



Etude fonctionnelle des exopolymères bactériens (EPS) dans la formation des biofilms : synthèse bibliographique

BRGM/RP-55974-FR
Décembre 2007

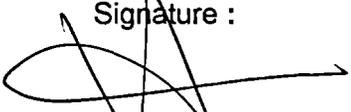


Etude fonctionnelle des exopolymères bactériens (EPS) dans la formation des biofilms : synthèse bibliographique

BRGM/RP-55974-FR
Décembre 2007

C. Michel
Avec la collaboration de
F. Garrido, S. Challan-Belval

<p>Vérificateur :</p> <p>Nom : Battaglia-Brunet Fabienne</p> <p>Date : 5/12/2007</p> <p>Signature :</p> 
--

<p>Approbateur :</p> <p>Nom : Hervé Gaboriau</p> <p>Date : 5/12/2007</p> <p>Signature :</p> 
--

En l'absence de signature, notamment pour les rapports diffusés en version numérique,
l'original signé est disponible aux Archives du BRGM.
Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2000.

Mots clés : Exopolymères bactériens (EPS), Biofilm, Protéines, Glucides, Lipides, eDNA

En bibliographie, ce rapport sera cité de la façon suivante :

Michel C., Garrido F., Challan-Belval S. (2007) – Etude fonctionnelle des exopolymères bactériens (EPS) dans la formation des biofilms : synthèse bibliographique. BRGM/RP-55974-FR, 29 p., 3 fig., 4 tabl.

© BRGM, 2007, ce document ne peut être reproduit en totalité ou en partie sans l'autorisation expresse du BRGM.

Synthèse

La thématique Biofilm au BRGM vise à étudier la formation des biofilms bactériens, leur croissance et leurs propriétés (en termes de bioremédiation par exemple), et d'identifier les facteurs qui favorisent ou non la fixation des cellules sur un support. Ce type d'étude est indispensable notamment dans le cadre de la mise au point et de l'amélioration de bioprocédés tels que les bioréacteurs à lit fixé, dont le fonctionnement est basé sur l'activité d'un biofilm. De plus, les biofilms correspondant au mode de vie de 99% des microorganismes en milieux naturels, leur étude permettra une meilleure compréhension de la biogéochimie environnementale (sol de surface, sous-sol et sédiments).

Un certain nombre de paramètres ayant un impact sur la formation des biofilms et de facteurs de contrôles ont d'ores et déjà été identifiés. Ainsi, la nature du support de croissance, la température, le temps de séjour... influencent la capacité des microorganismes à se développer sous forme de biofilm. Les travaux ont également montré que les exopolymères bactériens (EPS pour ExoPolymeric Substances) ont un rôle crucial, et qu'il faut donc tenir compte de ce facteur biologique pour l'étude des biofilms. Dans le cadre du développement de bioprocédés mettant en œuvre des biofilms, l'objectif est de jouer sur les facteurs physicochimiques et biologiques pour favoriser la formation et l'activité d'un biofilm.

Les EPS sont des molécules appartenant principalement aux familles des glucides, lipides, protéines, acides uroniques et acides nucléiques. Ces molécules sont excrétées par les cellules. Les EPS ont de nombreuses fonctions, et interviennent en particulier dans la formation et la structure des biofilms. La concentration et la composition de ces EPS dépendent de nombreux paramètres, en particulier des organismes présents, de la nature du support, des conditions environnementales, du degré de maturité du biofilm ... Connaître leur composition et leur fonction au sein d'un biofilm devrait donc permettre d'identifier des molécules clés dont les propriétés pourront être exploitées, par exemple par ajout d'EPS pour favoriser et accélérer la croissance et l'activité des biofilms.

Le présent rapport est une synthèse bibliographique réalisée dans le cadre des projets cibles Enzenv 2007 et Biofilm 2007 (projet cadre Bioproc POLR16). L'objectif ici est de faire l'état de l'art des techniques biochimiques et chimiques qui permettent d'étudier la localisation et les fonctions des EPS au sein d'un biofilm et au cours des différentes phases de sa vie (attachement des premières cellules, maturation et enfin décrochage du biofilm). Les exemples présentés dans ce rapport illustrent l'intérêt de pouvoir réguler la formation des biofilms, et la possibilité d'améliorer des procédés en prenant en compte le « facteur EPS ». Ce facteur biologique peut, selon les cas, être un frein ou un accélérateur pour le bon fonctionnement d'un bioprocédé. Ces travaux soulignent ainsi la possibilité d'utiliser des enzymes ou des molécules biologiques libres (*i.e.* non associées à des microorganismes entiers) pour l'amélioration des procédés.



Sommaire

1. Introduction.....	7
2. EPS de type protéique	9
2.1. UTILISATION DE PROTEASES	9
2.2. UTILISATION D'ANTICORPS.....	10
3. EPS de type glucidique.....	11
3.1. UTILISATION DE L'ACIDE PERIODIQUE (HIO ₄).....	11
3.2. MISE EN EVIDENCE DE POLYSACCHARIDES CONTENANT DES UNITES (1→3)- β ET (1→4)-β-D-GLUCOPYRANOSYL PAR LE CALCOFLUOR	12
3.3. MISE EN EVIDENCE DE POLYSACCHARIDES DE TYPE POLY-β-1,6-GLCNAC	12
3.4. UTILISATION DE LECTINES.....	13
4. EPS de type lipidique	16
5. EPS de type nucléique	18
5.1. UTILISATION DE LA DNASE 1	18
5.2. UTILISATION DE COLORANTS.....	19
6. Conclusions - Applications envisageables	20
6.1. CONCLUSIONS – ETUDES REALISABLES AU BRGM	20
6.2. AMELIORATION DE LA FORMATION DES BIOFILMS DANS DES BIOPROCEDES	20
6.3. ELIMINATION DES EPS NUISIBLES AU FONCTIONNEMENT D'UN BIOPROCEDES	21

6.4. CONCLUSIONS	22
7. Bibliographie.....	24

Liste des illustrations

Figure 1 : Exemple de protocole d'utilisation de la pronase pour l'étude de la fonction des EPS de type protéique au sein d'un biofilm. Ce protocole permet d'étudier le rôle des EPS protéiques dans la phase d'attachement des cellules sur un support	10
Figure 2 : Exemple de protocole d'utilisation de l'acide périodique pour l'étude de la fonction des EPS de type glucidique au sein d'un biofilm	11
Figure 3 : Exemple de protocole pour la mise en évidence de l'effet de biosurfactant (ex : rhamnolipides) sur la structure d'un biofilm (Irie et al., 2005).....	17
Figure 1 : Exemple de protocole d'utilisation de la pronase pour l'étude de la fonction des EPS de type protéique au sein d'un biofilm. Ce protocole permet d'étudier le rôle des EPS protéiques dans la phase d'attachement des cellules sur un support	10
Figure 2 : Exemple de protocole d'utilisation de l'acide périodique pour l'étude de la fonction des EPS de type glucidique au sein d'un biofilm	11
Figure 3 : Exemple de protocole pour la mise en évidence de l'effet de biosurfactant (ex : rhamnolipides) sur la structure d'un biofilm (Irie et al., 2005).....	17
Tableau 1: Exemple de protocoles d'utilisation du calcofluor pour l'étude de la fonction des EPS de type glucidique au sein d'un biofilm (d'après Quintero and Weiner, 1995)	12
Tableau 2 : spécificité de certaines lectines vis-à-vis des glucides (d'après Johsen et al., 2000 ; voir aussi Szwajcer et al., 2006).....	14
Tableau 3 : Techniques potentiellement applicables au BRGM pour l'étude de la fonction et de la localisation des différentes familles d'EPS au sein d'un biofilm.....	20
Tableau 4 : spécificité des enzymes hydrolytiques utilisées pour le relargage des EPS à partir de boues.	22

1. Introduction

Les exopolymères bactériens, ou EPS (Extracellular Polymeric Substances) font partie des constituants majeurs des biofilms, et contribuent à l'adhésion, l'intégrité, la cohésion et aux propriétés des biofilms.

Les EPS sont constitués de glucides, acides uroniques, protéines, lipides, d'ADN, mais également de vésicules, de débris cellulaires,

L'étude des EPS comprend leur quantification, leur identification, leur purification, leur localisation et la détermination de leur rôle au sein du biofilm. De manière générale, les fonctions occupées par les EPS au sein des biofilms sont les suivantes :

- construction/structure/volume du biofilm (ex : polysaccharides neutres)
- sorption : EPS fonctionnant comme des résines échangeuses d'ions, pouvant interagir avec des nutriments ou des ions métalliques... (ex : protéines et polysaccharides hydrophobes ou chargés)
- action sur des molécules : modification de composés, dégradation de substrats polymériques (ex : enzyme extracellulaire)
- information : formation du biofilm, transfert d'information génétique, ... (ex : acides nucléiques) ; reconnaissance cellulaire, interactions bactérie-bactérie et bactérie-support, co-adhésion, co-agrégation (ex : lectine)
- réaction d'oxydation ou de réduction
- nutrition : ces EPS sont une source de carbone (polysaccharides), azote (protéines), phosphore (acides nucléiques)...
- activité de surface : transport de composés actifs, de facteurs de virulences, sorption de métaux, d'antibiotiques... (ex : membranes de vésicules) ; interaction avec les interfaces : adhésion, détachement, fonction dans la structure du biofilm, conditionnement des surfaces... (ex : polymères amphiphiles).

Le BRGM, dans le cadre de ses projets en biologie/biotechnologie, a principalement travaillé depuis ces dernières années sur l'extraction et la quantification des EPS (Garrido *et al.*, 2002), et a également initié des travaux sur la compréhension du rôle des EPS dans la formation des biofilms (Michel *et al.*, 2007). Il s'agit donc maintenant de poursuivre ces travaux sur l'étude de la fonction des EPS au sein d'un biofilm. L'objectif de cette synthèse est donc de recenser les techniques (chimiques et biologiques) qui vont permettre de cibler spécifiquement certains des composants des EPS afin de déterminer leur rôle dans la formation et l'intégrité du biofilm, et en particulier leur fonction d'adhésion. Ce type d'approche permet également, selon les cas, de mettre en évidence des variations de production d'EPS et ainsi que des changements de phénotype. Ce type d'étude pourra par la suite être élargi à l'étude (identification et localisation) des EPS impliqués dans l'activité des biofilms, avec par exemple les EPS ayant des propriétés d'adsorption de polluants....

2. EPS de type protéique

Plusieurs types de protéines peuvent être présents au sein des EPS : des protéines possédant une activité enzymatique et celles qui n'en ont pas. La présence de peptides (courte séquence d'acides aminés) peut également avoir lieu. La mise en évidence de la présence de protéines et/ou peptides et le dosage de ces composés au sein des EPS totaux se fait classiquement par dosage colorimétrique. Les dosages les plus utilisés sont les **dosages de Lowry et de Bradford** qui sont disponibles sous forme de Kit prêt à l'emploi (Biorad).

Différentes techniques existent pour neutraliser les EPS de type protéique et ainsi mettre en évidence leur rôle dans la formation et/ou la structure d'un biofilm. Elles sont détaillées ci-dessous.

2.1. UTILISATION DE PROTEASES

Le protocole classiquement utilisé pour mettre en évidence le rôle de protéines ou de peptides extracellulaires, et donc leur fonction(s) au sein du biofilm, est l'utilisation de **protéases**. Ces enzymes permettent de cliver les séquences protéiques en peptides (Quintero and Weiner, 1995 ; Szwajcer *et al.*, 2006). En détruisant la structure des protéines, ces dernières perdent leur fonction. La protéase qui semble être la plus intéressante est la **pronase**, une protéase non spécifique qui, en général, conduit à l'hydrolyse totale des protéines et des peptides en acides aminés.

La pronase est par exemple disponible chez Roche (No 10 165 921 001, 1g).

Un exemple de protocole de traitement d'un biofilm par la pronase a été proposé par Quintero et Weiner (1995), et est donné dans la figure 1.

Ce protocole est adapté pour des cellules qui adhèrent rapidement à un support de type verre. Pour des cellules qui adhèrent moins rapidement ou qui n'adhèrent pas au verre, plusieurs types d'adaptation du protocole peuvent être prévus : allongement du temps d'incubation avec la pronase, étude de la fixation des cellules sur un autre support (par exemple la pouzzolane) puis comptage des cellules fixées après décrochage du support...

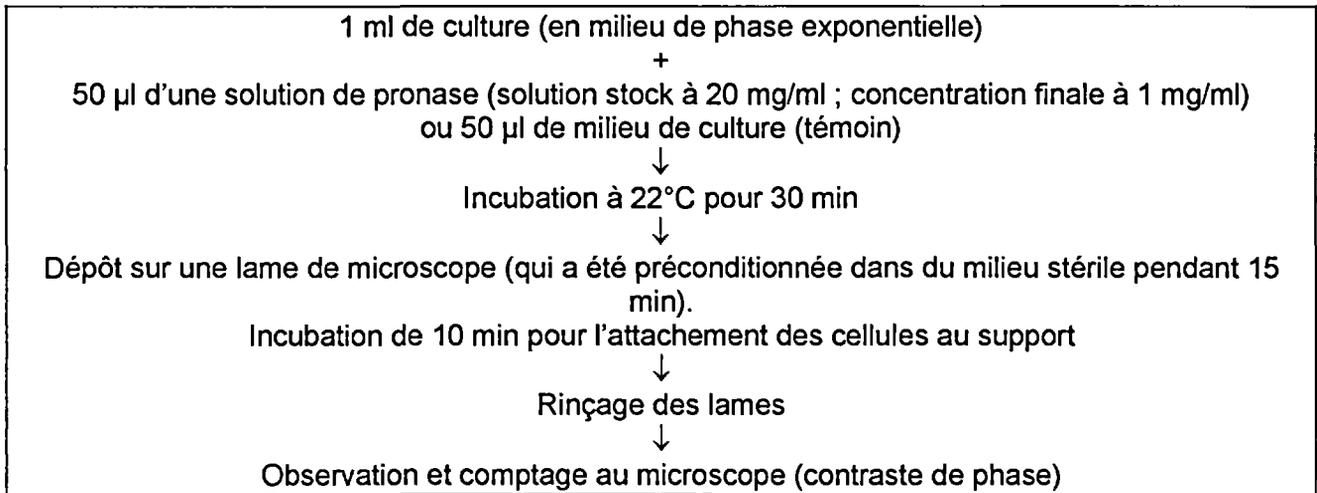


Figure 1 : Exemple de protocole d'utilisation de la pronase pour l'étude de la fonction des EPS de type protéique au sein d'un biofilm. Ce protocole permet d'étudier le rôle des EPS protéiques dans la phase d'attachement des cellules sur un support

2.2. UTILISATION D'ANTICORPS

Un certain nombre de protéines a été identifié comme composant des EPS. C'est par exemple le cas de la protéine Embp (Extracellular Matrix Binding Protein), une protéine de 1 MDa, impliquée dans la formation de biofilm (phases d'attachement et d'accumulation) par *Staphylococcus epidermidis*. La purification de ces protéines permet ensuite de produire des anticorps spécifiques. L'ajout d'un antisérum au milieu de culture va conduire à la fixation des anticorps sur la protéine qui va donc avoir des groupes fonctionnels neutralisés par les anticorps, et qui ne pourra donc plus exercer sa fonction au sein du biofilm.

L'obtention d'un anticorps nécessite d'avoir identifié au préalable une protéine d'intérêt, et d'avoir ensuite mis au point un protocole de purification de cette protéine. Ces deux étapes suivies de l'étape d'obtention d'un anticorps peuvent être très longues (au minimum plusieurs mois, voire plusieurs années). Pour des raisons de durée de l'expérimentation et de coûts, ce type d'approche ne peut donc pas être utilisé comme une approche de routine pour l'étude de la fonction des EPS de type protéique au sein d'un biofilm.

3. EPS de type glucidique

Les glucides sont des composants majeurs des EPS. Leur dosage peut se faire par différentes techniques, telles que les dosages colorimétriques, la quantification (et l'identification) par HPLC, des techniques spectroscopiques ... Au BRGM, les travaux réalisés depuis ces dernières années ont principalement fait intervenir des techniques colorimétriques et plus particulièrement le dosage par la méthode au phénol/acide sulfurique (Daniels *et al.*, 1994). Une adaptation de ce protocole pour le dosage d'EPS glucidiques dans des échantillons de biolixiviation (milieu acide et présence de fortes concentrations en fer) a également été réalisée (Michel *et al.*, 2008). D'autres travaux nous ont également permis de doser des EPS par spectroscopie infra-rouge au service MMA. Dans l'objectif d'étudier les EPS glucidiques du point de vue de leur fonction et de leur localisation au sein d'un biofilm, différentes techniques biochimiques et chimiques ont été recensées et sont présentées ci-dessous. Ces techniques permettent de cibler soit les glucides en général, soit certains groupements en particuliers.

3.1. UTILISATION DE L'ACIDE PÉRIODIQUE (HIO_4)

Un traitement à l'acide périodique (HIO_4) permet d'étudier l'implication des glucides dans la structure des biofilms. L'acide périodique permet d'oxyder les glycols en aldéhydes. Pour information, une application classique de cette réaction est d'associer l'acide périodique au réactif de Schiff (mixture de pararosaniline et de métabisulfite de sodium), ce qui conduit à l'apparition d'une coloration et permet par exemple de révéler des glycoprotéines par électrophorèse.

Afin d'étudier le rôle des glucides dans la formation des biofilms, un protocole de traitement d'un biofilm par l'acide périodique a été proposé par Quintero et Weiner (1995) dans la figure 2.

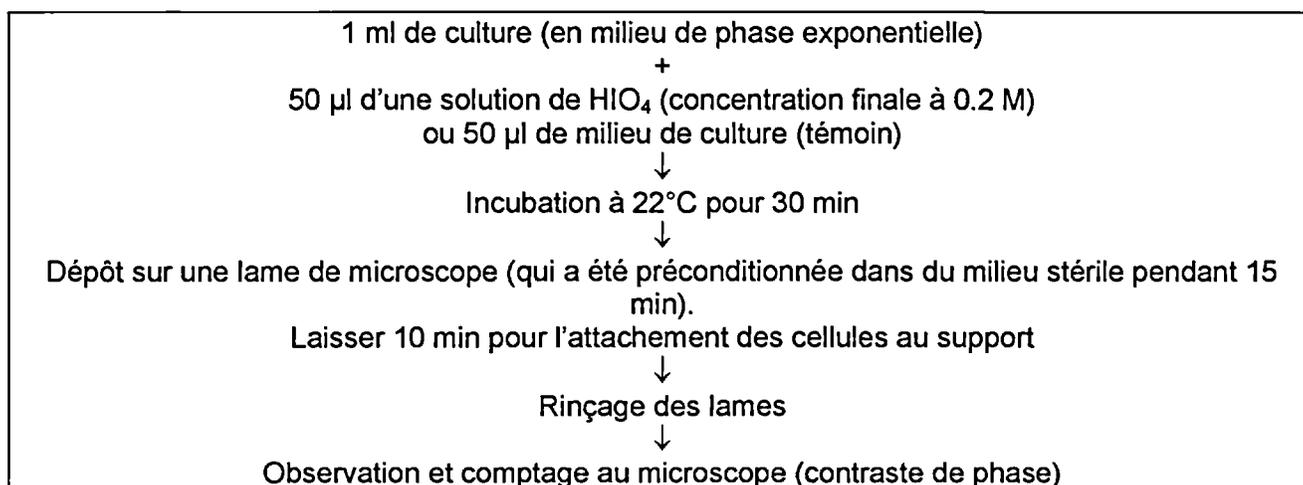


Figure 2 : Exemple de protocole d'utilisation de l'acide périodique pour l'étude de la fonction des EPS de type glucidique au sein d'un biofilm

3.2. MISE EN EVIDENCE DE POLYSACCHARIDES CONTENANT DES UNITES (1→3)- β ET (1→4)- β -D-GLUCOPYRANOSYL PAR LE CALCOFLUOR

L'utilisation de **calcofluor** (4,4'-bis[4-anilino-6-bis(2-hydroxyethyl)amino-s-triazine-2-ylamino]-2,2'-stilbenedisulfonic acid) permet de détecter de manière simple la présence de certains polysaccharides (Quintero and Weiner, 1995 ; Wood, 1980). Le calcofluor est connu pour former des complexes avec les polysaccharides ; il augmente par exemple le taux de polymérisation du glucose en cellulose par certaines bactéries (Benziman et al., 1980).

Les protocoles d'utilisation du calcofluor dans le cadre de l'étude de biofilm peuvent être ceux présentés dans le tableau 1.

Essais sur boîte de pétri	Essais sur lame de microscope
<p>Le milieu de culture contient 80 $\mu\text{g/ml}$ de calcofluor</p> <p>↓</p> <p>Etalé sur boîte de pétri</p> <p>↓</p> <p>Incubation</p> <p>↓</p> <p>Analyse des colonies sous UV (on place la boîte de pétri dans le lecteur de gel) : mise en évidence des complexes EPS/calcofluor</p>	<p>Lavage des lames de verre à l'acide</p> <p>↓</p> <p>Pré-incuber les lames dans du milieu de culture</p> <p>↓</p> <p>Mélanger la culture cellulaire à du calcofluor (à une concentration finale de 75 $\mu\text{g/ml}$)</p> <p>↓</p> <p>Déposer la préparation « bactéries+ calcofluor » sur les lames</p> <p>↓</p> <p>Rinçage</p> <p>↓</p> <p>Observation/comptage au microscope</p>

Tableau 1: Exemple de protocoles d'utilisation du calcofluor pour l'étude de la fonction des EPS de type glucidique au sein d'un biofilm (d'après Quintero and Weiner, 1995)

Référence du calcofluor : Sigma, F-3543 Fluorescent brightener 28 (se dissout, à pH > 6,5, à la concentration de 1,5 mg/ml).

3.3. MISE EN EVIDENCE DE POLYSACCHARIDES DE TYPE POLY- β -1,6-GLCNAC

Ce type de polysaccharide (aussi appelé PGA chez *E. coli*, ou PIA, SAE et PNAG chez les staphylocoques) contribue, chez certaines espèces bactériennes, à l'intégrité structurale du

biofilm. Une manière de mettre en évidence la présence et le rôle de ce polysaccharide au sein d'un biofilm est d'utiliser une enzyme qui dépolymérise ce composé (Itoh *et al.*, 2005 ; Parise *et al.*, 2007). Si le traitement d'un biofilm par cette enzyme entraîne la dispersion du biofilm, c'est que ce polysaccharide est un composant essentiel de la matrice extracellulaire.

Une enzyme, la dispersine B (DspB, enzyme ayant une activité glycoside hydrolase), clive spécifiquement les liaisons glucidiques de type poly- β -1,6-GlcNAc, et a été mise en œuvre dans des protocoles pour étudier le rôle de certains glucides. Les essais ont été réalisés soit en introduisant la DspB dans le milieu de culture (pendant la croissance), soit en traitant un biofilm pendant 16 heures à 37°C.

La dispersine DspB utilisée dans les travaux publiés est celle d'*Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Elle n'est apparemment pas commercialisée, les laboratoires la purifient eux même.

La DspB est utilisée à une concentration finale de 50 μ g/l. Les travaux ont été réalisés sur des microplaques de 96 puits. L'enzyme est introduite dans les puits au moment de l'inoculation. A différents temps de culture, le milieu de culture est éliminé, et la procédure classique de quantification de bactéries fixées (coloration au cristal violet) est réalisée. Afin d'étudier l'effet de cette enzyme sur un biofilm et de pouvoir analyser les résultats, il faut s'assurer au préalable que l'enzyme n'a pas d'effet sur la croissance de la souche, et donc réaliser une étude de l'effet de l'enzyme sur la croissance des cellules planctoniques.

3.4. UTILISATION DE LECTINES

Les lectines sont un groupe de diverses glycoprotéines qui se lie aux résidus monosaccharidiques composant les oligo- et les polysaccharides. Une lectine contient au moins 2 sites de fixation des sucres. Les complexes lectine-sucres peuvent être aussi spécifiques que les interactions antigène-anticorps. La spécificité des lectines est habituellement définie par les mono- ou oligosaccharides avec lesquels elles interagissent, conduisant à une précipitation ou une agglutination. Les lectines sont des molécules stables qui peuvent donc également être utilisées pour mettre en évidence la présence d'EPS de type glucidique (Szwajcer *et al.*, 2006). Pour information, il est intéressant de noter que les lectines produites par des plantes sont largement utilisées aujourd'hui, par exemple pour la purification, la détection et la caractérisation structurale des glycoconjugués, pour l'étude de l'architecture des surfaces cellulaires, l'identification et la différenciation de différentes cellules procaryotes et eucaryotes, ...

3.4.1. Utilisation de lectines marquées et visualisation par fluorescence

Il a été montré récemment que des lectines associées à un groupement fluorescent pouvaient être utilisées pour l'étude de la formation et de la composition des biofilms (Johnsen *et al.*, 2000 ; Robitaille *et al.*, 2006). Les lectines utilisées pour ce type d'étude sont généralement la concanavaleine A et certaines agglutinines (exemple la PNA, peanut agglutinin, la WGA, wheat germ agglutinin).

Un certain nombre de lectines marquées sont disponibles dans le commerce, notamment chez Sigma-Aldrich. Les lectines commercialisées par ce fournisseur peuvent être marquées avec du FITC, du TRITC, du Cy5, Le microscope à fluorescence dont dispose le BRGM étant équipé de filtres pour le FITC, le Cy3 et le Cy5, les travaux s'orienteront dans un premier temps vers l'utilisation de lectines couplées aux marqueurs FITC (lectines les plus classiquement utilisées).

Les lectines potentiellement très intéressantes pour nos études et disponibles chez Sigma-Aldrich sont les suivantes :

- la Concanavaleine A FITC-labeled (FITC-Con A de *Canavalia ensiformis*), référence 61761-5MG (47,40 €)
- la Peanut agglutinin FITC conjugate (FITC-PNA d'*Arachis hypogaea*), référence L7381-1MG (69 €)
- la *Dolichos biflorus* agglutinin FITC conjugate (FITC-DBA), référence L9142-1MG (129 €)

Un exemple d'affinité de certaines lectines pour les glucides est présentée dans le tableau 2 (Johnsen *et al.*, 2000) :

Lectine	Marquage fluorescent	Spécificité
ConA	TRITC Cy5	α -D-mannose terminal α -D-glucose terminal
PNA WGA	TRITC Texas red	β -Galactose(1→3) <i>N</i> -acétylgalactosamine <i>N</i> -Acétyl- β -D-glucosamine, acide <i>N</i> -acétylneuraminic, et acide <i>N</i> -acétylmuraminic
UEA1 (<i>Ulex europaeus</i>) Pha-E DBA	TRITC TRITC FITC	α -L-Fructose Galactose Residue <i>N</i> -acétyl- α -D-galactosaminyl terminal

Tableau 2 : spécificité de certaines lectines vis-à-vis des glucides (d'après Johnsen *et al.*, 2000 ; voir aussi Szwajcer *et al.*, 2006)

Dans la mesure où nous disposons au BRGM d'un microscope à fluorescence, il est envisageable de mettre au point une technique de détection et de localisation des EPS de type glucidique au sein d'un biofilm. Un résumé du protocole pour l'utilisation de lectines pour localiser les exopolysaccharides au sein d'un biofilm est donné ci-après (voir l'article de Johnsen *et al.*, 2000, pour plus d'information). Dans le protocole développé par ces auteurs, les biofilms se développent sur les lames de microscopes (système de lame couplés à des puits de culture). 10 μ l d'une solution de lectine à 0,1 mg/ml (préparée dans du tampon PBS, voir Matériels et Méthodes de l'article de Johnsen *et al.*, 2000) sont ajoutés. Après 15 minutes d'incubation dans le noir, les puits sont lavés avec 1ml de tampon PBS, puis les lames sont immergées dans du tampon PBS 30 minutes dans le noir. L'observation a ensuite lieu avec un microscope à épifluorescence.

Il est également intéressant de noter que l'utilisation de lectines marquées peut permettre de mettre en évidence la présence de certaines bactéries, et de distinguer par exemple les bactéries Gram-positives des bactéries Gram-négatives (Sizemore *et al.*, 1990 ; Fife *et al.*, 2000). Le principe de cette coloration est basé sur le fait que l'agglutinine WGA peut se fixer aux résidus N-acétylglucosamine de la couche de peptidoglycanes des bactéries Gram-positives. La lectine WGA ne peut par contre pas se lier à la couche de peptidoglycane des cellules qui possèdent une membrane externe (comme c'est le cas chez les bactéries Gram-négatives), la membrane externe empêchant l'accès des lectines aux peptidoglycanes. Cette technique de coloration des bactéries Gram-positives est en particulier intéressante pour l'étude des bactéries et des archaebactéries impliquées en biolixiviation, dans la mesure où la technique classique de coloration des bactéries Gram-positives et Gram-négatives n'est généralement pas applicable aux bactéries acidophiles (Fife *et al.*, 2000). Ce type de coloration par les lectines permettrait également de travailler sur des cultures sans avoir à les cultiver préalablement (Sizemore *et al.*, 1990).

3.4.2. Utilisation de lectines non marquées

Il est possible d'exploiter les propriétés d'interaction des lectines avec les glucides par résonance plasmonique de surface (utilisation d'un Biacore, Wawrzynczyk *et al.*, 2007 ; Szwajcer *et al.* 2006). Cette technique permet de détecter des variations de masse, et par conséquent de déterminer la masse moléculaire ou la concentration d'un composé. Le principe est de fixer l'un des partenaires (ici les lectines) sur une surface, et de mettre ensuite cette surface en contact avec une solution contenant le deuxième partenaire (ici une solution d'EPS totaux préalablement extraits). Les glucides des EPS totaux vont ainsi se lier aux lectines ce qui va entraîner un changement de masse (sur la surface) qui va pouvoir être détecté. Ce système permet de tester différentes lectines pour une même solution d'EPS totaux, et différentes solutions d'EPS totaux pour une même lectine. Un exemple détaillé de protocole pour l'immobilisation de lectines sur une surface et ensuite pour l'étude de l'interaction lectines-EPS glucidiques par Biacore, est donné par Szwajcer *et al.* 2006.

L'étude par résonance plasmonique de surface des EPS glucidiques (avec l'aide de lectines) est intéressante, mais elle nécessite un appareillage particulier qu'est le Biacore. Dans la littérature, peu de travaux font appel à cette technique, la plupart des études se font en effet par l'utilisation de lectines marquées.

4. EPS de type lipidique

Le dosage des EPS de type lipidique se fait, au BRGM, par dosage colorimétrique, avec la méthode dite sulpho-phospho-vanilline (Frings *et al.*, 1972). Il est à noter que l'extraction des EPS lipidiques est rendue difficile par le fait qu'il n'est généralement pas aisé de les dissocier des lipides constituant les membranes cellulaires sans entraîner une rupture des membranes. L'étude des EPS lipidiques n'est donc pas chose facile, ce qui explique probablement pourquoi d'une manière générale, les EPS lipidiques font partie des EPS les moins étudiés. D'après la bibliographie, deux méthodes permettent d'étudier les EPS lipidiques :

- l'utilisation de **lipases**, qui sont des enzymes qui hydrolysent les lipides. Cette méthode est mentionnée dans des travaux réalisés par Szwajcer *et al.* (2006), mais elle n'est pas développée ;
- l'utilisation de **biosurfactants**, qui semble être la méthode la plus classiquement utilisée pour ce type d'étude, et qui est développée ci-après.

Des travaux ont ainsi montré que l'utilisation de biosurfactants peut empêcher la formation de biofilms, mettant en évidence la présence et l'implication d'EPS lipidiques dans le développement de biofilms (Irie *et al.*, 2005). En fait, certains biosurfactants produits par des bactéries inhibent la formation de biofilm par d'autres bactéries (exemple : la surfactine de *Bacillus subtilis* et la surlactine de *Lactobacillus* spp.), et peuvent donc servir d' « outil biochimique » pour étudier les EPS lipidiques.

Certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* produisent, durant la dernière phase de leur développement sous forme de biofilm, un biosurfactant de type rhamnolipide qui jouent un rôle important dans l'évolution de l'architecture des microcolonies notamment en maintenant des canaux pour permettre aux fluides de circuler à travers le biofilm (Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). Les rhamnolipides peuvent avoir une activité bactéricide sur certaines bactéries, mais pas sur toutes. Les travaux réalisés par Irie *et al.* (2005) montrent qu'un test préliminaire de croissance et de viabilité de la bactérie d'intérêt en présence du biosurfactant, en condition de croissance planctonique (*i.e.* en absence d'un support de croissance) est indispensable afin de s'assurer de la non toxicité de la molécule, et donc de la possibilité de tester un biosurfactant donné à affecter la structure d'un biofilm sans que ce soit dû à une lyse bactérienne. Un exemple de protocole d'utilisation de rhamnolipides est donnée figure 3.

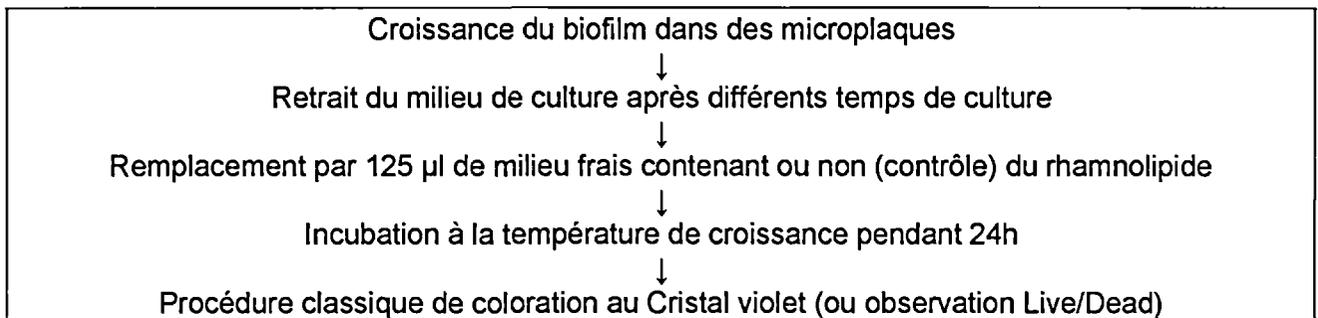


Figure 3 : Exemple de protocole pour la mise en évidence de l'effet de biosurfactant (ex : rhamnolipides) sur la structure d'un biofilm (Irie et al., 2005)

Pour information, un test colorimétrique pour le dosage des rhamnolipides est donné par Pamp et Tolker-Nielsen (2007).

La première étape est donc de tester la toxicité du biosurfactant sur les bactéries à étudier. Des tests Live/Dead sur les bactéries fixées et sur les bactéries qui se sont décrochées après traitement est un bon moyen de vérifier que les bactéries qui se sont décrochées ne se sont pas décrochées parce qu'elles étaient mortes suite au traitement mais parce que le biosurfactant a eu un effet sur la structure du biofilm. Depuis 2007, le test Live/Dead est facilement réalisable au BRGM.

L'utilisation de biosurfactant est un outil de choix pour l'étude des EPS lipidiques. Malheureusement, à notre connaissance, il n'y a pas de biosurfactant qui soit commercialisé. Les laboratoires qui font des études sur les EPS lipidiques produisent eux même leurs biosurfactants (en général des rhamnolipides), par exemple à partir de surnageant de milieu de culture de bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Irie et al., 2005). Une alternative potentielle est d'utiliser des surfactants chimiques, en particulier ceux appartenant aux tensioactifs non ioniques tels que le Tween.

5. EPS de type nucléique

La présence d'acides nucléiques dans la matrice extracellulaire a longtemps été considérée comme étant issue de la lyse cellulaire de certains microorganismes au sein du biofilm. Plusieurs études ont récemment démontré que de l'ADN était spécifiquement sécrété par les cellules (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Ces EPS de type nucléique sont appelés eDNA pour ADN extracellulaire.

La première étape pour l'étude de la production d'eDNA est l'extraction et le dosage de ces EPS nucléiques. Le dosage de l'ADN se fait classiquement par spectroscopie UV, à 260 nm. D'autres types de dosage existent, le dosage par DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl-indole) -spécifique de l'ADN double brin- en est un exemple (Palmgren et Nielsen, 1996). L'étude du rôle ou de la localisation de l'eDNA peut ensuite être réalisée grâce à l'utilisation de la DNase 1 ou de colorants spécifiques de l'ADN.

5.1. UTILISATION DE LA DNASE 1

Le rôle de l'ADN extracellulaire dans la formation et la structure d'un biofilm peut être mis en évidence grâce à un traitement du biofilm à la DNase 1 (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Le protocole consiste à traiter un biofilm (biofilm de 4 jours formé par *Pseudomonas aeruginosa* dans le cas des travaux réalisés par Allesen-Holm *et al.*, 2006) avec de la DNase 1 (utilisée à 100 µg/ml) pendant 45 minutes. L'effet du traitement de la DNase est mesuré en testant la résistance du biofilm à un détergent comme le SDS (incubation de 2 heures dans un milieu contenant 0.01% SDS, alimentation en continu). Une sensibilité accrue du biofilm aux détergents après un traitement nucléasique met en évidence un rôle des acides nucléiques dans sa structure.

Des études ont montré que pour des biofilms formés par certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*, le traitement à la DNase n'entraîne la dissolution que des biofilms « jeunes », alors qu'il a peu d'effet sur les biofilms matures. Ces résultats suggèrent que les cellules d'un jeune biofilm sont liées les unes aux autres par du eDNA alors que d'autres types d'EPS doivent intervenir dans la structure du biofilm mature. Ceci montre l'intérêt de tester la DNase (et l'ensemble des autres traitements cités dans ce rapport) sur des biofilms à différents stades de croissance afin de pouvoir réellement déduire le rôle de chaque type d'EPS.

Il est enfin important de noter que la DNase 1 dégrade l'ADN double brin, alors que la nucléase S1 ne dégrade que l'ADN simple brin. Ainsi un eADN qui est dégradé par de la DNase 1 et pas par la nucléase S1 est très probablement un ADN double brin (Allesen-Holm *et al.*, 2006).

La DNase 1 est disponible chez Sigma :

- ref D4263-1VL : 27,20€ (environs 1 mg de protéine totale, soit 2000 KU)

- ref AMPD1-1KT : 70,60€

La nucléase S1 (d'*Aspergillus oryzae*) est disponible chez Sigma (ref N5661).

5.2. UTILISATION DE COLORANTS

Il est possible de visualiser, localiser et quantifier l'eDNA par des **colorants spécifiques de l'ADN**, en microscopie à fluorescence (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Ces colorants peuvent se diviser en 2 groupes :

- ceux qui ne rentrent pas dans la cellule et qui permettent donc de visualiser l'eDNA : le propidium iodide, l'éthidium bromide, le DDAO ([7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one)])

- ceux qui rentrent dans la cellule vivante, qui ne peuvent donc pas être utilisés *in situ* pour détecter l'eDNA, mais qui peuvent être utilisés pour quantifier l'ADN cellulaire ou l'eDNA après séparation de ces deux types d'ADN : l'acridine orange, le SYBR-Green, le PicoGreen.

Il est intéressant d'utiliser ces colorants pour visualiser la formation d'un biofilm et la localisation de l'ADN extracellulaire au cours du temps, et donc de faire des observations au microscope à intervalles réguliers, par exemple 2, 4, et 6 jours. En utilisant différents marqueurs et filtres de fluorescence, on peut réaliser plusieurs types de marquage de l'échantillon, ce qui permettra par exemple de localiser les cellules d'une part, et l'eDNA d'autre part. La superposition des deux permettra de localiser l'eDNA par rapport aux cellules.

6. Conclusions - Applications envisageables

6.1. CONCLUSIONS – ETUDES REALISABLES AU BRGM

Suite à cette synthèse bibliographique, nous pouvons envisager de mettre en œuvre au BRGM, de manière relativement simple, un certain nombre des techniques citées dans ce rapport, afin de commencer nos études sur le rôle fonctionnel et la localisation des EPS au sein d'un biofilm. La liste de ces techniques est présentée dans le tableau 3.

Famille d'EPS	Techniques pouvant être mises en place au BRGM dans un délai bref pour l'étude des EPS
Protéine	Traitement aux protéases (pronase en particulier)
Glucide	Traitement au calcofluor, à l'acide périodique. Utilisation de lectines marquées (microscopie à épifluorescence)
Lipide	Traitement à la lipase. Traitement par des surfactants chimiques
eDNA	Traitement à la DNase 1. Utilisation de colorants

Tableau 3 : Techniques potentiellement applicables au BRGM pour l'étude de la fonction et de la localisation des différentes familles d'EPS au sein d'un biofilm.

6.2. AMELIORATION DE LA FORMATION DES BIOFILMS DANS DES BIOPROCEDES

Ce travail bibliographique a permis de recenser un certain nombre de techniques biochimiques et chimiques permettant d'étudier le rôle potentiel des différents types d'EPS au sein de la structure du biofilm et au cours de temps. L'étude de la fonction des différents types d'EPS permettra d'identifier, pour un biofilm donné, quelle(s) biomolécule(s) est (sont) impliquée(s) dans les différentes étapes de la formation, de la maturation et du détachement du biofilm. Ces travaux permettront donc une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la vie d'un biofilm.

A partir de ce type d'étude, il est ensuite envisageable de sélectionner, produire et purifier des EPS d'intérêt, et de tester l'effet de l'ajout de ces EPS sur le biofilm. Par ce biais, il devrait être possible d'identifier des biomolécules dont l'ajout peut favoriser et/ou accélérer l'adhésion des premières cellules au support. L'apport d'EPS préalablement identifiés comme jouant un rôle positif dans la formation d'un biofilm peut être envisagée de plusieurs façons :

- par la présence de conditions favorables pour une production maximale des EPS identifiés. Ceci nécessite une bonne connaissance des voies métaboliques conduisant à la production des EPS d'intérêt,

- par l'ajout de « concentrés d'EPS » préalablement produits par des bioréacteurs fonctionnant en parallèle, puis purifiés. La possibilité d'utiliser des organismes génétiquement modifiés pour leur production d'EPS serait un plus, mais elle nécessite, ici aussi, une bonne connaissance des voies de synthèse des EPS d'intérêt.

- par l'ajout de molécules commercialisées qui pourra également être envisagé dans la mesure où de nombreuses biomolécules (telles que certains glucides, lipides ...) sont sur le marché. Il faut cependant noter que comme leur nom l'indique, les EPS (exopolymeric substances) sont des polymères qui peuvent être complexes et donc probablement non disponibles chez les fournisseurs de molécules biologiques. A titre d'exemple, dans le cas des sucres, ceux classiquement commercialisés sont des sucres simples (monosaccharides tels que le glucose). Il faut également prendre en compte le fait que plusieurs types d'EPS peuvent être impliqués dans la même phase de développement d'un biofilm, et que l'utilisation d'un mélange d'EPS est probablement plus adaptée.

D'un point de vue biotechnologique, la mise en œuvre des différents protocoles présentés ci-dessus et les résultats qui en découleront pourront ainsi être mis à profit dans l'amélioration de bioprocédés à lit fixé. En particulier, il devrait être possible d'agir sur la phase de développement du biofilm, phase qui constitue l'une des premières étapes de la mise au point d'un bioprocédés à lit fixé, tels qu'ils sont actuellement développés au BRGM.

Les EPS intervenant dans la formation d'un biofilm pourraient ainsi être, au même titre qu'un certain nombre de paramètres physico-chimiques, un paramètre supplémentaire dont il faudra tenir compte pour fixer les conditions opératoires de la phase de développement du biofilm dans un bioprocédés.

6.3. ELIMINATION DES EPS NUISIBLES AU FONCTIONNEMENT D'UN BIOPROCEDES

Comme décrit précédemment, les EPS peuvent jouer un rôle positif dans un bioprocédé en favorisant la formation des biofilms, par exemple dans le cas de bioprocédés à lit fixé. La production d'EPS par les microorganismes présents dans un bioprocédés peut par contre dans certains cas être un handicap pour le bon fonctionnement d'un procédé. Dans ce cas, c'est la dégradation des EPS qui permettra d'améliorer les performances du procédé. Les techniques biochimiques et chimiques décrites dans ce rapport pour l'étude de la fonction des EPS pourraient donc être utilisées pour neutraliser les EPS dans des bioréacteurs.

L'impact négatif de la présence d'EPS dans des bioprocédés peut être illustré par les problèmes rencontrés dans le traitement des boues de stations d'épuration (Szwajcer *et al.*, 2006). En effet, la présence d'EPS gêne les étapes de décantation, biofloculation, et déshydratation des boues. Les travaux réalisés par Szwajcer *et al.*, (2006) ont montré que l'utilisation de certaines enzymes, en particulier des protéases (enzymes permettant l'hydrolyse des protéines) et des glycosidases (enzyme permettant l'hydrolyse des sucres), permet le relargage des EPS (Tabl 4). L'utilisation de lipases (enzyme permettant l'hydrolyse des lipides) permet d'éliminer les EPS lipidiques ou de produire une émulsion. Utilisée en tant qu'étape de prétraitement des boues, l'action des lipases permet de faciliter l'accès des autres enzymes (protéases, glucosidases) au sein des boues. Ces travaux ont également montré que certaines des enzymes ajoutées étaient en partie adsorbées sur les boues, et perdaient leur capacité à hydrolyser les gros polymères. Les composés humiques sont généralement le matériel sur lequel s'adsorbent les enzymes. Les composés humiques interagissant avec la boue *via* des mécanismes de chélation des métaux, l'ajout de triphosphate de sodium pentabasique (qui interagit avec les ions métalliques pour former des complexes solubles dans l'eau) permet de rompre les liaisons avec les métaux. Les travaux ont ainsi montré que le traitement au triphosphate de sodium pentabasique couplé à l'utilisation d'enzymes permettait d'augmenter le relargage de protéines, de sucres et de composés humiques, et donc de restituer l'activité des enzymes (Szwajcer *et al.*, 2006).

Nom de l'Enzyme	EC Number	Spécificité de clivage
Protéase (Alcalase)	3.4.4.16	Pont peptidique
Lipase (Lipolase)	3.1.1.3	Liaisons ester
Enzymes glycosidiques		
Dextranase	3.2.2.11	1,6- α -D-Glucan 6-glucanohydrolase
Cellulase (Celluclast)	3.2.1.4	1,4-(1,3 ; 1,4)- β -D-Glucan-4- glucanohydrolase
Xylanase (Pulpzyme)	3.2.1.8	Liaison endo-1,4- β D-xylalosidique
Amylase (Termamyl)	3.2.1.1	Liaison 1,4- α -D-glucosodique
polygalactouranase	3.2.1.15	Liaison 1,4- α -D-galactosiduronique
Lysozyme	3.2.1.17	Liaison 1,4- β - dans les peptidoglycanes et les chitodextrines

Tableau 4 : spécificité des enzymes hydrolytiques utilisées pour le relargage des EPS à partir de boues.

« EC Number » correspond au numéro donnée par l'Enzyme Commission (Szwajcer *et al.*, 2006).

6.4. CONCLUSIONS

Les exemples présentés dans ce rapport illustrent l'intérêt de pouvoir réguler la formation des biofilms, et la possibilité d'améliorer des procédés en prenant en compte le « facteur EPS ». Ce facteur biologique peut, selon les cas, être un frein ou un accélérateur pour le bon fonctionnement d'un bioprocédé. Ces travaux soulignent ainsi la possibilité d'utiliser des enzymes ou des molécules biologiques libres (*i.e.* non associées à des microorganismes entiers) pour l'amélioration des procédés.

Il est enfin important de noter que les EPS peuvent aussi jouer un rôle dans l'activité des biofilms en termes de bioremédiation (adsorption de métaux...), de biolixiviation... L'implication des EPS a par exemple été montrée dans l'activité de biolixiviation des bactéries acidophiles. Dans ce cas, les EPS jouent un rôle dans l'attachement des bactéries à la surface (sulfure), et permettent de concentrer les ions Fe(III) par complexation de ces ions à la surface minérale (Sand et Gehrke, 2006). Les EPS intervenant dans la formation des biofilms peuvent ainsi être différents de ceux impliqués dans l'activité de ceux-ci. L'étude des 2 rôles des EPS est indispensable pour valider les choix à faire dans le cadre, par exemple, de l'amélioration de bioprocédés.

7. Bibliographie

Allesen-Holm M., Bundvig Barken K., Yang L., Klausen M., Webb J., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* 59: 1114-1128.

Benziman M., Haigler C., Brown R., White A., Cooper K. (1980). Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6678-6682.

Daniels L., Hanson R., Phillips J. (1994). Chemical analysis. In : Gerhardt P., Murray R., Wood W., Krieg N. (eds). *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp 512-554.

Fife D., Bruhn D., Miller K., Stoner D. (2000). Evaluation of a fluorescent lectin-based staining technique for some acidophilic mining bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2208-2210.

Frings C., Frendley T., Dunn R., Queen C. (1972). Improved determination of total serum lipids by the sulpho-phospho-vanillin reaction. *Clin. Chem.* 18 : 673-674.

Garrido F., Michel C., Morin D. (2002). Les exopolymères bactériens: synthèse bibliographique. BRGM RP-51637-FR, 39p., 2 fig., 4 tabl.

Irie Y., O'Toole G., Yuk M. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 250: 237-243.

Itoh Y., Wang X., Hinnebusch B., Preston III J., Romeo T. (2005). Depolymerisation of β -1,6-N-Acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol* 187: 382-387.

Johnsen A., Hausner M., Schnell A., Wuertz S. (2000). Evaluation of fluorescently labelled lectins for non-invasive localization of extracellular polymeric substances in *Sphingomonas* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3487-3491.

Michel C., Delorme F., Bény C., Poirier L., Morin D., d'Hugues P. (2008). Exopolysaccharides produced by acidophilic bioleaching bacteria in laboratory-scale continuous stirred reactors: extraction, quantification, and correlation to bacterial activity. En préparation.

Michel C., Jean M., Coulon S., Dictor M.-C., Delorme F., Morin D., Garrido F. (2007). Biofilms of As(III)-oxidising bacteria : formation and activity studies for bioremediation process development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 457-467.

Palmgren R., , Nielsen P. (1996). Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures. *Wat. Sci. Tech.* 34: 233-240.

Pamp S., Tolker-Nielsen T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 189: 2531-2539.

- Parise G., Mishra M., Itoh Y., Romeo T., Deora R. (2007). Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J. Bacteriol.* 189: 750-760.
- Quintero E., Weiner R. (1995). Evidence for the adhesive function of the exopolysaccharide of *Hyphomonas* strain MHS-3 in its attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1897-1903.
- Robitaille G., Moineau S., St-Gelais D., Vadeboncoeur C., Britten M. (2006). Detection and quantification of capsular exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* using lectin probes. *J. Dairy Sci.* 89: 4156-4162.
- Sand W., Gehrke T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* 157: 49-56.
- Sizemore R., Caldwell J., Kendrick A. (1990). Alternate Gram staining technique using a fluorescent lectin. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2245-2247.
- Szwajcer E., Szewczyk E., Wawrzynczyk J., Norrlöw O. (2006). A novel approach for Characterization of exopolymeric material in sewage sludge. *J. Res. Sci. Technol.* 3: 97-103.
- Wawrzynczyk J., Szewczyk E., Norrlöw O., Szwajcer E. (2007). Application of enzymes, sodium tripolyphosphate and cation exchange resin for the release of extracellular polymeric substances from sewage sludge. Characterization of the extracted polysaccharides/glycoconjugates by a panel of lectins. *J. Biotechnol.* 130: 274-281.
- Wood P. (1980). Specific interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 85: 271-287.



Géosciences pour une Terre durable

brgm

**Centre scientifique et technique
Service XXXXXXXXXX**

3, avenue Claude-Guillemin

BP 36009 – 45060 Orléans Cedex 2 – France – Tél. : 02 38 64 34 34