from the mapping of the genes of the BF HEX (gray box), and the BF COM (open box) and BF TRI (black box) groups in the KEGG pathway/genome database were classified according to their expression profiles (down- or over-expressed). Numbers refer to the number of KEGG annotation terms in each category.

Figure 5: Representation of the carbohydrate metabolism response of *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm on triolein.

The figure summarizes the KEGG PATHWAY mapping of the genes of the TRI expression category annotated as involved in glycolysis, fermentation, the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. Gene names and TRI vs AC ratios are indicated. Only key metabolites are indicated. G6P, glucose-6-phosphate; F1,6diP, fructose-1,6-biphosphate. G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; PEP, phosphoenol-pyruvate; Pyr, pyruvate; Ac CoA, acetyl CoA; Acetaldh, acetaldehyde; AOA, oxaloacetate; α KGlu, alpha-ketoglutarate; Suc CoA, succinyl CoA; TCA, tricarboxylic acid.

Figure 6: Differential expression of the chemotaxis and motility genes in biofilms at HOC-water interfaces.

A) Differential expression of the chemosensory system. The regulation of the flagellum assembly and rotation and type IV pili function use similar molecular mechanisms. A histidine kinase (CheA, ChpA) is coupled to a methyl-accepting chemotaxis receptor (MCP, PilJ) by an adaptor protein (CheW, PilI). Upon receipt of a signal, the histidine kinases autophosphorylate, and phosphate groups are transferred to response regulators (CheY and CheB; PilG and PilH). Gray triangles in boxes represent down-expression; upper left triangle, *n*-hexadecane condition; bottom right triangle, triolein condition.

B) Differential expression of genes in clusters of type IV pili genes. Down-expressed genes are represented as gray open arrows.

Figure 7: Mapping of the putative genetic features and the differentially expressed genes onto the *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome.

The *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome map was generated with the DNAPlotter Java application of the Artemis genome viewer software. The tracks from the outside represent the scale in megabases; the forward coding and reverse coding sequences (CDS) with the CDS annotated as mobile and extra-chromosomal elements are in black; GI predictions by IslandPath-DIMOB (blue box), SIGI-HMM (orange box), IslandPick (green box) and all three methods (red box); the locations of a putative Pf1-like prophage (position 0.55 Mb) and the 2-Mb region (gray boxes); the genes of the TRI⁺, HEX⁻, HEX⁺TRI⁺, HEX⁺, TRI and HEX⁻TRI⁻ categories, respectively, with same colors as in Figure 3; and the %GC plot.

Figure 8: Genome alignment between *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 and VT8 strains using the MAUVE algorithm.

The MAUVE progressive alignments between *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 and VT8 genomes defined locally collinear blocks of homologous regions. Homologous regions are indicated by similarly colored blocks and are connected by lines. The boundaries of colored blocks usually indicate the breakpoints of genome rearrangement, unless a sequence has been gained or lost in the breakpoint region. The black open box located around the 2-Mb position in the *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 genome points to the putative 2-Mb GI region that has no homologous counterpart in the *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 genome.

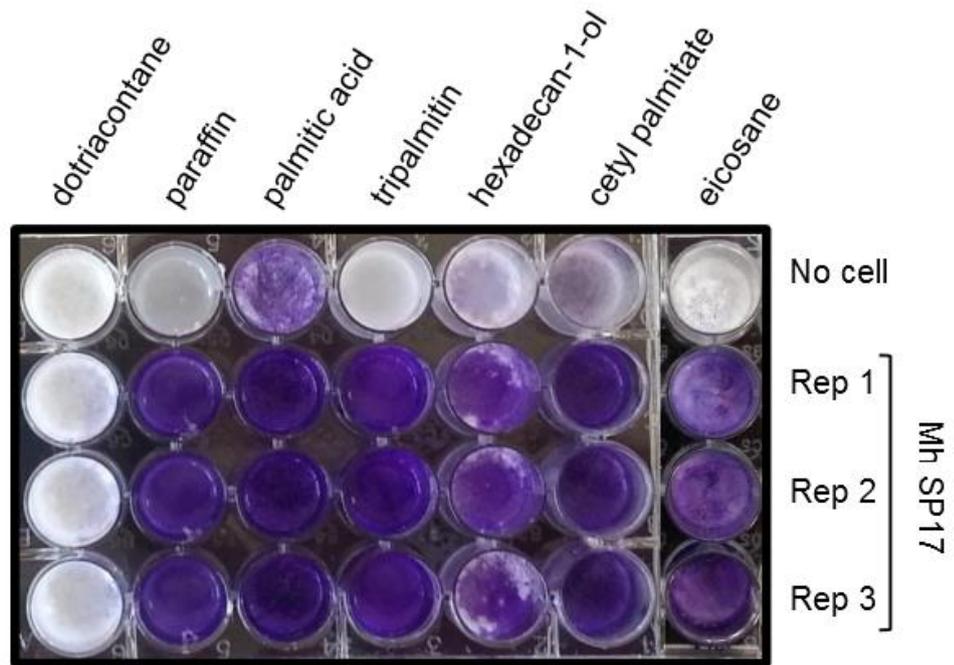


Figure 1

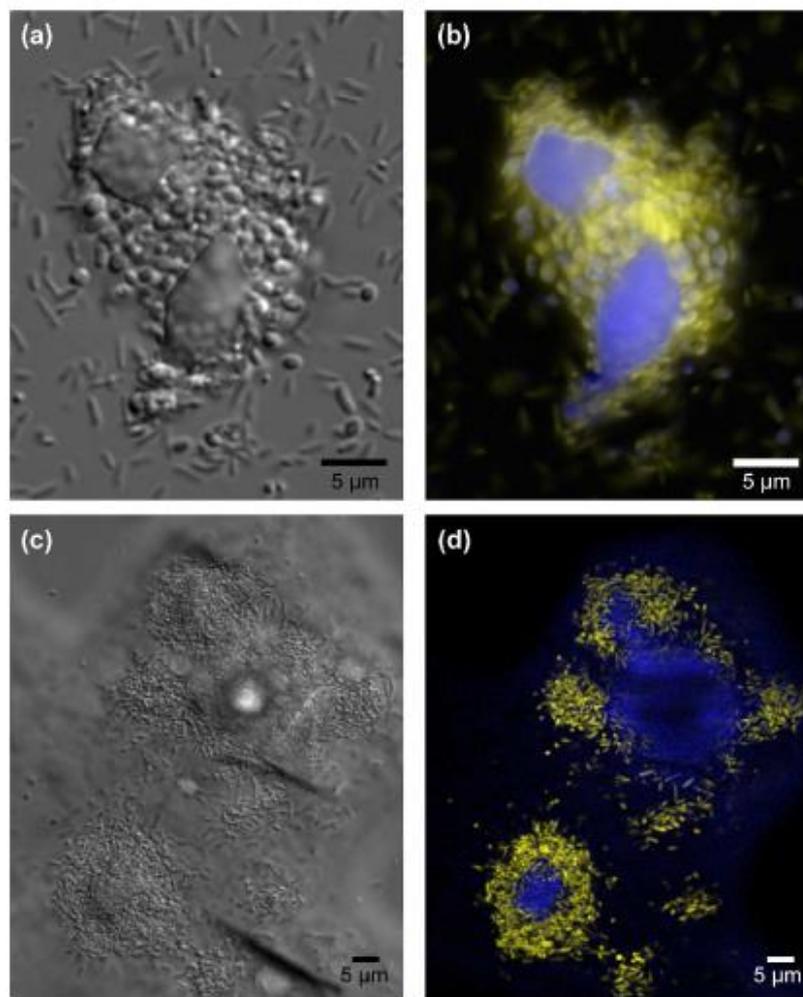


Figure 2

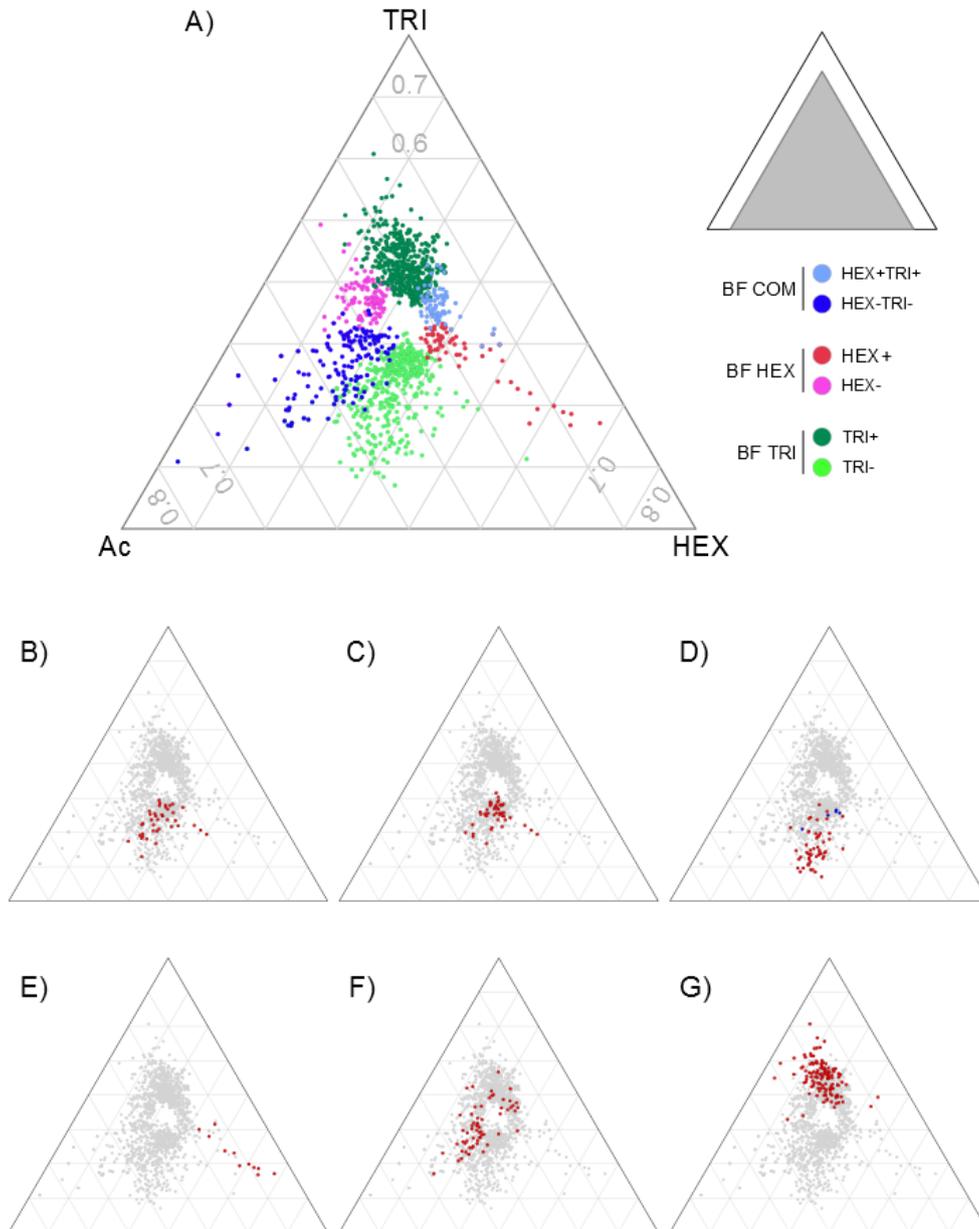


Figure 3

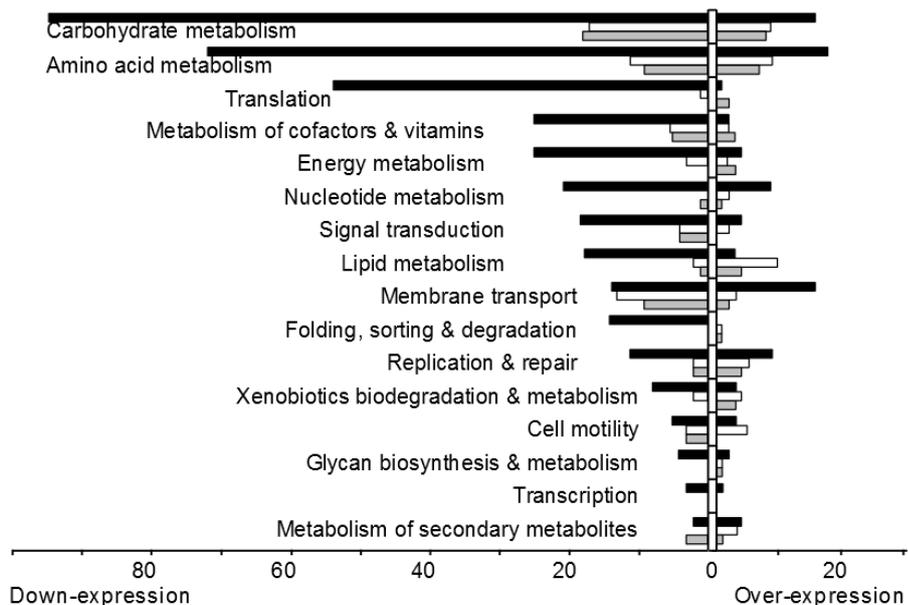


Figure 4

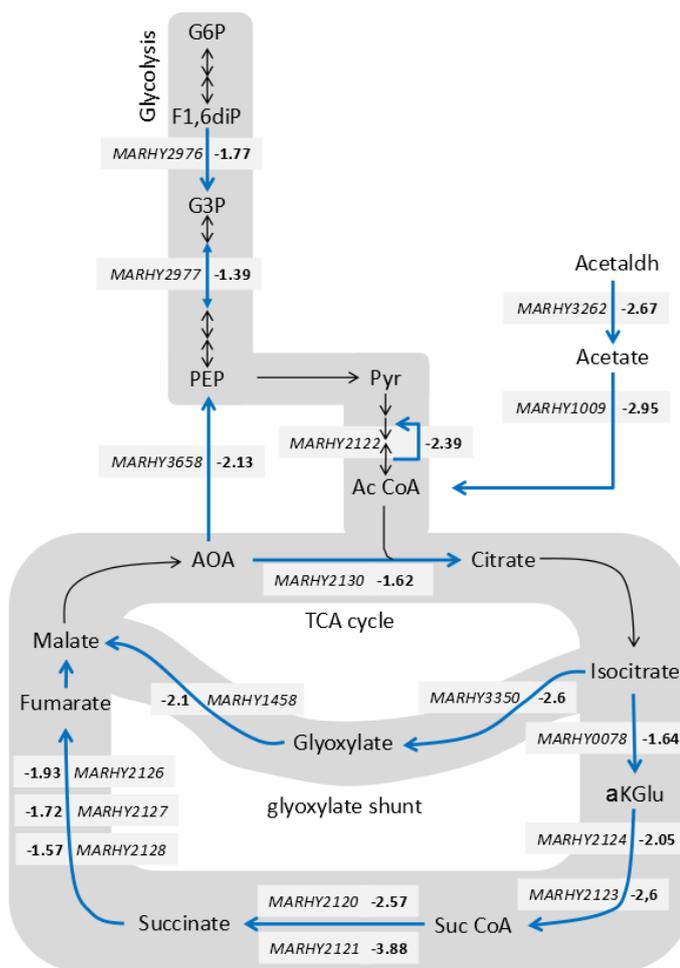


Figure 5

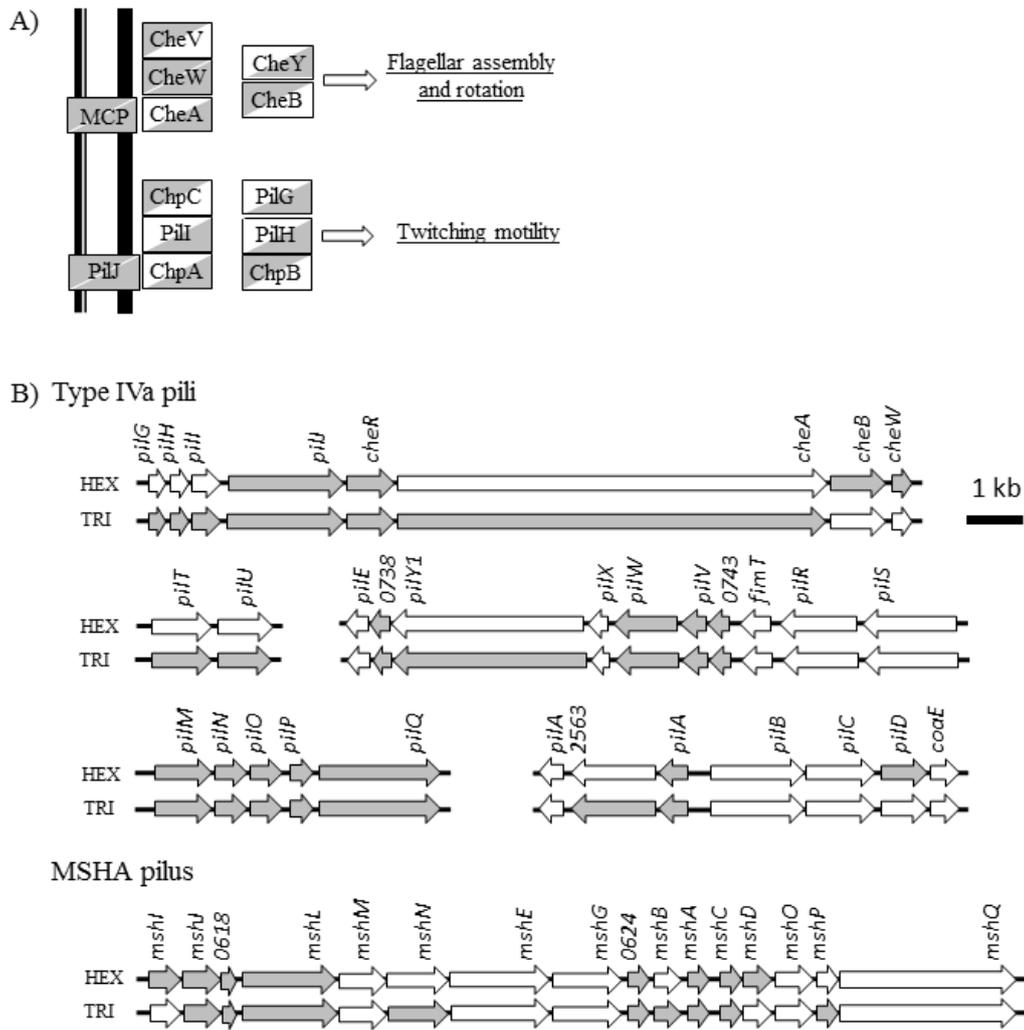


Figure 6

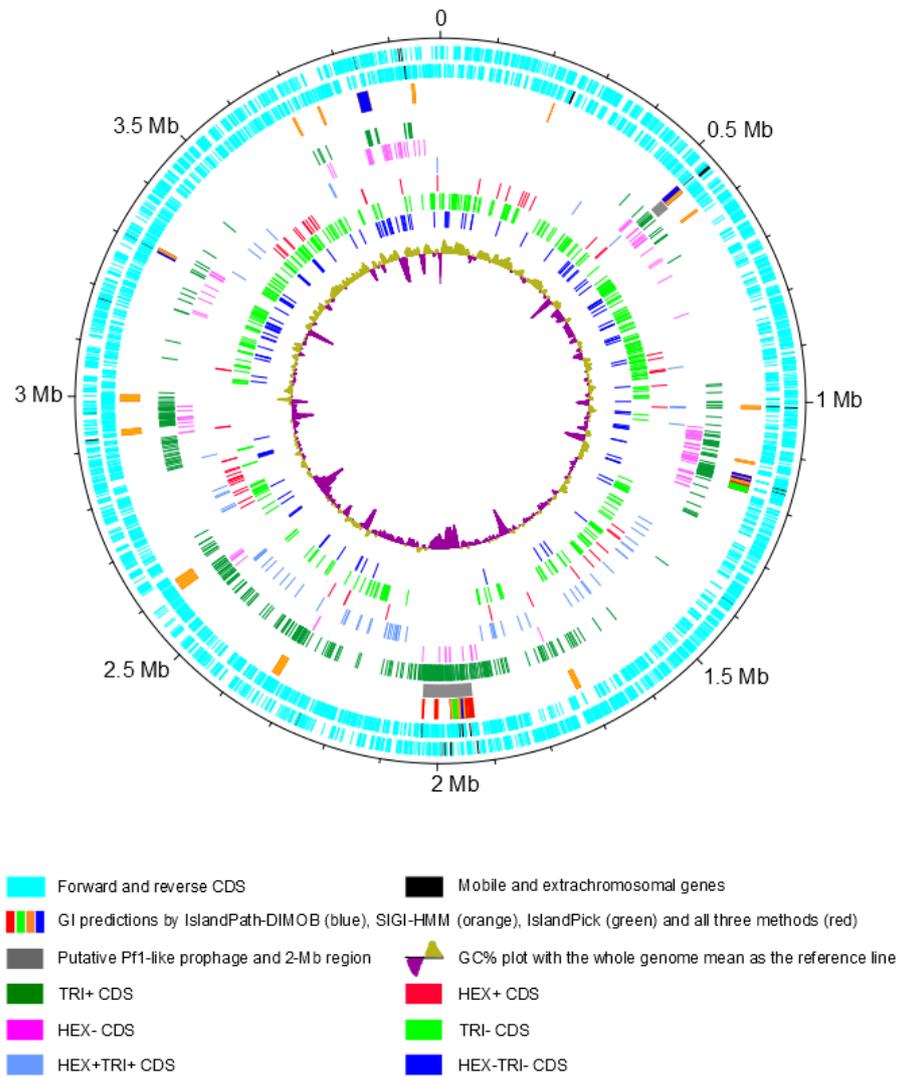


Figure 7

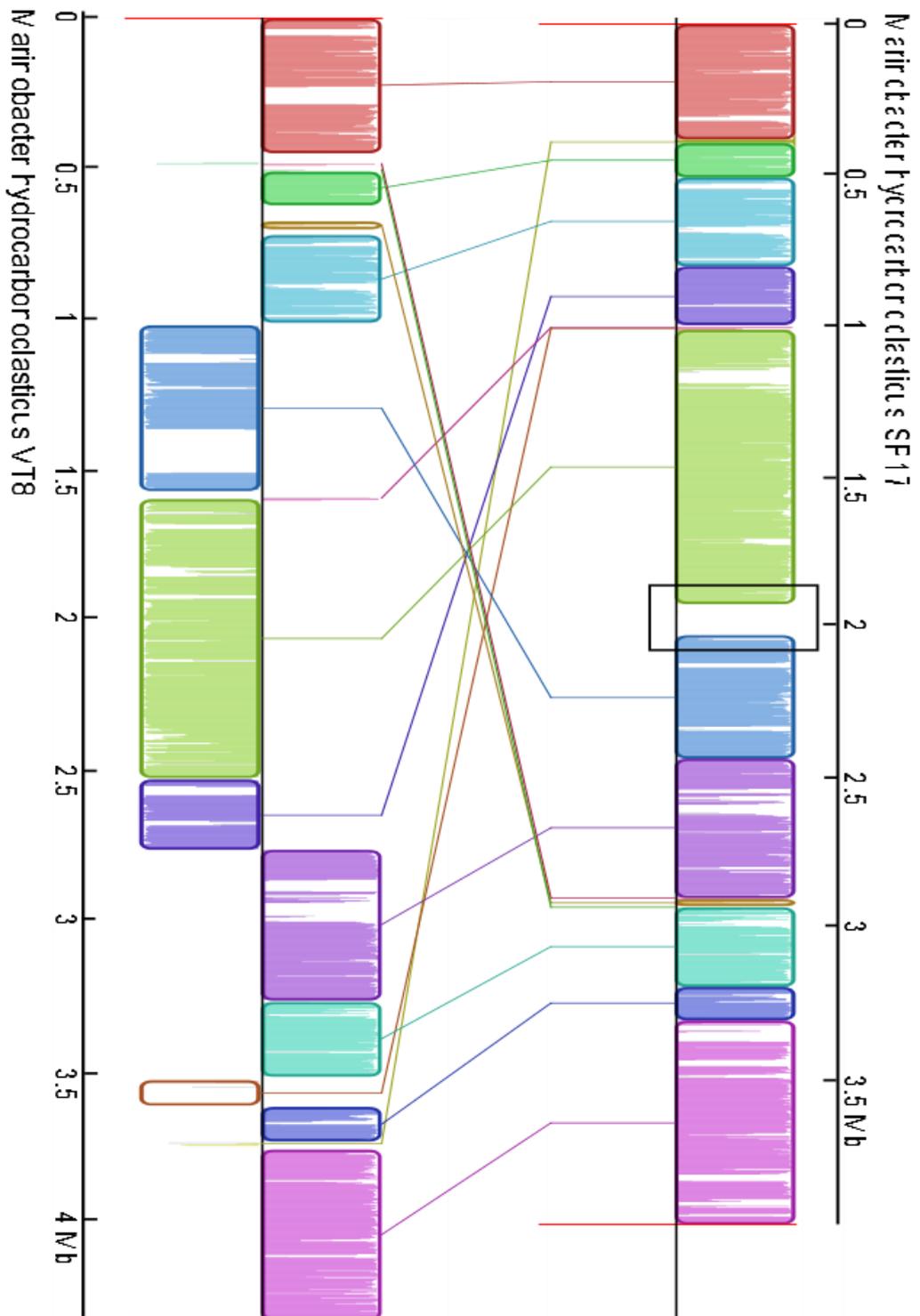


Figure 8

Annexe 2 : Article « RNB info n°5 »

Article parut sur le site web du RNB (Réseau National Biofilm) :

https://colloque2.inra.fr/reseau_national_biofilm/actualites/rnb_info_n5

Le bulletin d'information du Réseau National Biofilms

RNB.info



Plats de résistance pour microbes

Julie Mounier, Habiba Ennouri, Arantxa Camus, Pierre Sivadon et Régis Grimaud

Institut Pluridisciplinaire de Recherche en Environnement et Matériaux, Equipe Environnement et Microbiologie, UMR 5254, CNRS, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.

Au laboratoire nous nourrissons nos organismes préférés, les bactéries, avec des milieux nutritifs contenant en excès et sous forme soluble tous les nutriments nécessaires à leur croissance rapide. Les milieux permettant leur culture contiennent des sources de carbone et d'énergie rapidement assimilables comme les sucres, les acides aminés ou les petits acides organiques (acide acétique, lactique, pyruvique...).

Les bactéries chimio-organohétérotrophes que l'on retrouve en grand nombre dans beaucoup d'écosystèmes puisent leur énergie et leur carbone dans des composés organiques généralement plus complexes et moins accessibles. Dans les écosystèmes naturels le carbone organique est synthétisé par les producteurs primaires qui sont principalement les plantes dans les milieux terrestres et le phytoplancton dans les milieux aquatiques. Une part importante de ce carbone organique n'est pas dissous dans l'eau. Dans les océans, par exemple, une

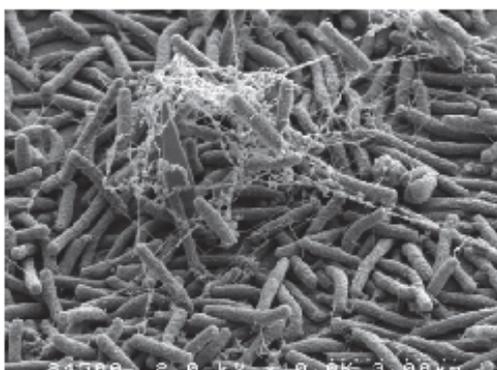


Des biofilms à manger! www.office-bacteria.com

grande partie du carbone organique existe sous forme de particules dont la taille varie de quelque nm à plusieurs mm. On parle alors de Carbone Organique Particulaire (COP). Ces particules sont formées par des débris d'organismes morts, de la matière fécale ainsi que par l'agrégation de macromolécules en colloïdes. Leur nature chimique est complexe ; elles contiennent un mélange d'un grand

nombre de différents composés organiques comme les protéines, les polysaccharides et les lipides et de la matière organique non-caractérisée.

Les substances polymériques sont de loin les plus abondantes. La chitine, par exemple, est le bio-polymère le plus abondant dans les océans. C'est un élément essentiel des parois cellulaires de certaines algues et un constituant majeur des cuticules et des exosquelettes de mollusques et d'arthropodes du zooplancton. La production de chitine dans la biosphère aquatique est énorme. Les estimations de la quantité annuelle de chitine générée par un seul genre de zooplancton marin (copépodes) dépassent le milliard de tonnes. Dans les milieux terrestres, c'est la cellulose présente dans toutes les plantes qui est le polymère biologique le plus abondant.



Des substances exopolymériques localisées.
A. Canette, Inra Mima2.

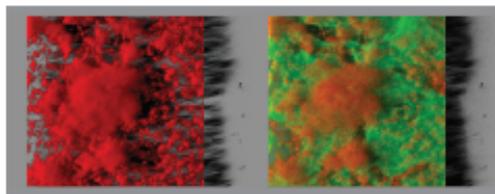
Les protéines sont également des composés importants de la matière organique car elles entrent pour une grande part dans la constitution de toute cellule. Bien que les lipides et les hydrocarbures soient moins abondants que les substances polymériques, ils constituent tout de même une part non négligeable de la matière organique (15 à 20% du carbone organique en milieu marin). Les lipides sont en effet des constituants de tout être vivant où ils forment les membranes, servent de composés de réserve ou forment

une grande partie des pigments photosynthétiques tel que la chlorophylle. L'origine des hydrocarbures est plus diverse. Une partie est d'origine biotique car synthétisée par certains organismes comme les plantes et les algues. Les hydrocarbures retrouvés dans l'environnement sont aussi d'origine pétrolière provenant soit du suintement naturel des formations géologiques pétrolifères affleurant la surface, soit de pollutions chroniques ou accidentelles. La quasi-totalité de ce carbone organique est recyclée, c'est à dire transformé en CO_2 et en matière vivante. Les principaux acteurs de ce gigantesque recyclage sont les procaryotes chimio-organo-hétérotrophes qui l'utilisent comme source de carbone et d'énergie.

Il est généralement admis que les bactéries ne peuvent assimiler que les composés dissous dans l'eau ayant un poids moléculaire inférieur à environ 1000 Da. Par conséquent, les macromolécules et les molécules hydrophobes de la COP ne sont pas directement accessibles aux bactéries. Leur assimilation nécessite la mise en place de processus permettant de réduire leur taille et/ou d'augmenter leur solubilisation. En maintenant les populations cellulaires attachées aux particules et confinées dans une matrice d'exo-polymères, le mode de vie biofilm crée une situation favorable pour l'assimilation des composés organiques non-solubilisés. Il s'agit donc de biofilms qui se développent sur une interface nutritive. Ils sont en cela différents des biofilms généralement étudiés en laboratoire qui se développent sur un support inerte tel que le plastique, les métaux ou le verre.

Pour les polymères, protéines et polysaccharides, trop gros pour entrer directement dans la cellule, la stratégie employée par les bactéries est de sécréter des enzymes extracellulaires qui hydrolysent ces polymères en monomères ou oligomères de faible poids moléculaire, solubles dans l'eau et

donc directement assimilables. Les avantages apportés par le mode vie biofilm dans ce processus apparaissent alors clairement.



Un biofilm bactérien (en rouge) se développant sur de la paraffine (en vert). P. Branchu, Inra.

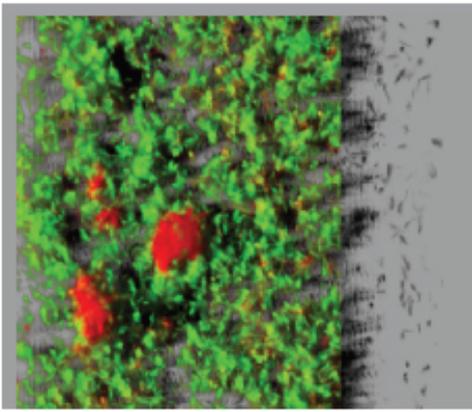
Les exo-enzymes sont retenues au sein du biofilm à proximité ou en contact du substrat par la matrice extracellulaire, évitant ainsi leur perte par dilution dans le milieu environnant. La matrice retient également les produits de dégradation à proximité des cellules résidant dans le biofilm. La dégradation de la chitine et de la cellulose respectivement par les bactéries chitinolytiques et cellulolytiques s'inscrit tout à fait dans ce schéma.

Les bactéries utilisant les composés organiques hydrophobes (COH), lipides et hydrocarbures, comme source de carbone et d'énergie sont très diverses et sont retrouvées dans de nombreux écosystèmes. Dans les milieux aqueux, les COH forment des systèmes biphasiques comprenant une phase aqueuse et une phase organique. Les bactéries planctoniques, flottant dans la phase aqueuse, ne peuvent assimiler que la fraction de COH dissoute dans l'eau. La vitesse de dégradation des COH et, en conséquence, la croissance des bactéries sont limitées par le taux de transfert de masse du COH de la phase organique vers les cellules dans la phase aqueuse. Ce transfert de masse comprend la dissolution des molécules dans l'eau, leur diffusion à travers la couche limite de diffusion recouvrant l'interface et leur mélange par convection ou brassage dans phase aqueuse. Pour les composés les plus hydrophobes,

comme les alcanes et les acides gras à longues chaînes, le processus de transfert est trop lent pour permettre des temps de division de l'ordre de l'heure qui sont communément observés. Dans des cultures de bactéries dégradant les COHs, les gouttelettes ou les cristaux d'hydrocarbures sont recouverts par un biofilm d'une ou de plusieurs couches de bactéries. Le taux de croissance des cellules adhérees est bien supérieur au taux de croissance suggéré par le taux de transfert de masse de l'hydrocarbure en l'absence de bactérie. Il est donc clair que le mode de croissance biofilm favorise le transfert de masse et ainsi stimule la croissance sur COH. Cet accroissement du taux de transfert de masse au sein du biofilm s'explique au moins en partie par un effet de distance entre l'interface et les cellules consommant le substrat. En effet, selon la loi de diffusion de Fick, le taux de diffusion dépend, entre autres, de la distance sur laquelle le composé diffuse. Au sein d'un biofilm, la distance entre les cellules et l'interface est réduite, de l'ordre du μm ou de la dizaine de μm , permettant ainsi d'augmenter d'un facteur 100 le taux de transfert de masse diffusif.

Pour survivre dans l'environnement l'agent du choléra, *Vibrio cholerae*, adhère aux débris de carapaces de crustacés formés de chitine qu'il dégrade afin de s'en nourrir. L'adhésion de *V. cholerae* à la chitine met en jeu un type de pilus différent de celui utilisé pour l'adhésion à la cellulose que cette bactérie n'est pas capable de dégrader. La voie de développement du biofilm sur la chitine nutritive serait donc différente de celle du biofilm sur la cellulose inerte. D'autre part la présence d'une interface nutritive peut induire une régulation de l'expression génique. En effet, chez la bactérie chitinolytique *Xylella fastidiosa*, des gènes d'adhésion sont surexprimés lorsqu'elle est en présence de chitine colloïdale. Cette bactérie est donc capable de reconnaître la présence

du substrat sur lequel elle forme un biofilm. La nature nutritive et insoluble de l'interface sont de la même façon des facteurs importants dans le déterminisme de la formation d'un biofilm sur les COH. Il a été ainsi observé que les biofilms sont plus abondants sur les hydrocarbures les moins solubles. La souche modèle *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 montre d'autre part une forte préférence pour les supports métabolisables lors de la formation de biofilms. De plus, une étude transcriptomique menée sur cette même souche a montré que les cellules répondent spécifiquement et rapidement, en moins de 15 min, à l'adhésion à une surface nutritive. Ces observations suggèrent que les bactéries formant des biofilms sur les composés hydrophobes seraient capables de reconnaître la nature nutritive de l'interface.



Des bactéries (en vert) qui se nourrissent de substrats hydrophobes (en rouge). P. Branchu, Inra.

Dans de nombreux écosystèmes où une forte proportion de la matière organique servant de source de carbone et d'énergie se trouve dans un état non solubilisé et donc non directement accessible, le mode de vie biofilm permet à certaines espèces d'accéder à ces substrats et donc d'occuper la niche écologique constituée par les interfaces nutritives. En contrepartie, le mode de vie

biofilm est plus coûteux en termes de synthèse de macromolécules et de régulation génétique. L'avantage sélectif conféré par la possibilité d'assimiler des substrats non-solubilisés et à fort potentiel énergétique peut justifier le maintien de ce mode de vie. Enfin, en permettant le recyclage d'une part importante du carbone organique non accessible à la plupart des micro-organismes, les biofilms se développant sur des interfaces nutritives jouent un rôle primordial dans le cycle biogéochimique du carbone et par conséquent dans l'équilibre général des écosystèmes.

Pour aller plus loin :

Microbial structuring of marine ecosystems. Azam, F., et F. Malfatti. 2007. *Nature Reviews Microbiology* 5:782-791.

The Vibrio cholerae chitin utilization program. Meibom, K., X. Li, A. Nielsen, C. Wu, S. Roseman, et G. Schoolnik. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2524-2529.

Differentiation of Chitinase-Active and Non-Chitinase-Active Subpopulations of a Marine Bacterium during Chitin Degradation. Baty, A. M., C. C. Eastburn, Z. Diwu, S. Techakarnjanaruk, A. E. Goodman, et G. G. Geesey. 2000. *Applied and Environmental Microbiology* 66:3566-3573.

A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by Vibrio cholerae El Tor. Watnick, P. I., K. J. Fullner, et R. Kolter. 1999. *Journal of Bacteriol.* 181:3606-3619.

Microorganism-hydrophobic compound interactions. Harms, H., Smith, K.E.C., and Wick, L.Y. (2009) *In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Timmis, K.N. (ed.). Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, pp. 1479-1490.

Biofilm Development at Interfaces between Hydrophobic Organic Compounds and Water. Grimaud, R. 2010. *In K.N. Timmis (éd.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Springer Berlin Heidelberg, p. 1491-1499.

Cells dispersed from Marinobacter hydrocarbonoclasticus SP17 biofilm exhibit a specific protein profile associated with a higher ability to reinitiate biofilm development at the hexadecane-water interface. Vaysse, P., P. Sivadon, P. Goulas, et R. Grimaud. 2011. *Environmental Microbiology* 13:737-746.

Résumé

Les composés organiques hydrophobes (HOC), une grande famille de molécules naturelles ou d'origine anthropique incluant les lipides et les hydrocarbures, constituent une part significative de la matière organique dans les écosystèmes marins. Du fait de leur faible solubilité dans l'eau, les bactéries qui les dégradent requièrent la mise en place de fonctions cellulaires spécifiques permettant d'augmenter la fraction assimilable de ces HOC. La formation de biofilms à l'interface eau-HOC est une de ces stratégies adaptatives. C'est le cas pour *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, modèle d'étude utilisé au laboratoire, qui est capable de former des biofilms sur un large spectre de HOC métabolisables tels que les alcanes, les triglycérides et les alcools gras. Le but de mes recherches consistait à améliorer la compréhension du processus d'adhésion et de développement des biofilms sur les HOC, à travers la caractérisation fonctionnelle de 10 gènes candidats mis en évidence lors d'analyses d'expression en protéomique et en transcriptomique. Pour mener à bien ce projet, des outils génétiques et une caractérisation fonctionnelle propre à chaque gène ont dû être développés.

L'étude fonctionnelle du gène *MARHY2686* a relevé son implication dans la formation de biofilm sur les alcanes. La co-expression de *MARHY2686* et des gènes adjacents *MARHY2687* et *MARHY2685* en transcriptomique, leur distribution phylogénétique et leur conservation de la synténie suggèreraient que ces trois gènes soient impliqués dans le même processus biologique. D'après l'identité forte de 36 % qui existe entre la protéine *MARHY2686* et une protéine périplasmique AdeT d'un système de pompe d'efflux tripartite d'*Acinetobacter baumannii*, cette protéine, en association avec *MARHY2687* et *MARHY2685*, pourrait faire partie d'un système de ce type. Par ailleurs, des observations ont permis d'envisager une implication potentielle de ce gène dans l'assimilation des HOC ou dans l'accumulation des réserves lipidiques intracellulaires. *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 utilise les pili de type IV lors de la formation de biofilm sur les HOC. Ces appendices interviennent lors de l'adhésion de cette souche à des HOC ainsi que dans un processus de détachement d'un support hydrophobe. Les pili pourraient soit intervenir directement pour permettre à la bactérie de se détacher de la surface à laquelle elle s'est adhéree, soit indirectement par l'action de bactériophages. La présence d'une mobilité de type twitching sur les HOC a pu être également envisagée. Enfin, le rôle du système de sécrétion de type VI (T6SS), connu pour permettre à la bactérie d'interagir avec une cellule hôte, lors de la formation de biofilm mono-spécifique sur HOC, où aucun autre microorganisme que *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 n'est présent, a été étudié.

Mots clés : bactérie marine, alcane, composés organiques hydrophobes, biofilm, adhésion, détachement, flagelle, pili de type IV, système de sécrétion de type VI, pompes d'efflux.

Summary

Hydrophobic organic compounds (HOC), a large family of naturally-produced or anthropogenic molecules including lipids and hydrocarbons, represent a significant part of organic matter in marine ecosystems. Because of their low solubility in water, bacteria that degrade those compounds require the establishment of specific cell functions to increase their biodisponibility. Biofilm formation in water-HOC interface is one of these adaptations. The model of bacteria used in our laboratory, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, is able to form a biofilm on a wide range of HOC, such as alkanes, fatty alcohols and triglycerides, in order to use them as a carbon and energy source. The main purpose of my work was to broaden the knowledge of how bacteria adhere to and form biofilms on HOC, through the functional characterization of 10 candidate genes highlighted during proteomic and transcriptomic studies. Genetic tools and a gene-specific functional characterization have been developed in order to carry out this project.

Functional study conducted on *MARHY2686* revealed its involvement in the formation of biofilm on alkanes. Co-expression of *MARHY2686* and the adjacent genes *MARHY2687* and *MARHY2685* during transcriptomic analysis together with their phylogenetic distribution and synteny conservation suggest that these three genes are involved in the same biological process. According to the high peptide sequence identity between *MARHY2686* and AdeT, a periplasmic protein of a tripartite efflux pump system of *Acinetobacter baumannii*, *MARHY2686* in combination with *MARHY2687* and *MARHY2685* could be the components of such a system. Other phenotypic observations would consider the involvement of *MARHY2686* either in the assimilation of HOC or in the accumulation of intracellular lipid reserves. *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 uses type IV pili during biofilm formation on HOC. These appendages are involved in the adhesion of this strain to and in a detachment process from HOC. Type IV pili could either act directly to allow bacteria to detach from the surface to which it is adhered, or indirectly through the action of bacteriophages. The presence of twitching motility on HOC has also been suggested. Finally, the role of the type VI secretion system (T6SS), a well-known protein system which allows interactions between bacteria and host cells, during the formation of a mono-species biofilm on HOC where no other microorganism than *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 is present, has been studied.

Keywords: marine bacterium, alkane, hydrophobic organic compounds, biofilm, adhesion, detachment, flagella, type IV pili, type VI secretion system, efflux pumps.