



HAL
open science

Caractérisation par analyse métabolomique de biomarqueurs bactériens au sein de biofilms marins

Laurie Favre

► **To cite this version:**

Laurie Favre. Caractérisation par analyse métabolomique de biomarqueurs bactériens au sein de biofilms marins. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Toulon, 2017. Français. NNT : 2017TOUL0005 . tel-01687902

HAL Id: tel-01687902

<https://theses.hal.science/tel-01687902>

Submitted on 18 Jan 2018

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

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

ÉCOLE DOCTORALE n°548 « Mer et Sciences »
Laboratoire Matériaux Polymères Interfaces Environnement Marin

THÈSE présentée par :
Laurie FAVRE

Soutenance le : **28 mars 2017**

Pour obtenir le grade de Docteur en Biochimie
Spécialité : Ecologie Chimique

**Caractérisation par analyse métabolomique
de biomarqueurs bactériens au sein de
biofilms marins**

JURY :

M^{me} PRADO Soizic	Professeur des universités Muséum national d'histoire naturelle	Rapporteur
M GROVEL Olivier	Maître de conférences HDR, Université de Nantes	Rapporteur
M^{me} BONIN Patricia	Directrice de recherche CNRS, Aix-Marseille Université	Examineur
M MARTIN Jean-Charles	Directeur de recherche INRA, Aix-Marseille Université	Examineur
M PEREZ Thierry	Directeur de recherche CNRS, Aix Marseille Université	Examineur
M GANDOLFO Robert	Chef de projet, Pôle Mer Méditerranée	Invité
M CULIOLI Gérald	Maître de conférences - HDR, Université de Toulon	Directeur de thèse
M^{me}ORTALO-MAGNE Annick	Maître de conférences, Université de Toulon	Co-encadrante de thèse

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie le Pr André Margaillan (jusqu'en 2015) ainsi le Pr Jean-François Chailan directeurs du laboratoire MAPIEM pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de ce laboratoire. Je remercie également la région PACA ainsi que le Pôle Mer Méditerranée pour l'attribution de cette bourse de thèse. Un merci particulier à Monsieur Robert Gandolfo pour son soutien lors de l'attribution de cette bourse ainsi que pour son suivi tout au long de cette thèse.

Je tiens ensuite particulièrement à remercier mon directeur de thèse Dr Gérald Culioli ainsi que ma co-encadrante Annick Ortalo-Magné pour leur implication, leurs conseils ainsi que leur enthousiasme pour les travaux réalisés au cours de cette thèse. Merci Gérald et Annick pour votre disponibilité, la transmission de votre passion et votre confiance au cours de ces trois ans. Cette thèse et notamment votre encadrement rigoureux m'ont permis d'évoluer, de progresser et finalement de m'épanouir. Ce fut et ça reste un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Je remercie les membres du jury et ainsi les rapporteurs Monsieur Olivier Grovel et Madame Soizic Prado, les examinateurs Madame Patricia Bonin, Monsieur Jean-Charles Martin et Monsieur Thierry Pérez et enfin l'invité Monsieur Robert Gandolfo pour avoir lu ce manuscrit et porté de l'intérêt à ce travail.

Je souhaite remercier spécialement le Dr Jean-Charles Martin pour m'avoir fait plonger et fait aimer le monde de la métabolomique au cours de mon stage de master 2 et finalement de m'avoir transmis cette offre de thèse et appuyé positivement ma candidature. Merci Jean-Charles d'être encore présent après 3 ans et de te rendre disponible pour des conseils, des explications ou des ... blagues (parmi tes best avec en prime le comique de répétition : L. A. U. R. I. E). Sincèrement, merci pour tout.

Je voudrais également remercier chaleureusement le Dr Thierry Pérez pour son accueil toujours très sympathique à la station marine d'Endoume. Merci Thierry pour ton intérêt (malgré le fait que je ne travaille pas sur les éponges !) et pour ton accessibilité qui font du bien et qui font que nos échanges sont d'excellents souvenirs pour moi. J'en profite pour remercier également le Dr Stéphane Greff, ingénieur sur la plateforme MALLABAR (et oui on doit maintenant t'appeler Docteur Steph !) pour sa disponibilité, sa serviabilité, son aide et sa sympathie.

Un très grand merci également au Dr Jean-François Briand pour son intérêt et son implication dans mon travail. Merci Jean-François pour toutes tes explications, pour les discussions sur les communautés microbiennes, les analyses statistiques et bien d'autres choses.

J'adresse des remerciements particuliers au Dr Cédric Garnier pour l'ensemble de ses explications patientes et précises à une novice des métaux traces. Merci Cédric pour ta disponibilité, ta réactivité et tes précieux conseils. Je tiens également à te remercier pour ta gestion remarquable du projet PREVENT au cours duquel il a été un plaisir pour moi de participer.

Je souhaite également remercier le Dr Benjamin Misson pour ses explications et son initiation à la biologie moléculaire. Merci Ben pour tes conseils scientifiques, tes remarques toujours pertinentes et ton engouement particulier.

Un remerciement qui me tient à cœur est pour le Pr Jean-Claude Tabet. Jean-Claude je tiens à te dire merci pour toutes tes explications sur la spectrométrie de masse, tous tes conseils, toutes tes remarques constructives et positives. Même si je n'avais pas tout compris du premier coup à tes cours, je les ressors régulièrement et ça fait « tilt » alors tu continues toujours à m'aider régulièrement.

Mes remerciements vont également au Pr Olivier Thomas au Dr Gregory Genta-Jouve et au Dr Raphaël Lami pour leur implication, leurs remarques et leurs conseils précieux en tant que membres d'un de mes comités de thèse.

Je remercie également Mme Carole Pichereaux ainsi que Mme Audrey Gargaros pour la réalisation des analyses protéomiques. Merci également au Pr Martine Bertrand pour les discussions et les échanges au cours de l'interprétation de ces analyses protéomiques.

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu l'occasion d'encadrer au cours de ces trois ans. Merci Lionnel Kerloch, Carole Lapalus, Joke Swaegers, Matthieu Lazare et Hereiti Taverre pour votre sympathie et pour l'implication dont vous avez fait preuve. Bonne route à vous 5 pour la suite de vos parcours.

Merci également à Louis-Félix Nothias-Scaglia pour son aide et ses encouragements quand je me suis mis aux réseaux moléculaires. C'est un peu grâce à toi que j'ai finalement réussi !

Je ne dois pas oublier Anne Delarue qui a toujours été disponible et souriante malgré mes demandes d'ordre de mission envoyées avec pas vraiment d'anticipation. Merci Anne pour ta sympathie.

Je remercie aussi l'équipe d'enseignants de l'UFR science de l'université de Toulon de m'avoir intégré à l'équipe enseignante et aidé pour mes premiers enseignements. J'ai ainsi une pensée particulière pour Natacha Jean, Véronique Lenoble, Virginie Garlatti, Nadia Rabah et Jean Louis Jamet.

Un remerciement particulier à Thomas Pollet. Thomas, je garde grâce à toi un très bon souvenir des « missions terrains », nos matinées au radeau me manqueroient presque. Ne le prend pas mal mais je me passerai bien par contre de revivre le rotor sous une pluie battante ou une nuit à Banyuls-sur-Mer sans dormir.

Je dois également remercier l'ensemble des collègues qui sont passés dans le bureau. Tania, Pierre, Sofyane, Clément, Benoît merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse à toute épreuve. Pierre particulièrement je te remercie pour avoir pris les temps de m'expliquer tous les rudiments des manipulations en microbiologie. Merci aux « anciennes » qui ont facilité mon intégration dans le labo, Perrine, Tania, Sandra avec qui j'ai partagé de très bons moments. Merci également aux actuels, Marlène, Mélanie, Vitalys, Damien, Laure, qui ont eu une attention particulière pour ma santé mentale en ces temps rudes de rédaction... De manière générale merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur accueil et leur sympathie.

Une mention spéciale à vous mes parias sans qui la vie au labo n'aurait jamais été la même. Aurélie, pour nos conversations qui durent des heures, pour m'avoir fait découvrir la grenouille et une utilisation inédite de la brosse à dent et surtout pour être là tout le temps, quoi qu'il arrive (les fous rires, les bons moments mais aussi les coups de gueule, les angoisses et les chagrins). Richard, pour ta compagnie au labo à 6h du matin (enfin 6h30 ahah), pour comprendre et utiliser les expressions charentaises et connaître la différence entre le Poitou Charente et la Bretagne dans cet univers de sudiste et puis merci pour ... non mais en fait rien ! Tu vois tu as finalement déteints sur moi. Plus sérieusement merci à toi aussi de ton soutien à toute épreuve. El cocleto ! Pour ton sens aigüe de la critique vestimentaire et culinaire sans quoi ma vie n'aurait pu être que meilleure. Pour être toujours partant (peut-être un peu trop toujours) pour faire la fête et trouver mes idées géniales quand elles sont pourries. Pour philosopher et s'enflammer avec moi sur des choses complètement inutiles mais qui donnent la sensation de ne pas être seule. Wiwi pour ton innocence et ta crédulité (ou crédibilité je sais déjà plus), pour ton addiction à Koh Lanta et tous les débriefings, pour tes « tu peux répéter je t'écoutais pas » après 5 minutes de monologue et pour ton naturel qui fait du bien au milieu de tout ce « faux ».

J'ai aussi une pensée reconnaissante pour Julien et Ben, qui sont toujours là chacun à leur manière pour me changer les idées et s'inquiéter de mon sort.

Je remercie ma belle-famille pour leur gentille attention quant à l'avancement de cette thèse.

*J'ai une pensée pour vous mes amis lycées, Julia, Ingrid, Alicia, Hélène, Arthur, Florent, Arnaud, Julien.
Après tout ce temps, vous êtes encore et toujours là pour moi. Merci simplement d'être vous.*

Mes derniers mots vont à ma famille. Merci papa, maman de me soutenir dans tout ce que j'entreprends et de m'avoir donné le goût de la persévérance et du travail. Merci Jojo pour ton éternelle folie qui donne l'impression que le temps s'est arrêté quand on avait 8 ans. Et finalement un grand merci à Seb pour avoir traversé tout ça avec moi et de partager ma vie.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	III
TABLE DES MATIERES	VII
TABLE DES ILLUSTRATIONS - FIGURES	XI
TABLE DES ILLUSTRATIONS –TABLEAUX	XV
LISTE DES ABREVIATIONS	XVII
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I.1. BIOFILMS ET COMMUNAUTES MICROBIENNES EN ENVIRONNEMENT MARIN	9
<i>I.1.1 Biofouling</i>	9
I.1.1.1. Problèmes économiques et écologiques liés au <i>biofouling</i> marin	9
I.1.1.2. Moyens de lutte contre le <i>biofouling</i>	11
I.1.1.2.1. Revêtements antifouling	11
I.1.1.2.2. Nouvelles alternatives.....	12
I.1.1.3. Formation du <i>biofouling</i>	14
<i>I.1.2. Biofilms bactériens en milieu marin</i>	15
I.1.2.1. Biofilms marins : Définition.....	15
I.1.2.2. Mise en place des biofilms	15
I.1.2.2.1. Formation du film conditionnant	16
I.1.2.2.2. Adhésion bactérienne « réversible ».....	16
I.1.2.2.3. Adhésion bactérienne « irréversible »	17
I.1.2.2.4. Maturation	18
I.1.2.2.5. Détachement	18
I.1.2.3. Diversité bactérienne dans les biofilms marins	19
I.1.2.4. Régulation des biofilms et état physiologique des bactéries	20
I.1.2.4.1. Développement des bactéries en biofilms.....	21
I.1.2.4.2. Croissance des bactéries en mode planctonique	21
I.2. METABOLOMIQUE	23
<i>I.2.1. Définitions et généralités</i>	23
I.2.1.1. Définitions.....	23
I.2.1.2. Intérêts et défis liés à l'utilisation de la métabolomique	26
I.2.1.2.1. Intérêts.....	26
I.2.1.2.2. Défis	27
I.2.1.3. Métabolomique et bactéries marines.....	28
<i>I.2.2. Métabolomique par Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)</i>	29
I.2.2.1. Techniques analytiques : intérêt et biais de l'utilisation de la LC-MS	29
I.2.2.2. Conduite d'une étude métabolomique par LC-MS	32
I.2.2.2.1. Préparation des échantillons	32
I.2.2.2.2. Analyse par HPLC	36
I.2.2.2.3. Spectrométrie de masse	38
I.2.2.2.4. Appareillage utilisé pour des études en métabolomique LC-MS sur des bactéries marines.....	43
I.2.2.2.5. Extraction des données et normalisation.....	44
I.2.2.2.6. Analyses statistiques multivariées	48
I.2.2.2.7. Identification de biomarqueurs	50
I.3. LES BACTERIES MARINES ET LEUR METABOLOME	52
<i>I.3.1. Différentiation des souches bactériennes marines selon leur métabolome et découverte de nouvelles molécules</i>	52
<i>I.3.2. Impact de paramètres extérieurs sur le profil métabolique des bactéries marines</i>	55
I.3.2.1 Effets de la concentration en sels	55
I.3.2.2. Impact d'autres paramètres	57

<i>1.3.3. Impact de paramètres physiologiques sur le métabolome bactérien</i>	58
1.3.3.1. Mode de culture	58
1.3.3.1.1. Biofilm versus planctonique	58
1.3.3.1.2. Co-Cultures bactéries-autres organismes	60
1.3.3.2. Phases de croissance en mode planctonique	61
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	63
II.1. ETUDE METABOLOMIQUE	65
II.1.1. <i>Culture des souches bactériennes marines</i>	65
II.1.1.1. Souches bactériennes	65
II.1.1.2. Milieux de culture	66
II.1.1.2.1. Vääänen Nine Salts Solution (VNSS)	66
II.1.1.2.2. Marine Broth (MB)	67
II.1.1.2.3. Artificial Sea Water (ASW).....	67
II.1.1.2.4. Ajout de cuivre dans les cultures	68
II.1.1.3. Méthodes de culture.....	68
II.1.1.3.1. Conservation des souches bactériennes	68
II.1.1.3.2. Conditions de culture	68
II.1.1.3.3. Caractéristique de croissance des souches bactériennes	69
II.1.1.4. Protocoles de cultures pour la mesure de métaux traces.....	70
II.1.2. <i>Prélèvement d'échantillons de biofilms formés in situ</i>	71
II.1.3. <i>Extraction du métabolome bactérien à partir de cultures</i>	71
II.1.4. <i>Analyse de métabolome bactérien</i>	72
II.1.4.1. Plateformes analytiques	72
II.1.4.1.1. HPLC-ESI-IT-MS.....	73
II.1.4.1.2. UPLC-ESI-QToF-MS	74
II.1.4.2. Séquence d'injection.....	74
II.1.5. <i>Extraction des données</i>	75
II.1.6. <i>Pré-traitements et filtrations</i>	75
II.1.6.1. Filtration en fonction du rapport signal sur bruit.....	76
II.1.6.2. Filtration en fonction du coefficient de variation	76
II.1.6.3. Filtration en fonction du coefficient de corrélation	76
II.1.7. <i>Analyses statistiques multivariées</i>	77
II.1.8. <i>Identification des métabolites</i>	77
II.1.9. <i>Réseaux moléculaires</i>	78
II.2. EFFETS DU CUIVRE SUR DES BACTERIES MARINES CULTIVEES <i>IN VITRO</i>	79
II.2.1. <i>Effet du cuivre sur les bactéries cultivées en mode planctonique</i>	79
II.2.2. <i>Effet du cuivre sur la viabilité cellulaire</i>	81
II.2.2.1. Test à la résazurine	81
II.2.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de de la Concentration Minimale Létale ou Bactéricide (CML).....	82
II.2.3. <i>Effet du cuivre sur l'adhésion bactérienne</i>	82
II.3. ETUDE PROTEOMIQUE.....	84
II.3.1. <i>Préparation des échantillons</i>	84
II.3.1.1. Culture bactérienne	84
II.3.1.2. Extraction du protéome	84
II.3.2. <i>Analyse protéomique</i>	84
CHAPITRE III : UTILISATION DE LA METABOLOMIQUE POUR L'ETUDE DE BIOFILMS MARINS NATURELS	85
III.1. PREVENT : PROTECTION DU LITTORAL MEDITERRANEEN : EVALUATION, SURVEILLANCE, CONSEQUENCES, IMPACT ECONOMIQUE ET SOCIETAL - APPLICATION A LA RADE DE TOULON	88
III.1.1. <i>Contexte général</i>	88
III.1.2. <i>Présentation de l'étude par métabolomique de biofilms complexes formés au niveau de sites présentant des profils de pollution contrastés</i>	91
III.1.3. <i>Résultats et discussion</i>	94
III.1.3.1. Evaluation visuelle de la colonisation des plaques immergées.....	94
III.1.3.1. Impact du site d'immersion	95
III.2. DRACONS : <i>DRAG REDUCING ANTIFOULING COATINGS FOR NAVY SHIPS</i>	105
III.2.1. <i>Contexte général</i>	105

III.2.2. Présentation de l'étude par métabolomique de biofilms complexes formés <i>in situ</i> sur différents revêtements antifouling dans des conditions hydrodynamiques variées	107
III.2.3. Résultats et discussion	112
III.2.3.1. Evaluation visuelle de la colonisation des plaques immergées	112
III.2.3.2. Effet du revêtement sur la signature chimique des biofilms formés <i>in situ</i>	114
III.2.3.3. Effet du temps d'immersion sur la signature chimique des biofilms formés <i>in situ</i>	123
III.2.3.3.1. Surface PVC	123
III.2.3.3.2. Revêtement SPC	126
III.2.3.3.3. Revêtements FRC	128
III.2.3.4. Effet du site d'immersion sur la signature chimique des biofilms formés <i>in situ</i>	128
III.2.3.5. Biofilms naturels : relations entre structure des communautés microbiennes et signature chimique	128
CHAPITRE IV : DISCRIMINATION PAR METABOLOMIQUE (LC-MS) DE QUATRE BACTERIES MARINES CAPABLE DE FORMER UN BIOFILM ET EVALUATION DE L'INFLUENCE DES PARAMETRES DE CULTURE	137
IV.1. INTRODUCTION	139
IV.2 ARTICLE: DISCRIMINATION OF FOUR MARINE BIOFILM-FORMING BACTERIA BY LC-MS METABOLOMICS AND INFLUENCE OF CULTURE PARAMETERS	139
IV.2.1. Abstract	139
IV.2.2. Introduction	140
IV.2.3. Experimental section	144
IV.2.3.1. Reagents	144
IV.2.3.2. Bacterial strains, culture conditions and metabolite extraction	144
IV.2.3.3. Metabolic fingerprinting by LC-MS	145
IV.2.3.3.1. LC-ESI-IT-MS analyses	145
IV.2.3.3.2. UPLC-ESI-QToF-MS analyses	145
IV.2.3.3.3. Quality control	146
IV.2.3.3.4. Data preprocessing and filtering	146
IV.2.3.3.5. MS/MS networking	147
IV.2.3.3.6. Annotation of biomarkers	147
IV.2.3.3.7. Statistical analyses	147
IV.2.3.3.8. Data visualization	148
IV.2.4. Results and discussion	148
IV.2.4.1. Selection of the metabolite extraction method (experiment #1)	148
IV.2.4.2. Impact of the culture medium (experiment #2)	155
IV.2.4.3. Impact of the growth phase (experiment #3)	157
IV.2.4.4. Impact of the mode of culture (experiment #4)	161
IV.2.4.5. Analytical platforms comparison and identification of putative biomarkers	164
IV.2.5. Conclusion	173
IV.2.6. Acknowledgements	173
CHAPITRE V : ETUDE PAR METABOLOMIQUE ET PROTEOMIQUE DE LA DISCRIMINATION PHENOTYPIQUE DE PSEUDOALTEROMONAS LIPOLYTICA TC8 CULTIVEE EN MODE PLANCTONIQUE ET EN BIOFILM	175
V.1 INTRODUCTION	177
V.2. ARTICLE: A COMBINED METABOLOMICS/PROTEOMICS APPROACH FOR THE DIFFERENTIATION BETWEEN BIOFILM AND PLANKTONIC PHENOTYPES OF <i>PSEUDOALTEROMONAS LIPOLYTICA</i> TC8	177
V.2.1. Abstract	177
V.2.2. Introduction	178
V.2.3. Materials and Methods	180
V.2.3.1. Reagents	180
V.2.3.2. Cell Growth Conditions	180
V.2.3.3. Metabolome Analysis	181
V.2.3.4. Proteome analysis	182
V.2.3.4.1. Sample preparation	182
V.2.3.4.2. Digestion and nano-LC-MS/MS	182
V.2.3.4.3. Database search and data analysis	183
V.2.4. Results and Discussion	184
V.2.4.1. Metabolomics analysis	184
V.2.4.2. Proteomics analysis	190
V.2.4.2.1. Comparison of proteomes of planktonic and biofilm phenotypes of <i>P. lipolytica</i> TC8	190

V.2.4.2.2. Functional roles of proteins	192
V.2.4.2.3. Differential expression analysis of proteins in biofilm and planktonic samples of <i>P. lipolytica</i> TC8 ...	194
V.2.4.2.4. Multivariate analyses of protein profiles of the two phenotypes of <i>P. lipolytica</i> TC8	196
V.2.5. Conclusion	199
CHAPITRE VI : ETUDE PAR METABOLOMIQUE ET PROTEOMIQUE DE LA REPONSE DE <i>PSEUDOALTEROMONAS LIPOLYTICA</i> TC8 A UN STRESS CUPRIQUE.....	201
VI.1. STRESS AU CUIVRE ET REPONSE METABOLIQUE BACTERIENNE	203
VI.1.1. Introduction.....	203
VI.1.2 Effet de concentrations environnementales de cuivre sur le métabolome de quatre souches de bactéries marines – Etude métabolomique	204
VI.1.2.1. Présentation de l'étude	204
VI.1.2.2. Résultats et discussion	205
VI.1.3. Recherche de concentrations inhibitrices de la croissance pour chaque souche bactérienne.....	207
VI.2. METABOLOMIC AND PROTEOMIC ANALYSIS OF THE MARINE BIOFILM-FORMING BACTERIA <i>PSEUDOALTEROMONAS LIPOLYTICA</i> TC8 IN RESPONSE TO COPPER CONTAMINATION	208
VI.2.1. Introduction.....	208
VI.2.2. Materials and Methods	210
VI.2.2.1. Reagents.....	210
VI.2.2.2. Cell growth conditions.....	210
VI.2.2.3. Dose-response growth experiments.....	211
VI.2.2.3.1. Determination of bacterial growth inhibition concentrations (IC_{25} and IC_{50}).....	211
VI.2.2.3.2. Susceptibility testing (determination of MIC and MBC).....	212
VI.2.2.4. Dose-response adhesion experiment	212
VI.2.2.5. Metabolome analysis in response to copper stress.....	213
VI.2.2.6. Proteome analysis in response to copper stress.....	213
VI.2.2.6.1. Protein sample preparation	213
VI.2.2.6.2. Digestion and nano-LC-MS/MS	214
VI.2.2.6.3. Database search and data analysis	215
VI.2.3. Results and discussion	215
VI.2.3.1. Dose-dependent effect of copper on cell planktonic growth and biofilm formation	215
VI.2.3.2. Metabolic stress response under copper exposure	219
VI.2.3.3. Proteome analysis in response to copper stress	237
VI.2.4. Conclusion	254
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	255
CONCLUSIONS	257
PERSPECTIVES	262
A propos de l'analyse du métabolome de biofilms marins naturels.....	262
A propos de la discrimination de bactéries marines sur la base de leur métabolome	262
A propos de la discrimination phénotypique (biofilm vs planctonique) de <i>P. lipolytica</i> TC8	264
A propos de la variation du métabolome et du protéome de <i>P. lipolytica</i> TC8 en réponse à un stress cuprique.....	264
ANNEXE I : CHROMATOGRAMMES DES ECHANTILLONS CARACTERISTISTIQUES ETUDIES.....	267
ANNEXE II : SPECTRES DE MASSE ET FRAGMENTATION PROPOSEE DES METABOLITES D'INTERET	273
ANNEXE III : LISTE DES PROTEINES IDENTIFIEES CHEZ <i>P. LIPOLYTICA</i>	281
ANNEXE IV : LISTE DES MOLECULES PUTATIVEMENT IDENTIFIEES CHEZ LES 4 SOUCHES TC4, TC7, TC8 ET TC11 .	297
LISTE DES COMMUNICATIONS	301
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUE	305

TABLE DES ILLUSTRATIONS - FIGURES

Figure 1 : Biofouling présent sur différentes structures marines.....	10
Figure 2 : Schéma de la formation du biofouling sur une surface immergée en milieu marin	14
Figure 3 : Étapes de formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée	16
Figure 4 : Courbe de croissance bactérienne.....	22
Figure 5 : La cascade « omique »	24
Figure 6 : Nombre d'articles contenant le mot « metabolomic* » dans le titre en fonction de l'année de parution (recherche bibliographique ISI Web of Science du 3/02/2017.....	25
Figure 7 : Schéma de la composition d'un spectromètre de masse et des différentes étapes d'analyse associées à chaque module	39
Figure 8 : Schéma du principe d'ionisation par electrospray	40
Figure 9 : Schéma du phénomène de désorption	40
Figure 10 : Schéma d'un Q-ToF	41
Figure 11 : Schéma d'un electrospray couplé avec une trappe ionique.....	42
Figure 12 : Données brutes de LC-MS en 3 dimensions : couplage du chromatogramme avec les spectres de masse en chaque point	45
Figure 13 : Traitement des données LC-MS brutes par XCMS	46
Figure 14 : Courbe de croissance en fonction du temps des 5 bactéries de références sélectionnées pour cette étude	70
Figure 15 : Schéma résumant les différentes étapes du protocole d'extraction du métabolome à partir de cultures de bactéries marines	72
Figure 16 : Schéma d'ensemencement des microplaques pour le test d'inhibition de la croissance des bactéries marines cultivées en mode planctonique	80
Figure 17 : Distribution de l'arsenic, du cuivre, du mercure, du plomb et du zinc dans les sédiments de surface (0-5 cm) de la rade de Toulon.....	90
Figure 18 : Localisation géographique des cinq sites d'immersion des plaques PC durant le mois de juin 2015 dans la rade de Toulon.....	92
Figure 19 : Dispositif expérimental utilisé lors de l'immersion des plaques PC en juin 2015 dans la rade de Toulon.....	93
Figure 20 : Photographies des biofilms formés sur des plaques PC à l'issue d'un mois d'immersion en surface et en profondeur en cinq points de la rade de Toulon	94
Figure 21 : a) Analyse ACP ; b) analyse PLS-DA (5 classes : une classe par point géographique) ; c) analyse PLS-DA (2 classes : 12 et 41, et 15, CS et MIS des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir des biofilms récoltés sur les plaques PC immergées en surface et en profondeur pendant 1 mois aux cinq sites de récoltes de la rade de Toulon	95
Figure 22 : a) Analyse ACP et b) analyse PLS-DA (une classe avec les échantillons collectés aux points 12, 15 et CS AR et une classe avec ceux provenant des points MIS, 41 et CS AV des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir des biofilms récoltés sur les plaques immergées en surface ; c) Analyse ACP et d) analyse PLS-DA (5 classes : une classe par site de collecte) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir des biofilms récoltés sur les plaques immergées en profondeur	97
Figure 23 : Représentation heatmap à partir des données UPLC-HRMS des métabolites discriminants entre les sites d'immersion.....	100
Figure 24 : ACC représentant la variation de la composition en microorganismes (cytométrie en flux) des biofilms récoltés aux points MIS, CS, 15 et 41 en fonction des données géochimiques.....	102
Figure 25 : ACP réalisée à partir des données de l'analyse biochimique de la matrice (EPS) des biofilms récoltés au fond et en surface au niveau des différents sites d'immersion	104
Figure 26 : Site des immersions statiques de la baie de Toulon	109
Figure 27 : Site des immersions de la baie de Banyuls-sur-Mer	110
Figure 28 : Site des immersions dynamiques de La Seyne-sur-Mer.....	111
Figure 29 : Photos des plaques PVC, SPC et FRC1 montrant l'évolution visuelle de la colonisation à l'issue des sept temps d'immersion (rade de Toulon)	113
Figure 30 : Photos des plaques PVC, SPC, FRC1 et FRC2 montrant la colonisation après 2,5 mois d'immersion dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer	113
Figure 31 : Analyse ACP et PLS-DA des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues par ionisation positive et par ionisation négative d'échantillons de biofilms collectés in situ sur des plaques PVC, ou recouvertes avec un revêtement SPC ou FRC prélevées aux sept temps d'immersion	114
Figure 32 : Représentation heatmap à partir des données UPLC-HRMS des métabolites discriminants entre les revêtements FRC1, PVC et SPC	117
Figure 33 : Analyses ACP des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en ionisation positive et en ionisation négative sur des biofilms prélevé à t ₁ (1j), t ₂ (4j) et à t ₇ (2,5 mois) sur des revêtements PVC, FRC et SPC	119

Figure 34 : Abondances cellulaires bactériennes observées sur les trois types de surfaces (PVC, FRC1 et SPC) aux sept temps d’immersion par cytométrie en flux.....	120
Figure 35 : Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l’ADNr sur des surfaces de type PVC, FRC et SPC à t ₆ (28j)	122
Figure 36 : Analyses ACP et PLS-DA des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en mode d’ionisation positif et négatif des échantillons correspondant à des biofilms provenant de surfaces en PVC prélevées aux sept temps d’immersion dans la rade de Toulon.....	123
Figure 37 : Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l’ADNr sur des revêtements PVC après 1j (t ₁), 8j (t ₃), 20j (t ₅), 28j (t ₆) et 2,5 mois (t ₇) d’immersion dans la rade de Toulon.....	125
Figure 38 : Analyses ACP et PLS-DA des données obtenues par UPLC-ESI-QToF-MS en mode d’ionisation positif et négatif des échantillons correspondant aux biofilms formés in situ sur les revêtements SPC prélevés aux sept temps d’immersion dans la rade de Toulon.....	126
Figure 39 : Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l’ADNr sur des revêtements SPC après 20j (t ₅), 28j (t ₆) et 2,5 mois (t ₇) d’immersion	128
Figure 40 : Analyses ACP et PLS-DA des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en mode d’ionisation positif et négatif des échantillons correspondant à des biofilms formés in situ sur les revêtements FRC et prélevés aux sept temps d’immersion dans la rade de Toulon	129
Figure 41 : Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l’ADNr sur des revêtements FRC après 20j (t ₅), 28j (t ₆) et 2,5 mois (t ₇) d’immersion.....	130
Figure 42 : Analyses ACP des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir de biofilms prélevés au temps t ₇ (2,5 mois) dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer sur des surfaces PVC, SPC et FRC en mode d’ionisation positif et négatif	131
Figure 43 : Analyses ACP des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir de biofilms prélevés au temps t ₇ dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer, en mode d’ionisation positif et négatif sur des surfaces PVC, sur des revêtements SPC et sur des revêtements FRC1 et FRC2.....	132
Figure 44 : Abondances cellulaires des procaryotes et des autotrophes obtenues par analyse en cytométrie de flux sur des surfaces PVC, et des revêtements SPC, FRC1 et FRC2 au temps t ₇ dans la rade de Toulon et la baie de Banyuls-sur-Mer.....	133
Figure 45 : Statistique r de Mantel entre les données de structure de communautés (métagénomique) et les données métabolomiques des échantillons de biofilms formés in situ à tous les temps d’immersion sur les revêtements PVC, SPC et FRC dans la rade de Toulon	135
Figure 46 : Overview of the experimental workflow used for the discrimination of the four marine bacterial strains and for the putative identification of relevant biomarkers.....	143
Figure 47 : Growth stages of <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8, <i>Shewanella</i> sp. TC11, <i>Persicivirga</i> (<i>Nonlabens</i>) <i>mediterranea</i> TC4 and TC7 cultured planktonically in VNSS medium	149
Figure 48 : Number of m/z features (LC-LRMS) detected for the whole dataset of the four bacterial strains depending on the extraction solvent.....	150
Figure 49 : Venn diagrams showing unique and shared metabolites (LC-LRMS) for the four bacterial strains in each extraction condition.....	150
Figure 50 :PCA score plot obtained from LC-LRMS profiles of the four bacterial strains; PLS-DA score plot obtained from LC-MS profiles of the four bacterial strains cultured planktonically in two media (VNSS and MB); PLS-DA score plot obtained from LC-MS profiles of the four bacterial strains at five time points of their growth curve; d) PLS-DA score plot obtained from LC-MS profiles of three of the strains cultured in biofilms and planktonic conditions in VNSS.....	152
Figure 51 : PCA and PLS-DA score plots of LC-LRMS profiles of the four bacterial strains extracted with MeOH a) and d), MeOH/DCM b) and e) or EtOAc c).....	153
Figure 52 : Number of m/z features (LC-LRMS) detected for the four bacterial strains depending on the culture media (MB or VNSS).....	155
Figure 53 : PCA and PLS-DA score plots a) of the LC-LRMS profiles of the four bacterial strains cultured planktonically in two media (VNSS or MB)	156
Figure 54 : Number of m/z features (LC-LRMS) detected after the filtering steps for each bacterial strain (extraction with EtOAc, planktonic cultures in VNSS) at five time points of the growth curve	158
Figure 55 : PLS-DA score plots of LC-LRMS profiles of <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8, <i>Persicivirga</i> (<i>Nonlabens</i>) <i>mediterranea</i> TC4 and <i>Shewanella</i> sp. TC11 strains at five time points of their growth curve	160
Figure 56 : PLS-DA score plots of LC-LRMS profiles of a <i>Persicivirga</i> (<i>Nonlabens</i>) <i>mediterranea</i> TC7, <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8 and <i>Shewanella</i> sp. strains cultured in planktonic and biofilm modes.....	162
Figure 57 : PCA and PLS-DA score plots of LC-LRMS profiles of three of the strains cultured in biofilms (24 and 48h) in VNSS	163
Figure 58 : PCA score plots of LC-LRMS profiles of three of the strains cultured in biofilms (24 and 48h) and planktonic conditions (five time points of their growth curve) in VNSS	163
Figure 59 : PCA score plots of LC-HRMS profiles of the four bacterial strains	165
Figure 60 : PLS-DA score plot obtained from LC-HRMS profiles of the four bacterial strains ; PLS-DA loading plots with the most contributing mass peaks (VIP) numbered from 1 to 17; Heatmap of the 17 differential metabolites with VIP values > 3.0 from the PLS-DA model	166

Figure 61: PLS-DA score plots of LC-HRMS profiles of <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8) at five time points of its growth curve.....	166
Figure 62: Molecular networks of HRMS fragmentation data obtained from cultures of the four bacterial strains.....	168
Figure 63: HRMS mass spectra of <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i> TC8 ornithine lipid at m/z 677.5785 (VIP $n^{\circ}1$) and proposed fragmentation of VIP $n^{\circ}1$	172
Figure 64: PCA, PLS-DA score plot, PLS-DA biplot and heatmap representation of the 18 metabolites with VIP values > 1 of metabolomic data of <i>P. lipolytica</i> TC8 samples cultured in planktonic and biofilm conditions.	186
Figure 65: Distribution of proteins identified in samples of <i>P. lipolytica</i> TC8	190
Figure 66: Volcano-plot of the complete quantified protein cohort from <i>P. lipolytica</i> TC8 samples	191
Figure 67: Classification based on GO of all significantly up- and down-regulated proteins in biofilm samples of <i>P. lipolytica</i> TC8 compared to planktonic ones	193
Figure 68: OPLS-DA score plot and loading S-plot of proteomics data of <i>P. lipolytica</i> TC8 cultured in biofilm and planktonically.	197
Figure 69 : Description du gradient de concentration en cuivre dissous (nM) dans la rade de Toulon en 2015.....	203
Figure 70 : Score plot ACP des données de métabolomique (LC-MS) obtenues à partir de cultures planctoniques des souches TC4, TC8, TC11 et 4M6 réalisées à trois concentrations environnementales de cuivre ou sans cuivre.....	206
Figure 71: Growth inhibition of <i>P. lipolytica</i> TC8 cultured in VNSS and MB supplemented with various copper concentrations	216
Figure 72: Copper effect on the viability of <i>P. lipolytica</i> TC8 in VNSS and MB medium supplemented with various copper concentrations.....	217
Figure 73: Copper effect on the adhesion of <i>P. lipolytica</i> TC8 in VNSS and ASW medium supplemented with various copper concentrations.....	218
Figure 74: PCA score plot based on UPLC-HRMS data of planktonic and biofilm samples of <i>P. lipolytica</i> TC8 cultured with (IC ₂₅ and IC ₅₀) and without (Control) copper	220
Figure 75: 3D PLS-DA score plot based on UPLC-HRMS data of planktonic and biofilm samples of <i>P. lipolytica</i> TC8 cultured with (IC ₂₅ and IC ₅₀) and without (Control) copper.....	221
Figure 76: HCA based on PLS-DA of UPLC-HRMS data of planktonic and biofilm samples of <i>P. lipolytica</i> TC8 cultured with (IC ₂₅ and IC ₅₀) and without (Control) copper.....	221
Figure 77: PLS-DA score plot based on UPLC-HRMS data of planktonic control and Cu-treated (IC ₂₅ and IC ₅₀) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8	223
Figure 78: Heatmap of the nineteen differential metabolites (VIP score value > 1) from the PLS-DA model (2) of planktonic control or Cu-treated (IC ₂₅ and IC ₅₀) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8	224
Figure 79: PLS-DA score plot based on UPLC-HRMS data of biofilm control and Cu-treated (IC ₂₅ and IC ₅₀) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	227
Figure 80: Heatmap of the twenty differential metabolites (VIP score value > 1) from the PLS-DA model (3) of biofilm control and Cu-treated (IC ₂₅ and IC ₅₀) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	228
Figure 81: Heatmap of the thirty-eight differential metabolites (VIP score value > 1) from the PLS-DA model (3) of biofilm and planktonic control or Cu-treated (IC ₂₅ and IC ₅₀) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	232
Figure 82: Venn diagram representing proteins identified in the three sample replicates of each culture condition of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	238
Figure 83: Volcano plots representing changes in protein expression with the fold change of all quantified proteins in planktonic and biofilm cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	239
Figure 84: Venn diagrams representing the proteins up-regulated and down-regulated under copper exposure in planktonic and biofilm cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	239
Figure 85: Function classification (based on gene ontology) of significantly up-and down-regulated proteins in <i>P. lipolytica</i> TC8 biofilm and planktonic cells under copper exposure.....	244
Figure 86: Different transporter types participating in transition copper (and metal in general) translocation in Gram-negative bacteria.....	245
Figure 87: Hemolysin export system: HlyBD-ToIC efflux system.....	247
Figure 88: PCA score plot, HCA based on PLS-DA, bi-plot representing distribution of the 200 VIP > 1 of OPLS-DA and S-plot representing distribution of the 200 VIP > 1 of OPLS-DA based on LC-HRMS protein data of planktonic and biofilm control and Cu-treated (IC ₂₅ and IC ₅₀) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	252

TABLE DES ILLUSTRATIONS – TABLEAUX

Tableau 1 : Paramètres utilisés lors de précédentes études pour la préparation d'échantillons de bactéries marines destinés à une analyse en métabolomique par LC-MS	36
Tableau 2 : Bilan bibliographique des conditions analytiques utilisées lors de l'analyse en métabolomique par LC-MS de bactéries marines	44
Tableau 3 : Définitions des niveaux d'identification des métabolites en métabolomique	51
Tableau 4 : Données relatives aux cinq souches de bactéries marines étudiées	65
Tableau 5 : Composition chimique du milieu de culture VNSS	66
Tableau 6 : Composition chimique du milieu de culture MB	67
Tableau 7 : Composition chimique de l'ASW	68
Tableau 8 : Paramètres utilisés lors de l'extraction des données LC-MS brutes avec XCMS sous R	75
Tableau 9 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés aux points 12, 15, 41, MIS et CS de la rade de Toulon après un mois d'immersion	95
Tableau 10 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés aux points 12, 15, 41, MIS et CS en profondeur et en surface	97
Tableau 11 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés aux points 12, 15, 41, MIS et CS en profondeur	100
Tableau 12 : Liste des biomarqueurs (Valeur VIP > 1,1) identifiés par UPLC-HRMS pour la discrimination des biofilms formés aux différents sites d'immersion.....	101
Tableau 13 : Concentrations en métaux (zinc, plomb et cuivre) de la rade de Toulon et de la baie de Banyuls-sur-Mer mesurées en 2015.....	108
Tableau 14 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms en fonction de la nature des surfaces sur lesquels ils se sont formés.....	115
Tableau 15 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms en fonction de la nature des surfaces sur lesquels ils se sont formés.....	118
Tableau 16 : Liste des biomarqueurs (Valeur VIP > 1,1) identifiés par UPLC-HRMS pour la discrimination des biofilms formés sur les revêtements PVC, FRC et SPC	118
Tableau 17 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms formés in situ sur des surfaces PVC aux différents temps d'immersion dans la rade de Toulon	124
Tableau 18 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés sur les revêtements SPC en fonction du temps d'immersion (rade de Toulon)	127
Tableau 19 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés sur les revêtements FRC en fonction du temps d'immersion (rade de Toulon).....	129
Tableau 20 : Summary of the parameters for the assessment of the quality and of the validity of the PLS-DA models used for the discrimination of the bacterial strains according to different culture or analysis conditions	154
Tableau 21 : Composition of the MB and VNSS culture Media	156
Tableau 22 : Summary of parameters for assessment of the quality and the validity of the PLS-DA models used for the intra-strain discrimination depending on different culture conditions.....	159
Tableau 23 : List of the biomarkers identified by LC-HRMS for the discrimination of the four bacterial strains	171
Tableau 24 : Summary of the parameters for the assessment of the quality and of the validity of the PLS-DA models used for the discrimination of the two phenotypes of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	186
Tableau 25 : List of the m/z features with VIP value > 1.5 (model 2) putatively identified from LC-HRMS profiles of <i>P. lipolytica</i> TC8 cultured in biofilm and planktonic conditions	189
Tableau 26 : Subset of proteins differentially expressed when <i>P. lipolytica</i> TC8 was cultivated in biofilm	192
Tableau 27 : Summary of the parameters for the assessment of the quality and of the validity of the PLS-DA models used for the discrimination of the two phenotypes of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	197
Tableau 28 : List of the most significant proteins (VIP value > 1.5) up- or down-regulated in biofilm conditions.....	199
Tableau 29 : Valeurs estimées de l'IC ₅₀ de cuivre pour les 4 souches bactériennes de l'étude	207
Tableau 30 : Susceptibility to copper of <i>P. lipolytica</i> TC8 cultured planktonically in VNSS and MB media.....	218
Tableau 31 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS-DA models used for the discrimination of planktonic control and Cu-treated cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8	223
Tableau 32 : List of the biomarkers (VIP score value > 1.5) identified by LC-HRMS for the discrimination of planktonic control and Cu-treated (IC ₂₅ and IC ₅₀) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	225
Tableau 33 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS-DA models used for the discrimination of biofilm cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8 according to copper exposure.....	227

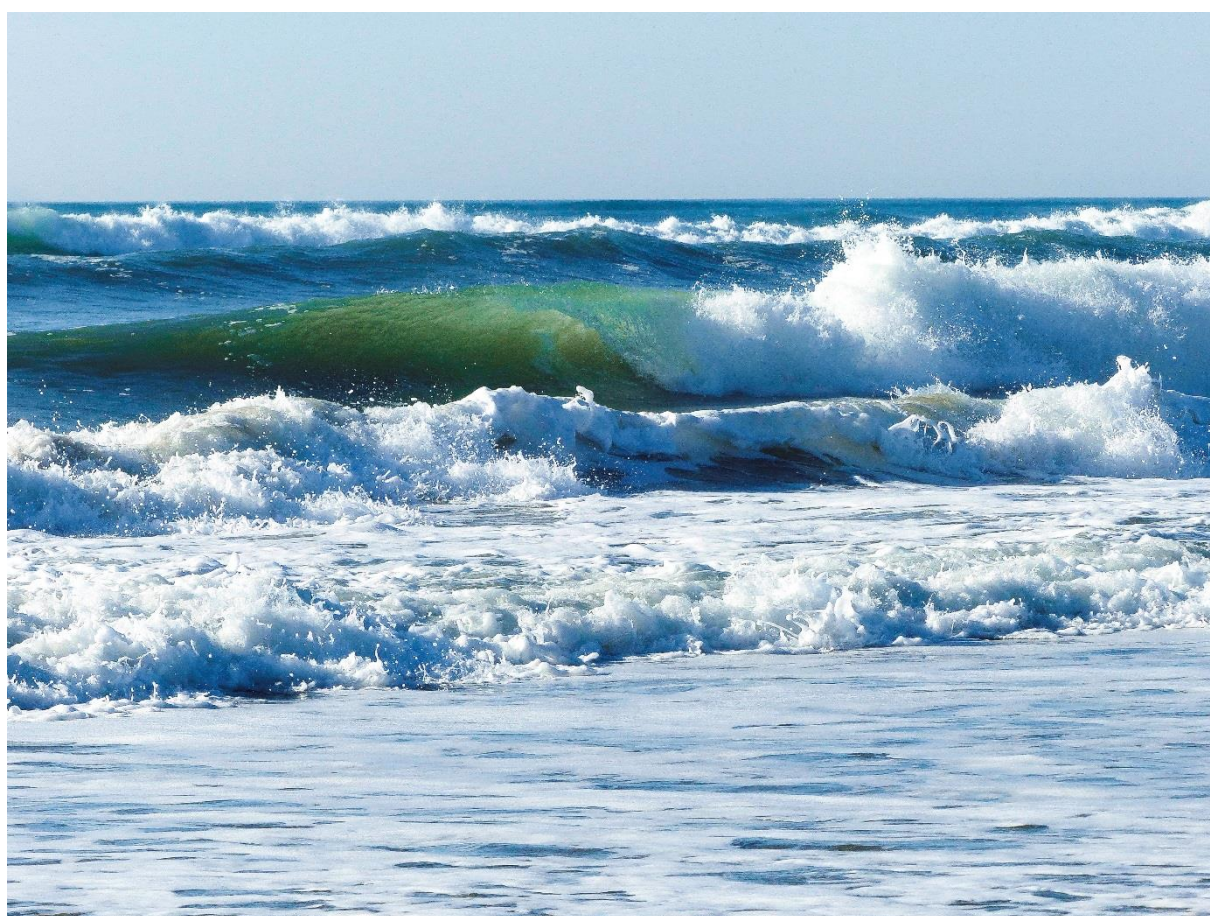
Tableau 34 : List of the biomarkers identified by LC-HRMS for the discrimination of biofilm control and Cu-treated (IC_{25} and IC_{50}) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	229
Tableau 35 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS-DA models used for the discrimination of planktonic and biofilm control and Cu-treated (IC_{25} and IC_{50}) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8	231
Tableau 36 : List of the biomarkers identified by LC-HRMS as over-produced only in planktonic Cu-treated (IC_{25}) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8	233
Tableau 37 : List of the biomarkers identified by LC-HRMS as over-produced only in planktonic Cu-treated (IC_{50}) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8	233
Tableau 38 : List of the biomarkers identified by LC-HRMS as under-produced in planktonic Cu-treated (IC_{50}) cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8 and not found in biofilms	234
Tableau 39 : List of the biomarkers identified by LC-HRMS as over-produced in biofilm Cu-treated cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8 (whatever the copper concentration).....	234
Tableau 40 : List of the biomarkers identified as over-produced in biofilm Cu-treated cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8 (whatever the copper concentration) and common to planktonic Cu-treated (IC_{25}) samples	235
Tableau 41 : Summary of the number of proteins identified in each culture condition of <i>P. lipolytica</i> TC8 and up- or down-regulated under copper stress.....	237
Tableau 42 : Subset of proteins differentially expressed in response to copper exposure in planktonic and biofilm cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8	241
Tableau 43 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS- and OPLS-DA models used for the discrimination planktonic and biofilm control and Cu-treated cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8.....	250
Tableau 44 : List of the most significant proteins up- or down-regulated when biofilm and planktonic cultures of <i>P. lipolytica</i> TC8 were Cu-treated.....	251

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABC** : Cassette de liaison ATP (*ATP-binding cassette*)
ACC : Analyse canonique des correspondances (*Canonical Correspondance Analysis, CCA*)
ACP : Analyse en Composante Principale (*Principal Component Analysis, PCA*)
ACN : Acétonitrile
AcOEt : Acétate d'Ethyle (*Ethyl Acetate, EtOAc*)
ADNr : Acide DésoxyriboNucléique ribosomale
AHL : N-Acyl Homosérine Lactone
AMP : Adénosine monophosphate cyclique
ASW : Eau de mer artificielle (*Artificial Sea Water*)
ATP : Adénosine TriPhosphate
Bf : Biofilm
CDP : Polymère à dégradation contrôlée (*Controlled Depletion Polymer*)
COD : Carbone Organique Dissous
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)
CID : Collision induite par dissociation (*Collision Induced Dissociation*)
CS : *Cosine Score*
Cu : Cuivre
CV-ANOVA : Validation croisée de l'analyse de la variance (*Cross Validation-ANalysis Of VAriance*)
DART : *Direct Analysis in Real Time*
DCM : Dichlorométhane
DESI : *Desorption EletroSpray Ionisation*
DGA : Direction Générale de l'Armement
DGT : Gradient de diffusion en couche mince (*Diffusive Gradient in Thin films*)
DIMS : Spectrométrie de masse en infusion directe (*Direct Infusion Mass Spectrometry*)
DO : Densité Optique
DRACONS : *Drag Reducing Antifouling Coatings for Navy Ships*
EC : Concentration efficace (*Effective Concentration*)
ELSD : Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (*Evaporative Light Scattering Detector*)
EPS : Substances polymériques extracellulaires (*Extracellular Polymeric Substances*)
ESI : Ionisation par électronébulisation (*ElectroSpray Ionization*)
FC : *Fold Change*
FRC : *Foul Release Coatings*
FT-ICR : *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*
GC : Chromatographie en phase gazeuse (*Gas Chromatography*)
GL : *Glycine Lipid*
GNPS : *Global Natural Product Social molecular networking*
GO : Onthologie génique (*Gene Ontology*)
HCA : Analyse hiérarchique des groupes (*Hierarchical Cluster Analysis*)
HOL : *Hydroxylated Ornithine Lipid*
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
HRMS : Spectrométrie de masse à haute résolution (*High Resolution Mass Spectrometry*)
IC : Concentration inhibitrice (*Inhibitory Concentration*)
IF : Intensité de Fluorescence (*Fluorescence intensity*)
IMO : Organisation maritime internationale (*International Marine Organisation*)

IT : Trappe à ions (*Ion Trap*)
KEGG : *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
LC : Chromatographie en phase liquide (*Liquid Chromatography*)
LDI : Ionisation par désorption laser (*Laser Desorption Ionization*)
LRMS : Spectrométrie de masse basse résolution (*Low Resolution Mass Spectrometry*)
MALDI : Ionisation par désorption laser assistée par une matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)
MB : *Marine Broth*
MBC : Concentration bactéricide minimum (*Minimum Bactericidal Concentration*)
MeOH : Méthanol
MIC : Concentration inhibitrice minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*)
MFP : Protéine de fusion membranaire interne (*inner Membrane Fusion Protein*)
MS : Spectrométrie de masse (*Mass Spectrometry*)
NGS : Séquençage de nouvelle génération (*Next Generation Sequencing*)
OD : Densité optique (*Optical Density*)
OL : *Ornithine Lipid*
OMF : *Outer Membrane Factor*
OPLS-DA : *Orthogonal Partial Least Square - Discriminant Analysis*
PC : Polycarbonate
PE : *PhosphatidylEthanolamine*
PI : Planctonique
PLS-DA : *Partial Least-Square - Discriminant Analysis*
PREVENT : Protection du littoral méditerranéen : Evaluation, surveillance, conséquences, impact économique et sociétal – Application à la rade de Toulon
PVC : Polychlorure de vinyle (*PolyVinyl Chloride*)
Q-ToF : Quadripôle - temps de vol (*Quadrupole – Time of Flight*)
RMN : Résonance magnétique nucléaire (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*)
RNA : Acide nucléique ribosomale (*Ribosomal Nucleic Acid*)
RND : Résistance nodulaire à la division cellulaire (*Resistance Nodulation cell division*)
RT : Temps de rétention (*Retention Time*)
SPC : Revêtements auto-polissant (*Self Polishing Coatings*)
SPH : Self Polishing Hybrid
TBT : Tributylétain (*TriButyl Tin*)
TC : *Toulon Collection*
TPM : Toulon Provence Méditerranée
UFC : Unité formant une colonie (*Colony-Forming Unit, CFU*)
UniProtKB : Base de données Uniprot (*UniProt KnowledgeBase*)
UHPLC : Chromatographie liquide à ultra haute performance (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)
VIP : Importance de la variable sur la projection (*Variable Importance on Projection*)
VNSS : *Väätänen Nine Salts Solution*
VS : *Versus*

INTRODUCTION GENERALE



Plus de 70% de la surface de la Terre est recouverte par l'océan mondial (constitué de cinq océans ainsi que de nombreuses mers). Même s'il évoque principalement les loisirs tels que les voyages, la navigation ou encore la pêche, le milieu marin est essentiel au bon fonctionnement de notre planète et il concentre une part majeure des espèces vivantes (Mora et al., 2011; Costello et al., 2013). Une partie de cette bioressource marine permet ainsi de nourrir chaque jour des millions de personnes mais une grande portion reste encore inexplorée et peu comprise.

Au sein de cet immense réservoir de biodiversité, la composante invisible microbienne et son rôle dans les principaux cycles biologiques ne sont réellement étudiés que depuis quelques dizaines d'années. Pourtant, il est estimé qu'un seul millilitre d'eau de mer prélevé dans les cent premiers mètres concentre entre 10^5 et 10^6 bactéries. Ces microorganismes sont souvent différents physiologiquement de ceux rencontrés dans des environnements terrestres. Ils ont en effet la particularité d'avoir développé des stratégies d'adaptation, de survie et de défense adaptées aux conditions particulières qui caractérisent le milieu marin (salinité, pH, oxygénation réduite, basses températures, fortes pressions, ...) (Colwell and Morita, 1975). Les bactéries marines sont de véritables actrices de l'équilibre biologique de par leur association aux processus de destruction et de recyclage de la matière organique, leur influence dans la production de méthane ou de diméthylsulfoxyde dans l'atmosphère mais également, du fait de leur capacité de chélation des métaux lourds. Depuis quelques années, les bactéries marines focalisent de plus en plus d'attention car si les océans sont aujourd'hui capables de nourrir les hommes, ils seront également capable de les soigner (en lien avec les capacités de défenses particulières des bactéries se trouve potentiellement un large arsenal de molécules bioactives originales) et d'apporter des réponses à des problèmes actuels de société (recyclage de déchets, remédiation de sites pollués, production de matériaux durables et d'énergies renouvelables). Un véritable espoir est ainsi placé dans l'utilisation des microorganismes marins pour le développement des « biotechnologies bleues ». En milieu marin, les bactéries peuvent se développer sous forme libre (état planctonique) en suspension dans l'eau de mer ou adhérer à une surface et vivre en communauté (état sessile ou biofilm). L'organisation en biofilm est considérée comme le mode de vie naturel le plus favorable pour les bactéries (Costerton et al., 1995; Hall-Stoodley et al., 2004; Haras, 2005; Flemming and Wingender, 2010): elle repose sur la présence d'une matrice extracellulaire qui entoure les microorganismes et qui confère une intégrité structurelle et fonctionnelle au biofilm. La formation des biofilms est observée en milieu marin dès lors qu'une surface naturelle ou artificielle est immergée (Rascio, 2000). Cette étape est considérée comme cruciale pour la colonisation ultérieure par un large éventail d'autres organismes marins (Haras, 2005). Ce phénomène naturel de colonisation est appelé

biofouling. La présence de salissures marines sur les surfaces immergées engendre de nombreux problèmes économiques (détérioration de matériel, ralentissement des navires, augmentation de la consommation en carburants ...) (Rascio, 2000) et écologiques (augmentation des émissions de gaz à effet de serre, dissémination d'espèces invasives...) (Yebra et al., 2004; Piola et al., 2009). Afin de mieux lutter contre ce type de phénomène, la compréhension et donc l'étude de la formation du biofilm et, de façon plus générale, de la colonisation des surfaces par les bactéries marines sont primordiales. Au sein de ces biofilms, la densité de population, l'expression de gènes spécifiques et, plus globalement, de nombreux systèmes de communication intra- ou interspécifiques sont contrôlés par le biais de signaux chimiques qui sont généralement des molécules de faibles masses moléculaires (métabolites) (Decho et al., 2011). Par ailleurs, d'autres signaux chimiques émis par des bactéries fixées sur une surface sont également capables de moduler la colonisation ultérieure par d'autres organismes (bactéries, diatomées, champignons, larves d'invertébrés, spores de macro-algues) (Qian et al., 2007). La production métabolique des biofilms marins représente ainsi un élément-clé pour la compréhension de leur formation, de leur composition en termes de communautés mais aussi de leurs interactions avec les surfaces qu'ils colonisent et les autres organismes colonisateurs.

La métabolomique constitue un nouveau domaine analytique qui fournit, via l'analyse de l'ensemble des métabolites présents et excrétés par un échantillon biologique, des informations instantanées sur le bilan des événements passés et sur les modifications induites sur les organismes constituant cet échantillon par des facteurs internes et externes. En effet, la régulation génétique ainsi que certains facteurs environnementaux engendrent des variations de l'expression des protéines qui se traduisent par des modifications dans la biosynthèse des métabolites produits (Raamsdonk et al., 2001a). Ainsi, une étude métabolomique est en mesure de fournir des éléments de classification des organismes par l'utilisation de critères chimiques. Elle peut également permettre la caractérisation de variabilité métabolique d'un même organisme dans diverses conditions (ex : planctonique ou sessile pour les bactéries) et de sa réponse métabolique face à un environnement particulier (disponibilité en nutriments, présence de polluants, température...). En termes de méthodologie, comme les métabolites témoignent d'une grande diversité chimique, il est impossible de réaliser l'analyse du métabolome global d'un échantillon biologique à l'aide d'une seule technique universelle. Les deux principaux outils analytiques fournissant l'information structurale des métabolites sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS et LC-MS). La métabolomique environnementale constitue un domaine de recherche émergeant au sein

duquel encore peu de travaux ont porté sur des organismes marins, en général, et sur les bactéries marines et leur biofilm, en particulier.

Dans la cadre de cette thèse, le principal objectif est de développer des méthodologies d'analyse métabolomique destinées à l'étude de la production de métabolites par des bactéries au sein de biofilms marins. Dans un premiers temps, des biofilms formés *in situ* sur des revêtements *antifouling* ont été analysés par métabolomique afin de participer à la caractérisation de leur efficacité. Dans ce domaine, l'étude du métabolome des consortia de micro-organismes formant les biofilms pionniers sur des revêtements pourrait permettre d'évaluer plus rapidement l'efficacité des revêtements, évitant ainsi de longues périodes d'immersion qui ralentissent leur développement. L'approche métabolomique serait également utile pour mieux comprendre les paramètres régulant ou inhibant la formation de biofilms au niveau de ces revêtements.

C'est ainsi que dans un second temps, l'objectif a été de mettre en évidence, via des approches métabolomiques non-ciblées, l'existence de biomarqueurs taxonomiques et d'état physiologique à partir d'une sélection de quatre bactéries issues de biofilms naturels prélevés dans la rade de Toulon. L'une de ces souches, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, a ensuite été plus finement analysée par une approche conjointe de métabolomique et de protéomique afin de mieux appréhender les variations métabolique engendrées en fonction de son mode de culture (planctonique vs biofilm).

Enfin, un troisième volet de ces travaux a eu pour but d'évaluer l'impact du cuivre, un élément métallique utilisé comme co-biocide dans les revêtements *antifouling* et présent en concentrations alarmantes dans certains écosystèmes marins, sur la production métabolique de cette même souche. A cette fin, *P. lipolytica* TC8 a été également étudiée par une analyse métabolomique couplée à une étude réalisée par protéomique. Il s'est agi de comparer l'expression du métabolome et du protéome de cette bactérie modèle, en présence ou non de concentrations variées en cuivre, afin de mettre en évidence la présence de marqueurs d'adaptation ou de stress.

Une partie de ces études a été développée dans le cadre de deux programmes de recherche. Le projet PREVENT (Protection du littoral méditerranéen : évaluation, surveillance, conséquences, impact économique et sociétal- Application à la rade de Toulon) financé par l'université de Toulon vise à développer des outils pertinents pour l'appréhension des inter-relations des zones côtières avec l'écosystème et les activités économiques et sociétales. Le projet DRACONS (*Drag Reducing Antifouling COatings for Navy Ships*) a pour but de déterminer les performances de revêtements *antifouling* dans plusieurs conditions de vieillissement tout en caractérisant les biofilms se formant à leur surface.

CHAPITRE I

Étude Bibliographique



En lien avec les objectifs de cette thèse, cette première partie consiste en un état de l'art bibliographique divisé en trois parties. La première s'attachera à la description du phénomène de *biofouling* en milieu marin et plus particulièrement au rôle des biofilms et des communautés microbiennes dans ce phénomène. La deuxième partie sera dédiée à la description de la métabolomique avec, dans un premier temps, un aperçu général de ce type d'approche et de son utilisation puis ensuite une attention particulière sur les études menées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Finalement, dans une troisième partie, un bilan des travaux réalisés en métabolomique et ayant trait plus spécifiquement aux bactéries marines sera réalisé.

I.1. Biofilms et communautés microbiennes en environnement marin

Dans cette première partie, un volet initial sera consacré à la présentation du phénomène de *biofouling* avec notamment une description des problèmes économiques et écologiques qu'il engendre, les moyens de lutte mis en place et les mécanismes de sa formation. Un second volet sera ensuite spécifiquement dédié aux biofilms bactériens en milieu marin avec un bilan détaillé de leur formation et de leur régulation.

I.1.1 *Biofouling*

I.1.1.1. Problèmes économiques et écologiques liés au *biofouling* marin

Le *biofouling* est un phénomène biologique typiquement marin même s'il est également couramment décrit au niveau de structures « humides » en milieu terrestre ou en eaux douces. En milieu marin, il se définit comme l'accumulation indésirable de microorganismes, de plantes et d'animaux sur des surfaces immergées, artificielles ou non (Rascio, 2000). Du fait de la qualité nutritive véhiculée par l'eau de mer comparée à celle de l'air, les structures et les équipements marins sont plus sujets à ce type de colonisation biologique (Wahl, 1989).

Dans le cadre des activités humaines liées au milieu marin, le *biofouling* apparaît sur des surfaces très variées parmi lesquelles peuvent être citées les coques de bateaux (Figure 1a), les structures portuaires, les pipelines (Figure 1b), les pylônes (Figure 1c), les structures aquacoles (Figure 1d et 1e), ou les infrastructures pétrolières. Toutes les activités aquatiques sont impactées par ce phénomène qui engendre des problèmes tant économiques qu'écologiques (Evans and Clarkson, 1993).

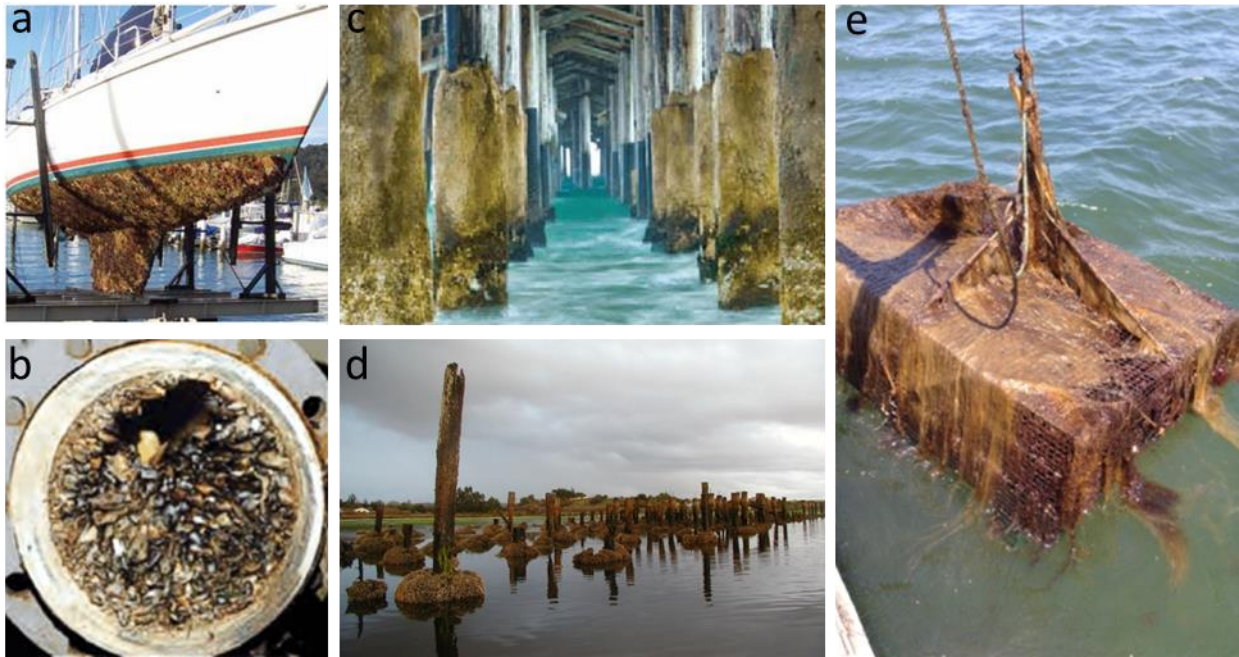


Figure 1 : Biofouling présent sur différentes structures marines :

a) Coque d'un bateau (Source : <http://www.agriculture.gov.au/biosecurity/avm/vessels/biofouling/biofouling-threat>); b) Pipeline (Source : <http://marktool.com/splashtron/Bio-Shield-Anti-Foulant-Coating/Internal-Bio-Shield>); c) Pylône (Source : http://www.mcpsltd.com/about_marine_growth_prevention.htm); d) Structure aquacole (Source : http://www.serc.si.edu/labs/marine_invasions/feature_story/July_2014.aspx); e) Cage aquacole (Source : <http://wardaquafarms.com/about/about-research.html>)

Les activités maritimes impliquant des navires sont notamment très touchées : la présence de *biofouling* sur les coques entraîne une augmentation de leur poids, de leur résistance aux frottements de l'eau et par conséquent, une augmentation de leur consommation en carburant (Rascio, 2000). Cette surconsommation peut atteindre 40%, engendrant des frais supplémentaires conséquents (Champ, 2000) ainsi qu'une augmentation des gaz à effet de serre émis dans l'atmosphère (Yebra et al., 2004). Pour réduire la présence des salissures marines sur les coques de navires, les nettoyages doivent être fréquents ; ils induisent ainsi une plus faible rentabilité et une augmentation des coûts de maintenance. De plus, ces opérations de nettoyage produisent des déchets toxiques qu'il faut ensuite traiter (Abbott et al., 2000).

Les différentes structures marines sont affectées par la présence de ces salissures marines non seulement par le fait qu'elles subissent une surcharge pondérale importante (Characklis and Cooksey, 1983) mais également parce que les matériaux utilisés sont plus rapidement altérés par la corrosion. Ce phénomène est notamment induit par la présence de bactéries sulfato-réductrices et méthanogènes (Beech and Sunner, 2004).

En aquaculture, le *biofouling* est également problématique car sa présence sur les cages, en plus d'augmenter leur poids et de les déformer, diminue les volumes d'ouverture vers l'extérieur. Les flux d'eau sont alors perturbés et diminuent la circulation des nutriments et des déchets. Ainsi, la présence de salissures marines sur les cages peut considérablement diminuer les rendements d'élevage : la croissance des moules peut par exemple être inhibée jusqu'à 50 % (Braithwaite and McEvoy, 2004). Des conditions anoxiques peuvent aussi se développer.

Au niveau écologique, le *biofouling* sur les coques de navire ainsi que dans les ballasts est considéré comme l'un des éléments majeurs responsables du transport d'espèces non-indigènes. En effet, malgré la présence de revêtements *antifouling* certaines espèces parviennent tout de même à adhérer aux coques. En parallèle, les eaux de ballast contenant différentes espèces sont vidées aléatoirement dans les ports et le long des côtes du monde entier. Ces espèces possèdent un avantage sur les espèces endémiques qui elles à priori ne présentent pas de résistance aux métaux lourds et aux biocides présents dans les revêtements *antifouling*. Ce phénomène contribue donc à l'introduction d'espèces allochtones, ainsi qu'à la création de nouveaux biotopes et écosystèmes, et ce au détriment des espèces autochtones souvent plus sensibles aux agents *antifouling* (Piola et al., 2009).

I.1.1.2. Moyens de lutte contre le *biofouling*

La recherche de solutions pour limiter le *biofouling* constitue un champ d'investigation abordé par l'homme depuis l'Antiquité mais qui, du fait des nouvelles restrictions réglementaires en termes de toxicité des biocides, est en plein essor depuis la fin du XX^{ème} siècle. En effet, la demande est forte pour de nouveaux revêtements *antifouling* plus performants mais qui se doivent de répondre aux nouvelles réglementations visant à protéger l'environnement marin.

I.1.1.2.1. Revêtements *antifouling*

Historiquement, l'utilisation de revêtements *antifouling* pour empêcher le développement du *biofouling* sur une surface immergée est la plus ancienne des techniques (Woods Hole Oceanographic Institution, 1952). Des méthodes alternatives, telles que le nettoyage régulier ou l'utilisation d'appareils à ultrasons existent, mais l'utilisation de revêtements *antifouling* reste à l'heure actuelle la méthode la plus fréquemment adoptée.

La plupart de ces revêtements sont des peintures contenant des biocides. Un biocide est une substance active capable de détruire, repousser ou bloquer l'adhésion et/ou la croissance des organismes par

des actions chimiques ou biologiques (Directive 98/8/CE, 1998). Ces molécules sont certes efficaces contre les espèces-cibles mais elles sont souvent très toxiques pour l'environnement, avec en particulier des effets néfastes vis-à-vis d'espèces non-ciblées. Ainsi au début du XX^{ème} siècle, le plomb, le mercure et l'arsenic sont déjà interdits dans certains pays du fait de leur persistance dans l'environnement (Bennett, 1996). A partir des années 1960, les revêtements *antifouling* commerciaux incorporent des oxydes de cuivre ou des composés organostanniques, tels les oxydes de tributylétain (TBT). Ces derniers sont très efficaces mais ils témoignent d'une forte toxicité et ils ne se dégradent pas. Ils s'accumulent dans les sédiments et engendrent des problèmes sérieux pour une large gamme d'organismes marins (les gastéropodes notamment). Du fait de sa toxicité, le TBT a été interdit en France dès 1982 puis partout dans le monde en 2008 par l'IMO (*International Maritime Organization*).

Suite à cette interdiction, plusieurs alternatives ont été développées. Le cuivre est alors largement utilisé avec des co-biocides tels que l'Irgarol 1051, la pyrithione de zinc ou le Sea Nine 211. Cependant, cette nouvelle génération de biocides *antifouling* montre aussi des effets négatifs sur l'environnement marin (Thomas and Brooks, 2010). En effet, bien que le cuivre soit nécessaire au développement des organismes vivants, à haute concentration il devient toxique pour beaucoup d'organismes. Son accumulation dans les sédiments des zones côtières (Bao et al., 2010) ou dans certains organismes constitue donc un problème écologique majeur (Omae, 2003).

Suite à plusieurs directives et un décret (directive européenne 199/13 du 11 mars 1999, décret n°2001-97 du 1^{er} février 2001 et directive 2002/62 du 9 juillet 2002), les revêtements *antifouling* doivent maintenant répondre à un cahier des charges très contraignant. Ils doivent ainsi être peu coûteux et efficaces tout en contenant un agent actif qui se dégrade rapidement, ne s'accumule pas dans les organismes (absent de la chaîne alimentaire) et soit inactif vis-à-vis d'organismes non-ciblés. Peu de revêtements commerciaux actuels répondent à ces critères inscrits dans la réglementation. Le développement de nouvelles approches *antifouling* constitue donc une gageure scientifique qui nécessite l'implication et la collaboration de nombreux acteurs académiques et/ou industriels.

1.1.1.2.2. Nouvelles alternatives

Surfaces *antifouling* :

Deux types d'approches sont en cours de développement et sont basés sur les propriétés physico-chimiques des revêtements.

La première approche vise à créer des revêtements qui miment la nature physico-chimique du tégument de certains animaux marins (ex : requins ou dauphins). Ils ne contiennent donc pas de biocides ou de molécules inhibitrices mais sont hydrophobes, minimisant ainsi les énergies de surface afin de limiter la fixation des micro-organismes. Les revêtements de type « *Foul Release Coatings* (FRC) », par exemple, permettent le décrochage des salissures marines des coques dès que les navires se mettent en mouvement.

Une deuxième approche vise à incorporer des polymères érodables et/ou biodégradables dans le revêtement afin de contrôler l'érosion de la surface et la libération de biocides (Haras, 2005). Ce genre de mécanisme est utilisé dans les revêtements de type « *Self Polishing Coatings* (SPC) » (Lejars et al., 2012).

Molécules *antifouling* :

La difficulté de la nouvelle réglementation réside dans l'exigence qu'elle impose de trouver des molécules *antifouling* qui auraient un effet sur les organismes visés mais qui n'affecteraient pas la viabilité des organismes non-ciblés.

L'une des stratégies pourrait être de réduire la diffusion de ces molécules dans l'environnement marin, par greffage sur le revêtement par exemple, en limitant uniquement leur action *antifouling* au niveau des surfaces à protéger.

Une autre stratégie repose sur des observations réalisées en écologie chimique. En effet, beaucoup d'études ont montré que dans le milieu naturel un certain nombre d'organismes marins ne semblent pas affectés par le *biofouling* (Clare, 1996). Il s'est avéré que dans de nombreux cas ces organismes marins étaient capables de synthétiser des molécules inhibant la colonisation par d'autres organismes ou favorisant l'adhésion de micro-organismes épiphytes spécifiques synthétisant eux-mêmes des composés *antifouling*. Un grand nombre de molécules naturelles inhibitrices du *biofouling* ont ainsi été décrites depuis une vingtaine d'année (Fusetani, 2004; Qian et al., 2009).

I.1.1.3. Formation du *biofouling*

La colonisation des surfaces immergées en milieu marin a été résumée de manière globale comme un processus s'organisant en 5 étapes (Haras, 2005) (Figure 2).

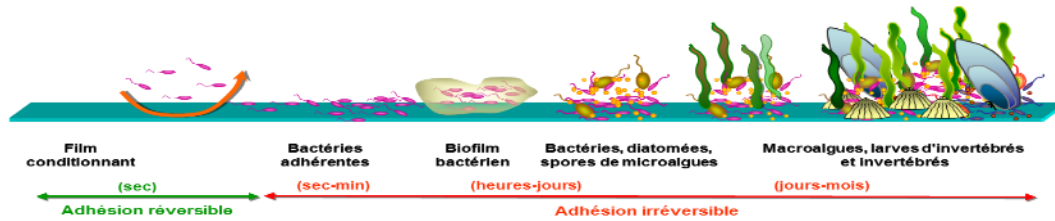


Figure 2 : Schéma de la formation du *biofouling* sur une surface immergée en milieu marin (d'après Haras, 2005)

Après seulement quelques secondes d'immersion d'un élément artificiel propre, sa surface est « conditionnée pour l'adhésion » via son recouvrement par un film chimique composé de matière organique dissoute. La colonisation bactérienne s'effectue ensuite en quelques minutes (adsorption) et devient irréversible après quelques heures (adhésion). Les bactéries forment un biofilm, dit « primaire », dont la cohésion vient notamment de la sécrétion de substances polymériques (EPS). D'autres micro-organismes, aussi bien hétérotrophes qu'autotrophes (diatomées, levures, protozoaires, spores de microalgues, ...), vont ensuite s'associer à ce biofilm et le complexifier. A ce stade de la colonisation, le terme de *microfouling* est utilisé pour qualifier l'ensemble des microorganismes présents. Ces espèces sont substrat-dépendantes mais leur nature et leur nombre varient également selon la situation géographique, les saisons, ainsi que d'autres facteurs liés tels que la compétition et la prédation.

Le terme de *macrofouling* est employé lorsque l'avancement de la colonisation conduit à la présence de macro-organismes. Des phénomènes de communication moléculaire entre micro- et macro-colonisateurs ont été mis en évidence et il semblerait que la présence de certaines espèces microscopiques conditionne celle de macroorganismes (Matz et al., 2008). On parle de *biofouling* doux quand les espèces qui se fixent sont des algues ou des invertébrés mous (coraux mous, éponges, anémones, tuniciers, ...) et de *biofouling* dur lorsque la colonisation implique des invertébrés à corps durs (balanes, moules, vers tubicoles, ...) (Wahl, 1989; Callow and Callow, 2002; Huang et al., 2009).

I.1.2. Biofilms bactériens en milieu marin

I.1.2.1. Biofilms marins : Définition

La formation d'un biofilm est une étape importante de la colonisation d'une surface en milieu marin. Comme l'avait remarqué Zobell (Zobell, 1943), les micro-organismes privilégient dans l'environnement un développement de type sessile où ils vivent en communauté au sein d'un biofilm plutôt qu'un état planctonique isolé (Filloux and Vallet, 2003). Il est d'ailleurs estimé que 80 % de la biomasse microbienne mondiale se développerait sous forme de biofilm (Ballard et al., 2008).

La notion de « biofilm » a été abordée pour la première fois par Costerton en 1978 pour décrire l'adhésion et le développement en communautés des bactéries (Costerton et al., 1978). La définition du biofilm n'a ensuite cessé d'évoluer pour correspondre aujourd'hui à, au minimum, un agrégat de micro-colonies de cellules microbiennes adhérees à une surface biotique ou abiotique et insérées dans une matrice polymérique extracellulaire (Myckatyn et al., 2016).

Dans la plupart des biofilms la masse sèche représentée par les micro-organismes n'atteint que rarement plus de 10% de la masse totale du biofilm tandis que celle de la matrice exopolymérique peut dépasser 90%. Les micro-organismes sont effectivement insérés dans cette matrice qu'ils produisent souvent eux-mêmes. Cette dernière est constituée d'une agglomération de substances polymériques extracellulaires (EPS) de nature et de composition très variables. Il s'agit principalement d'exopolysaccharides et de protéines auxquels peuvent s'ajouter des acides nucléiques et des lipides. La matrice extracellulaire joue un rôle primordial dans l'attachement du biofilm à une surface ; elle est à l'origine de la structure en trois dimensions du biofilm et de sa cohésion. Elle est également impliquée dans la protection des micro-organismes vis-à-vis d'agressions extérieures telles que la dessiccation, l'oxydation, la présence de biocides, de cations métalliques ou de radiations UV-Vis, ou encore des protozoaires brouteurs (Flemming and Wingender, 2010).

I.1.2.2. Mise en place des biofilms

La mise en place d'un biofilm a souvent été décrite dans la littérature. Elle se décompose en 5 étapes : (i) la formation du film conditionnant, (ii) l'adhésion bactérienne réversible, (iii) l'adhésion bactérienne irréversible, (iv) la maturation du biofilm et enfin (v) le détachement de cellules (Figure 3) (Filloux and Vallet, 2003).

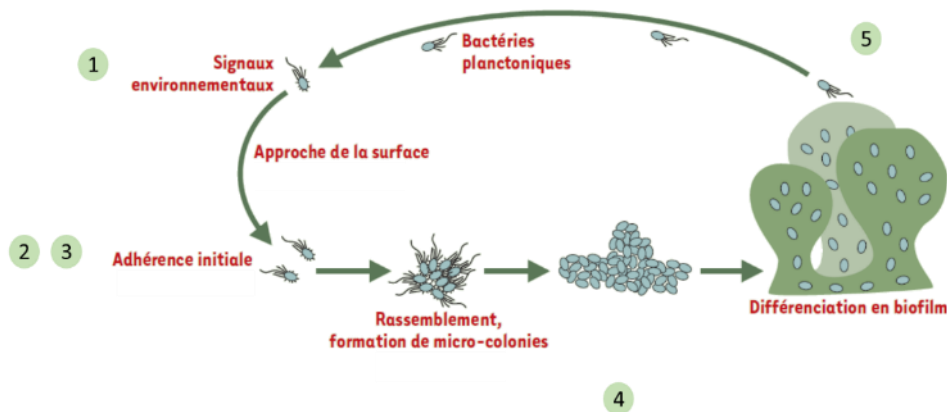


Figure 3 : Étapes de formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée (d'après Filloux et Vallet, 2003)

1.1.2.2.1. Formation du film conditionnant

L'étape initiale est la formation d'un film primaire dit conditionnant. Elle consiste en l'adsorption de composés organiques dissous sur la surface fraîchement immergée dans l'eau de mer. Cette étape est connue pour influencer l'adhésion ultérieure des bactéries (Jain and Bhosle, 2009). Les composés chimiques impliqués sont essentiellement des macromolécules, protéines (Compère et al., 2001), polysaccharides (Wahl, 1989) et lipides (Loeb and Neihof, 1975), et des matières minérales (Vu et al., 2009). Cette accumulation de molécules au niveau de l'interface est rapide et purement physique. Elle diminue l'énergie de la surface colonisée et représente une source de nutriments pour les bactéries, favorisant ainsi leur chimiotactisme (Wahl, 1989; Kumar and Anand, 1998). Les éléments présents dans le milieu aqueux ainsi que la nature et les caractéristiques physico-chimiques de la surface jouent donc un rôle important lors de cette première étape (Compère et al., 2001).

1.1.2.2.2. Adhésion bactérienne « réversible »

Des bactéries vont ensuite être transportées vers cette surface « conditionnée ». Deux modes d'acheminement sont décrits dans la littérature : un transport dû aux mouvements browniens, basé sur un phénomène de sédimentation, et un transport par convection impliquant un mouvement du fluide transporteur (Palmer et al., 2007). Le transport par convection permettrait un meilleur attachement des cellules (Yang et al., 1999). Le rôle du flagelle de la bactérie dans cette étape de transport est quant à lui encore peu compris (Palmer et al., 2007).

Deux théories sont ensuite communément décrites pour expliquer l'attachement des bactéries. La première suppose que les bactéries soient transportées jusqu'à proximité immédiate des surfaces à coloniser et que l'attachement s'effectue grâce à une combinaison de forces et d'interactions (forces de van der Waals, forces électrostatiques et interactions hydrophobes) (Van Loosdrecht et al., 1987; Carpentier and Cerf, 1993; Flint et al., 2000). Le deuxième modèle propose l'implication des forces de Lifshitz-van der Waals lorsque les bactéries sont à une centaine de nm de la surface, puis d'interactions électrostatiques lorsqu'elles sont à 20 nm et enfin l'intervention de récepteurs spécifiques d'adhésion lorsqu'elles sont à 5 nm (Busscher and Weerkamp, 1987).

Cette adhésion est dite réversible puisqu'à l'issue de cette étape de faibles forces mécaniques peuvent détacher les bactéries.

1.1.2.2.3. Adhésion bactérienne « irréversible »

L'adhésion est dite irréversible quand l'intervention de traitements physiques ou chimiques est nécessaire pour détacher les organismes d'une surface. Cette phase « d'ancrage » des microorganismes à une surface s'effectue grâce à un certain nombre d'interactions de courtes portées : liaisons covalentes, liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes. Les bactéries peuvent produire des exopolysaccharides et posséder des filaments spécifiques à leur surface (pili ou fimbriae) qui faciliteront leur adhésion. Durant cette étape, des organismes planctoniques viennent s'associer aux différentes espèces déjà présentes à l'interface milieu/surface créant ainsi sur le substrat des agrégats appelés micro- puis macro-colonies (Dunne, 2002; Palmer et al., 2007). Les organismes présents initialement semblent être capables d'attirer ou d'empêcher cette « co-adhésion » d'autres organismes planctoniques ce qui favorise, lorsqu'une attraction s'opère, la formation de biofilms multi-spécifiques (Dobretsov, 2010).

La structure du biofilm va alors être très dépendante des espèces qui le composent. Des facteurs à la fois physiques (forces hydrodynamiques et vitesse du flux, propriétés de surface dont la viscosité ou la rugosité), chimiques (nature des nutriments en présence, production d'EPS) et biologiques (prédation et compétition) jouent également un rôle très important dans l'architecture du futur biofilm mature (Romeo, 2008; Dobretsov, 2010; Wahl et al., 2012).

1.1.2.2.4. Maturation

La phase de maturation est caractérisée par la multiplication des microorganismes du biofilm formé et par leur production en substances polymériques extracellulaires (EPS). Ces EPS, principalement des polysaccharides, des protéines, des lipides et de l'ADN extracellulaire, forment une matrice dont la cohésion et la stabilité mécanique jouent un rôle crucial dans le maintien du micro-consortium (Flemming and Wingender, 2010; Flemming et al., 2016). La matrice ainsi formée constitue l'environnement proche de la communauté microbienne ; elle favorise son développement par ses effets de protection (rôle de barrière de diffusion) et de sorption (rétention de composés). Les EPS interagissent en effet entre eux, ainsi qu'avec les molécules organiques ou inorganiques du milieu environnant, rendant encore bien plus complexe la composition chimique du biofilm. Le potentiel de croissance d'un biofilm bactérien est ainsi conditionné par la disponibilité en nutriments, la diffusion de ces nutriments et l'évacuation des déchets (Dunne, 2002). Les EPS permettent non seulement la rétention d'eau, d'exo-enzymes ou de composés nutritifs, qui sont utiles pour les cellules du biofilm mais ils tiennent également un rôle de barrière à la diffusion de biocides qui pourraient être néfastes aux cellules bactériennes.

1.1.2.2.5. Détachement

Le détachement est la dernière étape du cycle de vie d'un biofilm mature. Il peut être considéré comme un phénomène intervenant de manière passive et donc être dû aux mouvements de fluides provoquant des phénomènes d'érosion (pertes de petites molécules) ou de « desquamation » (pertes de biomasses importantes) (Picioreanu et al., 2001).

Il peut également être abordé de manière active comme la réaction à un stress nutritionnel (changement de nature ou de concentrations en nutriments). Les bactéries se détacheraient alors de manière volontaire pour repasser dans un mode de vie planctonique afin de trouver de meilleures ressources en colonisant de nouvelles surfaces (O'Toole et al., 2000; Sauer et al., 2004). La phase de détachement est la seule phase du cycle où la production protéique est sous-réglée suggérant que les bactéries repassent effectivement dans un phénotype planctonique (Sauer et al., 2002). La phase de détachement est aussi caractérisée par une augmentation de l'expression des flagelles (Sauer et al., 2004).

L'intervention d'agents chimiques, tels que des molécules tensio-actives, des dérivés chlorés, des chélateurs, ou des modificateurs de pH, peut également provoquer le détachement des bactéries ou leur mort cellulaire (Haras, 2005).

I.1.2.3. Diversité bactérienne dans les biofilms marins

La diversité des biofilms en milieu marin est principalement due aux multiples espèces qui y sont représentées. Les rapports d'abondances de ces différentes espèces varient mais les bactéries et les diatomées sont toujours majoritaires. La prédominance de l'un des deux types d'organismes dépend de la saison et de la zone géographique, et plus globalement de l'ensemble des conditions environnementales (Salta et al., 2013). Ainsi, chaque biofilm est unique (nature des espèces et composition de la matrice associée), hétérogène (répartition des espèces et des composés de la matrice) et évolue dans l'espace et dans le temps.

Les bactéries peuvent présenter un intérêt particulier du fait de leur implication, liée à leur abondance, dans la formation du biofilm primaire. Leur identification est rendue difficile par leur taille et leur morphologie est trop simple pour en faire un critère de reconnaissance. L'identification bactérienne reposait jusqu'à récemment sur l'étude de multiples caractéristiques physiologiques et biochimiques ainsi que sur le séquençage et l'analyse phylogénétique de l'ARNr 16S. Ces différentes techniques nécessitent la mise en culture des souches bactériennes étudiées. Cela représente un biais considérable, puisqu'il est estimé que moins de 0,1 % des bactéries prélevées en milieu marin sont cultivables en laboratoire (Amann et al., 1995).

L'étude de la biodiversité des bactéries marines a beaucoup évolué avec l'apparition de techniques permettant d'obtenir une « image » globale des communautés bactériennes présentes dans des échantillons environnementaux, sans étape préalable de mise en culture. Le plus souvent, les techniques utilisées se concentrent sur l'ADN des populations présentes dans l'échantillon et plus particulièrement sur l'analyse de séquences de petits segments du gène de l'ARNr 16S (amplification ou NGS).

En milieu marin, comme dans beaucoup d'autres environnements, la plupart des bactéries sont à Gram négatif. Une très grande diversité bactérienne a été identifiée au sein des biofilms marins. Les groupes les plus fréquemment rencontrés et les plus abondants sont les α - et les γ -Proteobacteria, et ce que ce soit dans des environnements aussi variés que ceux que l'on trouve dans l'océan Pacifique ou l'océan Antarctique (Hagstrom et al., 2002; Railkin, 2004; Jones et al., 2007; Polymenakou et al., 2009). Dans

le but de déterminer les premiers organismes qui colonisent un support immergé, des études sur des communautés issues de biofilms jeunes ont été effectuées. Il apparaît que les bactéries pionnières de l'adhésion sont des *Alteromonas* et des *Pseudoalteromonas* (γ -Proteobacteria) ainsi que des *Roseobacter* (α -Proteobacteria) (Dang and Lovell, 2002; Dang et al., 2008; Lee et al., 2008). D'autres études ont cherché à déterminer la chronologie de succession des communautés bactériennes sur une surface. Ainsi, pour Lee et al. ce sont plutôt les α -Proteobacteria qui sont dominantes au sein d'un biofilm marin. Lors de cette étude, au cours des neuf premières heures d'immersion de coupons d'acrylique, de verre et d'acier dans un port de Corée, le biofilm était principalement constitué de γ -Proteobacteria : ce sont dans ce cas les bactéries pionnières de l'adhésion. Par contre, après douze heures d'immersion, leur prédominance change au profit de celle des α -Proteobacteria, faisant de cette classe les seconds colonisateurs du biofilm (Lee et al., 2008). Pour Dang et al. (2008), le genre *Roseobacter* appartenant aux α -Proteobacteria est le premier colonisateur de différents types de plaques (verre, PVC et plexiglas) immergées sur les côtes chinoises (Dang et al., 2008). Chung et al. ont observé des biofilms isolés dans un port de Hong-Kong sur du polystyrène et des supports granitiques (Chung et al., 2010). Des Bacteroidetes, des Cyanobactéries, des Firmicutes et des Protéobactéries étaient présents dans ces biofilms âgés de six et douze jours. D'autres clades se développent au fur et à mesure que le biofilm vieillit. Ainsi, les Acidobacteria et Verrucomicrobia sont des groupes pour lesquels la représentation devient plus importante dans les biofilms de douze jours que dans ceux de six jours, alors que les Planctomycetes ne se trouvent que dans les biofilms âgés de douze jours. Le groupe le plus diversifié reste tout de même celui des Proteobacteria : en plus des classes α et γ présentes dès les premières minutes de l'immersion, les classes δ et ϵ sont représentées dans des biofilms de six jours.

Ainsi au cours du temps, les communautés bactériennes adhérees évoluent et des paramètres environnementaux tels que la température de l'eau ou la richesse du milieu influencent fortement cette évolution (Lau et al., 2005; Chiu et al., 2008).

1.1.2.4. Régulation des biofilms et état physiologique des bactéries

Les bactéries présentent différents états physiologiques selon qu'elles sont dans l'une des différentes phases de formation du biofilm décrites précédemment ou en mode de vie planctonique. Ces différences conduisent à une hétérogénéité de la composition ainsi que de l'architecture du biofilm.

1.1.2.4.1. Développement des bactéries en biofilms

La croissance des bactéries au sein d'un biofilm est un phénomène complexe. Leur environnement est changeant dû à la production intensive de substances extracellulaires. Elles subissent également de nombreuses modifications phénotypiques suite à leur adhésion sur la surface. La structure tridimensionnelle des biofilms ainsi que les différentes activités métaboliques des bactéries génèrent la formation de gradients de concentration en nutriments, en oxygène, en molécules de signalisation et en produits du catabolisme bactérien. Il existe donc au sein même du biofilm des conditions très hétérogènes. Les bactéries doivent s'adapter à ces micro-conditions locales qui sont susceptibles d'évoluer spatialement et temporellement. L'état physiologique des cellules bactériennes dépendra donc de ces micro-conditions impliquant ainsi que certaines d'entre-elles se multiplient alors que d'autres se mettent en état de dormance (Stewart and Franklin, 2008).

La formation du biofilm est régulée par différents mécanismes. Le *Quorum Sensing* (QS) est celui qui est le plus communément décrit. Il s'agit d'un mode de communication chimique véhiculée par des métabolites dans le milieu. Le QS est utilisé par une grande variété de bactéries afin de coordonner l'expression de certains gènes en fonction de la densité cellulaire. Il a une implication dans des fonctions cellulaires multiples telles que la bioluminescence, la virulence, la résistance aux antibiotiques ou encore la formation des biofilms (Li and Nair, 2012). Dans ce mode de communication, les signaux moléculaires, également appelés « auto-inducteurs », les plus connus sont les *N*-acyl homosérine lactones (AHLs).

1.1.2.4.2. Croissance des bactéries en mode planctonique

Lorsque les bactéries sont cultivées en mode planctonique, les phases de croissance sont distinctes. Pour chaque espèce, la caractérisation de ces phases est essentielle afin de comprendre les différents phénotypes et les modifications métaboliques qui sont induits lors des transitions entre ces différentes phases.

Dans des conditions favorables, les bactéries se multiplient de manière exponentielle selon la formule suivante :

$$n_t = n_0 \times 2^{\mu t}$$

Avec n_t : Nombre de bactéries dans une population donnée à un instant t , n_0 : Nombre de bactéries dans la même population au moment de la première détermination, μ : Taux de croissance.

L'évolution de la croissance bactérienne peut se mesurer au cours du temps de plusieurs façons : par turbidimétrie (mesure de l'absorbance de la suspension bactérienne), par pesée de la biomasse sèche, par dénombrement (comptage des bactéries totales ou des bactéries viables et cultivables (UFC)). Les bactéries suivent un schéma de croissance particulier au cours du temps. En traçant la courbe de croissance correspondante, il est possible de distinguer 5 phases (Figure 4).

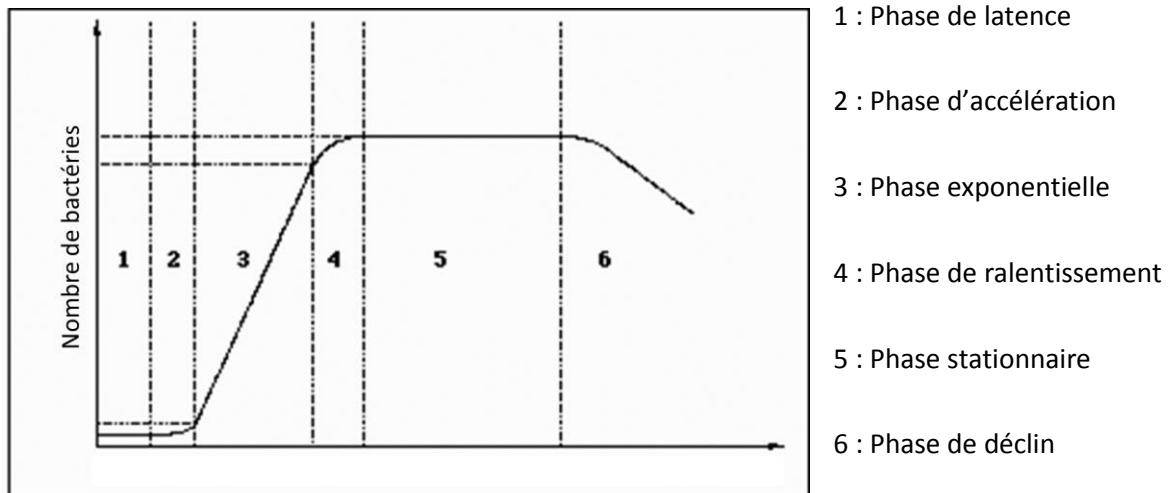


Figure 4 : Courbe de croissance bactérienne

La durée des différentes phases est dépendante de la souche bactérienne et des conditions de culture. Les 5 phases sont néanmoins communes à la plupart des bactéries avec, pour une même souche, des variations de durée selon les conditions de mise en culture. Pendant la phase de latence (1), les bactéries s'adaptent à leur environnement et ne se divisent pas. Le nombre de bactéries n'augmente donc pas. Il augmente par contre lors de la phase d'accélération (2) pendant laquelle la vitesse de croissance devient plus importante et lors de la phase dite exponentielle (3) durant laquelle les cellules se divisent exponentiellement avec un taux de croissance maximal. Le taux de croissance diminue ensuite durant la phase de ralentissement (4) puis la population bactérienne se stabilise en phase stationnaire (5). Cette phase est une phase d'équilibre entre la multiplication et la division cellulaire, le nombre de cellules restant constant. Elle est propice à la production de molécules dites « spécialisées » (EPS, sidérophores, toxines ...) (de Carvalho and Fernandes, 2010).

La croissance bactérienne telle que décrite ici est dépendante de certains paramètres. Notamment, l'apport en nutriments et la présence de certains composés (eau, carbone, azote, phosphore et soufre) sont primordiaux. Pour les bactéries aérobies, la présence de dioxygène est indispensable. Certains facteurs physico-chimiques jouent également un rôle important. De façon schématique (les distinctions restant arbitraires), les bactéries peuvent être par exemple divisées en 4 grands groupes

en fonction de leur température optimale de croissance : les psychrophiles (-10 à 20°C), les mésophiles (10 à 45°C), les thermophiles (55 à 65°C) et les thermophiles extrêmes (80 à 110 C). Les bactéries peuvent être également divisées en 4 groupes en fonction de leur besoin en NaCl pour leur croissance, la pression osmotique étant également un facteur déterminant pour leur croissance. Celles qui n'ont pas besoin de NaCl sont dites non-halophiles. La plupart des organismes marins sont halophiles légers (Vreeland, 2012), c'est-à-dire qu'ils ont besoin de 3% (m/v) de NaCl. Quand les besoins en NaCl sont supérieurs, compris entre 3 et 15% (m/v), les bactéries sont qualifiées d'halophiles modérées et pour des besoins supérieurs à 25% (m/v) d'halophiles extrêmes. En ce qui concerne le pH du milieu, la majorité des bactéries connues sont neutrophiles et se développent ainsi de façon optimale à pH neutre tout en témoignant d'une certaine tolérance vis-à-vis de possibles variations. Cependant, des bactéries nécessitent un milieu spécifiquement acide ou basique pour se développer (bactéries acidophiles ou alcalophiles). On notera ici que l'eau de mer présente un pH relativement stable et légèrement alcalin (7,5 - 8,5).

Les conditions optimales de croissance telles qu'observées en laboratoire sont rarement retrouvées dans l'environnement. Pour cette raison, le mode de vie en biofilm, pour lequel les bactéries sont associées à des surfaces biotiques ou abiotiques et vivent en communauté avec une mutualisation des fonctions, est privilégié dans le milieu naturel.

I.2. Métabolomique

Cette deuxième partie est consacrée à la description de la métabolomique. Dans un premier temps, une présentation générale de ce type d'approche est proposée puis un focus est réalisé sur les études métabolomiques menées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Dans un second volet, les différentes étapes nécessaires à la mise en œuvre d'une analyse métabolomique seront décrites.

I.2.1. Définitions et généralités

I.2.1.1. Définitions

Les progrès technologiques des dernières décennies en spectroscopies (spectrométrie de masse, RMN) et en chromatographies ont conduit à l'amélioration de l'identification et de la quantification de molécules, permettant ainsi l'analyse d'échantillons de plus en plus complexes tout en diminuant les temps d'analyse. Le domaine de la biologie des systèmes dédié à la compréhension des organismes au

niveau moléculaire a ainsi connu un développement exponentiel et les « cascades omiques » ont participé de manière évidente à l'avancement de cette compréhension (Figure 5) (Dettmer et al., 2007).

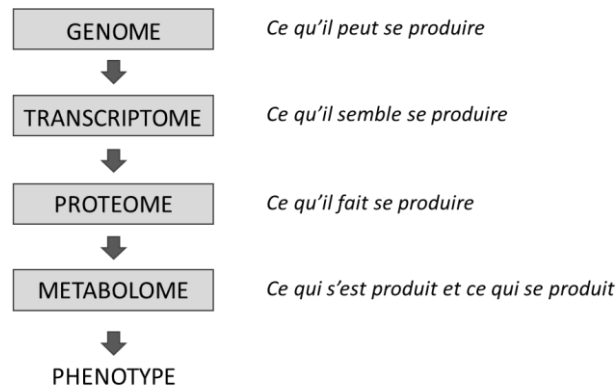


Figure 5 : La cascade « omique » (d'après Dettmer, Aronov et Hammock, 2007)

Le suffixe « ome » désigne un ensemble et « omique » se rapporte à la science qui l'étudie. Par définition, les sciences « omiques » fournissent une vue générale d'un phénomène et non des informations détaillées sur les comportements indépendants de cellules ou de tissus spécifiques (Zhang and Chen, 2012). La métabolomique est la dernière des techniques « omiques » et prend ainsi la suite de la génomique, la transcriptomique et la protéomique. Le nombre croissant de publications dans ce domaine de recherche (Figure 6) montre qu'il n'est pas un « omique » de plus mais une véritable science émergente.

La métabolomique pourrait être définie comme une plateforme d'analyses multidisciplinaires de la biologie par la chimie. Elle englobe des domaines aussi variés que la biochimie, la chimie analytique, la bio-informatique, les bio-statistiques, et la biologie métabolique (Dettmer et al., 2007; Mishur and Rea, 2012). La métabolomique consiste en l'analyse la plus complète possible de l'ensemble des métabolites présents dans un fluide biologique, une cellule, un tissu cellulaire, un organe ou un organisme à un instant donné (Ellis et al., 2007; Nicholson and Lindon, 2008).

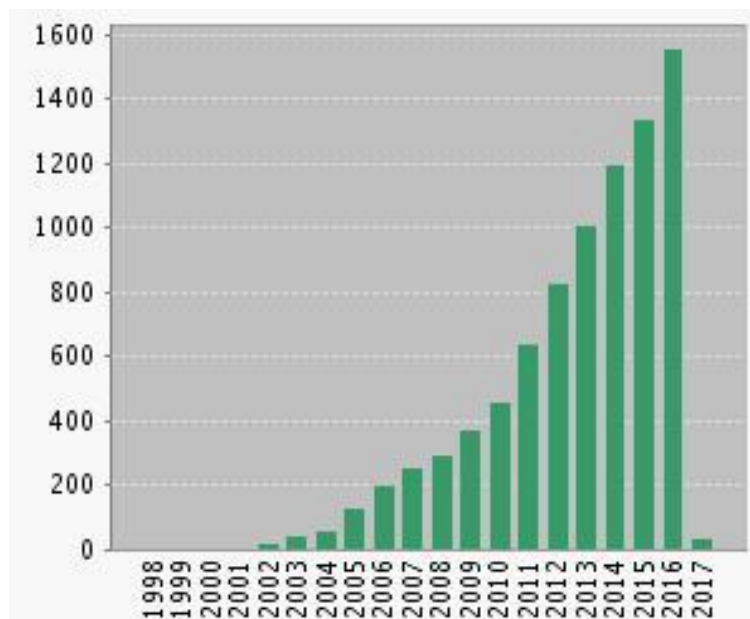


Figure 6 : Nombre d'articles contenant le mot « metabolomic* » dans le titre en fonction de l'année de parution (recherche bibliographique ISI Web of Science du 3/02/2017)

Le terme « métabolome » a été utilisé pour la première fois en 1998 par Oliver et al afin de décrire l'ensemble des métabolites synthétisés par un organisme (Oliver et al., 1998). Ce terme peut être apparenté aux termes « génome » ou « protéome ». Un métabolite est une molécule de faible poids moléculaire (< 1500 Da). Ces molécules jouent un rôle important dans divers processus physiologiques en intervenant dans de nombreuses réactions biologiques participant ainsi à des fonctions biologiques variées (Lv, 2013). Ces fonctions peuvent être primaires comme le métabolisme de base, la synthèse d'énergie, le stockage (Dawes and Ribbons, 1964) ou la construction de la biomasse (Noor et al., 2010) mais elles peuvent aussi être secondaires telles la signalisation moléculaire (Schaefer et al., 2008), l'acquisition de métaux (Henderson et al., 2009) ou la pathogénicité (Pierson and Pierson, 2010). Les études métabolomiques permettent donc l'analyse simultanée des métabolites primaires mais aussi des métabolites spécialisés (Fridman and Pichersky, 2005).

Ce terme « métabolomique » a été introduit en 2001 par Fiehn décrivant alors l'analyse complète d'un système biologique dans lequel tous les métabolites ont été identifiés et quantifiés (Fiehn, 2001). L'analyse métabolique n'est pas un nouveau champ de recherche en soit puisque historiquement des analyses ciblées de métabolites ont déjà été réalisées. Mais ce n'est que récemment que les scientifiques ont pris conscience que les voies métaboliques ne fonctionnaient pas seules mais au sein d'un réseau complexe (Ryan and Robards, 2006). L'observation de l'ensemble des métabolites produits par un organisme, à un instant et dans des conditions données, permet l'analyse globale des fonctions alors qu'une étude plus classique de quelques molécules ne conduit qu'à une vision fonctionnelle

parcellaire (Xu et al., 2014). Deux leviers méthodologiques ont été les points déclencheurs de cette prise de conscience : il s'agit du développement de méthodes mathématiques destinées à modéliser le métabolisme cellulaire (*metabolic control analysis*) dans les années 1960 et celui de la RMN, et donc la possibilité d'identifier les métabolites, dans les années 1980 (Nicholson and Lindon, 2008).

Ainsi, en termes de méthodologie, la métabolomique se base aujourd'hui sur des méthodes analytiques robustes telles que la RMN et la Spectrométrie de Masse (MS) avec différents types d'ionisation et d'analyseurs. Ces méthodes analytiques au service de l'approche métabolomique représentent une véritable innovation puisqu'elles permettent l'analyse d'un large panel de métabolites d'un échantillon complexe en une seule étape via l'acquisition rapide et efficace de données multiparamétriques (Lv, 2013). Il est ensuite possible de comparer les données chromatographiques et/ou spectrales de plusieurs échantillons et ainsi d'identifier et de quantifier les proportions relatives de dizaines de métabolites dans chaque échantillon.

1.2.1.2. Intérêts et défis liés à l'utilisation de la métabolomique

1.2.1.2.1. Intérêts

La métabolomique est de plus en plus utilisée pour combler certaines zones d'ombre en biologie des systèmes (Schmidt, 2004). Par exemple, l'obtention du phénotype biochimique de systèmes biologiques a pour but de mieux comprendre les voies métaboliques impactées en réponse à diverses perturbations internes (modifications de l'expression des gènes) ou extérieures (changements environnementaux, toxicité ...) (Raamsdonk et al., 2001b; Yanes et al., 2010; Joghee and Jayaraman, 2014).

Il a été suggéré que la métabolomique fournirait l'information la plus fonctionnelle de toutes les techniques « omiques » (Sumner et al., 2003). En effet, au contraire des gènes et des protéines qui donnent de l'information sur « ce qui va se passer », la composition en métabolites donne de l'information sur « ce qui s'est passé » (Figure 5) (Schmidt, 2004; Dettmer et al., 2007). Le métabolisme est en effet régulé par l'expression des gènes et par des événements transcriptionnels et post-traductionnels (Zhang and Chen, 2012). Ces métabolites endogènes étant les produits de l'expression génique, leur caractérisation et la compréhension de leur implication dans les voies biosynthétiques peut permettre une meilleure compréhension de l'expression des gènes dans des contextes biologiques définis (Nicholson and Lindon, 2008; Lv, 2013). Les récents progrès dans les techniques de séquençage ont permis le déchiffrement de nombreuses séquences de gènes mais leurs fonctions et leurs

rôles restent encore souvent mystérieux (Nandagopal and Elowitz, 2011). De par sa position en aval des autres informations « omiques », le métabolome est plus représentatif des changements physiologiques liés aux modifications génétiques. Une approche métabolomique permet donc d'analyser de manière fonctionnelle des changements phénotypiques d'un organisme que ne permettent pas les analyses génomiques (Allen et al., 2003).

Deux approches complémentaires sont généralement utilisées pour les études en métabolomique. La métabolomique non-ciblée (*metabolomic fingerprinting*) et la métabolomique ciblée (*metabolomic profiling* et *metabolomic target analysis*) sont communément distinguées.

La première a pour but d'analyser sans *a priori* la modification de l'ensemble des métabolites présents dans des échantillons biologiques suite à un stimulus, et ce dans le but de découvrir de nouvelles voies métaboliques impliquées dans les différentes réponses. L'objectif initial de ce type d'approche n'est pas d'identifier tous les métabolites observés mais de comparer les profils métaboliques des échantillons afin d'observer où se produisent les changements. Les métabolites qui sont d'intérêt (biomarqueurs) nécessitent ensuite d'être identifiés pour comprendre les mécanismes biologiques mis en jeu. L'un des enjeux peut être ensuite de s'appuyer sur la présence ou la concentration d'un biomarqueur pour détecter des maladies, des changements environnementaux, etc.

La métabolomique ciblée se concentre quant à elle sur des métabolites impliqués dans des voies métaboliques bien particulières ou sur des familles de composés précises (Dettmer et al., 2007; Lv, 2013). Elle nécessite donc une connaissance préalable des familles de métabolites recherchés et découle souvent de la réalisation préalable d'une analyse métabolomique non-ciblée. Les données issues de ce type d'approche sont à la fois qualitatives et quantitatives, tout en étant idéalement indépendantes du système analytique utilisé. Elles permettent de créer des profils caractéristiques de modifications métaboliques liées à une perturbation, de construire des bases de données et de trouver des corrélations sur les cartes métaboliques et en lien avec les autres approches « omiques » (Ryan and Robards, 2006; Dettmer et al., 2007).

1.2.1.2.2. Défis

Les limites de la métabolomique sont en fait exactement opposées à celles de la génomique. En effet, alors qu'en génomique la source génétique d'une modification est souvent trop en amont de la modification pour être identifiée, en métabolomique les changements métaboliques peuvent être trop

loin en aval et dilués par les activités protéiques, l'environnement ou encore des évènements biochimiques intermédiaires (Schmidt, 2004).

La compréhension du métabolome est rendue difficile de par son dynamisme et sa complexité. La concentration de métabolites intracellulaires a par exemple pu être estimée à 300 mM approximativement chez la bactérie modèle *E. coli* (Bennett, 1996). Ils appartiennent à une large variété de classes chimiques telles que les acides aminés, les lipides, les acides organiques ou encore les nucléotides. Tous ces composés ont des propriétés chimiques et physiques très diverses et sont présents dans différentes gammes de concentration (allant généralement du picomolaire au millimolaire). De plus, des métabolites n'apparaissant qu'à l'état de traces doivent tout de même être pris en compte car ils peuvent avoir un rôle de régulation important (Ryan and Robards, 2006; Dettmer et al., 2007).

Toutes ces différentes caractéristiques rendent l'étude de l'ensemble des métabolites de manière simultanée délicate. En effet, les techniques d'analyses chromatographiques actuelles ne permettent pas l'analyse de l'ensemble de la gamme de polarités existantes (le choix de la colonne chromatographique et de la phase mobile associée sont déterminants) et les techniques analytiques n'utilisant pas de séparations chromatographiques, telles que la RMN, sont souvent moins sensibles. D'autre part, les protocoles d'échantillonnage et d'extraction ont une importance capitale.

Il faut également prendre en compte le fait que la distribution en métabolites est sujette à d'importantes variations temporelles et spatiales (Ryan and Robards, 2006; Dettmer et al., 2007; Verpoorte et al., 2008).

1.2.1.3. Métabolomique et bactéries marines

L'étude des bactéries marines par métabolomique n'en est encore qu'à ses balbutiements. La recherche bibliographique combinant les termes « metabolomic* AND (marine bacteri*) » aboutit à seulement 23 résultats dans ISI Web of Science (le 03/02/2017), contre près de 23 000 résultats pour le seul mot « metabolomic* ».

L'un des plus grands freins à l'étude des bactéries marines est, comme cela a déjà été dit précédemment, le fait que la plupart d'entre-elles ne soient pas cultivables *in vitro*. La métabolomique appliquée à l'étude de biofilms naturels, de bactéries en suspension dans l'eau de mer ou plus globalement à tout échantillon environnemental s'affranchit de cette contrainte. Elle peut ainsi

permettre l'obtention du « phénotype biochimique » de bactéries encore jamais étudiées mais dans ce cas, la réponse obtenue correspondra le plus souvent à des communautés complexes de micro-organismes.

Dans le cadre de bactéries marines cultivables, ce type d'approche peut être utilisé pour différencier les espèces entre elles, découvrir des molécules originales et mieux appréhender les diverses voies biosynthétiques mises en œuvre par ces organismes. La comparaison de profils métaboliques peut également conduire à l'observation des différences induites après l'introduction d'un « élément perturbateur ». En effet, l'expression d'un métabolite illustre la réponse biologique de l'organisme à une perturbation extérieure. La métabolomique donne donc l'opportunité d'explorer les effets d'une multitude de paramètres sur des systèmes biologiques marins et ce genre d'étude est crucial pour comprendre les mécanismes d'adaptation et de régulation en réponse à un stress naturel (disponibilité en nutriments, présence de polluants, température, interactions biotiques...) dans ce milieu (Joghee and Jayaraman, 2014; Liebeke and Lalk, 2014).

L'étude des bactéries et plus largement des micro-organismes par métabolomique présente plusieurs avantages par rapport aux études réalisées sur d'autres modèles : les conditions expérimentales sont faciles à contrôler, les variations individuelles sont minimisées, les échantillons sont rapidement disponibles et les problèmes d'éthique sont inexistantes. Par contre, les cultures bactériennes *in vitro* peuvent impliquer l'utilisation de milieux de cultures riches qui complexifient considérablement les profils chimiques en augmentant le bruit de fond métabolique.

Le milieu marin apporte quant à lui un certain nombre d'inconvénients. En effet, contrairement à l'utilisation de la métabolomique appliquée aux plantes, aux animaux, ou encore aux bactéries terrestres, les métabolites extraits à partir des bactéries marines sont généralement inconnus et ainsi difficiles à identifier (Xu et al., 2014). D'autre part, les contraintes liées par exemple à l'échantillonnage en milieu marin ou à la présence de sels complexifient également les études portant sur les organismes marins.

1.2.2. Métabolomique par Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

1.2.2.1. Techniques analytiques : intérêt et biais de l'utilisation de la LC-MS

Historiquement, la RMN ¹H est une des techniques les plus utilisées en métabolomique. Elle a en effet l'avantage, par rapport à la MS, de nécessiter une étape de préparation d'échantillon peu

contraignante qui en outre limite la perte éventuelle de métabolites d'intérêt. Cette méthode d'analyse a également l'avantage d'être non destructrice et indépendante de la capacité d'ionisation des molécules.

Cependant, les approches par spectrométrie de masse sont de plus en plus attractives et souvent choisies pour leur sensibilité. En effet, au contraire de la RMN qui ne détecte que les métabolites présents en concentration suffisante (de l'ordre du millimolaire) dans les échantillons, la MS permet la détection d'une plus large gamme de métabolites à partir de différents types de matrices. Ce type d'analyse témoigne également d'une très grande sensibilité et permet d'acquérir des données en haute résolution, et ceci avec une durée d'analyse relativement courte (Dettmer et al., 2007; Verpoorte et al., 2008; Lv, 2013; Theodoridis et al., 2013). De plus, la possibilité d'obtenir des spectres de fragmentation permet d'accéder à des informations précieuses pour l'identification des métabolites. Néanmoins, la MS présente quelques limites car, pour être analysées, les molécules doivent être au préalable ionisées et les performances d'ionisation ne sont pas les mêmes selon les composés et les paramètres d'ionisation utilisés. Pour pallier à ce potentiel manque d'information, les spectromètres de masse peuvent être couplés à d'autres types de détecteurs. Par exemple, le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (*Evaporative Light Scattering detector* : ELSD) est un détecteur universel qui, couplé à la MS, permet de s'assurer que la méthode n'exclut pas des métabolites présents en quantités non négligeables mais non ionisés dans les conditions opératoires choisies.

La spectrométrie de masse peut être utilisée seule (*Direct Infusion Mass Spectrometry* : DIMS) ou couplée à une technique de séparation telles que la Chromatographie en phase Gazeuse (GC) ou la Chromatographie Liquide (LC). L'avantage de ce couplage est de diminuer le nombre de composés co-élus susceptibles d'interférer dans la source d'ionisation. Il permet ainsi de diminuer le nombre de molécules détectées simultanément et donc d'augmenter le nombre de molécules analysées. Les constituants chimiques d'échantillons complexes peuvent ainsi être séparés avant d'être analysés par le spectromètre de masse (Forcisi et al., 2013).

Outre le matériel disponible, le choix de la plateforme analytique dépendra des composés à analyser et de la matrice dont ils seront extraits. La GC permet de détecter des molécules de faibles poids moléculaires, volatils (apolaires) et thermostables. Pour augmenter le nombre de composés détectés, certaines molécules peuvent être rendues volatiles par la formation de dérivés appropriés. La GC-MS est sensible, résolutive et permet l'obtention d'un schéma de fragmentation des molécules

reproductible. De plus, des bases de données commerciales comptant plusieurs centaines de milliers de références sont disponibles pour l'identification d'échantillon inconnu (Verpoorte et al., 2008).

La LC permet l'analyse d'un plus grand nombre de composés organiques. Une grande variété de phases stationnaires sont disponibles sur le marché et permettent la séparation de diverses gammes de composés (phases normales, phases inverses ou phases à greffages hydrophiles). Le développement de la chromatographie en mode HILIC a par exemple permis d'améliorer la séparation des composés polaires, augmentant ainsi le nombre de métabolites détectés dans un échantillon biologique (Idborg et al., 2005). De plus, l'apparition de la LC à Ultra Haute Performance (*Ultra High Performance Liquid Chromatography* : UHPLC) a rendu cette technique beaucoup plus rapide et résolutive qu'auparavant et ainsi encore plus adaptée à la métabolomique.

Le choix du mode d'ionisation du spectromètre de masse couplé à la LC a un effet significatif sur les profils métaboliques observés. L'interface mettant en jeu une ionisation par électronébulisation (*ElectroSpray Ionization* : ESI) est la plus largement utilisée. Elle permet l'ionisation d'un large spectre de molécules. Pour l'analyse d'acides organiques ou de carbohydrates, l'ionisation en mode négatif (production d'ions négatifs) sera préférée au mode positif (production d'ions positifs) car plus efficace. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* : APCI) sera quant à elle plus utilisée pour la détection de composés moins polaires. De nouvelles techniques d'ionisation se sont également développées ces dernières années, s'apparentant à de « l'imagerie » métabolique : l'ionisation par désorption laser (*Laser Desorption Ionization* : LDI), l'ionisation par désorption laser assistée par une matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* : MALDI), l'ionisation par désorption par électronébulisation (Desorption Electrospray Ionization : DESI), et l'ionisation par analyse directe en temps réel sous pression atmosphérique (Direct Analysis in Real Time). La LC-MS offre ainsi une multitude de combinaisons (phases stationnaires / source d'ions / analyseurs) qui donnent beaucoup de possibilités d'analyses métabolomiques mais présentent l'inconvénient d'empêcher la standardisation des méthodes.

Depuis quelques années, les spectromètres de masse à haute résolution sont devenus des appareillages courants. Ils permettent l'obtention de données qui conduisent à la détermination des formules brutes des métabolites. De plus, l'analyse des schémas de fragmentation (MS/MS, MSⁿ ...) obtenus avec de tels spectromètres facilite la détermination des structures chimiques (Cui et al., 2008; Wishart, 2009). La combinaison de l'UPLC et de la spectrométrie de masse à temps de vol (*Time of Flight* : ToF) offre aujourd'hui la meilleure résolution chromatographique combinée à une excellente

sensibilité et une haute précision de masse. D'autres instruments utilisant la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) ou encore l'Orbitrap sont également très performants. Ces outils sont aujourd'hui d'une importance majeure pour la métabolomique non-ciblée (Theodoridis et al., 2013).

1.2.2.2. Conduite d'une étude métabolomique par LC-MS

La qualité des résultats obtenus lors d'une analyse métabolomique est dépendante de l'ensemble des étapes : le design expérimental est donc crucial. Le but étant de détecter le maximum de métabolites de façon reproductible (von Roepenack-Lahaye, 2004), les étapes d'échantillonnage doivent être méticuleusement menées. Les techniques analytiques doivent être puissantes et optimisées pour permettre la détection, voire l'identification, du maximum de métabolites en une seule analyse. Un grand nombre de données est ainsi généré. Des outils bio-informatiques et statistiques spécifiques sont nécessaires pour l'extraction de l'information, la comparaison des profils métaboliques et l'évaluation de la pertinence des résultats.

La diversité des techniques utilisées (méthodes de *quenching*, d'extraction, d'analyse, de traitement de données) rend les résultats difficilement comparables avec ceux de travaux effectués par d'autres équipes (Bertini et al., 2014). Compte tenu de ces différences, une tentative d'uniformisation a été proposée en 2004 afin de faciliter la comparaison des résultats entre laboratoires et d'améliorer les liens de la métabolomique avec les autres sciences « omiques », notamment la génomique. Les auteurs de cette étude proposent une liste compilant les informations qui devraient être fournies à minima dans le cadre de toute étude métabolomique (Bino et al., 2004). Dans le domaine biomédical, comme par exemple pour l'analyse d'échantillons d'urine et de plasma, des procédures optimisées sont proposées afin d'harmoniser les résultats obtenus et de pouvoir les comparer.

En général, une étude métabolomique valide est conduite en 5 étapes : (i) l'échantillonnage, (ii) l'analyse, (iii) le traitement des données, (iv) l'identification de biomarqueurs et enfin (v) l'interprétation biologique.

1.2.2.2.1. Préparation des échantillons

La collecte des échantillons constitue une étape initiale primordiale lors du design expérimental de l'étude. En effet, il s'agit du point de départ de l'obtention des données nécessaires pour répondre à

la question biologique choisie. Dans notre cas, l'analyse par métabolomique de bactéries marines requiert la prise en compte de plusieurs paramètres :

- ✓ Les échantillons traités sont de nature biologique : chaque condition de culture ou de prélèvement doit être réalisée au moins en triplicats.
- ✓ De nombreux paramètres externes (non contrôlés), tels que des facteurs environnementaux, des facteurs de stress, etc..., peuvent faire varier la composition en métabolites des échantillons. Il est donc primordial de prévoir un groupe contrôle de référence.
- ✓ L'analyse des métabolites de l'échantillon est réalisée dans un milieu de culture particulier (« *metabolic footprinting* ») (Allen et al., 2003). Les signaux provenant de ce milieu de culture doivent pouvoir être identifiés afin de les distinguer des métabolites des cellules bactériennes dans le profil global. Il faut donc prévoir de préparer des échantillons ne contenant que le milieu de culture (« blancs milieu »).
- ✓ Dans une culture bactérienne, certains métabolites sont intracellulaires et d'autres sont sécrétés dans le milieu. Il est impératif, au moment de la construction du design expérimental, de savoir si les deux types de métabolites doivent être analysés et s'ils doivent l'être ensemble ou séparément.
- ✓ Pour s'assurer que sur les profils métaboliques obtenus les différences observées ne sont pas dues à des dérives analytiques, des échantillons de contrôle-qualité (mélange ou *pool* de tous les échantillons) doivent être prévus. Leur analyse sera effectuée régulièrement lors d'une séquence d'analyses de manière à contrôler les performances de l'appareillage tout au long de la séquence.

La métabolomique est basée sur l'analyse non biaisée de la globalité des métabolites d'un organisme à un instant donné. La technique de préparation de l'échantillon est donc cruciale. En effet, elle ne doit pas être sélective et elle doit conduire à l'analyse de l'ensemble des métabolites présents de façon reproductible tout en empêchant leur dégradation. Comme cela a pu déjà être plusieurs fois décrit dans la littérature, le choix de la méthode d'extraction et les conditions expérimentales utilisées ont un fort impact sur le métabolome résultant (Prasad Maharjan and Ferenci, 2003; Winder et al., 2008; Duportet et al., 2012). Aussi, en fonction des contraintes liées au design expérimental (durée de préparation des échantillons, type de matrice, ...) il est important de choisir la méthode la plus adaptée possible.

Dans le cas d'échantillons microbiens, l'extraction doit être très rapide à partir du moment où l'on souhaite obtenir un « arrêt sur image » de la culture. En effet, il faut éviter tous les changements métaboliques qui pourraient intervenir dans le temps qui s'écoule entre l'arrêt de la culture et la mise en œuvre de l'extraction. Il est donc impératif qu'immédiatement après le retrait de la culture de l'incubateur ou d'un échantillon de son milieu naturel, le métabolisme cellulaire soit bloqué de façon à empêcher de futures conversions métaboliques. Toute méthode utilisée pour ce blocage métabolique est appelée « *quenching* ». Cette étape peut être combinée à différentes étapes d'échantillonnage mais en respectant le fait que toute activité métabolique doit avoir été bloquée au moment de l'échantillonnage. La composition finale de l'échantillon est influencée par la procédure de *quenching*. Des changements dans la matrice de l'échantillon peuvent effectivement à ce moment-là affecter les résultats obtenus en LC-ESI-MS (effet de suppression d'ions qui induisent des changements de réponse) (Theodoridis et al., 2013). Aussi est-il important de définir une méthode de *quenching* qui conduise à la plus grande reproductibilité des résultats.

En métabolomique microbienne plusieurs techniques sont utilisées telles que l'ajout d'une solution à pH extrême, le chauffage ou le refroidissement de l'échantillon, ou l'ajout de solvant. La technique utilisée diffère si l'échantillon complet doit être extrait (endo- et exo-métabolome) ou seulement les cellules microbiennes (endo-métabolome). Dans le cas où seules les cellules sont étudiées, les techniques de *quenching* susceptibles de les dénaturer, comme par exemple l'utilisation de solutions alcalines ou acides, sont exclues. La procédure la plus utilisée en métabolomique microbienne permet la séparation des cellules du milieu de culture : il s'agit d'un *quenching* au méthanol froid suivi d'une centrifugation à froid (De Koning and Van Dam, 1992). La méthode de *quenching* ne doit pas conduire à la perte de métabolites (par problème de miscibilité ou de lyse moléculaire par exemple). Des travaux ont été menés avec plusieurs méthodes de *quenching* sur différentes espèces de microorganismes afin d'estimer la perte en métabolites (Spura et al., 2009; van Gulik, 2010). Les résultats obtenus montrent qu'une solution unique n'existe pas et que la procédure de *quenching* doit être optimisée et validée pour chaque espèce étudiée.

A l'issue de l'étape de *quenching*, le but est d'extraire la totalité, ou du moins le nombre maximum de métabolites. Les conditions doivent être telles que les enzymes soient dénaturées empêchant ainsi des modifications métaboliques, des dégradations et/ou des conversions chimiques. Dans la littérature, plusieurs méthodes sont utilisées pour extraire le métabolome des microorganismes : le chauffage, l'introduction d'une solution à pH extrême ou l'utilisation de solvants organiques (Theodoridis et al., 2013).

Dans le cas d'échantillons marins, la présence de sels est une difficulté supplémentaire qui s'ajoute à cette étape d'échantillonnage. Les sels, et en particulier le chlorure de sodium (NaCl), s'associent dans la source d'ionisation créant ainsi des adduits qui augmentent la difficulté d'identification des composés (Keller et al., 2008). Les ions adduits $[M+Na]^+$ peuvent être présents avec la même intensité ou même être plus intenses que les ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$. De plus, l'apparition de ces ions est peu reproductible et ils sont résistants à la fragmentation (Nguyen et al., 2011). Enfin, la présence de matrices fortement salées nécessite un entretien plus régulier de la source d'ionisation. Les méthodes d'échantillonnage doivent donc prendre en compte ces contraintes en essayant d'éviter la présence de sels dans les extraits, ou du moins, en facilitant leur dilution (Goulitquer et al., 2012).

Il n'existe pas à ce jour de revue comparant les différentes méthodes d'extraction pour l'analyse métabolomique en LC-MS de bactéries marines. Un bilan bibliographique a donc été réalisé et l'ensemble des données est compilé dans le Tableau 1.

Globalement, les protocoles décrits utilisent tous un solvant organique et effectuent ainsi l'étape de *quenching* en même temps que celle d'extraction. La méthode d'extraction la plus utilisée consiste à extraire le milieu de culture contenant les cellules bactériennes à l'aide d'acétate d'éthyle. L'utilisation de ce solvant pour le milieu marin n'est pas surprenante. En effet, le chlorure de sodium est peu soluble dans ce solvant ; son utilisation permet donc de s'affranchir de la majeure partie des sels. La plupart des études l'utilisant ne comportent d'ailleurs pas d'étape de dessalage. En outre, le groupement éthyle de ce solvant lui donne une affinité pour les composés peu polaires tandis que son moment dipolaire assez important (environ 1,78) lui confère une bonne miscibilité avec les composés plus polaires. L'acétate d'éthyle permet ainsi d'extraire une large gamme de métabolites.

Tableau 1 : Paramètres utilisés lors de précédentes études pour la préparation d'échantillons de bactéries marines destinés à une analyse en métabolomique par LC-MS

Organisme étudié	Mode de culture	Extraction (Etape systématiquement couplé au <i>quenching</i>)	Dessalage	Solvant de reprise	Réf.
<i>Sulfitobacter</i> sp. 2047	Planctonique	<u>Cellules bactériennes :</u> 1) Solvant froid 2) Surnageant : 3) Filtration / Lyophilisation 4) Suspension dans ACN/MeOH/H ₂ O	∅	ACN/MeOH/ H ₂ O (4:4:2, v/v/v)	(Ankrah et al., 2014)
<i>Synechococcus</i> sp. 7002	Planctonique	<u>Culot bactérien :</u> 1) Centrifugation 2) MeOH froid + sonication <u>Surnageant :</u> 1) Séchage 2) MeOH froid 12h 3) Centrifugation	∅	MeOH	(Baran et al., 2010, 2011)
<i>Salinispora</i>	Milieu solide	<u>Cellules bactériennes :</u> 1) AcOEt 2) Agitation 90 min	0.2 µm PTFE Filtre seringue (4 mm diamètre)	MeOH/H ₂ O (2:8, v/v)	(Bose et al., 2014)
<i>Vibrio</i> sp. 010	Planctonique et Biofilm	<u>Culot bactérien :</u> 1) 3 x MeOH/DCM (1 :1) 2) Sonication 3) Séparation phase	Cartouche C ₁₈ Sep -Pak	MeOH	(Chandramouli et al., 2013)
<i>Vibrio fischeri</i>	Planctonique et biofilm	<u>Cellules bactériennes :</u> 1) Centrifugation 2) PBS pH 7.4 3) Centrifugation 4) Lyophilisation	∅	??	(Chavez-Dozal et al., 2015)
<i>Streptomyces sundarbansensis</i> WR1L1S8	Planctonique	<u>Bactéries + surnageant :</u> AcOEt	∅	MeOH	(Djinni et al., 2013)
<i>Streptomyces</i> sp.	Planctonique	<u>Bactéries + surnageant :</u> 2 x AcOEt	∅	MeOH (500 µg/ml)	(Forner et al., 2013)
<i>Zooshikella rubidus</i> S1-1	Planctonique	<u>Surnageant :</u> AcOEt <u>Pigments cellulaires :</u> Acétone	∅	MeOH (50%)	(Lee et al., 2011)
77 bactéries marines	Milieu solide	<u>Cellules bactériennes :</u> 2 x AcOEt	Filtration sur Büchner avec filtre de 110 mm	AcOEt	(Macintyre et al., 2014)
<i>Pseudoalteromonas</i>	Planctonique	<u>Bactéries + surnageant :</u> AcOEt	Filtration sur filtre seringue : 13-mm ID PTFE	ACN/H ₂ O (1:1, v/v)	(Vynne et al., 2011)
Vibrionaceae <i>Vibrio Corallilyticus</i>	Planctonique	<u>Bactéries + surnageant :</u> AcOEt	∅	MeOH	(Wietz et al., 2010, 2011)

1.2.2.2.2. Analyse par HPLC

De toutes les étapes, l'analyse instrumentale est certainement la plus critique car elle peut affecter directement la qualité des données brutes pour la métabolomique.

Principe

La chromatographie est une technique analytique permettant la séparation de composés en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. La chromatographie de partage, qui constitue le mécanisme de séparation le plus courant, est basée sur la différence de miscibilité d'un analyte entre deux phases non miscibles.

Dans des conditions chromatographiques données, un analyte est caractérisé par son temps de rétention (t_r) et l'amplitude de son pic donné par la largeur de pic à la base (ω) ou à mi-hauteur ($\omega_{1/2}$).

A partir de ces deux grandeurs, découlent 3 autres paramètres caractéristiques permettant de définir l'efficacité d'une colonne chromatographique :

- ✓ Le facteur de rétention (k) détermine la capacité de la colonne à retenir des composés :

$$k = (t_r - t_m) / t_m$$

t_m : Temps mort (temps de rétention de composés non retenus par la phase stationnaire)

- ✓ La résolution (R_{AB}) permet de caractériser la séparation entre deux pics chromatographiques A et B :

$$R_{AB} = 2 \times (t_{rB} - t_{rA}) / (\omega_A + \omega_B)$$

ω : Largeur des pics à la base

- ✓ Le nombre de plateaux théoriques (N) caractérise le nombre d'équilibres successifs qu'a subi un composé de l'échantillon dans la colonne. Il détermine l'efficacité de la colonne :

$$N = 16 (t_r / \omega)^2 = 5.54 \times (t_r / \omega_{1/2})^2$$

La phase stationnaire

Plusieurs types de phases stationnaires peuvent être utilisés en LC. Les phases à polarité inverse sont apolaires (généralement composées de silice greffée par des chaînes linéaires carbonées à 18 atomes de carbone, C_{18}) et nécessitent un éluant polaire. Sur ces phases stationnaires, les analytes seront élués par polarité décroissante. Pour modifier les propriétés de rétention de ces phases, les fournisseurs

modifient le taux de greffage des chaînes carbonées, utilisent des greffons spécifiques sur les groupements silanols résiduels (*endcapping*) ou modifient le greffage de la silice (phénylhexyle, diphényle, ...). Les phases stationnaires dites « normales » sont polaires (composées de gel de silice ou d'un greffage polaire) et requièrent un éluant apolaire. La quasi-totalité des études métabolomiques utilisant la LC se font aujourd'hui sur des colonnes à phase inverse (Theodoridis et al., 2008, 2013). De nouvelles phases stationnaires hydrophiles (*Hydrophilic interaction chromatography* : HILIC) sont maintenant disponibles, permettant la séparation de composés très polaires tout en conservant la possibilité d'utiliser une phase mobile polaire (composée ou miscible avec l'eau).

La phase mobile

La phase mobile dépend de la phase stationnaire sélectionnée. En général, lorsque l'analyse est réalisée en phase inverse, deux solvants sont utilisés en mélange, l'un aqueux et l'autre organique. Afin d'améliorer ou de favoriser l'ionisation des composés par la suite, la phase mobile peut être tamponnée à l'aide de sels ou de réactifs ioniques (Kaliszan et al., 2004). Deux modes d'analyse liés à la phase mobile sont utilisés : (i) le mode « gradient » qui correspond à des analyses au cours desquelles la composition de la phase mobile change et (ii) le mode « isocratique » qui est utilisé lors d'analyses où la phase mobile reste inchangée.

Particularité de l'UPLC

L'UPLC fonctionne sur les mêmes principes que l'HPLC. La seule différence réside dans la granulométrie des phases stationnaires qui est inférieure 2 μm , induisant de fait une augmentation très importante de la perte de charge (pressions supérieures à plusieurs centaines de bars). Avec ce type de phase, la résolution chromatographique, la vitesse d'analyse et la sensibilité sont nettement améliorées (de Villiers et al., 2006). L'augmentation de la séparation des pics chromatographiques minimise ensuite le phénomène de suppression d'ions dans la source du spectromètre de masse (Chambers et al., 2007).

1.2.2.2.3. Spectrométrie de masse

Principe

Le principe de la spectrométrie de masse est d'analyser les molécules en fonction de leur rapport masse sur charge électrique (m/z), avec m la masse de l'ion et z le nombre de charges portées par l'ion. Le rapport m/z est exprimé en Thomson (Th) par convention. La MS permet ainsi de transformer pour leur analyse des molécules naturellement neutres en ions à l'état gazeux.

Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ions où se réalise l'ionisation, d'un analyseur qui trie les ions en fonction de leur rapport m/z , d'un détecteur qui comptabilise l'abondance des ions et d'un ordinateur qui permet la visualisation et le traitement du signal. Lorsqu'un spectromètre de masse est couplé à un système chromatographique, les données ainsi générées sont en trois dimensions : rapport m/z , intensité du pic et temps de rétention (Rasmiena et al., 2013) (Figure 7).

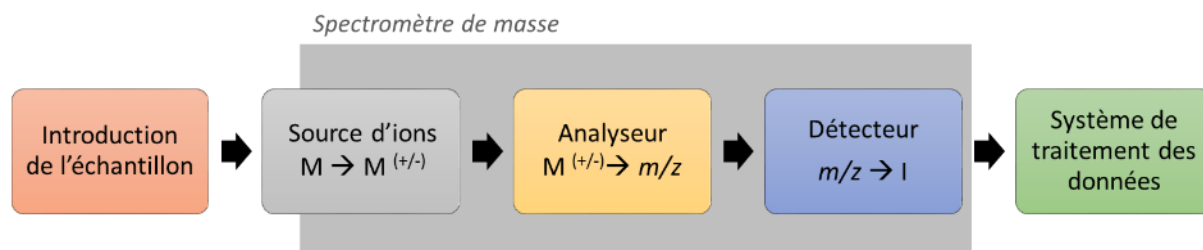


Figure 7 : Schéma de la composition d'un spectromètre de masse et des différentes étapes d'analyse associées à chaque module

Les performances analytiques d'un spectromètre de masse sont mesurées grâce à deux paramètres :

- ✓ La capacité de l'analyseur à distinguer deux signaux proches entre eux (la résolution). Plus la résolution est faible, plus les pics se rapprochent et se recouvrent : il n'est alors plus possible de calculer une masse précise.
- ✓ La justesse de la mesure de la masse par le spectromètre (précision en masse). Pour pouvoir obtenir la composition élémentaire d'un analyte, il faut généralement une masse précise au cent millième.

Ionisation par électronébulisation (*ElectroSpray Ionisation*, ESI)

Plusieurs méthodes d'ionisation existent (Forcisi et al., 2013). L'ionisation par *electrospray* est une « méthode douce » permettant l'ionisation de solutés non chargés. Le principe est de faire passer ces derniers d'un état liquide à un état gazeux. Cette technique permet l'ionisation de molécules de polarité et de masses moléculaires variables (10^1 à 10^7) tout en conservant les composés thermosensibles. A pression atmosphérique, certaines molécules ne se volatilisent pas. Il est donc nécessaire de passer d'un système macromoléculaire à un système micromoléculaire en réalisant une ionisation par désorption. Ce phénomène est réalisé grâce au nébuliseur et à un différentiel de voltage entre la sortie de l'aiguille du nébuliseur et l'entrée du capillaire (Figure 8).

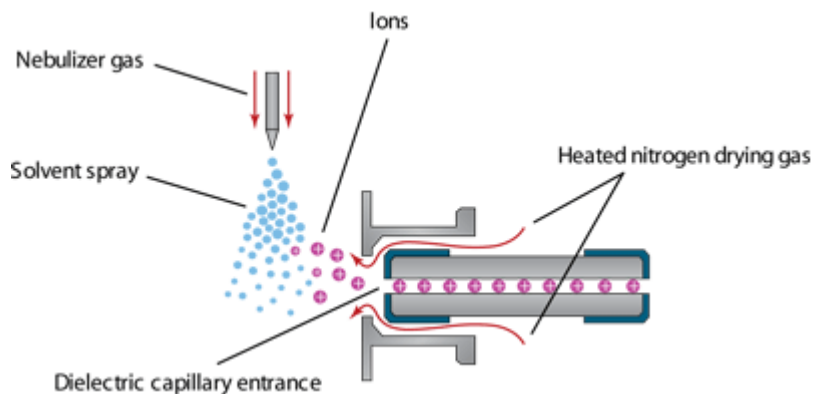


Figure 8 : Schéma du principe d'ionisation par *electrospray* (Source : www.agilent.com)

Cette génération d'ions peut être décrite en trois étapes :

- ✓ L'étape de nébulisation : Le soluté est dissous dans la phase mobile et introduit dans le nébuliseur. Le gaz de nébulisation va à la sortie permettre la dispersion de l'échantillon et la création de gouttelettes. Ces gouttelettes sont ensuite dirigées dans le capillaire. La différence de potentiel entre le capillaire et le nébuliseur entraîne la fixation de charges sur les gouttes créées.
- ✓ L'étape de désorption : Le solvant des gouttelettes s'évapore progressivement provoquant une augmentation des charges à la surface. Lorsque la limite de Rayleigh est atteinte, la force de répulsion de Coulomb (répulsion de deux charges positives) dépasse la tension de surface des gouttelettes. Elles vont alors exploser (explosion coulombienne) et produire de plus petites gouttelettes sujettes à l'évaporation du solvant (Figure 9).

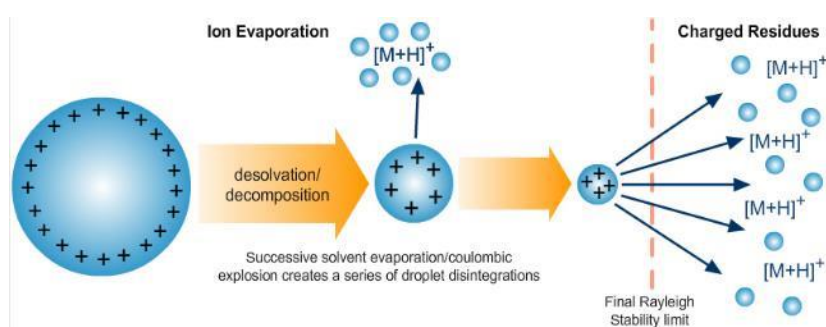


Figure 9 : Schéma du phénomène de désorption (Source : <http://www.chromacademy.com/Electrospray-Ionization-ESI-for-LC-MS.html>)

- ✓ L'étape d'évaporation : De la même manière, quand le solvant s'évapore, la surface des petites gouttelettes devient de plus en plus chargée. Une fois que le champ créé par les ions en surface

des gouttelettes devient plus grand que la tension de surface, les ions sont émis en phase gazeuse.

Quadripôle couplé à un analyseur à temps de vol (QToF)

Cet analyseur hybride se compose généralement, associés en série, d'un hexapôle, d'un quadripôle, d'une cellule de collision et d'un analyseur à temps de vol à injection orthogonale des ions muni d'un réflectron (Figure 10).

Une fois ionisées, les molécules de l'échantillon passent par le capillaire. Plus les ions avancent dans l'instrument, plus le vide est poussé pour faciliter leur avancement. Les ions sont ensuite focalisés et transférés dans l'hexapôle (*Ion guide* sur la Figure 10). Ce dernier est constitué de six électrodes parallèles associées électriquement deux à deux. Un potentiel alternatif ($V \cos(\omega t)$) et un potentiel continu (U) sont appliqués. Le potentiel alternatif crée une radiofréquence qui permet de refocaliser les ions, les empêchant ainsi de se neutraliser. Lorsque le balayage permet de maintenir le rapport U/V constant, les ions sont séparés en fonction de leur rapport m/z .

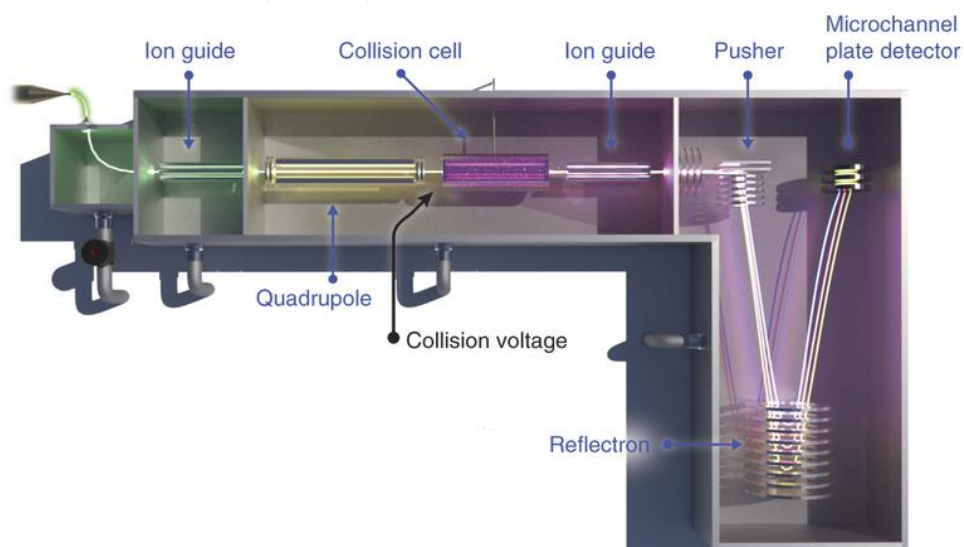


Figure 10 : Schéma d'un Q-ToF (D'après Laganowsky et al, 2013)

En mode MS, c'est-à-dire juste en mode « balayage » (sans fragmentation), le quadripôle (4 électrodes parallèles associées électriquement deux à deux) sert de guide jusqu'à l'analyseur à temps de vol. En mode MS/MS, c'est-à-dire quand il y a fragmentation de l'ion, le quadripôle est utilisé comme un filtre pour isoler les ions précurseurs de masse précise. Les ions sont alors accélérés par inversion de polarité

des barres du quadripôle et fragmentés dans la cellule de collision. Les ions fragmentés sont alors transmis dans l'analyseur à temps de vol.

Au départ de l'analyseur à temps de vol, tous les ions ont la même énergie cinétique et ils sont accélérés orthogonalement dans la zone de vol. La durée du vol (quelques nanosecondes) dépend directement de la masse des ions. Ils arrivent alors au niveau du réflectron, un miroir électrostatique qui impose un champ électrique dans le sens opposé du champ accélérateur de départ, et les ions de même rapport m/z se focalisent sur un même plan par normalisation des différences d'énergie initiales. La distance de vol est ainsi allongée sans augmenter la taille de l'analyseur.

Les ions sont finalement détectés grâce au détecteur à micro-canaux (*microchannel plat*). Celui-ci va convertir et amplifier le signal des ions grâce à ses millions de micro-canaux incurvés et recouverts d'un matériel semi-conducteur.

Trappe à ions :

Dans cet analyseur, les quatre électrodes du quadripôle sont remplacées par une trappe ionique (Figure 11).

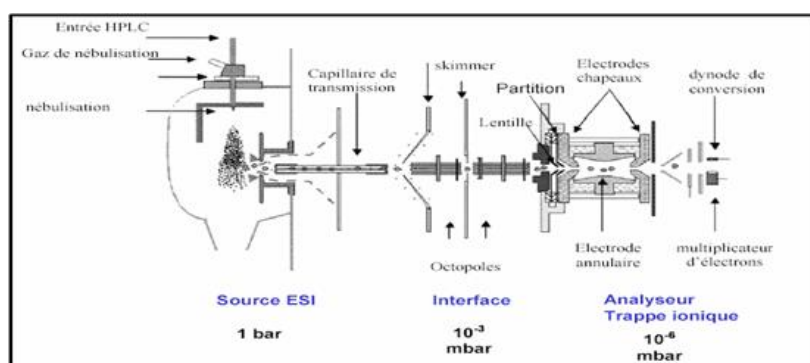


Figure 11 : Schéma d'un *electrospray* couplé avec une trappe ionique

Elle est constituée d'une électrode annulaire couverte par deux électrodes « chapeaux » quasi-hyperboliques. Les ions arrivent et quittent cet espace grâce à deux orifices placés au centre de chaque électrode hyperbolique. Comme dans un quadripôle classique, les électrodes « chapeaux » et l'électrode annulaire sont soumises à un potentiel électrique qui a pour effet de créer un champ quadripolaire au sein de la trappe où les ions se déplacent. Les paramètres doivent être réglés pour permettre l'éjection des ions. Si un ion a une trajectoire stable, il n'est pas éjecté de la trappe : il faut que son accélération soit égale au champ électrique pour pouvoir l'être. Ainsi, la tension alternative

est augmentée de façon progressive, déstabilisant la trajectoire des ions et entraînant leur expulsion de manière successive.

Quand les ions sont en trop grand nombre dans le piège, les répulsions mutuelles vont induire des changements de trajectoire nuisant au résultat. Pour garder les ions à proximité du centre de la trappe, un gaz neutre est introduit dans la trappe (le plus souvent de l'hélium) afin de les refroidir.

L'un des grands avantages de cet instrument est de pouvoir réaliser des expériences de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et ce jusqu'à plus de huit fragmentations successives. L'isolement d'ions spécifiques est réalisé en éjectant tous les autres ions de la trappe. Une énergie cinétique d'une intensité choisie est transmise à ces ions précurseurs. Ils entrent alors en collision avec les molécules d'hélium induisant ainsi une fragmentation si la collision est efficace. Les ions obtenus sont appelés ions fils et cette étape peut être reproduite sur ces derniers. Ce processus peut s'avérer très utile pour l'élucidation de la structure chimique d'une molécule.

1.2.2.2.4. Appareillage utilisé pour des études en métabolomique LC-MS sur des bactéries marines

Le Tableau 2 dresse le récapitulatif des conditions analytiques utilisées lors de l'analyse de bactéries marines par LC-MS. On remarquera que la plupart de ces analyses ont été réalisées avec un Q-ToF après une séparation sur une phase stationnaire de type C₁₈.

Tableau 2 : Bilan bibliographique des conditions analytiques utilisées lors de l'analyse en métabolomique par LC-MS de bactéries marines

Auteurs	Instrument	Colonne chromatographique	Types de molécules
(Ankrah et al., 2014)	HPLC-MS (TSQ)	HILIC (2 x 250 mm, 5 µm)	
(Bose et al., 2014)	UHPLC-MS (Q-ToF)	C ₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,8 µm)	Composés antibactériens
(Baran et al., 2010, 2011)	LC-MS (Q-ToF)	ZIC-HILIC (1 x 150 mm x 3,5 µm)	Acides aminés Dérivés de saccharides Acides organiques Nucléobases Nucléosides
(Chandramouli et al., 2013)	UPLC-MS (Q-ToF)	C ₁₈ (2,1 x 150 mm, 1,7 µm)	Tripeptides Acides gras Molécules <i>quorum sensing</i>
(Chavez-Dozal et al., 2015)	LC-MS (IT) Suivi de Identification ciblée Q-ToF MS/MS		Acides organiques Dérivés du glycérol Alcools
(Djinni et al., 2013)	LC-MS (IT)	C ₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Composés antibactériens
(Forner et al., 2013)	LC-MS (Q-Orbitrap)	C ₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,9 µm)	
(Lee et al., 2011)	LC-MS (Q-Orbitrap)	C ₁₈ (2,1 x 150 mm, 5 µm)	Pigments (Analogues de la prodigiosine)
(Macintyre et al., 2014)	LC-MS (Q-Orbitrap)	C ₁₈ (3 x 75 mm, 5 µm)	
(Vynne et al., 2011)	LC-UV/VIS	C ₆ -phenyl (2 x 100 mm, 3 µm)	Pigments Composés antibactériens
(Wietz et al., 2010, 2011)	LC-MS (Q-ToF)	C ₁₈ (2 x 50 mm, 3 µm)	Composés antibactériens

1.2.2.2.5. Extraction des données et normalisation

Extraction des données :

Un fichier brut de LC-MS peut être visualisé comme un cube constitué d'une multitude de plans. Derrière chaque point du chromatogramme, défini par un temps de rétention et une intensité, il y a un plan représentant le spectre de masse où les ions sont définis par leur rapport m/z et leur intensité (Figure 12).

Ce type de fichiers renferme une multitude d'informations. Pour être en mesure d'extraire la totalité des informations issues de centaines de fichiers similaires, des outils de traitement de données sont nécessaires. De nombreux logiciels ont été développés à cette fin, parmi lesquels peuvent être cités

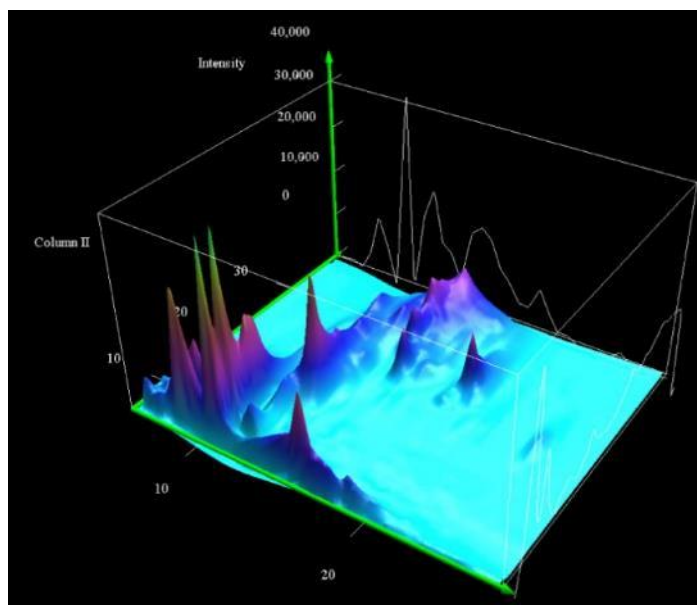


Figure 12 : Données brutes de LC-MS en 3 dimensions : couplage du chromatogramme avec les spectres de masse en chaque point

MarkerLynxTM (Waters), XCMS (Smith et al., 2006), Metalign (Tikunov, 2005) et Mzmine (Katajamaa and Orešič, 2005). Le but commun de ces outils est de détecter l'ensemble des pics de l'analyse chromatographique en les associant aux données de spectrométrie de masse afin de créer une matrice à deux dimensions. Les données tridimensionnelles sont donc réduites à deux dimensions en associant un rapport m/z à un temps de rétention créant ainsi des « *features* » ou variables. La matrice brute obtenue à partir de ce traitement des données recense l'ensemble des variables détectées (en colonnes) et leurs intensités dans chacun des échantillons dans lesquels ces variables ont été mesurées (en lignes).

Seul le fonctionnement du logiciel XCMS sous R sera détaillé ici, puisqu'il s'agit de celui qui a été choisi pour le traitement des données présentées dans ce manuscrit. L'extraction des données brutes avec ce logiciel se déroule en 4 étapes principales (Figure 13) :

1/ La détection des pics (« *peak detection* »)

Les données LC-MS d'un échantillon sont divisées par tranches de m/z (réglable). Pour un m/z donné au niveau du chromatogramme, le pic dont l'intensité est maximale est sélectionné et est extrait. Des couples m/z et t_r correspondant à une variable sont ainsi formés et il est possible d'avoir une représentation de la variable sous la forme d'un « *extracted ion base peak chromatogram* ». En fonction de l'appareillage (UPLC/HPLC, LR-MS/HR-MS), certains paramètres doivent être ajustés pour

une extraction optimale. Des biais lors de cette étape peuvent conduire à des erreurs dans l'analyse statistique puis dans l'interprétation biologique des données.

Les paramètres les plus importants sont les suivants :

- ✓ *fwhm* : permet de déterminer la valeur minimale de la largeur à mi- hauteur (exprimée en secondes) d'un pic pour qu'il soit extrait.
- ✓ *sntreshold* : permet de différencier le bruit de fond d'un ion. Par défaut, l'extraction d'un ion est réalisée quand son intensité est cinq fois supérieure à celle du bruit de fond.
- ✓ *step* : permet de définir la largeur des tranches *m/z* et ainsi la définition des pics chromatographiques.

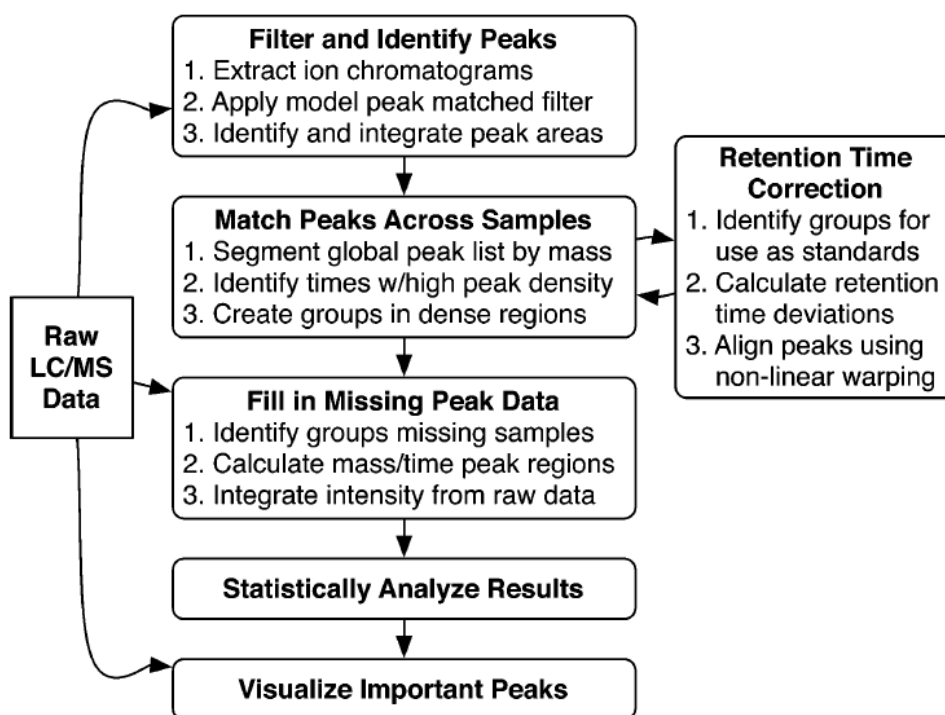


Figure 13 : Traitement des données LC-MS brutes par XCMS (d'après Smith et al, 2006)

2/ La recherche des pics correspondants (« *peak matching* »)

Après avoir identifié les différents pics dans un échantillon, ils sont recherchés dans l'ensemble des échantillons afin d'éliminer les variables redondantes. Lorsqu'un ion est retrouvé dans plusieurs échantillons, il est considéré comme un « group ». Cette recherche est contrôlée par plusieurs paramètres :

- ✓ *mzwid* : définit la variation maximale acceptée entre deux pics chromatographiques de deux échantillons différents pour pouvoir être rassemblés.
- ✓ *bw* : définit la largeur minimum à mi-hauteur des pics chromatographiques extraits pouvant être rassemblés.

Patti et al suggèrent de régler ces paramètres à 0,015 et 2, respectivement, pour des analyses effectuées sur un système de type UPLC-Q-ToF (haute résolution) et à 0,025 et 5, respectivement, pour celles obtenues avec une HPLC-Q-ToF (Patti et al., 2012).

3/ L'alignement des temps de rétention (« *retention time alignment* »)

Au cours de l'analyse, un même composé présent dans plusieurs échantillons peut présenter une dérive au niveau de son temps de rétention. Il est alors nécessaire de ne pas considérer deux variables mais bien une seule pour ce composé. L'algorithme utilisé par le logiciel permet de corriger le temps de rétention des pics dans tous les échantillons en une seule étape. Plusieurs ions bien représentés dans plusieurs échantillons seront considérés comme des références et permettront de corriger l'ensemble des valeurs de temps de rétention des autres ions.

4/ La recherche et l'ajout des pics manquants (« *fill in missing peak data* »)

La recherche des pics a été effectuée à partir des données d'un seul échantillon de référence. Il est possible que les données des autres échantillons contiennent d'autres pics non détectés dans cette référence. La quatrième et dernière étape d'extraction permet de parcourir l'ensemble des données à la recherche de pics manquants et de les intégrer dans la matrice finale.

Certains paramètres permettent de vérifier la qualité des données ainsi extraites :

- ✓ Le nombre de zéros dans la matrice ne doit pas excéder un certain seuil (40%),
- ✓ Les pics présents dans moins de 20% des échantillons analysés doivent être éliminés,
- ✓ Les temps de rétention et l'intensité du signal des échantillons de contrôle doivent être répétables.

Normalisation :

Au cours d'une même séquence d'acquisition, le processus d'ionisation et donc son rendement peuvent être altérés par des phénomènes de suppression d'ions dus à un encrassement de la source. Ainsi la variabilité à étudier peut être masquée ou augmentée aléatoirement. Pour être en mesure de

corriger cette dérive analytique, la solution la plus commune est l'utilisation d'échantillons de contrôle-qualité (*Quality control, QC*). Ces QCs sont généralement composés d'un mélange de l'ensemble des échantillons analysés et sont injectés régulièrement tout au long de la séquence d'analyse. Le biais analytique pourra ainsi être modélisé et corrigé par régression. La méthode généralement utilisée est la régression locale de type LOESS (*Low order non linear locally estimated smoothing function*).

1.2.2.2.6. Analyses statistiques multivariées

Les analyses statistiques multivariées permettent l'étude simultanée de plusieurs variables (ici tous les métabolites détectés). Elles permettent de réduire la dimensionnalité des données et ainsi de synthétiser et de structurer les données obtenues par LC-MS. Elles visent à sélectionner les variables d'intérêt d'un groupe d'échantillons.

Les données obtenues après extraction des pics et les différentes filtrations doivent encore être traitées avant d'être soumises à des analyses statistiques. En effet, la disparité des intensités (analyse-dépendantes) et les variations inter-échantillons ne doivent pas masquer les différences biologiques recherchées. Les données sont donc « centrées » pour déplacer la distribution des valeurs autour de zéro et non de la moyenne. Une mise à l'échelle est également effectuée selon une mesure de distribution (écart-type) ou de taille (moyenne ou transformation logarithmique).

Les données ainsi traitées peuvent être soumises à des analyses statistiques multivariées descriptives (ex : analyse en composante principale, ACP) ainsi qu'à des analyses statistiques explicatives et prédictives (ex : analyse discriminante PLS, PLS-DA).

Analyses statistiques descriptives :

Les analyses statistiques descriptives ont pour objectif de donner une vision globale des données sans connaissances nécessaires sur l'appartenance d'un échantillon à un groupe. L'ACP est sans doute l'analyse la plus connue et c'est généralement la première étape du traitement statistique lors de l'analyse d'un jeu de données. Elle permet de décrire visuellement les sources de variabilités entre les données de par leur structuration dans un espace réduit. Les données sont distribuées autour de deux axes appelés composantes principales. Ces deux composantes, les plus importantes, sont représentées visuellement mais une ACP peut avoir plus de deux composantes. Les composantes principales ont été calculées par des combinaisons linéaires des variables d'origine afin d'être les plus représentatives possible de la variance. La première composante représente la plus grande source de variance tandis

que la deuxième extrait la plus grande variance restante, et ainsi de suite. Les données sont représentées autour de ces deux axes sous forme de « *score plot* » ou de « carte factorielle » des échantillons. Les échantillons appartenant à un même « *cluster* » sont plus proches les uns des autres. Il est alors possible d'observer (grâce à une carte factorielle du poids des variables, le « *loading plot* ») les relations entre les métabolites et une éventuelle structuration des échantillons. Les variables discriminantes, sous- ou sur- exprimées dans un groupe d'échantillons peuvent ainsi être mises en évidence.

Analyses statistiques explicatives et prédictives :

Ces analyses ont pour but d'expliquer la variabilité qui a pu être observée avec des modèles descriptifs tels que l'ACP. L'analyse discriminante PLS explique par exemple une réponse à partir de variables explicatives contenues dans la matrice de données. Les caractéristiques de l'échantillon (appartenance à un groupe) sont renseignées et participent à la construction du modèle. Le nombre de variables étant souvent bien plus grand que le nombre d'échantillons, les résultats de ces tests doivent être vérifiés statistiquement afin de s'assurer qu'ils ne sont pas dus au hasard. Des techniques telles que la validation croisée (*cross validation*, CV) ou le test de permutation sont les plus couramment utilisés à cette fin.

✓ *La validation croisée :*

Les données sont divisées en deux groupes : les données de test et les données de validation. Un modèle discriminant est construit à partir des données de test et est utilisé pour classer les données de validation. Comme la classe des données de validation est connue, le nombre d'erreurs de classement par le modèle peut être compté. Ce processus est répété un certain nombre de fois en changeant la distribution des données dans les deux groupes (test et validation). Pour renforcer la validité du test, il est également possible, pour chaque répétition, d'enlever 10 % des données (« *k-fold cross-validation* ») (Hastie et al., 2001).

✓ *Le test de permutation :*

La matrice contenant l'intensité des métabolites par échantillon est appelée *X*. La classification donnée quant à elle rentre dans la catégorie « étiquette de classe *y* » (*class label*). L'analyse discriminante consiste alors à bâtir des modèles entre *X* et *y*. Le principe du test de permutation est de construire des modèles « sans sens » en permutant les étiquettes de classe (en laissant *X* intact). Ceci est répété un grand nombre de fois avec différentes permutations. Les données sont ainsi mélangées aléatoirement et les classes ne correspondent plus à celles

des données brutes. Au nombre de permutations le plus important (fixé par l'utilisateur), le modèle permuté doit donc être complètement différent du modèle décrit et beaucoup moins prédictif.

1.2.2.2.7. Identification de biomarqueurs

En métabolomique, les biomarqueurs correspondent généralement aux ions qui contribuent le plus à la construction des modèles statistiques multivariés. Donc pour les identifier, il faut revenir aux données brutes et rechercher les molécules dont ils sont issus. La difficulté réside dans le fait que les ions observés peuvent aussi bien être des ions pseudo-moléculaires que des adduits, des isotopes ou des fragments. Une fois les métabolites d'intérêt mis en évidence, il faut procéder à leur identification. Avec leur masse précise (obtenue par exemple avec un QToF), il est possible d'émettre des hypothèses quant aux formules brutes de ces métabolites d'intérêt.

L'analyse des échantillons par fragmentation MS/MS permet d'obtenir plus d'informations sur la structure des composés grâce à leurs schémas de fragmentation. Cela permet généralement de valider les formules brutes hypothétiques et d'émettre des hypothèses sur les formules développées correspondantes. Cette étape d'identification des variables d'intérêt est appelée l'annotation. Des outils tels que MetFrag (Wolf et al., 2010), CSIfinger ID (Dührkop et al., 2015) ou encore Metfusion (Gerlich and Neumann, 2013) aident à faire le lien entre un spectre MS, un spectre MS/MS et les bases de données.

La génération d'hypothèses sur la formule brute d'une molécule d'intérêt est réalisée grâce à la recherche dans des bases de données. Les principales bases de données utilisées pour l'identification de molécules en métabolomique sont présentées ci-dessous :

- ✓ *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (www.genome.jp/kegg/) : base de données biologiques contenant des molécules présentes dans différentes espèces (plantes, rat, homme,...). Elle a la particularité de décrire les voies métaboliques conduisant à ces composés (Kanehisa, 2002).
- ✓ *Nature Lipidomics Gateway* (www.lipidmaps.org/) : base de données qui rassemble des molécules de nature lipidique.
- ✓ *Metlin* (http://metlin.scripps.edu/metabo_search.php) : base de données regroupant des molécules contenues dans KEGG, Lipidmaps et HMDB (*Human Metabolome Data Base*) (Smith et al., 2005).

- ✓ *Scifinder* : base de données donnant accès au catalogue de molécules répertoriées dans la littérature en chimie (Wagner, 2006).
- ✓ *Pubchem* : base de données contenant les molécules répertoriées dans les bases de données Pbsubstances, Pcompound et PCBioAssay (Sayers et al., 2011).

Pour valider l'identité putative d'un métabolite, il est nécessaire de réaliser, dans les mêmes conditions et de manière simultanée, l'injection d'un standard pur et de l'échantillon. Dans le cas d'organismes marins, il est très rare de pouvoir réaliser cette étape puisque les molécules d'intérêt ne sont généralement pas connues et encore moins disponibles sous forme de standards. Dans ce cas-là, l'identification d'un composé peut être réalisée grâce à sa purification et son analyse structurale par RMN.

Afin d'harmoniser le langage et les démarches du travail d'identification, un groupe de travail de la société de métabolomique a défini des niveaux d'identification (Tableau 3) (Fiehn et al., 2007).

Tableau 3 : Définitions des niveaux d'identification des métabolites en métabolomique (Fiehn et al, 2007)

Termes	Définitions
Composés inconnus	Aucune hypothèse structurale émise
Composés putativement caractérisés	Pas de proposition de structure dans les bases de données mais similitude spectrale et/ou physico-chimique avec des composés connus d'une classe chimique donnée
Composés putativement annotés	Pas de standard commercial disponible mais similitude spectrale et/ou physico-chimique avec un composé présent dans les banques de données spectrales
Composés identifiés	Nécessite 2 critères d'identification comparés à ceux obtenus à partir du produit de référence analysé dans les mêmes conditions parmi : t_r avec spectre de masse, t_r avec spectre RMN- ¹ H, masse précise avec massif isotopique, masse précise avec spectre MS/MS, spectres RMN- ¹ H et/ou RMN- ¹³ C avec spectres RMN 2D

Aujourd'hui, il y a un certain nombre d'obstacles à l'étape d'identification :

- ✓ Les spectres de masse obtenus pour une même molécule diffèrent d'un appareil à l'autre (variabilité au niveau de la formation d'adduits),
- ✓ Du fait de cette variabilité, l'utilité d'une base de données spectrale en LC-MS a des limites,

- ✓ Le nombre de données disponibles pour l'identification de composés en LC-MS est donc loin d'être suffisante (loin de la quantité de données disponibles pour la génomique).

Certains chercheurs construisent donc des banques de données propres à leurs plateformes analytiques et aux conditions utilisées. Ces banques n'étant pas interchangeables entre laboratoires, l'un des principaux enjeux de la métabolomique est le développement de bases de données universelles et publiques (Schmidt, 2004).

I.3. Les bactéries marines et leur métabolome

Les travaux réalisés à ce jour en métabolomique et portant sur les bactéries marines s'articulent en trois principaux axes de recherche : (1) la classification d'espèces et la découverte de molécules originales, (2) la compréhension de l'impact de paramètres extérieurs sur le métabolisme bactérien, (3) l'étude de l'impact de paramètres physiologiques sur le métabolome bactérien (mode de culture, co-culture...). Un état de l'art est présenté en suivant cette organisation en 3 parties.

I.3.1. Différentiation des souches bactériennes marines selon leur métabolome et découverte de nouvelles molécules

L'une des applications de la métabolomique réside dans l'aide apportée à la classification d'organismes par le biais de critères chimiques et ce, à une échelle plus globale que la plupart des études chimiotaxonomiques actuelles qui se focalisent plus sur une famille particulière de molécules. De nouvelles méthodologies ont été mises en place pour permettre la caractérisation des souches bactériennes par une approche métabolomique. Leur regroupement s'effectue selon les familles de métabolites communes et leur discrimination grâce aux familles de molécules qui leur sont spécifiques (Macintyre et al., 2014). La discrimination des souches bactériennes en fonction de leur profil métabolique est reproductible et améliore d'ailleurs nettement la résolution par rapport aux techniques actuelles de dérégulation moléculaire pour la discrimination inter-souches (Forner et al., 2013). La métabolomique est aujourd'hui plus communément utilisée pour la caractérisation des bactéries terrestres. Cette approche a fait ses preuves, pour l'identification de bactéries, en tant que « méthode de routine » en plus des tests biochimiques et du séquençage de génome (Krásný et al., 2013).

La caractérisation des espèces bactériennes marines est souvent couplée à la recherche ou à la découverte de nouvelles molécules. En effet, la recherche de composés originaux chez une espèce peut également conduire à la caractérisation précise d'une partie de son métabolome et donc de

l'espèce elle-même. Inversement l'obtention de la signature chimique la plus complète possible peut mener à la détection de composés originaux. La recherche de métabolites bioactifs s'effectue au sein d'un consortium de milliers de composés. L'ensemble de ces composés doit donc être analysé et testé. Dans ce contexte, une étude métabolomique peut s'avérer utile si elle permet de mettre en évidence des composés apparaissant dans des conditions spécifiques, c'est-à-dire ayant potentiellement des propriétés et un rôle bien spécifiques. La métabolomique peut donc permettre de cibler rapidement des métabolites potentiellement actifs (Zhang and Chen, 2012).

L'analyse des composés d'un organisme vivant est souvent difficile du fait de la faible disponibilité de ce dernier et ainsi des faibles quantités d'extrait pouvant être obtenues. La métabolomique est dans ce cas-là également un outil très efficace car elle permet de déterminer les conditions optimales de production d'un composé ciblé par un organisme donné (Bose et al., 2014). De plus, l'examen du profil métabolique peut permettre d'obtenir des informations sur les précurseurs spécifiques de métabolites d'intérêt ; ceci peut être utile pour comprendre et contrôler les processus biosynthétiques conduisant à ces métabolites. Dans ce contexte, les bactéries marines qui peuvent être cultivées en grandes quantités constituent des organismes de choix pour la production et la recherche de composés originaux.

Les organismes marins possèdent des fonctions spécifiques pour s'adapter aux conditions particulières de leur environnement (salinité, température, hautes pressions, milieux oligotrophes) et produisent ainsi un large arsenal de composés chimiques dont certains ont montré un fort potentiel dans le domaine pharmacologique via des activités antinéoplasiques (Fayette et al., 2006), antivirales (Chill et al., 2004; Mansson et al., 2011), anti-oxydantes (Mendis et al., 2005), antibiotiques (Wagner-Döbler et al., 2002) ou anti-inflammatoires (Anjaneyulu and Rao, 1997). De par sa liaison avec le domaine pharmaceutique, cet axe de recherche visant à découvrir de nouvelles molécules actives au sein du métabolome de bactéries marines est celui qui s'est développé le plus rapidement (Zhang et al., 2005; Fenical, 2006; Lam, 2006; Bull and Stach, 2007).

Dans cette partie, le but n'est pas de réaliser l'inventaire des nouveaux produits bioactifs découverts dans le métabolome bactérien mais de décrire en quoi la métabolomique constitue un outil de choix pour ce type de recherche à double intérêt (recherche de métabolites bioactifs et classification des espèces) (Macintyre et al., 2014).

L'analyse du profil LC-MS de la bactérie *Zooshikella rubidus* a ainsi permis de détecter la présence de pigments majeurs (prodigiosine et cycloprodigiosine) et de distinguer des souches très proches

phylogénétiquement (Lee et al., 2011). L'étude du profil LC-MS de plusieurs souches de *Pseudoalteromonas* pigmentées et non pigmentées a également été effectuée. Des discriminations inter-espèces ont été observés et des molécules antibactériennes ont été identifiées (Vynne et al., 2011). L'étude par FT-ICR-MS de 22 souches de *Salinibacter* (Bacteroidetes) a conduit à leur discrimination par la présence de métabolites spécifiques (lipides et antibiotiques) (Antón et al., 2013). Les profils métaboliques de deux souches de *Salinispora* ont été réalisés (LC-MS) et ont permis de mettre en évidence des différences métaboliques. Certaines des molécules produites sont par ailleurs des dérivés originaux de l'ansamycine (Bose et al., 2014). De la même manière, une partie du métabolome de Firmicutes, d' α -Proteobacteria, de γ -Proteobacteria et d'Actinobacteria a été analysée dans le cadre d'une vaste étude métabolomique ciblée portant sur la famille des phénazines (intérêt pour leurs activités antibiotiques). Le potentiel génétique de quatre bactéries pour la biosynthèse de phénazines a ainsi été démontré pour la première fois (Schneemann et al., 2011). L'étude et la différenciation de plusieurs souches de Vibrionaceae à l'aide de leurs profils métaboliques (établis par LC-MS) a permis l'identification d'une souche (*Vibrio coralliilyticus*) capable de produire un peptide antibiotique, l'andrimide. L'analyse des paramètres de culture de *V. coralliilyticus*, dans le but d'augmenter sa production d'antibiotique, a permis de démontrer que l'ajout de chitine à son milieu de culture augmentait la production en antibiotique (Wietz et al., 2011). L'étude par métabolomique de la bactérie *Vibrio* sp. QWI-06 a permis la découverte d'un nouveau polycétide antibiotique contre *Acinetobacter baumannii* (Liaw et al., 2015). L'étude des profils chimiques (LC-HRMS et RMN) de 77 souches de bactéries de la famille des Proteobacteria (42), des Actinobacteria (23) des Bacteroidetes (4) et des Firmicutes (2) isolées à partir d'invertébrés marins a conduit à leur différenciation. Les souches ayant la production de métabolites spécifiques la plus importante ont pu être ainsi distinguées (Macintyre et al., 2014). Neuf souches bactériennes marines, dont deux ont été identifiées comme étant de la famille des Firmicutes et du genre *Bacillus*, ont également été analysées par MALDI-TOF-MS dans le but de trouver des molécules actives en *antifouling*. Il a ainsi été montré que les espèces les plus actives produisaient des lipopeptides tels que la surfactine A, la mycosubstiline, ou encore la bacillomycine D (Ortega-Morales et al., 2008).

L'analyse par MALDI-TOF-MS de douze souches marines de la famille des Proteobacteria, des Actinobacteria et des Bacteroidetes, et leur classification sur la base de critères chimiques a montré une forte analogie avec la classification effectuée grâce aux séquences d'ARN 16S (Salaün et al., 2010). Une étude métabolomique réalisée sur des *Salinibacter* a démontré qu'il était possible de distinguer la provenance géographique de différentes souches grâce à leur signature métabolique (FT-ICR-MS) et

en particulier la mise en évidence de la production de certains métabolites caractéristiques (Rosselló-Mora et al., 2008). Plus récemment, deux souches de *Salinibacter ruber* ont été étudiées par génomique et métabolomique. Les résultats démontrent que de petites variations génétiques ont des conséquences sur le métabolome des bactéries, mettant en évidence une réponse métabolique spécifique à la prédation virale et une compétition pour s'adapter à leur environnement (Pena et al., 2010). L'analyse du profil métabolique de Vibrionaceae et l'observation de différences significatives dans leur production en métabolites secondaires (composés antibactériens, sidérophores, anticancéreux, interférant dans le processus de *quorum sensing*...) a également permis de différencier des espèces phénotypiquement identiques (Mansson et al., 2011).

1.3.2. Impact de paramètres extérieurs sur le profil métabolique des bactéries marines

Le milieu marin représente une combinaison unique de facteurs environnementaux spécifiques (salinité, pression, température) liés à des problématiques particulières de disponibilité en nutriments. Il est relativement connu et non surprenant que la production métabolique de bactéries marines cultivées *in vitro* varie en fonction des conditions de culture (Wagner-Döbler et al., 2002). De manière générale, il a également été remarqué que les conditions de culture favorisant la croissance bactérienne ne sont pas forcément celles qui favorisent la production de métabolites spécialisés (Wang et al., 2011; Djinni et al., 2013). De nombreuses publications étudient l'impact des conditions de culture sur la croissance bactérienne mais il est souvent difficile de conclure quant aux voies métaboliques impactées.

L'étude de l'effet de paramètres extérieurs sur le métabolome d'une bactérie peut être réalisée parfois à des fins purement écologiques. Cependant dans la littérature, ce genre d'étude est plus régulièrement mené afin d'optimiser les conditions de production de métabolites secondaires bioactifs. Les travaux cités témoignent de la diversité des paramètres (ex. : stress physiques ou chimiques, état physiologique) ayant démontré un impact sur le métabolome de bactéries marines.

1.3.2.1 Effets de la concentration en sels

La plupart des bactéries marines peuvent se développer dans de l'eau de mer artificielle contenant de 0,5 à 12% de sels avec une croissance optimale autour de 3 à 7% (Hidaka, 1965). On notera que l'ordre de grandeur retenu comme valeur standard de salinité de l'eau de mer est de 35 g/L soit 3,5% (Maurel, 2006). Dès 1965, certains auteurs mentionnent la nécessité des ions Na⁺ pour la croissance et les

activités métaboliques des bactéries marines (Hidaka, 1965; MacLeod, 1965). D'autres, en s'intéressant aux caractéristiques physiologiques de la bactérie marine *Vibrio alginolyticus*, ont également remarqué que la présence de sodium dans son milieu de culture était essentielle à son équilibre homéostatique et à sa croissance (Tokuda et al., 1981). De plus récentes études sur *Salinispora* spp. montrent que la présence d'ions sodium dans le milieu de culture pouvait être remplacée par des conditions osmotiques appropriées (solution à base de chlorure de potassium) (Tsueng and Lam, 2008). La bactérie *Halocynthia Roretzi*, isolée à partir d'une ascidie marine, nécessite quant à elle pour sa croissance une concentration en NaCl comprise entre 1 et 5% et un apport en chlorure de magnésium (Kim et al., 2011). En plus des ions Na⁺, d'autres ions (K⁺, Mg²⁺ ou Ca²⁺) sont également essentiels pour la croissance des bactéries marines (Hidaka 1965), mais les voies métaboliques correspondant à ces besoins restent encore méconnues (Tsueng et al., 2008).

Il apparaît donc que la concentration en sels (NaCl et autres sels) d'un milieu de culture est un élément influençant fortement la croissance bactérienne et la production métabolique des cellules.

Par exemple, la production d'un agent antitumoral (le salinosparamide A) par l'actinomycète marin *Salinispora tropica* est directement corrélée à la composition en sels du milieu de culture (Tsueng and Lam, 2008; Tsueng et al., 2008). Différentes productions métaboliques et différents modèles de croissance ont ainsi été observés dans des milieux à base de sulfate de sodium, de chlorure de sodium et de chlorure de potassium (Tsueng and Lam, 2008). Plus récemment, il a été démontré grâce à une étude métabolomique que la production d'un antibiotique, la rifamycine W, par *Salinispora arenicola* variait selon la teneur en NaCl du milieu de culture. D'ailleurs, les différences de production en antibiotiques observées en fonction de la salinité suggèrent qu'un stress salin empêcherait ces bactéries de rivaliser au sein d'une communauté microbienne (Bose et al., 2015). Le même type de résultats avait déjà été observé sur *S. arenicola* par le biais d'une analyse HPLC-UV (Ng et al., 2014).

Dans le cadre de la recherche de conditions optimales de culture pour la production d'antibiotiques par *Streptomyces* sp. WR1L1S8, cette souche a montré des profils métaboliques distincts selon la concentration en sels (Djinni et al., 2013). Elle était capable de croître aussi bien en présence qu'en absence de sels mais en produisant toutefois des quantités variables d'antibiotiques.

Une autre étude métabolomique a porté sur des bactéries provenant d'une région d'Inde où les sols sont naturellement riches en sel (NaCl) afin d'étudier leurs réponses *in vitro* à ce stress. Les résultats ont montré que la quantité en métabolites extraits était directement dépendante de la teneur en NaCl contenue dans le milieu de culture. Plus la salinité est importante, plus la production métabolique est

grande, avec cependant une concentration-seuil à partir de laquelle la croissance des cellules est inhibée (Joghee and Jayaraman, 2014).

1.3.2.2. Impact d'autres paramètres

D'autres paramètres peuvent influencer notablement la production en métabolites des bactéries marines.

Des profils chimiques obtenus par RMN de bactéries marines ont montré des différences significatives selon si le milieu de culture était riche (milieu ZoBell) ou non (milieu VNSS) (Salaün et al., 2010). Dans d'autres études, les sources de carbone présentes dans le milieu de culture ont également témoigné d'un impact sur la production en métabolites. Par exemple, des bactéries du genre *Streptomyces* produisent plus de composés antibiotiques lorsque la source de carbone est de l'amidon et du glucose qu'en présence de lactose ou de galactose (Djinni et al., 2013). Le métabolisme de *Saccharophagus degradans* est également modifié en fonction de la source de carbone qui lui est fournie. Cela a été expliqué par le fait que différentes voies cataboliques du carbone sont utilisées en fonction de la source fournie (Shin et al., 2010).

Chez des *Streptomyces*, l'utilisation de caséine en tant que source d'azote a conduit à une augmentation de la production d'antibiotiques (Djinni et al., 2013). En fait, il semblerait que ce soit plutôt le contraire car la présence d'une source d'azote, favorisant la croissance, défavoriserait la production de molécules antibiotiques (van Wezel and McDowall, 2011).

Le pH du milieu est également important puisqu'il peut favoriser ou non la croissance et la production de certains métabolites (Djinni et al., 2013). Comme la salinité, le pH de l'eau de mer est variable mais basique, en général légèrement supérieur à 8.

La composition du milieu de culture en sulfates peut aussi affecter fortement la composition du métabolome des bactéries. En présence d'un excès de sulfates, les molécules sécrétées dans l'environnement par *Pseudovibrio* sp. FO-BEG1 sont essentiellement des peptides et des composés fortement insaturés alors qu'en présence de ressources limitées en sulfates, ce sont plutôt des composés phénoliques et polyphénoliques qui sont excrétés (Romano et al., 2014).

L'activité métabolique des bactéries marines est étroitement liée à leur capacité d'adaptation à une pollution du milieu qui les entoure. Par exemple, la production métabolique de bactéries (appartenant aux genres *Bosea*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Shingomonas* et *Variovorax*) issues de biofilms

marins en présence de cuivre est dépendante de leur capacité à métaboliser cet élément (Beale et al., 2014). La présence d'une forte concentration de cadmium dans le milieu de culture affecte de nombreuses voies métaboliques chez *Rhizobium alarii*, poussant même cette bactérie à changer de « mode de vie » et impactant ainsi forcément sa signature métabolique (Schue et al., 2011).

Dans une étude par métabolomique (GC-MS) de bactéries terrestres appartenant aux familles des Micrococaceae, des Nocardiceae et des Enterobacteriaceae, il a été démontré que la température jouait un rôle important sur leur production métabolique tout en affectant peu leur catabolisme (Coucheney et al., 2008).

L'ensemble des paramètres intervenant sur la production métabolique des bactéries rend l'étude de leur métabolome complexe. Certaines études s'affranchissent de la différence de composition du milieu de culture en appliquant un filtre spécifique lors du traitement des données afin de permettre quand même la comparaison du métabolome de deux bactéries cultivées dans des milieux différents (Macintyre et al., 2014).

I.3.3. Impact de paramètres physiologiques sur le métabolome bactérien

I.3.3.1. Mode de culture

I.3.3.1.1. Biofilm versus planctonique

Comme il a été décrit plus haut, un biofilm présente une multitude d'interactions biochimiques qui structurent la communauté microbienne. Ce mode de vie, à l'opposé du mode planctonique, permet aux bactéries de changer d'état physiologique leur apportant ainsi une résistance accrue à différents stress (Yildiz and Visick, 2009). L'ensemble de ces modifications, chimiques et physiologiques, suggèrent une activité métabolique des bactéries très différente en biofilm.

La lutte contre les salissures (*fouling*) en milieu marin représente un enjeu considérable et nécessite le développement de matériaux spécifiquement destinés à des applications marines. En effet, l'impact de la formation d'un biofilm marin sur une surface immergée n'est pas limité à la seule colonisation bactérienne mais cela contribue aussi à la colonisation ultérieure de cette surface par d'autres micro- et des macro- organismes.

Peu d'études portant sur les changements métaboliques qui ont lieu entre le mode de vie en biofilm et le mode de vie planctonique ont été réalisées sur des microorganismes marins. La formation d'un

biofilm *in vitro* par la bactérie *Vibrio* sp. 010 a été observée en analysant l'effet d'un composé *antifouling* naturel (poly-éther B) par le biais de trois méthodes d'analyses couplées : la cytométrie de flux, la protéomique et la métabolomique. Ces travaux montrent que le poly-éther B cause une réduction significative de la viabilité des cellules, une modification de la production de protéines liées au métabolisme des nucléotides, au cycle glycoxylique et à la réponse au stress, ainsi qu'une modification de la production de métabolites de type tripeptides, acides gras et molécules du QS. La sous-régulation des protéines et de ces métabolites conduit à une diminution de la capacité de la bactérie à coloniser une surface, ce qui affecte la structure du biofilm formé. Les métabolites ainsi identifiés pourraient donc servir de molécules-cibles lors de la recherche de nouveaux composés *antifouling* (Chandramouli et al., 2013).

Dans le cadre d'une autre étude, les différents profils métaboliques de *Vibrio fischeri* cultivée en modes planctonique et biofilm ont été comparés. De nombreuses molécules (environ 200) sont recensées dans les métabolomes de l'un ou l'autre des modes de culture. Certaines sont communes aux deux tandis que d'autres, au contraire, mettent en évidence des changements métaboliques critiques entre les deux états. Les profils métaboliques des échantillons de biofilms montrent une surexpression de plusieurs acides (phosphorique, aspartique, docosanoïque, malonique, hydroxybenzoïque et céto gluconique), de plusieurs sucres (fructose, mannose et maltose) et de composés dérivés du glycérol (hexadecanoylglycérol, dodecanoylglycérol, heptadecanoylglycérol et tétradecanoylglycérol). Les composés sous-exprimés en biofilm et surexprimés en mode planctonique sont l'acide thréonique, l'hydroxypyrimidine, la tyramine et le cellobiose. La présence de nombreux dérivés du glycérol en biofilm suggère que les cellules du biofilm utilisent des phospholipides relargués par des cellules voisines comme source de carbone, pour la synthèse d'acides aminés par exemple. Plus globalement, les métabolites détectés en biofilm sont importants dans la synthèse des EPS de la matrice du biofilm ou impliqués dans des processus de régulation impliquant des messagers (Chavez-Dozal et al., 2015).

Du côté de la recherche en milieu terrestre, une étude compare les profils métaboliques en RMN de cultures en biofilm et en planctonique de *Staphylococcus aureus*. Elle démontre que cette bactérie produit en biofilm significativement plus d'isoleucine, d'alanine et de 2,3-butanediol alors qu'en mode planctonique la glycine bêtaïne, un osmoprotecteur, est surexprimé (Junka et al., 2013). Une autre étude s'intéresse aux différents profils métaboliques GC-MS de *Salmonella enterica* cultivée en biofilm et en mode planctonique. Les résultats révèlent une claire distinction métabolique entre les deux types de culture. Dans les surnageants, des acides aminés (alanine, acide glutamique, glycine et ornithine) contribuent le plus à cette différence tandis que dans les cellules, ce sont plutôt des acides organiques

(acide succinique, putrescine, acide pyroglutamique et acide *N*-acétylglutamique). L'analyse de biofilms d'âges différents montre également des différences métaboliques essentiellement dues à la production en acides aminés (Wong et al., 2015). Dans le cas d'*Acinetobacter baumannii* 1656-2, l'analyse comparée de ses profils métaboliques RMN révèle des différences métaboliques notables entre les modes de vie biofilm et planctonique. Ainsi, il est démontré que des précurseurs tel que l'acétate, le pyruvate, le succinate, l'uridine diphosphate-glucose, l'adénosine monophosphate cyclique (AMP) le glutamate et la lysine sont beaucoup plus impliqués dans le métabolisme énergétique en biofilm qu'en planctonique. Le ratio *N*-acétyl-*D*-glucosamine sur *D*-glucosamine est également plus élevé en biofilm (Yeom et al., 2013).

D'autres études se sont également intéressées à l'expression protéique et génique des bactéries dans ces deux modes de culture et démontrent qu'à ces niveaux-là des différences notables (sous- ou sur-expression d'un certain nombre de gènes et protéines) sont observées (Vilain et al., 2004; Shemesh et al., 2007; Collet et al., 2008).

1.3.3.1.2. Co-Cultures bactéries-autres organismes

Les interactions chimiques entre les différents organismes sont essentielles dans le fonctionnement des écosystèmes. La présence et la production métabolique de chacun peut engendrer des modifications de comportement chez l'autre. Afin de mimer des interactions qui pourraient exister dans l'environnement, des expérimentations mettant en jeu plusieurs organismes en co-cultures semblent pertinentes. Les études portant sur les interactions chimiques de bactéries marines avec d'autres organismes marins, et notamment avec d'autres bactéries marines, restent encore peu décrites dans la littérature. En effet, ce genre de travaux requiert le développement de dispositifs expérimentaux spécifiquement dédiés. L'échantillonnage d'organismes en co-cultures est en effet difficile, en particulier pour des organismes planctoniques qui vivent dans des communautés peu complexes mais très diluées.

L'analyse d'une co-culture entre une micro-algue (*Thalassiosira pseudomona*) et une bactérie (*Dinoroseobacter shibae*) a été conduite par métabolomique (GC-MS). Les deux organismes sont physiquement séparés par une membrane mais peuvent échanger des signaux chimiques. Il a été observé que la bactérie influence le métabolisme de la micro-algue en induisant spécifiquement une augmentation de la production en acides aminés indiquant ainsi une réponse adaptative de la diatomée. La bactérie a cependant peu d'influence sur la croissance de la micro-algue. Ce type de

réponse liée aux interactions des organismes entre eux pourrait être crucial pour une meilleure compréhension des flux métaboliques au sein des communautés planctoniques (Paul et al., 2012).

Micrococcus luteus et *Vibrio anguillarum* sont deux bactéries pathogènes qui influent sur le métabolisme d'une moule (*Mytilus galloprovincialis*). Elles peuvent causer des maladies et conduire à des mortalités massives chez les animaux d'aquaculture et ainsi créer des pertes économiques importantes. Les extraits de moules contaminées, ou non, ont été analysés par RMN. La variation des taux des biomarqueurs métaboliques (acides aminés, betaïnes, ATP) observée suggère que les deux bactéries (et particulièrement *V. anguillarum*) induisent chez la moule des perturbations sur le métabolisme énergétique et sur la régulation osmotique (Ji et al., 2013).

Dans une autre étude, l'infection de la bactérie *Sulfitobacter* sp. par un phage a également été provoquée en recherchant des variations métaboliques intra- et extracellulaires liées à l'infection. La présence du phage dans la cellule conduit à une différenciation du profil métabolique de la cellule infectée. Une surexpression de 71 % des métabolites a été observée au niveau des cellules infectées (Ankrah et al., 2014).

1.3.3.2. Phases de croissance en mode planctonique

Les bactéries marines ont la possibilité de libérer dans l'environnement des composés différents selon leur état physiologique (Carlson, 2002). Elles peuvent sécréter des composés spécifiques pour l'acquisition de nutriments (ex. : sidérophores), pour la communication (ex. : HSL) ou encore pour la compétition entre les espèces (ex. : antibiotiques) (Romano et al., 2014).

Plusieurs études se sont intéressées à la production métabolique de bactéries marines selon leur phase de croissance. Ainsi, l'analyse des profils métaboliques obtenus par GC-MS de *Phaeobacter gallaeciensis* à 5 temps différents de sa phase de croissance a permis la détection de 147 métabolites. L'abondance de 87 d'entre eux change en début de phase stationnaire. L'analyse de ces variations métaboliques révèle la sous-régulation de diverses voies métaboliques (assimilation du soufre et synthèse de l'enveloppe cellulaire) et la sur-régulation de la formation de cadavérine. Le catabolisme central du carbone semble quant à lui inchangé (Zech et al., 2009). Le profil métabolique de 2 souches de *Salinibacter* a été analysé à différentes phases de croissance (initiale, exponentielle et stationnaire) dans le cadre d'une étude métabolomique menée par FT-ICR-MS. Les différences de profils métaboliques observés sont notables, en particulier au niveau de l'exo-métabolome. Les marqueurs les plus discriminants de la phase stationnaire sont des composés aliphatiques chimiquement associés

à des lipides (Brito-Echeverría et al., 2011). Dans le cas de la bactérie *Pseudovibrio* sp., la signature métabolique de l'exo-métabolome est clairement dépendante de la phase de croissance (Romano et al., 2014).

En 2010, une étude métabolomique a été réalisée par MALDI-TOF MS sur les colonies formées par 29 souches bactériennes sur des boîtes gélosées. Les résultats obtenus ont montré que l'âge des cultures n'avait pas d'effet sur les signatures chimiques des bactéries (Salaün et al., 2010).

Du côté du milieu terrestre, l'étude et la recherche de biomarqueurs de croissance a été également développée. Ce type de travaux concerne tout particulièrement le milieu médical car la recherche de métabolites en tant que biomarqueurs de croissance bactérienne peut servir au diagnostic d'une infection (Shnayderman et al., 2005). L'étude des modifications de structure cellulaire de plusieurs bactéries a été réalisée grâce à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) révélant que les modifications ayant lieu au cours des changements de phase de croissance étaient espèce-dépendantes. Pour *Bacillus stearothermophilus*, une modification de la composition en lipides a été mise en évidence alors que pour *Halobacterium salinarium* et *Halococcus morrhuae*, c'est un changement dans la concentration en ions sulfates qui a été observé. Enfin pour *Acetobacter aceti*, des différences de composition en polysaccharides ont été détectées (Ede et al., 2004). Il a également été démontré que l'entrée en phase stationnaire de *E. coli* était accompagnée d'une modification globale de sa composition en phospholipides (Takahashi et al., 2008). Plus tard, grâce à une étude en MALDI-ToF MS, les composés les plus spécifiques de la phase exponentielle ont été identifiés comme étant des protéines ribosomales (Momo et al., 2013). Une étude en métabolomique ciblée portant sur *Pseudomonas putida* a permis de démontrer que les AHLs, molécules du *quorum sensing*, sont spécifiquement produites par cette bactérie au début de la phase exponentielle (Fekete et al., 2010). Enfin, l'étude du métabolome de trois *Mycobacterium* spp. en fonction de leurs phases de croissance démontre également l'existence de biomarqueurs spécifiques des différentes phases ; ces biomarqueurs (intervenant dans le métabolisme de l'azote principalement) pouvant être identiques ou non entre les trois souches étudiées (Drapal et al., 2014).

CHAPITRE II

Matériel et méthodes



II.1. Etude métabolomique

II.1.1 Culture des souches bactériennes marines

II.1.1.1. Souches bactériennes

L'étude de la signature métabolique de cinq souches de bactéries marines a été effectuée. Ces souches servent de référence à l'étude entreprise ici (Tableau 4). Quatre d'entre elles proviennent de mer Méditerranée et appartiennent à la collection du laboratoire MAPIEM (TC4, TC7, TC8 et TC11). Le code d'appellation de ces souches contient les lettres TC pour « *Toulon Collection* ». Une souche provient de l'océan Atlantique (4M6) ; elle a été gracieusement fournie par le Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines (LBCM) de l'Université de Bretagne Sud (UBS).

La souche TC4 a été isolée à partir d'un biofilm provenant d'une plaque de polystyrène alors que les souches TC7, TC8 et TC11 sont issues de biofilms formés sur une plaque de silicone ou silicone fluoré. Toutes ces plaques ont été immergées 6h à 1m de profondeur en février 2008 dans la rade de Toulon (43°06'23''N - 5°57'17''E). La souche 4M6 provient quant à elle d'un biofilm formé sur une lame de verre immergée au niveau du Golfe du Morbihan (île Bailleron, 47°34'37''N - 2°44'54''O) à une profondeur de 1m pendant 6h en mars 2000.

TC4 et TC7 sont identifiées comme étant deux souches de *Persicivirga mediterranea*, TC8 une souche de *Pseudoalteromonas lipolytica*, TC11 une souche de *Shewanella sp.* (Brian-Jaisson et al., 2014) tandis que la souche 4M6 appartient au genre *Paracoccus* (Grasland et al., 2003).

Tableau 4 : Données relatives aux cinq souches de bactéries marines étudiées

Code	TC4	TC7	TC8	TC11	4M6
Taxonomie	<i>Persicivirga (Non labens) mediterranea</i>	<i>Persicivirga (Non labens) mediterranea</i>	<i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	<i>Shewanella sp.</i>	<i>Paracoccus sp.</i>
Classe	Flavobacteria	Flavobacteria	γ -Proteobacteria	γ -Proteobacteria	α -Proteobacteria
Lieu d'isolement	Mourillon (Toulon)	Mourillon (Toulon)	Mourillon (Toulon)	Port militaire de Toulon	Golf de Morbihan
Support	Polystyrène	Silicone ELP08/55554/13	Silicone ELP08/55554/13	Silicone fluoré ELP08/55554/13	Verre
Référence	(Brian-Jaisson et al., 2014)	(Brian-Jaisson et al., 2014)	(Brian-Jaisson, 2014)	(Brian-Jaisson et al., 2014)	(Grasland et al., 2003)

II.1.1.2. Milieux de culture

Tous les milieux de culture, mais aussi le matériel et les solutions sont stérilisés par autoclavage (Systec, 5050 MLV) avant toute utilisation. En fonction de la nature des produits à autoclaver, deux cycles sont utilisés :

- ✓ Un cycle de 7 min à 134°C à une pression de 1 bar pour la verrerie et les plastiques,
- ✓ Un cycle de 20 min à 120°C à une pression de 1 bar destiné aux solutions et aux milieux liquides.

II.1.1.2.1. Väätänen Nine Salts Solution (VNSS)

La majorité des cultures planctoniques réalisées dans le cadre de cette thèse l'ont été dans le milieu VNSS liquide. Ce milieu est traditionnellement considéré comme pauvre par rapport à d'autres milieux de culture couramment utilisés pour la culture de bactéries marines (ex. : ZoBell). Dans cette étude, par comparaison avec l'eau de mer artificielle (*Artificial Sea Water* ASW), il sera néanmoins considéré comme un milieu riche. Ce sera également le cas du milieu MB (*Marine Broth*) présenté dans le paragraphe suivant. Le VNSS est entièrement préparé au laboratoire et sa composition est détaillée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Composition chimique du milieu de culture VNSS

Produit	Concentration (g/L)
NaCl	17,60
Na₂SO₄	1,47
MgCl₂, 6 H₂O	1,87
Peptone	1,00
Amidon soluble	0,50
Extrait de levure	0,50
Glucose	0,50
CaCl₂, 2 H₂O	0,41
KCl	0,25
NaHCO₃	0,08
KBr	0,04
FeSO₄, 7 H₂O	0,01
H₃BO₃	0,01
Na₂HPO₄	0,01
SrCl₂, 6 H₂O	0,01

Pour préparer le VNSS agar, une base de VNSS liquide est utilisée. 1,5% d'agar bactériologique est alors ajouté puis solubilisé dans la solution de VNSS grâce à un chauffage à ébullition. Après autoclavage, le VNSS agar tiède (température ambiante) est coulé dans des boîtes de Pétri (polystyrène, Ø 90 mm,

Gosselin, Hazebrouck, France) à raison de 20 mL par boîte. Les boîtes sont ensuite stockés à une température de 4°C jusqu'à utilisation.

II.1.1.2.2. Marine Broth (MB)

Le milieu MB (Becton, Dickson and Company, Le Pont de Claix, France) est également un milieu spécifique pour la croissance des bactéries marines. Il a été utilisé ponctuellement au cours de cette étude. Contrairement au VNSS, sa préparation consiste uniquement à la solubilisation de 36g d'un mélange commercial dans 1L d'eau distillée. Il est nécessaire, pour obtenir une bonne solubilisation, d'amener le mélange à ébullition lors de la préparation de ce milieu. La composition du milieu MB est détaillée dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Composition chimique du milieu de culture MB

Produit	Concentration (g/L)
NaCl	19,45
MgCl ₂	5,90
Peptone	5,00
Na ₂ SO ₄	3,24
CaCl ₂	1,80
Extrait de levure	1,00
KCl	0,55
NaHCO ₃	0,16
C ₆ H ₅ FeO ₇	0,10
KBr	0,08
SrCl ₂	0,034
H ₃ BO ₃	0,022
Na ₂ HPO ₄	0,008
Na ₂ SiO ₃	0,004
NaF	0,0024
(NH ₄)NO ₃	0,0016

II.1.1.2.3. Artificial Sea Water (ASW)

Dans cette étude, ce « milieu » au contraire du VNSS et du MB est considéré comme étant pauvre. Il ne contient pas de sources de carbone mais uniquement des sels. La préparation de l'ASW consiste en la solubilisation d'un mélange commercial (*Sea Salts*, Sigma Aldrich, St Quentin, France) à une concentration de 36 g/L. Le mélange doit être amené à ébullition pour une bonne solubilisation. Sa composition est décrite dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Composition chimique de l'ASW

Produit	Concentration (g/L)
Cl	19,29
Na	10,78
SO ₄	2,66
Mg	1,32
K	0,42
Ca	0,40
HCO ₃	0,20
Br	0,056
Sr	0,0088
B	0,0056
F	0,001
Eléments traces	0,0005
Li	0,0003
I	0,00024

II.1.1.2.4. Ajout de cuivre dans les cultures

L'ajout de cuivre dans les cultures à différentes concentrations est réalisé à partir d'une solution-mère de sulfate de cuivre (CuSO₄, 5 H₂O, 242,68 g.mol⁻¹) (Sigma Aldrich) à 1M dans du VNSS. Quand plusieurs concentrations sont nécessaires pour la même expérience, les dilutions sont effectuées en cascade.

II.1.1.3. Méthodes de culture

II.1.1.3.1. Conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées sont conservées dans un congélateur à -80°C. Elles sont stockées dans des cryotubes contenant 50 % de liquide cryoprotecteur (glycérol).

II.1.1.3.2. Conditions de culture

Pour effectuer les cultures bactériennes, les souches sont récupérées à partir des cryotubes de stockage puis étalées sur milieu VNSS gélosé conditionné dans des boîtes de Pétri avant d'être incubées à 20°C. Chaque culture est conservée au maximum deux semaines sur milieu VNSS gélosé.

Des pré-cultures bactériennes sont ensuite réalisées dans des flacons en verre de 50 mL à partir des colonies collectées sur la boîte gélosée avec un cône stérile. L'immersion du cône dans un volume de 10 mL de VNSS permet la mise en suspension des bactéries de la colonie. Elles sont alors incubées

toute la nuit dans un incubateur (EXCELLA-e24r, Eppendorf, Montesson, France) thermostaté à 20°C sous agitation (120 rpm) afin de démarrer les cultures 24h après.

Cultures en mode planctonique :

Le volume des cultures effectuées dans cette étude est dans la plupart des cas de 50 mL dans un erlenmeyer de 250 mL. L'inoculation du milieu de culture est réalisée de manière à avoir une absorbance initiale à 600 nm de 0,1. Les absorbances sont mesurées grâce à un spectrophotomètre (Thermofisher Scientific-genesys 20 model 4001/4). Les cultures sont ensuite incubées à 20°C sous agitation (120 rpm) jusqu'à atteindre la phase de croissance désirée.

Cultures en mode biofilm :

Avant la mise en culture en biofilm, une étape de culture en mode planctonique est réalisée à partir de la pré-culture jusqu'au stade de croissance désiré. Pour cela, les bactéries issues d'une pré-culture sontensemencées dans 10 mL de milieu de façon à avoir une absorbance de 0,1 à 600 nm. Après incubation à 20°C sous agitation, le temps d'atteindre la fin de la phase exponentielle, les bactéries sontensemencées dans un volume de 10 mL de milieu dans une boîte de Pétri ($DO_{600} = 0,1$). La croissance en biofilm s'effectue alors pendant la durée souhaitée (24 ou 48h) à 20°C sans agitation.

II.1.1.3.3. Caractéristique de croissance des souches bactériennes

Chaque souche bactérienne possède sa propre courbe de croissance. Les caractéristiques de croissance de chaque souche ont été déterminées lors de précédents travaux (Brian-Jaisson, 2014). La croissance de chaque souche bactérienne a cependant été de nouveau suivie et ainsi contrôlée lors de chaque expérimentation (mesure de l'absorbance du milieu à 600 nm en fonction du temps). Les courbes de croissance des cinq bactéries marines sont présentées dans la Figure 14.

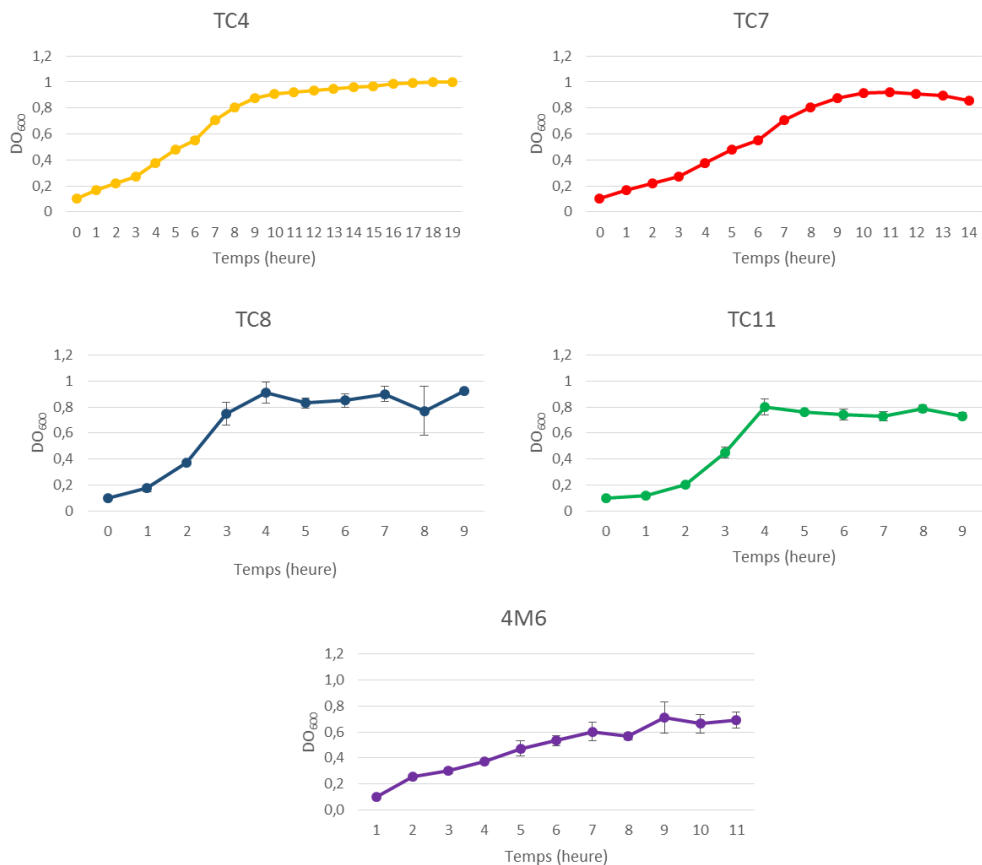


Figure 14 : Courbe de croissance en fonction du temps des 5 bactéries de références sélectionnées pour cette étude

II.1.1.4. Protocoles de cultures pour la mesure de métaux traces

Certaines des analyses effectuées au cours de ces travaux de thèse l'ont été en présence de très faibles quantités de métaux (« métaux traces »), puisque des concentrations en cuivre inférieures à 1000 nM ont été utilisées. Dans de telles conditions d'expérimentation, des exigences particulières sont à respecter pour éviter toute contamination.

Aussi afin d'éviter la complexation du cuivre avec les surfaces des contenants, les cultures bactériennes ne sont plus réalisées dans du flaconnage en verre mais dans des récipients en Téflon. La première utilisation des flacons dans de telles conditions nécessite un protocole de rinçage particulier. Ils sont ainsi rincés deux fois à l'eau milli-Q (volume d'environ 20% de celui du flacon) avec une forte agitation, puis les flacons sont remplis à 10 ou 20% de leur volume avec de l'acide nitrique pur (Pro Analysis) et agités pendant 24h. Ils sont finalement rincés trois fois à l'eau milli-Q et ainsi prêts pour leur première utilisation.

Pour les utilisations suivantes, une fois l'analyse terminée, les flacons sont vidés et rincés deux fois à l'eau milli-Q, puis remplis avec de l'acide nitrique à 10% (v/v) et agités pendant 24h. Pour une utilisation immédiate, les flacons sont rincés 3 fois à l'eau milli-Q et autoclavés en étant remplis d'eau milli-Q (afin d'éviter qu'ils ne se déforment). Pour un stockage supérieur à 7j, les flacons sont remplis d'eau milli-Q avec 0,2% d'acide nitrique de qualité *Trace Metal Grade*. Ils seront rincés trois fois à l'eau milli-Q avant utilisation.

II.1.2. Prélèvement d'échantillons de biofilms formés *in situ*

Dans le cadre du projet PREVENT et du projet DRACONS des biofilms formés *in situ* ont été prélevés dans diverses conditions. Le design expérimental de ces deux études est présenté dans le chapitre 3. Seule la méthode de prélèvement de ces biofilms est présentée ici.

Pour chacune des expérimentations, le prélèvement est effectué sur place. Le prélèvement est effectué immédiatement après que les plaques soient sorties de l'eau. Chaque plaque est rincée avec de l'ASW afin d'enlever tout organisme planctonique. La surface est ensuite grattée à l'aide d'un scalpel et le matériel biologique est directement mis dans un flacon en verre contenant de l'AcOEt froid. La lame de scalpel est retirée de son support à l'aide d'une pince puis mise également dans le flacon. La lame est ainsi changée pour chaque échantillon prélevé. Les gants ainsi que la solution d'ASW de nettoyage sont changés entre chaque triplicat d'un même revêtement. Les échantillons sont stockés au froid (+4°C) dès la fin de leur traitement puis ils sont transportés au laboratoire pour la finalisation de l'extraction du métabolome.

II.1.3. Extraction du métabolome bactérien à partir de cultures

Les différentes étapes du protocole suivi sont indiquées dans la Figure 15. Avant tout traitement, la densité optique des cultures en mode planctonique est vérifiée. Les cultures en biofilm sont quant à elles grattées de leurs supports grâce à un râteau en polystyrène. Ainsi, les cultures bactériennes ayant atteint la phase de croissance ou le temps de maturation du biofilm souhaité(e), sont soumises à un traitement physique [bain à ultrasons (Branson 2510MT, Sigma-Aldrich, Lyon) pendant 30 min] et chimique (ajout de solvant) qui conduit au « *quenching* » et à la lyse des cellules. Le métabolome des bactéries est ensuite obtenu grâce à une extraction liquide/liquide dans une ampoule à décanter à l'issue de laquelle la phase organique est conservée. L'endo- et l'exo-métabolome contenus dans cette phase sont ainsi extraits sans distinction. La phase organique obtenue est alors concentrée sous pression réduite grâce à un évaporateur rotatif ($T < 35^{\circ}\text{C}$). L'extrait sec est repris dans quelques

millilitres de MeOH puis il est transféré dans un tube à hémolyse pré-pesé. L'échantillon est de nouveau séché sous air comprimé dans un bain sec et stocké à 4°C jusqu'à son analyse.

Plusieurs solvants d'extraction, AcOEt, MeOH et un mélange MeOH/DCM (1 :1 ; v/v) ont été testés. Pour chaque test, deux volumes de solvant ont été ajoutés à un volume de culture. Par la suite, seul l'AcOEt sera utilisé comme solvant d'extraction, les résultats préliminaires obtenus ayant conduit à la sélection de ce dernier.

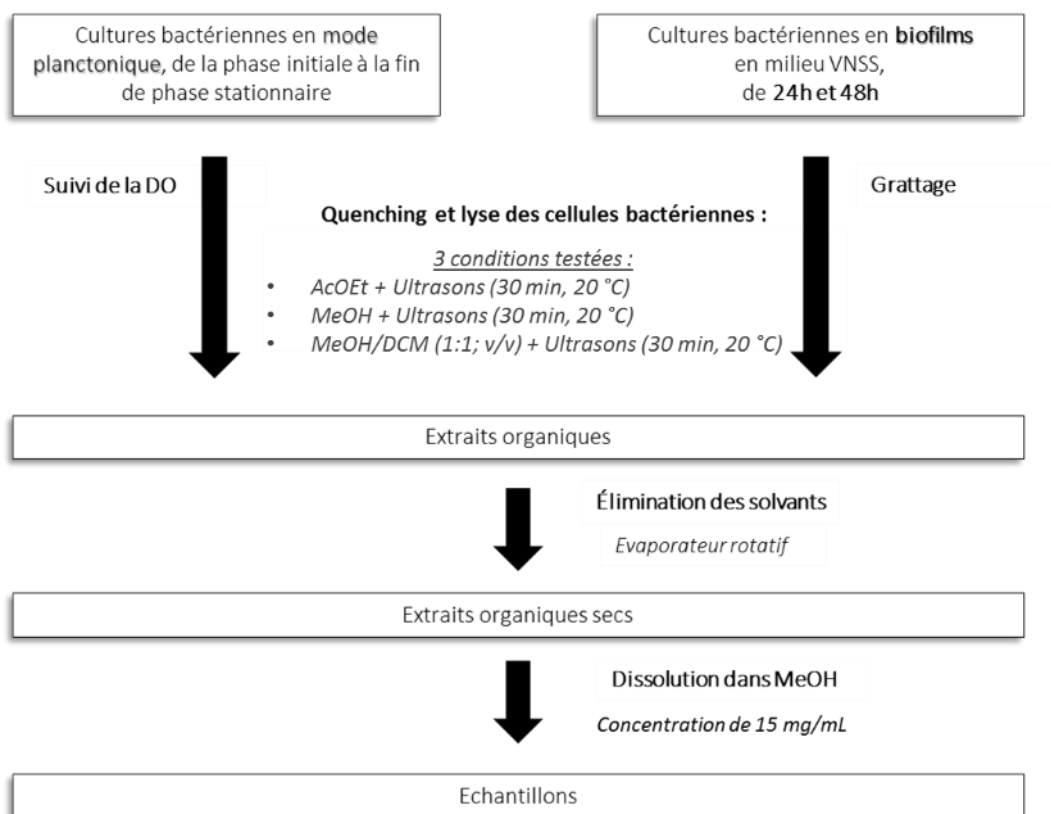


Figure 15 : Schéma résumant les différentes étapes du protocole d'extraction du métabolome à partir de cultures de bactéries marines

II.1.4. Analyse de métabolome bactérien

II.1.4.1. Plateformes analytiques

Les échantillons destinés à des analyses métabolomiques sont conditionnés dans des vials. Deux plateformes analytiques ont été utilisées pour mener à bien les analyses du métabolome des bactéries sélectionnées :

- ✓ 1 système HPLC couplé à un spectromètre de masse à basse-résolution (trappe à ions) : HPLC-ESI-IT-MS

- ✓ 1 système UPLC couplé à un QToF : UPLC-ESI-QToF-MS

II.1.4.1.1. HPLC-ESI-IT-MS

Système chromatographique :

Le système chromatographique utilisé (Elite Lachrom, VWR-Hitachi) est équipé d'une pompe quaternaire L-2130, d'un dégazeur en ligne, d'un injecteur automatique L-2200 avec système d'injection à volume variable (volume d'injection choisi : 5 μ L) et d'un four à colonne (L2300). La température du four est fixée à 30°C et le débit de la phase mobile est de 0,5 mL/min. Les profils chromatographiques sont réalisées sur une colonne analytique à phase inverse de type *core-shell* (Phenomenex ; Kinetex Phenyl-Hexyl ; 2,6 μ m ; 100 \times 3 mm) précédée d'une pré-colonne (Phenomenex ; AJ0-8781). La phase mobile est constituée de mélanges d'eau acidifiée avec 0,1% d'acide formique et d'acétonitrile (ACN) avec 0,1% d'acide formique. L'élution est réalisée en mode gradient sur une durée totale d'analyse de 30 min. Le gradient utilisé est le suivant : (i) palier isocratique initial de 5 min avec 20 % d'ACN, (ii) gradient linéaire allant de 20 à 100% d'ACN en 10 min, (iii) palier isocratique de 10 min avec 100% d'ACN, (iv) retour aux conditions initiales en 0,1 min et équilibrage de la colonne pendant 4,9 min.

Systèmes de détection :

La chaîne d'analyse est équipée de 3 détecteurs :

- ✓ Un détecteur UV-Visible à barrettes de photodiodes (VWR-Hitachi, L-2455). Le domaine spectral étudié est fixé de 190 à 700 nm.
- ✓ Un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL ; Eurosep, Chromachem). Les paramètres de nébulisation et d'évaporation ont été optimisés et fixés respectivement à 35°C et 45°C. La pression du gaz de séchage (N₂) est fixée à 1,5 bars.
- ✓ Un spectromètre de masse (Bruker, Esquire 6000) à ionisation par électronébulisation (ESI) et équipé d'une trappe d'ions (IT). Les conditions d'ionisation utilisées sont les suivantes : température de séchage, 350°C ; tension du capillaire, 4000 V ; pression du nébuliseur, 3,45 bars ; gaz de séchage, hélium à un débit de 12 L/min, et trappe d'ions en mode *Full scan* balayant de m/z 50 à 1200. Le spectromètre de masse est contrôlé à l'aide du logiciel Esquire control version 6.1 (Bruker).

II.1.4.1.2. UPLC-ESI-QToF-MS

Système chromatographique :

Le système chromatographique de cet appareil est équipé d'une pompe RS, d'un injecteur automatique réfrigéré, d'un compartiment thermostaté pour la colonne ainsi qu'un réseau de diodes UV (modèle Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation, Thermo Fisher Scientific). Le volume d'injection est fixé à 5 μ L, la température du four de colonne à 40°C et le débit de la phase mobile à 0,5 mL/min. Les séparations sont réalisées sur une colonne analytique de type *core-shell* (Phenomenex ; Kinetex Phenyl-Hexyl ; 1,7 μ m ; 150 \times 2,1 mm) précédée d'une pré-colonne (Phenomenex ; Phenyl sub 2 μ m). La phase mobile est constituée d'H₂O et d'ACN acidifiés à 0,1% en acide formique. Le gradient d'éluion est le suivant : (i) palier isocratique de 1 min avec 20% d'ACN, (ii) gradient linéaire allant de 20 à 100% d'ACN en 7 min, (iii) palier isocratique de 4 min à 100% ACN, (iv) retour aux conditions initiales en 0,1 min et équilibrage de la colonne durant 1,9 min.

Système de détection :

Le système de détection est un spectromètre de masse (Bruker Daltonics, Impact II) à ionisation par électronébulisation (ESI) équipé d'un quadripôle à temps de vol (QToF). Le voltage du capillaire est fixé à 4500 V en mode positif ou négatif. Les paramètres de nébulisation sont les suivants : pression du gaz de nébulisation, 0,4 bar ; débit de gaz de séchage (N₂), 4,0 L/min ; température de séchage, 180°C. Les spectres de masse sont obtenus en mode *profile* en *full scan* de *m/z* 50 à 1500. Le spectromètre de masse est contrôlé par le logiciel Bruker Compass (version 4.0.17.1840).

Avant chaque série d'analyses, le spectromètre de masse est calibré grâce à l'injection d'une solution standard d'acétate formiate. Cette solution contient un certain nombre d'ions avec une gamme de *m/z* connus allant de 90 à 900. Cette solution est également injectée avant chaque analyse afin de permettre une re-calibration de chaque spectre de masse individuellement au sein de chaque analyse.

II.1.4.2. Séquence d'injection

La séquence d'injection en métabolomique est particulière et doit être rigoureuse pour permettre un traitement correct des données par la suite.

Les premières injections sont toujours réalisées avec du méthanol seul afin de s'assurer de la propreté de la colonne ou, si ce n'est pas le cas, d'appliquer une procédure de nettoyage. Pour équilibrer le

système, un même échantillon appelé « *pool* d'équilibrage » est injecté ensuite 8 à 10 fois successivement. Il s'agit d'un mélange constitué d'un volume égal de tous les échantillons. Ce même mélange sera ensuite injecté tous les quatre échantillons analysés afin de pouvoir vérifier la dérive analytique au cours de la séquence d'injections ou, dans le cas contraire, d'être en mesure de la corriger. Les échantillons sont injectés de manière aléatoire au sein de la séquence d'injection. Des « blancs d'extraction », c'est-à-dire des échantillons issus de l'extraction de milieux de culture seuls (sans cellules bactériennes), sont injectés au même titre qu'un échantillon d'intérêt.

II.1.5. Extraction des données

L'acquisition des données est réalisée grâce au logiciel DataAnalysis (v 4.3). Suite à une analyse, un script développé sous DataAnalysis permet de re-calibrer tous les chromatogrammes et de générer le fichier « .cdf » nécessaire au traitement des données. En effet, les données brutes sont extraites grâce au logiciel XCMS exigeant ce format. Les fichiers sont alors classés selon leur nature : échantillon, pool ou blanc. Les données sont ensuite extraites avec XCMS, comme décrits dans le chapitre 1, en utilisant différents paramètres en fonction de la plateforme analytique sur laquelle les acquisitions ont été effectuées. Ces différents paramètres sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres utilisés lors de l'extraction des données LC-MS brutes avec XCMS sous R

Paramètres	HPLC-MS (IT)	UPLC-MS (Q-ToF)
method	matchedFilter	centWave
ppm	-	15
peakwidth	-	c(5,20)
snthresh	5	5
profstep	0,1	0,1
bw	30	2
mzwid	0,5	0,015

Le fichier obtenu correspond à une matrice à deux dimensions décrivant l'intensité de chaque variable (une variable correspondant à un couple m/z et temps de rétention) dans chaque échantillon. Ce fichier contient de nombreuses informations (environ 2 000 variables pour une analyse en IT et 30 000 en Q-ToF). Pour le traitement des données, il est nécessaire de trier ces informations afin de ne garder que ce qui est pertinent et informatif.

II.1.6. Pré-traitements et filtrations

L'objectif des différentes étapes de filtration après l'extraction des données par XCMS est d'éliminer toutes les variables qui ne sont pas d'origine bactérienne, celles dont la variabilité n'est pas biologique

mais analytique et enfin celles qui sont redondantes. Trois filtrations sont ainsi successivement appliquées.

II.1.6.1. Filtration en fonction du rapport signal sur bruit

Cette filtration permet d'éliminer toutes les variables détectées qui ne proviennent pas des souches bactériennes et qui viennent donc essentiellement du milieu de culture ou du protocole analytique. Elle s'appuie sur la valeur du rapport signal sur bruit. Le signal correspond pour une variable à la moyenne de son intensité dans les *pools* et les échantillons, et le bruit pour la même variable correspond à la moyenne de son intensité dans les blancs. Un rapport de 1 par exemple signifie que l'intensité moyenne d'une variable observée dans les *pools* et les échantillons est la même que celle observée dans les blancs. C'est donc une variable qui ne provient pas des souches bactériennes et qui peut être supprimée. Il sera considéré qu'un métabolite n'aura pas de bruit de fond lorsque son intensité moyenne dans les *pools* et les échantillons sera au moins 10 fois supérieure à celle observée dans les blancs. Le rapport signal sur bruit doit donc être supérieur ou égal à 10.

II.1.6.2. Filtration en fonction du coefficient de variation

Cette filtration a pour but d'éliminer les signaux dont les fluctuations sont dues à la variabilité analytique de la plateforme analytique et non à la variabilité biologique des échantillons. Il s'agit d'une filtration qui se base sur les *pools* qui sont injectés de manière régulière tout au long de la séquence analytique. Le coefficient de variation de chaque variable au cours de l'analyse est ainsi calculé et la mesure d'intensité est considérée comme fiable pour un métabolite si ce coefficient est inférieur à 20%.

II.1.6.3. Filtration en fonction du coefficient de corrélation

Cette troisième filtration est utilisée afin de supprimer des variables qui seraient redondantes dans le fichier de données. Elle ne concerne donc que les échantillons. Ainsi, des variables ayant le même temps de rétention avec deux rapports m/z différents pourraient correspondre à deux ions d'un même métabolite. Pour vérifier que ces deux variables correspondent bien à deux métabolites différents, un coefficient de corrélation est calculé entre les deux variables. Pour un même temps de rétention, deux variables ayant une corrélation de plus de 80% seront considérées comme correspondant au même métabolite et donc apportant la même information. La filtration va permettre de supprimer la variable qui possèdera l'intensité moyenne la plus faible des deux.

II.1.7. Analyses statistiques multivariées

Une fois la matrice de données filtrée, celle-ci est traitée via des analyses statistiques multivariées. Les différents modèles statistiques sont générés grâce au logiciel Simca 13.0.3 (Umetrics). Les données sont au préalable transformées en $\log_{10}(1+x)$ et sont moyennées et centrées grâce à une mise à l'échelle Pareto. Des analyses en composantes principales, des analyses discriminantes PLS ou encore des analyses discriminantes orthogonales PLS sont ensuite effectuées.

Certains critères sont observés afin de valider la robustesse des modèles discriminants PLS. La performance descriptive du modèle est ainsi validée grâce à la valeur de la variance calculée cumulée [R^2 (cum)] de X et Y. Ainsi, dans un modèle parfait, les valeurs de R^2X (cum) et de R^2Y (cum) sont égales à 1. Des valeurs supérieures à 0,5 sont néanmoins acceptées. La performance prédictive du modèle est quant à elle validée par la valeur de la variance prédite cumulée [Q^2 (cum)]. Dans un modèle parfait, la valeur de Q^2 (cum) est égale à 1 mais des valeurs supérieures à 0,5 sont couramment acceptées.

Pour garantir la validité des modèles et certifier qu'ils ne sont pas dus au hasard, deux tests sont appliqués : le test de validation croisée (ANOVA) et un test de permutation. Le principe de ces deux tests a été expliqué dans le chapitre 1.

Un modèle est considéré comme parfait lorsque le p du test de validation croisée ANOVA est égal à 0, mais il est cependant validé pour des valeurs de p inférieures à 0,05.

Le R^2 et le Q^2 du modèle généré suite au test de permutation doivent être éloignés l'un de l'autre et très inférieurs aux R^2 et Q^2 du modèle original.

A partir de ces modèles, les VIP (en anglais *Variable Influence on Projection*), soient les variables contribuant le plus à la construction du modèle, sont déterminés. Pour chaque variable, la valeur du VIP est un paramètre qui résume l'importance de la variable dans l'explication de la variance dans chaque dimension du modèle. Plus la valeur du VIP est importante, plus son rôle explicatif de la variance est important. Les VIP dont la valeur est supérieure à 1 sont souvent considérées comme pertinents.

II.1.8. Identification des métabolites

Les métabolites d'intérêt repérés grâce aux modèles statistiques sont ensuite identifiés à partir des chromatogrammes et des spectres de masse (MS et MS/MS) obtenus à partir de la plateforme UPLC-ESI-QToF-MS exploités sous le logiciel DataAnalysis (v 4.3).

Les EIC (en anglais *Extracted Ion Chromatogram*) sont générés pour les ions d'intérêt. Pour un ion donné, le pic chromatographique correspondant est intégré et le spectre de masse global est ainsi généré. Une première identification de la formule brute est alors possible grâce à l'outil « SmartFormula Manually ». Une liste de formules brutes possibles est générée grâce à la masse de l'ion à identifier mais aussi par simulation de son profil isotopique. La précision de mesure en masse ainsi que la correspondance du profil isotopique sont mesurées grâce à deux paramètres : l'erreur de masse en ppm « *Erppm* » et le sigmait « *mSigma* », respectivement. Ainsi, une formule brute est considérée comme probable quand $Erppm < 5$ et $mSigma < 5$.

Pour obtenir une précision plus importante, le spectre MS/MS de l'ion concerné est également analysé grâce à l'outil « SmartFormula 3D ». En plus des deux paramètres décrits précédemment, cet outil donne le pourcentage de fragments du spectre MS/MS expliqué par la formule brute proposée par le biais du paramètre « *lexpl* ». Ces différents paramètres permettent de sélectionner de façon rigoureuse la formule brute la plus pertinente pour un ion donné.

Afin d'identifier la formule développée du métabolite d'intérêt, les pics du spectre MS et du spectre MS/MS sont analysés sur des plateformes telles que Metfrag, Metfusion ou encore CSI: FingerID. En fonction des données issues des spectres de masse et de fragmentation, ces banques spectrales recherchent les composés les pertinents. Plusieurs candidats peuvent être sélectionnés. Quand les standards de ces molécules sont disponibles, ils sont achetés puis injectés dans les mêmes conditions que les échantillons analysés. Le temps de rétention et les données de spectrométrie de masse obtenus sur la même plateforme analytique permettent de confirmer ou non l'identité de la molécule.

II.1.9. Réseaux moléculaires

L'approche bio-informatique des « réseaux moléculaires » a été développée récemment par un laboratoire de l'Université de San Diego - Californie. Le développement d'un réseau moléculaire permet d'organiser et de visualiser les données MS/MS sous une forme de « carte » de similarité spectrale. Cela permet de mettre en évidence des groupes de molécules ayant des ressemblances spectrales et d'évaluer leur degré de similarité.

Les réseaux moléculaires sont générés sur la plateforme internet GNPS (<http://gnps.uscd.edu>). Les données brutes (spectres MS/MS) sont au préalable converties au format « .mzXML » avec le logiciel DataAnalysis et téléchargées vers GNPS à l'aide d'un client FTP (logiciel Filezilla). Les spectres sont traités de façon à éliminer les ions situés dans un intervalle de +/-17 autour du rapport m/z précurseur.

Afin de créer un spectre consensus, les données sont ensuite simplifiées en utilisant l'outil « *MS-Cluster* » avec une tolérance de 1 Da pour l'ion précurseur. Les spectres consensus créés contenant moins de deux spectres ont été éliminés. Les résultats sont ensuite comparés aux spectres de la bande spectrale GNPS. Les réseaux moléculaires obtenus peuvent être visualisés directement en ligne et importés pour être visualisés avec le logiciel Cytoscape (version 3.4.0). Les spectres MS/MS ayant une forte similarité spectrale [Cosine Score (CS) > 0,65] sont représentés sous forme de perles (*Node* en anglais). Les liens entre les perles n'apparaissent qu'à partir du moment où le score CS est supérieur à 0,65 et qu'au moins quatre ions communs sont détectés. L'épaisseur des connections entre les perles est proportionnelle à la valeur du CS.

II.2. Effets du cuivre sur des bactéries marines cultivées *in vitro*

I.2.1. Effet du cuivre sur les bactéries cultivées en mode planctonique

Le principe du test est de mettre en contact des bactéries-cibles avec du cuivre afin d'évaluer l'effet de ce biocide sur leur croissance en mode planctonique. Afin de tester plusieurs concentrations simultanément, les cultures ne sont pas réalisées dans des flacons en verre comme décrit dans le paragraphe II.1.1.3.2 mais dans des microplaques transparentes 96 puits en polystyrène à fond plat (Greiner-Bio One Cellstar, Fisher scientific, Illkirch, France). Les solutions de cuivre utilisées sont solubilisées dans le milieu de culture choisi pour le test, à une concentration de 2M. Cette solution est filtrée sur un filtre seringue (2 μm) pour assurer sa stérilité. Les solutions avec des plus faibles concentrations en cuivre sont ensuite obtenues grâce à des dilutions en cascade.

La microplaque estensemencée par des bactéries en phase exponentielle de croissance ($\text{DO}_{600} = 0,1$) selon un schéma particulier représenté dans la Figure 16. De manière générale, aucune bactérie n'est inoculée dans les puits positionnés sur les bords de la plaque qui sont réservés aux différents blancs. Ainsi les colonnes 1 et 12 contiennent uniquement du milieu de culture (200 μL) et constituent les « blancs milieux » de la plaque. L'effet du cuivre est testé à 8 ou 16 concentrations par plaque sur une ou deux souches bactériennes (selon le nombre de concentrations testées) en triplicats. Le cuivre est introduit dans les puits des colonnes 2 à 5 et 8 à 11 avec les bactéries (100 μL de solution de cuivre + 100 μL d'inoculum bactérien). La première et la dernière ligne (A et H) correspondent aux « blancs biocides » (100 μL de solution de cuivre à la concentration présente dans les puits du dessous ou du dessus + 100 μL de milieu sans bactérie). Le but de ces blancs est de soustraire leur absorbance (liée à la présence de cuivre) à l'absorbance mesurée dans les puits de test de croissance bactérienne (bactéries en présence de cuivre). Les 6^{ème} et 7^{ème} colonnes contiennent les suspensions bactériennes

sans cuivre (100 μ L d'inoculum bactérien + 100 μ L de milieu). Ce témoin, en 6 répliquats, servira de référence de croissance bactérienne pour toute la plaque.

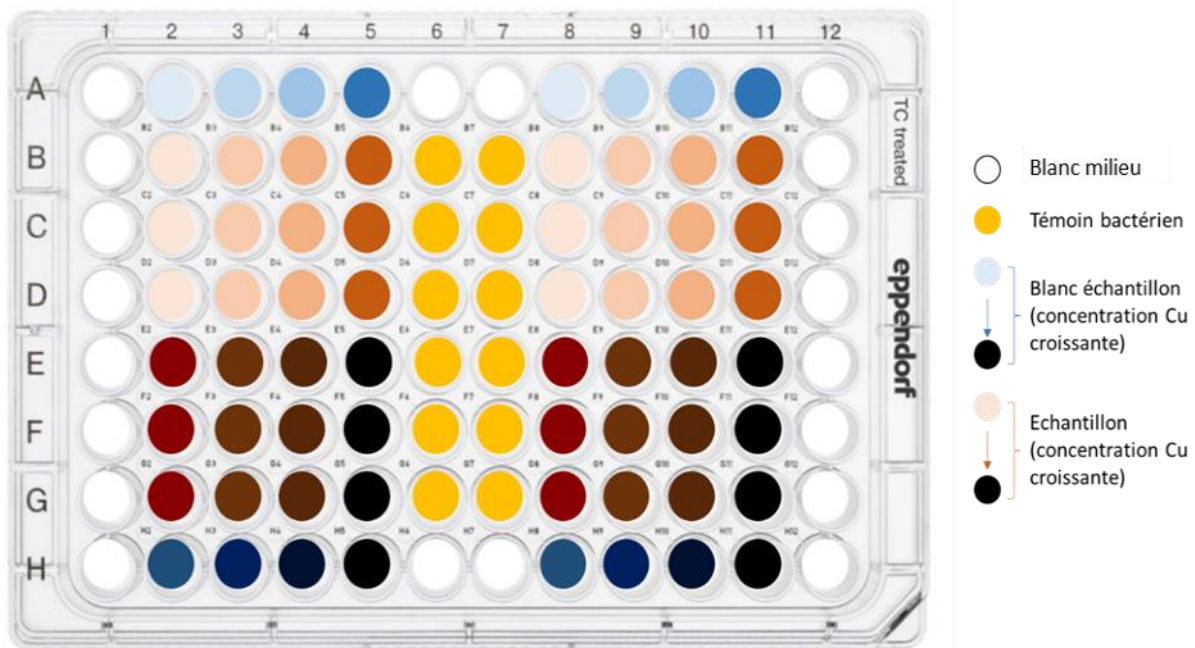


Figure 16 : Schéma d'ensemencement des microplaques pour le test d'inhibition de la croissance des bactéries marines cultivées en mode planctonique

Une fois l'ensemencement de la plaque terminé, une première mesure de la turbidité à 600 nm est effectuée grâce à un lecteur de microplaques (Infini M200 pro, TECAN). La microplaque est ensuite incubée à 20°C sous une agitation de 120 rpm. Le suivi de la croissance, et donc de la turbidité, est effectué toutes les heures jusqu'à ce que la souche testée atteigne le début de la phase stationnaire. Le taux de croissance μ (h^{-1}) est alors calculé à toutes les concentrations testées à partir de l'équation suivante :

$$\mu = [\ln (N/N_0)] / t$$

N = Nombre de bactéries au temps t, N_0 = Nombre de bactéries au temps t_0 , μ = Taux de croissance.

Puis le pourcentage d'inhibition de la croissance est calculé avec la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \mu_i - \mu_0 / \mu_0 \times 100$$

μ_0 = Taux de croissance en l'absence de cuivre, μ_i = Taux de croissance pour une concentration donnée de cuivre

Les données obtenues permettront de tracer une courbe sigmoïde dose-réponse [% d'inhibition de croissance = $f(\text{Log } C_i)$] (avec C_i la concentration de cuivre) et ainsi de déterminer la concentration en cuivre qui inhibe 50% de la croissance bactérienne (CI_{50}).

II.2.2. Effet du cuivre sur la viabilité cellulaire

II.2.2.1. Test à la résazurine

Ce test permet de déterminer la viabilité des cellules présentes dans les cultures bactériennes. Il est effectué à la suite du test d'inhibition de croissance. La résazurine (Sigma Aldrich, St Quentin, France) est un indicateur d'oxydo-réduction. Sous sa forme réduite, elle est de couleur bleue et non fluorescente. Les enzymes de la chaîne respiratoire bactérienne l'oxydent en résorufine de couleur rose et pouvant être quantifiée du fait de sa fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 575 nm et une longueur d'onde d'émission de 585 nm.

Ainsi, quand les bactéries ont atteint la phase stationnaire de croissance dans la microplaque, 50 μL de résazurine à 20 μM (diluée dans de l'ASW) sont introduits dans chaque puits. La plaque est incubée pendant 2h à l'obscurité et la fluorescence est ensuite mesurée à l'aide du lecteur de microplaques.

Le pourcentage de cellules viables est calculé grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ cellules viables} = (IF_T - IF_{Pdt}) / (IF_{TB} - IF_{Blc}) \times 100$$

IF_T : Moyenne des valeurs de fluorescence des triplicats de croissance pour chacune des concentrations de cuivre testées (cuivre + bactéries + fluorochrome), IF_{Pdt} : Valeur de fluorescence de la solution de cuivre en présence du fluorochrome (cuivre sans les bactéries + fluorochrome), IF_{TB} : Moyenne des valeurs de fluorescence des six réplicats des témoins de la viabilité bactérienne (bactéries + fluorochrome), IF_{Blc} : Moyenne des valeurs de fluorescence de l'ensemble des « blancs milieux » (milieu + fluorochrome).

Ces données permettent de tracer la courbe sigmoïde dose-réponse [% de viabilité = $f(\text{Log } C_i)$] (avec C_i la concentration en cuivre) et de déterminer la concentration létale pour 50% des bactéries (CL_{50}).

II.2.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de de la Concentration Minimale Létale ou Bactéricide (CML)

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Létale (CML) s'effectue grâce à un test prenant en compte le même schéma de microplaque que celui utilisé pour le test d'inhibition de l'adhésion. Les bactéries sont mises en contact avec une solution contenant du cuivre pendant 15h à 20°C sous agitation à 120 rpm. La lecture de la DO_{600} est effectuée avant et après incubation grâce au lecteur de microplaques. Les puits dans lesquels une croissance bactérienne est observée ne sont pas considérés ; la concentration en cuivre présente n'a pas inhibé la croissance et les bactéries ne sont donc pas mortes. Les puits dans lesquels une absence de croissance est observée sont concernés par la suite du test. 20 μ L de chacun de ces puits sont transférés dans 200 μ L de milieu frais dans une nouvelle microplaque et mis à incuber jusqu'en fin de phase stationnaire (dans les conditions normales). Une lecture de la microplaque est alors réalisée. Les puits où une croissance est observée contiennent des bactéries qui étaient inhibées par la présence de cuivre mais qui ne sont pas mortes. La plus petite des concentrations où ce phénomène est observé est la CMI. Les puits pour lesquels aucune croissance n'est observée sont soumis à un dernier test. 20 μ L du puit sont prélevés et étalés sur une boîte gélosée. Ces boîtes sont incubées à 20°C pendant 48h. Celles sur lesquelles aucune colonie n'est observée correspondent aux puits dans lesquels la concentration en cuivre a été létale pour les bactéries. La plus petite concentration à laquelle ce phénomène est observé correspond à la CML.

II.2.3. Effet du cuivre sur l'adhésion bactérienne

Le protocole de ce test a été développé au laboratoire (Camps et al., 2011). Son principe est de mettre en contact les bactéries avec le biocide à tester (ici le cuivre) à différentes concentrations et d'évaluer la capacité de ce composé à inhiber l'adhésion des bactéries au polystyrène de la microplaque.

A partir d'une pré-culture réalisée pendant une nuit dans du VNSS, une culture est réalisée dans un flacon en verre jusqu'en début de phase stationnaire (phase où l'adhésion est souvent maximale). La culture bactérienne est alors centrifugée à 6 000 rpm pendant 10 min. Le milieu de culture est ainsi éliminé puis remplacé par un volume d'ASW permettant d'obtenir une DO_{600} de 0,6. Le choix de ce milieu pauvre vient du fait qu'il possède une composition en sels très proche de celle de l'eau de mer naturelle. Les bactéries marines y sont maintenues en vie tout en favorisant leur adhésion car la croissance planctonique est inhibée du fait de l'absence de sources de carbone. Il faut noter que la

densité d'ensemencement de la microplaque est de 0,3 (dilution 1/2 dans le puits de la microplaque avec l'ajout de la solution de cuivre).

Le schéma d'ensemencement de la microplaque est alors similaire à celui utilisé pour le test d'inhibition de croissance en mode planctonique. Cependant, la microplaque utilisée dans ce test n'est pas transparente mais noire afin de pouvoir mesurer la fluorescence des fluorochromes qui seront utilisés. Les colonnes 1 et 12 contiennent ainsi 200 μL d'ASW constituant le « blanc ». Les colonnes 2 à 5 et 8 à 11 contiennent les bactéries ainsi que les solutions de cuivre aux différentes concentrations testées en triplicats (100 μL de solution de cuivre à concentration choisie + 100 μL d'inoculum bactérien). Les lignes A et H contiennent les « blancs d'échantillons » (100 μL de solution de cuivre choisie + 100 μL d'ASW). Ces puits permettront de vérifier l'absence de fluorescence du biocide utilisé ou, dans le cas où il y aurait une valeur de fluorescence, de corriger les valeurs des puits contenant cette dose de biocide. Les colonnes 6 et 7 contiennent quant à elles les témoins d'adhésion (100 μL d'inoculum bactérien + 100 μL d'ASW). Ces puits serviront de référence positive pour mesurer l'adhésion.

Une fois remplie, la microplaque est mise à incuber à 20°C sous une agitation de 120 rpm (afin d'éviter toute sédimentation). Après 15h d'incubation, la microplaque est retournée afin d'éliminer le surnageant et les bactéries non adhérentes. Trois lavages sont alors effectués à raison d'un ajout de 200 μL de NaCl à 36 g/L par puits et par lavage. Les bactéries adhérentes sont ensuite marquées à l'aide d'une solution de SYTO® RED 61 (Molecular Probes® Invitrogen) à 1 μM . La microplaque est mise à incuber 20 min à l'obscurité. L'excès de fluorochrome est ensuite éliminé par retournement puis par un lavage avec une solution NaCl à 36 g/L. La lecture de la fluorescence est effectuée grâce au lecteur de microplaques. Le SYTO® RED 61 fluoresce dans le rouge à une longueur d'onde d'excitation de 628 nm et une longueur d'onde d'émission de 645 nm. Le pourcentage de bactéries marquées grâce à ce fluorochrome permet de déterminer le pourcentage de bactéries adhérentes au fond de chaque puits.

De la même façon que pour déterminer le pourcentage de cellules viables, le pourcentage d'adhésion des bactéries dans chaque puits est calculé grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ adhesion} = (IF_T - IF_{\text{Pdt}}) / (IF_{\text{TB}} - IF_{\text{Blc}}) \times 100$$

IF_T : Moyenne des valeurs de fluorescence des triplicats pour chacune des concentrations de cuivre testées (cuivre + bactéries + fluorochrome), IF_{Pdt} : Valeur de fluorescence du cuivre seul en présence du fluorochrome (sans les bactéries), IF_{TB} : Moyenne des valeurs de fluorescence des 6 réplicats des

témoins de l'adhésion bactérienne (bactéries + fluorochrome), IF_{Bic} : Moyenne des valeurs de fluorescence de l'ensemble des « blancs milieux » (ASW + fluorochrome)

L'interprétation des résultats n'est valable que si l'adhésion bactérienne a bien eu lieu. Pour s'assurer que l'adhésion est suffisante, le ratio IF_T/IF_{Pdt} est calculé et sa valeur doit être supérieure à 2,5 (Camps et al., 2011).

II.3. Etude protéomique

II.3.1. Préparation des échantillons

II.3.1.1. Culture bactérienne

La bactérie *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 a été cultivée jusqu'en phase stationnaire en mode planctonique et jusqu'à 48h en biofilm dans le milieu VNSS, comme décrit dans le paragraphe II.1.1.3.2. Deux concentrations de cuivre ont été appliquées aux différentes cultures : 0 et 700 mM. Chaque condition de culture est réalisée au moins en triplicats (pour le mode biofilm, les cultures de plusieurs boîtes de Pétri sont rassemblées, pour une quantité suffisante).

II.3.1.2. Extraction du protéome

Cette partie étant développée dans la section « Material and Methods » des Chapitres V et VI de ce manuscrit, elle n'est pas reproduite ici.

II.3.2. Analyse protéomique

Les analyses de protéomique ont été réalisées au sein de la Plate-forme Protéomique de la Génomole Toulouse Midi-Pyrénées à l'institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) (Picheraux C. et Gargaros A.) Les 12 échantillons protéiques (quatre types × triplicat) ont donc été envoyés pour l'analyse de leur contenu dans de la carboglace au laboratoire CNRS *Genotoul – Proteomic* de Toulouse.

Le traitement de l'échantillon, l'analyse par spectrométrie de masse et l'analyse bio-informatique sont développés dans la section « Material and Methods » des Chapitres V et VI.

CHAPITRE III

Utilisation de la métabolomique pour l'étude de biofilms marins naturels



La composition microbienne (bactéries et diatomées) et chimique des biofilms marins est complexe et aujourd'hui encore peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature. De plus, comme décrit dans le Chapitre 1.1.2.3., les résultats déjà obtenus ne sont pas toujours concordants. Dans ce chapitre, deux projets seront présentés : le projet DRACONS (*Drag Reducing Antifouling Coatings for Navy Ships*) et le projet PREVENT (Protection du littoral méditerranéen : évaluation, surveillance, conséquences, impact économique et sociétal – Application à la rade de Toulon). Le premier, financé par la DGA (Direction Générale de l'Armement), vise à déterminer les performances de revêtements *antifouling*. Le projet PREVENT vise quant à lui à évaluer l'impact de l'anthropisation que subit une zone côtière telle que la rade de Toulon. Ce projet est financé par l'université de Toulon, la communauté d'agglomération Toulon Provence Méditerranée (TPM) et le conseil départemental du Var (CD 83).

Le point commun à ces deux projets est qu'une partie est consacrée à la caractérisation dans sa globalité de biofilms marins complexes formés *in situ*, les questions posées restant néanmoins différentes. Ainsi dans ce chapitre, les deux projets seront décrits dans leur globalité, puis une partie concernant la caractérisation de biofilms complexes sera développée. Les biofilms ont été caractérisés dans les deux études à l'aide de plusieurs méthodes d'analyse. Les analyses métabolomiques ont été réalisées dans le cadre de cette thèse, les résultats présentés s'axeront principalement sur ces données. Certaines données issues d'autres types d'analyses seront tout de même utilisées afin de fournir des éléments de discussion.

Les principales études menées à ce jour sur les biofilms marins se sont majoritairement axées sur leur composition en termes d'espèces, de structure des communautés et des fonctions écologiques des bactéries (Smart et al., 2007; Monds and O'Toole, 2009). De nombreux travaux se sont focalisés sur la façon dont les communautés microbiennes induisaient la colonisation ultérieure par le *macrofouling* et ont démontré que des biofilms formés dans différentes conditions environnementales présentaient une attraction différente des macro-colonisateurs (Lau et al., 2005; Dobretsov and Qian, 2006; Hung et al., 2007; Chiu et al., 2008) La raison de cette attraction reste inconnue mais certaines études ont montré que le *macrofouling* pouvait être induit par voie chimique (Pawlik, 1992; Tamburri et al., 1992; Steinberg et al., 2002). Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à la composition chimique de biofilms naturels et pourtant, au vu de ces premiers résultats, il semblerait que la « dimension chimique » des biofilms joue un rôle crucial lors du processus de colonisation. De plus, les changements dans la structure de la communauté bactérienne sont très certainement accompagnés de changements chimiques très importants au sein d'un biofilm. L'étude de la production métabolique

d'un biofilm naturel et les approches métabolomiques constituent des domaines de recherche émergents. Dans l'une des rares études traitant de ce sujet, des analyses métabolomiques effectuées par GC-MS ont révélé une distinction de la signature chimique de biofilms en fonction de leur âge et du substrat (polystyrène et granite) sur lesquels ils s'étaient développés. L'âge du biofilm témoigne d'ailleurs d'un plus fort impact sur la signature chimique que le substrat (Chung et al., 2010). Ces expérimentations très novatrices n'ont que très peu de moyens de comparaison avec la littérature. Pour cette raison, les travaux conduisant à une meilleure compréhension des biofilms naturels, et notamment ceux faisant le lien entre la caractérisation des communautés et la production biochimique, doivent être menés par le biais d'approches pluridisciplinaires. C'est ce type même d'approches qui a été développé dans le cadre des deux projets de recherche décrits ci-après.

III.1. PREVENT : Protection du littoral méditerranéen : évaluation, surveillance, conséquences, impact économique et sociétal - Application à la rade de Toulon

III.1.1. Contexte général

Le développement exponentiel des activités humaines au cours de ces cent dernières années a eu un impact négatif sur l'environnement, et notamment sur les écosystèmes aquatiques. Les polluants métalliques constituent une source majeure de contamination. Ils peuvent être introduits dans la colonne d'eau sous forme particulaire, colloïdale ou dissoute (Kennish, 2002). Une fois dans la colonne d'eau, les métaux sont rapidement adsorbés sur des particules, se déposent sur les fonds marins et s'accumulent dans les sédiments, constituant ainsi une réserve en contaminants. Des études ont montré que les sédiments constituent une source potentielle de contaminants de la colonne d'eau par désorption et remobilisation (Saulnier and Mucci, 2000; Kim et al., 2006; Tankere-Muller et al., 2007; Kalnejais et al., 2010).

Plusieurs études ont démontré que l'anthropisation des milieux naturels (eutrophisation, pollution chimique ...) avait un effet sur les organismes en termes de croissance, de développement, d'immunité et de reproduction (Boening, 2000; Rice and Barone Jr, 2000; Menezes-Oliveira et al., 2013). Les réponses apportées aux questions soulevées restent cependant compliquées à transposer à l'échelle de la totalité d'un écosystème.

Dans ce contexte, le projet de recherche PREVENT vise à mieux évaluer l'impact de l'anthropisation que subissent les zones côtières, et plus particulièrement celles de mer Méditerranée. Il se focalise sur un site représentatif, la rade de Toulon.

La rade de Toulon est une zone côtière méditerranéenne séparée en deux parties : la petite rade (9,8 km², semi-fermée) est ainsi distinguée de la grande rade (42,2 km², ouverte vers l'extérieur). Cette zone, et en particulier la petite rade, est soumise à divers apports anthropiques liés notamment aux activités nautiques en lien avec la plaisance et surtout la présence d'une large part de la Flotte de guerre française. Dans la petite rade, l'absence d'entrée régulière d'eau douce associée à une faible circulation de l'eau favorise l'accumulation de sédiments. Il s'est avéré que ces derniers sont fortement contaminés en éléments métalliques tels que le cuivre, le plomb, le zinc, l'arsenic et le mercure (Figure 17). La contamination en mercure est tellement importante qu'il semble que de tels taux de pollution n'aient encore jamais été décrits dans la littérature pour des environnement marins comparables (Tessier et al., 2011).

Cette problématique d'anthropisation des milieux naturels est donc d'autant plus préoccupante dans un tel site quand on considère la présence d'activités sensibles à la pollution telle que l'aquaculture.

Le projet PREVENT réunit un grand nombre de disciplines scientifiques afin d'appréhender les différentes facettes de cette problématique. Les objectifs principaux du projet consistent à développer des outils qui permettront de mieux comprendre les relations complexes liant l'anthropisation des zones côtières, les écosystèmes et les activités économiques et sociétales. Quatre grands axes sont ainsi développés afin de mieux comprendre l'état de contamination de la rade de Toulon :

- ✓ **L'axe « Evaluation »** a pour objectif de développer des outils de modélisation hydro-sédimentaire afin d'évaluer les apports et le devenir des polluants;
- ✓ **L'axe « Surveillance »** projette de développer de nouveaux capteurs spécifiques à certains polluants;
- ✓ **L'axe « Conséquences »** a pour but d'étudier l'impact réciproque entre la pollution et certains organismes biologiques-clés et d'identifier des indicateurs de qualité du milieu;
- ✓ **L'axe « Impact économique et sociétal »** doit identifier les principales activités économiques et sociétales liées à ce type de zones côtières.

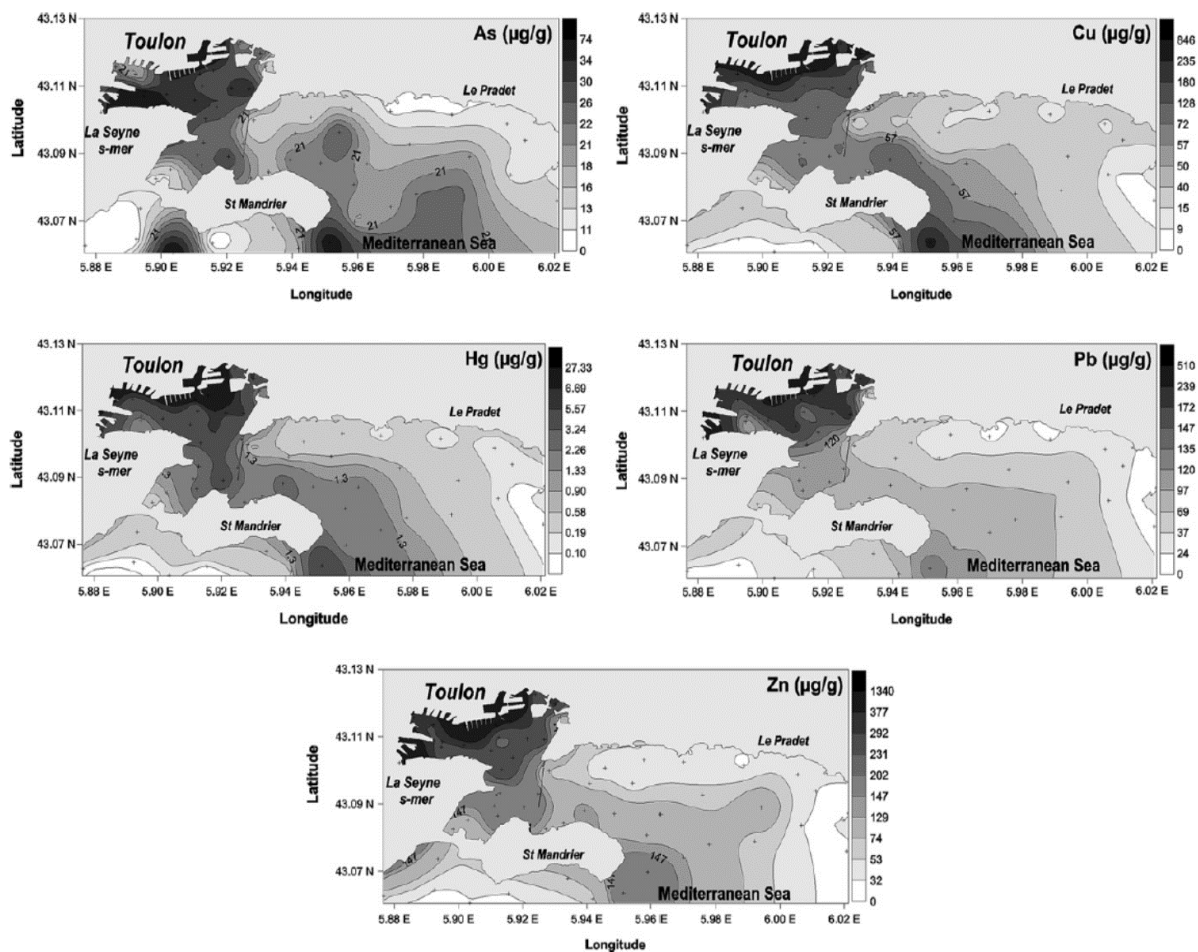


Figure 17 : Distribution de l'arsenic, du cuivre, du mercure, du plomb et du zinc dans les sédiments de surface (0-5 cm) de la rade de Toulon (d'après Tessier et al., 2011)

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse et présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans l'axe « Conséquences ». Cet axe étudie, dans 3 compartiments environnementaux (sédiment, eau, biofilm), le lien entre des polluants (métaux, métalloïdes, organométalliques) particulièrement préoccupants de la rade de Toulon (Dang et al., 2008; Cossa et al., 2014; Pougnet et al., 2014) et des micro-organismes (bactéries, archaea, phytoplancton) qui sont essentiels au fonctionnement de l'écosystème et qui participent activement au transfert des polluants (Plewniak et al., 2013; Grégoire and Poulain, 2014; Liu et al., 2014). Au sein de cet axe, les recherches se sont organisées autour de quatre actions :

- ✓ **Action 1** : Effectuer des prélèvements (de sédiments, d'eau et de biofilms) en différents points de la rade présentant des contaminations chimiques contrastées. Les variations spatiales d'abondance, de diversité, de structure des communautés microbiennes et de profil

métabolique seront étudiées en relation avec les caractéristiques géochimiques des différents compartiments abiotiques étudiés.

- ✓ **Action 2** : Mettre en évidence l'impact de la pollution chimique sur les microorganismes et leurs fonctions en mesurant le niveau d'exposition aux polluants de certains d'entre eux, en mesurant des variations potentielles d'activité biologique et en identifiant des espèces résistantes ou sensibles dans les trois compartiments étudiés. De telles espèces pourraient ainsi servir de bio-indicateurs de la pollution du milieu. Des expériences sont également réalisées pour caractériser la réponse physiologique des souches bactériennes issues de la rade de Toulon exposées à des gradients de pollution dans des conditions contrôlées par une approche de métabolomique environnementale.
- ✓ **Action 3** : Evaluer l'impact de certains microorganismes sur les polluants en analysant la relation entre des profils diagénétiques (variations verticales et amplitudes de traceurs diagénétiques) et des activités microbiennes (variations verticales d'activités généralistes : dénitrification, sulfato-réduction) et en analysant l'impact sur la mobilité sédimentaire des polluants. Des expériences d'incubation de carottes sédimentaires sont également conduites à l'aide d'isotopes stables. Leur dynamique est suivie en parallèle des variations d'abondance et d'activités spécifiques de ces organismes.
- ✓ **Action 4** : Etudier les mécanismes qui contrôlent le transfert de certains polluants vers des organismes-cibles et d'un compartiment source (sédiments) vers différents niveaux trophiques par l'analyse de la signature isotopique de métaux.

Une partie des travaux de cette thèse a été réalisée dans le cadre des actions 1 et 2. Les résultats de l'action 1 seront présentés dans ce chapitre tandis que ceux issus de l'action 2 seront détaillés au niveau du Chapitre VI.

III.1.2. Présentation de l'étude par métabolomique de biofilms complexes formés au niveau de sites présentant des profils de pollution contrastés

Dans le cadre de cette première action de l'axe « Conséquences », plusieurs immersions (plaques, capteurs, DGT (*Diffusive Gradient in Thin films*), cages à oursins) ont eu lieu à deux profondeurs sur cinq sites contrastés de la rade de Toulon. Ces sites se caractérisent par des niveaux de pollution variés, notamment en métaux lourds (Figure 17).

De cette façon, dix plaques en polycarbonate (PC) d'une surface de 750 cm² ont été immergées pendant 1 mois (juin 2015) pour les différentes analyses. Le polycarbonate a été sélectionné pour cette

étude car certaines analyses effectuées nécessitaient des surfaces les moins contaminées possibles en métaux traces. Les cinq sites sont indiqués sur la Figure 18 et sont dénommés dans le cadre du projet : **12, 15, 41, CS** et **MIS**.

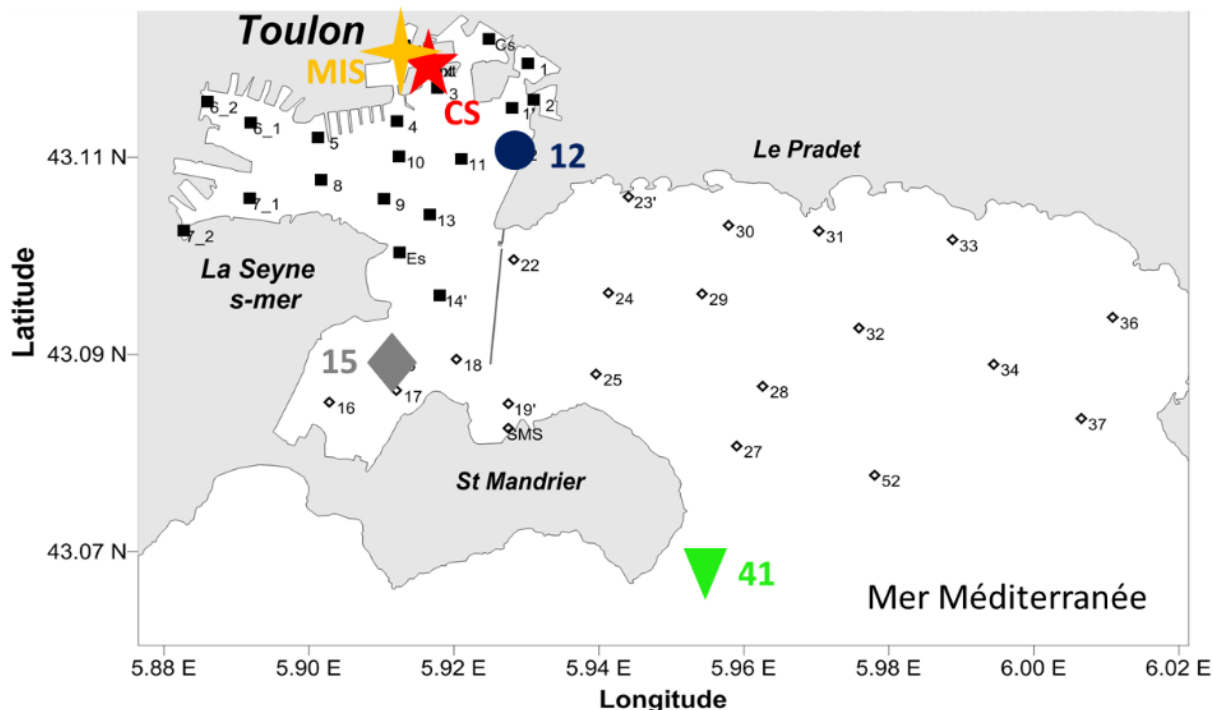


Figure 18 : Localisation géographique des cinq sites d’immersion des plaques PC durant le mois de juin 2015 dans la rade de Toulon

Les sites **CS** ($43^{\circ} 7'8.65''N - 5^{\circ}54'57.31''E$) et **MIS** ($43^{\circ} 7'9.37''N - 5^{\circ}54'40.07''E$) sont des points situés dans les zones les plus fermées de la petite rade puisqu’il s’agit d’une darse située le long des sites de mouillage des sous-marins nucléaires. Plus particulièrement, le site **CS** est proche du lieu d’enfouissement de sédiments issus du dragage de la rade. Le site **1** ($43^{\circ} 6'34.96''N - 5^{\circ}55'41.09''E$) est également localisé dans la petite rade. Le site **4** ($43^{\circ} 5'24.82''N - 5^{\circ}54'39.05''E$), plus éloigné de la côte mais toujours localisé dans la petite rade, est positionné dans la baie du Lazaret, à proximité d’une zone dédiée à la mytiliculture. Le site **5** ($43^{\circ} 4'21.74''N - 5^{\circ}57'21.48''E$) se trouve à la sortie de la grande rade de Toulon, à proximité de Saint-Mandrier.

Deux plaques sont immergées au niveau de chaque site : une à 1m sous la surface et l’autre à 1m au-dessus du fond. La surface de ces plaques est divisée en trois parties et l’une d’entre-elles (le tiers de la surface totale, soit 250 cm^2) est réservée à l’échantillonnage de biofilms pour l’analyse métabolomique. Une face de chaque plaque est sablée (face rugueuse avant, AV) et l’autre ne l’est pas (face lisse arrière, AR). Deux échantillons ($2 \times 1/6$ de la surface de la plaque, soit $2 \times 125 \text{ cm}^2$) sont

prélevés sur la face AV et deux sur la face AR au niveau de chaque plaque. Quatre échantillons sont donc prélevés par plaque et huit par site (4 × 2 profondeurs, surface et fond). Un dispositif particulier a été réalisé pour permettre cette immersion (Figure 19).

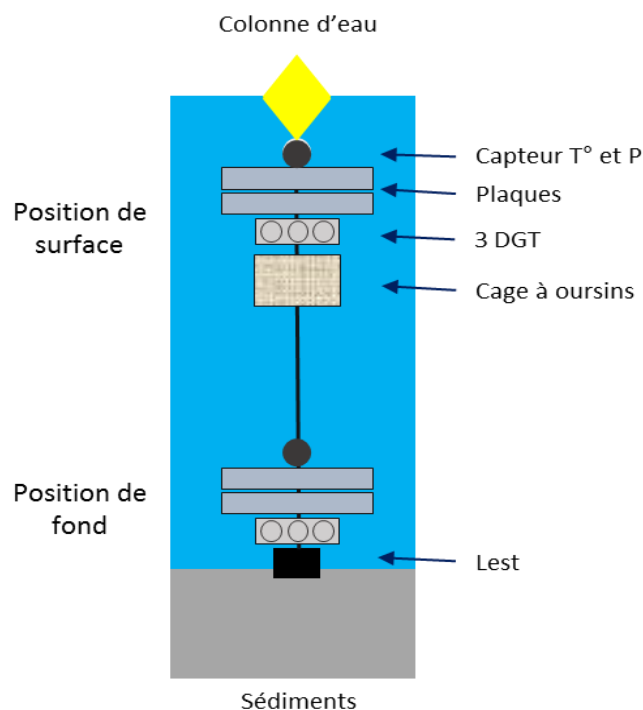


Figure 19 : Dispositif expérimental utilisé lors de l'immersion des plaques PC en juin 2015 dans la rade de Toulon

A l'issue du mois d'immersion, les dispositifs sont retirés du milieu naturel. Les plaques sont aussitôt placées dans de grosses caisses préalablement remplies d'eau de mer du site. Elles sont ensuite ramenées à terre et les biofilms naturels sont alors directement prélevés comme décrit dans le Chapitre II.1.2. Plusieurs analyses sont ensuite réalisées en parallèle :

- ✓ L'analyse métabolomique par UPLC-ESI-QToF-MS de la production en métabolites par les microorganismes en présence : elle est destinée à la réalisation d'un profilage métabolique des biofilms naturels prélevés (cette étude a été réalisée dans le cadre de cette thèse);
- ✓ L'analyse métagénomique par séquençage massif de l'ADNr 16S (pyroséquençage) : elle permet d'obtenir la composition relative de la communauté procaryote (bactéries et archées);
- ✓ L'analyse quantitative des différents groupes de microorganismes par cytométrie en flux : elle a pour but de quantifier les bactéries, les cyanobactéries, ainsi que les pico- et nano-eucaryotes;

- ✓ L'analyse quantitative de la composition microbenthique par microscopie inversée : elle ne sert quasi-exclusivement qu'à la quantification des diatomées;
- ✓ L'analyse quantitative et qualitative des EPS : elle est destinée à caractériser les grandes classes biochimiques entrant dans la constitution de la matrice des biofilms naturels formés.

III.1.3. Résultats et discussion

III.1.3.1. Evaluation visuelle de la colonisation des plaques immergées

Les biofilms sur les plaques PC à leur sortie de l'eau après 1 mois d'immersion dans la rade de Toulon sont présentés dans la Figure 20.

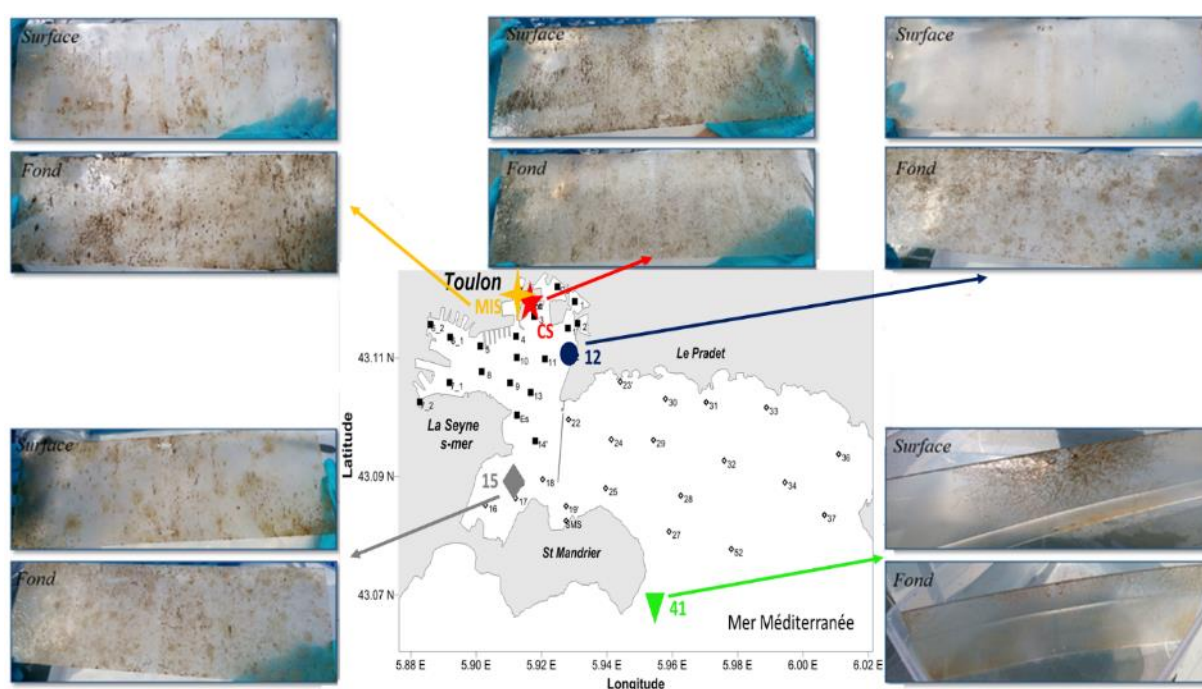


Figure 20 : Photographies des biofilms formés sur des plaques PC à l'issue d'un mois d'immersion en surface et en profondeur en cinq points de la rade de Toulon

Visuellement, les biofilms formés sont différents en fonction du lieu d'immersion dans la rade. Ainsi les biofilms formés aux points **MIS** et **CS** semblent plus colorés et visqueux que ceux formés aux autres points. Aux trois autres points, les biofilms sont moins épais. Au point **41** en surface, une algue a colonisé une partie de la plaque. Il est également possible d'observer des différences notables pour des biofilms provenant d'un même site d'immersion en fonction de la profondeur d'échantillonnage (surface/profondeur). C'est le cas par exemple du point **12** pour lequel le biofilm formé en profondeur est plus important et coloré que celui formé en surface. Ces différences seront-elles également

constatées chimiquement ? Quels sont les types de micro-organismes qui varient entre ces différents biofilms ?

III.1.3.1. Impact du site d'immersion

L'ensemble des échantillons récoltés pour les analyses métabolomiques a été analysé en UPLC-ESI-QToF-MS en mode d'ionisation positive. Les modèles statistiques ACP et PLS-DA obtenus avec ces données sont présentés dans la Figure 21.

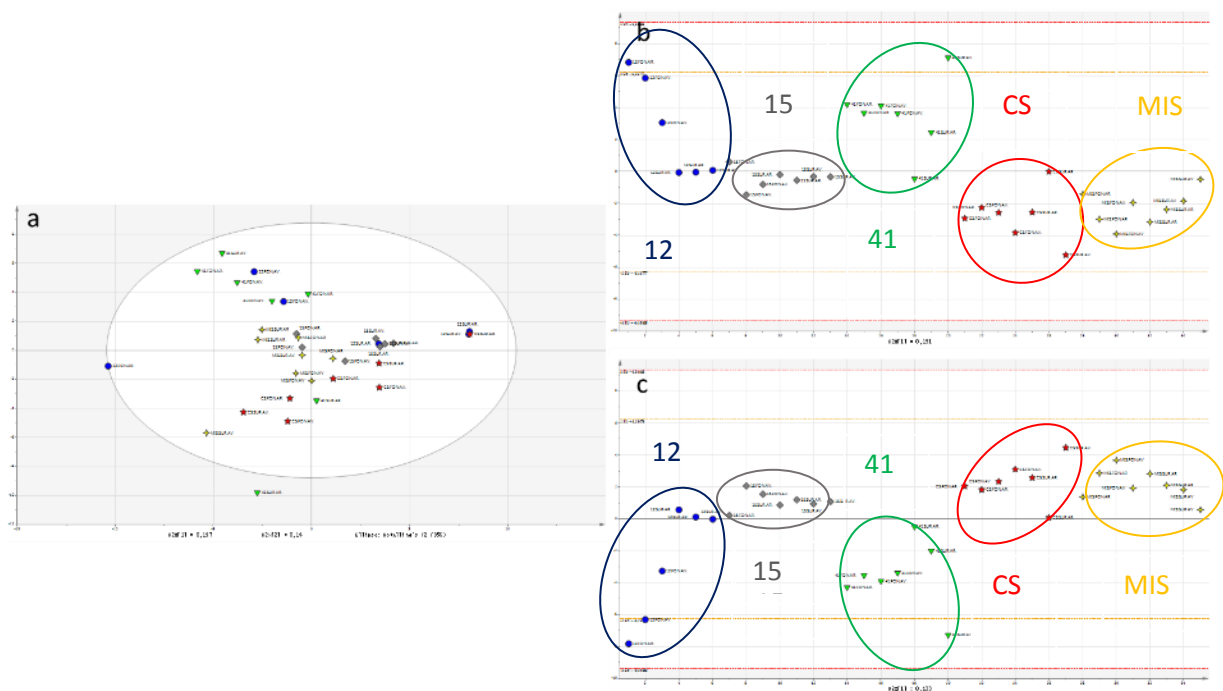


Figure 21 : a) Analyse ACP ; b) analyse PLS-DA (5 classes : une classe par point géographique) ; c) analyse PLS-DA (2 classes : 12 (●) et 41 (▼), et 15 (◆), CS (★) et MIS (†)) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir des biofilms récoltés sur les plaques PC immergées en surface et en profondeur pendant 1 mois aux cinq sites de récoltes de la rade de Toulon

Tableau 9 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés aux points 12, 15, 41, MIS et CS de la rade de Toulon après un mois d'immersion

Modèles	N ^o ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	p ^f
5 classes	1	0,131	0,170	0,022	0,092	-0,030	0,961
2 classes	1	0,133	0,640	0,453	0,321	-0,136	< 0,001

^aNombre de composantes du modèle; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X ; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y; ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X ; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation (n = 150) ; ^fValeur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA (k fold = 7).

L'ACP (Figure 21a) ne permet pas de distinguer de tendance particulière quant à la signature chimique en fonction du lieu d'immersion dans la rade. Pour « forcer » la discrimination, un modèle statistique de type PLS a été construit (Figure 21b) en considérant une classe par lieu d'immersion. Dans ces conditions, les tests statistiques appliqués au modèle révèlent qu'il n'est pas statistiquement valide (Tableau 9). Il laisse cependant apparaître une certaine tendance puisqu'il ne possède qu'une seule composante et que celle-ci sépare les échantillons des points **15**, **CS** et **MIS** de ceux récoltés aux points **41** et **12**. Un nouveau modèle discriminant PLS est donc construit en ne considérant que deux classes : une pour les échantillons des points **15**, **CS** et **MIS** et l'autre pour les échantillons des points **41** et **12** (Figure 21c). Ce nouveau modèle est statistiquement correct (Tableau 9) et confirme la discrimination entre les deux groupes d'échantillons. Comme les photographies le montraient, une certaine différence apparaît entre les échantillons récoltés au point **12** en fonction de leur provenance, de la surface ou du fond : la signature chimique des échantillons de la surface étant plus proche de celle des points **MIS**, **CS** et **15**.

Dans nos conditions d'analyse, le lieu d'immersion a un impact sur la signature chimique du métabolome des biofilms naturels récoltés. Dans le cas précis du point **12**, la profondeur est un paramètre qui semble également avoir un effet sur la signature chimique des biofilms formés *in situ*.

Afin de s'affranchir de l'effet potentiel de la profondeur, de nouveaux modèles ACP et PLS-DA ont été construits en ne prenant en compte que les échantillons récoltés en surface, d'une part, et ceux provenant du fond, d'une autre part (Figure 22).

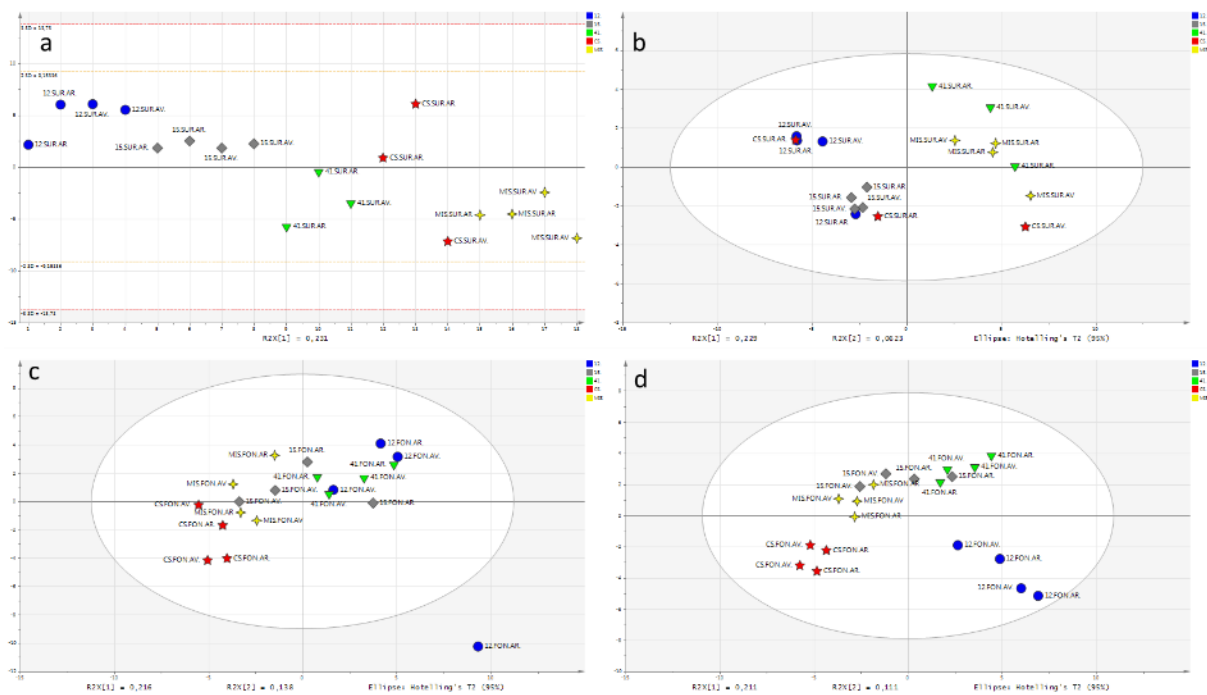


Figure 22 : a) Analyse ACP et b) analyse PLS-DA (une classe avec les échantillons collectés aux points 12 (●), 15 (◆) et CS AR (★) et une classe avec ceux provenant des points MIS (+), 41 (▼) et CS AV (☆)) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir des biofilms récoltés sur les plaques immergées en surface ; c) Analyse ACP et d) analyse PLS-DA (5 classes : une classe par site de collecte) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir des biofilms récoltés sur les plaques immergées en profondeur

Tableau 10 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés aux points 12, 15, 41, MIS et CS en profondeur et en surface

Profondeur du prélèvement	Modèles	N ^o ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	p ^f
Surface (figure non montrée)	5 classes	1	0,227	0,193	0,078	0,116	-0,069	0,981
Surface	2 classes	3	0,410	0,988	0,824	0,707	-0,401	0,002
Fond	5 classes	4	0,483	0,852	0,520	0,513	-0,410	0,015

^aNombre de composantes du modèle; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y; ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation ($n = 150$); ^fvaleur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA ($k \text{ fold} = 7$).

Le modèle ACP construit avec les échantillons de surface uniquement (Figure 22a) est très différent de celui qui a été construit avec la totalité des échantillons. En effet, ce modèle ne présente qu'une seule composante et discrimine nettement les échantillons collectés aux points 15 et 12 de ceux provenant des points MIS et 41. Les échantillons du point CS sont divisés en deux groupes en fonction de la face sur laquelle le biofilm est récolté : les échantillons issus de la face arrière (AR) lisse étant regroupés avec les échantillons des points 12 et 15. Le modèle PLS-DA construit en considérant chaque point

d'immersion comme une classe n'est pas statistiquement valide (Tableau 10). Un nouveau modèle considérant la discrimination observée sur le modèle PLS initial a donc été construit en regroupant d'une part les échantillons des points **12**, **15** et **CS** (AR) et d'autre part, ceux de **MIS**, **41** et **CS** (AV). Le modèle PLS ainsi construit se montre statistiquement correct après validation.

Le modèle ACP construit avec uniquement les échantillons provenant du fond (Figure 22c) montre des regroupements différents de ceux obtenus avec les échantillons de surface et se rapprochant plus de ceux initialement observés avec la totalité des échantillons. Ainsi, une nette discrimination est observée entre les échantillons issus des points **15**, **CS**, **MIS** et ceux des points **41** et **12**. Le modèle discriminant PLS à 5 classes (une classe par lieu) est statistiquement valide (Tableau 10). Il permet de séparer sur le premier axe les échantillons des points **MIS**, **CS** et **15** (AV) de ceux des points **41**, **12** et **15** (AR) tandis que le deuxième axe permet de discriminer les échantillons de **MIS** et **CS**, d'une part, et ceux des points **41** et **12**, d'autre part. Les échantillons du point **15** sont positionnés en fonction de la face de la plaque sur laquelle ils ont été récoltés.

Une nette différence dans la discrimination des échantillons de biofilms formés *in situ* apparaît donc en fonction de la profondeur d'immersion, fond ou surface. La discrimination observée avec les échantillons du fond concorde avec ce qui pourrait être attendu : les signatures chimiques des biofilms formés dans les zones les plus polluées sont proches et sont à la fois différentes des signatures chimiques obtenues à partir des biofilms provenant des zones les moins polluées. Il semble donc qu'en profondeur, le degré de pollution ait un réel effet sur la signature chimique des biofilms.

En surface, la discrimination observée montre que les signatures des biofilms provenant des points **MIS** et **41** sont proches alors que le point **MIS** est le site où la pollution est la plus importante et le point **41** est celui qui est le moins contaminé. La pollution ne semble donc pas être le paramètre le plus important pour la discrimination des échantillons de surface.

En définitive, le facteur pollution a donc un impact sur la signature chimique des biofilms formés en profondeur mais pas sur celle des biofilms de surface. Cette conclusion peut se justifier de plusieurs façons. Premièrement, la pollution est toujours plus importante au niveau des sédiments que dans la colonne d'eau. La différence des concentrations en polluants entre ces deux compartiments constitue une explication plausible à cette différence d'effet. Deuxièmement, la lumière pourrait être un facteur essentiel entrant en jeu dans la discrimination entre des échantillonnages en surface et en profondeur : il s'agit d'un paramètre important pour la croissance des organismes et il montre des niveaux très contrastés entre ces deux types de conditions. Il est avéré que des biofilms formés avec une faible

luminosité ont des besoins plus importants en carbone organique dissous (COD) que ceux qui se développent à la lumière (recyclage interne et COD disponible pour les hétérotrophes) (Romani et al., 2004). Il est ainsi possible que la colonisation par certaines espèces, notamment celles autotrophes et hétérotrophes, soit défavorisée en absence de lumière. Ainsi, une étude a montré que les communautés de biofilms incubés dans le noir étaient composées de plus d'organismes autotrophes que celles issues de biofilms développés en présence de lumière (Lear et al., 2009). Avec un niveau de luminosité suffisant, la pollution du site aurait ainsi moins d'impact sur les organismes colonisateurs et la lumière serait dans ce cas-là un facteur plus important que le niveau de pollution. Les résultats des analyses de communautés effectuées au cours du projet ne sont pas encore disponibles mais ils permettront de vérifier cette hypothèse. Enfin, un troisième facteur est constitué par le développement d'une algue sur une partie de la plaque de surface du point **41**. Sa présence pourrait ainsi avoir fortement contribué à la signature chimique des échantillons de surface en ce point.

Afin d'avoir un aperçu des métabolites qui varient dans les biofilms formés sur les plaques en profondeur aux différents sites d'immersion et donc de ceux qui sont impactés par le facteur pollution, les métabolites ayant les plus grandes valeurs de *VIP score* (importance de la variable sur la projection) dans le modèle PLS-DA de la Figure 22d ont été plus particulièrement étudiés. Ce modèle possède 450 métabolites dont la valeur de *VIP* est supérieure à 1. Afin d'améliorer la robustesse du modèle et de cibler les métabolites les plus importants dans la discrimination entre les échantillons, un nouveau modèle est généré avec ces 450 métabolites (Tableau 11). L'opération est répétée une seconde fois avec les 143 métabolites dont la valeur de *VIP* est supérieure à 1 dans ce nouveau modèle (Tableau 11). Finalement, ce troisième modèle sera conservé car une autre réduction du nombre de variables diminue sa robustesse. Dans ce modèle, 55 métabolites ont une valeur de *VIP* supérieure à 1 et les 20 premiers seront plus particulièrement étudiés. Parmi ces métabolites, quatre ne sont retrouvés que dans les biofilms du point **CS**, trois sont caractéristiques du point **MIS**, trois sont communs aux points **MIS** et **15**, six sont retrouvés aux points **12** et **41** et ces deux derniers points possèdent tous deux un métabolite spécifique commun (Figure 23). L'ensemble de ces métabolites est listé dans le Tableau 12.

Les formules brutes de la plupart de ces composés sont retrouvées dans les bases de données. Cependant, une analyse plus poussée en UPLC-HRMS/MS sera nécessaire pour obtenir plus d'informations quant à la nature de ces composés.

Tableau 11 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés aux points 12, 15, 41, MIS et CS en profondeur

Profondeur du prélèvement	Modèles	N ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	p ^f
Surface VIP > 1 du modèle Figure 22d (1)	5 classes	6	0,660	0,954	0,684	0,724	-0,537	< 0,001
Surface VIP > 1 de (1)	5 classes	5	0,690	0,918	0,712	0,555	-0,534	< 0,001

^aNombre de composantes du modèle ; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X ; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y. ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X ; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation (n = 150); ^fValeur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA (k fold = 7).

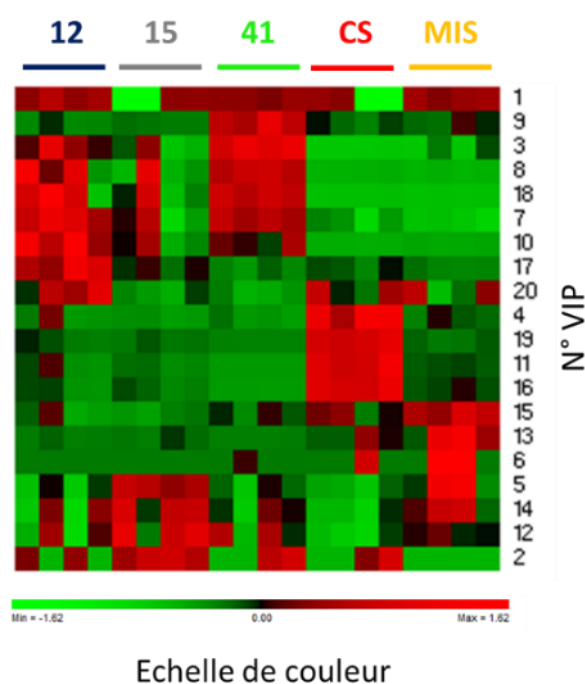


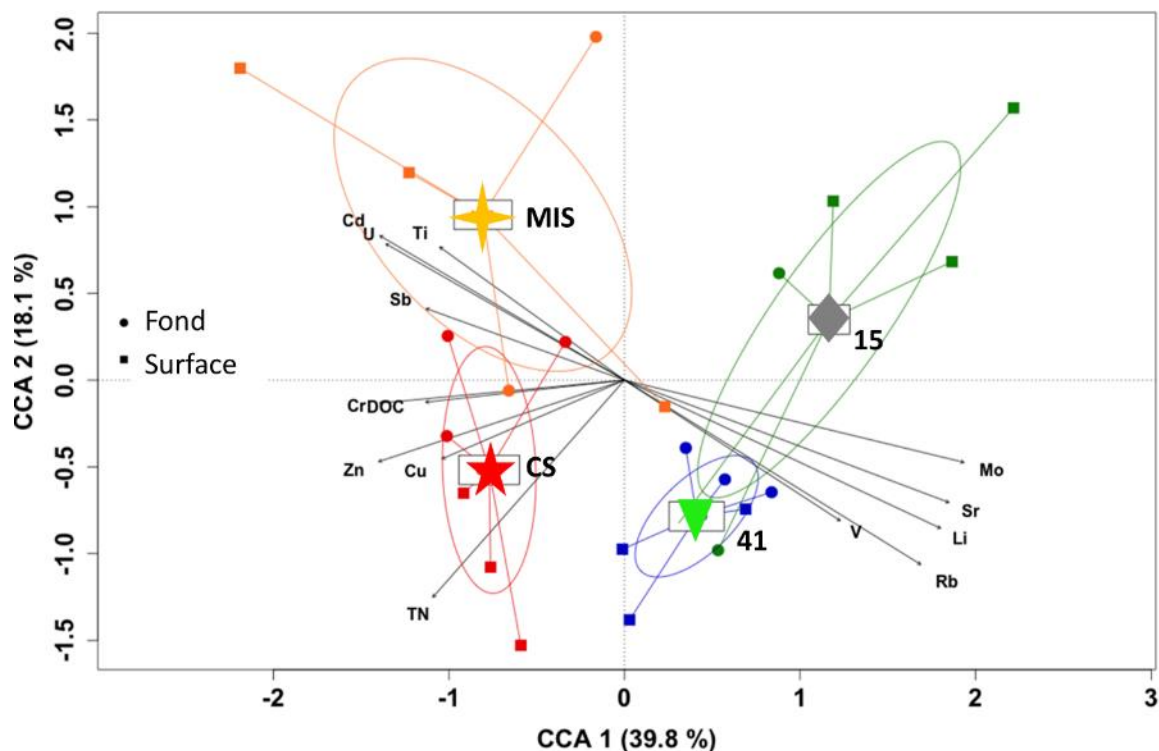
Figure 23 : Représentation *heatmap* à partir des données UPLC-HRMS des métabolites (valeur VIP > 1,1) discriminants entre les sites d'immersion

Tableau 12 : Liste des biomarqueurs (Valeur VIP > 1,1) identifiés par UPLC-HRMS pour la discrimination des biofilms formés aux différents sites d'immersion

N° VIP	m/z	RT (s)	Valeur de VIP	Formule	Erreur de masse (ppm)	mσ ^a
1	90,9765	9	1,8	C ₂ H ₄ PS	0,6	26,0
2	128,0193	34	1,6	-	-	-
3	105,0701	52	1,6	C ₈ H ₉	-2,0	5,0
4	369,1255	419	1,5	C ₂₁ H ₂₂ O ₄ P	-1,5	1,7
5	357,3477	326	1,4	C ₂₁ H ₄₅ N ₂ O ₂	-0,3	10,3
6	84,9595	33	1,4	-	-	-
7	152,1069	52	1,4	C ₉ H ₁₄ NO	0,6	3,1
8	134,0965	52	1,3	C ₉ H ₁₂ N	-0,4	6,6
9	520,3639	329	1,3	C ₃₀ H ₅₀ NO ₆	-1,2	14,8
10	212,1758	123	1,3	C ₁₁ H ₂₂ N ₃ O	-0,1	2,0
11	230,0965	369	1,3	C ₁₇ H ₁₂ N	-0,3	12,4
12	343,2956	296	1,3	C ₁₉ H ₃₉ N ₂ O ₃	-0,2	16,3
13	231,0840	36	1,2	C ₆ H ₁₁ N ₆ O ₄	-1,4	2,7
14	329,3166	302	1,2	C ₁₉ H ₄₁ N ₂ O ₂	-1,2	9,5
15	504,3175	338	1,2	C ₁₉ H ₄₇ N ₅ O ₈ P	-3,6	5,9
16	280,1124	426	1,2	C ₂₁ H ₁₄ N	-1,3	11,9
17	311,2583	441	1,2	C ₁₉ H ₃₅ O ₃	-0,8	15,4
18	134	41	1,2	-	-	-
19	304,1122	449	1,2	C ₂₃ H ₁₄ N	0,9	16,0
20	118,0863	43	1,2	C ₅ H ₁₂ NO ₂	-0,3	4,4

^aFacteur de correspondance statistique obtenu par comparaison des modèles isotopiques théoriques et observés

Les données obtenues en métabolomique ont ensuite été corrélées avec les autres résultats disponibles auprès des différents partenaires du projet. Ainsi, ces données de métabolomique sont comparées dans un premier temps avec celles issues de l'analyse de la composition en microorganismes des biofilms (cytométrie en flux). Cette analyse corrélée avec les données géochimiques recueillies au cours de l'étude est présentée sous forme d'ACC (Analyse Canonique des Correspondances) (Figure 24). Les échantillons du point **12** ne sont pas représentés sur cette figure car ils témoignent d'une trop grande divergence. Sur cette figure, le même type de discrimination que celle obtenue avec les données de métabolomique provenant des biofilms formés en profondeur est observée : les points **MIS** et **CS** sont proches et distincts des points **15** et **41**. Les points **MIS** et **CS** sont caractérisés par de fortes concentrations en métaux et la présence de signaux de cytométrie caractéristiques de *Prochlorococcus* (cyanobactérie) et de nanoeucaryotes (eucaryotes de taille comprise entre 2 et 20 μm). Les points **15** et **41** se différencient quant à eux par des signaux de cytométrie en accord avec la présence de *Synechococcus* (bactérie).



Ti : Titantium; Cd : Cadmium; U : Uranium; Sb : Antimoine; Cr : Chrome DOC : Carbone organique dissout; Zn : Zinc; Cu : Cuivre; TN : Total Nitogen; Mo : Molybdène; Sr : Strontium; Li : Lithium, Rb : Rubidium

Figure 24 : ACC représentant la variation de la composition en microorganismes (cytométrie en flux) des biofilms récoltés aux points MIS (+), CS (★), 15 (◆) et 41(▼) en fonction des données géochimiques (Coclet et al, communication personnelle)

Les résultats obtenus par métabolomique sont également comparés aux analyses biochimiques réalisées pour déterminer la composition de la matrice (nature des EPS) des biofilms. Un modèle ACP avec les échantillons de biofilms provenant des cinq sites (fond et surface) a été construit (Figure 25).

La discrimination obtenue pour ces échantillons est similaire à celle observée sur le modèle construit avec les données métabolomiques regroupant tous les échantillons (surface et fond) (Figure 21c). Les échantillons collectés au niveau des points **41** (surface et fond) et **12** (fond) sont ainsi regroupés et différenciés de ceux provenant des autres points de prélèvements. Ils sont caractérisés par une matrice contenant un fort taux de protéines alors que pour les autres points, ce sont les taux de polysaccharides et d'acides uroniques, ainsi que la quantité globale de biofilm qui sont des facteurs déterminants. Il est donc clairement visible que la nature et la quantité des EPS produits par les biofilms varient en fonction du site d'immersion.

En règle générale, les polysaccharides constituent la fraction majeure des EPS de la matrice des biofilms. Certains organismes ont cependant une production d'EPS au sein de laquelle la part de protéines est la plus importante. La production d'EPS est généralement adaptée aux conditions dans

lesquelles se développent les biofilms. Ainsi, les EPS polysaccharidiques sont souvent fortement produits dans des milieux très pollués (Flemming and Wingender, 2010). Les polysaccharides sont les EPS qui ont le pouvoir recouvrant le plus important et sont de ce fait fortement impliqués dans la structure tridimensionnelle du biofilm. Leur production en quantités importantes confère une forte viscosité à la matrice et permet d'enfermer et d'immobiliser les agrégats bactériens, créant ainsi une barrière de protection (physique et chimique) pour les bactéries contre le milieu naturel. Leur présence caractéristique dans la matrice des biofilms récoltés au niveau des zones les plus polluées pourrait s'expliquer par ces différentes raisons. De plus, la présence d'EPS acides (contenant des acides uroniques) dans ces mêmes biofilms pourrait conduire à la séquestration par la matrice d'espèces chimiques chargées (Flemming and Wingender, 2010). La matrice ainsi constituée présente des propriétés physico-chimiques particulières qui lui permettraient de protéger les cellules du biofilm vis-à-vis d'ions métalliques par exemple. Il a d'ailleurs été décrit que la matrice de certains biofilms accumulait les ions métalliques, la protégeant ainsi de l'érosion et protégeant les cellules bactériennes en son sein de la toxicité de ces ions (Grumbein et al., 2014; Flemming et al., 2016).

La nature protéique des EPS retrouvés dans les biofilms au point **41** pourrait quant à elle être expliquée par les propriétés hydrodynamiques de ce site. En effet, les conditions y sont beaucoup plus agitées que pour les autres sites et le fort taux de protéines dans la matrice apporterait des propriétés structurantes au biofilm évitant ainsi un décrochage ou un lessivage trop important. Certains organismes produisent effectivement des EPS protéiques afin de créer une matrice très hydrophobe et donc plus résistante aux contraintes hydrodynamiques (Flemming and Wingender, 2010).

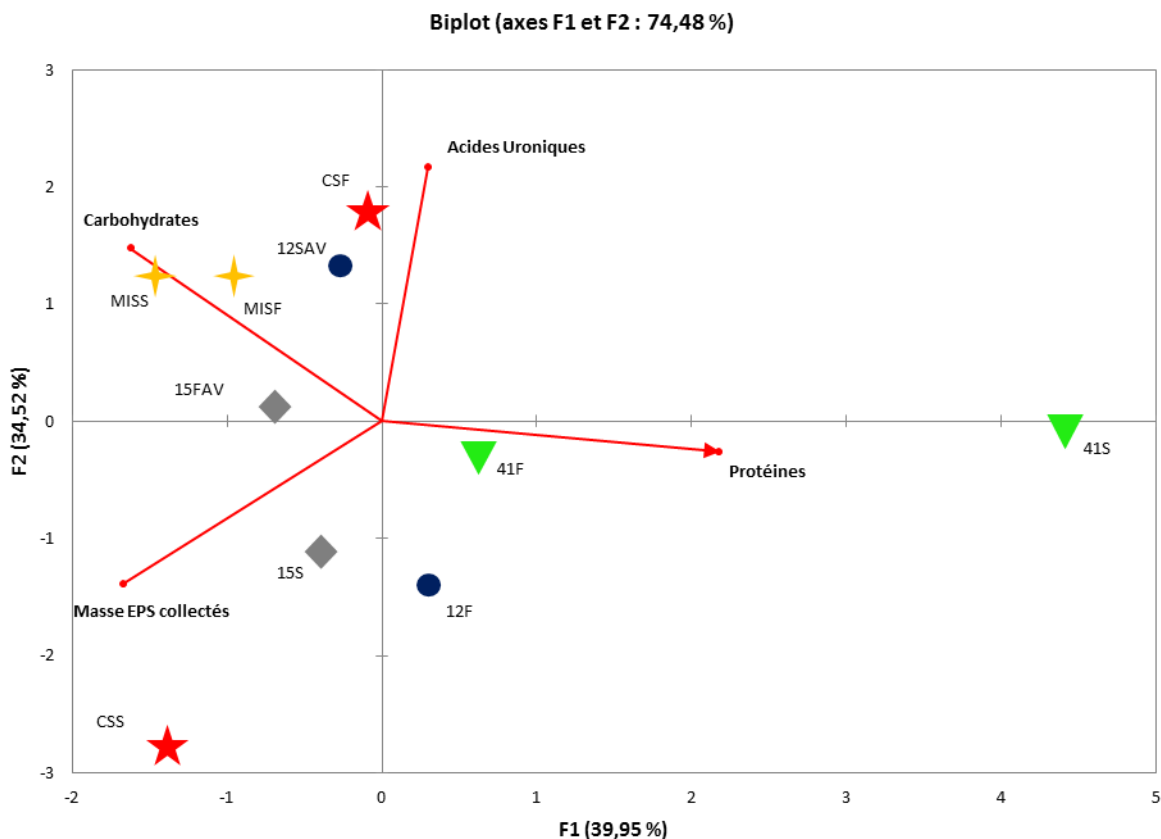


Figure 25 : ACP réalisée à partir des données de l'analyse biochimique de la matrice (EPS) des biofilms récoltés au fond et en surface au niveau des différents sites d'immersion (Ortalo-Magné et al., communication personnelle)

En conclusion des résultats obtenus lors de cette étude, la signature métabolique des biofilms marins dans la rade de Toulon varie en fonction du lieu ainsi que de la profondeur d'immersion des surfaces à coloniser. Les hypothèses émises suggèrent que les différences métaboliques entre les biofilms de surface et du fond sont principalement dues à la lumière tandis que celles observées entre les différents lieux d'immersion (entre les signatures des biofilms récoltés au fond) sont liées à la pollution, en particulier en éléments métalliques. L'étude de biofilms naturels complexes avec de telles approches pluridisciplinaires est particulièrement novatrice et ne trouve pas d'équivalent dans la littérature. Peu de moyens de comparaison sont donc disponibles pour jauger de la pertinence des résultats obtenus. L'interprétation combinée de ces résultats avec les données de séquençage massif par métagénomique permettra de fournir des éléments de discussion supplémentaires et conduira certainement à une meilleure compréhension des phénomènes observés, tandis que l'analyse des échantillons par UPLC-HRMS/MS permettra de mieux caractériser les biomarqueurs spécifiques des biofilms formés dans des conditions données.

III.2. DRACONS: Drag Reducing Antifouling Coatings for Navy Ships

III.2.1. Contexte général

Les bâtiments de surface (bateaux) ou les sous-marins de la Marine Nationale française sont mis à quai ou immergés pendant de longues périodes (> 50% de leur temps sur des durées allant jusqu'à 90j) et sont par conséquent soumis au développement de *biofouling*. Comme il a été décrit dans le Chapitre I.1.1.1, ce phénomène naturel entraîne des modifications importantes des conditions opérationnelles des navires et génère des coûts d'entretien et de maintenance élevés. L'application de revêtements *antifouling* est ainsi une nécessité.

Le projet DRACONS vise à déterminer les performances de revêtements *antifouling*. Il fait suite à des études suivies par la DGA (Direction Générale de l'Armement) sur le développement de peintures *antifouling* susceptibles de répondre aux exigences de la réglementation environnementale actuelle (interdiction de nombreuses substances chimiques), et de prendre en compte les besoins de performance spécifiques des bâtiments de la Marine Nationale. Les objectifs de ce projet sont ainsi d'évaluer le potentiel, ainsi que la conformité vis-à-vis de la réglementation en vigueur et des réglementations portant sur l'environnement, de plusieurs systèmes de peintures *antifouling* récemment développés. Cette évaluation précède des expérimentations qui seront réalisées sur des bâtiments de la Marine Nationale par la Direction de Soutien en Service de la Flotte (DSSF). Le projet DRACONS doit permettre l'évaluation de solutions de remplacement (pérennes pour au moins 10 ans) tout en prenant en compte les besoins de performances recherchés et en faisant évoluer les méthodes de caractérisation existantes peu adaptées aux nouvelles technologies *antifouling*.

Ainsi trois axes de recherche ont été développés au cours de ce projet afin de répondre aux objectifs donnés :

- ✓ **Axe 1** : L'étude de conditions de vieillissement accéléré de plusieurs revêtements sur une courte période : la durée d'efficacité des peintures doit être compatible avec les rythmes d'entretien des navires. La détermination de la durabilité des peintures ainsi que la caractérisation de l'état de vieillissement en service est donc primordiale.
- ✓ **Axe 2** : L'étude de la formation des biofilms sur des surfaces revêtues immergées *in situ* et *in vitro* : l'évaluation du développement du *biofouling* sur les surfaces permettra de gérer au mieux l'entretien des surfaces immergées.

- ✓ **Axe 3** : L'étude de l'incidence de ces biofilms sur la réduction de la traînée hydrodynamique : la compréhension de l'augmentation de la traînée hydrodynamique permettra de mieux connaître les conditions opérationnelles optimales des navires.

Les travaux effectués au cours de cette thèse font partie de l'axe 2 et portent sur l'étude de la formation des biofilms *in situ* sur différents types de revêtements et dans des conditions hydrodynamiques contrastées.

Des études précédentes ont montré que la composition microbienne variait en fonction de la nature des revêtements *antifouling*. Ainsi, des différences de densité microbienne et de structure des populations ont été observées entre quatre revêtements de types SPC (de différentes formulations) après une immersion de deux semaines (Briand et al., 2012). D'autres travaux ont montré, en fonction de la nature du revêtement [*Self-Polishing Copolymer* (SPC), *Self-Polishing Hybrid* (SPH) et *Controlled Depletion Polymer* (CDP)], des variations en termes de biomasse du biofilm, de densité et de structure des communautés bactériennes sur des biofilms formés sur des plaques immergées *in situ* pendant 1 an. Les différences les plus remarquables au niveau des espèces présentes par rapport aux biofilms contrôles concernent les Flavobacteria pour les revêtements SPC et les α -Proteobacteria pour les revêtements CDP (Muthukrishnan et al., 2014). Des différences d'abondances bactériennes marquées ont été également mises en évidence entre des biofilms formés sur des revêtements SPC et FRC après 1 mois d'immersion. Il a cependant été remarqué que sur tous les revêtements, les bactéries hétérotrophiques montraient les densités les plus hautes tandis que les valeurs les plus basses correspondaient aux diatomées (Camps et al., 2014).

La composition microbienne d'un biofilm varie également en fonction des conditions hydrodynamiques de l'environnement. Il a été montré que des forces de cisaillement externes engendraient un changement de la structure et de l'architecture du biofilm (Valiei et al., 2012; Kumar et al., 2013) et pouvaient également induire son détachement (Horn et al., 2003). Lorsque les forces de cisaillement sont intenses (par exemple pour des vitesses de navigation supérieures à 1,16 nœuds dans le cas d'un navire), la biomasse du biofilm diminue significativement (Tsai, 2005). La formation et l'écologie microbienne du biofilm sont ainsi influencés par ces conditions stressantes (Salta et al., 2013) et les communautés qui s'y développent sont moins diversifiées (Howell, 2009).

Dans une condition donnée de force de cisaillement, le site d'immersion peut également avoir un impact sur la colonisation. En effet les conditions hydrodynamiques, la disponibilité en nutriments (Chiu et al., 2008), la température (Lau et al., 2005) et le degré de pollution (Briand et al., 2012) sont

autant de facteurs qui peuvent induire des modifications de l'écophysiologie d'un biofilm (Salta et al., 2013).

Dans le cas d'immersions de revêtements *antifouling*, il est donc probable qu'en plus de la nature du revêtement, les conditions hydrodynamiques et plus globalement l'ensemble des facteurs environnementaux caractérisant un site précis ont un impact sur la composition et les propriétés des biofilms formés.

III.2.2. Présentation de l'étude par métabolomique de biofilms complexes formés *in situ* sur différents revêtements *antifouling* dans des conditions hydrodynamiques variées

L'étude présentée ici consiste à caractériser des biofilms formés en eau de mer naturelle (*in situ*) sur des revêtements *antifouling* aux propriétés différentes. Le but est de comparer la signature chimique de ces biofilms afin de mieux comprendre l'effet de la nature des revêtements et des conditions environnementales sur leur développement, leur composition et leur structure.

Ainsi, deux types de revêtements sont testés au cours du projet :

- ✓ Les peintures *antifouling* « auto-polissantes » à base de biocides organiques et de dérivés du cuivre (*Self Polishing Coatings* ; SPC) dont l'action repose sur l'érosion du revêtement et le relargage des biocides qui le compose au cours du temps. La peinture utilisée pour cette étude contient de l'oxyde de cuivre et de la pyrithione de cuivre.
- ✓ Les peintures *antifouling* à « faible adhérence », sans biocides et à base d'élastomère silicone (*Foul Release Coatings* ; FRC), dont l'action repose sur des faibles valeurs de rugosité (une surface rugueuse apporte une plus grande surface de colonisation et des « cages » de protection), d'énergie libre de surface (environ 20-25 mJ/m²) et de module élastique (entre 0,9 et 2 MPa). Ces valeurs permettent de limiter les forces d'adhésion des organismes marins et favorisent leur élimination sous contrainte. Deux revêtements de ce type, nommés FRC1 et FRC2, ont été utilisés au cours de ce projet.

Les deux types de revêtements sont actuellement commercialisés et présentent des durées d'efficacité moyenne de trois à quatre ans. Les revêtements de type FRC peuvent avoir une efficacité supérieure à cinq ans lorsque les bâtiments naviguent à des vitesses supérieures à 8-15 nœuds.

La caractérisation des biofilms à la surface de ces deux types des revêtements est effectuée en comparaison avec ceux formés sur des plaques de polychlorure de vinyle (PVC) non-revêtues, utilisées en tant que témoins positifs pour la colonisation. Le PVC est un constituant inerte chimiquement et des plaques de ce type ont déjà été utilisées comme référence dans des études précédentes (Camps et al., 2014). Ces plaques ont été préalablement sablées (taille de grain comprise entre 0,150 et 0,255 mm) afin d'en augmenter la rugosité et ainsi de favoriser la colonisation.

La formation du biofilm inclut une dimension temporelle (en relation avec les cycles de vieillissement) ; les analyses sont donc réalisées sur les trois types de surfaces après plusieurs temps différents d'immersion. Afin de tester et de comprendre l'effet des différentes conditions hydrodynamiques auxquelles peuvent être soumis les différents revêtements (en mouvement pendant la navigation et statique quand le bateau est à quai) l'expérimentation a été réalisée dans des conditions statiques et dynamiques.

Deux lieux d'immersion ont été utilisés pour cette étude : la rade de Toulon (Var, France) qui correspond à un lieu peu agité et la baie de Banyuls-sur-Mer (Pyrénées Orientales, France) qui est soumise à des régimes hydrodynamiques plus importants. Ces deux lieux se différencient également en termes de conditions environnementales puisque la rade de Toulon est caractérisée comme étant un site présentant des zones fortement anthropisées alors que la baie de Banyuls-sur-Mer est moins exposée à la pollution (Tableau 13).

Tableau 13 : Concentrations en métaux (zinc, plomb et cuivre) de la rade de Toulon et de la baie de Banyuls-sur-Mer mesurées en 2015 (Garnier et al, communication personnelle)

Concentration en métaux (nM)	Toulon	Banyuls-sur-Mer
Zinc	173 – 461	5,7 – 13,9
Plomb	2,4 – 5,4	0,3 - 1,0
Cuivre	35,8 – 105,5	4,4 – 5,5

Enfin, pour caractériser ces biofilms deux séries d'échantillonnage ont été réalisées. Une première s'est déroulée de mai à juillet 2014 sur une durée totale de 2,5 mois. Des échantillons soumis à des conditions statiques ont été immergés conjointement dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer. Une deuxième série d'échantillonnage a été réalisée de juin à août 2015 (soit également sur une durée totale de 2,5 mois) ; elle a permis de collecter des échantillons soumis à un régime dynamique ayant été immergés dans la rade de Toulon. Les deux campagnes ont été mises en œuvre en été car il s'agit de la saison où la colonisation est la plus importante. Elles ont été réalisées à la même période afin de minimiser les variations temporelles inter-séries. Il semblerait toutefois que

ce paramètre ait moins d'impact sur les biofilms formés *in situ* que le revêtement utilisé ou le site d'immersion (Briand et al, sous presse).

Dans le cadre de la 1^{ère} série d'échantillonnage, 69 plaques de 25 cm² ont été immergées et échantillonnées sur un radeau dans une darse de la rade de Toulon (Figure 26). La cinétique de formation des biofilms a été testée sur trois revêtements (PVC, SPC et FRC1) en triplicats à six temps d'immersion (t_1 : 1j, t_2 : 4j, t_3 : 8j, t_4 : 12j, t_5 : 20j, t_6 : 28j) et sur quatre revêtements (PVC, SPC, FRC1 et FRC2) en triplicats après 2,5 mois (t_7) d'immersion.



Figure 26 : Site des immersions statiques de la baie de Toulon. a) Vue aérienne de la petite rade de Toulon, avec en jaune (point) la localisation du radeau où ont lieu les immersions statiques (Source : <https://www.google.fr/maps/@43.1119658,5.9207914,4231m>) ; b) Vue aérienne de la darse dans laquelle se trouve le radeau (point jaune) (Source : <https://www.google.fr/maps/@43.1066415,5.9275219,446m>) ; c) Photo du radeau, barge flottante dans une darse de la petite rade de Toulon ; d) Photo des plaques immergées attachées aux racks du radeau de la rade de Toulon

Pour cette même série, 24 autres plaques de 25 cm² ont été immergées sous une bouée placée dans la baie de Banyuls-sur-Mer (Figure 27). La formation du biofilm est observée sur quatre revêtements (PVC, SPC ACWS, FRC1 et FRC2) en triplicats à 2,5 mois et 1 an d'immersion.

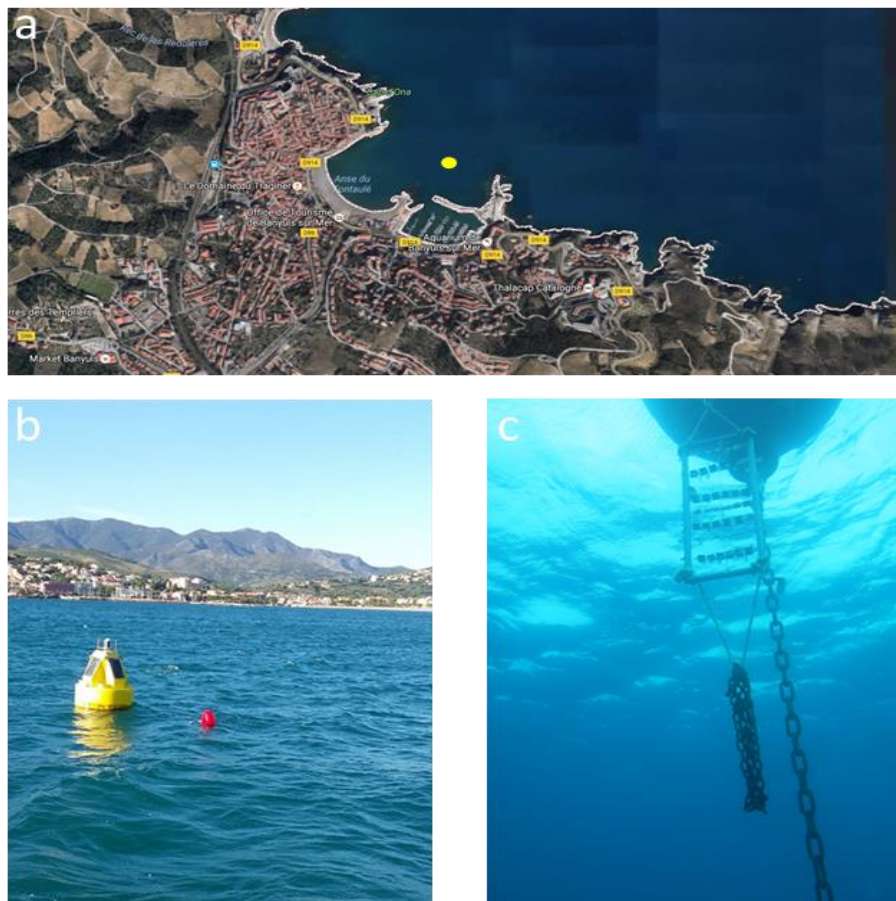


Figure 27 : Site des immersions de la baie de Banyuls-sur-Mer : a) Vue aérienne de la baie de Banyuls-sur-Mer, avec en jaune (point) la localisation de la bouée sous laquelle sont immergées les plaques en condition statique (Source : <https://www.google.fr/maps/place/66650+Banyuls-sur-mer/@42.4815112,3.1323815,1072m>) ; b) Photo de la bouée dans la baie de Banyuls-sur-Mer sous laquelle sont immergées les plaques en condition statique ; c) Photo sous-marine du cadre attaché sous la bouée sur lequel sont attachées les plaques

Dans le cadre de la 2^{ème} série d'échantillonnages, 32 plaques de 50 cm² ont été immergées sur un rotor dans la rade de Toulon au niveau du site de l'IFREMER de la Seyne-sur-Mer (Figure 28). Le rotor est constitué d'une partie qui est immergée (partie rouge sur la Figure 28b) et mise en rotation grâce à un moteur à une vitesse de 150 rpm, soit une vitesse approximative de 15 nœuds. La cinétique de

formation des biofilms est testée sur trois revêtements (PVC, SPC et FRC1) en triplicats à sept temps d'immersion (t_1 : 1j, t_2 : 4j, t_3 : 8j, t_4 : 12j, t_5 : 20j, t_6 : 28j et t_7 : 2,5 mois) en triplicats.



Figure 28 : Site des immersions dynamiques de La Seyne-sur-Mer : a) Vue aérienne de la petite rade de Toulon, avec en jaune (point) la localisation du rotor où ont lieu les immersions dynamiques (Source : <https://www.google.fr/maps/@43.1119658,5.9207914,4231m>) ; b) Photo de la barge ainsi que du rotor (ici en position non-immergée) ; c) Photo des plaques PVC attachées sur la plateforme mobile du rotor ; d) Photo du rotor immergé et en fonctionnement

Comme précédemment réalisé pour le projet PREVENT, différents types d'analyse ont été menés afin de caractériser de manière quantitative et qualitative les communautés microbiennes présentes dans les biofilms formés *in situ* sur les différents types revêtements :

- ✓ L'analyse métagénomique par séquençage massif de l'ADNr 16S (pyroséquençage) ;
- ✓ L'analyse quantitative des différents groupes de microorganismes par cytométrie en flux ;
- ✓ L'analyse quantitative de la composition micro-benthique par microscopie inversée ;
- ✓ L'analyse métabolomique par UPLC-ESI-QToF-MS de la production de métabolites par les microorganismes en présence (réalisée dans le cadre de cette thèse).

Le prélèvement des biofilms *in situ* pour les analyses métabolomiques est décrit dans le Chapitre II.1.2. tandis que le protocole d'extraction du métabolome est décrit dans le Chapitre II.1.3.

En raison des courts délais pour le traitement des données (fin de campagne d'échantillonnage en septembre 2016), seuls les résultats obtenus dans le cadre de l'expérimentation en mode statique (1^{ère} série d'échantillonnage) sont décrits dans ce manuscrit.

III.2.3. Résultats et discussion

III.2.3.1. Evaluation visuelle de la colonisation des plaques immergées

Visuellement (Figure 29), la colonisation des plaques immergées dans des conditions statiques, que ce soit sur du PVC ou sur un revêtement *antifouling*, n'est pas visible et ce jusqu'au 8^{ème} jour (t_3). A partir du 12^{ème} jour (t_4), une colonisation est observée sur les surfaces en PVC mais pas sur les revêtements *antifouling* testés. Il faut attendre le 28^{ème} jour (t_6) voire 2,5 mois (t_7) pour voir apparaître les premières traces de colonisation sur les revêtements FRC et SPC. Visuellement, les deux revêtements SPC et FRC ont donc un impact sur la colonisation mais il est cependant impossible à l'œil nu de savoir lequel de ces revêtements est le plus efficace et d'avoir une indication sur celui qui le sera le plus à long terme. Les questions posées sont les suivantes : Existe-t-il des différences qualitatives de colonisation en fonction du type de revêtements ? La signature chimique des biofilms nous permet-elle de mettre en évidence une différenciation des biofilms en fonction des revêtements ? Est-il possible d'établir une relation entre les communautés de microorganismes colonisateurs et la signature chimique globale de ces biofilms formés *in situ* ?

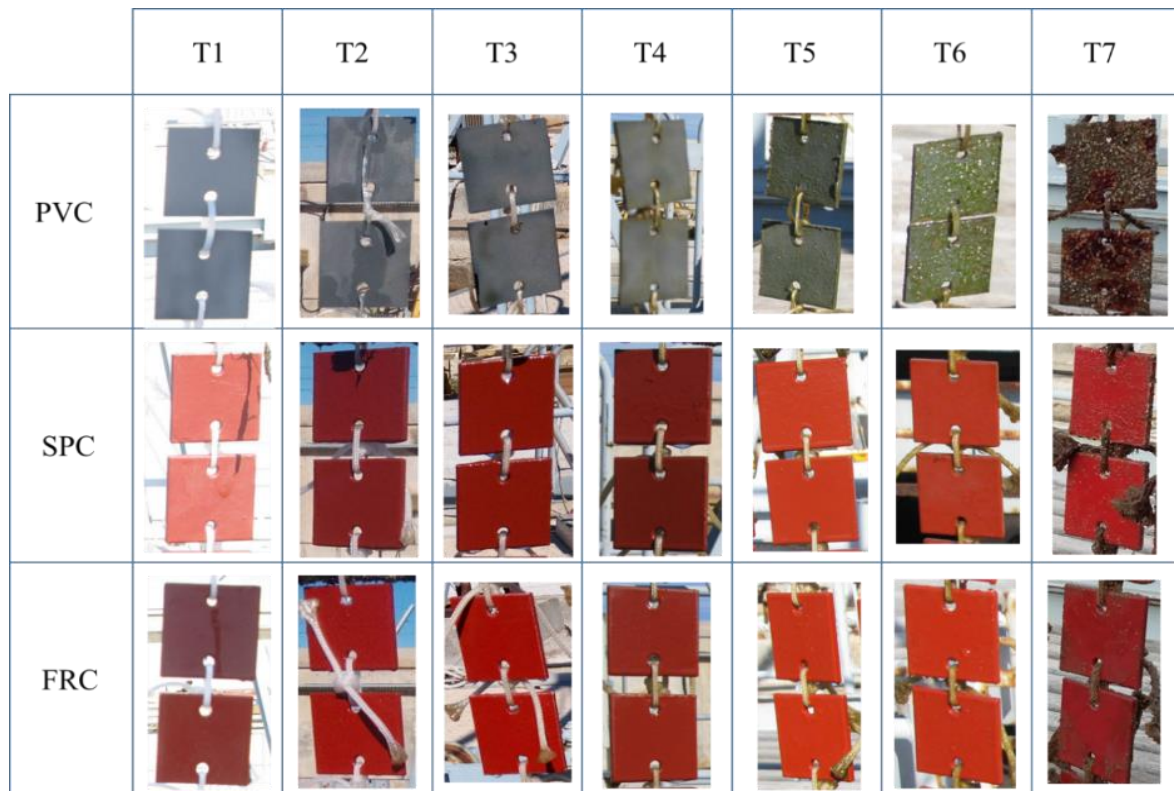


Figure 29 : Photos des plaques PVC, SPC et FRC1 montrant l'évolution visuelle de la colonisation à l'issue des sept temps d'immersion (rade de Toulon)

Dans un second temps, les plaques immergées pendant 2,5 mois dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer ont été également comparées visuellement (Figure 30).

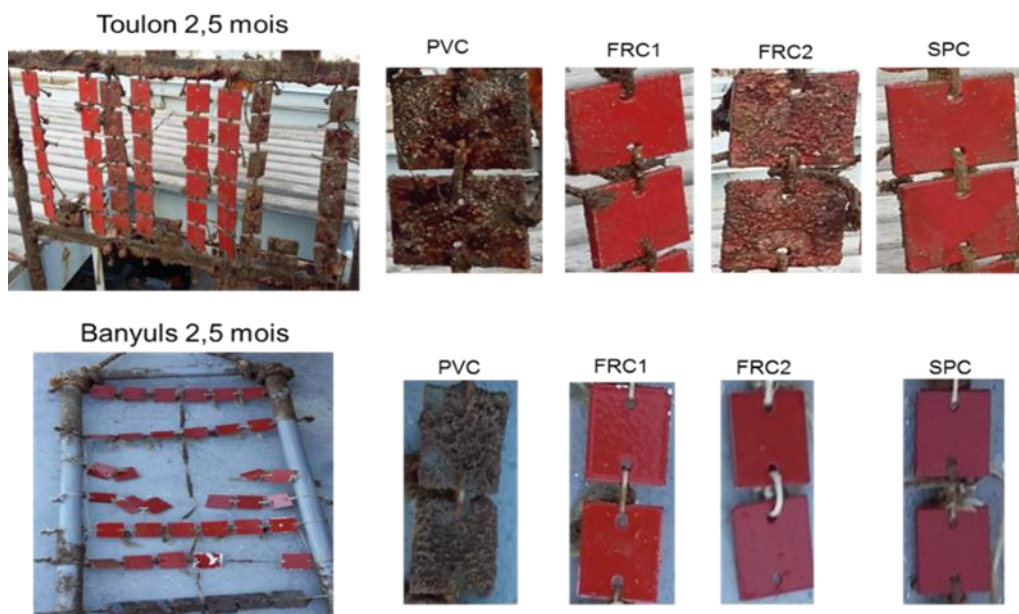


Figure 30 : Photos des plaques PVC, SPC, FRC1 et FRC2 montrant la colonisation après 2,5 mois d'immersion dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer

De nettes différences apparaissent pour des mêmes revêtements immergés au niveau des deux sites. Cette observation est particulièrement visible sur les plaques de PVC. Le lieu d'immersion semble donc avoir un impact conséquent sur la composition du biofilm formé (sur les surfaces PVC du moins). Les questions soulevées par ces observations sont les suivantes : Quels sont les groupes d'organismes colonisateurs qui diffèrent en fonction du site d'immersion ? Les revêtements *antifouling* sont-ils aussi performants au niveau des deux sites d'immersion ? La comparaison des signatures chimiques des différents biofilms nous permet-elle d'obtenir les mêmes conclusions ?

III.2.3.2. Effet du revêtement sur la signature chimique des biofilms formés *in situ*

L'ensemble des signatures chimiques de biofilms récoltés sur les plaques PVC, SPC et FRC1 à Toulon et à Banyuls-sur-Mer obtenues par UPLC-ESI-QToF-MS avec une ionisation positive et négative a été modélisée par ACP et PLS-DA. Les résultats obtenus en comparant le métabolome des biofilms qui se sont formés sur les différents types de surface testées sont représentés au niveau de la Figure 31.

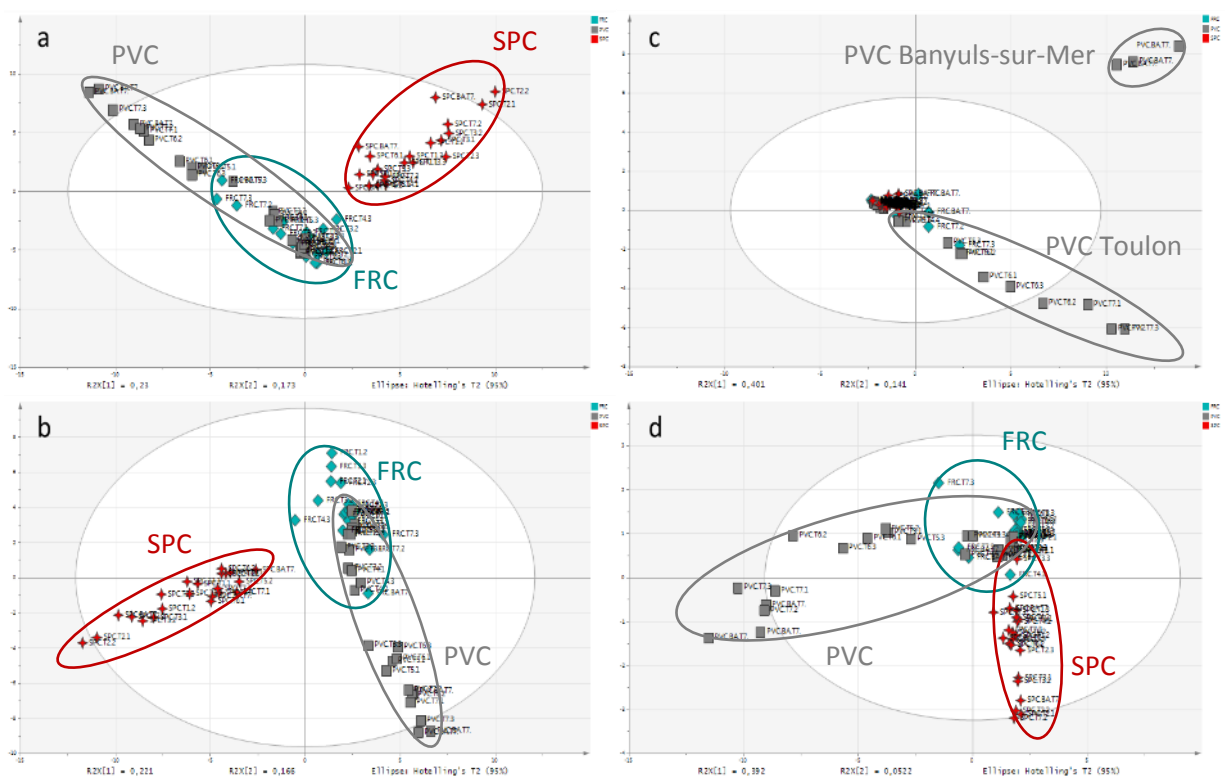


Figure 31 : Analyses (a) ACP et (b) PLS-DA (1 classe par type de surface) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues par ionisation positive. Analyses (c) ACP et (d) PLS-DA (1 classe par type de surface) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues par ionisation négative ; les échantillons analysés sont des biofilms collectés *in situ* sur des plaques PVC (■), ou recouvertes avec un revêtement SPC (✚) ou FRC (◆) prélevées aux sept temps d'immersion

Tableau 14 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms en fonction de la nature des surfaces sur lesquels ils se sont formés

Mode d'ionisation	Modèles	N ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	p ^f
Positif	3 classes	3	0,457	0,760	0,691	0,263	-0,257	< 0,001
Négatif	3 classes	6	0,704	0,815	0,725	0,454	-0,334	< 0,001

^aNombre de composantes du modèle; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y; ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation ($n = 150$); ^fValeur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA ($k \text{ fold} = 7$).

Cette figure permet d'observer le fort impact de la nature des revêtements sur le métabolome des biofilms formés *in situ* à leur surface. L'ACP présentée sur la Figure 31a montre que la 1^{ère} composante, expliquant 23% de la variance totale du jeu de données, permet de discriminer parfaitement les biofilms formés sur les revêtements SPC de ceux provenant des surfaces PVC ou FRC1. La distinction entre le métabolome des biofilms formés sur des surfaces PVC et FRC est quant à elle moins évidente. En effet, les points qui correspondent aux échantillons récoltés sur ces deux surfaces sont en partie confondus. Le temps d'immersion semble néanmoins être un paramètre important pour une discrimination potentielle de ces échantillons. En effet, pour la surface PVC, les échantillons récoltés aux temps t_1 , t_2 et t_3 sont regroupés puis un décrochement et une distinction beaucoup plus nette est observée pour les échantillons collectés à des temps plus longs. La même tendance est observée pour les revêtements FRC avec un regroupement des échantillons aux six premiers temps d'immersion et une nette distinction des échantillons prélevés au temps t_7 . Il semble donc que les signatures des biofilms formés sur du PVC ou le FRC soient vraiment très semblables aux premiers temps d'immersion mais, qu'au fur et à mesure de la durée d'immersion, une évolution apparaît, dès t_4 pour la surface PVC, et une même tendance est visible, mais seulement à partir de t_7 pour le revêtement FRC. Ainsi l'évolution de la signature chimique des biofilms formés sur les surfaces FRC évoluerait de la même manière que celle des biofilms présents sur des surfaces PVC mais avec un certain temps de latence. L'analyse statistique discriminante PLS présentée en Figure 31b a été réalisée en divisant le jeu de données en trois classes correspondant aux trois types de surfaces. Le modèle ainsi construit est statistiquement validé (Tableau 14) et présente les mêmes particularités que le modèle ACP présenté sur la Figure 31a.

Les mêmes échantillons ont été analysés avec un mode d'ionisation négatif. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'ACP sur la Figure 31c. Avec ce mode d'ionisation, le profil de discrimination diffère. En effet, alors qu'en mode positif il était aisé de distinguer les échantillons collectés sur des revêtements SPC de ceux provenant d'autres types de surface, il n'est pas possible en mode négatif de

réaliser cette même discrimination. Il est d'ailleurs observé que les échantillons correspondant aux biofilms formés sur les deux types de revêtements *antifouling* sont regroupés au centre du « score plot » suggérant ainsi une faible variabilité métabolique. Les biofilms formés sur les surfaces PVC montrent au contraire une dispersion importante en accord avec une production métabolique plus diversifiée. Une différence notable est observée avec ce mode d'ionisation négatif pour les échantillons de biofilms récoltés sur des surfaces PVC à Banyuls-sur-Mer qui se distinguent beaucoup plus de ceux provenant de Toulon à des mêmes temps d'immersion. Lorsque de la même façon qu'avec les données obtenues en mode positif, un modèle PLS-DA est construit, il est alors possible de discriminer les biofilms en fonction de la surface sur laquelle ils ont été récoltés. Le modèle ainsi est validé statistiquement (Tableau 14). Contrairement au modèle PLS-DA obtenu en mode positif, la 1^{ère} composante principale permet, dans ce cas, la discrimination des échantillons prélevés sur les surfaces PVC à des temps d'immersion assez longs (à partir de t_5) par rapport à ceux collectés sur les deux autres types de surface (FRC et SPC).

Ainsi, à l'issue de ces analyses, il apparaît que la signature chimique des biofilms est conditionnée par la nature du revêtement sur lequel ils se sont formés *in situ*. L'analyse métabolomique en mode positif permet de discriminer les échantillons provenant de surfaces SPC, tandis que celle réalisée en mode négatif montre une nette distinction des échantillons récoltés sur des surfaces PVC à des temps d'immersion longs. En ce qui concerne la discrimination des échantillons prélevés sur du PVC et du FRC, les mêmes tendances sont observées en modes positif et négatif avec une faible différenciation aux temps d'immersion courts et des différences de plus en plus marquées dès t_5 pour le PVC et à partir de t_7 pour le FRC.

Il est également intéressant de remarquer que globalement la nature du revêtement semble avoir un impact plus important que le lieu d'immersion sur la signature chimique des biofilms. En effet, les échantillons récoltés à Banyuls-sur-Mer apparaissent dans les mêmes groupes (en fonction des revêtements) que les échantillons prélevés sur des surfaces similaires à Toulon. Cette conclusion reste nuancée car elle ne s'applique pas aux biofilms provenant des surfaces PVC puisqu'en mode négatif la signature chimique de ces échantillons collectés à Banyuls-sur-Mer est nettement différenciée de ceux de Toulon.

Afin d'avoir plus d'informations sur la variation métabolique ayant lieu entre les différents échantillons de biofilm prélevés sur les 3 différents revêtements, la recherche de biomarqueurs a ensuite été réalisées à partir du modèle PLS-DA généré avec les données UPLC-HRMS avec le mode d'ionisation

positif (Figure 31b). Ce modèle possède 391 métabolites dont la valeur de VIP (Importance de la variable sur la projection) est supérieure à 1. Afin d'améliorer la robustesse du modèle et de cibler les métabolites les plus importants dans la discrimination, un nouveau modèle est généré avec ces 391 métabolites (Tableau 15). L'opération est répétée une seconde fois avec les 99 métabolites dont la valeur de VIP est supérieure à 1 dans ce modèle (Tableau 15). Finalement, ce troisième modèle sera conservé car une autre réduction du nombre de variables diminue sa robustesse. 36 métabolites ont une valeur de VIP supérieure à 1 et les 20 dont la valeur est la plus importante seront plus particulièrement étudiés. La grande majorité de ceux-ci caractérisent les biofilms formés sur des revêtements SPC. Deux d'entre eux sont caractéristiques des biofilms des temps t_5 , t_6 , t_7 formés sur des revêtements PVC et deux autres caractérisent les revêtements FRC (Figure 32). Les formules pour ces composés sont proposées dans le Tableau 16.

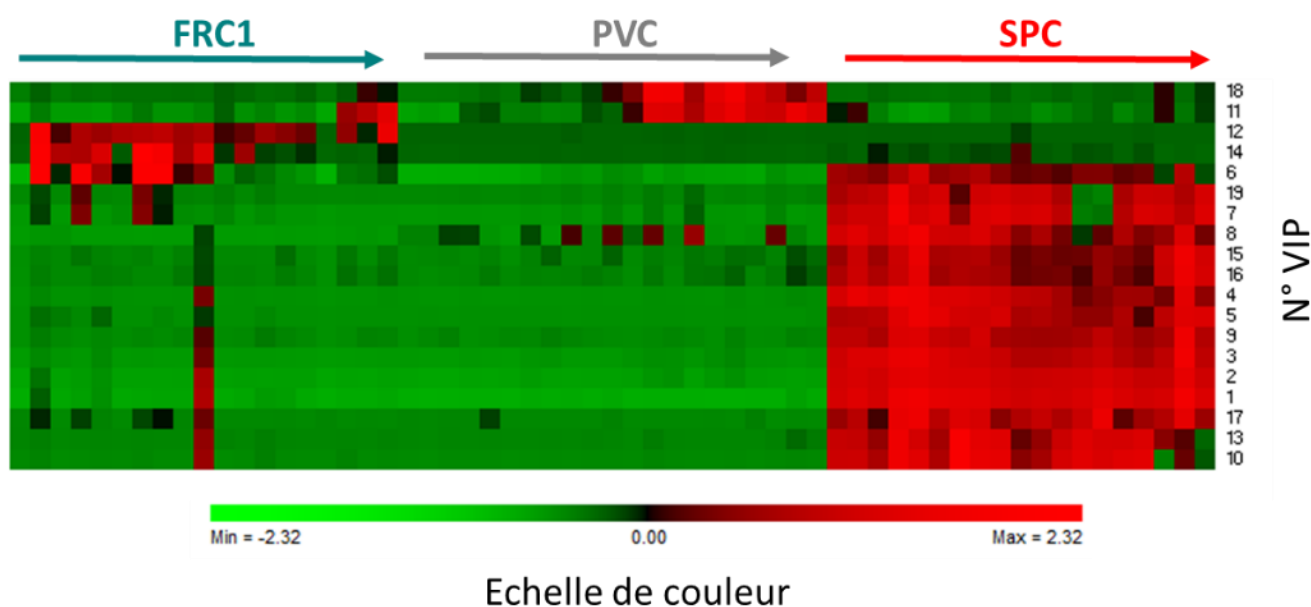


Figure 32 : Représentation *heatmap* à partir des données UPLC-HRMS des métabolites (valeur VIP > 1,1) discriminants entre les revêtements FRC1, PVC et SPC

Tableau 15 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms en fonction de la nature des surfaces sur lesquels ils se sont formés

SPC/FRC1/PVC Variables utilisées	Modèles	N ^{°a}	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	p ^f
VIP > 1 du modèle Figure 31b (1)	3 classes	3	0,566	0,758	0,705	0,170	-0,250	< 0,001
VIP > 1 de (1)	3 classes	3	0,718	0,760	0,721	0,119	-0,230	< 0,001

^aNombre de composantes du modèle; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y; ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation (n = 150); ^fValeur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA (k fold = 7).

Tableau 16 : Liste des biomarqueurs (Valeur VIP > 1,1) identifiés par UPLC-HRMS pour la discrimination des biofilms formés sur les revêtements PVC, FRC et SPC

N° VIP	m/z	RT (s)	Valeur de VIP	Formule	Erreur de masse (ppm)	mσ ^a
1	332,2945	436	2,0	C ₂₂ H ₃₈ NO	0,7	23,0
2	328,2633	400	1,8	C ₂₂ H ₃₄ NO	0,4	14,1
3	326,2476	395	1,6	C ₂₂ H ₃₂ NO	-1,5	5,7
4	342,2428	356	1,5	C ₂₂ H ₃₂ NO ₂	-0,1	2,2
5	411,2466	423	1,6	C ₂₅ H ₃₅ N ₂ OS	-0,3	19,9
6	312,3626	362	1,4	C ₂₁ H ₄₆ N	-0,5	11,8
7	406,2775	325	1,4	C ₂₄ H ₄₀ NO ₂ S	-0,2	16,9
8	368,2561	366	1,4	C ₁₇ H ₃₉ NO ₅ P	-0,1	22,8
9	334,3101	450	1,3	C ₂₂ H ₄₀ NO	0,9	2,6
10	314,2837	292	1,3	C ₂₁ H ₃₁ NO	1,4	2,0
11	104,1070	41	1,3	C ₅ H ₁₄ NO	0,0	2,3
12	606,3698	191	1,2	C ₂₆ H ₅₆ NO ₁₄	-0,4	0,4
13	318,3155	317	1,2	C ₂₂ H ₄₀ N	0,1	4,3
14	242,2842	295	1,2	C ₁₆ H ₁₃ N	-0,6	14,7
15	275,1460	61	1,2	C ₉ H ₁₉ N ₆ O ₄	0,8	15,8
16	231,1203	57	1,2	C ₇ H ₁₅ N ₆ O ₃	-1,2	6,2
17	180,0091	367	1,2	-	-	-
18	269,2110	367	1,2	C ₁₆ H ₂₉ O ₃	0,4	2,8
19	404,2619	313	1,2	C ₂₄ H ₃₈ NO ₂ S	-0,3	16,8

^aFacteur de correspondance statistique obtenu par comparaison des modèles isotopiques théoriques et observés.

De la même façon que pour l'étude précédente, les formules brutes de la plupart des composés sont retrouvées dans les bases de données mais une analyse plus poussée en UPLC-HRMS/MS sera nécessaire pour obtenir plus d'informations quant à leur nature chimique.

Pour les trois types de revêtements, une nette distinction du métabolome des biofilms a été remarquée lorsqu'ils sont récoltés à 2,5 mois (t_7). Afin de mieux appréhender l'importance de la modification de la signature chimique pour chacun des revêtements, des modèles ACP ont été construits en tenant compte de la signature chimique des biofilms sur les trois types de surfaces à des temps identiques d'immersion courts (t_1 et t_2) ou longs (t_7) (Figure 33).

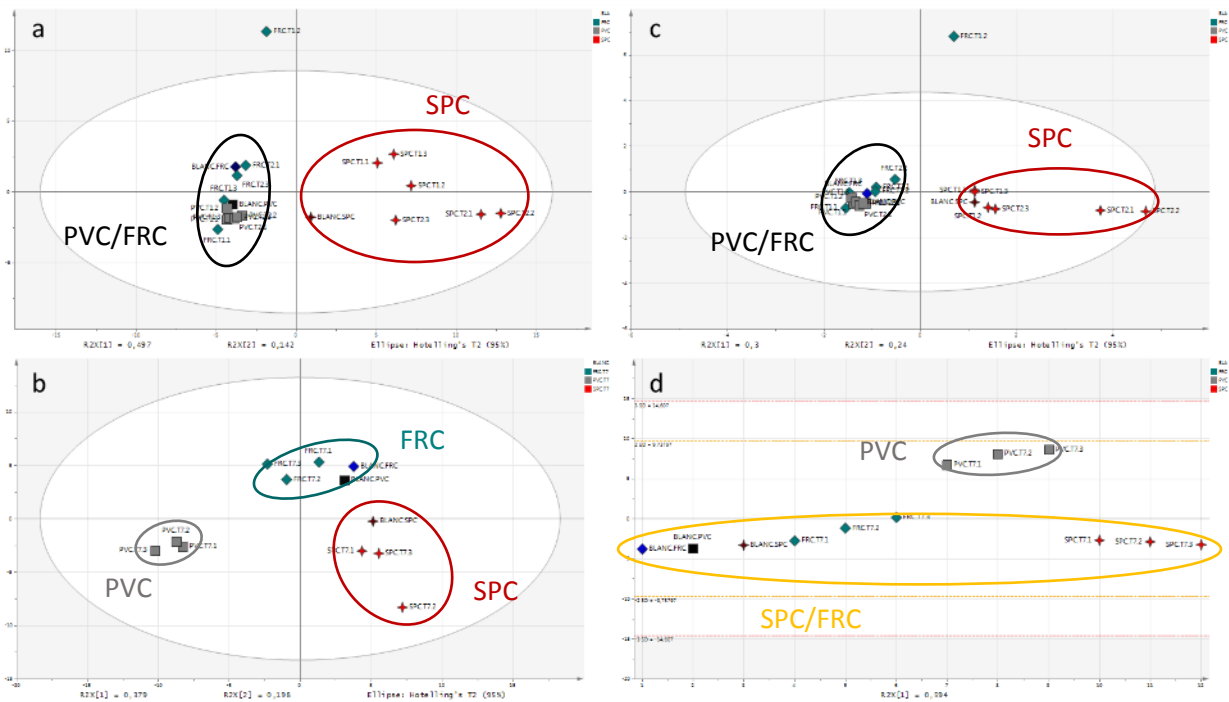


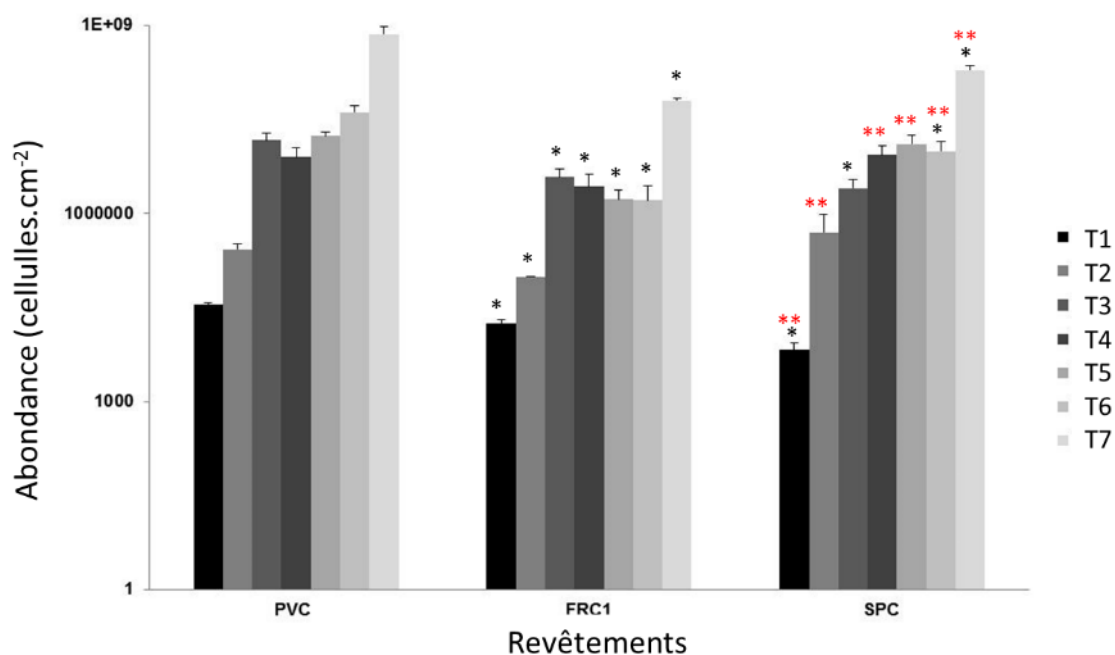
Figure 33 : Analyses ACP des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues (a) en ionisation positive et (c) en ionisation négative sur des biofilms prélevés à t_1 (1j) et t_2 (4j) ; analyses ACP des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues (b) en ionisation positive et (d) en ionisation négative sur des biofilms prélevés à t_7 (2,5 mois) sur des revêtements PVC (■), FRC (◆) et SPC (†)

Ainsi, aux temps d'immersion courts (t_1 et t_2), les échantillons provenant des revêtements SPC montrent des signatures chimiques nettement différenciées et ce, quelle que soit la méthode d'ionisation, tandis que les échantillons provenant des surfaces PVC et FRC restent quant à eux regroupés (Figures 33a et 33c). D'autre part, pour chacun des types de surfaces, les « blancs » se démarquent peu des échantillons : cette analogie des signatures chimiques témoigne d'une faible diversité chimique des biofilms formés (ou non) à la surface des revêtements. Ainsi, la forte discrimination en début d'immersion des échantillons prélevés sur les revêtements SPC pourrait s'expliquer par un relargage des composants chimiques entrant dans la composition de ce type de revêtement.

Aux temps d'immersion longs (supérieurs à 28j), les signatures chimiques des échantillons récoltés sur des surfaces SPC et FRC sont rassemblées dans des groupes distincts tout en étant toujours proches

de celles de leurs « blancs » respectifs (Figures 33b et 33d). Les échantillons provenant des surfaces PVC sont également regroupés mais considérablement éloignés de l'échantillon « blanc PVC ». Ainsi la réponse métabolique à 2,5 mois est beaucoup plus importante pour les biofilms formés *in situ* sur une surface PVC que sur des revêtements *antifouling* de types FRC ou SPC.

Afin d'essayer de comprendre l'origine des variations observées sur les signatures chimiques des biofilms formés *in situ*, les résultats de métabolomique sont comparés aux données d'abondances bactériennes obtenues au laboratoire (Pollet T., communication personnelle) lors de ce même projet (Figure 34).



*Différences significatives avec PVC. **Différences significatives avec PVC et FRC1.

Figure 34 : Abondances cellulaires bactériennes observées sur les trois types de surfaces (PVC, FRC1 et SPC) aux sept temps d'immersion par cytométrie en flux (Pollet T., communication personnelle)

Les trois types de revêtements peuvent être différenciés au regard de l'abondance bactérienne qui y est observée et ce, quel que soit le temps d'immersion. Globalement ce sont les surfaces PVC qui présentent les abondances bactériennes les plus importantes puis ce sont les revêtements SPC et enfin les revêtements FRC. Quels que soient les revêtements, un effet de la cinétique d'immersion est observé sur l'abondance bactérienne : une augmentation régulière de la densité bactérienne est ainsi visible en fonction de la durée d'immersion. Cette tendance est la plus marquée au niveau des revêtements SPC : en effet, un facteur multiplicatif de 30 000 est observé entre t_1 et t_7 sur ces revêtements alors qu'il n'est que de 20 000 et de 3 000 sur les surfaces en PVC et FRC1 respectivement. Après 2,5 mois d'immersion, la densité bactérienne reste tout de même 3,5 fois moins importante sur

les revêtements SPC que sur les surfaces PVC. Il y aurait ainsi une pression supérieure pour la colonisation des revêtements SPC aux temps courts d'immersion, puis ensuite un développement plus rapide des communautés présentes. Les résultats obtenus sont surprenants. En effet, il était attendu qu'en conditions statiques dans la rade de Toulon les revêtements SPC soient plus efficaces que le revêtement FRC1. En effet, ce dernier est conçu, du fait de ses propriétés de surface, pour avoir un effet anti-colonisateur principalement en conditions dynamiques. L'une des hypothèses pour la moindre efficacité du revêtement SPC est que les conditions statiques ne facilitent pas l'érosion de la couche de surface (*leach layer*) ne permettant pas la libération de la quantité voulue de biocide.

Cette différence de densité bactérienne peut être une des explications de l'obtention de signatures chimiques différentes pour les biofilms formés sur les trois types de surface. La grande distinction de la signature des biofilms formés sur des revêtements SPC en mode d'ionisation positif de celle des biofilms formés sur des revêtements PVC observée en mode d'ionisation négatif suggère l'implication d'espèces chimiques différentes. D'autre part, la variation chimique observée peut être en relation avec le degré de maturation du biofilm, comme cela a déjà été décrit dans une étude précédente (Chung et al., 2010). Lors de la maturation du biofilm, de nouvelles espèces chimiques sont produites en lien avec un nouvel équilibre au niveau des communautés bactériennes présentes. D'ailleurs, la présence de communautés différentes pourrait également fortement impacter les signatures chimiques des biofilms. Afin d'étudier la validité de cette hypothèse, les résultats de métabolomique ont été comparés aux données de diversité microbienne (Pollet T., communication personnelle) obtenues dans le cadre de ce projet sur les mêmes échantillons immergés jusqu'à t_6 (Figure 35).

Les résultats montrent qu'après 28 jours d'immersion les trois types de surfaces sont colonisés par des communautés différentes. La diversité bactérienne paraît moins importante au sein des biofilms qui se sont formés *in situ* sur les revêtements SPC. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'une certaine « pression de sélection » qui s'effectue à la surface de ces revêtements. En termes de représentativité des différents groupes bactériens, les Bacteroidetes sont moins représentées dans les biofilms formés sur les revêtements FRC et SPC. La présence de ces organismes, qui étaient majoritaires sur les surfaces en PVC, est ainsi réellement impactée par la présence d'un revêtement *antifouling*. Une tendance inverse est observée pour le groupe des γ -Proteobacteria (Alteromonadales) avec une abondance relative supérieure sur les revêtements *antifouling* par rapport aux surfaces PVC. En ce qui concerne les revêtements de type SPC, le groupe des α -Proteobacteria (Sphingobacteria) est plus représenté que sur les autres types de surfaces : la « pression de sélection » a donc favorisé la colonisation spécifique de ces surfaces par des espèces appartenant à ce groupe bactérien.

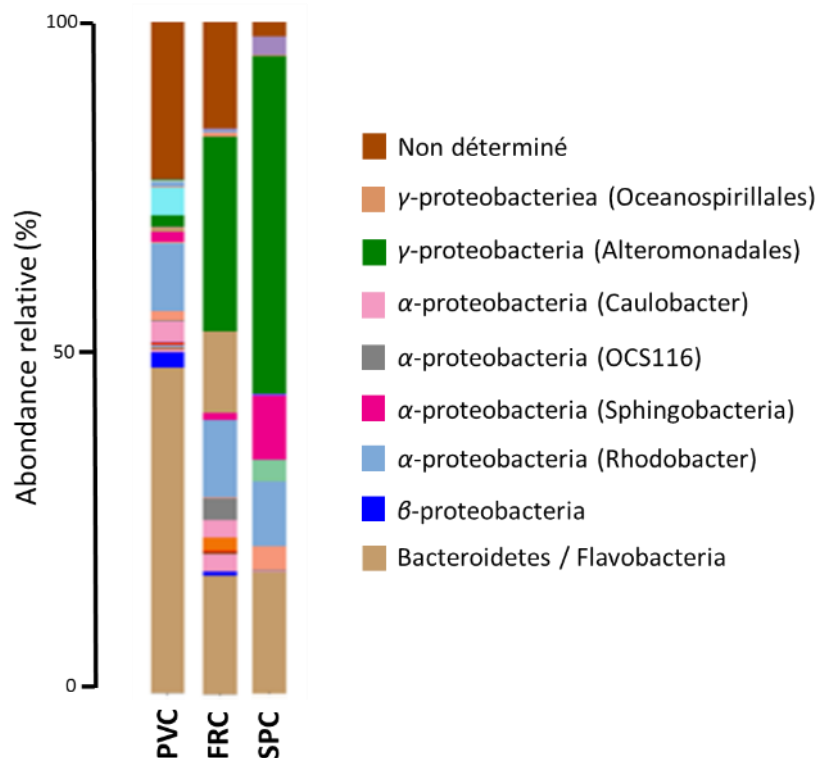


Figure 35 : Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l'ADNr (Illumina miseq) sur des surfaces de type PVC, FRC et SPC à t_6 (Pollet T., communication personnelle)

Les différences de signatures chimiques des biofilms formés sur les trois types de surfaces peuvent donc être justifiées par la mise en évidence de variations quantitatives (abondances bactériennes) mais également qualitatives (abondances relatives des différents groupes bactériens) des communautés bactériennes qui s'y développent. Ainsi, il est possible d'envisager que la signature chimique des biofilms formés sur les revêtements PVC soit fortement impactée par le métabolome des Bacteroidetes qui y sont majoritaires tandis que celle des biofilms collectés sur les surfaces SPC est plutôt reliée à la production métabolique des γ -Proteobacteria (Alteromonadales) et des α -Proteobacteria (Sphingobacteria). Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus lors d'une étude pour laquelle une plus forte proportion d' α -Proteobacteria et une présence moins importante des Bacteroidetes (Flavobacteria) avaient été relevées sur les revêtements SPC par rapport à des surfaces contrôles (Muthukrishnan et al., 2014).

III.2.3.3. Effet du temps d'immersion sur la signature chimique des biofilms formés *in situ*

Afin d'observer l'effet du temps d'immersion sur la signature chimique des biofilms, les échantillons prélevés sur chaque type de surfaces ont été étudiés séparément aux différents temps d'immersion.

III.2.3.3.1. Surface PVC

La Figure 36 présente les modèles ACP et PLS-DA des signatures chimiques, obtenues par UPLC-ESI-QToF-MS en modes d'ionisation positif et négatif, des échantillons de biofilms récoltés sur des surfaces PVC aux différents temps d'immersion à Toulon et à Banyuls-sur-Mer dans des conditions statiques.

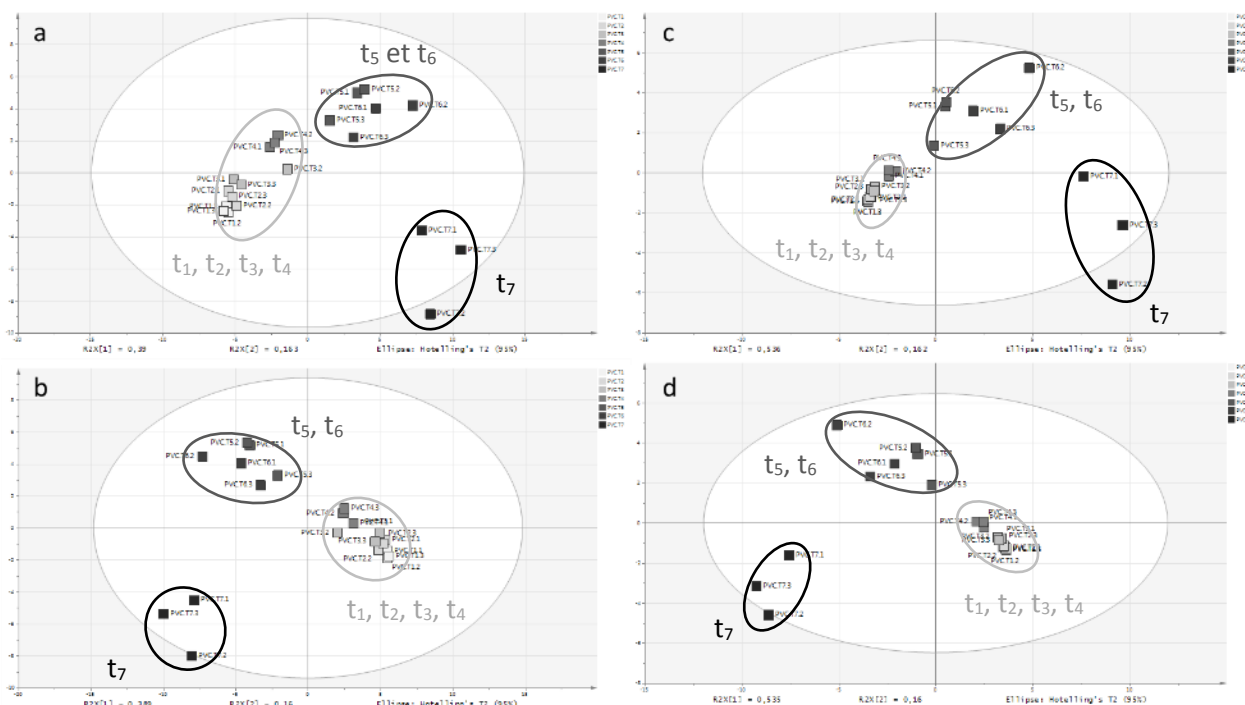


Figure 36 : Analyses a) ACP et b) PLS-DA (3 classes : 1 classe pour les temps t_1 à t_4 , 1 classe pour les temps t_5 et t_6 , et 1 classe pour le temps t_7) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en mode d'ionisation positif; analyses c) ACP et d) PLS-DA (3 classes : 1 classe pour les temps t_1 à t_4 , 1 classe pour les temps t_5 et t_6 , et 1 classe pour le temps t_7) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en mode d'ionisation négatif; les échantillons correspondent à des biofilms provenant de surfaces en PVC prélevées aux sept temps d'immersion dans la rade de Toulon

Tableau 17 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms formés *in situ* sur des surfaces PVC aux différents temps d'immersion dans la rade de Toulon

Mode d'ionisation	Modèles	N ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
Positif	3 classes	5	0,731	0,993	0,909	0,760	-0,340	< 0,001
Négatif	3 classes	5	0,850	0,991	0,941	0,638	-0,373	< 0,001

^aNombre de composantes du modèle; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y; ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation ($n = 150$); ^fvaleur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA ($k\ fold = 7$).

Les Figures 36a et 36c représentent les modèles ACP construits avec les données LC-MS obtenues en modes d'ionisation respectivement positif et négatif. La 1^{ère} composante principale permet dans les deux cas de discriminer les échantillons récoltés aux temps d'immersion initiaux (t_1 à t_4) de ceux formés à des temps plus longs (t_5 et t_6 , ainsi que t_7). Dans chaque cas, une nette différenciation de la signature chimique des biofilms est observée après 12 jours d'immersion ($t > t_4$). La 2^{ème} composante principale permet ensuite pour chaque mode d'ionisation de différencier les échantillons obtenus aux temps t_5 et t_6 de ceux formés à l'issue du temps t_7 . Ceci illustre une deuxième évolution notable de la réponse métabolique des biofilms entre 28j (t_6) et 2,5 mois (t_7) d'immersion. Les modèles PLS-DA construits avec ces trois différentes classes (t_1 à t_4 ; t_5 et t_6 ; t_7) sont statistiquement validés (Tableau 17) et confirment les observations faites avec les ACP. Il est donc clair que la réponse métabolique des biofilms formés *in situ* sur des surfaces PVC est fortement impactée par la durée d'immersion lorsque ces derniers sont récoltés sur des surfaces PVC dans la rade de Toulon, et ce dès le 12^{ème} jour (t_4) et quel que soit le mode d'ionisation.

Les résultats des mesures d'abondances des cellules bactériennes (Figure 34) précédemment présentés montrent une augmentation significative de ce type d'organismes tout au long de la cinétique de prélèvement sur les surfaces PVC. Il en est en réalité de même pour tous les organismes procaryotes (bactéries et archées) ainsi que pour les organismes autotrophes (phytoplancton) (Données non présentées; Pollet T., communication personnelle). Cette augmentation de densité cellulaire, donc du nombre de microorganismes, entre le premier et le dernier prélèvement impacte probablement fortement la signature chimique des biofilms récoltés à ces temps d'immersion.

En ce qui concerne la structure de communautés bactériennes (Figure 37), une grande variabilité est observée les premiers jours d’immersion, puis à partir de 20j (t_5) une certaine stabilisation apparaît avec des abondances relatives qui restent similaires pour les groupes bactériens majoritaires.

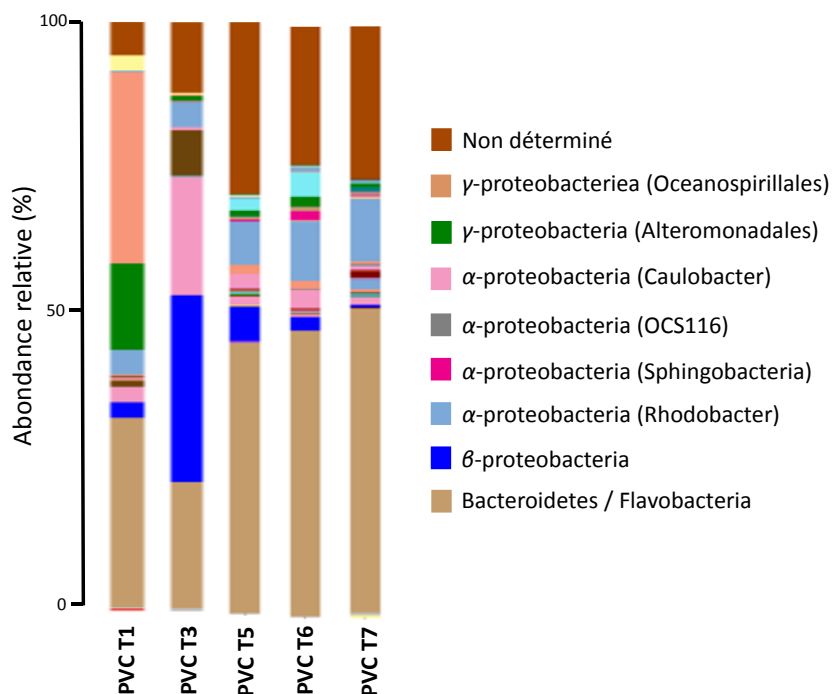


Figure 37 : Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l’ADNr (Illumina miseq) sur des revêtements PVC après 1j (t_1), 8j (t_3), 20j (t_5), 28j (t_6) et 2,5 mois (t_7) d’immersion dans la rade de Toulon (Pollet T., communication personnelle)

Dans les biofilms de plus de huit jours, l’abondance des γ -Proteobacteria (Alteromonadales), des γ -Proteobacteria (Oceanospirillales) et des β -Proteobacteria diminue tandis que les Bacteroidetes, et à un moindre niveau les β -Proteobacteria (Rhodobacteria), tendent à augmenter. Ce profil d’évolution des communautés présente une certaine analogie avec les variations observées sur les signatures chimiques des biofilms. En effet, dans les deux cas il y a une nette distinction entre les temps courts d’immersion et les temps plus longs. Il semble y avoir une stabilisation des structures des communautés à partir du temps t_5 et des signatures chimiques proches sont observées pour les temps t_5 et t_6 . Cependant, la signature chimique des échantillons du temps t_7 est bien distincte de celle des temps t_5 et t_6 alors que les communautés présentes sont similaires. Cette différence dans la signature chimique peut alors être expliquée par l’augmentation du nombre d’individus ou par l’expression de nouveaux métabolites du fait de la maturité des biofilms. Enfin, au vu des différences observées sur la structure des communautés aux temps courts, il peut paraître surprenant que les signatures chimiques

observées à ces mêmes temps soient si proches. Cette analogie des signatures chimiques peut être expliquée par une faible densité cellulaire et donc une expression métabolique plus faible par rapport aux temps d'immersion plus avancés.

III.2.3.3.2. Revêtement SPC

Les échantillons récoltés sur les surfaces SPC sont ensuite de la même façon observés individuellement. Compte-tenu de la distribution des échantillons sur les ACP obtenues avec les données LC-MS, notamment celles en mode d'ionisation positif (Figure 31a et 31b), il apparaît que le temps d'immersion a un effet sur la signature chimique des biofilms formés sur les revêtements de type SPC. Ainsi, lorsque les échantillons récoltés sur ce type de revêtement sont examinés de façon indépendante (Figure 38), il est effectivement possible d'observer une évolution des signatures chimiques en fonction du temps d'immersion.

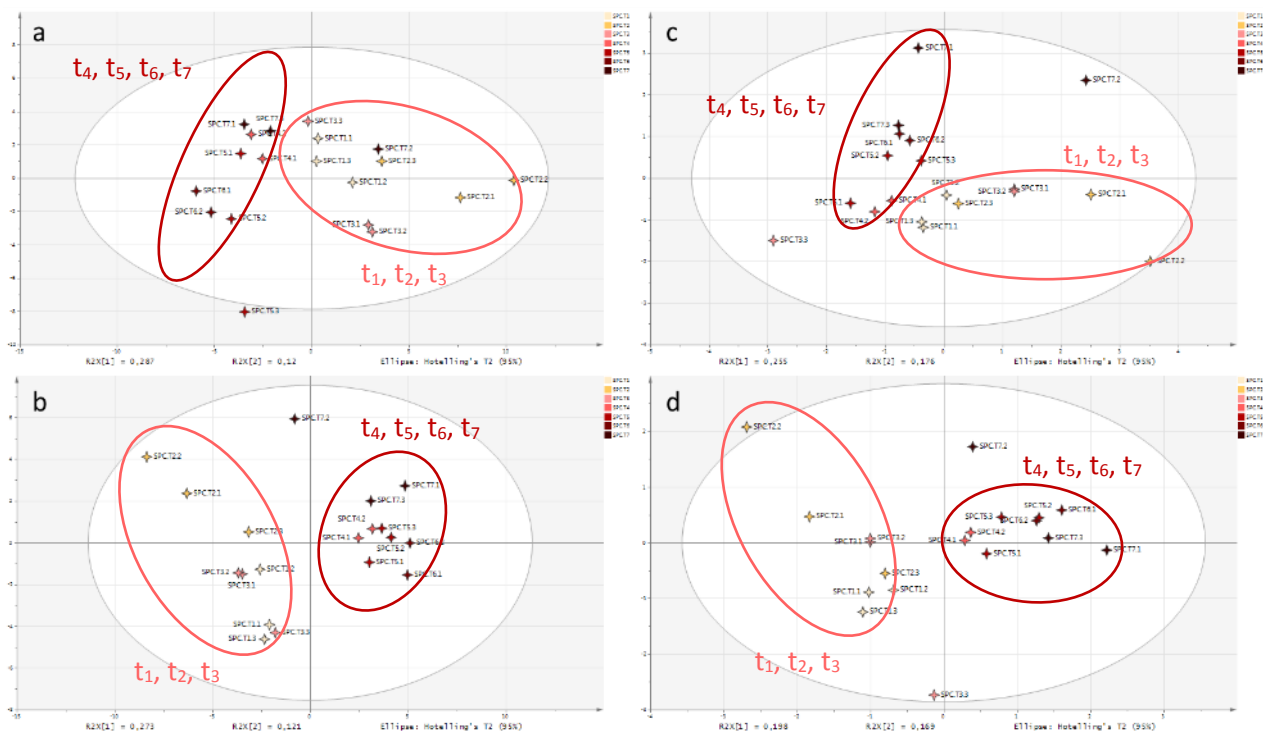


Figure 38 : Analyses a) ACP et b) PLS-DA (2 classes : 1 classe pour les temps t_1 à t_3 et 1 classe pour les temps t_4 à t_7) des données obtenues par UPLC-ESI-QToF-MS en mode d'ionisation positif; analyses c) ACP et d) PLS-DA (2 classes : 1 classe pour les temps t_1 à t_3 et 1 classe pour les temps t_4 à t_7) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en mode d'ionisation négatif; les échantillons correspondent aux biofilms formés *in situ* sur les revêtements SPC prélevés aux sept temps d'immersion dans la rade de Toulon

Tableau 18 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés sur les revêtements SPC en fonction du temps d'immersion (rade de Toulon)

Mode d'ionisation	Modèles	N ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	p ^f
Positif	2 classes	2	0,394	0,945	0,837	0,730	-0,128	< 0,001
Négatif	2 classes	5	0,612	0,996	0,863	0,976	0,111	0,049

^aNombre de composantes du modèle; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y; ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation ($n = 150$); ^fValeur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA ($k\ fold = 7$).

Les Figures 38a et 38c représentent les modèles ACP générés respectivement avec les données obtenues en modes d'ionisation positif et négatif. Pour chacun d'eux, la 1^{ère} composante principale différencie les biofilms formés aux temps initiaux (t_1 à t_3) de ceux formés aux temps plus longs (t_4 à t_7). Les modèles PLS-DA à 2 classes (t_1 à t_3 et t_4 à t_7) présentés sur les Figures 38b et 38d confirment cette discrimination et sont statistiquement corrects (Tableau 18). Ces analyses révèlent donc qu'il y a une réelle évolution de la signature chimique des biofilms sur les revêtements SPC immergés de façon statique entre le 8^{ème} (t_3) et le 12^{ème} jour (t_4) d'immersion dans la rade de Toulon.

Les analyses de diversité des communautés n'ont été effectuées que pour les temps t_5 à t_7 (Figure 39). Les profils des communautés montrent peu de différences aux temps t_5 et t_6 et des variations plus marquées avec notamment une diminution notable des γ -Proteobacteria (Alteromonadales) et l'augmentation des Bacteroidetes, après 2,5 mois (t_7) d'immersion.

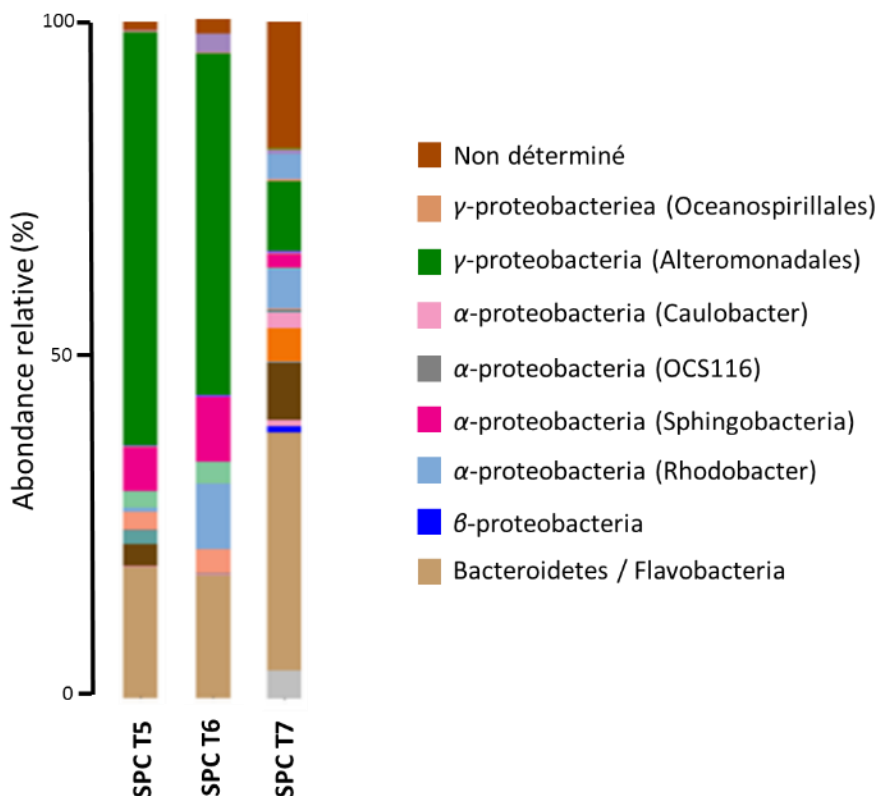


Figure 39: Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l'ADNr (Illumina miseq) sur des revêtements SPC après 20j (t_5), 28j (t_6) et 2,5 mois (t_7) d'immersion (Pollet T., communication personnelle)

III.2.3.3.3. Revêtements FRC

Finalement, de la même façon que les biofilms récoltés sur des surfaces PVC et SPC, les biofilms des surfaces FRC ont été analysés individuellement. Dans le cas de ces échantillons, les analyses statistiques montrent une évolution des signatures chimiques en fonction des temps d'immersion très différente de celles observées pour les autres types de surfaces (Figure 40).

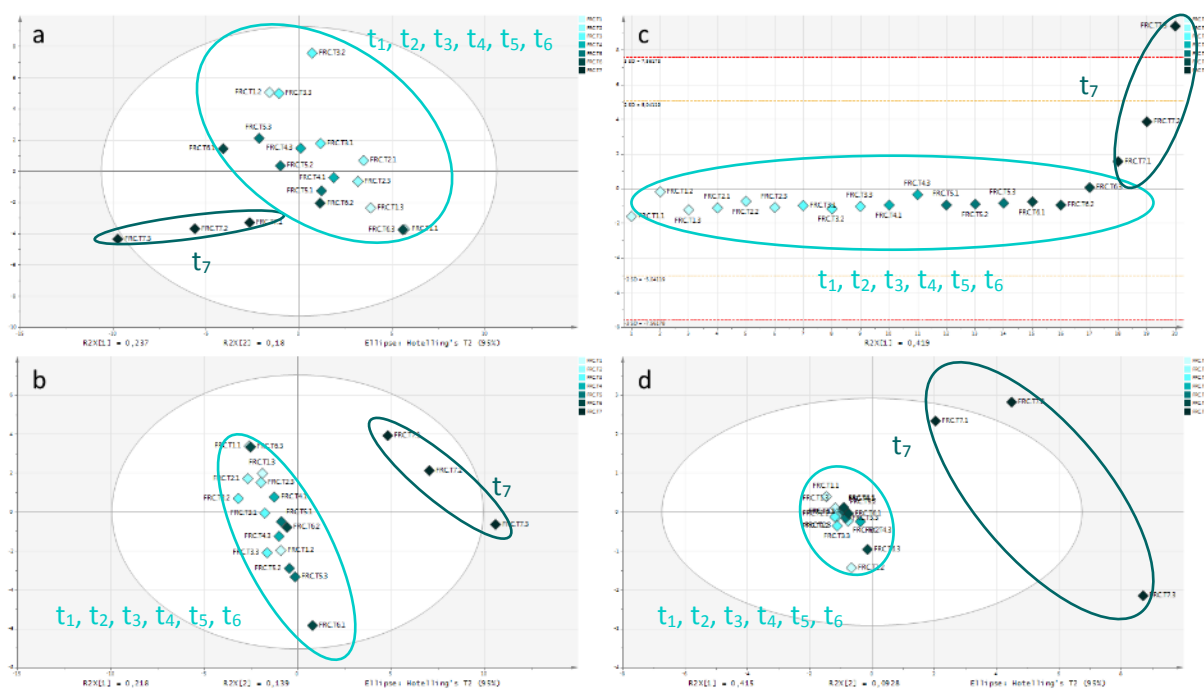


Figure 40 : Analyses a) ACP et b) PLS-DA (2 classes : 1 classe pour les temps t_1 à t_6 et 1 classe pour le temps t_7) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en mode d'ionisation positif; analyses c) ACP et d) PLS-DA (2 classes : 1 classe pour les temps t_1 à t_6 et 1 classe pour le temps t_7) des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues en mode d'ionisation négatif; les échantillons correspondent à des biofilms formés *in situ* sur les revêtements FRC et prélevés aux sept temps d'immersion dans la rade de Toulon

Tableau 19 : Résumé des paramètres d'évaluation de la qualité des modèles PLS-DA utilisés pour la discrimination des échantillons de biofilms récoltés sur les revêtements FRC en fonction du temps d'immersion (rade de Toulon)

Mode d'ionisation	Modèles	N ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	Pf
Positif	2 classes	3	0,474	0,989	0,885	0,821	-0,339	< 0,001
Négatif	2 classes	3	0,611	0,998	0,833	0,687	-0,111	0,049

^aNombre de composantes du modèle; ^bVariation modélisée cumulée dans la matrice X; ^cVariation modélisée cumulée dans la matrice Y; ^dVariation prédite cumulée dans la matrice X; ^eR et Q obtenus à l'intersection avec l'ordonnée après le test de permutation ($n = 150$); ^fValeur de p obtenue avec la validation croisée ANOVA de l'analyse PLS-DA ($k\ fold = 7$).

Sur les ACP présentées au niveau des Figures 40a et 40c, seuls les échantillons correspondant au temps t_7 sont discriminés des autres. Sur le modèle généré avec les données obtenues en mode d'ionisation négatif, une seule composante apparaît. Cette particularité des échantillons du temps t_7 est la seule source de variation importante dans le jeu de données. Cette tendance est confirmée par le modèle PLS-DA à 2 classes (t_1 à t_6 ; t_7) présenté en Figure 40b et qui est statistiquement validé (Tableau 19).

Sur des revêtements FRC immergés de façon statique à Toulon, une différenciation de la signature métabolique des biofilms naturels ne serait donc observée qu'entre 28j (t_6) et 2,5 mois (t_7) d'immersion.

L'analyse des communautés bactériennes a été réalisée sur les échantillons de biofilms formés après les temps t_5 à t_7 (Figure 41). Les structures des communautés sont assez proches aux temps t_5 et t_6 mais elles varient ensuite de façon notable au temps t_7 , avec notamment une augmentation des Bacteroidetes et une diminution des γ -Proteobacteria (Alteromonadales). Il avait été observé précédemment (Figure 31) que la signature chimique des biofilms formés sur des surfaces FRC au temps t_7 était proche de celle des biofilms récoltés aux temps t_5 et t_6 sur des surfaces PVC. En termes de communauté, c'est également le cas : la structure des communautés des biofilms formés sur des surfaces FRC après 2,5 mois (t_7) d'immersion est plus proche de celles des biofilms formés sur des surfaces PVC après 20j (t_5) et 28j (t_6) que celles des biofilms formés sur des PVC aux mêmes temps.

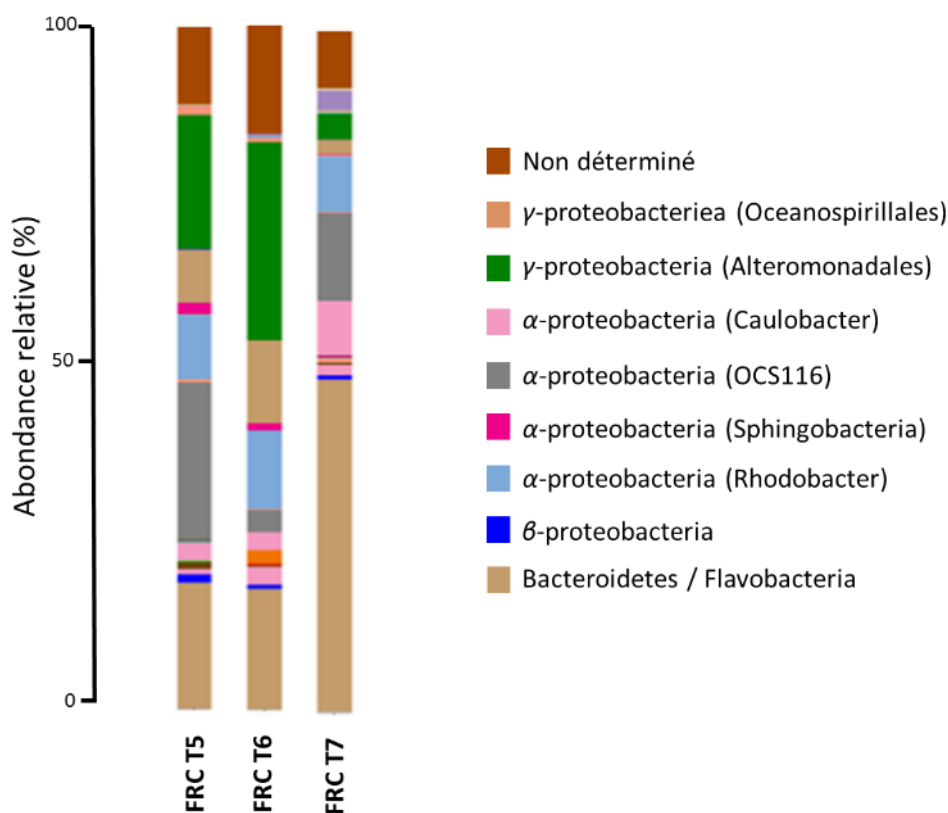


Figure 41 : Abondance relative des différentes communautés microbiennes obtenues par séquençage massif de l'ADNr (Illumina miseq) sur des revêtements FRC après 20j (t_5), 28j (t_6) et 2,5 mois (t_7) d'immersion (Pollet, communication personnelle)

Il y a donc un effet fort du temps d'immersion sur la structure des communautés présentes et sur la signature chimique des biofilms. Ainsi, les γ -Proteobacteria (Alteromonadales) sont majoritaires aux

temps t_5 et t_6 . Au temps t_7 (2,5 mois), cette tendance s'inverse avec une nette diminution de leur abondance et une augmentation des Bacteroidetes.

II.2.3.4. Effet du site d'immersion sur la signature chimique des biofilms formés *in situ*

Comme il a été commenté plus haut, à l'exception des surfaces PVC, la nature du revêtement semble avoir un impact plus important que le lieu d'immersion sur la signature chimique des biofilms formés *in situ*.

Afin de confirmer cette observation, des modèles ACP ont été construits avec les échantillons collectés aux temps t_7 sur chaque type de surfaces et au niveau des deux lieux d'immersion (Figure 42).

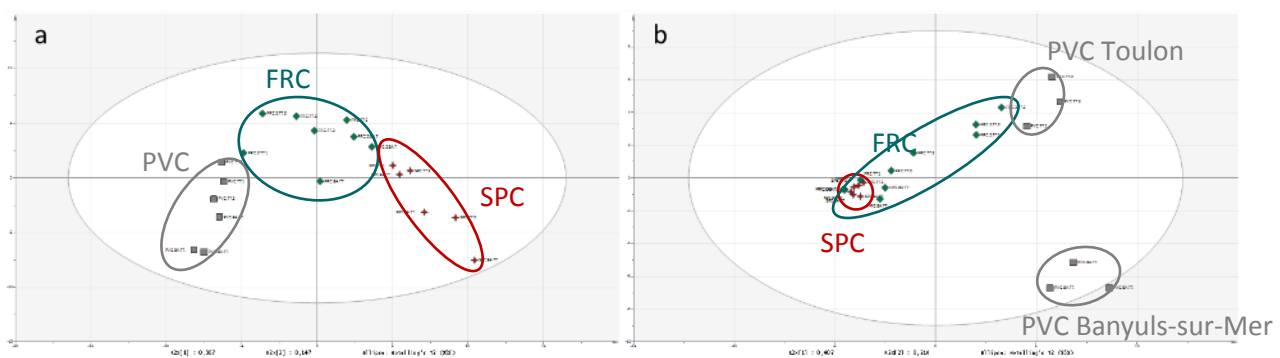


Figure 42 : Analyses ACP des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir de biofilms prélevés au temps t_7 (2,5 mois) dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer sur des surfaces PVC (■), SPC (+) et FRC (◆) en mode d'ionisation a) positif et b) négatif

Le modèle ACP correspondant aux données LC-MS obtenues avec un mode d'ionisation positif (Figure 42a) permet d'observer une discrimination des échantillons en fonction de la nature de la surface sur laquelle ils ont été récoltés. Avec un mode d'ionisation négatif, comme cela avait été précédemment observé avec la totalité des échantillons, il est difficile de discriminer les échantillons provenant des revêtements FRC de ceux issus des revêtements SPC. En revanche, les échantillons de biofilms formés sur des surfaces PVC sont nettement distincts de ceux provenant des deux autres types de revêtements. Ils sont, d'autre part, parfaitement discriminés en fonction du site d'immersion. Il est également possible d'observer que les échantillons de biofilms récoltés sur des revêtements FRC2 sont discriminés en fonction du site d'immersion alors que ce n'est pas le cas pour les échantillons récoltés sur les revêtements FRC1.

Afin d'observer l'effet de la localisation géographique sur la signature chimique des biofilms en s'affranchissant de l'impact du type de surface, le métabolome des biofilms récoltés après 2,5 mois (t_7) d'immersion dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer ont été comparés pour les trois types de surfaces pris individuellement (Figure 43).

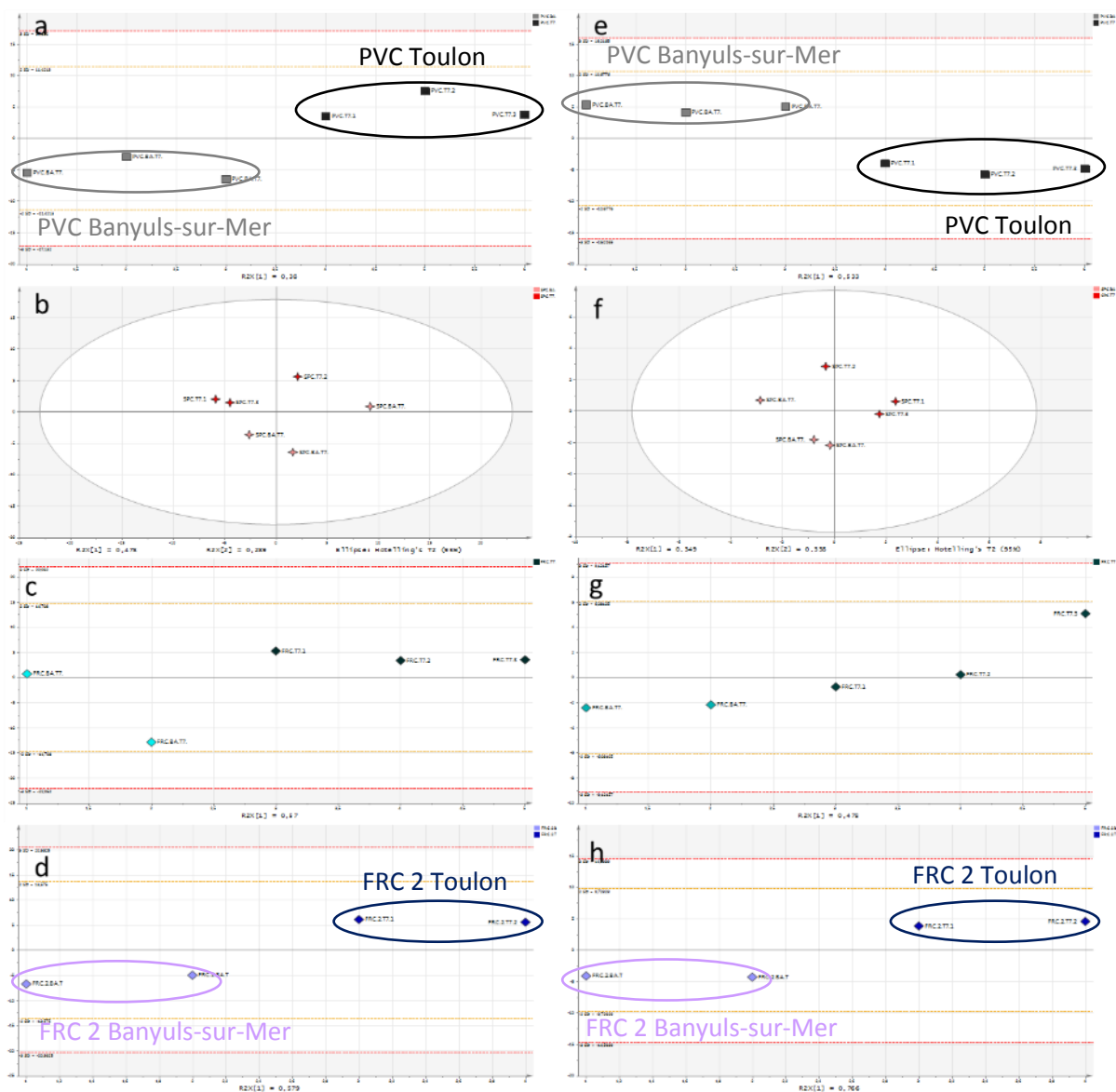


Figure 43 : Analyses ACP des données UPLC-ESI-QToF-MS obtenues à partir de biofilms prélevés au temps t_7 dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer, en mode d'ionisation positif a) sur des surfaces PVC, b) sur des revêtements SPC, c) sur des revêtements FRC1 et d) FRC2, ainsi qu'en mode d'ionisation négatif e) sur des surfaces PVC, f) sur des revêtements SPC, g) sur des revêtements FRC1 et h) FRC2

Compte tenu du faible nombre d'échantillons par condition, seuls des modèles ACP ont été élaborés car la construction de modèles PLS-DA et leur validité statistique auraient nécessité plus de réplicats. Les Figures 40a et 40e présentent ainsi les modèles ACP construits avec les échantillons récoltés sur

des surfaces PVC. Il apparaît de façon nette que le lieu d'immersion engendre une distinction marquée de la signature chimique des biofilms, et ce aussi bien en mode d'ionisation positif que négatif. Une seule composante principale explique cette discrimination dans les deux jeux de données avec respectivement, 38% et 53% de la variance totale. La discrimination des échantillons de biofilms formés sur les revêtements SPC (Figures 43b, et 43f) et FRC1 (Figure 43c et 43g) dans les deux lieux d'immersion n'est en revanche pas aussi évidente. Avec ces deux types de revêtement, le site d'immersion ne semble pas avoir d'impact (ou du moins, un impact plus limité que celui engendré par le revêtement) sur la signature chimique des biofilms formés *in situ*. Les échantillons récoltés sur des revêtements FRC2 (Figure 43d et 43h) sont quant à eux bien discriminés en fonction du site d'immersion. Cependant, comme seulement deux échantillons ont été analysés pour chaque condition (plaques décrochées pendant le temps d'immersion), les conclusions obtenues avec ce type de revêtement sont difficilement interprétables de manière robuste.

Ces données de métabolomique ont ensuite été comparées aux mesures d'abondances cellulaires des procaryotes et des organismes autotrophes effectuées sur les quatre types de revêtements après 2,5 mois (t_7) d'immersion dans la rade de Toulon et dans la baie de Banyuls-sur-Mer (Figure 44).

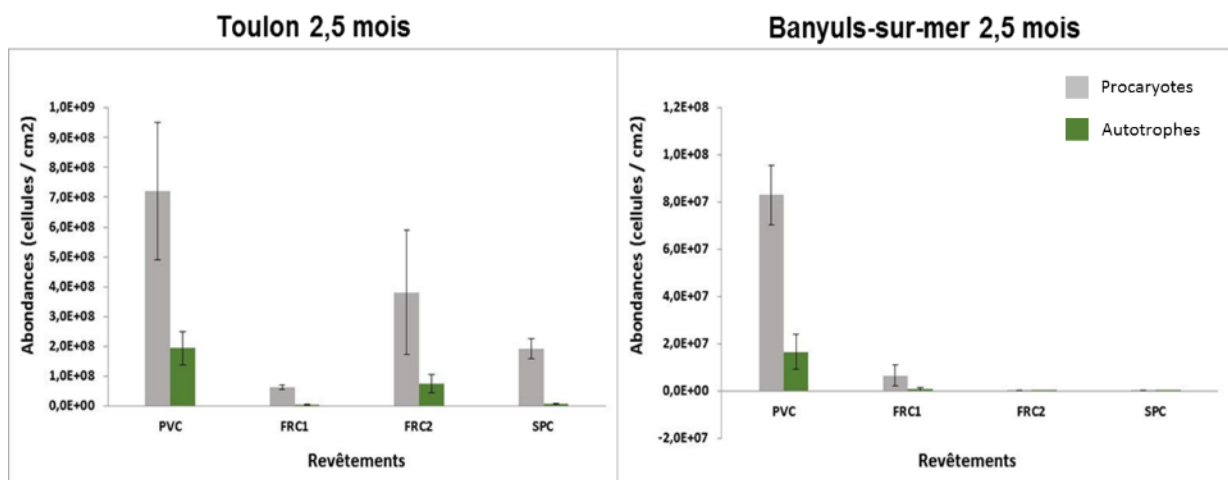


Figure 44 : Abondances cellulaires des procaryotes et des autotrophes obtenues par analyse en cytométrie de flux sur des surfaces PVC, et des revêtements SPC, FRC1 et FRC2 au temps t_7 dans la rade de Toulon et la baie de Banyuls-sur-Mer (Pollet T., communication personnelle)

Les résultats révèlent une colonisation plus importante sur les plaques immergées dans la rade de Toulon. Sur les surfaces PVC et les revêtements FRC1, les procaryotes et les autotrophes sont dix fois plus abondants à Toulon qu'à Banyuls-sur-Mer. Sur les revêtements FRC2, la totalité des organismes comptabilisés est 14 fois plus importante sur les plaques immergées dans la rade de Toulon. Les procaryotes sont également dix fois plus abondants sur les plaques SPC immergées sur ce même site.

Cette observation est moins évidente pour les organismes autotrophes qui sont seulement deux fois plus présents sur les plaques SPC dans la rade de Toulon. Ces analyses révèlent donc une différenciation des communautés sur tous les revêtements entre la rade de Toulon et la baie de Banyuls-sur-Mer. Les conditions hydrodynamiques et les concentrations en polluants métalliques sont les deux principaux facteurs de variation entre les deux sites. Comme mentionné précédemment, la composition microbienne d'un biofilm varie en fonction des forces de cisaillement externes appliquées (Valiei et al., 2012) et en fonction du degré de pollution (Briand et al., 2012). Ainsi les résultats obtenus peuvent être mis en relation avec ces précédentes études en faisant l'hypothèse que ces deux facteurs sont ceux qui influencent principalement la composition microbienne des biofilms analysés lors de cette étude.

III.2.3.5. Biofilms naturels : relations entre structure des communautés microbiennes et signature chimique

D'après les résultats présentés dans la partie III.2.3.3., les variations en termes de diversité microbienne semblent assez bien corrélées avec la discrimination des données obtenues par métabolomique. Afin de vérifier cette corrélation, un test de Mantel a été réalisé pour comparer les informations contenues dans la matrice des données de métabolomique avec celles issues des données de séquençage massif de l'ADNr de l'ensemble des biofilms formés dans les conditions statiques dans la rade de Toulon. Ce test permet de calculer la corrélation linéaire, ou la dissimilarité, existant entre deux jeux de données. Le test a été réalisé en prenant les résultats de séquençage massif à l'échelle de la classe, de la famille puis du genre (Figure 45). Les trois données statistiques de Mantel obtenues sont validées par une valeur de p inférieure à 0,01 à l'issue de 10 000 permutations aléatoires. Une corrélation absolue des deux matrices serait indiquée par une valeur de r égale à 1. Ainsi, plus r est proche de 1, plus les matrices sont corrélées. Les résultats montrent que plus l'échelle de précision de la matrice de métagénomique est importante, plus la corrélation de ces données avec celles de métabolomique est importante (Figure 45). Ainsi, quand les données de métagénomique sont interprétées à l'échelle du genre, la valeur de r est égale à 0,53. Compte tenu du caractère naturel, et donc de son caractère très fluctuant, du système biologique étudié, cette valeur indique une bonne corrélation entre les deux jeux de données.

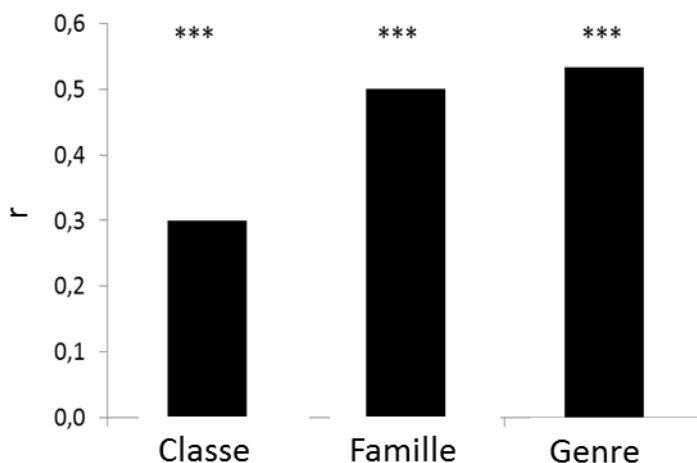


Figure 45 : Statistique r de Mantel entre les données de structure de communautés (métagénomique) et les données métabolomiques des échantillons de biofilms formés *in situ* à tous les temps d'immersion sur les revêtements PVC, SPC et FRC dans la rade de Toulon

Ce résultat montre que la diversité métabolique observée sur les profils de LC-MS pourrait être expliquée par les différences observées dans la structure des différentes communautés. Ainsi en accord avec les résultats présentés dans partie III.2.3.3., la distinction des signatures chimiques des biofilms formés sur des revêtements SPC après un mois d'immersion pourrait être liée à l'abondance des γ -Proteobacteria (Alteromonadales) tandis que, dans le cas des biofilms récoltés sur des surfaces PVC ou des revêtements FRC, cette distinction serait plus probablement liée à l'abondance des Bacteroidetes. La différence entre les signatures chimiques des biofilms provenant de ces deux derniers types de surface serait pour sa part, non seulement due à la différence d'abondance des γ -Proteobacteria (Alteromonadales), mais également à celle des α -Proteobacteria (OCS116).

Les γ -Proteobacteria (Alteromonadales) possèderaient donc des capacités à s'adapter aux propriétés drastiques des peintures *antifouling* que ne possèdent pas les Bacteroidetes. Ce groupe de γ -Proteobacteria (Alteromonadales) serait donc capable notamment de résister aux fortes teneurs en cuivre des peintures SPC. Les Bacteroidetes ne semblent pas avoir la capacité de coloniser ce genre de surface mais ont l'air de pouvoir s'adapter sur ce type de surface lorsqu'elle est déjà colonisée.

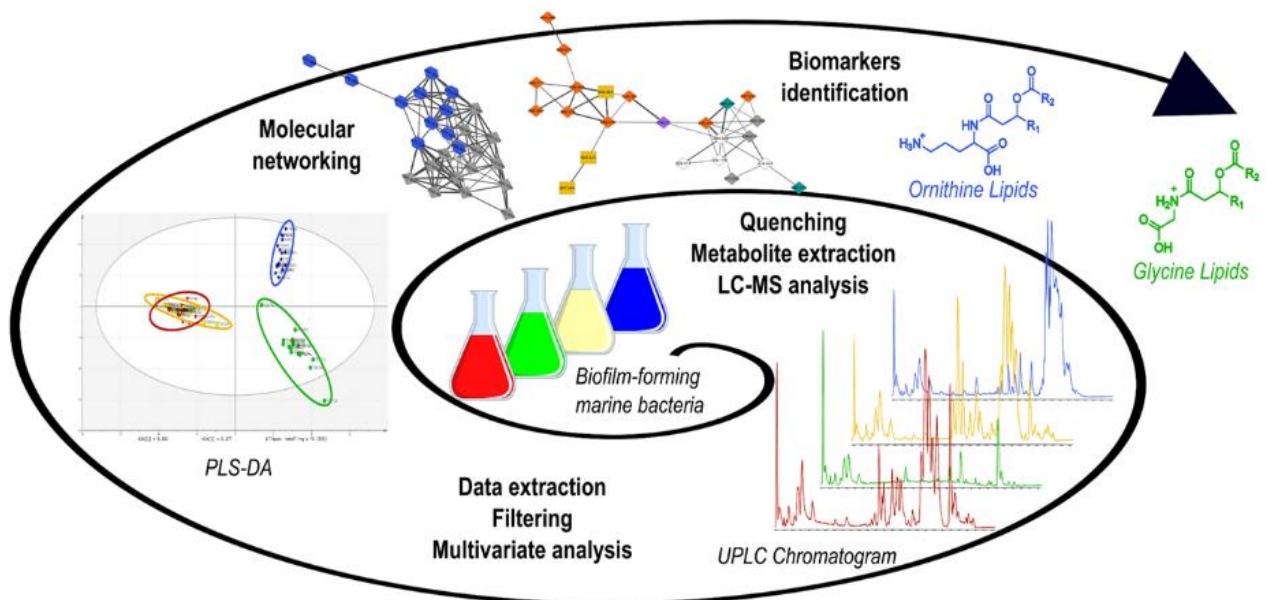
La présence de γ -Proteobacteria (Alteromonadales) aux temps courts d'immersion avec une abondance supérieure à celle des Bacteroidetes suggère donc une certaine efficacité du revêtement quant à sa colonisation ultérieure (échelle de 2,5 mois) alors qu'une forte abondance de Bacteroidetes supposerait une forte colonisation ultérieure.

Si effectivement la présence de Bacteroidetes à des temps courts d'immersion est un élément révélateur d'une future colonisation importante, la métabolomique peut constituer un outil déterminant pour l'évaluation de l'efficacité de revêtements *antifouling*. En effet, la détection de métabolites caractéristiques des Bacteroidetes ou de γ -Proteobacteria (Alteromonadales) sur un revêtement *antifouling* après quelques jours d'immersion serait un élément-clé pour la caractérisation de son efficacité. L'utilisation de cette technique constituerait alors un outil d'évaluation accélérée de cette efficacité, évitant ainsi de longues périodes de tests en immersion. De plus cette méthodologie d'analyse est, d'une part, rapide et peu coûteuse et d'autre part, les résultats obtenus sont robustes et les triplicats biologiques très proches, assurant ainsi une bonne répétabilité des manipulations.

La caractérisation de signaux spécifiques de Bacteroidetes, de γ -Proteobacteria ou d' α -Proteobacteria ne peut être effectuée à partir d'échantillons complexes contenant une multitude d'espèces. Il est effectivement ardu d'effectuer des correspondances directes entre la production de métabolites et un groupe bactérien ou une souche particulière. Pour cette raison, des études *in vitro* utilisant des bactéries de la souchothèque du laboratoire (provenant de biofilms collectés dans la rade de Toulon) ont été entreprises suite à ces travaux préliminaires. Leur but principal est d'essayer de caractériser des biomarqueurs taxonomiques en lien avec les grandes classes bactériennes retrouvées dans les biofilms de cette étude.

CHAPITRE IV

Discrimination par métabolomique (LC-MS) de quatre bactéries marines capable de former un biofilm et évaluation de l'influence des paramètres de culture



IV.1. Introduction

Pour la caractérisation du profil métabolique de souches bactériennes cultivées *in vitro* et la recherche de biomarqueurs taxonomiques, quatre bactéries sélectionnées dans la souchothèque de Toulon ont été étudiées. Ces souches ont été isolées de biofilms de la rade de Toulon et ont été choisies pour leur appartenance aux grandes classes bactériennes retrouvées dans les biofilms formés *in situ* sur différents types de surfaces au cours du projet DRACONS (cf. chapitre précédent).

Dans ce contexte, deux Flavobacteria [*Persicivirga* (Nonlabens) *mediterranea* TC4 et TC7] appartenant au groupe des Bacteroidetes ainsi que deux γ -Proteobacteria (*Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 et *Shewanella* sp. TC11) ont été sélectionnées pour cette étude.

Peu de travaux traitent de l'étude du métabolome de bactéries marines et de sa variation en fonction du milieu de culture (disponibilité en nutriments, température...), de l'état physiologique des bactéries (cultures en biofilm ou en mode planctonique) ou encore de la phase de croissance lorsque la bactérie est cultivée en conditions planctoniques. Ainsi, la capacité d'une analyse métabolomique à discriminer les quatre souches bactériennes, et ce malgré des modifications de leurs conditions de culture, a été étudiée.

Les travaux de ce chapitre sont rassemblés sous la forme d'une publication soumise à *Journal of Proteome Research* (Manuscript ID: pr-2016-01027p). Ils sont présentés en anglais dans le format de la publication. Les informations supplémentaires fournies en complément de la publication ont été ici intégrées directement dans le texte.

IV.2 Article: Discrimination of Four Marine Biofilm-Forming Bacteria by LC-MS Metabolomics and Influence of Culture Parameters

IV.2.1. Abstract

Most of the marine bacteria can form biofilms and they are the main components of biofilms observed on marine surfaces. Biofilms constitute a widespread life strategy, as growing in such structures offers a number of important biological advantages. The molecular compounds expressed in biofilms and, more generally, the metabolomes of marine bacteria remain poorly studied. In this context, the aim of this study was to develop a non-targeted LC-MS metabolomics approach to gain insights into the chemical composition of marine biofilm-forming bacterial strains. Four marine bacteria, *Persicivirga* (Nonlabens) *mediterranea* TC4 and TC7, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 and *Shewanella* sp. TC11,

were used as model organisms. The main objective was to search for some strain-specific bacterial metabolites and to determine how culture parameters (culture medium, phase growth and mode of culture) may affect the cellular metabolism of each strain and thus the global inter-strain metabolic discrimination. LC-MS profiles acquisition and statistical partial least-square discriminant analyses showed that the four strains could be differentiated at the species level whatever the medium, the growth phase or the mode of culture (planktonic vs biofilm). A MS/MS molecular network was subsequently built and allowed the identification of putative bacterial biomarkers. TC8 was discriminated by a series of ornithine lipids while the *P. mediterranea* strains produced hydroxylated ornithine and glycine lipids. Among the *P. mediterranea* strains, TC7 extracts were distinguished by the occurrence of diamine derivatives, such as putrescine amides.

KEYWORDS: Marine bacteria, Biofilms, Metabolomics, Liquid chromatography-Mass spectrometry, MS/MS networking, Ornithine lipids, Polyamines.

IV.2.2. Introduction

All biotic or abiotic surfaces immersed in the marine environment are subjected to colonization pressure by a great diversity of micro- and macroorganisms (*e.g.* bacteria, diatoms, micro- and macroalgae, invertebrate larvae). This so-called “marine biofouling” generates serious economic issues for end-users of the marine environment. Biofouling drastically alters boat hulls, pipelines, aquaculture and port structures (Yebra et al., 2004), affecting thus fisheries and the maritime industry by reducing vessels efficiency and increasing maintenance costs (Schultz et al., 2011). Among fouling organisms, bacteria are well known for their significant pioneer role in the process of colonization (Railkin, 2004). They are commonly considered as the first colonizers of immersed surfaces. They organize themselves in communities called biofilms, forming complex structures of cells embedded in an exopolymeric matrix (Stoodley et al., 2002). Thousands of bacterial strains are present in marine biofilms and bacterial cell concentration is higher than in planktonic samples isolated from the same environment. Such an organization confers a special functioning to the prokaryotic community (Flemming et al., 2016): i) it provides a better resistance to exogenous stress, ii) it allows accumulation of nutrients at the surface, and iii) it can constitute a protective system to predation (Matz et al., 2008). Moreover, the composition of the community and its biochemical production have been shown to impact the settlement of other organisms and thus the maturation of the biofouling (Lau, 2005; Dobretsov and Qian, 2006). From a chemical point of view, marine bacteria are known to produce a wide array of specialized metabolites exhibiting various biological activities (Blunt et al., 2007). Among them, a vast

number of compounds serve as protectors in such a highly competitive environment and others have specific roles in physiology, communication, or constitute adaptive responses to environmental changes (Dang and Lovell, 2016). Therefore, obtaining holistic information about the metabolic status of bacterial strains isolated from marine biofilms and correlating it with external parameters are of high interest. Such a knowledge constitutes a pre-requisite for further studies on the overall understanding of these complex ecological systems.

With the recent developments of metabolomics, it is now possible to obtain a snapshot view, as complete and accurate as possible, of the whole set of metabolites (*i.e.* small organic molecules with $M_w < 1000-1500$ Da) in a biological sample which reflects the metabolic state of the cells as a result of the specificity of their genetic background and an environmental context. Nuclear magnetic resonance or hyphenated techniques such as liquid chromatography (LC) or gas-chromatography (GC) coupled to mass spectrometry are commonly used as analytical tools for metabolomics studies. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has the advantage to analyze a large pool of metabolites with high sensitivity and resolution, even without derivatization (Zhou et al., 2012). In comparative experiments, metabolomics applied to bacteria allows the identification of biomarkers able to differentiate strains. To date, only a few number of metabolomics studies have been focused on marine bacteria or marine biofilms and only few of them have evaluated the effect of physiological and external parameters on the metabolism (Takahashi et al., 2008; Zech et al., 2009; Brito-Echeverría et al., 2011; Romano et al., 2014).

With the main objectives to search for some strain-specific bacterial metabolites and to assess the influence of culture parameters on the strain metabolism, this study intended: (i) to evaluate the LC-MS-based discrimination between the metabolome of four marine biofilm-forming bacterial strains depending on different extraction solvents and culture conditions, and (ii) to putatively annotate the main discriminating compounds (Figure 46).

The four marine strains studied herein are all Gram-negative bacteria isolated from natural biofilms: *Persicivirga* (Nonlabens) *mediterranea* TC4 and TC7 belong to the phylum Bacteroidetes while *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 and *Shewanella sp.* TC11 are γ -Proteobacteria. They were selected on the basis of their biofilm-forming capability when cultivated *in vitro* and their ease for growing (Brian-Jaisson, 2014). The two first strains (TC4 and TC7) were specifically chosen in order to evaluate the discriminative potential of our metabolomics approach as they belonged to the same species. Due to the use of high-salt culture media when working on marine bacteria and in order to obtain an

efficient extraction of intracellular metabolites, liquid-liquid extraction with medium polarity agents was specifically selected. For the analytical conditions, C18 reversed-phase HPLC columns are the most widely used for LC-MS profiling (Kuehnbaum and Britz-McKibbin, 2013). Such separation process provides satisfactory retention of medium to low polar analytes but do not allow a proper retention of more polar compounds. In the present study, to detect a large array of bacterial metabolites, analyses were performed on a phenyl-hexyl stationary phase. The recently developed core-shell stationary phase was applied here for improved efficiency (Gritti et al. 2010). For the MS detection, even if high resolution mass spectrometry (HRMS) is mainly used in metabolomics, a low resolution mass spectrometer (LRMS) was first chosen to achieve these developments. A cross-platform comparison including HRMS was subsequently undertaken to assess the robustness of the method. Finally, HRMS and MS/MS data were used for the metabolite annotation.

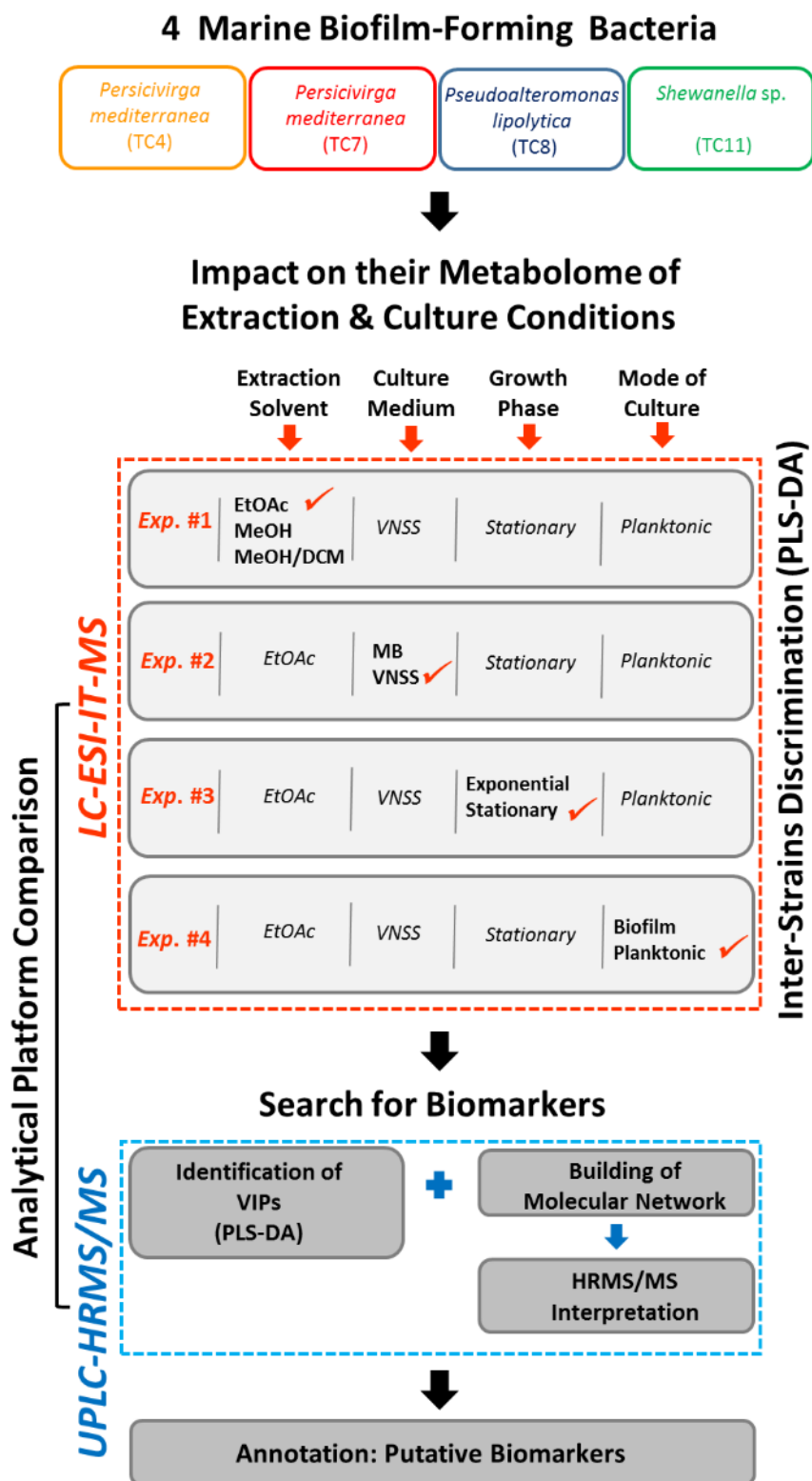


Figure 46: Overview of the experimental workflow used for the discrimination of the four marine bacterial strains and for the putative identification of relevant biomarkers

IV.2.3. Experimental section

IV.2.3.1. Reagents

Ethyl acetate (EtOAc), methanol (MeOH) and dichloromethane (DCM) used for the extraction procedures were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). LC-MS analyses were performed using LC-MS-grade acetonitrile (ACN) and MeOH (VWR). Milli-Q water was generated by the Millipore ultrapure water system (Waters-Millipore Corporation, Milford, MA, USA). Formic acid of mass spectrometry grade (99%) was obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

IV.2.3.2. Bacterial strains, culture conditions and metabolite extraction

Persicivirga (Nonlabens) *mediterranea* TC4 and TC7 (TC for Toulon Collection), *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 and *Shewanella sp.* TC11 strains were isolated from marine biofilms harvested on artificial surfaces immersed in the Mediterranean sea (Bay of Toulon, France, 43°06'23" N, 5°57'17" E) (Brian-Jaisson, 2014).

All strains were stored at -80°C in 50% glycerol medium until use and were grown in Väätänen nine salt solution (VNSS) at 20°C on a rotator/shaker (120 rpm) to obtain synchronized bacteria in post-exponential phase. A suspension of these cells was used as starting inoculum to prepare planktonic and sessile cultures. Depending on the experiment, these cultures were performed in two different nutrient media: VNSS or marine broth (MB) (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), always at the same temperature of 20°C. In the case of planktonic cultures, pre-cultured bacteria (10 mL) were suspended in culture medium (50 mL) at 0.1 absorbance unit (OD₆₀₀) and placed in 250 mL Erlenmeyer flasks. Strains were grown in a rotary shaker (120 rpm). Medium turbidity was measured at 600 nm (Genesys 20 spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) every hour for the determination of growth curves before metabolite extraction. Cultures were then extracted according to the OD₆₀₀ value correlated to the growth curve. For sessile conditions, pre-cultured planktonic cells were suspended in culture medium (10 mL) at 0.1 absorbance unit (OD₆₀₀) in Petri dishes. After 24h or 48h of incubation, the culture medium was removed and biofilms were physically recovered by scraping. The resulting mixture was then extracted.

Metabolite extractions were performed with EtOAc, cold MeOH or a mixture of cold MeOH/DCM (1:1, v/v). 100 mL of solvent were added to the bacterial culture. The resulting mixture was shaken for 1 min and then subjected to ultrasounds for 30 min at 20°C. For samples extracted with EtOAc, the organic

phase was recovered and concentrated to dryness under reduced pressure. Samples extracted with MeOH or MeOH/DCM were dried *in vacuo*. Dried extracts were then dissolved in MeOH at a concentration of 15 mg/mL. Samples were transferred into 2-mL HPLC vials and stored at -80°C until analysis.

IV.2.3.3. Metabolic fingerprinting by LC-MS

IV.2.3.3.1. LC-ESI-IT-MS analyses

The bacterial extracts were analyzed on an Elite LaChrom (VWR-Hitachi, Fontenay-sous-Bois, France) chromatographic system coupled with an ion trap mass spectrometer (Esquire 6000, Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Chromatographic separation was achieved on an analytical core-shell reversed-phase column (150 × 3 mm, 2.6 μm, Kinetex Phenyl-Hexyl, Phenomenex, Le Pecq, France) equipped with a guard cartridge (4 × 3 mm, SecurityGuard Ultra Phenomenex) and maintained at 30°C. The injected sample volume was 5 μL. The mobile phase consisted of water (A) and ACN (B) containing both 0.1% of formic acid. The flow rate was 0.5 mL/min. The elution gradient started at 20% B during 5 min, ascended to 100% B in 20 min with a final isocratic step for 10 min; and then returned to 20% B in 0.1 min and maintained 9.9 min. The electrospray interface (ESI) parameters were set as follows: nebulizing gas (N₂) pressure at 40 psi, drying gas (N₂) flow at 8 L/min, drying temperature at 350°C and capillary voltage at 4000 V. Mass spectra were acquired in the full scan range m/z 50 to 1200 in positive mode as this mode provides a higher number of metabolite features after filtering and also a better discrimination between clusters in the multivariate statistics. Data were handled with Data Analysis (version 4.3, Bruker Daltonics).

IV.2.3.3.2. UPLC-ESI-QToF-MS analyses

The UPLC-MS instrumentation consisted in a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific) chromatographic system coupled with a QToF Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics). The analyses were performed using an analytical core-shell reversed-phase column (150 × 2.1 mm, 1.7 μm, Kinetex Phenyl-Hexyl with a SecurityGuard cartridge, Phenomenex) with a column temperature of 40°C and a flow rate of 0.5 mL/min. The injection volume was 5 μL. Mobile phases were water (A) and ACN (B) containing each 0.1% (v/v) of formic acid. The elution gradient (A:B, v/v) was as follows: 4:1 from 0 to 1 min, 0:100 in 7 min and kept 4 min, and then 4:1 at 11.5 min and kept 2 min. The capillary voltage was set at 4500 V (positive mode) and the nebulizing parameters were set as follows: nebulizing gas (N₂) pressure at 0.4 Bars, drying gas (N₂) flow at 4 L/min, and drying

temperature at 180°C. Mass spectra were recorded from m/z 50 to 1200 at a mass resolving power of 25,000 Full Width Half Maximum (FWHM, $m/z = 200$) and a frequency of 2 Hz. Tandem mass spectrometry analyses were performed thanks to a Collision Induced Dissociation (CID) with a collision energy of 25 eV. A solution of formate/acetate forming clusters was automatically injected before each sample for internal mass calibration and the mass spectrometer was calibrated with the same solution before each sequence of samples. Data handling was done using Data Analysis (version 4.3).

IV.2.3.3.3. Quality control

For each sequence, a pool sample was prepared by combining 100 μL of each bacterial extract. The pool sample was divided into several HPLC vials which were used as quality controls (QCs). Samples of each condition were randomly injected to avoid any possible time dependent changes in LC-MS chromatographic fingerprints. To ensure analytical repeatability, the QCs were injected at the beginning, at the end and every four samples within each sequence run. Cell-free control samples (media blanks) were prepared in the same way as cultures with cells and they were randomly injected within the sequence. These blanks allowed the subsequent subtraction of contaminants or components coming from the growth media.

IV.2.3.3.4. Data preprocessing and filtering

LC-MS raw data were converted into netCDF files with a script developed within the Data Analysis software and pre-processed with the XCMS software (version 1.38.0) under R 3.1.0 environment. Peak picking was performed with the “*matchedFilter*” method for HPLC-IT-MS data and “*centwave*” method for UPLC-QToF-MS data. The other XCMS parameters were as follow: “*snthresh*” = 5, retention time correction with the *obiwarp* method (“*profstep*” = 0.1), peak grouping with “*bw*” = 5 for ion trap data, “*bw*” = 2 for QToF data and “*mzwidth*” = 0.5 for ion trap data, and “*mzwidth*” = 0.015 for QToF data, gap filling with default parameters (Patti et al., 2012).

To ensure data quality and remove redundant signals, two successive filtering steps were applied to preprocessed data using an in-house script on R. The first was based on the signal/noise (S/N) ratio in order to remove signals observed in medium blanks (S/N set at 10 for features matching between samples and medium blanks). The second allowed suppression of signals based on the value of the coefficient of variation (CV) of the intensity of the variables in the QCs.

IV.2.3.3.5. MS/MS networking

The molecular network was generated on the internet platform GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) from MS/MS spectra. Raw data were converted into .mzXML format with DataAnalysis. Data were filtered by removing MS/MS peaks within +/- 17 Da of the m/z of the precursor ions. Only the top six peaks were conserved in a window of 50 Da. Data were clustered using MS-Cluster with a tolerance of 1 Da for precursor ions and of 0.5 Da for MS/MS fragment ions in order to create a consensus spectrum. Consensus spectra containing less than two spectra were eliminated. The resulting spectra were compared to those of the GNPS spectral bank. The molecular network was then generated and previewed directly on GNPS online. Data were imported and treated offline with Cystoscape (version 3.4.0). MS/MS spectra with a high spectral similarity [Cosine Score (CS) > 0.65] were represented as nodes. Connections between these nodes appeared since the CS was above 0.7 and at least four common ions were detected. The thickness of the connections was proportional to the CS.

IV.2.3.3.6. Annotation of biomarkers

Variables of importance were identified from the multivariate statistical analyses (see below the statistical section). They were then subjected to annotation by searching the most probable molecular formula with the "smartformula" package of DataAnalysis and by analyzing their accurate masses and their fragmentation patterns comparing with the data available online in KEGG (www.genome.jp/kegg), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) and ChemSpider (www.chemspider.com) all simultaneously accessed by MetFrag (<http://msbi.ipb-halle.de/MetFragBeta>). Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org>) and Metlin (<https://metlin.scripps.edu/>) were also used for complementary information.

IV.2.3.3.7. Statistical analyses

Simca 13.0.3 software (Umetrics, Umeå, Sweden) was used for all multivariate data analyses and modeling. Data were log₁₀ transformed and mean-centered. Models were built on Principal Component Analysis (PCA) or on partial least-square discriminant analysis (PLS-DA). PLS-DA allowed the determination of discriminant metabolites using the Variable Importance on Projection (VIP). All the models evaluated were tested for over fitting with methods of permutation tests and Cross Validation-Analysis Of VAriance (CV-ANOVA). The descriptive performance of the models was determined by R²X(cumulative) [perfect model: R²X(cum) = 1] and R²Y(cumulative) (perfect model: R²Y(cum) = 1) values while their prediction performance was measured by Q²(cumulative) (perfect model:

$Q^2(\text{cum}) = 1$), and p (CV-ANOVA) (perfect model: $p = 0$) values, and a permutation test ($n = 150$). The permuted model should not be able to predict classes: R^2 and Q^2 values at the Y-axis intercept must be lower than those of Q^2 and the R^2 of the non-permuted model.

IV.2.3.3.8. Data visualization

The heatmap representation was obtained with the PermutMatrix software (Caraux and Pinloche, 2005). Dissimilarity was calculated with the squared Pearson correlation distance while the Ward's minimum variance method was used to obtain the hierarchical clustering.

IV.2.4. Results and discussion

IV.2.4.1. Selection of the metabolite extraction method (experiment #1)

Metabolomics allows the screening of many metabolites simultaneously detected in a biological sample. To ensure that the resulting metabolomic profiles characterize the widest range of metabolites with the highest relevance, the metabolite extraction protocol must be non-selective and highly reproducible (Kido Soule et al., 2015). Therefore, the biological material must be studied after simple preparation steps to prevent from any potential degradation or loss of metabolites. In microbial metabolomics, the first step of the sample preparation has to be a quenching to avoid alterations of the intracellular metabolome which is known for its fast turnover (de Jonge et al., 2012).

In this study, the first objective was therefore to develop an extraction protocol for LC-MS-based metabolome profiling (exo- and endometabolomes) of marine bacteria that should be applied to any strain, cultivated either planktonically or in sessile conditions, but also easily transposable to natural complex biofilms. For this purpose, liquid-liquid extraction was selected as this process allows quenching and extraction of the bacterial culture in a single step. The second issue is due to the high salinity of the extracts which would imply a desalting step. For these reasons, EtOAc, MeOH, and MeOH/DCM (1:1) were selected as potential extraction agents for this experiment.

The four bacterial strains were first grown planktonically in single-species cultures (in VNSS medium), each in biological triplicates, and extracted until they reached their stationary phase (at $t = t_5$, Figure 47) and before the decline phase. For each sample, the whole culture was extracted using a predefined set of experimental conditions and analyzed by LC-(+)-ESI-IT-MS. The selection of the optimal solvents was performed based on: (i) the number of features detected on LC-MS profiles after filtering, (ii) the

ability to discriminate the bacterial strains by multivariate analyses, and (iii) the ease of implementation of the experimental protocol.

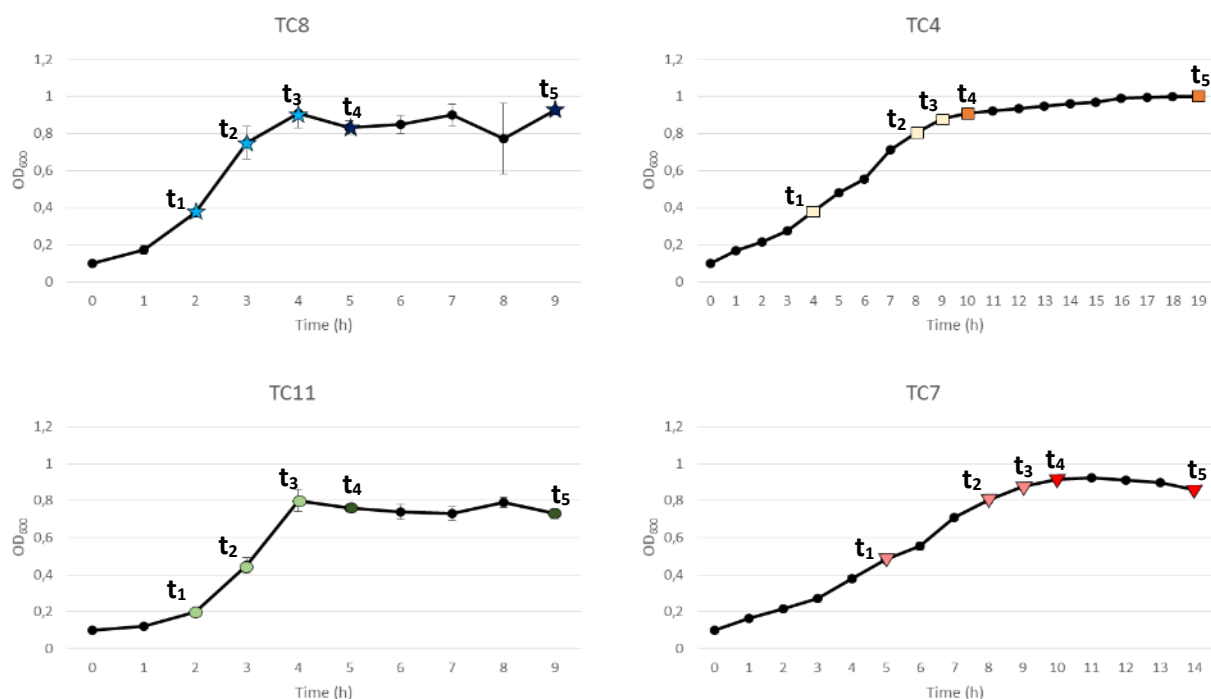


Figure 47: Growth stages of *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, *Shewanella sp.* TC11, *Persicivirga (Nonlabens) mediterranea* TC4 and TC7 cultured planktonically in VNSS medium

In such a rich culture medium, data filtering constitutes a key requirement because bacterial metabolites are masked by components of the culture broth (e.g. peptone, starch, yeast extract). Moreover, such a process was essential to reduce false positives and redundant data for the further statistical analyses. Firstly, for each solvent, treatment of all chromatograms with the XCMS package gave a primary dataset with 3190 ± 109 metabolite features (Figure 48). A primary filtering between variables present in both bacterial extracts and blank samples removed more than 80% of the detected features which were likely inferred to culture medium components, solvent contamination or instrumentation noise. After two additional filtering steps, one with the CV of variable intensities and the other with the coefficient of autocorrelation across samples and between variables with a same retention time, a final list of 155 ± 22 m/z features was reached.

The resulting data showed a different number of detected metabolite features depending on the extraction solvent (Figure 49): MeOH/DCM yielded a higher number of metabolites for TC4 and TC11 while EtOAc was the most effective extraction solvent for TC7 and TC8. This result was rather expected as previous works have shown that the extraction method had a strong effect on the detected

microbial metabolome, the physico-chemical properties of the extraction solvent being one of the main factor of the observed discrepancies (Shin et al., 2010; Duportet et al., 2012).

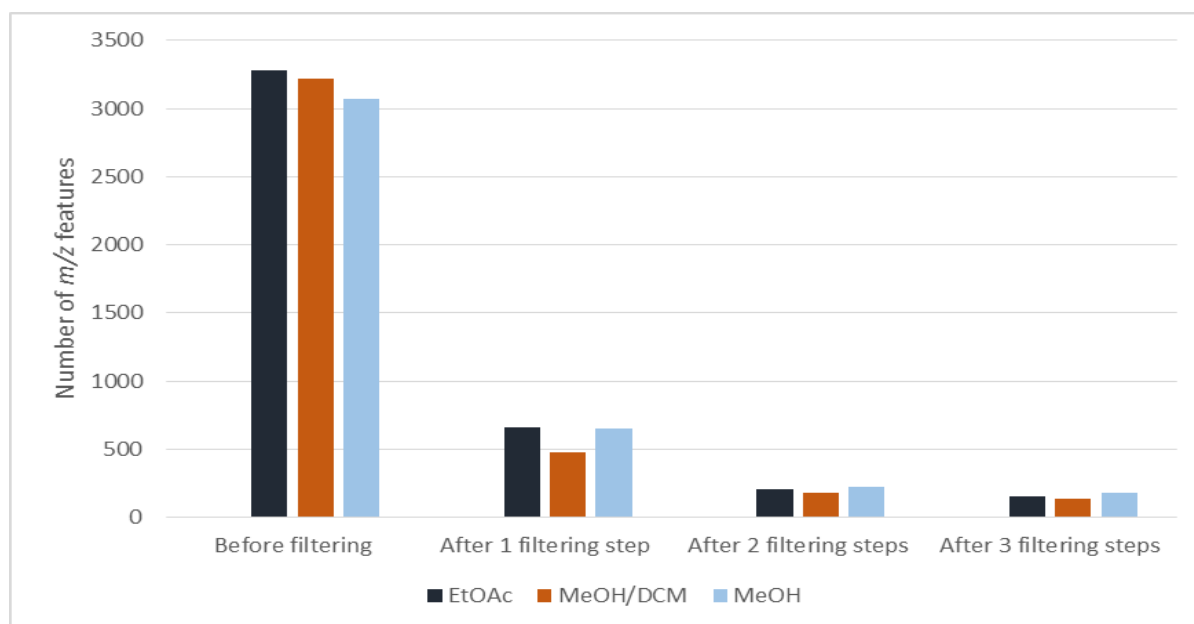


Figure 48: Number of *m/z* features (LC-LRMS) detected for the whole dataset of the four bacterial strains (stationary phase, planktonic cultures in VNSS) depending on the extraction solvent

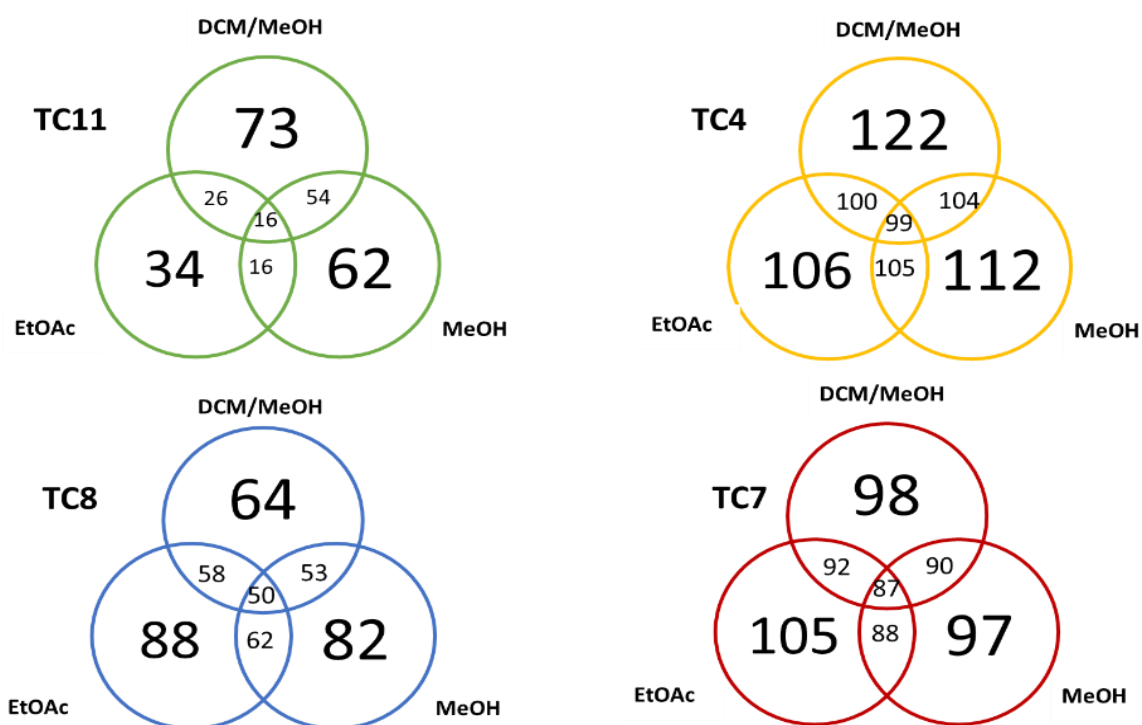


Figure 49 : Venn diagrams showing unique and shared metabolites (LC-LRMS) for the four bacterial strains (stationary phase, planktonic cultures in VNSS) in each extraction condition

The extraction parameters have not only an effect on the number of detected features but also on their concentration (Canelas et al., 2009).

The LC-MS data sets were analyzed by PCA and PLS-DA in order to evaluate the potential of the method to discriminate among the bacterial strains according to the extraction solvent system. After data treatment, PCA was performed and showed a trend of inter-strain separation on the score plots (Figure 50a and Figure 51a and 51b).

For each solvent, samples from TC4 and TC7 on one hand, and from TC8 and TC11 on the other hand, were clearly distinguished on the first component which accounts for 56 to 72% of the total variance. The second component, which accounts for 12 to 29%, allowed the distinction between TC8 and TC11, and to a lesser extent between TC4 and TC7. In order to find discriminant biomarkers, PLS-DA was also applied to the LC-MS data (one model by solvent condition and one class by strain). For each extraction solvent, the resulting score plots showed three distinct clusters composed by both *P. mediterranea* strains (TC4 and TC7), TC8 and TC11, respectively (data not shown). The PLS-DA four-class models gave R^2X_{cum} and R^2Y_{cum} values of 0.951-0.966 and 0.985-0.997, respectively, showing the consistency of the obtained data, and Q^2Y_{cum} values of 0.820-0.967, estimating their predictive ability (Table 20).

Nevertheless, the p -values (> 0.05) obtained from the cross validation indicated that the bacterial samples were not significantly separated according to the strain while the R intercept values (> 0.4) obtained from a permutation test ($n = 150$) showed overfitting of the models. Taking these results into account, three-class PLS-DA models regrouping the TC4 and TC7 strains into a same class were constructed. The resulting R^2X_{cum} (0.886-0.930), R^2Y_{cum} (0.974-0.991), and Q^2Y_{cum} (0.935-0.956) values attested the quality of these improved models. In addition, a permutation test ($n = 150$) allowed the successful validation of the PLS-DA models: R intercept values (< 0.4 , except for MeOH/DCM) and Q intercept values (< -0.2) indicated that no overfitting was observed while p -values (< 0.05) showed that the three groups fitted by the models were significantly different (Table 20, Figures 51c, 51d and 50e). Samples extracted with MeOH and EtOAc showed higher quality and more robust PLS-DA models for the strain discrimination than those obtained after extraction with MeOH/DCM. For all these reasons, EtOAc was selected for metabolome extraction in the subsequent experiments. These results were in accordance with the use of a similar protocol in recent studies dealing with the chemical profiling of marine bacteria (Vynne et al., 2011; Lu et al., 2014; Bose et al., 2015).

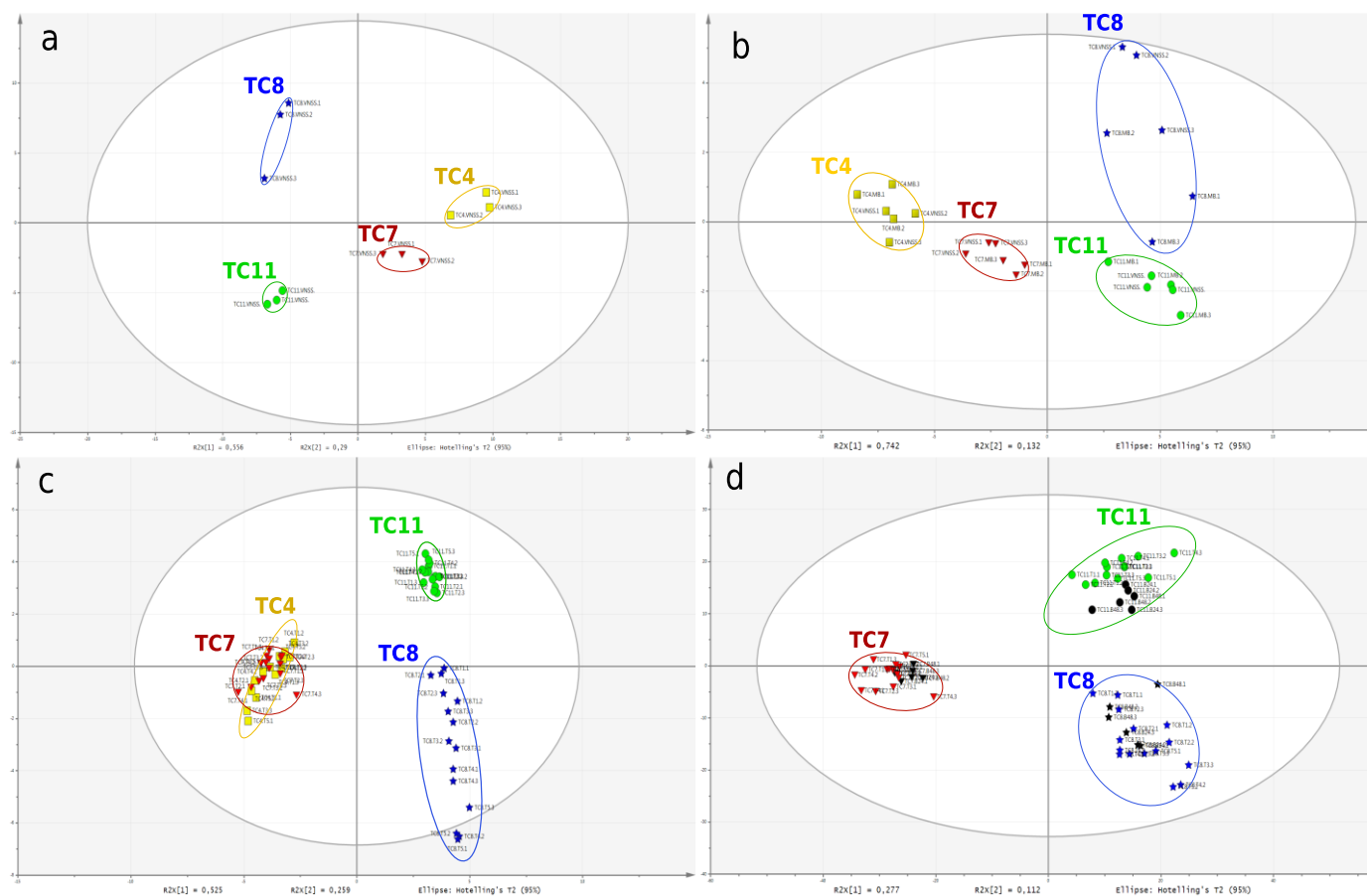


Figure 50: a) PCA score plot obtained from LC-LRMS profiles of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, stationary phase, planktonic cultures in VNSS); b) PLS-DA score plot obtained from LC-MS profiles of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, stationary phase) cultured planktonically in two media (VNSS and MB); c) PLS-DA score plot obtained from LC-MS profiles of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, planktonic cultures in VNSS) at five time points of their growth curve; d) PLS-DA score plot obtained from LC-MS profiles of three of the strains (extraction with EtOAc) cultured in biofilms (two time points; dark symbols) and planktonic conditions (five time points; colored symbols) in VNSS

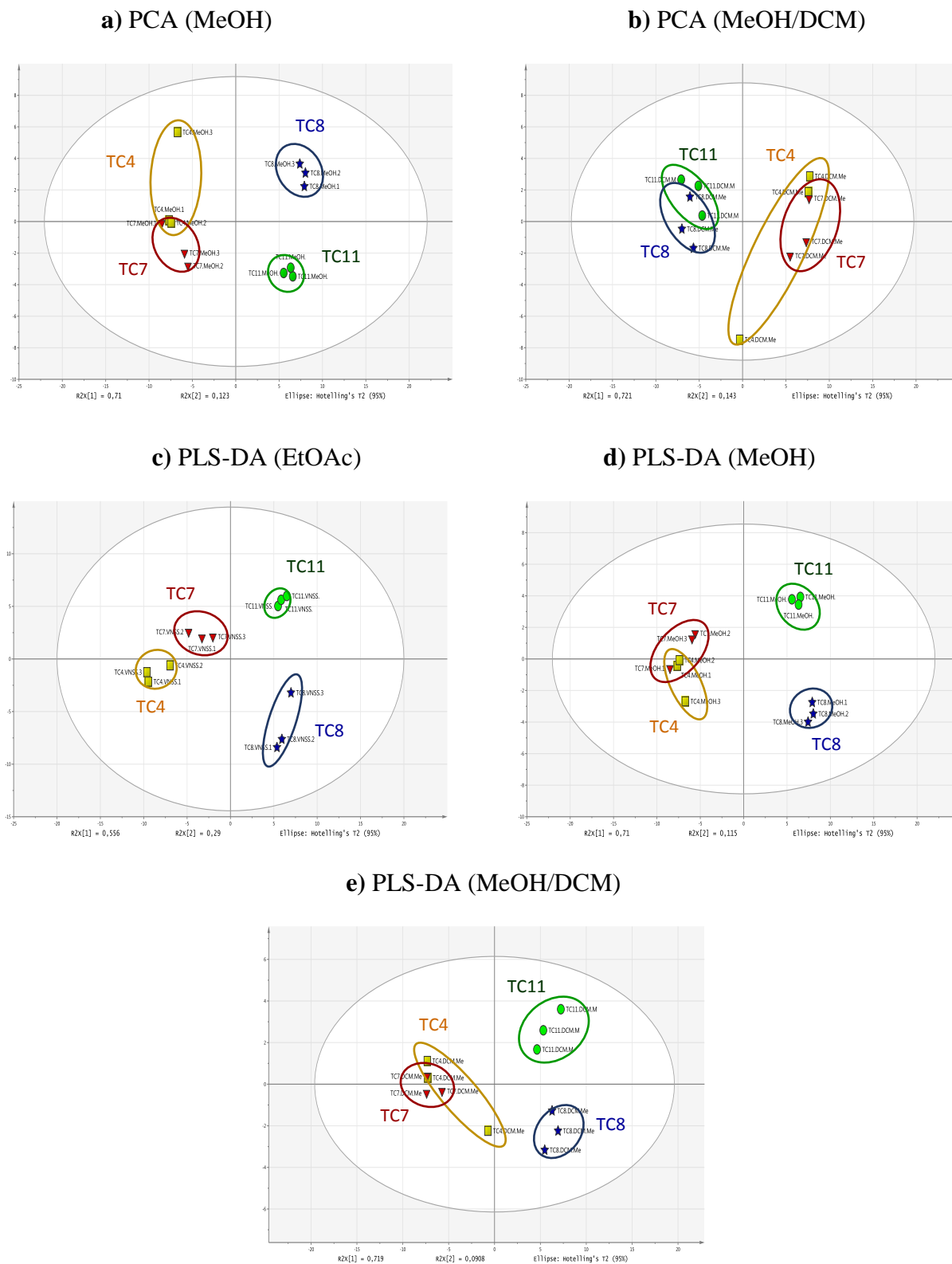


Figure 51: a) and b) PCA c), d) and e) PLS-DA score plots of LC-LRMS profiles of the four bacterial strains (stationary phase, planktonic cultures in VNSS) extracted with a) and d) MeOH, d) and e) MeOH/DCM and c) EtOAc.

Tableau 20 : Summary of the parameters for the assessment of the quality and of the validity of the PLS-DA models used for the discrimination of the bacterial strains according to different culture or analysis conditions

Experiments	Parameters	Models	N° ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
Extraction solvents (VNSS, planktonic, stationary phase)	EtOAc	4 classes ^g	5	0.951	0.985	0.880	0.660	-0.350	0.07
		3 classes ^h	3	0.896	0.974	0.939	0.326	-0.377	0.0001
	MeOH	4 classes ^g	5	0.957	0.995	0.967	0.637	-0.460	0.07
		3 classes ^h	3	0.886	0.985	0.935	0.399	-0.373	< 0.0001
	MeOH/DCM	4 classes ^g	6	0.966	0.997	0.820	0.861	-0.070	1
		3 classes ^h	4	0.930	0.991	0.956	0.656	-0.321	0.001
Culture media (EtOAc, planktonic, stationary phase)	MB	4 classes ^g	7	0.978	0.987	0.852	0.871	-0.051	0.87
		3 classes ^h	3	0.916	0.910	0.800	0.316	-0.413	0.007
	VNSS and MB	4 classes ^g	5	0.955	0.918	0.819	0.344	-0.469	< 0.0001
		3 classes ^h	4	0.941	0.931	0.877	0.294	-0.402	< 0.0001
Growth phases (EtOAc, VNSS, planktonic)	All growth phases	4 classes ^g	6	0.640	0.970	0.929	0.570	-0.324	0
		3 classes ^h	4	0.579	0.975	0.957	0.578	-0.322	0
Culture modesⁱ (EtOAc, VNSS, stationary phase)	Biofilm	3 classes ^j	3	0.638	0.994	0.984	0.580	-0.245	< 0.0001
	Biofilm and Planktonic	3 classes ^j	4	0.543	0.991	0.977	0.618	-0.136	0
Platforms comparison (EtOAc, VNSS, planktonic, stationary phase)	HRMS	4 classes ^g	5	0.867	0.989	0.785	0.661	-0.440	0.56
		3 classes ^h	3	0.735	0.989	0.939	0.489	-0.411	0.0001

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modeled variation in X matrix; ^c Cumulative modeled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; ^eR and Q intercepts obtained after permutation test ($n = 150$); ^f p value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA; ^gOne class for each strain; ^hTC4 and TC7 strains gathered in a same class; ⁱOnly three strains (TC7, TC8 and TC11) were used for this experiment; ^jOne class for each strain.

IV.2.4.2. Impact of the culture medium (experiment #2)

The influence of the culture medium on the marine bacteria metabolome has been poorly investigated (Canelas et al., 2009; Brito-Echeverría et al., 2011; Djinni et al., 2013; Bose et al., 2015). To ascertain that the chemical discrimination of the bacterial strains studied was not medium-dependent, a second culture broth was used. This second set of experiments was designed as follows: the four bacterial strains were cultivated in parallel in VNSS and MB media (each in biological triplicates) until they reached the stationary phase ($t = t_s$, Figure 47) and their organic extracts (extraction with EtOAc) were analyzed by LC-MS.

Just like in the case of VNSS, MB is a salt-rich medium widely used for marine bacterial cultures. The number of metabolites detected and the chemical discrimination between the bacterial strains were then determined for this set of samples. First, the number of metabolites obtained after the three filtering steps was similar for the two culture media (Figure 52) and all the detected m/z features were common to both media. This result showed the robustness of the filtering method because the chemical composition of both culture media is highly different (Table 21).

Indeed, MB contains more salts and, in terms of organic components, higher amounts of yeast extract and peptone, while starch and glucose are specific ingredients of VNSS. A small difference was observed on the PCA score plots obtained with samples from a single strain cultured in these two different media but the low number of samples did not allow to statistically validate the corresponding

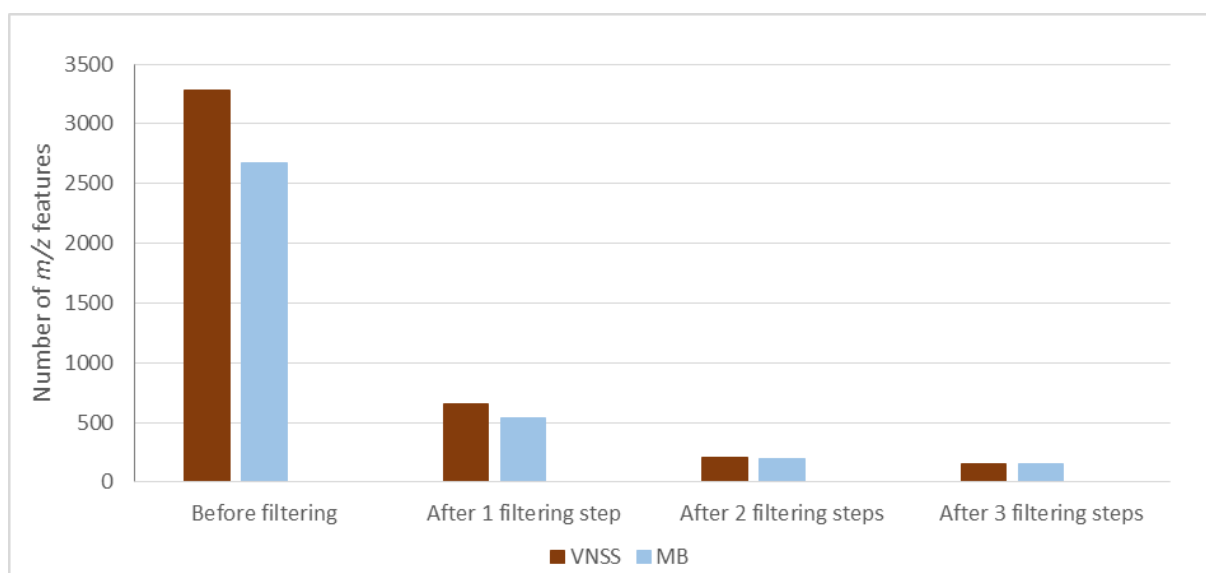


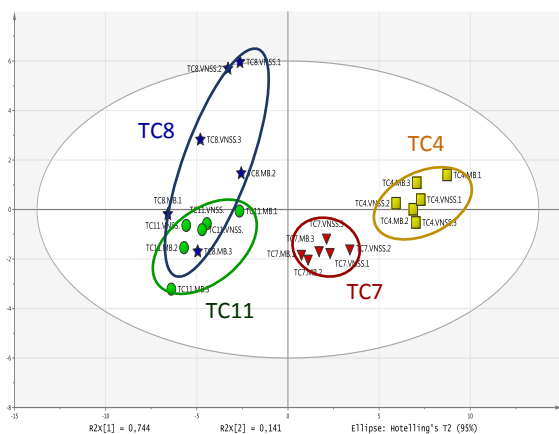
Figure 52: Number of m/z features (LC-LRMS) detected for the four bacterial strains (stationary phase, extraction with EtOAc, planktonic cultures) depending on the culture media (MB or VNSS)

PLS-DA models (data not shown). Whatever the media, an obvious clustering pattern of each of the four strains was observed on the PCA score plots when all the samples were considered (Figure 53a).

Tableau 21 : Composition of the MB and VNSS Culture Media

[Components] (g/L)	MB Medium	VNSS Medium
Ammonium nitrate	0.0016	-
Boric acid	0.022	0.01
Calcium chloride	1.80	0.41
Disodium phosphate	0.008	0.01
Ferric citrate	0.10	-
Ferrous sulphate	-	0.01
Glucose	-	0.50
Magnesium chloride	5.90	1.87
Peptone	5.00	1.00
Potassium bromide	0.08	0.04
Potassium chloride	0.55	0.25
Sodium bicarbonate	0.16	0.08
Sodium chloride	19.45	17.60
Sodium fluoride	0.0024	-
Sodium silicate	0.004	-
Sodium sulphate	3.24	-
Starch	-	0.50
Strontium chloride	0.034	0.01
Yeast extract	1.00	0.50

a) PCA (Samples cultured in VNSS and MB)



b) PLS-DA (Samples cultured in MB)

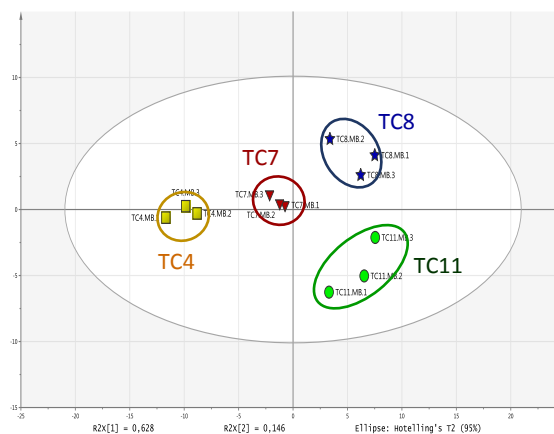


Figure 53: a) PCA score plots of the LC-LRMS profiles of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, stationary phase) cultured planktonically in two media (VNSS or MB) and b) PLS-DA (four-class model) score plots of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, stationary phase) cultured planktonically in MB

Four- and three-class PLS-DA models were constructed to evaluate the discrimination capacity of the method. As demonstrated for VNSS cultures (Figure 51c), the PLS-DA three-class model obtained with the bacteria grown in MB (Table 20 and Figure 53b) also showed a clear separation between the groups ($p < 0.05$) and it was statistically validated by a permutation test. When the whole dataset (VNSS and

MB) was analyzed, the resulting PLS-DA models (Table 20), which passed cross validation and permutation test, indicated that the bacterial samples can be efficiently discriminated with the strain at the species level. Based on the PLS-DA score plot, TC8 was the bacterial strain which demonstrated the higher metabolic variation with the culture media used (Figure 50b). It is now well established that changing bacterial culture media not only affects the metabolome quantitatively but also it has a significant impact on the expression of some distinct biosynthetic pathways. Such an approach, named OSMAC (One Strain-MAny Compounds), has been used in recent years to improve the number of secondary metabolites produced by a single microbial strain (Bode et al., 2002). In the present study, some intra-strain differences were observed between cultures in both media but they did not prevent to observe a clear inter-strain discrimination. Therefore, these results showed that this method allowed the discrimination between samples of the three marine biofilm-forming bacterial species even if they are grown in distinct media.

IV.2.4.3. Impact of the growth phase (experiment #3)

Growth of bacteria in suspension, as planktonic microorganisms, follows a typical curve with a sequence of a lag phase, an exponential phase (multiplication of cells), a stationary phase (stabilization) and a decline phase. To date, only few studies have focused on differences in the metabolome of microorganisms along their growth phase (Zech et al., 2009; Jin et al., 2013; Drapal et al., 2014) and most of these analyses were performed by NMR and GC-MS. These different culture phases are related to the rapid bacterial response to environmental changes and thus to different metabolic expressions. To determine the impact of this biological variation on the discrimination between bacterial cell samples, the metabolome content was analyzed (in biological triplicates) for the four strains grown in VNSS at five times of their different growth stages: two time points during the exponential phase (t_1 and t_2), one at the end of the exponential phase (t_3) and two others during the stationary phase (t_4 and t_5) (Figure 47).

All aliquots were treated with the selected extraction protocol followed by analysis with LC-MS. The data obtained for the four strains were preprocessed, filtered, and then analyzed by PCA and PLS-DA. As shown in Figure 47, the strains grew differently as indicated by OD_{600} changes: the exponential phase of all the strains started directly after inoculation and occurred during 3h for TC8 and TC11, and 8h for TC4 and TC7, respectively. After filtering, the data showed that among all the strains TC8 produced the highest number of metabolites at all the phases while TC7 was always the less productive. The number of metabolites detected was higher for TC8 during the stationary phase while

it was slightly higher for TC11 during the exponential phase and no significant differences were noticed for TC4 and TC7 (Figure 54). For each strain, the main part of the detected m/z features were found in both growth phases but more than two-thirds of them were present in higher amounts during the stationary phase.

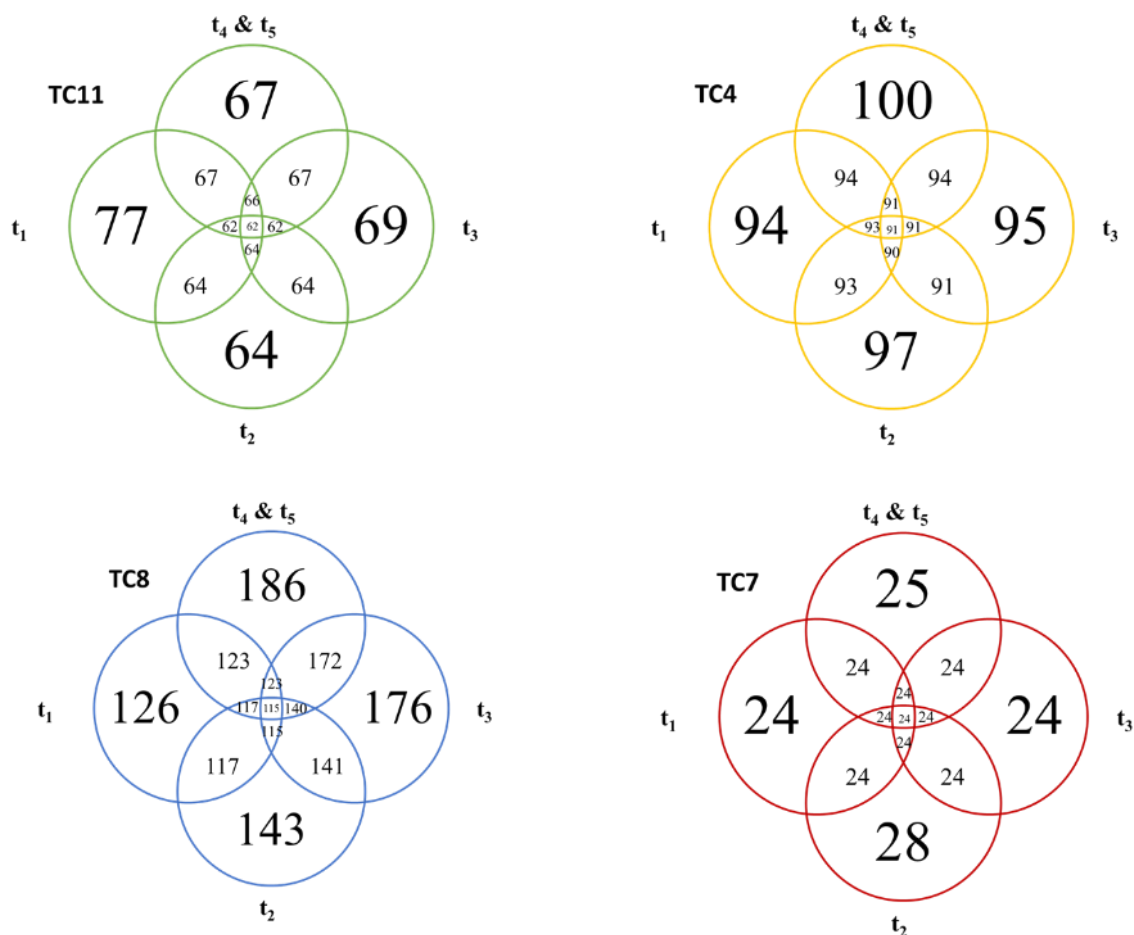


Figure 54: Number of m/z features (LC-LRMS) detected after the filtering steps for each bacterial strain (extraction with EtOAc, planktonic cultures in VNSS) at five time points of the growth curve (t_1 , t_2 and t_3 : exponential phase; t_4 and t_5 : stationary phase)

To determine if this method is also able to differentiate between the phases of growth, PLS-DA models were then constructed for each bacterial strain with the LC-MS profiles (Table 22). For TC8, it appeared that bacterial cultures were clearly discriminated with their growth phase as described on the corresponding PLS-DA score plot (Figure 55a).

Tableau 22 : Summary of parameters for assessment of the quality and the validity of the PLS-DA models used for the intra-strain discrimination depending on different culture conditions

Experiments	Bacterial strains	Models	N° ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
Growth phases (EtOAc, VNSS, planktonic)	TC4	2 classes ^g	2	0.615	0.808	0.679	0.468	-0.226	0.01
	TC8	2 classes ^g	3	0.784	0.983	0.929	0.754	-0.050	0.0005
	TC8	3 classes ^h	4	0.847	0.964	0.870	0.732	-0.267	< 0.0001
	TC11	2 classes ^g	4	0.751	0.992	0.693	0.956	0.168	0.66
Culture modes (EtOAc, VNSS, stationary phase)	TC7	2 classes ⁱ	3	0.598	0.969	0.815	0.677	-0.304	0.0004
	TC8	2 classes ⁱ	4	0.788	0.964	0.864	0.756	-0.274	0.0008
	TC11	2 classes ⁱ	2	0.593	0.972	0.927	0.465	-0.310	< 0.0001

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modeled variation in X matrix; ^cCumulative modeled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; ^eR and Q intercepts obtained after permutation test ($n = 150$); ^f p value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA; ^gone class for exponential phase samples (t_1 , t_2 and t_3) and one class for stationary phase samples (t_4 and t_5); ^hTwo classes for exponential phase samples (one class for t_1 and t_2 , and one class for t_3) and one class for stationary phase samples (t_4 and t_5); ⁱone class for biofilm samples and one class for planktonic samples.

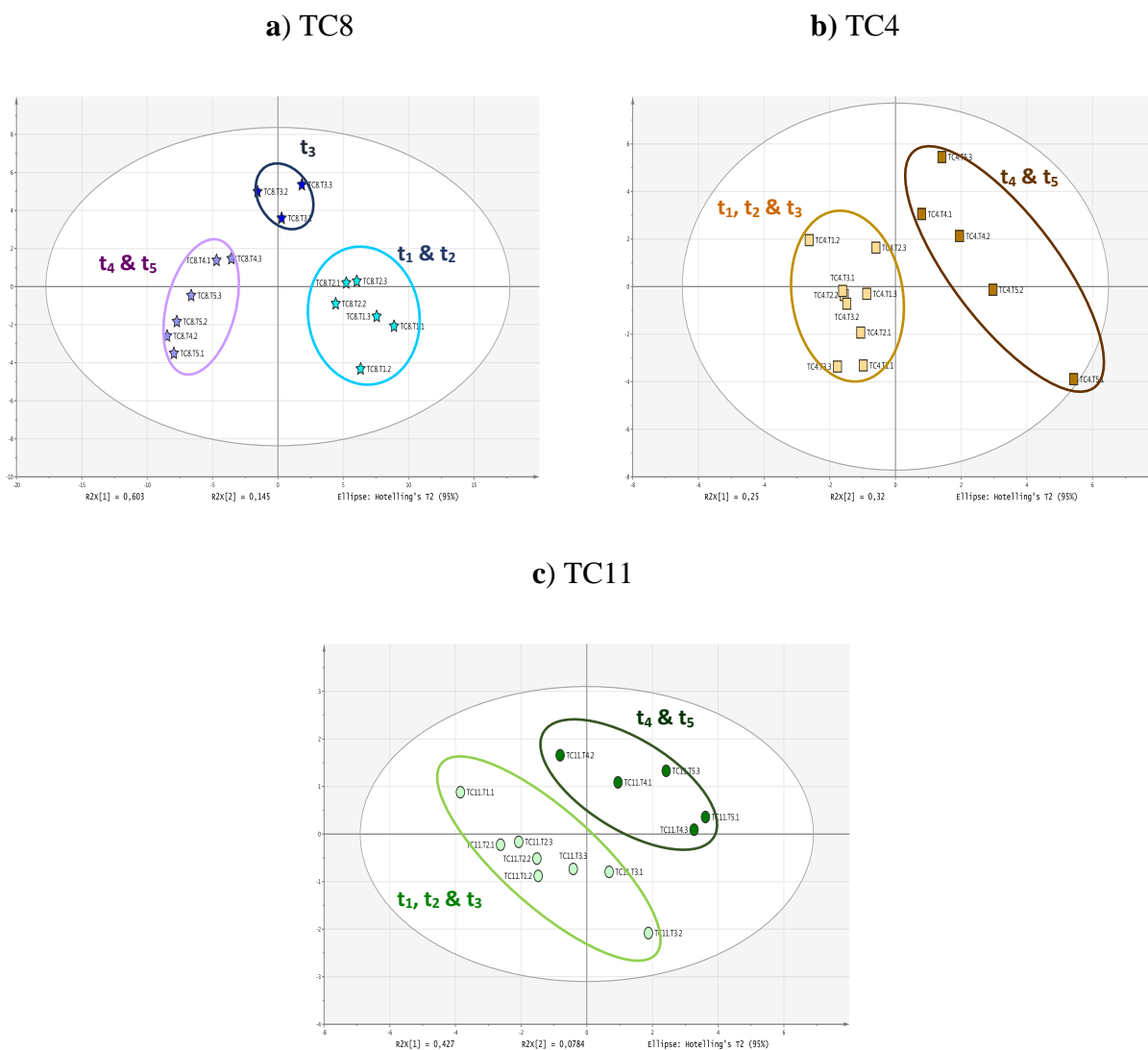


Figure 55: PLS-DA score plots of LC-LRMS profiles of a) *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, b) *Persicivirga* (Nonlabens) *mediterranea* TC4 and c) *Shewanella* sp. TC11 strains (extraction with EtOAc, planktonic cultures in VNSS) at five time points of their growth curve (t₁, t₂ and t₃: exponential phase; t₄ and t₅: stationary phase)

This constructed PLS-DA model was well-fitted to the experimental data: it consisted in four components and the two first explained almost 75% of the variation. The first dimension showed a significant separation between cultures harvested at the beginning and the middle of the exponential phase (t₁ and t₂), the end of this same growth phase (t₃) and the stationary phase (t₄ and t₅) while the second one emphasized the discrimination of cultures collected at the end of the exponential phase (t₃) from the others. With a less pronounced separation between samples of the exponential phase, a similar pattern was also observed for TC4 and, to a lesser extent, for TC11 (Figure 55b and 55c). For TC7, no PLS-DA model allowed highlighting significant differences between samples with the growth phase (data not shown). Finally, the discrimination between all the bacterial species harvested during

the two growth phases (5 time points) was analyzed. The resulting PLS-DA model explained more than 78% of the variance of the dataset (Table 20 and Figure 50c). Here again, the metabolome of the TC8 strain showed the most important variability but a clear discrimination between the metabolomes of the four bacterial strains was observed whatever the phase of growth. In accordance with their taxonomic proximity, it could also be highlighted that the two *P. mediterranea* strains (TC4 and TC7) appeared very close to each other.

It is now well-established that drastic changes may occur in bacterial metabolic production at the transition from exponential phase to stationary phase. This phenomenon is often due to a lowered protein biosynthesis which induces the biosynthetic machinery to switch from a metabolic production mainly dedicated to cell growth during exponential phase towards alternative metabolism producing a new set of compounds during the stationary phase (Alam et al., 2010; Herbst et al., 2015). However, in contrast to well-studied model microorganisms, several marine bacteria undergo a stand-by step between these two growth phases (Gade et al., 2005; Yeom et al., 2013). For each strain, our results showed that most of the changes between the growth phases correspond to the upregulation of a large part of the metabolites during the stationary phase. This trend was already observed in previous studies (Jin et al., 2013; Drapal et al., 2014) but opposite results have also been described due to distinct metabolome coverage and/or studied microorganism (Zech et al., 2009). These bibliographic data were also in accordance with the different behavior of each of the four strains when the metabolome, restricted to the extraction and analytical procedures, was investigated at different time points of the growth curve. The chemical discrimination of these bacteria was thus not dependent on their growth phase. Overall, as the chemical diversity seemed to be higher during the stationary phase, this growth phase was then chosen for the rest of the study.

IV.2.4.4. Impact of the mode of culture (experiment #4)

The bacterial strains were isolated from marine biofilms developed on artificial surfaces immersed *in situ* (Brian-Jaisson, 2014). In addition to their facility to grow *in vitro*, these strains were chosen for their propensity to form biofilms. The intrinsic differences between the metabolisms of planktonic and biofilm cells and the impact of these two modes of culture on the inter-strain discrimination were analyzed by LC-MS profiling of three of the bacteria (due to the chemical similarity of both *P. mediterranea* strains, only TC4 was used for this experiment). For this purpose, these strains were cultured in triplicates in planktonic (at five points of their growth curve) and biofilm modes (at two culture times: 24 and 48h). This difference in growth time between both culture modes was due to the

slow-growing nature of biofilms. So to compare accurately the two modes of cultures, the development of biofilms was performed in static conditions and in the same medium as those used for planktonic growth (VNSS). For each strain, PLS-DA models were constructed and showed a clear discrimination between samples with their culture mode with total variances ranging from 52 to 59% (Figure 56).

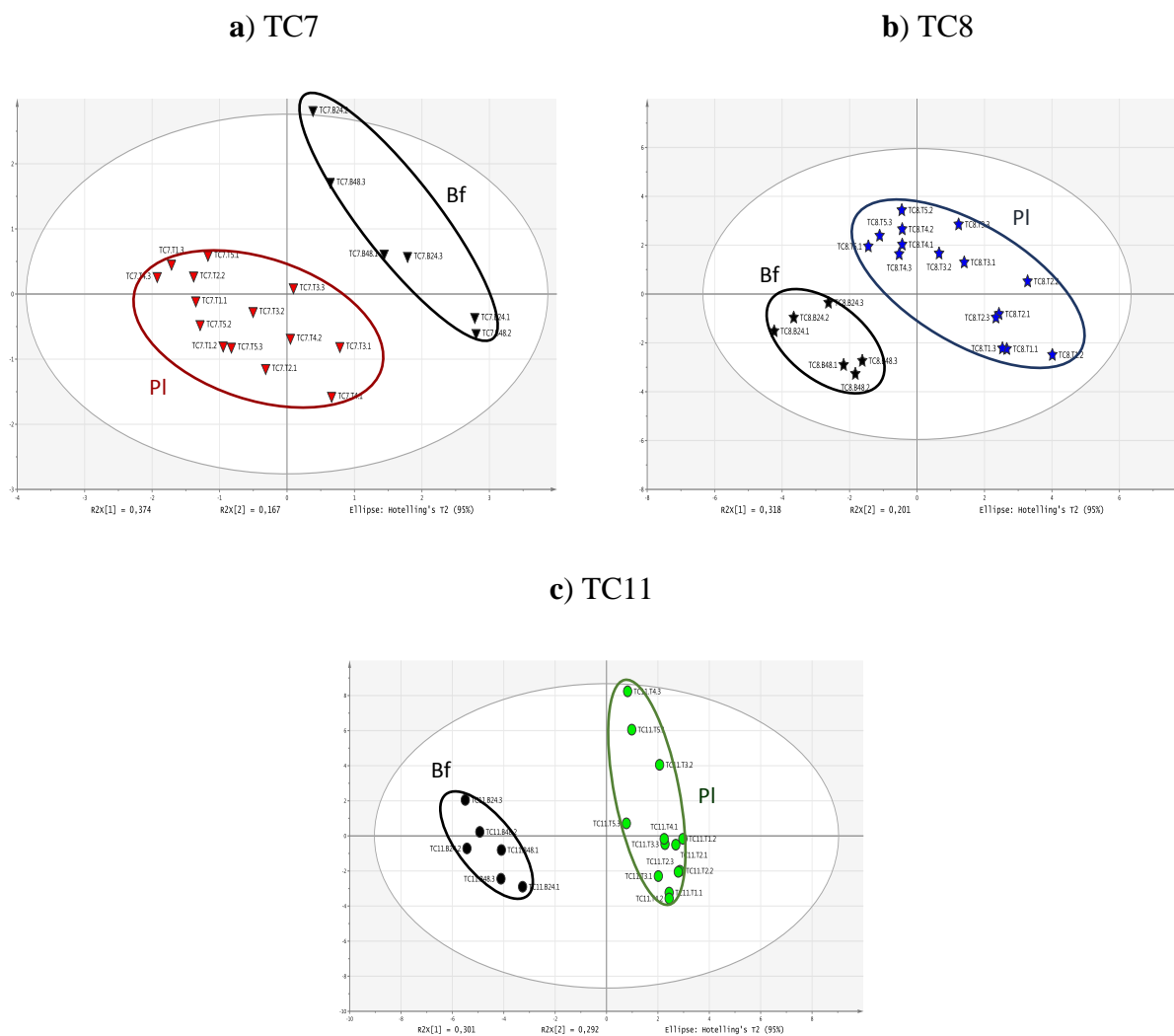


Figure 56: PLS-DA score plots of LC-LRMS profiles of a) *Persicivirga* (Nonlabens) *mediterranea* TC7, b) *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 and c) *Shewanella* sp. strains (extraction with EtOAc, VNSS medium) cultured in planktonic (PI) and biofilm (Bf) modes

PLS-DA models with good-quality parameters were obtained and validation values indicated that they could be regarded as predictable (Table 22). Moreover, a similar number of m/z features upregulated specifically in one of the two culture modes was detected for each strain. When dealing with the inter-strain discrimination for bacteria cultured as biofilms, the three strains were clearly separated on the PCA score plot and the total variance due to the two main projections accounted for 59% (Figure 57a).

The corresponding PLS-DA model showed a similar trend and gave good results indicating that this model could distinguish the three strains (Table 20 and Figure 57b). When the full dataset (biofilms and planktonic cultures) was analyzed, the same pattern was further noticed with the occurrence of one cluster by strain on the PCA score plot (Figure 58). A PLS-DA model was built and demonstrated again, after validation, a good separation among all the strains (Table 20 and Figure 50d).

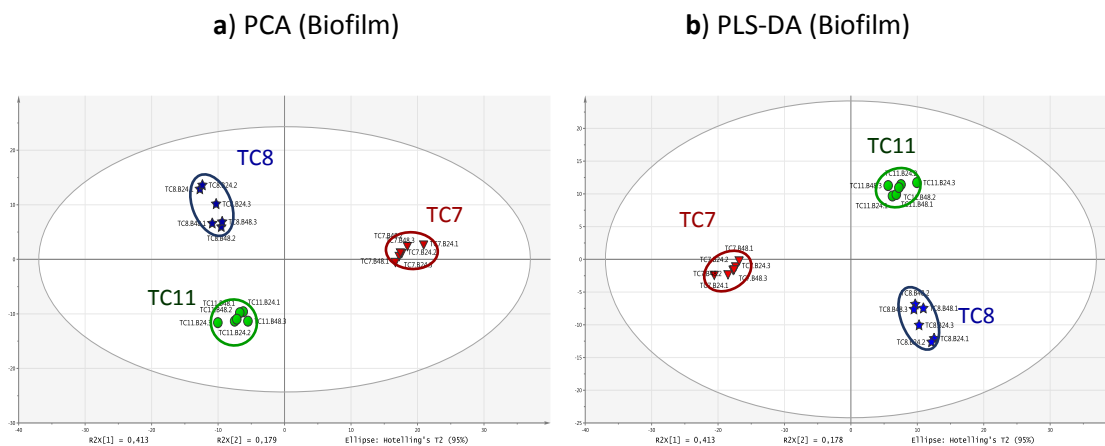


Figure 57 : a) PCA and b) PLS-DA (three-classes model) score plots of LC-LRMS profiles of three of the strains (extraction with EtOAc) cultured in biofilms (24 and 48h) in VNSS

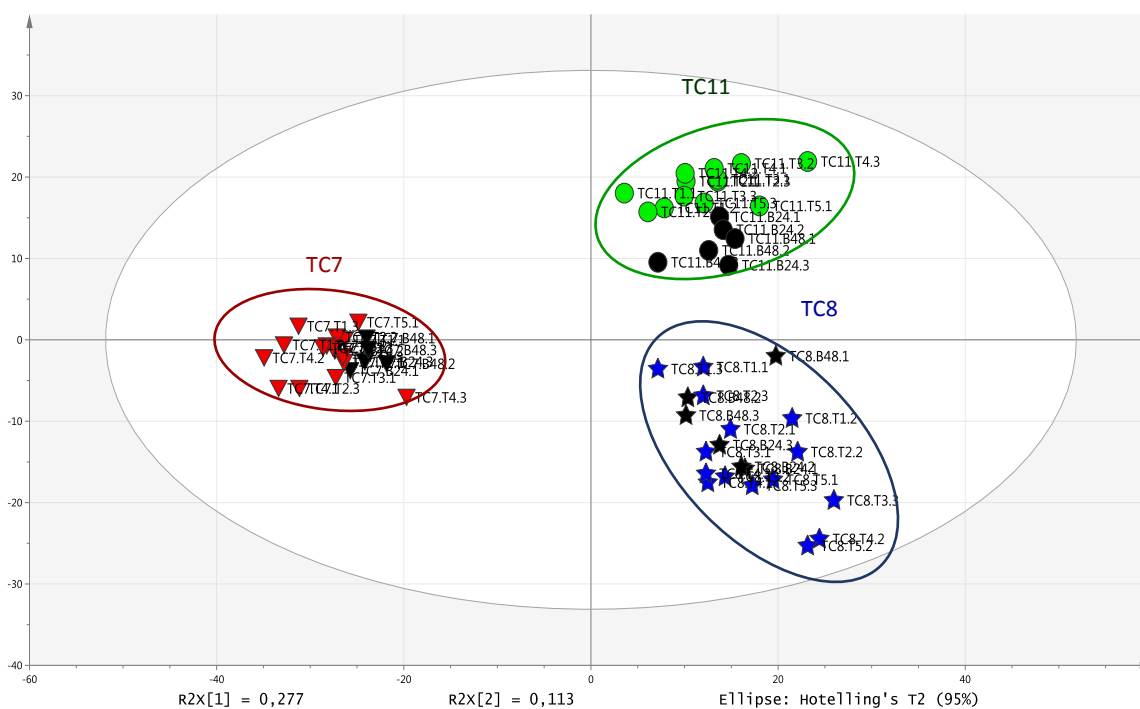


Figure 58: PCA score plots of LC-LRMS profiles of three of the strains (extraction with EtOAc) cultured in biofilms (24 and 48h) and planktonic conditions (five time points of their growth curve) in VNSS

To date, the few metabolomics studies undertaken on biofilms were mostly based on NMR which is limited by intrinsic low-sensitivity (Yeom et al., 2013; Ammons et al., 2014). More specifically, only two studies have used a metabolomic approach with the aim of analyzing marine bacterial biofilms (Chandramouli et al., 2013; Chavez-Dozal et al., 2015). It is now well-established that in many aquatic environments most of the bacteria are organized in biofilms and this living mode is significantly different from its planktonic counterpart (Hall-Stoodley et al., 2004). Deep modifications occur in bacterial cells at various levels (*e.g.* gene expression, proteome, transcriptome) during the transition from free-living planktonic to biofilm states (Sauer, 2003).

Biofilm cells have traditionally been described as metabolically dormant with reduced growth and metabolic activity. Additionally, cells in biofilms show a higher tolerance to stress (*e.g.* chemical agents, competition, and predation). Based on these data, a liquid culture alone does not allow a full understanding of the ecological behavior or the realistic response to a specific challenge in the case of benthic marine bacteria. For the TC4, TC8 and TC11 strains, PLS-DA models allowed an unambiguous distinction between biofilm and planktonic samples at different ages. As described in the literature for other bacteria, these results agreed with a significant metabolic shift between the two modes of culture whatever the strain and the culture time. Considering the biofilm samples and the whole set of samples, our results demonstrate that chemical profiling by LC-MS followed by PLS-DA analysis lead to a clear discrimination between the three strains. Therefore the inter-strain metabolic differences are more significant than the intra-strain differences inherent to the culture mode.

IV.2.4.5. Analytical platforms comparison and identification of putative biomarkers

The data collected during the first part of this study did not allow the annotation of the biomarkers. In this last part, both accurate MS and MS/MS data were obtained from a limited pool of samples (4 strains, EtOAc as extraction solvent, planktonic cultures in VNSS until the stationary phase) with an UPLC-ESI-QToF equipment. UPLC chromatograms of the 4 bacterial strains and of the culture medium are presented in Annex I, Figure AI.1. After extraction and filtering, the data obtained from the LC-HRMS profiles were subjected to chemometric analyses. The resulting PCA and PLS-DA score plots (Figures 59 and 60a) were compared with those obtained with the same set of samples on the previous LC-LRMS platform (Figures 50a and 51c).

For both platforms, the PCA score plots exhibited a clear discrimination between the four strains with a separation of the two couples TC4/TC7 and TC8/TC11 on the first component and between the strains

of each pair on the second component. The main difference relies in the total variance accounted by these two first components which was lower in the case of the HRMS platform (64% instead of 85% for the LRMS platform). The subsequent step was to build a supervised discrimination model using PLS-DA for UPLC-QToF data. As already described for HPLC-IT-MS data, the resulting three-class PLS-DA model led to a proper differentiation of the three bacterial groups (Table 20). Moreover, despite the different kind of chromatographic conditions (HPLC vs UPLC) and mass spectrometry instrumentations (ESI-IT vs ESI-QToF) the two platforms gave similar results and the same conclusion is made with other sets of samples. Moreover, samples used for the study of the impact of the growth phase and the mode of culture on the TC8 strain were also analyzed on the HRMS platform (UPLC chromatograms presented in Annex 1, Figure AI.2) and the resulting PLS-DA model was similar to those obtained on the LC-LRMS platform (Figures 55a and 61).

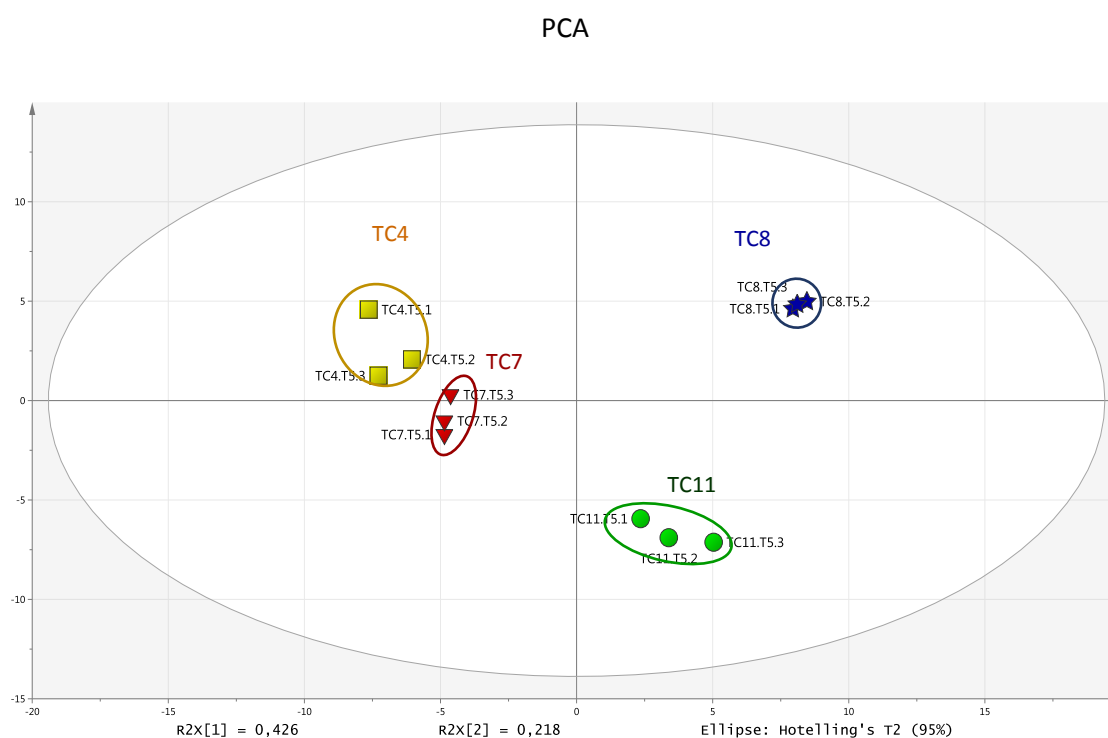


Figure 59: PCA score plots of LC-HRMS profiles of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, stationary phase, planktonic cultures in VNSS)

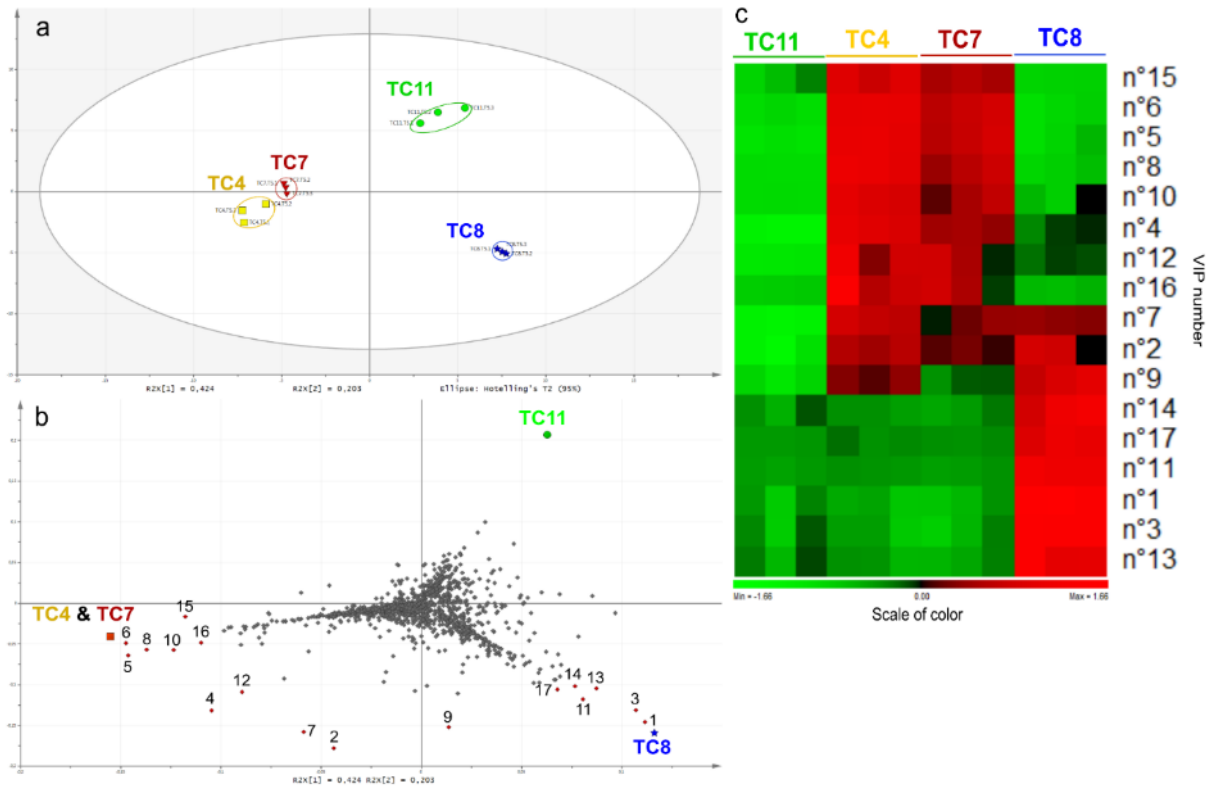


Figure 60: a) PLS-DA score plot obtained from LC-HRMS profiles of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, stationary phase, planktonic cultures in VNSS); b) PLS-DA loading plots with the most contributing mass peaks (VIP) numbered from 1 to 17; c) Heatmap of the 17 differential metabolites with VIP values > 3.0 from the PLS-DA model. Detailed VIP description is given in Table 20

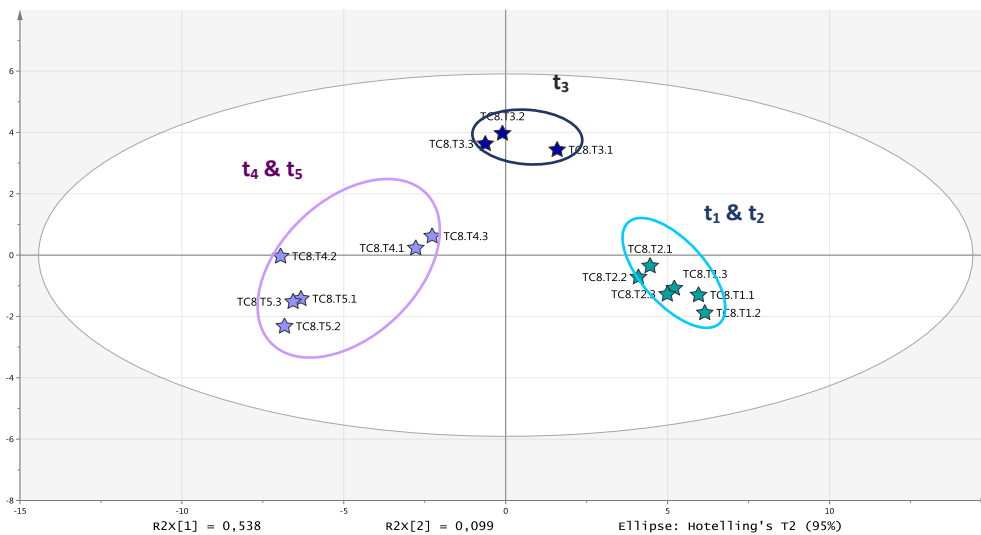


Figure 61: PLS-DA score plots of LC-HRMS profiles of *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 (extraction with EtOAc, planktonic cultures in VNSS) at five time points of its growth curve

In a second step, the aim was to identify putative biomarkers for each bacterial strain. Metabolome annotation is often considered as a bottleneck in the metabolomics data analysis which is even more challenging for non-studied species. For this reason, a molecular network was constructed based on MS/MS data (Figure 62). This analysis has the main advantage to organize mass spectra by fragmentation similarity rendering easier the annotation of compounds of a same chemical family (Watrous et al., 2012). The metabolic network constructed with a set of data including all the strains (EtOAc as extraction solvent, planktonic cultures in VNSS until the stationary phase) highlighted several clusters. At the same time, the most discriminating m/z features in the PLS-DA model (Figures 60b and 60c) were selected based on their VIP score which resulted in 17 compounds with VIP value higher than 3 (Table 23).

The molecular formulae of each VIP were proposed based on accurate mass measurement, true isotopic pattern and fragmentation analysis. A detailed analysis of VIP and metabolic network revealed that most of these discriminant metabolites constitute the cluster A (Figure 62). These chemical compounds were specific to TC8 on one hand, and to TC4 and TC7 on the other hand. Interestingly, all these specific compounds showed a similar fragmentation pattern with a characteristic ion fragment at m/z 115. A bibliographic review allowed us to propose ornithine-containing lipids (OL) as good candidates for this chemical group. OLs are widespread among Gram-negative bacteria, more rarely found in Gram-positive ones, and absent in eukaryotes and archaea (Moore et al., 2016). These membrane lipids contain an ornithine head group linked to a 3-hydroxy fatty acid via its α -amino moiety, and a second fatty acid chain (also called “piggyback” fatty acid) esterified to the hydroxyl group of the first fatty acid. In some bacteria the ester-linked fatty acid can be hydroxylated, usually at the C-2 position (Geiger et al., 2010).

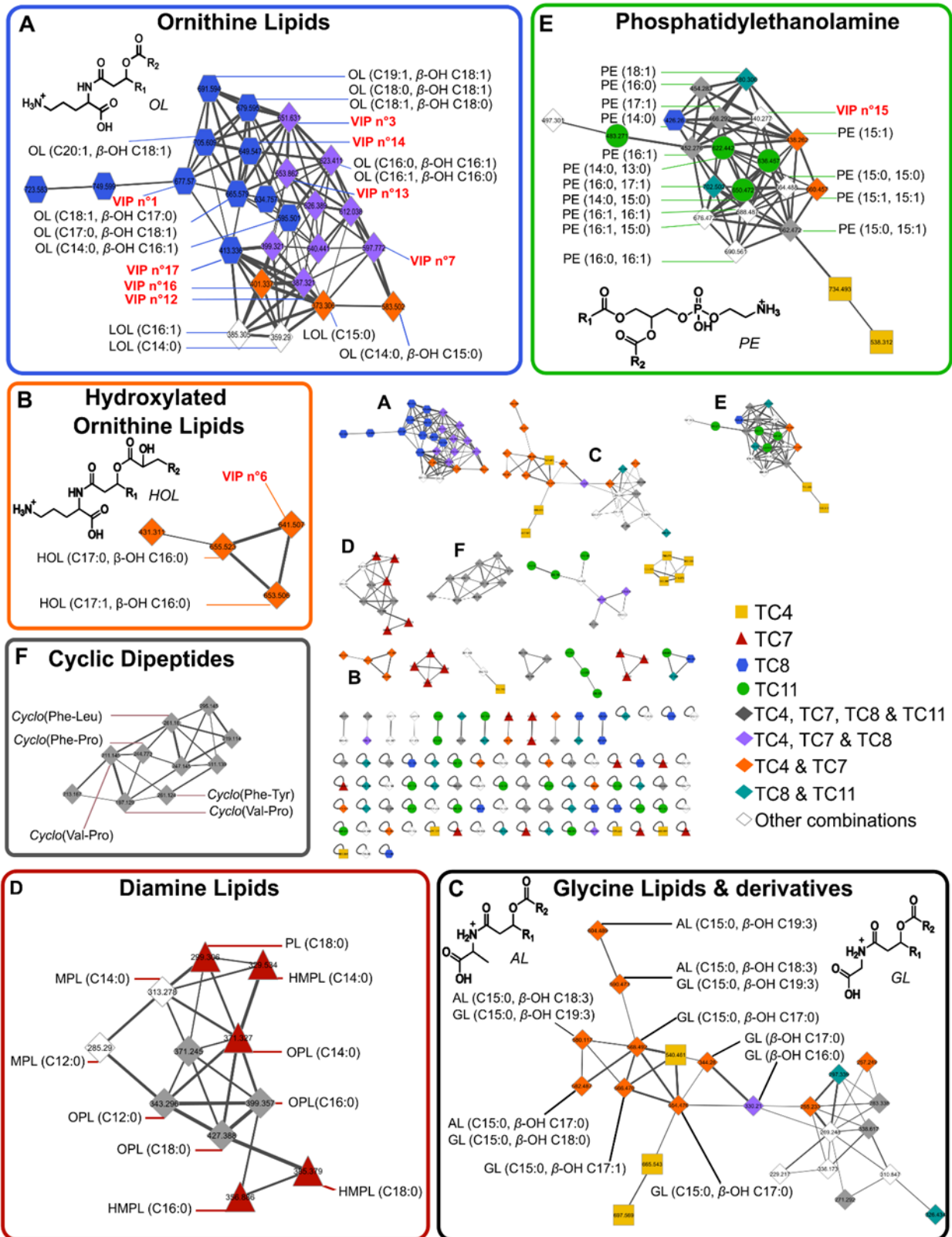


Figure 62: Molecular networks of HRMS fragmentation data obtained from cultures of the four bacterial strains (extraction with EtOAc, stationary phase, planktonic cultures in VNSS); AL: alanine lipid, GL: glycine lipid, HOL: hydroxylated ornithine lipid, HPL: hydroxylated putrescine lipid, LOL: lyso-ornithine lipid. MPL: methylated putrescine lipid, OL: ornithine lipid, PE: phosphatidylethanolamine, PL: putrescine lipids

OLs show a specific MS fragmentation pattern used in this study for their identification. Characteristic multistage MS fragmentation patterns include the sequential loss of H₂O (from the ornithine part), the piggyback acyl chain and the amide-linked fatty acid (Zhang et al., 2009). This characteristic mode of fragmentation leads to head group fragment ions at m/z 159 (C₆H₁₁N₂O₃), 141 (C₆H₉N₂O₂), 133 (C₅H₁₃N₂O₂), 115 (C₅H₁₁N₂O₂), and 70 (C₄H₈N). On that basis, HRMS/MS fragmentation of VIP N°1 (m/z 677) is proposed in Figure 63 and the same pattern is observed for the other OLs (Table 23). In Gram-negative bacteria, membranes are constituted by polar lipids frequently composed of phospholipids like phosphatidylethanolamine (PE). In this work, this type of lipids was detected in the four strains (cluster E, Figure 62) but several studies have shown that under phosphorus starvation, which is common in marine environments, the production of non-phosphorus polar lipids such as OLs may increase significantly (Sandoval-Calderón et al., 2015; Yao et al., 2016). Moreover, due to their zwitterionic character, OLs have been speculated to play a crucial role for the membrane stability of Gram-negative bacteria and more broadly for the adaptation of the membrane in response to changes of environmental conditions. Our results have been obtained in poor-phosphorus culture media and OLs are biosynthesized by three of the strains but not by *Shewanella sp.* TC11. In a same way, components of cluster B specifically produced by Bacteroidetes (TC4 and TC7) were identified as hydroxylated OLs (HOLs). These compounds showed the same MS fragmentation pattern than their non-hydroxylated analogs, while a supplementary loss of H₂O was observed at the beginning of the MS fragmentation pathway. HRMS/MS fragmentation of VIP N°8 (m/z 613) is proposed in Annex II, Figure All.1. HOLs have been described as metabolites specifically produced by bacteria under stress (*e.g.* temperature (Taylor et al., 1998), pH (Vences-Guzmán et al., 2011)): the occurrence of an additional hydroxyl group seems to be implied in the membranes stability via an increase of strong lateral interactions between their components (Nikaido, 2003). HOLs were mainly described in α -, β -, and γ -Proteobacteria and Bacteroidetes (Sohlenkamp and Geiger, 2015). In our study HOLs were only detected in LC-MS profiles of Bacteroidetes (TC4 and TC7) but not in those of the γ -Proteobacteria (TC8 and TC11). Concerning the position of the additional hydroxyl group in these derivatives, the absence of characteristic ion fragments for ornithine head-group hydroxylation (Moore et al., 2016) indicated that this group was linked to one of the two fatty acids (at the 2-position). This structural feature is in agreement with the fact that hydroxylation of the ornithine head group in HOLs was only observed in α -Proteobacteria but not in Bacteroidetes (Sohlenkamp and Geiger, 2015). TC4 and TC7 were also clearly discriminated from the other strains through another class of metabolites putatively identified on the basis of their HRMS/MS data as glycine lipids (GLs) and close derivatives, namely methylglycine or alanine lipids (cluster C, Figure 62). These compounds are structurally similar to OLs, the main

difference being the replacement of the ornithine unit by a glycine one. They showed a similar fragmentation sequence and were specifically characterized by head group fragment ions at m/z 76 ($C_2H_6NO_2$) for GLs and m/z 90 ($C_3H_8NO_2$) for methylglycine or alanine lipids. HRMS/MS fragmentations of a GL (m/z 554) and alanine lipid (m/z 582) are proposed in Annex II, Figure AII.2 and AII.3 respectively. This last class of compounds needs to be further confirmed by purification and full structure characterization. In a chemotaxonomic point of view, GLs are valuable compounds as they had only been described from Bacteroidetes and thus seem to be biomarkers of this bacterial group (Sohlenkamp and Geiger, 2015). Finally, when considering the discrimination between the two *P. mediterranea* strains, TC7 specifically produces a variety of lipids tentatively assigned as N-acyl diamines by HRMS/MS (cluster D, Figure 62). More precisely, a fragmentation pattern common for most of the compounds of cluster D showed the occurrence of a diamine backbone with an amide-linked fatty acid and yielded fragment ions at m/z 89 ($C_4H_{13}N_2$) and 72 ($C_4H_{10}N$) characteristic of the putrescine head group (Voynikov et al., 2016). HRMS/MS fragmentation of a putrescine lipid (m/z 355) is proposed in Annex II, Figure AII.4. Several other chemical members of this cluster showed similar fragmentation pathways but with fragment ions in accordance with slight variations of the chemical structure of the head group (*N*-methylation, hydroxylation). In the case of TC7, compounds with a hydroxylated head group were specifically overexpressed. According to literature data, polyamines are commonly found in most living cells and, among this chemical family, putrescine constitutes one of the simplest member (Michael, 2016). This diamine is widespread among bacteria and is involved in a large number of biological functions (Miller-Fleming et al., 2015). Taking into account the few studies on natural N-acyl diamines and their MS fragmentation and, the absence of commercially available standards, further structure investigations are required to fully characterize this class of bacterial biomarkers. Finally, some other specific clusters were remarkable in the molecular network but without possible affiliation of the corresponding compounds to an existing chemical family. Conversely, molecular components of the non-discriminative cluster F were putatively identified as cyclic dipeptides. This type of compounds exhibit a wide range of biological functions and cyclic dipeptides are involved in chemical signaling in Gram-negative bacteria with a potential role in inter-kingdom communication (Holden et al., 1999; Ryan and Dow, 2008; Ortiz-Castro et al., 2011).

Tableau 23 : List of the biomarkers (VIP value > 3) identified by LC-HRMS for the discrimination of the four bacterial strains

VIP number	m/z	RT (s)	VIP value	Formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	I expl ^b (%)	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
1	677.5806	438	4.0	C ₄₁ H ₇₇ N ₂ O ₅	3.8	4.9	63.5	659 (3) ^c , 413 (16) ^d , 395 (62) ^e , 377 (62) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (25) ^g	OL (C18:1, C18:1)
2	625.5501	425	4.0	C ₃₇ H ₇₃ N ₂ O ₅	2.0	3.6	93.6	607 (2) ^c , 387 (11) ^d , 369 (41) ^e , 351 (44) ^f , 159 (6) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (24) ^g	OL (C16:0, C16:0)
3	651.5653	429	3.7	C ₃₉ H ₇₅ N ₂ O ₅	2.7	5.9	61.7	633 (3) ^c , 413 (6) ^d , 395 (24) ^e , 377 (24) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (21) ^g	OL (C18:1, C16:0)
4	611.5354	426	3.7	C ₃₆ H ₇₁ N ₂ O ₅	0.6	2.8	62.5	593 (2) ^c , 387 (12) ^d , 369 (43) ^e , 351 (48) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (25) ^g	OL (C16:0, C15:0)
5	627.5304	408	3.5	C ₃₆ H ₇₁ N ₂ O ₆	0.4	2.4	81.7	609 (< 1) ^c , 591 (< 1) ^h , 387 (8) ^e , 369 (58) ^f , 351 (62) ⁱ , 159 (7) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (16) ^g	HOL (C16:0, C15:0)
6	641.5462	417	3.4	C ₃₇ H ₇₃ N ₂ O ₆	0.2	1.7	80.5	623 (1) ^c , 605 (< 1) ^h , 401 (7) ^e , 383 (50) ^f , 365 (52) ⁱ , 159 (6) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (15) ^g	HOL (C17:0, C15:0)
7	597.5184	418	3.3	C ₃₅ H ₆₉ N ₂ O ₅	2.8	1.8	57.7	579 (2) ^c , 387 (2) ^d , 369 (8) ^e , 351 (10) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (36) ^g	OL (C16:0, C14:0)
8	613.5149	398	3.3	C ₃₅ H ₆₉ N ₂ O ₆	0.2	1.3	78.9	595 (1) ^c , 577 (< 1) ^h , 387 (5) ^e , 369 (33) ^f , 351 (37) ⁱ , 159 (7) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (22) ^g	HOL (C16:0, C14:0)
9	623.5339	425	3.2	C ₃₇ H ₇₁ N ₂ O ₅	2.9	1.5	66.8	605 (2) ^c , 385 (3) ^d , 367 (12) ^e , 349 (12) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (24) ^g	OL (C16:1, C16:0)
10	639.5299	403	3.0	C ₃₇ H ₇₁ N ₂ O ₆	1.2	10.5	81.0	621 (1) ^c , 603 (< 1) ^h , 399 (< 1) ^e , 381 (58) ^f , 363 (56) ⁱ , 159 (7) ^g , 141 (3) ^g , 133 (6) ^g , 115 (100) ^g , 70 (21) ^g	HOL (C17:1, C15:0)
11	621.5182	409	3.0	C ₃₇ H ₆₉ N ₂ O ₅	3.0	8.6	61.0	603 (2) ^c , 385 (15) ^d , 367 (54) ^e , 349 (52) ^f , 159 (5) ^g , 141 (3) ^g , 133 (6) ^g , 115 (100) ^g , 70 (36) ^g	OL (C16:1, C16:1)
12	387.3218	294	3.0	C ₂₁ H ₄₃ N ₂ O ₄	-0.3	12	103.6	369 (3) ^c , 351 (5) ^h , 159 (1) ^g , 141 (3) ^g , 133 (7) ^g , 115 (100) ^g , 70 (62) ^g	LOL (C16:0)
13	653.5808	446	3.0	C ₃₉ H ₇₇ N ₂ O ₅	2.9	7.1	63.0	635 (2) ^c , 415 (8) ^d , 397 (28) ^e , 379 (29) ^f , 159 (5) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (35) ^g	OL (C18:0, C16:0)
14	649.5498	430	3.0	C ₃₉ H ₇₃ N ₂ O ₅	2.5	2.6	66.0	631 (2) ^c , 413 (7) ^d , 395 (27) ^e , 377 (27) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (23) ^g	OL (C18:1, C16:1)
15	440.2769	340	3.0	C ₂₀ H ₄₃ NO ₇ P	0.2	15.2	76.6	299 (100) ⁱ	PE (C15:0)
16	401.3373	305	3.0	C ₂₂ H ₄₁ N ₂ O ₄	0.1	16.0	81.5	383 (4) ^c , 365 (6) ^h , 159 (2) ^g , 141 (4) ^g , 133 (7) ^g , 115 (100) ^g , 70 (60) ^g	LOL (C17:0)
17	413.5187	304	3.0	C ₂₃ H ₄₅ N ₂ O ₄	0.2	13.6	80.5	395 (4) ^c , 377 (6) ^h , 159 (2) ^g , 141 (4) ^g , 133 (10) ^g , 115 (100) ^g , 70 (51) ^g	LOL (C18:1)

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list, ^c[M + H - H₂O]⁺; ^d[M + H - RCOH]⁺; ^e[M + H - H₂O - RCOH]⁺; ^f[M + H - 2 H₂O - RCOH]⁺; ^gOther typical OL ion fragments; ^h[M+H - 2 H₂O]; ⁱ[M + H - 3 H₂O - RCOH]⁺; ^j[M + H - C₂H₅NO₄P]⁺.
HOL: Hydroxylated ornithine lipid, LOL: Lyso-ornithine lipid, OL: Ornithine lipid, PE: Phosphatidylethanolamine.

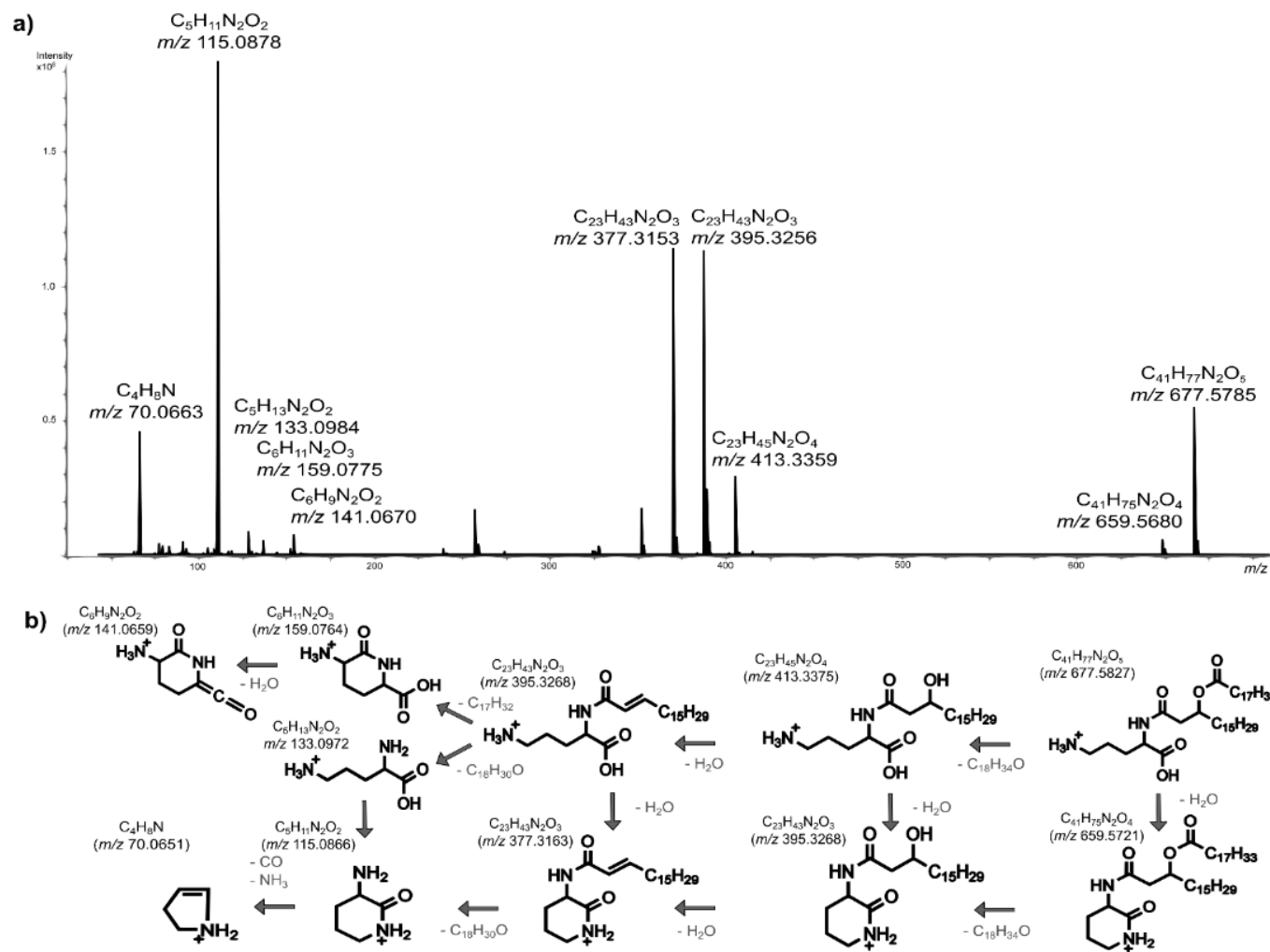


Figure 63: a) HRMS mass spectra of *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 ornithine lipid at m/z 677.5785 (VIP n°1); b) Proposed fragmentation of VIP n°1 (the elemental composition of fragment ions is indicated and the corresponding theoretical value of m/z is given in parentheses)

IV.2.5. Conclusion

In this study, we describe a metabolomics approach applied to the assessment of the effects of several culture parameters, such as culture media, growth phase or mode of culture, in the metabolic discrimination between four marine biofilm-forming bacteria. The developed method based on a simple extraction protocol can differentiate bacterial strains cultured in organic-rich media. Depending on the culture parameters, some significant intra-strains metabolic changes were observed but overall these metabolome variations are always less pronounced than inter-strains differences. Finally, several class of biomarkers were putatively identified via HRMS/MS analysis and molecular networking. As main outcomes, OLs were identified as specifically produced by three of the bacteria while HOLs and GLs were only detected in the two Bacteroidetes strains.

Our study provides evidence that such an analytical protocol is useful to explore more deeply the metabolome of marine bacteria in various culture conditions, including cultures in organic-rich media and biofilms. This efficient process gives information on the metabolome of marine bacterial strains that represent complementary data to those provided by genomic, transcriptomic and proteomic analyses on the regulatory and metabolic pathways of marine bacteria involved in biofilms. Also, a broader coverage of the biofilm metabolome requires the examination of polar extracts even if high-salt contents limit drastically the analysis capabilities of polar compounds in marine bacterial cultures and environmental biofilm samples.

As important result, bacterial acyl amino acids, and more broadly membrane lipids, can be used as efficient biomarkers not only for chemotaxonomy but also directly for studies directed towards bacterial stress response. Indeed, a targeted analysis of GLs would be efficient to estimate the occurrence of Bacteroidetes in complex natural biofilms while OLs and HOLs would be valuable molecular tools to evaluate the response of bacteria to specific environmental conditions.

IV.2.6. Acknowledgements

This study was partly funded by the French “Provence-Alpes-Côte d’Azur (PACA)” regional council (L.F. PhD grant). The authors are grateful to R. Gandolfo for the kind support of the French Mediterranean Marine Competitivity Centre (Pôle Mer Méditerranée) and wish to thank J.C. Tabet, R. Lami, G. Genta-Jouve, J.F. Briand and B. Misson for helpful discussions. LC-HRMS experiments were acquired on the regional platform MALLABAR (CNRS and PACA supports).

CHAPITRE V

Etude par métabolomique et protéomique
de la discrimination phénotypique de
Pseudoalteromonas lipolytica TC8 cultivée
en mode planctonique et en biofilm



V.1 Introduction

Les travaux présentés dans ce chapitre portent sur l'étude des variations du métabolome et du protéome de la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 en fonction de son mode de culture : en suspension (condition planctonique) ou en biofilm (condition sessile).

Cette souche bactérienne a été spécifiquement sélectionnée car, parmi les quatre bactéries précédemment étudiées dans le chapitre IV, il s'agit de celle qui a témoigné des variations métaboliques intra-souches les plus marquées en fonction du temps de croissance et du mode de culture. Par ailleurs, le genre *Pseudoalteromonas* constitue, de par sa représentation dans tous les océans, le plus étudié des trois genres précédemment sélectionnés. En effet, les *Pseudoalteromonas* ont fait l'objet de nombreux travaux, principalement en lien avec la recherche de leurs rôles écologiques, mais aussi plus généralement pour leur capacité à former des biofilms et à synthétiser des composés bioactifs (Holmström and Kjelleberg, 1999; Offret et al., 2016). Un certain nombre d'études sont ainsi disponibles sur ce genre bactérien et permettent d'avoir des éléments de comparaison et de discussion pour les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse. Enfin, d'un point de vue pratique *P. lipolytica* TC8 est l'une des souches bactériennes précédemment sélectionnées qui possède le temps de croissance le plus rapide et avec laquelle aucun problème de phase de latence n'est observé lors de la mise en culture.

Les travaux de ce chapitre font l'objet d'une publication en cours de préparation. Ils sont ainsi présentés en anglais dans le format de la publication. Les informations supplémentaires qui seront fournies au journal sont ici intégrées dans le texte.

V.2. Article: A combined metabolomics/proteomics approach for the differentiation between biofilm and planktonic phenotypes of *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8

V.2.1. Abstract

A number of bacteria may adopt various lifestyles such as planktonic free-living and sessile biofilm stages. This enables their survival and development in a wide range of drastically contrasted environments. With the aim to highlight specific metabolic shifts between these phenotypes, a comparative metabolomics/proteomics approach was applied to planktonic and biofilm samples of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. The resulting data were subjected to multivariate analyses and showed a clear separation between planktonic and biofilm samples. The liquid

chromatography mass spectrometry (LC-MS) based metabolomics study indicated that phosphatidylethanolamine (PE) derivatives were over-produced in biofilm samples while ornithine lipids (OLs) were more specifically biosynthesized in planktonic cultures. Differences between proteomes of biofilm and planktonic stationary cultures revealed that various processes were impacted among which, some regulating biosynthesis of important biofilm-related molecules, such as amino acids (e.g. arginine, histidine), some others being implied in nutrient assimilation pathways (e.g. sulfur, phosphorus).

V.2.2. Introduction

Most bacterial cells possess the ability to live in suspension (planktonic free-living state) or as communities adhered on biotic or abiotic surfaces (biofilm sessile state). The biofilm structure provides several advantages to the cells. In biofilms, the survival of the bacteria does not rely on their rapid multiplication which is advantageous in the constant movement of the aquatic environment (Jefferson, 2004) but this lifestyle is mainly known to increase resistance of bacterial cells to different types of environmental stresses (e.g. starvation, desiccation, oxidation, biocides, grazing, and hydrodynamic shear forces) (Flemming and Wingender, 2010). According to their location in the three-dimensional structure, biofilm cells are exposed to completely different micro-environments which is not the case for their planktonic analogues cultivated in a homogeneous media. Therefore, metabolic activity at the biofilm scale is heterogeneous. Indeed, many genes are differentially expressed in biofilms compared to planktonic cells. This is also supported by the fact that biofilm lifestyle implies EPS production, development of special structures (e.g. fimbriae, curli), implementation of specific biochemical interactions, more particularly chemical signalling, and generation of a different phenotype (Lopez et al., 2010). The growth transition between these two bacterial life history modes thus involves radical physiological, structural and biochemical shifts. To date, most studies dealing with bacterial biofilms have focused on some of their particular features or have used recent molecular techniques linked to genomics, transcriptomics or proteomics to compare biofilm characteristics to those of their planktonic counterparts (Neufeld et al., 2007; Jones et al., 2012). With the huge development of metabolomics during the last decade and even if this research field is still in its infancy, it is now possible to gain insight into metabolites which constitute the final products of gene expression. This type of studies allows to understand the biochemical reactions catalysed by microorganisms and to directly correlate the metabolic production to the cell physiology (Gjersing et al., 2007; Yeom et al., 2013; Ammons et al., 2014; Wong et al., 2015). Proteomics gives complementary information not only on the whole set of catalysers produced by the bacterial cells, but also on proteins with miscellaneous

structural functions or cellular roles (e.g. signalling or adhesion). More recently, a promising approach combining metabolomics and proteomics has been used to decipher the variations occurring between planktonic and biofilm samples of the symbiotic bacteria *Vibrio fischeri* (Serra et al., 2008; Kleiner et al., 2012; Booth et al., 2013; Chavez-Dozal et al., 2015). More generally, analysis of both metabolome and proteome, as they are often the end-products of regulatory processes, will provide a fairly complete vision on the biochemical “action-reaction” of a bacterial strain cultured in specific conditions or submitted to various stresses.

Pseudoalteromonas, a widespread bacterial genus in marine environments, comprises 41 species and two subspecies with valid names (Hwang et al., 2016). It belongs to the γ -Proteobacteria class and is classified in the Pseudoalteromonadaceae family. This genus constitutes a readily culturable bacterial group and its related species are frequently isolated from various marine samples such as natural biofilms or eukaryotes. *Pseudoalteromonas* species were specifically studied for their ecological significance together with their pharmaceutical and antifouling potential (Holmström and Kjelleberg, 1999; Bowman, 2007)(Holmström and Kjelleberg, 1999; Bernbom et al., 2011). Indeed, several of these species have demonstrated the ability to induce or inhibit the settlement of organisms commonly implied in the biofouling phenomenon (Dobretsov and Qian, 2006; Hadfield, 2011; Yang et al., 2013). In view of their capacity to live attached and to produce high amounts of EPS (Poli et al., 2010; Brian-Jaisson et al., 2016), together with a wide range of bioactive chemicals (Offret et al., 2016), *Pseudoalteromonas* strains appear to play a significant role in marine ecosystems. *P. lipolytica* TC8 was isolated from a natural biofilm formed on a silicon coupon immersed in the Bay of Toulon (Mediterranean Sea). This strain was selected for this work on the basis of its taxonomic affiliation and its ease for growing when cultured planktonically or as biofilms (Brian-Jaisson, 2014). Concerning the marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*, no combined metabolomic/proteomic study has been undertaken to date with the aim of analysing the biochemical changes between planktonic and biofilm stages.

Previous metabolomics studies dealing with differences between planktonic cells and biofilms in other bacterial genera were mostly performed using nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry or gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). In recent years, liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) has emerged as a versatile, robust and indispensable platform for non-targeted metabolomics. This fact was largely due to the development of stationary phases with sub-2 μ m particles (Ultra high performance liquid chromatography, UHPLC) and various chemical properties which now allow to obtain higher separation of a wider range of compounds within shorter analysis

times (Zhou et al., 2012). For MS analysis, electrospray ionisation (ESI) is a soft ionisation method usually selected as it conducts to a valuable ionisation for various classes of molecules. Hybrid instruments with very fast scanning rates, such as quadrupole time of flight mass spectrometry (QToF-MS), are widely used in coupling with UHPLC either for targeted and non-targeted studies (Theodoridis et al., 2012). This type of mass spectrometers offers the possibilities of integrating MS/MS experiments giving thus additional spectral information on the metabolites. These specific data permitted the construction of spectral networks (e.g. Global Natural Products Social, GNPS) which give a representation of the whole metabolome with similar compounds gathered in a same cluster (Watrous et al., 2012). Such original tools then facilitate metabolome annotation when non-model organisms are analysed.

In this context, the present study aimed to determine differences between the metabolic and protein profiles of *P. lipolytica* TC8 cultured in biofilm and planktonic modes by a combined metabolomic and proteomic approach. With each of these “omics”, multivariate statistical analyses (PCA and PLS-DA) of the resulting data showed a clear discrimination between the two types of samples. Metabolomics analysis indicated that drastic chemical changes occurred in membranes while proteomics provided new knowledge about the influence of growth mode on the protein composition. Therefore, this work intended to better understand some of the key biological aspects of the switch between the two life history strategies of *P. lipolytica* TC8 for purposes of revealing novel targets allowing the development of new antifouling strategies.

V.2.3. Materials and Methods

V.2.3.1. Reagents

Ethyl acetate (EtOAc) used for the extraction procedures was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). UPLC-MS analyses were performed using LC-MS-grade acetonitrile (ACN) and MeOH (VWR). Milli-Q water was generated by the Millipore ultrapure water system (Waters-Millipore Corporation, Milford, MA, USA). Formic acid of mass spectrometry grade (99%) was obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

V.2.3.2. Cell Growth Conditions

P. lipolytica TC8 is a γ -Proteobacteria isolated from a marine biofilm harvested in a silicon plate after 6h of immersion (1m deep) in the bay of Toulon (43°06'23''N, 5°57'17''E). It was stored at -80°C in 50%

glycerol medium until use. Cultures were performed in Väättänen nine salt solution (VNSS). The starter culture was made in VNSS at 20°C on a rotator/shaker (120 rpm) to the end of the log phase of growth. For planktonic cultures, bacteria from the starter culture were diluted in fresh culture medium at a defined absorbance unit (OD_{600}) for a total volume of 10 or 50 mL depending on the experiment. To follow the cell growth, medium turbidity was measured at 600 nm (Genesys 20 spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cultures were then incubated until the cells reached the stationary phase (5h for the beginning and 7h). For biofilm development, pre-cultured planktonic cells were diluted in fresh culture medium at 0.1 absorbance unit (OD_{600}) in Petri dishes for a total volume of 10 mL and incubated 24h or 48h in static conditions at 20°C.

V.2.3.3. Metabolome Analysis

Metabolomic analyses were then conducted as described before (*cf.* Chapter IV). Briefly metabolite extractions were performed with EtOAc (2:1, v/v: solvent/bacterial culture). The resulting mixture was shaken for 1 min and sonicated for 30 min at 20°C. The organic phase was collected and concentrated to dryness until utilization. Dried extracts were recovered in 500 μ L MeOH and 5 μ L were analysed by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS). It consisted in a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific) chromatographic system coupled with a Q-ToF Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics). Separation was performed using an analytical core-shell reversed-phase column (150 \times 2.1 mm, 1.7 μ m, Kinetex Phenyl-Hexyl with a SecurityGuard cartridge, Phenomenex) with a column temperature of 40°C and a flow rate of 0.5 mL/min. The elution gradient (A: H₂O + 0.1% formic acid; B: acetonitrile + 0.1% formic acid; A:B, v/v) was as follows: gradient : 0-1 min at 20% of B, from 20% to 100% of B in 6 min and kept 4 min, from 100% to 20% of B in 0.5 min and kept 2 min. The capillary voltage was set at 4500 V (positive mode) and the nebulizing parameters were set as follows: nebulizing gas (N₂) pressure at 0.4 Bars, drying gas (N₂) flow at 4 L/min, and drying temperature at 180°C. Mass spectra were recorded from m/z 50 to 1200 at a mass resolving power of 25,000 full width half maximum (FWHM, $m/z = 200$) and a frequency of 2 Hz. In order to facilitate the identification of remarkable compounds, a second set of experiments was carried out by UPLC-QToF with tandem mass spectrometry (MS/MS). Tandem mass spectrometry analyses were performed thanks to a collision induced dissociation (CID) with a collision energy of 25 eV. A solution of formate/acetate forming clusters was automatically injected before each sample for internal mass calibration and the mass spectrometer was calibrated with the same solution before each sequence of samples. Data handling was done using Data Analysis (version 4.3). The order of injection followed a specific scheme to allow quality control of data and features filtering. Raw data

were pre-processed with the XCMS software (version 1.38.0) under R 3.1.0 environment. Redundant signals were suppressed by three successive filtrations thanks to an in house script on R. The data were log₁₀ transformed, mean-centered and analysed by principal component analysis (PCA) and by partial least-square discriminant analyses (PLS-DA) under the Simca 3.0.3 software. All the supervised models were tested for overfitting with a permutation test and cross validation of variance (CV-ANOVA). Variables with the best importance on projection (VIP) identified from the PLS-DA analyses were subjected to annotation by searching the most probable molecular formula with the “smartformula” package of DataAnalysis and by analyzing their accurate masses and their fragmentation patterns comparing with the freely available databases (Metlin, KEGG, Pubchem, Chempid and Lipidmaps). Identification of compounds of a same chemical family was facilitated by the building of a molecular networking (GNPS).

V.2.3.4. Proteome analysis

V.2.3.4.1. Sample preparation

P. lipolytica TC8 was cultured in planktonic and biofilm modes in triplicates. After 7h or 48h respectively, planktonic and biofilm cultures were centrifuged (4000 rpm, 4°C, 15 min) two times in order to wash cells which were suspended in equal volume of sterile cold ASW between the two centrifugations. Pellets were stored at -80°C until use. They were then suspended in five pellet volumes of a lysis buffer (10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HCl, pH 8.0) with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St Quentin, France). For the protein extraction, cell solutions were sonicated on ice (three cycles of 10s, 100W, followed by resting intervals of 10s) in order to disrupt cells. Unbroken cells and aggregated proteins were removed by centrifugation at 14 000g at 4°C for 20 min. Protein content from the different soluble fractions was quantified by the Bradford based Uptima coo protein assay (Interchim). For each sample, a volume containing 100 µg of proteins was precipitated with trichloroacetic acid (final concentration, 10%), washed with ice-cold acetone and stored at -80°C until analysis.

V.2.3.4.2. Digestion and nano-LC-MS/MS

Proteome samples were reduced and alkylated using equilibration buffers containing dithiothreitol and iodoacetamide and loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. After Instant Blue (Invitrogen) staining of the gel, bands were excised and digested by the addition of 60 µL of a solution of modified

trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate (20 ng/ μ L, sequence grade, Promega, Charbonnières, France). The mixture was incubated at 37°C overnight.

Peptides mixtures were analysed by nano-LC-MS/MS using nanoRS UHPLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Five microliters of each sample were loaded on a C18 pre-column (5 mm \times 300 μ m; Dionex) at 20 μ L/min in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 min of desalting, the pre-column was switched on line with the analytical C18 column (15 cm \times 75 μ m; in-house packed) equilibrated in 95% of mixture A (5% acetonitrile + 0.2% formic acid in water) and 5% of mixture B (80% acetonitrile + 0.2% formic acid in water). Peptides were eluted using a 5-50% gradient of B during 105 min at a 300 nL/min flow rate. The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software. Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300–2000 m/z range with the resolution set to a value of 60 000. The twenty most intense ions per survey scan were selected for CID fragmentation, and the resulting fragments were analysed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60s to prevent repetitive selection of the same peptide.

V.2.3.4.3. Database search and data analysis

Acquired MS data were processed using MaxQuant version 1.5.3. Derived peak lists were submitted to the Andromeda search engine and data were searched against Uniprot *Pseudoalteromonas lipolytica* (7 969 sequences; 2 670 655 residues). The precursor mass tolerance was set to 20 ppm for first searches and 4.5 ppm for main Andromeda database searches. The fragment ion mass tolerance was set to 0.5 Da. Trypsin/P was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Oxidation of methionine and protein *N*-terminal acetylation were defined as variable modifications, and carbamidomethylation of cysteine was defined as a fixed modification. Minimum peptide length was set to seven amino acids. Minimum number of unique peptides was set to one. Maximum false discovery rate (FDR), calculated by employing a reverse database strategy, was set to 1% for peptides and proteins.

The LFQ metric was used to perform relative quantification between proteins identified in different biological conditions, (reflecting a normalized protein quantity deduced from all peptides intensity values). For each comparison, only proteins which were quantified in the 3 replicate experiments [3 label-free quantification (LFQ) values retrieved by MaxQuant] in at least one of the biological conditions were considered for further processing and statistical analysis. Missing values were

replaced by a constant noise value determined independently for each analytical run as the 1% percentile of the total protein population. For all comparison, statistical analysis was applied to the LFQ values. Proteins with a p -value < 0.01 and a ratio of average normalized area < 0.5 and > 2 were considered significant.

Multivariate analysis were performed by PCA, PLS-DA and orthogonal partial least square discriminant-analysis (OPLS-DA) under the Simca 3.0.3 software. All the supervised models were tested for overfitting with permutation tests and cross validation of variance (CV-ANOVA).

Venn diagrams were drawn using the Venny web service (Oliveros, J. C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams).

Functional annotation of the differentially expressed proteins was carried out using the gene ontology (GO) database in the UniProt knowledgebase (UniProtKB).

V.2.4. Results and Discussion

V.2.4.1. Metabolomics analysis

In order to compare the metabolic profiles of the two physiological states, *P. lipolytica* TC8 cells were grown in triplicates for 24h and 48h in biofilm and for 5h and 7h in planktonic conditions in VNSS medium. In sessile conditions, 24h was the time necessary for cells to form a substantial biofilm. It was extended to 48h to obtain a more mature biofilm (Brian-Jaisson, 2014). In planktonic conditions, 5h and 7h corresponded to the times of growth until the cells reached the beginning and the middle of the stationary phase, respectively. The difference in growth time between biofilm and planktonic cultures was unavoidable due to the slow growing nature of biofilms. After extraction of the bacterial cultures, the resulting crude extracts were then analysed by UPLC-HRMS. At the preliminary stage, a total of 29 853 m/z features were detected but after data filtering, the final dataset was composed of 1 103 variables.

PCA analysis was first carried out to detect intrinsic clustering between samples. PCA score plot clearly indicated unsupervised separation between biofilm and planktonic samples: 42.1% of the total variance within the dataset was thus explained by the first component (Figure 64a). As already observed in a previous study on biofilm and planktonic phenotypes of *Salmonella enterica* (Wong et al., 2015), biofilm samples of *P. lipolytica* TC8 were unexpectedly less dispersed on the score plot than planktonic ones. This fact was surprising because metabolism in planktonic cells should be more

homogeneous than that of biofilm. But one explanation could be a more strictly regulated metabolism in biofilm cells. A first PLS-DA model (1) was then built in order to maximize the separation between these two types of bacterial samples (Figure 64b). The resulting model indicated a good predictive ability and it was validated using permutation test statistics (Table 24). Such a test was based on permuted data where the order of the class variable is permuted randomly: the quality of the resulting 150 permuted models should be of lower quality than the original one.

The VIP score values indicate the importance of each m/z feature in the projection used in the model to discriminate samples of specific classes and are used for metabolite selection. A metabolite with a VIP value greater than one is considered to provide a statistically significant contribution to the model. To be more selective and to improve the performance of the discrimination, a second PLS-DA model (2) was generated by only including the metabolites with a VIP value greater than one: 250 variables were thus selected. Quality parameters of this model (2) were superior to those of model (1) (Table 24). Keeping the 85 metabolites of model (2) which have a VIP value greater than one did not improve the statistical performance of the discrimination between the phenotypes; the model (2) was thus conserved. Some of the 250 selected compounds are characteristic of the biofilm conditions and some others of the planktonic ones (Figure 64c).

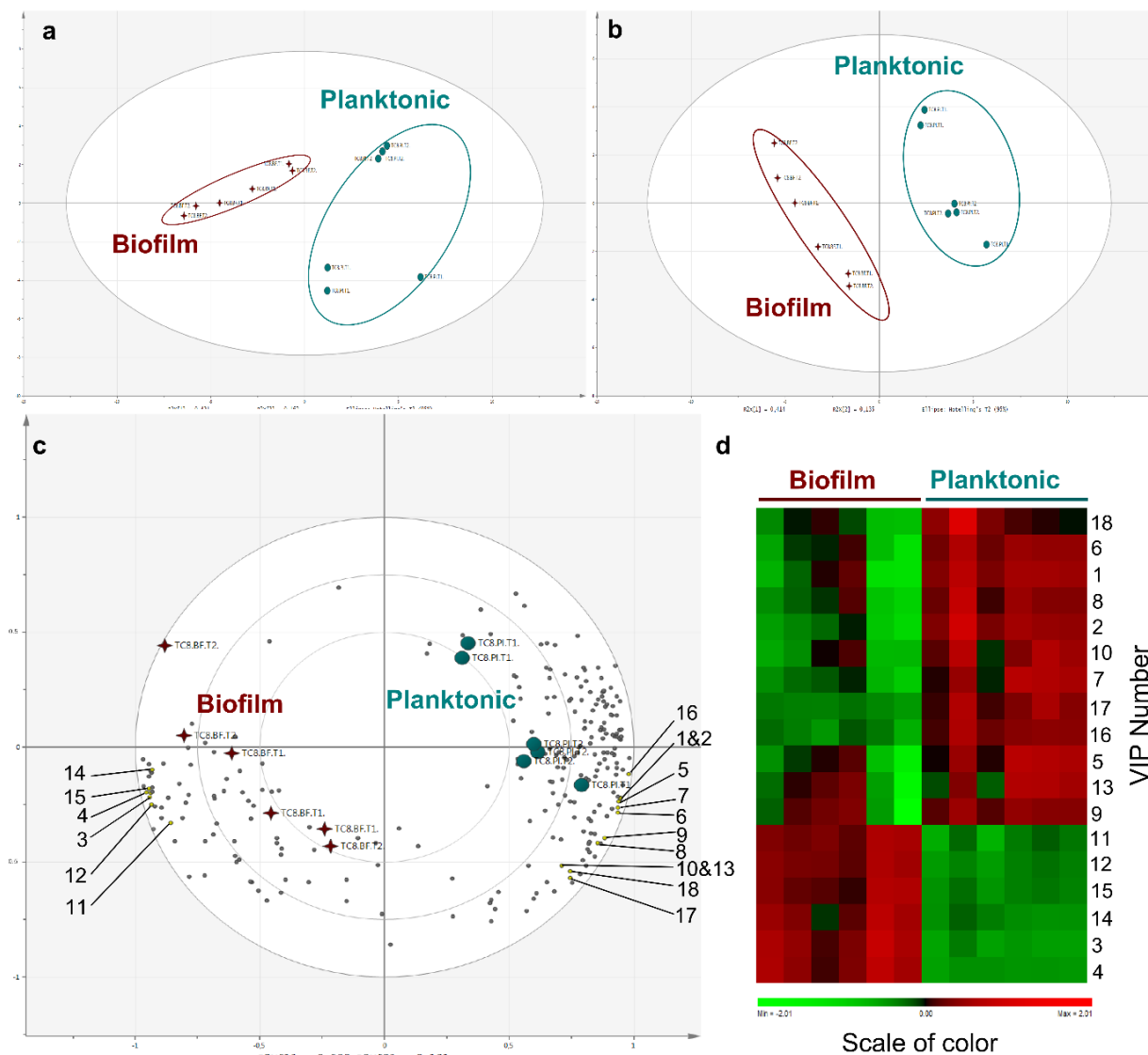


Figure 64: a) PCA score plot, b) PLS-DA (model 1) score plot, c) PLS-DA (model 2) biplot with the most contributing *m/z* features coloured in red, and d) Heatmap representation of the 18 metabolites with VIP values > 1 (model 2) of metabolomic data of *P. lipolytica* TC8 samples cultured in planktonic (●) and biofilm (+) conditions.

Tableau 24: Summary of the parameters for the assessment of the quality and of the validity of the PLS-DA models used for the discrimination of the two phenotypes of *P. lipolytica* TC8

Culture mode	Models	N ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
Biofilm / Planktonic Model (1)	2 classes	2	0.549	0.988	0.947	0.684	-0.162	< 0.001
Biofilm / Planktonic Model (2) ^g	2 classes	2	0.669	0.986	0.961	0.557	-0.140	< 0.001

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modelled variation in X matrix; ^cCumulative modelled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; R and Q intercepts obtained after permutation tests (*n* = 150); ^f*p* value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA; ^gModel constructed with variables of model (1) with a VIP value > 1.

A focus was made on the eighteen variables with a VIP value greater than 1.5. Twelve of them were specifically over-produced in planktonic cultures while the biosynthesis of the remaining six was on the contrary increased in biofilm samples (Figure 64d). A molecular formula was proposed for each of these main VIP thanks to accurate mass measurement, isotopic pattern and MS/MS data. The final annotation of the VIP was then putatively realized with respect to the fragmentation pattern of each metabolite (Table 25). Most of them belonged to two chemical families, phosphatidylethanolamines (PE) and amino acid-containing ornithine lipids (OLs), previously characterised thanks to molecular networking (cf. Chapter 4). PE constitute a common class of zwitterionic phospholipids predominantly found in cytoplasmic membranes of Gram-negative bacteria. This type of lipids could be unambiguously detected by MS/MS with positive ionisation through diagnostic fragment ions corresponding to the neutral loss of m/z 141 (phosphoethanolamine) (Godzien et al., 2015). OLs are phosphorus- and glycerol-free membrane lipids formed by an ornithine amino-acid linked by its α -amino moiety to a β -hydroxylated fatty acid chain which could in turn be esterified by a second fatty acid. OLs showed typical MS fragmentation with an intense diagnostic fragment ion at m/z 115, which resulted from the dehydrative cyclisation of protonated ornithine, but also with other characteristic fragment ions at m/z 133 (protonated ornithine) and m/z 70 (formed via the loss of H₂O, NH₃ and CO from protonated ornithine) (Moore et al., 2016).

Our results showed that metabolic profiles of *P. lipolytica* TC8 biofilms were characterized by a specific over-expression of PE derivatives while OLs were discriminant components of extracts obtained from planktonic samples. OLs are widespread among bacteria, particularly in the outer membrane of Gram-negative ones, but absent from eukaryotic organisms and archaea (Sohlenkamp and Geiger, 2015). Since their discovery in the late 1960's, this class of compounds has been drastically less studied than glycerol- and/or phosphorus-derived lipids. Thus, their biological functions remain rarely discussed in the literature. OLs constitute variable proportions of bacterial membranes depending on environmental or cultures conditions and they seem to be implied in the outer membrane stability of Gram-negative bacteria. Several studies have demonstrated the significant regulation effect of phosphorus limitations during growth leading to an increased biosynthesis of OLs, but sometimes also of other types of non-phosphorus lipids such as glycolipids or sulfolipids, instead of PE (Shim and Kim, 1993; Taylor et al., 1998; Geiger et al., 1999; Carini et al., 2015; Sandoval-Calderón et al., 2015). With this strategy, bacteria could use preferentially the phosphate resources for crucial cellular functions (e.g. nucleic acid biosynthesis) and not for phospholipid production. More particularly, OL production has been shown to increase cell yields of the α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* under

phosphorus starvation (López-Lara et al., 2005). However, OLs could be also highly produced by many bacteria in phosphorus-rich conditions (Palacios-Chaves et al., 2011). In the present work, a rich-salt culture medium (VNSS) containing a significant amount of phosphate (70 μ M) has been used. Nevertheless, even if culture times were longer in the case of biofilms, thus leading to a nutrient depletion, OLs were still preferentially identified in planktonic samples of *P. lipolytica* TC8 obtained after shorter growth times. These results were in accordance with a difference in the production of OLs based on phenotypes rather than on the availability of nutrients.

OLs, and more especially their hydroxylated derivatives, have been shown to be involved in bacterial resistance to acidic conditions or increased temperatures (Taylor et al., 1998; González-Silva et al., 2011; Vences-Guzmán et al., 2011). Several other roles of OLs have also been described with, for example, their requirement for steady-state amounts of several extracytoplasmic proteins (Aygun-Sunar et al., 2006), their elicitation of host immune responses in mammals (Kawai et al., 2000) or their emulsifying properties when they are excreted out of the bacterial membrane (Maneerat et al., 2006).

As observed in our study, phospholipids and particularly PE were found to be in higher levels in biofilm than in planktonic cells of *Candida albicans* (Lattif et al., 2011). Moreover, the presence of specific PE in the culture media of *Pseudomonas aeruginosa* has been shown to increase cell velocity. Speculations were thus made about the involvement of these PE in biofilm formation as endogenous auto-attractant and aggregation signal (Kearns et al., 2001). More recently, the analysis of the membrane lipid composition in *Streptomyces coelicolor* gave insight into drastic changes related to different media, growth phases and developmental stages (Sandoval-Calderón et al., 2015): PE were completely replaced by OLs when phosphate resources were limited but the authors did not exclude the potential involvement of OLs during differentiation.

The results obtained in this metabolomics analysis were in accordance with the increasing number of studies which demonstrate the plasticity of bacterial membrane lipids in response to several types of environmental conditions or culture-induced stresses. The differences in the lipid composition of membranes between the two phenotypes of *P. lipolytica* TC8 supported the fact that these classes of compounds could play a critical role during the colonization of marine immersed surfaces by marine bacteria.

Discrimination phénotypique de *P. lipolytica* TC8

Tableau 25 : List of the *m/z* features with VIP value > 1.5 (model 2) putatively identified from LC-HRMS profiles of *P. lipolytica* TC8 cultured in biofilm and planktonic conditions

VIP number	<i>m/z</i>	RT (s)	VIP value	Formula	Mass error (ppm)	$m\sigma^d$	I exp ^b (%)	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
1	649.5515	420	2.2	C ₃₉ H ₇₃ N ₂ O ₅	-0.2	5.1	65.0	631 (2) ^c , 413 (7) ^d , 395 (27) ^e , 377 (27) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (23) ^g	OL (C18:1, C16:1)
2	621.5199	407	2.2	C ₃₇ H ₆₉ N ₂ O ₅	0.3	11.7	64.8	603 (2) ^c , 385 (15) ^d , 367 (54) ^e , 349 (52) ^f , 159 (5) ^g , 141 (3) ^g , 133 (6) ^g , 115 (100) ^g , 70 (36) ^g	OL (C16:1, C16:1)
3	674.4764	479	2.2	C ₃₆ H ₆₉ NO ₈ P	-1.2	2.0	13.4	533 (100) ⁱ	PE (C16:1, C15:1)
4	676.4920	499	2.0	C ₃₆ H ₇₁ NO ₈ P	-1.3	4.1	19.9	535 (100) ⁱ	PE (C16:1, C15:0)
5	663.5672	427	2.0	C ₄₀ H ₇₅ N ₂ O ₅	-0.2	7.2	55.8	645 (2) ^c , 413 (13) ^d , 395 (46) ^e , 377 (46) ^f , 159 (5) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (34) ^g	OL (C18:1, C17:1)
6	651.5671	417	1.9	C ₃₉ H ₇₄ N ₂ O ₅	-0.0	3.7	12.9	633 (3) ^c , 413 (6) ^d , 395 (24) ^e , 377 (24) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (21) ^g	OL (C18:1, C16:0)
7	635.5358	413	1.8	C ₃₈ H ₇₁ N ₂ O ₅	-0.1	2.1	16.7	617 (3) ^c , 385 (12) ^d , 367 (49) ^e , 349 (47) ^f , 159 (6) ^g , 141 (4) ^g , 133 (6) ^g , 115 (100) ^g , 70 (35) ^g	OL (C16:1, C17:1)
8	595.5043	403	1.8	C ₃₅ H ₆₇ N ₂ O ₅	0.2	2.2	69.0	677 (3) ^c , 359 (8) ^d , 341 (29) ^e , 323 (30) ^f , 159 (5) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (414) ^g	OL (C14:0, C16:1)
9	623.5356	415	1.8	C ₃₇ H ₇₁ N ₂ O ₅	0.3	1.8	51.8	605 (2) ^c , 387 (4) ^d , 369 (20) ^e , 351 (18) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (24) ^g	OL (C16:0, C16:1)
10	413.3373	302	1.7	C ₂₃ H ₄₅ N ₂ O ₄	0.2	13.6	80.5	395 (4) ^c , 377 (6) ^h , 159 (2) ^g , 141 (4) ^g , 133 (10) ^g , 115 (100) ^g , 70 (51) ^g	LOL (C18:1)
11	466.2923	351	1.7	C ₂₂ H ₄₅ NO ₇ P	1.1	2.8	72.5	325 (100) ⁱ	PE (C17 :1)
12	440.2769	336	1.7	C ₂₀ H ₄₃ NO ₇ P	0.2	15.2	76.6	299 (100) ⁱ	PE (C15:0)
13	637.5516	424	1.7	C ₃₈ H ₇₃ N ₂ O ₄	-1.3	6.2	44.7	619 (2) ^c , 387 (7) ^d , 369 (225) ^e , 351 (27) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (26) ^g	OL (C16:0, C17:1)
14	702.5076	505	1.7	C ₃₈ H ₇₃ NO ₈ P	-0.6	10.8	12.0	561 (100) ⁱ	PE (C17:1, C16:0)
15	438.2612	325	1.6	C ₂₀ H ₄₁ NO ₇ P	0.8	5.1	68.1	597 (100) ⁱ	PE (C15:1)
16	229.1414	152	1.6	C ₈ H ₁₇ N ₆ O ₂	-2.7	1.7	3.5	-	-
17	211.1442	97	1.6	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₂	-0.3	5.2	68.0	Pic a 70	-
18	813.6208	423	1.5	-	-	-	-	-	-

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list; ^c[M + H - H₂O]⁺; ^d[M + H - RCOH]⁺; ^e[M + H - H₂O - RCOH]⁺; ^f[M + H - 2 H₂O - RCOH]⁺; ^gOther typical OL ion fragments; ^h[M+H - 2 H₂O]; ⁱ[M + H - 3 H₂O - RCOH]⁺; ^j[M + H - C₂H₈NO₄P]⁺.

LOL: Lyso-ornithine lipid, OL: Ornithine lipid, PE: Phosphatidylethanolamine.

Over and under expressed proteins in biofilm vs planktonic samples are coloured in red and green respectively.

V.2.4.2. Proteomics analysis

In order to complete the metabolomics analysis of *P. lipolytica* TC8, a proteomics approach was performed on biofilm and planktonic cultures obtained after 48h and 7h, respectively. The main objective was to establish a quantitative proteomic framework to highlight differences between the two phenotypes of *P. lipolytica* TC8.

V.2.4.2.1. Comparison of proteomes of planktonic and biofilm phenotypes of *P. lipolytica* TC8

When considering only proteins detected in all the replicates of both culture modes, a total of 1 733 non-redundant ones were detected in the whole cell lysates. This selection represented 43.6% of the total proteome (3 974 proteins) of *P. lipolytica* SCSIO 04301, taken as a reference strain (Zeng et al., 2014). Among this set of proteins, 90% were common to proteomes of both planktonic and biofilm samples whereas around 5% were unique to samples obtained in a single culture condition (Figure 65). This meant that the vast majority of the proteins were common to both physiological states. Proteins either detected in all planktonic samples and not in biofilm ones (84 proteins) or the reverse (90 proteins) were considered as specific to a single phenotype.

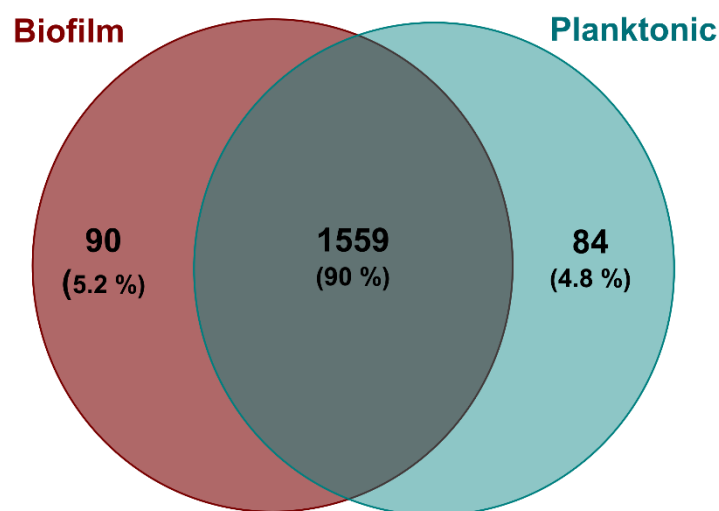


Figure 65 : Distribution of proteins identified in samples of *P. lipolytica* TC8

Among proteins which differed significantly by at least 2-fold change (p -value < 0.01) in biofilms with respect to planktonic samples, 114 were up-regulated while 68 were down-regulated (Figure 66, Table 26 and Annex III, Table AIII.1). The comparison of this set of proteins with those only produced by free-living or biofilm cells was carried out: among the 114 proteins significantly over-expressed in biofilm

cells, 9 were completely absent in planktonic samples while, among the 68 proteins significantly over-expressed in planktonic cells, eight were not detected at all in biofilm samples.

Within this proteomic study, a particular attention has been given to the set of proteins showing fold-changes higher than ten (Table 26).

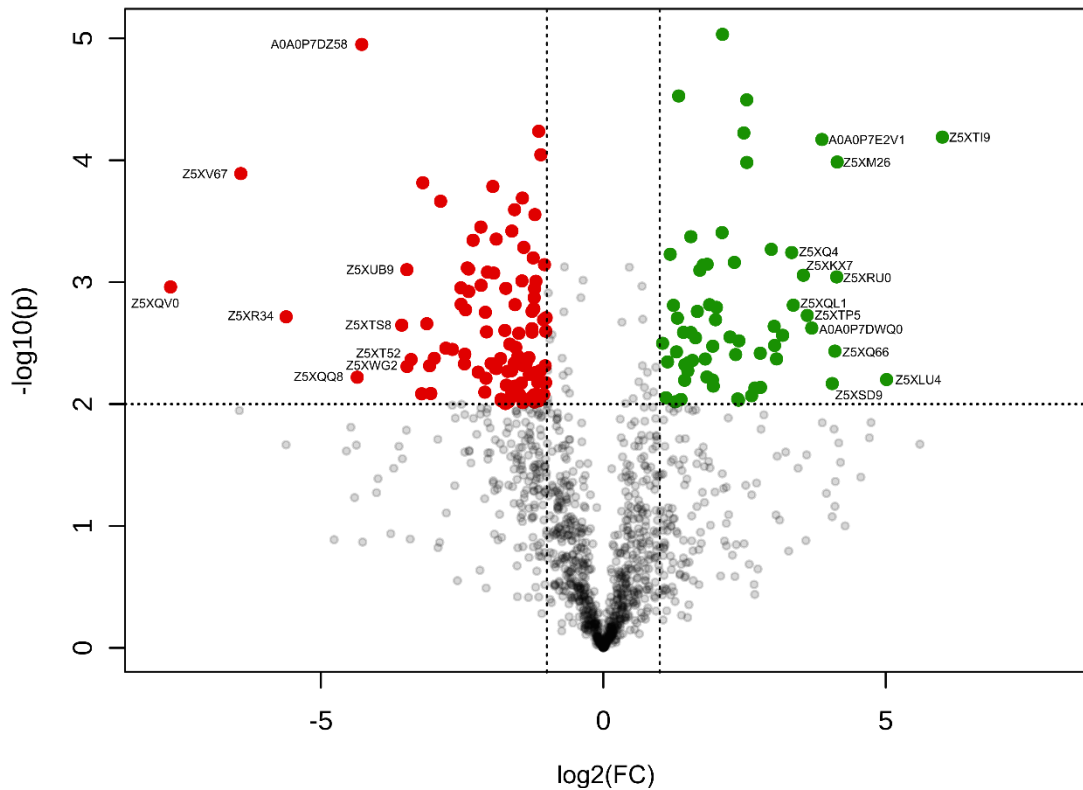


Figure 66: Volcano-plot of the complete quantified protein cohort from *P. lipolytica* TC8 samples graphed as Log2 fold-change biofilm/planktonic vs. -Log10 ANOVA *p*-value. Up- and down-regulated proteins in biofilms vs. planktonic samples are coloured in red and green, respectively

Tableau 26 : Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 was cultivated in biofilm

Protein ID ^a	Protein name ^b	Mol. weight (kDa)	Fold change Biofilm/Planktonic	p-value
Z5XQV0	Peptidase S8	190.9	202.7	0.0011
Z5XV67	Uncharacterized protein	20.5	85.6	0.0001
Z5XR34	Uncharacterized protein	55.9	49.1	0.0019
Z5XQQ8	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	35.3	20.5	0.0060
A0A0P7DZ58	GntR family transcriptional regulator	26.6	19.4	< 0.0001
Z5XTS8	Uncharacterized protein	32.3	11.9	0.0023
Z5XUB9	Uncharacterized protein	45.8	11.2	0.0008
Z5XWG2	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	42.5	11.1	0.0049
Z5XT52	Uncharacterized protein	17.0	10.6	0.0043
Z5XSQ4	Monooxygenase	42.7	-10.1	0.0006
A0A0P7DWQ0	Uncharacterized protein	23.7	-10.5	0.0017
Z5XKX7	Phosphoadenosine phosphosulfate (PAPS) reductase	28.2	-11.6	0.0009
Z5XQL1	Uncharacterized protein	56.3	-12.2	0.0015
Z5XTP5	Cell division protein FtsZ	42.9	-12.5	0.0012
A0A0P7E2V1	α -1,4 glucan phosphorylase	95.6	-14.6	0.0001
Z5XSD9	UPF0276 protein AT00_03630	32.3	-16.6	0.0068
Z5XQ66	Uncharacterized protein	27.1	-17.1	0.0037
Z5XRU0	Siroheme synthase	51.6	-17.5	0.0009
Z5XM26	γ -glutamyl phosphate reductase	44.6	-17.6	0.0001
Z5XLU4	Uncharacterized protein	23.5	-32.3	0.0063
Z5XTI9	Coproporphyrinogen-III oxidase	51.3	-64.1	0.0001

^aProteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed with an absolute fold change greater than 10; ^bAccording to Uniprot ID.

Up and down regulated proteins in biofilm vs planktonic samples are coloured in red and green respectively.

V.2.4.2.2. Functional roles of proteins

The predicted global proteome consisted of 246 proteins (*i.e.* 14% of the whole proteome) with unknown functions. The bioinformatics analysis of the identified and functionally assigned proteins was performed on all those which were differentially expressed by more than 2-fold between the two types of samples (p -value < 0.01). This allowed to cluster proteins in functional categories based on the gene ontology (GO) database (Figure 67). When comparing on the one hand biological process profiles and, on the other hand, molecular function profiles of up- and down-regulated proteins in biofilm, GO distributions were quite similar. Genes influenced by the culture mode were highly correlated to metabolic, cellular and single-organism processes with about 81% of the total clustered proteins. Most of them were involved in catalytic activities and binding and appeared to partition within various functions. Several proteins were involved in amino acid or carbohydrate metabolism.

Others played a role in oxidative stress response, transcription, lipid metabolism or transport, or they had chaperone functions (Annex III, Table AIII.1). This diversity in function of differentially abundant proteins, not limited to the previous enumeration, was related to the complex regulatory network which controls biofilm formation. Such a diversity was also found in particular among the biofilm-specific proteins (Figure 67).

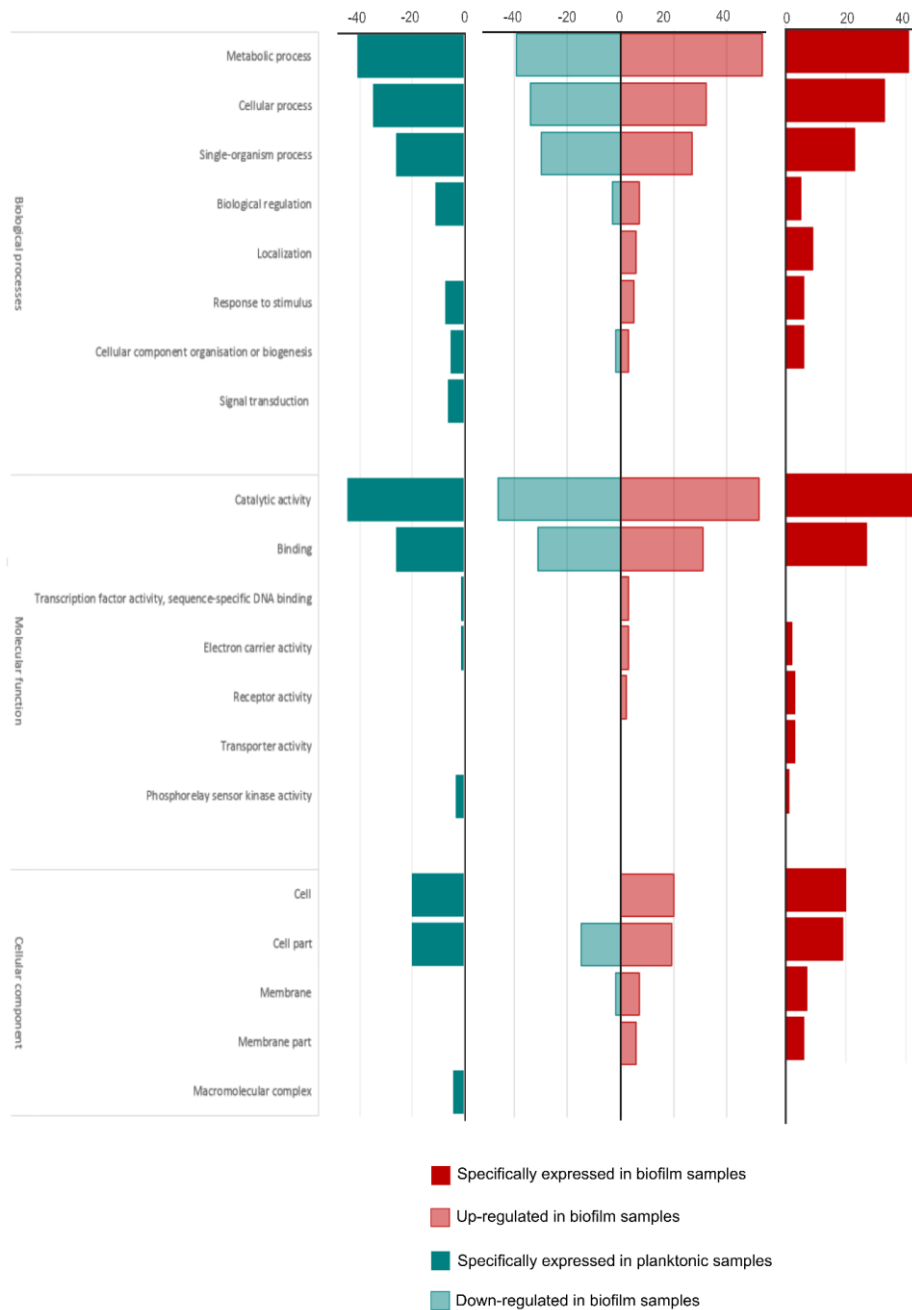


Figure 67: Classification based on GO of all significantly up- and down-regulated proteins in biofilm samples of *P. lipolytica* TC8 compared to planktonic ones

V.2.4.2.3. *Differential expression analysis of proteins in biofilm and planktonic samples of P. lipolytica TC8*

As shown by a detailed analysis, a peptidase S8 (Z5XQV0) displayed the highest differential expression (203-fold up-regulated) in biofilm. More broadly, a higher peptidase activity in biofilm proteome of *P. lipolytica* TC8 was highlighted through multiple proteins (14) identified with such an activity and all more abundant at least 2-fold compared with planktonic proteome (Annex III, Table AIII.1). The peptidase S8 family, also known as subtilisin-like family, is one of the largest family of serine proteases (Rawlings et al., 2010). These proteins, generally secreted, are mainly involved in nutrition and host invasion. They are also known to play a role in precursor processing and protein maturation reactions. In this way, prokaryotic subtilases are implied in maturation processes for extracellular adhesins and some results have suggested that they could be involved in substrate binding (Li et al., 2016). Moreover, another peptidase (*D*-alanyl-*D*-alanine carboxypeptidase, Z5XWG2) was also found to be over-expressed in biofilm samples (+11-fold). This type of enzymes are involved in modulating peptidoglycan cross-linking. As they are implied in regulation of the growth and remodelling of the peptidoglycan cell wall, these proteins are essential for growth, cell division, and viability but giving them a distinct biological function is often difficult (Vollmer et al., 2008). A previous study has shown that the expression of a *D*-alanyl-*D*-alanine carboxypeptidase was enhanced in *Streptococcus mutans* biofilms (Jiang et al., 2015).

The most down-regulated protein was a coproporphyrinogen-III oxidase subunit (Z5XTI9, 64-fold down-regulated). This protein was shown to participate to cell protection from oxidative damage (Zeilstra-Ryalls and Kaplan, 1995). The down-regulation of such an enzyme could be in accordance with a hypothetical reduced aerobic respiration rate in biofilm. Indeed, sessile development compared with dispersed planktonic growth can induce drastic changes to the local environment of cells, such as in amounts of nutrients or in a reduced oxygen availability. The over-expression of several peptidases and the down-regulation of a coproporphyrinogen-III oxidase subunit could reflect these two potential changes, respectively. Moreover, a *cbb3*-type cytochrome *c* oxidase subunit (Z5XQQ8) was found here to be up-regulated (+20 fold). Such a protein shows a higher affinity for oxygen when compared with other terminal oxidases and it plays a role in respiration under low oxygen conditions. In *P. aeruginosa* PAO1, this type of oxidases has been shown to promote biofilm formation under anoxic denitrifying conditions (Hamada et al., 2014). A functionally related protein identified as cytochrome *C* (Z5XKY1) was also over-expressed (+2-fold) in biofilm samples of *P. lipolytica* TC8 (Annex III, Table AIII.1).

In another category, two GntR family transcriptional regulators (AOAOP7DZ58 and Z5XMH5) were up-regulated in biofilm phenotypes (+19- and +2-fold, respectively). The GntR family constitutes one of the most abundant family of transcription factors. GntR members have been found to play important roles in controlling various metabolic processes by regulating many diverse biological functions. Herein, the over-expression of these DNA-binding proteins correlated with previous studies demonstrating that GntR members are involved in biofilm formation (*i.e.* (Ballering et al., 2009; Wassinger et al., 2013)).

Several other proteins linked to sulfur metabolism, a siroheme transferase (Z5XRU0, -18-fold), a phosphoadenosine phosphosulfate (PAPS) reductase (Z5XKX7, -12-fold), and two sulfate adenylyltransferases (Z5XTM7, -5-fold; Z5Q77, -4-fold) were over-expressed in planktonic samples. In bacteria, the sulfate assimilation pathway involves several enzymes that allow the sulfate transport into the cell and the transformation of sulfate into sulfide. The sulfur atom is then incorporated as sulfide into cysteine which constitutes a source of sulfur for a wide range of biomolecules. Some intermediates required in this biosynthetic process, such as PAPS, can also act as signal compounds or play a role in gene expression. Our findings were in accordance with several works which have shown a correlation between the deletion of genes implied in the sulfur metabolism and an increased capacity to form biofilms (Ren et al., 2005; Rossi et al., 2014). At the same time, as sulfate assimilation and *bis*-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) metabolism have been suspected to be linked (Chao et al., 2013), a specific search of proteins potentially implied in the production of this second messenger was done. C-di-GMP is known to be involved in the biofilm regulation via the biosynthesis of adhesins and the production of exopolysaccharide matrix substances, but also the inhibition of motility. Its production is regulated by diguanylate cyclases (production) and phosphodiesterases (degradation) and C-di-GMP intracellular concentration is expected to be high in sessile state and low in planktonic lifestyle (Hengge, 2009). Interestingly, a diguanylate cyclase (Z5XN55, +6.4-fold) was found to be up-regulated in biofilm samples of *P. lipolytica* TC8 while two diguanylate phosphodiesterases (Z5XTL6, -2-fold; Z5XN61, -26-fold, *p*-value 0.019) were preferentially expressed in planktonic phenotypes.

Another over-expressed feature in free-living cells was a cell division protein FtsZ (Z5XTP5, -13-fold). It is established that this type of proteins plays a vital role in cell size control and is essential for bacterial cell division. Its over-expression in planktonic samples could be explained because cell division is commonly less efficient in sessile conditions than in planktonic lifestyle (Donlan and Costerton, 2002).

Moreover, the expression of an α -1,4-glucan phosphorylase (A0A0P7E2V1, -15-fold) was increased in planktonic samples. Glucan phosphorylases are involved in the catabolism of storage polysaccharides, such as amylose and glycogen, via the cleavage of their non-reducing ends in the presence of inorganic phosphate. A similar pattern of expression was already observed in biofilm-associated and planktonic forms of a mucoid strain of *P. aeruginosa* (Patrauchan et al., 2007).

Further examinations of the differentially expressed proteins conducted to the identification of three enzymes related to arginine/proline metabolism. A recent analysis has shown how arginine is critical for cellular growth and biofilm formation (Jakubovics et al., 2015). The biosynthesis of arginine starts from glutamate which is converted through different steps to ornithine and then to arginine (Cunin et al., 1986; Charlier and Glansdorff, 2004). The four identified enzymes, an ornithine carbamoyltransferase (Z5XP93, -2.9-fold), a gamma-glutamyl phosphate reductase (Z5XM26, -18-fold), an acetylornithine aminotransferase (Z5XMV3, -3.6-fold) and an acetylglutamate kinase (Z5XTE1, -4.3-fold) were down-regulated in biofilm samples. Whereas the first cited was not functionally well-defined (as catabolic or anabolic enzyme in arginine metabolism and thus in ornithine conversion), the three other ones were directly involved in the biosynthesis of ornithine from glutamate. Moreover, a glutamate synthase (Z5XT03, -2.1-fold) was also down-regulated in biofilm. Taken together, the under-expression of all these enzymes in biofilm samples of *P. lipolytica* TC8 could lead to a lower ornithine concentration. Ornithine being a starting point for the biosynthesis of ornithine lipids (Dunn, 2015), a lower concentration of this precursor in biofilm could be correlated with the lower amounts of ornithine lipids detected in biofilm through the metabolomics study of *P. lipolytica* TC8.

V.2.4.2.4. Multivariate analyses of protein profiles of the two phenotypes of P. lipolytica TC8

In parallel of the differential expression analysis of the proteins of *P. lipolytica* TC8 cultured in biofilm or in planktonic mode, the dataset including the 182 proteins with at least a 2-fold change (p -value < 0.01) was also subjected to multivariate analyses. The resulting PCA score plot (data not shown) conducted to an unambiguous differentiation of the protein profiles of biofilm and planktonic samples of *P. lipolytica* TC8. An orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) model with good prediction accuracy was then obtained (Figure 68a and Table 27). It allowed to maximize the variations between the two phenotypes (two classes) and to minimize those between samples of one class, and so to highlight differences in the protein expression between the two lifestyles.

The most discriminative proteins were identified using an OPLS-DA loading S-plot (Figure 68b). In this representation, each variable is displayed combining the covariance (the contribution to the model)

and the correlation within the dataset. The correlation coefficient of each protein in the resulting model was higher than 0.8 (absolute value) which indicated a good reproducibility and thus all the 182 proteins could be considered as putative discriminant variables. The twenty proteins with the highest VIP scores were labelled on Figure 68b and listed in Table28.

Tableau 27 : Summary of the parameters for the assessment of the quality and of the validity of the PLS-DA models used for the discrimination of the two phenotypes of *P. lipolytica* TC8

Culture mode	Models	N ^o ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	p ^e
Biofilm / Planktonic	2 classes	1	0.932	0.992	0.988	0.001

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modelled variation in X matrix; ^cCumulative modelled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; ^ep value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA

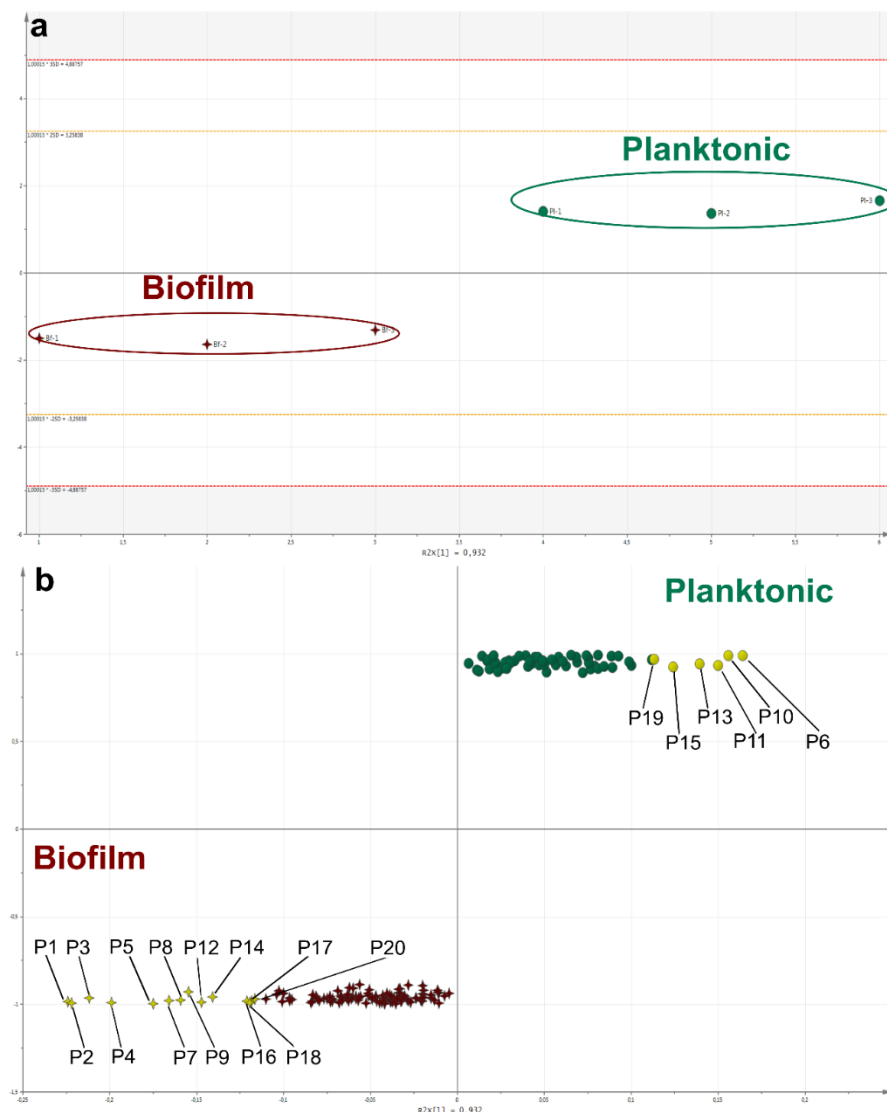


Figure 68: OPLS-DA a) score plot and b) loading S-plot of proteomics data of *P. lipolytica* TC8 cultured in biofilm (†) and planktonically (●); The 20 first VIP are represented in yellow on b).

OPLS is a regression, but also a prediction method, which gives information on the variation and on the capacity of a model to predict a known information (class prediction). Among the highest VIP, the previously mentioned acetylnithine aminotransferase (Z5XMV3, VIP n°6) and coproporphyrinogen-III oxidase (Z5XTI9, VIP n°10) have been recovered. Interestingly, most of the up- or down-regulated proteins previously discussed were not identical to those defined as the most discriminant (VIP) using the OPLS-DA model. Four of the eight first VIP (Z5XLA3, VIP n°1; Z5XPLO, VIP n°2; Z5XPL6, VIP n°4; Z5XRI5, VIP n°8) were over-expressed in biofilm samples (+5.7, +4.1, +5.2, and +3.1-fold, respectively) and these proteins were implied in histidine biosynthesis. In light of this fact, a specific search in the proteomics dataset allowed the identification of four other proteins involved in histidine metabolism. Two of them (AOA0N8HKN3, +2.7-fold; Z5XRJ1, +3.7-fold) participating in the biosynthesis of histidine were also up-regulated in biofilms while the last one, a committed enzyme in histidine catabolism, was down-regulated (Z5XMI3, -2.1-fold). These data appointed histidine metabolism as critical for biofilm formation because regulated by biofilm-cells of *P. lipolytica* TC8 in comparison with planktonic-cells. The up-regulation of the biosynthesis of histidine could be related to the down-regulation of arginine metabolism mentioned above and which appeared impacted via the down-regulation of an acetylnithine aminotransferase (Z5XMV3, VIP n°6, -3.57-fold).

Several studies have already related the involvement of arginine in bacterial adhesion and biofilm formation. For example, the lack of exogenous arginine promoted *Streptococcus gordonii* growth and resulted in increasing biofilm biomass (Jakubovics et al., 2015). In another study, high levels of exogenous arginine lead to repression of arginine biosynthesis in *E. coli* suggesting a role for arginine in signalling, rather than simply functioning as an exogenous nutrient (Cho et al., 2012). Nevertheless, no direct link could be established between arginine and histidine biosynthetic processes, and the biofilm state of *P. lipolytica* TC8 cells, but a specific response including regulation of amino acid metabolism has been shown.

One of the most important VIP was an alkaline phosphatase (Z5XL94, +2.3-fold, VIP n°5) over-expressed in biofilm samples. This enzyme belongs to a family usually produced by bacteria in response to phosphate starvation (Wanner, 1996). Such proteins are involved in dephosphorylation reactions of many types of molecules (nucleotides, proteins and alkaloids). In accordance with our results, it has been previously demonstrated that gel-entrapped cells of *E. coli* cultured in low phosphate medium showed higher alkaline phosphatase activity than free cells. One possible explanation given is a lower phosphate availability in biofilms due to mass transfer limitation in the polymer matrix (Vilain et al., 2002). In another study, PE has been found to be required for the production of alkaline phosphatase

in *E. coli* (Golovastov et al., 2000). The same trend was observed in *P. lipolytica*TC8: an alkaline phosphatase was more expressed in biofilm cells where PEs were found in higher amounts.

Tableau 28 : List of the most significant proteins (VIP value > 1.5) up- or down-regulated in biofilm conditions

VIP number	Protein ID ^a	Protein name ^a	Mol. Weight [kDa]	Fold change Biofilm/Planktonic	p-value
1	Z5XLA3	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase	26.6	+5.7	0.0015
2	Z5XPL0	Histidinol dehydrogenase	46.2	+4.1	0.0008
3	Z5XRJ7	Uncharacterized protein	51.7	+3.0	0.0046
4	Z5XPL6	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	28.4	+5.2	0.0008
5	Z5XL94	Alkaline phosphatase	47.1	+2.3	0.0003
6	Z5XMV3	Acetylornithine aminotransferase	43.9	-3.6	0.0007
7	Z5XSZ1	Redoxin	21.1	+3.4	0.0025
8	Z5XRI5	Aspartate aminotransferase	39.8	+3.1	0.0004
9	Z5XUZ9	Acyl carrier protein	8.7	+2.2	0.0053
10	Z5XTI9	Coproporphyrinogen-III oxidase	51.3	-64.1	0.0001
11	Z5XNV1	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	50.3	-3.8	0.0034
12	Z5XVD0	Methyltransferase	29.9	+2.3	0.0010
13	Z5XTB1	Ribonucleoside-diphosphate reductase	85.9	-2.9	0.0026
14	Z5XXQ4	Sorbose dehydrogenase	40.4	+3.0	0.0071
15	Z5XP56	Long-chain fatty acid--CoA ligase	79.7	-3.0	0.0044
16	Z5XMQ9	LOG family protein	50.1	+3.3	0.0011
17	Z5XTG6	Chaperone SurA	48.4	+2.2	0.0001
18	Z5XMT6	Uncharacterized protein	19.1	+8.7	0.0022
19	Z5XUR7	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyl adenosine synthase	53.8	-7.9	0.0005
20	Z5XYV9	Uncharacterized protein	54.099	+3.0	0.0048

^aAccording to Uniprot ID.

Up and down regulated proteins in biofilm vs planktonic samples are coloured in red and green respectively.

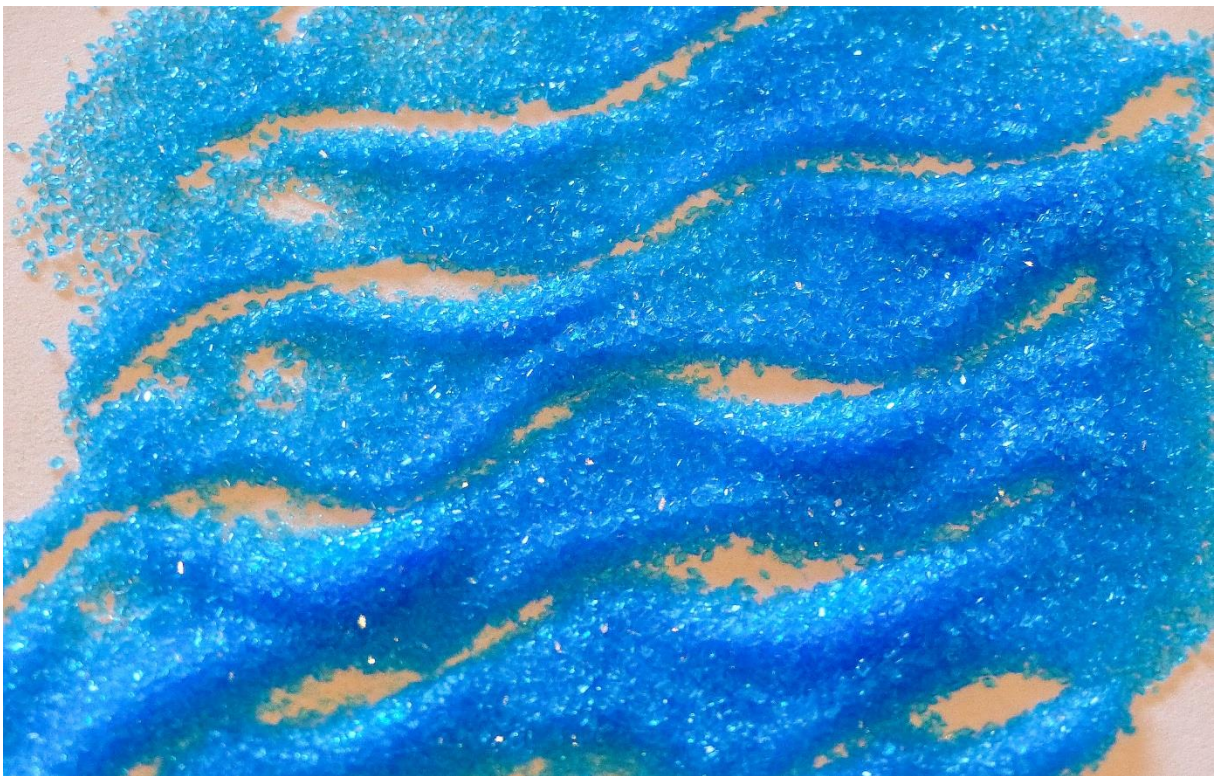
V.2.5. Conclusion

In this study, metabolic variation and protein expression profiles of biofilm and planktonic cells of *P. lipolytica* TC8 were evaluated using combined metabolomics/proteomics approaches and multivariate statistical analyses. Metabolomic analyses revealed that the culture mode may have an impact on the lipid membrane composition which was highlighted as a discriminant factor. Indeed, various PE and OLs were identified as VIP in biofilm and planktonic cells, respectively. Proteomic analyses pointed out the complexity and diversity of the mechanisms differentiating biofilm from planktonic phenotype. However, specific pathways were shown as important through the regulation levels of the proteins involved or thanks to multivariate analyses of proteomics data. In particular, numerous peptidases were up-regulated in biofilm while proteins involved in sulfur metabolism were

down-regulated. Identification of the VIP proteins allowed to recognize the amino-acid metabolism as significantly differentiated between the two cultures modes.

Chapitre VI

Etude par métabolomique et protéomique
de la réponse de *Pseudoalteromonas*
lipolytica TC8 à un stress cuprique



Ce chapitre comporte une première partie rédigée en français suivie d'une seconde partie rédigée sous forme de publication (en préparation).

VI.1. Stress au cuivre et réponse métabolique bactérienne

VI.1.1. Introduction

Comme décrit dans le Chapitre III, la rade de Toulon est un site maritime multi-contaminé. Une source de contamination évidente vient du fait que ce lieu concentre le plus important port militaire français, un port de ferries ainsi qu'un port de plaisance. Afin d'éviter les problèmes liés au *biofouling*, les bateaux sont en majorité protégés par des revêtements *antifouling*. Et comme indiqué dans le Chapitre I, la majorité de ces revêtements actuels contient du cuivre, ou certains de ses dérivés, comme co-biocides.

Dans l'eau de mer, le cuivre est présent sous forme d'ions libres mais il a également la capacité de former des complexes stables avec des ligands organiques ou inorganiques. Lorsqu'il est complexé, le cuivre n'est pas bio-disponible et sa toxicité est minime. Il témoigne en revanche d'une activité toxique lorsqu'il est présent sous forme libre (Andrew et al., 1976; Sunda and Guillard, 1976; Anderson and Morel, 1978; Menkissoglu and Lindow, 1991). La pollution en cuivre dissous dans la rade de Toulon est aujourd'hui telle que sa concentration est 190 fois supérieure au bruit de fond géochimique de la mer Méditerranée (Morley et al., 1997)(Figure 69).

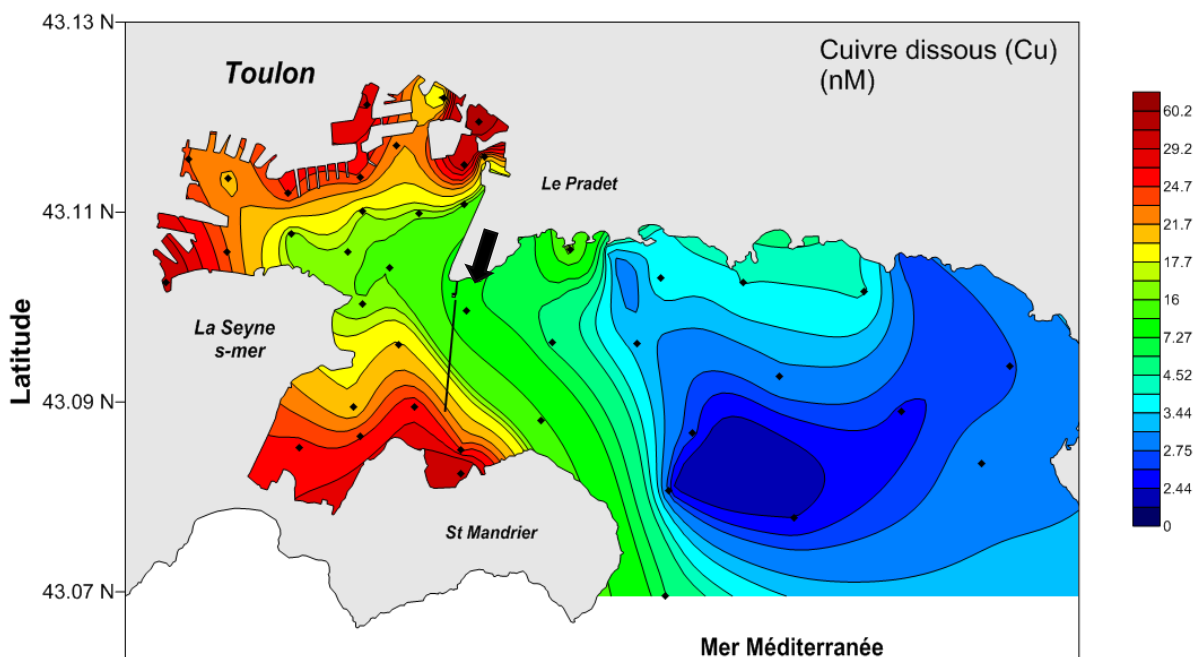


Figure 69 : Description du gradient de concentration en cuivre dissous (nM) dans la rade de Toulon en 2015 (D'après Coclet et al., communication personnelle)

Si le cuivre, comme d'autres métaux, constitue à faibles concentrations un élément essentiel pour beaucoup d'organismes (Franke et al., 2003), il provoque des dégradations irréparables dans les écosystèmes marins à plus hautes concentrations (Nies, 1999). Il faut noter toutefois l'existence d'espèces adaptées pouvant survivre dans des environnements riches en métaux. Effectivement, au vu des résultats présentés dans le Chapitre III, certaines classes bactériennes semblent s'accommoder mieux que d'autres de la présence de hautes concentrations en cuivre. En effet, différents profils de communautés ont pu être observés dans des biofilms naturels formés sur différents revêtements immergés et caractérisés notamment par la présence ou l'absence de cuivre dans leur composition.

Afin de mieux appréhender l'effet d'une exposition à un gradient de pollution en cuivre sur la réponse physiologique de souches bactériennes cultivées en conditions contrôlées, plusieurs études ont été menées dans le cadre de cette thèse. Dans un premier temps, l'effet du cuivre sur le profil métabolique de quatre souches de bactéries marines a été étudié à des concentrations environnementales (inspirées de celles décelées dans la rade de Toulon). Dans un second temps, la recherche des concentrations en cuivre effectives, inhibant la croissance de ces bactéries (IC₅₀, IC₉₅ ou MIC) ou provoquant leur mort (MBC), a été effectuée. Finalement, l'étude conjointe de l'impact sur le métabolome et le protéome de concentrations élevées en cuivre (sublétales) a été réalisée sur la souche *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. Cette souche a été sélectionnée car il s'agissait de celle qui montrait la plus grande résistance au cuivre parmi les quatre bactéries initialement étudiées.

VI.1.2 Effet de concentrations environnementales de cuivre sur le métabolome de quatre souches de bactéries marines – Etude métabolomique

VI.1.2.1. Présentation de l'étude

Afin d'appréhender l'effet du cuivre sur les organismes microbiens, quatre souches bactériennes issues de biofilms marins de la rade de Toulon ont été choisies pour des expérimentations *in vitro*. Trois de ces souches proviennent d'un site moyennement pollué de la rade de Toulon (site indiqué par une flèche sur la Figure 69) et ont déjà fait l'objet d'une analyse métabolomique (Chapitre IV) : *Persicivirga mediterranea* TC4, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 et *Shewanella* sp. TC11 (Brian-Jaisson, 2014). La quatrième souche, *Paracoccus* sp. 4M6 provenant du Golfe du Morbihan a précédemment été décrite comme étant sensible au cuivre (EC₅₀ < 20 μM) (Camps et al., 2011).

Ces quatre souches bactériennes ont été choisies pour leurs profils de résistance au cuivre potentiellement contrastés. En effet, *P. lipolytica* TC8 et *Shewanella* sp. TC11 sont des γ -

Proteobacteria, une des classes qui est retrouvée dans les biofilms récoltés sur des revêtements *antifouling* contenant du cuivre. Elles seraient donc hypothétiquement plus résistantes que *P. mediterranea* TC4, une Flavobacteria de l'embranchement des Bacteroidetes, retrouvée plutôt sur des surfaces sans revêtements *antifouling*. La souche 4M6 est quant à elle une α -Proteobacteria, une classe qui n'est pas du tout représentée dans les biofilms formés sur des revêtements à base de cuivre (Chapitre III).

Dans cette étude métabolomique de l'effet du cuivre, quatre concentrations en cuivre ont été testées. Ces concentrations ont été déterminées à partir des données expérimentales de dosage du cuivre en différents points de la rade de Toulon (Coclet et al. 2015 ; Communication personnelle) (Figure 69). Outre le contrôle (absence de cuivre), le cuivre a été ajouté aux milieux de cultures à une concentration de 50 nM (correspondant aux sites les plus pollués de la rade de Toulon), de 200 nM (concentration intermédiaire) et de 1500 nM (correspondant à une concentration estimée en excès aux abords de revêtements *antifouling* d'après des mesures de taux de lixiviation du cuivre effectuées pour différents revêtements et conditions) (Valkirs et al., 2003).

L'expérience a été réalisée sur des cultures planctoniques, en milieu VNSS, en maintenant les bactéries jusqu'en phase stationnaire. Les cultures ont été effectuées dans des conditions analytiques spécifiques à l'étude des métaux « traces » selon le protocole présenté dans le paragraphe II.1.1.4. Ces conditions ont pour but d'éviter la complexation du cuivre au niveau des surfaces d'un flaconnage non adapté et l'introduction de cuivre dans le milieu par ce même flaconnage ou par l'expérimentateur.

Les échantillons dédiés à l'étude métabolomique ont ensuite été extraits, traités et analysés en utilisant les protocoles précédemment décrits (Chapitres IV et V).

VI.1.2.2. Résultats et discussion

Une première observation a révélé l'absence d'effet du cuivre ajouté dans le milieu de culture sur la croissance des quatre souches bactériennes. L'évolution de la DO₆₀₀ mesurée était en effet identique, à tous les temps de la phase de croissance pour les cultures de contrôle et pour les cultures traitées, quelle que soit la concentration en cuivre (50, 200 ou 1500 nM). A partir de ces différentes cultures, les métabolomes des quatre souches ont été extraits et analysés par LC-MS. Les données ainsi obtenues ont ensuite été traitées par ACP (Figure 70).

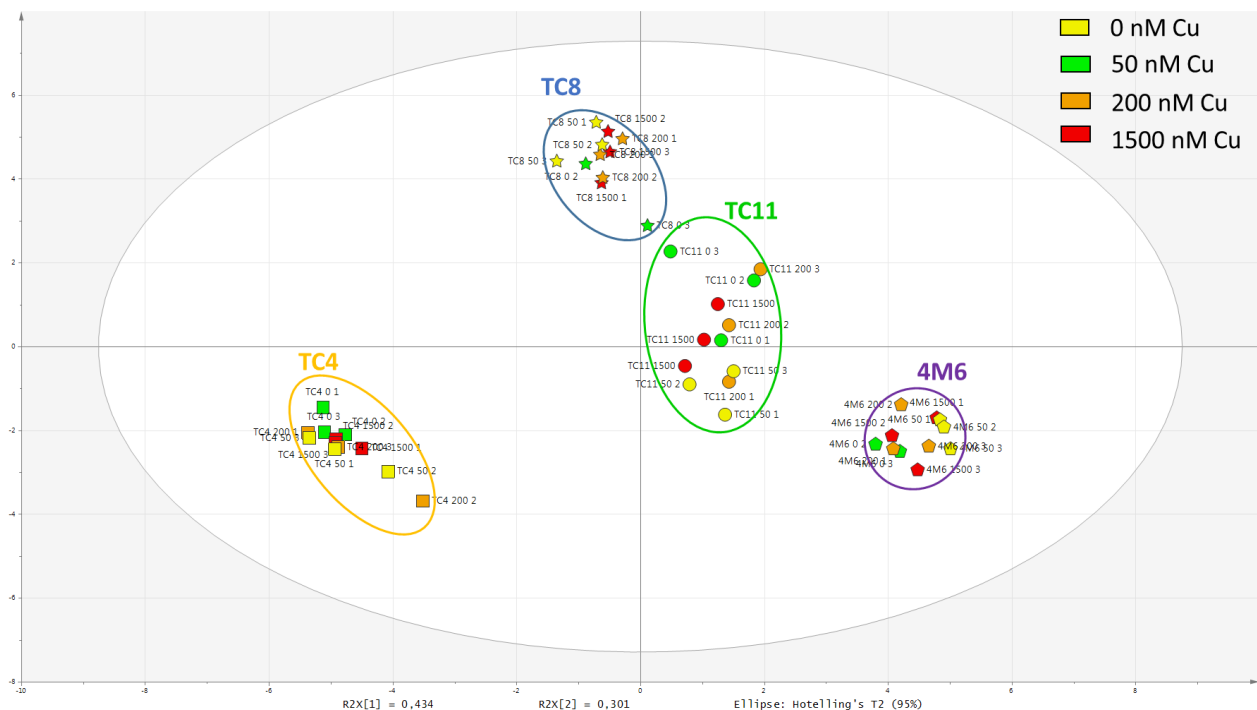


Figure 70: Score plot ACP des données de métabolomique (LC-MS) obtenues à partir de cultures planctoniques (phase stationnaire, milieu VNSS) des souches TC4 (■), TC8 (★), TC11 (●) et 4M6 (●) réalisées à trois concentrations environnementales de cuivre ou sans cuivre

Le modèle ACP obtenu explique 73,5% de la variabilité totale du jeu de données. Aucune discrimination ou tendance n'est observée en fonction de la concentration en cuivre présente dans les milieux de cultures. En effet, le premier axe permet de discriminer l'ensemble des souches, et ce quelle que soit la concentration en cuivre. Le deuxième axe permet quant à lui d'améliorer la discrimination entre les souches TC8 et TC11.

Lorsqu'un modèle ACP est construit pour chaque souche individuellement (données non montrées) afin de s'affranchir de la forte variation inter-souche, aucune discrimination due au cuivre n'est observée également. De plus, des modèles statistiques multivariés explicatifs de type PLS ont été construits postérieurement et se sont avérés non fiables.

Ainsi, le cuivre ajouté au milieu de culture, dans des concentrations définies comme « environnementales » (comprises entre 50 et 1500 nM), n'a pas permis de détecter un quelconque effet significatif sur le métabolome des souches bactériennes testées. L'absence de différences observables au niveau de la courbe de croissance laisse penser que les quatre bactéries présentent une résistance au cuivre à de telles concentrations. Dans le cas de cette hypothèse, il est tout de même

surprenant de ne voir aucun effet significatif du cuivre au niveau du métabolisme de ces bactéries. Il faut toutefois noter que, d'une part, cette résistance peut s'exprimer au travers de molécules non extraites ou non détectées dans les conditions d'analyses choisies et d'autre part, les concentrations de cuivre ajoutées au milieu sont peut-être tout simplement trop faibles. Aussi, une deuxième hypothèse pourrait être que la majorité, voire la totalité du cuivre ajouté, se complexe aux nombreux composants du milieu de culture (extrait de levure, amidon, peptone, ...) le rendant ainsi moins bio-disponible et non toxique pour les bactéries.

La mesure de la quantité de cuivre dissous dans le milieu de culture a été envisagée mais elle est rendue compliquée par la richesse du milieu en sels et en composés organiques. Afin de tester la résistance des bactéries au cuivre, il a été décidé d'observer l'effet sur leur croissance d'une gamme de concentrations de cuivre, allant au-delà de 1500 nM.

VI.1.3. Recherche de concentrations inhibitrices de la croissance pour chaque souche bactérienne

Afin de tester une plus large gamme de concentrations en cuivre et leur effet sur la croissance bactérienne, les cultures des quatre souches étudiées ont été réalisées en microplaques. Ainsi neuf concentrations ont été testées en triplicats trois fois pour chaque souche bactérienne : 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 et 6400 nM. La concentration inhibitrice 50% (IC₅₀) permettant de réduire de moitié la croissance bactérienne a ainsi pu être estimée. Le Tableau 29 présente les valeurs d'IC₅₀ estimées au cours de cette expérience.

Tableau 29 : Valeurs estimées de l'IC₅₀ de cuivre pour les 4 souches bactériennes de l'étude

Souche	IC ₅₀ estimée
<i>P. mediterranea</i> TC4	Entre 200 et 400 μ M
<i>P. lipolytica</i> TC8	Entre 400 et 800 μ M
<i>S. sp.</i> TC11	~ 400 μ M
<i>Paracoccus sp.</i> 4M6	~ 50 μ M

Comme supposé précédemment, les quatre bactéries présentent des profils de résistance au cuivre différents. Ainsi, les deux γ -Proteobacteria (TC8 et TC11) sont celles qui résistent aux plus fortes concentrations en cuivre ; TC8 étant la souche qui montre la plus grande résistance avec une IC₅₀

supérieure à 400 μM . La souche TC4 montre un profil de résistance à des concentrations plus faibles tandis que la souche 4M6, de la classe des α -Proteobacteria et provenant d'une région moins polluée en métaux, présente la plus grande sensibilité au cuivre (inférieure à 100 μM).

Pour la suite de cette étude, les travaux de recherche se sont focalisés sur la souche *P. lipolytica* TC8, celle-ci montrant le profil de résistance/tolérance au cuivre le plus important.

VI.2. Metabolomic and proteomic analysis of the marine biofilm-forming bacteria *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 in response to copper contamination

Cette partie du chapitre est rédigée en anglais car les travaux qui y figurent feront l'objet d'une publication.

VI.2.1. Introduction

Copper, such as other transition metals (*e.g.* iron, zinc or manganese), is a naturally-occurring element essential for cellular functions as cofactor of various proteins. Copper exists in the oxidized cupric Cu (II) form and in the reduced cuprous Cu (I) form. The ability to change between these two redox states makes this metal an ideal cofactor for enzymes involved in reactions requiring electron transfers. However, all organisms need to maintain adequate intracellular levels of copper because of its high toxicity when present in excess. For example, inactivation of crucial enzymes can be produced since copper can compete with other metals for their binding sites (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013). Several authors have mentioned copper cell toxicity as being primarily due to inactivation of enzymes with exposed iron-sulfur clusters. In this case, the Cu(I) strong soft metal form leads to a release of free iron which can cause drastic oxidative stresses (Rensing and McDevitt, 2013). Copper toxicity includes also the production of reactive oxygen species (ROS) via the Fenton reaction (Ladomersky and Petris, 2015). Therefore, the redox change ability of copper gives to this metal a dual nature, essential and dangerous for a cell. Both eukaryotic and prokaryotic cells have thus developed highly balanced mechanisms of copper homeostasis to prevent cellular damage by maintaining copper concentrations in a narrow safe range.

In bacteria, mechanisms involved in copper homeostasis are complex on at least two related levels. Firstly, they require to provide to cells this essential micronutrient while preventing toxic effects, namely by maintaining copper concentration at a right level. Secondly, they involve a complex machinery of proteins since bacteria engage a number of intra- and extracellular processes such as

sequestration, enzymatic detoxification and active efflux. In Gram-negative bacteria, the periplasmic space which represents an additional compartment and the outer membrane require from cells intricate and precisely regulated protein systems which interact with each other (Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013). They thus regulate the level of copper in the cytoplasm through the control of its concentration in the periplasmic space.

In an environmentally point of view, copper is more considered as pollutant instead of crucial for cell metabolism because of its widespread presence in aquatic environments contaminated by agricultural or mining wastes, industrial discharges or atmospheric deposition. High levels of copper can also originate from boat antifouling coatings, another obvious source of contamination. Furthermore, this could be accentuated since the pressure for a complete ban of the use of the harmful TBT requires to find better environment-friendly antifouling options. Thus, improvement of copper-biocide based coatings could be right now the best solution to replace TBT in antifouling paints, but not without considering the threat for living organisms.(Omae, 2003). Indeed, copper has already shown deleterious effects on marine organisms such as bacteria (Boyd et al., 2005). Moreover, a prolonged exposure of bacterial cells to copper due to its widespread use as biocide can lead, in consequence, to the selection of copper-resistant or -tolerant strains.

In this study, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 isolated from a natural biofilm sampled in a copper-polluted marine environment was selected (Tessier et al., 2011; Brian-Jaisson, 2014). This bacterium belongs to the *Pseudoalteromonas* genus which is well represented in ocean throughout the world and widely studied for its ecological significance, its EPS richness or its capacity to synthesize bioactive compounds (Holmström and Kjelleberg, 1999; Dobretsov and Qian, 2006; Yang et al., 2013). Furthermore, *P. lipolytica* TC8 has the ability to form biofilms and biofilm formation by a bacterial strain is known to increase its resistance to toxic metals (Harrison et al., 2005; McElroy et al., 2016). The resistance to copper can so be increased by a factor of 600 in biofilm in comparison to free-living lifestyle (Teitzel and Parsek, 2003). This increased tolerance was mainly attributed to metal chelation by EPS and to quorum sensing mediated gene regulation (Harrison et al., 2007).

In order to investigate the influence of an exogenous parameter on the metabolism of a single organism, a metabolomic approach is a powerful tool allowing to underline occurring physiological processes. This relatively recent “omic” technique allows the visualization in one snapshot of a main part of the metabolome, giving thus information on “what happened”. At the same time, analysis of protein expression, function and modification is a key element to understand “what is happening”. A

proteomic approach treated with multivariate analysis constitutes a way to overcome the complexity in the whole protein dataset giving a more holistic view of the relationship among samples (Marengo et al., 2007; Serra et al., 2008). New approaches that combine both metabolic and protein profiles allow thus a global view on the metabolism and the pathways putatively impacted by an external parameter such as a metal stress.

To resolve the extent to which metabolic variation was induced by copper in *P. lipolytica* TC8, a global profiling of both proteins and metabolites of this organism was established. The aim of the study was to highlight how copper could influence bacterial growth, metabolic and protein profiles under growth inhibitory concentrations in both planktonic and biofilm culture conditions. Effects of cell copper-exposure were thus investigated on *P. lipolytica* TC8 using susceptibility tests, proteomics and metabolomics. Metabolite and protein contents of planktonic and biofilm cultures were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

Metabolomic and proteomic analyses revealed that a part of the copper stress responses of biofilm and planktonic cells was similar in both culture conditions. A defense response of planktonic cells was thus proposed with cells shifting to metabolism closer to those of sessile cells. Nevertheless, differential effects of copper were highlighted between both culture modes.

VI.2.2. Materials and Methods

VI.2.2.1. Reagents

Ethyl acetate (EtOAc) used for extraction was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). UPLC-MS analyses were performed using LC-MS-grade acetonitrile (ACN) and MeOH (VWR). Milli-Q water was generated by a Millipore ultrapure water system (Waters-Millipore Corporation, Milford, MA, USA). Formic acid of mass spectrometry grade (99%) and copper sulfate were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

VI.2.2.2. Cell growth conditions

P. lipolytica TC8 is a γ -Proteobacteria originally isolated from a marine biofilm formed in the bay of Toulon (Mediterranean Sea, 43°06'23"N-5°57'17"E) (Brian-Jaisson, 2014). Cultures were performed at 20°C in three different media depending on the experiment: Väätänen nine salt solution (VNSS), marine broth (MB) (BD®, Franklin Lakes, NJ, USA) or artificial sea water (ASW) (Sigma-Aldrich). In copper exposure experiments, the metal was added to the culture medium from a stock solution of

copper sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) at 1M in VNSS or MB; the volume depending on the desired final concentration. The starter culture of the bacterial strain was done in VNSS or MB at 20°C on a rotator/shaker (120 rpm) until the end of the exponential phase. For planktonic cultures, bacteria from the starter culture were diluted in fresh culture medium at a defined absorbance unit (OD_{600}) for a total volume of 10 or 50 mL depending on the experiment (dose-response growth experiments or metabolomic/proteomic analyses, respectively). Medium turbidity was measured at 600 nm (Genesys 20 spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cultures were then incubated until the end of the exponential phase for susceptibility testing and until the stationary phase was reached for metabolomic and proteomic analyses. For biofilm development, pre-cultured planktonic cells were diluted in fresh culture medium at 0.1 absorbance unit (OD_{600}) in Petri dishes for a total volume of 10 mL and incubated 48h in static conditions at 20°C.

VI.2.2.3. Dose-response growth experiments

VI.2.2.3.1. Determination of bacterial growth inhibition concentrations (IC_{25} and IC_{50})

Exponential pre-cultured *P. lipolytica* TC8 cells were suspended in fresh medium at an OD_{600} of 0.2 (for a final OD_{600} seeding of 0.1). A total of sixteen copper concentrations were tested in a range from 0 to 2000 μM . 100 μL of culture medium enriched with copper were added in four wells of a 96-well microtiter plate (sterile transparent PS; Nunc, Fisher Scientific). All the concentrations were tested in triplicate. The fourth well (in the edge of the microplate) was filled for OD_{600} control of copper solutions. Six specific wells were filled with medium without copper for bacterial growth control (in the center of the microplate). Subsequently, 100 μL of bacterial suspension were inoculated in all wells except border ones which were filled with a same volume of fresh medium (see Figure 16 in chapter II). The microplate was incubated under shaking conditions (120 rpm) at 20°C. OD_{600} was monitored every hour during 7h using an Infinit 200 microplate reader (TECAN, Lyon, France). The growth rate μ (h^{-1}) was calculated during the exponential phase at each copper concentration according to the equation: $N = N_0 e^{\mu t}$ where N is the bacterial density at t time and N_0 is the bacterial density at t_0 . The percentage of growth inhibition was then calculated as follows: $(\mu_i - \mu_0 / \mu_0) \times 100$ with μ_i , the growth rate of the bacteria for a particular concentration of copper and μ_0 , the growth rate of the bacteria grown without copper. After mean and SD calculation per triplicate for each concentration, a sigmoid dose-response curve: % of growth inhibition = $f(\log [\text{Cu}])$ was obtained and the IC_{50} and IC_{25} (concentrations that inhibited 50% and 25% of growth, respectively) were determined.

VI.2.2.3.2. Susceptibility testing (determination of MIC and MBC)

Similarly to that described above, cultures of *P. lipolytica* TC8 were done in microplate in MB or VNSS with a concentration range of copper (from 0 to 4500 μM) and incubated at 20°C under shaking (120 rpm). OD₆₀₀ were measured after 15h. The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) value was determined as the first copper concentration from which there was no bacterial growth. To determine the MBC (Minimum Bactericidal Concentration), 20 μL of suspension in wells where no growth was observed were transferred in corresponding wells of another microplate containing 180 μL of fresh medium. OD₆₀₀ was measured after 15h of shaking incubation (120 rpm, 20°C). The MBC value was determined as the first copper concentration from which there was no growth.

VI.2.2.4. Dose-response adhesion experiment

The starter culture of *P. lipolytica* TC8 was grown to the end of exponential phase and then centrifuged (4 000 *g*, 10 min). After removing the supernatant, the pellet was re-suspended in sterile ASW in order to obtain an OD₆₀₀ of 0.6 (for a final OD₆₀₀ seeding of 0.3). Microtiter plates (sterile black PS; Nunc, Fisher Scientific, Illkirch, France) were then filled as described before but with ASW instead of VNSS. After 15h of incubation at 20°C with stirring (120 rpm; to prevent sedimentation), medium and non-adhered bacteria were eliminated by inversion of the microplate followed by three successive washes (36 g/L sterile NaCl solution, 200 μL per well). The adhered bacteria were stained with Syto 61 red fluorescent dye (Molecular Probes[®] Invitrogen) (1 μM , 100 μL per well). After 15 min of incubation in the dark, excess dye was removed by a washing step (36 g/L sterile NaCl solution, 200 μL per well). Fluorescence intensities were measured with the following parameters: $\lambda_{\text{exc}} = 620 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$. The intensity of fluorescence (IF) is proportional to the quantity of adhered bacteria. Considering an adhesion of 100% for the control wells, adhesion rates were calculated from the fluorescence rates with the following formula : $(IF_T - IF_{Cu}) / (IF_{BAC} - IF_B) \times 100$ with IF_T, the mean of fluorescence intensity of triplicate cultures with copper at a given concentration (copper and bacteria in ASW + Syto 61); IF_{Cu}, the fluorescence intensity of the medium with copper at the same concentration (copper in ASW + Syto 61); IF_{BA} the mean of fluorescence intensity of the bacterial adhesion control (bacteria in ASW + Syto 61); IF_B the mean of fluorescence intensity of the medium (ASW + Syto 61). Then, a sigmoid dose-response curve (% of inhibition of the adhesion = $f(\log [Cu])$) was obtained and the EC₅₀ (Effective Concentration inhibiting 50% of adhesion) was determined.

VI.2.2.5. Metabolome analysis in response to copper stress

Cultures were done in MB medium with three concentrations of copper: 0 (Ctrl), 1000 (Cu-treated IC₂₅) and 1400 μ M (Cu-treated IC₅₀) in planktonic (Pl) and biofilm (Bf) modes. Each condition was applied five times. Control and Cu-treated cultures were incubated 7h in order to reach the stationary phase in non-polluted conditions. The metabolomic analysis was then conducted as described before (Chapter IV). Briefly, metabolite extractions were performed with EtOAc [solvent/bacterial culture, 2:1 (v/v)]. The resulting mixture was shaken for 1 min before being sonicated for 30 min at 20°C. Then, the organic phase was collected and concentrated to dryness until utilization. Dried extracts were recovered in 500 μ L MeOH and 5 μ L were analyzed by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UPLC-MS). It consisted in a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific) chromatographic system coupled with a Q-ToF Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics). Separation was performed using an analytical core-shell reversed-phase column (150 \times 2.1 mm, 1.7 μ m, Kinetex Phenyl-Hexyl with a SecurityGuard cartridge, Phenomenex) with the following gradient: 0-1 min at 20% of B in A (A: H₂O with 0.1% formic acid; B: ACN with 0.1% formic acid), 1 to 7 min to 100% of B and kept so until 11 min at 100%, 11 to 11.5 min 20% of B and kept so until 13.5 min. Flow rate was set at 0.5 mL/min and the column temperature at 40°C. The electrospray voltage was set at 4500V in positive mode. The sequence of injection followed a specific scheme to allow quality control of data and features filtering. Raw data were pre-processed with the XCMS software (version 1.38.0) under R 3.1.0 environment. Redundant signals were suppressed by three successive filtrations thanks to an in-house script on R. The data were log₁₀ transformed, mean-centered and analyzed by principal component analysis (PCA) and by partial least-square discriminant analyses (PLS-DA) under the Simca 3.0.3 software. All the supervised models evaluated were tested for over fitting with methods of permutation test and cross validation of variance (CV-ANOVA). Identification of compounds was obtained thanks to a second analysis by UPLC followed by tandem mass spectrometry (MS/MS), tools of the DataAnalysis software and freely available databases (Metlin, KEGG, Pubchem, Chempid and Lipidmaps).

VI.2.2.6. Proteome analysis in response to copper stress

VI.2.2.6.1. Protein sample preparation

P. lipolytica TC8 was cultured in VNSS medium without (Ctrl, control) or with copper added (Cu-treated) in the beginning of the growth at one concentration under the MIC (IC₅₀, 700 μ M). Cultures were performed in planktonic (Pl) and biofilm (Bf) modes in triplicates for each copper condition. After

7h or 48h respectively, planktonic and biofilm cultures were centrifuged (4 000 rpm, 4°C, 15 min) two times in order to wash cells which were suspended in equal volume of sterile cold ASW between the two centrifugations. Pellets were stored at -80°C until use. They were then suspended in five pellet volumes of a lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0) with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). Extractions of both control and Cu-treated cell sample triplicates were then performed as followed. Cell solutions were sonicated on ice (three cycles of 10s, 100W, followed by resting intervals of 10s) in order to disrupt cells. Unbroken cells and aggregated proteins were removed by centrifugation at 14 000 *g* at 4°C for 20 min. Protein content from the different soluble fractions was quantified by the Bradford based Uptima coo protein assay (Interchim). For each sample, a volume containing 100 μ g of proteins was precipitated with TCA (final concentration, 10%), washed with ice-cold acetone and stored at -80°C until analysis.

VI.2.2.6.2. Digestion and nano-LC-MS/MS

Proteome samples were reduced and alkylated using equilibration buffers containing dithiothreitol and iodoacetamide and loaded onto a 12% SDS-polyacrylamide gel. After Instant Blue (Invitrogen) staining of the gel, bands were excised and digested by the addition of 60 μ L of a solution of modified trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 (20 ng/ μ L, sequence grade, Promega, Charbonnières, France). The mixture was incubated at 37°C overnight. The peptides mixtures were analyzed by nano-LC-MS/MS using nanoRS UHPLC system (Dionex, Amsterdam, the Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Five microliters of each sample were loaded on a C18 pre-column (300 μ m x 5 mm; Dionex) at 20 μ L/min in 2% acetonitrile with 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 min of desalting, the pre-column was switched on line with the analytical C18 column (75 μ m x 15 cm; in-house packed) equilibrated in 95% solvent A (5% acetonitrile with 0.2% formic acid) and 5% solvent B (80% acetonitrile with 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 5-50% gradient of solvent B during 105 min at a 300 nL/min flow rate. The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with the Xcalibur software. Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300-2000 *m/z* range with the resolution set to a value of 60 000. The twenty most intense ions per survey scan were selected for CID fragmentation, and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60s to prevent repetitive selection of the same peptide.

VI.2.2.6.3. Database search and data analysis

Acquired MS data were processed using MaxQuant version 1.5.3. Derived peak lists were submitted to the Andromeda search engine and data were searched against Uniprot *P. lipolytica* (7 969 sequences; 2 670 655 residues). The precursor mass tolerance was set to 20 ppm for first searches and 4.5 ppm for main Andromeda database searches. The fragment ion mass tolerance was set to 0.5 Da. Trypsin/P was chosen as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Oxidation of methionine and protein N-terminal acetylation were defined as variable modifications, and carbamidomethylation of cysteine was defined as a fixed modification. Minimum peptide length was set to seven amino acids. Minimum number of unique peptides was set to one. Maximum FDR – calculated by employing a reverse database strategy – was set to 1% for peptides and proteins. The LFQ metric was used to perform relative quantification between proteins identified in different biological conditions, (reflecting a normalized protein quantity deduced from all peptides intensity values). For each comparison, only proteins which were quantified in the three replicate experiments (three LFQ values retrieved by MaxQuant) in at least one of the biological conditions were considered for further processing and statistical analysis. Missing values were replaced by a constant noise value determined independently for each analytical run as the 1% percentile of the total protein population. For all comparison, statistical analysis was applied to the LFQ values. Proteins with a *p*-value < 0.01 and a ratio of average normalized area (fold change < 0.5 and > 2 were considered significant).

Multivariate analyses were performed by PCA, PLS-DA and orthogonal partial least square discriminant-analysis (OPLS-DA) under the Simca 3.0.3 software. All the supervised models evaluated were tested for over fitting with methods of permutation test and cross validation of variance (CV-ANOVA) Venn diagrams were drawn using the Venny web service (Oliveros, J. C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams, <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (2007)). Functional annotation of the differentially expressed proteins was carried out using the gene ontology (GO) database in the UniProt Knowledgebase (UniProtKB).

VI.2.3. Results and discussion

VI.2.3.1. Dose-dependent effect of copper on cell planktonic growth and biofilm formation

Bacterial heavy-metal resistance and/or tolerance can be defined as the capacity of bacteria to continue growing, or at least survive, in the presence of the metal. A copper resistance can be thus

considered when the bacterial growth rate is greater than 95% compared to the control (culture without metal). Under 95%, the decreasing growth rate shows a growth inhibition. Copper effect on *P. lipolytica* TC8 planktonic cultures was determined thanks to the comparison of the growth rates of the bacteria subjected to a range of copper concentrations in two media, VNSS and MB. The Figure 71 illustrates growth inhibition of the bacteria in triplicate cultures by a range of copper concentrations. Effective concentrations that inhibited 25% and 50% of the growth (IC_{25} and IC_{50} , respectively) in both media are reported in Table 30.

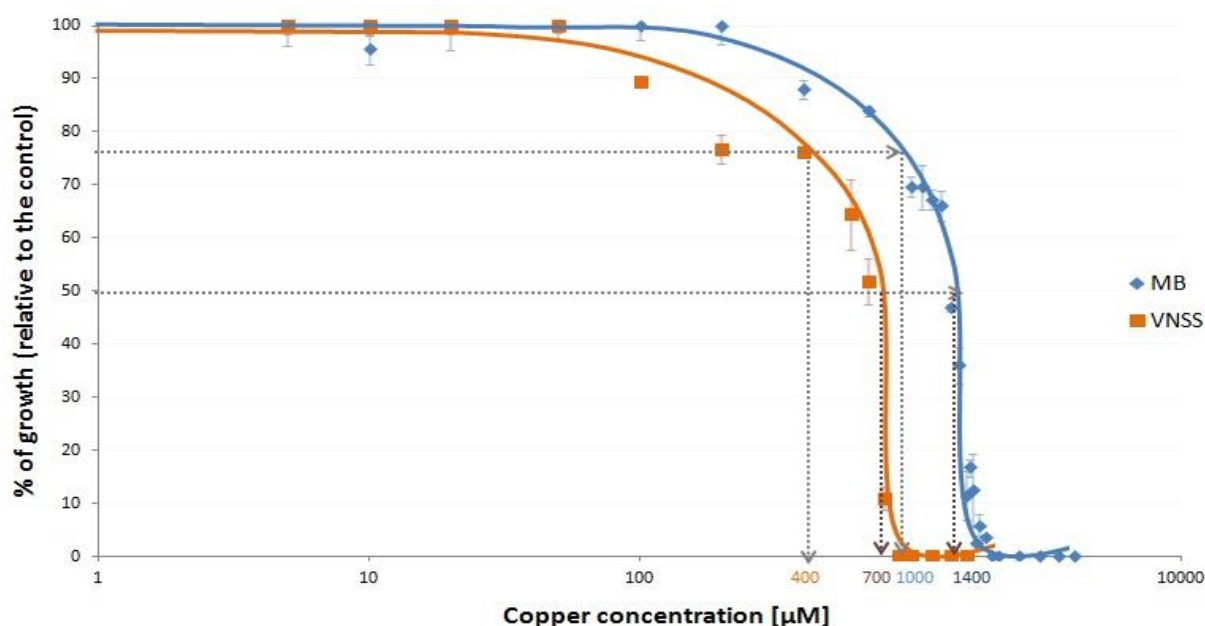


Figure 71: Growth inhibition of *P. lipolytica* TC8 cultured in VNSS and MB supplemented with various copper concentrations (from 0 to 2000 μM)

Growth inhibition was thus noticed from 100 μM and increased with copper concentration in a concentration-dependent manner. The IC_{25} and IC_{50} values were determined as 400 and 700 μM , respectively, in VNSS medium, and at a higher level of 1000 and 1400 μM in MB medium. Growth inhibitory concentrations values were thus nearly two times higher in MB than in VNSS medium. These results could be correlated with a higher copper-binding capacity of MB medium compounds (Booth et al., 2013). When copper was added to VNSS medium at concentrations higher than 400 μM , or higher than 1400 μM in MB, bacterial cells required more time to start dividing. Indeed, the lag phase was prolonged as observed by the follow-up of the growth (curves not shown).

The minimum inhibitory concentration (MIC) can be defined as the lowest copper concentration that stops the growth of planktonic cells. Here, copper-concentrations found to inhibit 95% of growth of *P. lipolytica* TC8 (IC₉₅) were around 800 μ M in VNSS and 1800 μ M in MB. The minimum bactericidal concentration (MBC) is conventionally defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent required to kill 99.9% of the cells of a bacterial culture. Such a lethal effect of copper on *P. lipolytica* TC8 was observed from 1800 μ M in VNSS and from 2800 μ M in MB. Figure 72 illustrated the observed viability of the *P. lipolytica* TC8 cells cultured in triplicate depending on copper concentration. Key copper concentrations were summarized in Table 30.

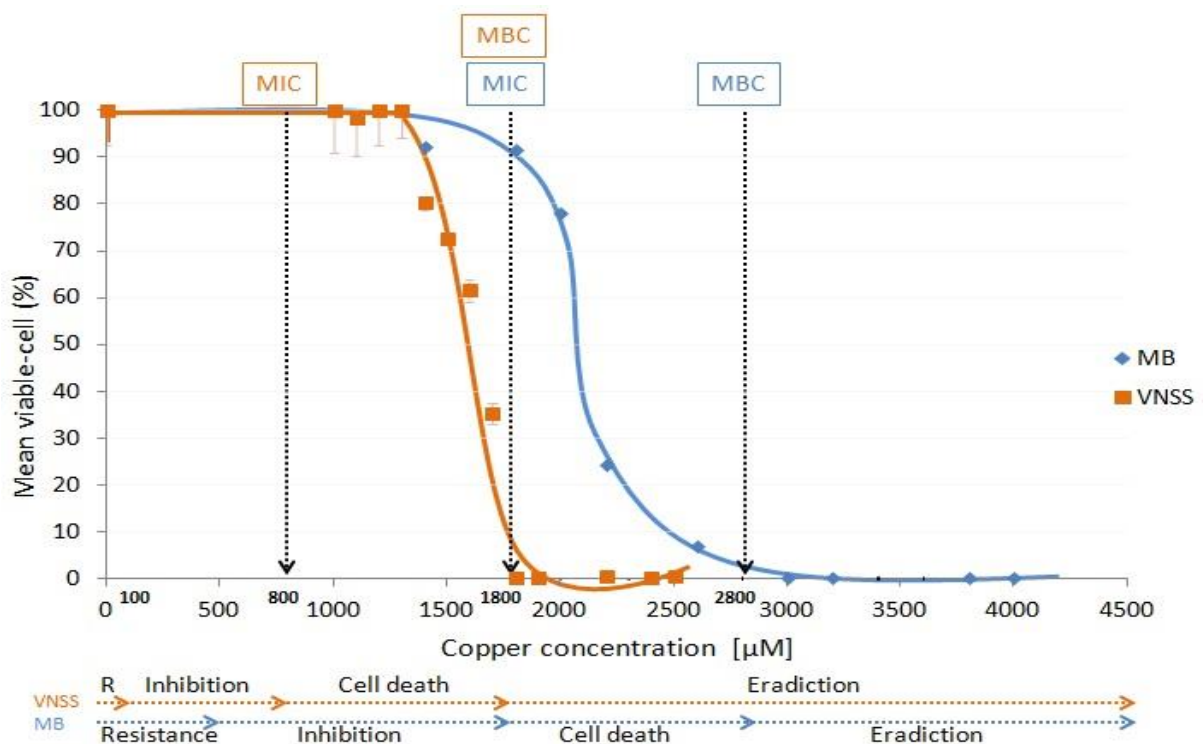


Figure 72: Copper effect on the viability of *P. lipolytica* TC8 in VNSS and MB medium supplemented with various copper concentrations (from 0 to 4500 μ M). MIC and MBC values are here reported

These values could not easily be compared with equivalent data found for other bacteria mainly because of huge differences induced by the culture media in copper speciation. These differences led indeed to various levels of bioavailability, and thus toxicity, of the metal added to the medium (Booth et al., 2015; Guo et al., 2015). Nevertheless, this study of *P. lipolytica* TC8 gave MIC values close to those reported in a previous study for various bacterial species cultured in a range of copper concentration from 1000 to 3000 μ M (Guo et al. 2015). Furthermore, it has to be noticed that, for

P. lipolytica TC8, MBC and MIC values were found in a close range in both media with a lower ratio in MB than in VNSS (MBC/MIC ratio of 1.55 vs 2.25, respectively).

Tableau 30 : Susceptibility to copper of *P. lipolytica* TC8 cultured planktonically in VNSS and MB media

Medium	IC ₂₅ (μM)	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)	MBC (μM)
VNSS	400	700	800	1800
MB	1000	1400	1800	2800

P. lipolytica TC8 was previously shown to be able to form surface-adhered biofilms (see Chapter V). Effect of copper on the ability of this strain to adhere to a surface was thus examined. Such assays were performed in ASW medium supplemented with a range of copper concentrations. An exposure time of 15h was selected to avoid the death of bacterial cells in this medium due to the lack of nutrients. Percentage of adhesion in presence of copper was determined in comparison with bacterial adhesion without copper added to ASW (Figure 73). A full adhesion of *P. lipolytica* TC8 cells was observed at copper concentrations lower than or equal to 400 μM. Adhesion remained strong until 600 μM and dropped from 700 μM. No adhesion was observed beyond a concentration of 800 μM. The effective concentration that inhibited 50% of adhesion of *P. lipolytica* TC8 (EC₅₀) was thus determined as 700 μM in static culture conditions (Figure 73).

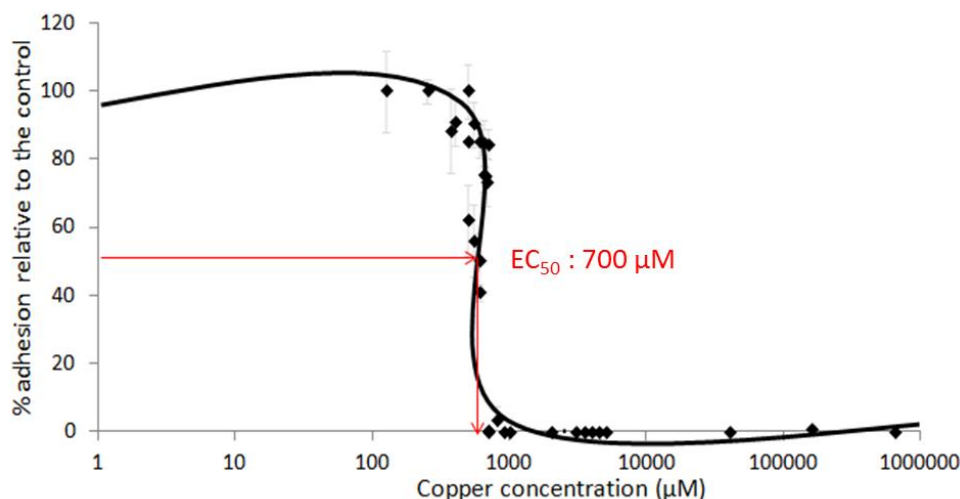


Figure 73: Copper effect on the adhesion of *P. lipolytica* TC8 in VNSS and ASW medium supplemented with various copper concentrations (from 0 to 1000 mM)

These first steps towards understanding the susceptibility of *P. lipolytica* TC8 to copper were necessary to define the copper concentrations relevant to study the effects of this metal on both the metabolome and proteome of this bacterial strain.

VI.2.3.2. Metabolic stress response under copper exposure

In order to analyze the maximum number of metabolites, a non-targeted metabolomic study was conducted on organic extracts of *P. lipolytica* TC8 grown for 48h in biofilm or 7h in planktonic conditions in MB. Such a difference in growth time, and so in exposure time to copper, was necessary because of the slower cell growth in sessile lifestyle. Cells cultured in both modes were exposed to copper concentrations of 0 (Control: Ctrl), 1000 (Cu-treated IC₂₅) and 1400 μ M (Cu-treated IC₅₀). These concentrations were chosen thanks to the results previously described (Cf. Table 30). Experiments were performed on five biological replicates. EtOAc was used as extraction solvent because of its ability to extract a large amount of compounds avoiding salt mixing and allowing protein precipitation (see Chapter IV). For the same purpose to get a wide view of the metabolome, separations were achieved using a phenyl-hexyl stationary phase which allows to obtain a better retention of polar and aromatic compounds than more conventional C₁₈ phases (see Chapter IV). Analyses were then performed by UPLC-HRMS and the resulting chromatograms were presented in annexes (Annex I, Figure AI.4).

The total filtered dataset (981 *m/z* features) was treated by PCA in order to assess grouping and trends among samples. Results obtained from the PCA score plot showed a clear discrimination of samples according to: (i) culture conditions (Pl vs Bf) and (ii) copper concentrations when bacterial cells were grown planktonically (Figure 74). This model explained 72.7% of the total variance of the dataset. The first component, which accounted for 31.3%, allowed the distinction between planktonic and biofilm samples while the second one allowed to discriminate between planktonic Cu-treated (IC₅₀) samples and the other planktonic samples [Controls and Cu-treated (IC₂₅) cultures].

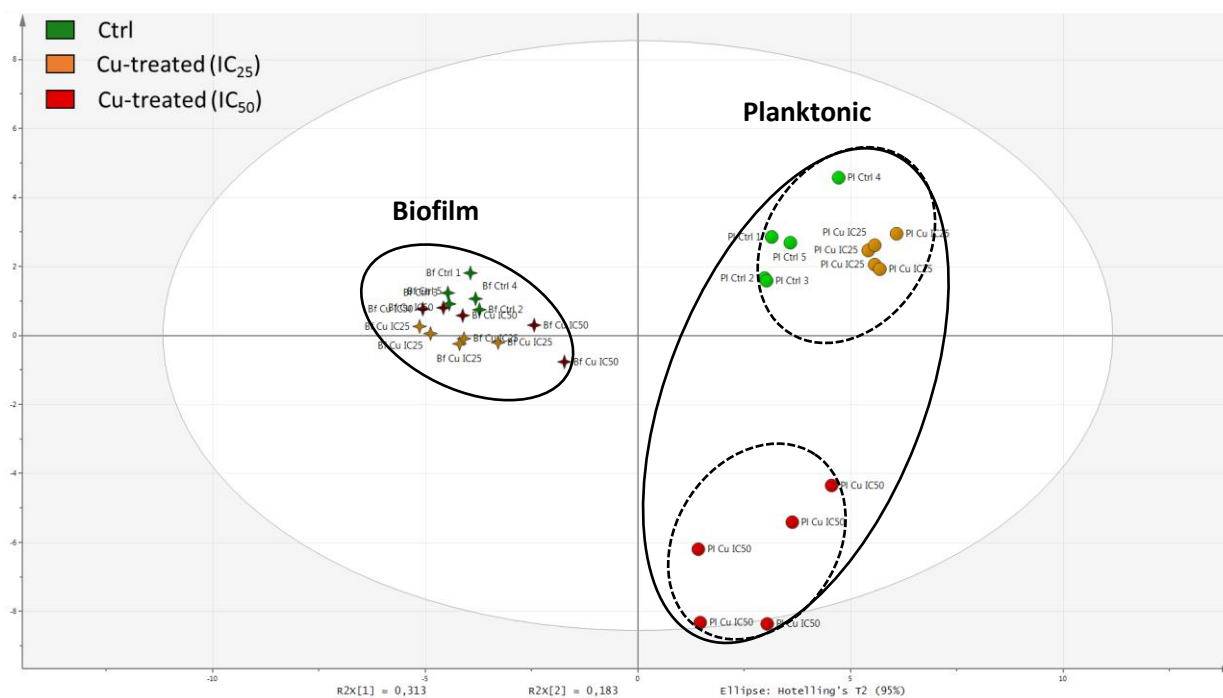


Figure 74: PCA score plot based on UPLC-HRMS data of planktonic (●) and biofilm (✦) samples of *P. lipolytica* TC8 cultured with (IC₂₅ and IC₅₀) and without (Control) copper

A PLS-DA model (six classes: one class by condition) was then built in order to determine biomarkers implied in the discrimination between samples. R^2X_{cum} (0.727) and R^2Y_{cum} (0.960) values showed the goodness of fit of the model while Q^2Y_{cum} (0.799) value estimated its predictive ability. The p -value (< 0.05) obtained from the cross validation indicated the significance of the separation according to each experimental condition. The permutation test ($n = 150$) also allowed the validation of the PLS-DA model. Biofilm samples cultured with or without copper were not discriminated according to the 2D score plot representation constructed with the two main components. However, these samples were separated in the 3D score plot representation (Figure 75). Nevertheless, the three classes of biofilm samples were less separated than the planktonic ones. In order to consider all the components of the model, clustering was performed using HCA (Hierarchical Cluster Analysis) where each component was weighted with its eigenvalue (value that gives the variance of the component) (Jolliffe, 2002) (Figure 76).

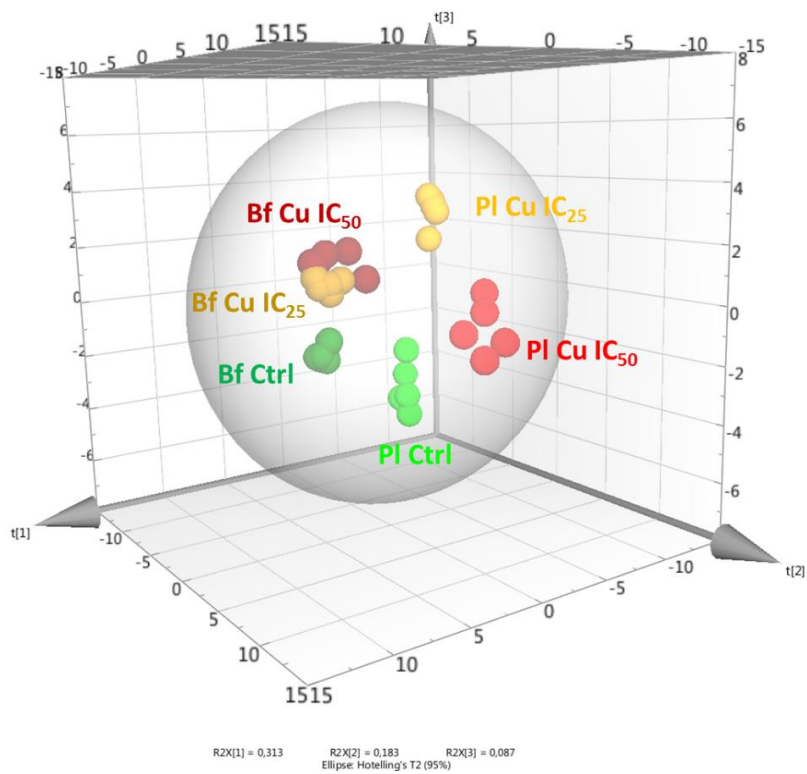


Figure 75: 3D PLS-DA score plot based on UPLC-HRMS data of planktonic and biofilm samples of *P. lipolytica* TC8 cultured with (IC₂₅ and IC₅₀) and without (Control) copper

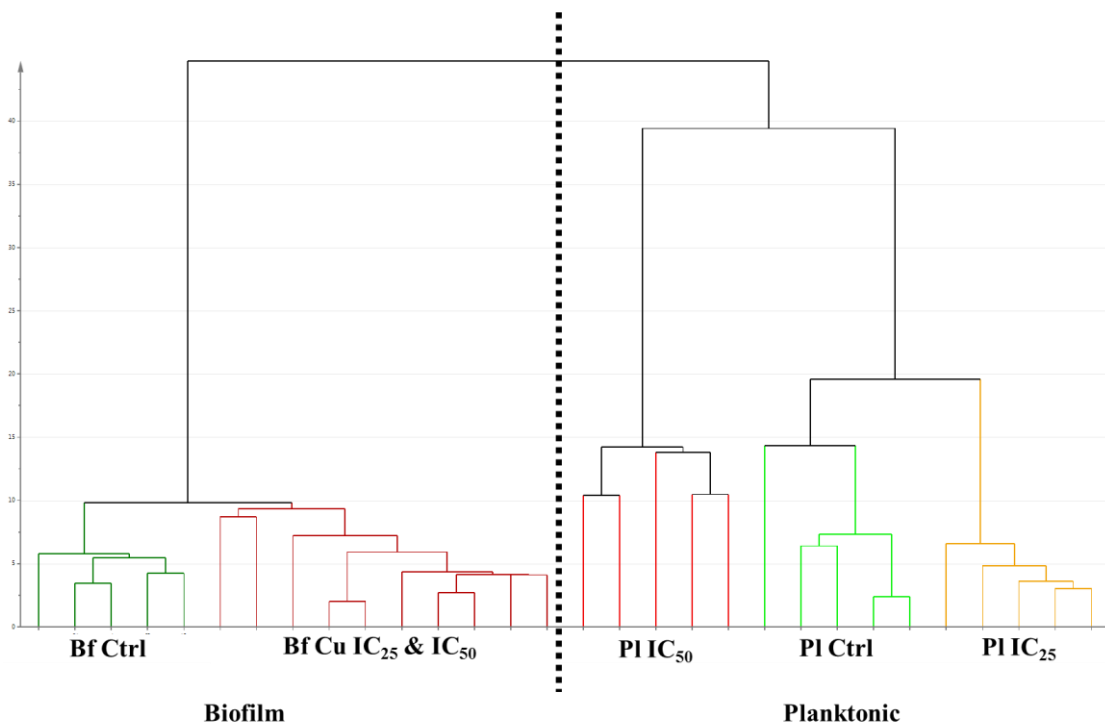


Figure 76: HCA based on PLS-DA of UPLC-HRMS data of planktonic (PI) and biofilm (Bf) samples of *P. lipolytica* TC8 cultured with (IC₂₅ and IC₅₀) and without (Control) copper

Taking into account all the components of the model, the highest level of discrimination occurred between biofilm and planktonic samples. Then, in planktonic samples, a clear distinction was observed between those Cu-treated (IC₅₀) and all the others. The discrimination between controls and Cu-treated (IC₂₅) planktonic samples was more pronounced than the distinction between biofilm samples obtained with or without copper. Moreover, no discrimination was observed between metabolomes of Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) biofilm samples.

Metabolic differences observed between planktonic and biofilm cultures of *P. lipolytica* TC8 were expected (see Chapter V). In addition, these results showed that culture mode exerts more influence on the metabolome than copper treatment (in the concentration range tested). Moreover, metabolic profiles of biofilm and planktonic cultures did not converge under copper stress. A similar conclusion was reached for *Pseudomonas fluorescens* in a previous work (Booth et al., 2011). However, as for *P. fluorescens*, the most important metabolic shift was observed in planktonic cultures of *P. lipolytica* TC8 exposed to copper and not in biofilms.

Due to these main differences observed between biofilm and planktonic metabolic responses to copper exposure, these two groups of samples were first analyzed independently.

Planktonic cell response to copper stress

Metabolic profiles of planktonic cells of *P. lipolytica* TC8 cultured with or without copper were compared by statistical multivariate analysis with the aim of identifying stress biomarkers (Figure 77). A PLS-DA model (1) was built (Table 31), and as previously shown (Figure 74), the greatest discrimination was observed on the first component (37.1%) between Cu-treated (IC₅₀) cells and the other planktonic samples. The second component allowed the discrimination between controls and Cu-treated (IC₂₅) cells and explained 16.8% of all the variance within the dataset.

In model (1), 273 *m/z* features showed a VIP score value higher than one. In order to increase the selectivity, a second PLS-DA model was generated by including only these VIP. This model (2) was well-fitted to the experimental data as reflected in Table 31. A total of 86 metabolites of model (2) had a VIP score value higher than one. The construction of a third model including only these 86 VIP did not improve the quality of the discrimination. Thus, model (2) was selected and a focus was then made on the nineteen variables with a VIP score value greater than 1.5. Their expression level were represented visually on a heatmap (Figure 78) and allowed to highlight similarities and differences between samples. Indeed, ten metabolites were over-expressed when cells were Cu-treated (IC₂₅) and three

when cells were Cu-treated (IC₅₀), while six were under-expressed under copper treatment whatever the copper concentration. The molecular formulae, and when possible the identification, of these nineteen VIP were deduced thanks to accurate mass measurement, isotopic pattern and fragmentation analysis (Table 32).

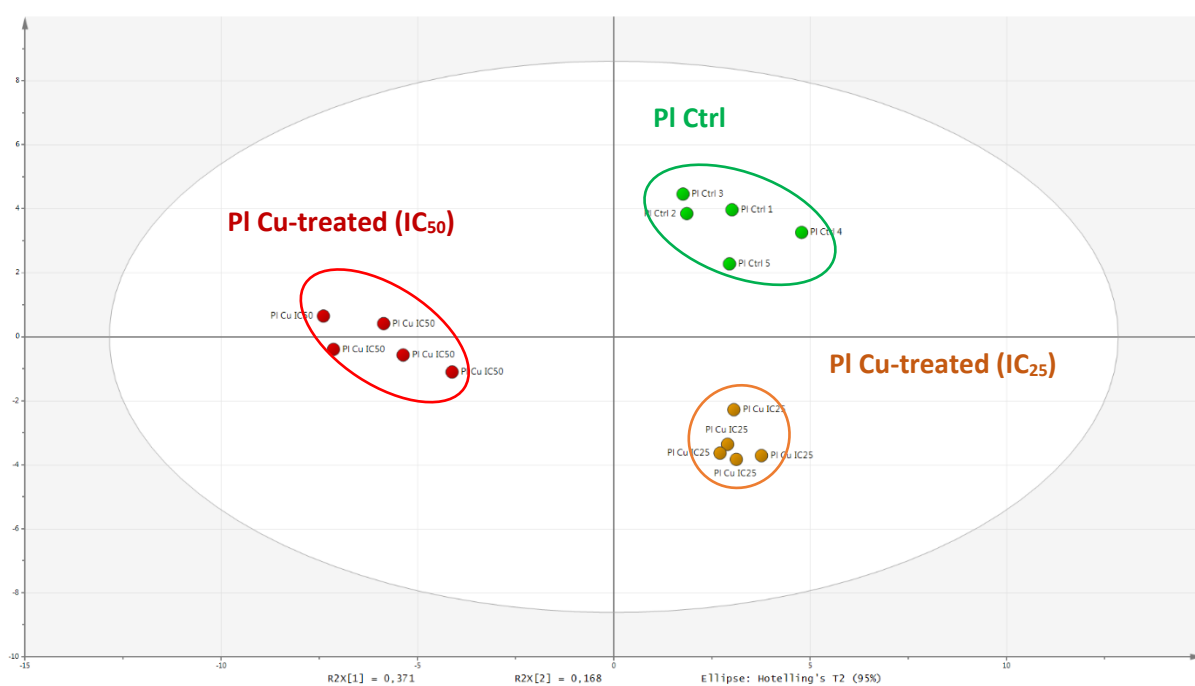


Figure 77: PLS-DA score plot based on UPLC-HRMS data of planktonic (PI) control (Ctrl) and Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

Tableau 31 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS-DA models used for the discrimination of planktonic control and Cu-treated cultures of *P. lipolytica* TC8

	Models	N° ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
Model (1)	3 classes	3	0.627	0.980	0.925	0.620	-0.346	< 0.001
Model (2)	3 classes	2	0.730	0.979	0.944	0.482	-0.414	< 0.001

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modeled variation in X matrix; ^cCumulative modeled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; ^eR and Q intercepts obtained after permutation test ($n = 150$); ^f p value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA.

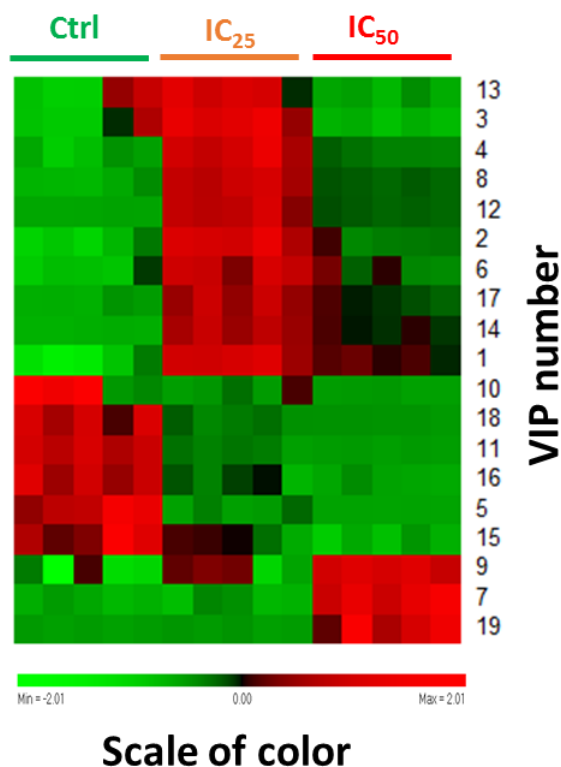


Figure 78: Heatmap of the nineteen differential metabolites (VIP score value > 1) from the PLS-DA model (2) of planktonic control (Ctrl) or Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

In this way, phospholipids such as phosphatidylethanolamine (PE) (C17:1, C16:0) (VIP n°7) and PE (C16:1, C16:1) (VIP n°9) were found to be over-produced when cultures were Cu-treated (IC₅₀). This type of compounds was previously shown to be more specifically biosynthesized in biofilms than in planktonic cultures (Cf. Chapter V). This was the case for PE (C17:1, C16:0) (VIP n°14 in Table 25, Chapter V). Here, the presence of these compounds as VIP in Cu-treated (IC₅₀) cultures suggested that one of the defense response of the planktonic cells could be the switching to a similar metabolism than sessile cells.

Tableau 32 : List of the biomarkers (VIP score value > 1.5) identified by LC-HRMS for the discrimination of planktonic control and Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

VIP number	m/z	RT (s)	VIP Value	Formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	I expl ^b (%)	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
1	229.0590	74	2.5	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₃	0.1	0.1	18.9	-	-
2	120.0449	297	2.3	C ₇ H ₆ NO	-0.5	4.6	76.0	-	-
3	391.1409	103	2.2	C ₂₁ H ₁₉ N ₄ O ₄	-1.5	1.3	54.0	-	-
4	147.0557	65	2.1	C ₈ H ₇ N ₂ O	-3.1	6.8	84.0	-	-
5	290.0939	280	2.0	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃ P	0.7	10.8	3.0	-	-
6	347.2200	360	1.9	C ₁₇ H ₂₇ N ₆ O ₂	-3.0	5.1	0.7	-	-
7	702.5067	505	1.9	C ₃₈ H ₇₃ NO ₈ P	-0.5	3.5	78.9	561 (100) ^c	PE (C17:1, C16:0)
8	147.4842	74	1.9	-	-	-	-	-	-
9	688.4909	491	1.9	C ₃₇ H ₇₀ NO ₈ P	-0.3	11.7	3.1	547 (100) ^c	PE (C16:1, C16:1)
10	531.4078	508	1.8	C ₃₀ H ₅₉ O ₅ S	-0.1	12.6	99.8	-	-
11	233.1298	51	1.7	C ₁₁ H ₂₂ O ₃ P	1.3	6.2	-	-	-
12	231.0770	200	1.7	C ₁₂ H ₁₁ N ₂ O ₃	-2.7	4.6	82.3	-	-
13	375.1455	202	1.7	C ₂₁ H ₁₉ N ₄ O ₃	0.6	6.6	37.3	-	-
14	237.1029	244	1.7	C ₁₅ H ₁₃ N ₂ O	-2.9	3.8	12.1	-	-
15	287.1015	204	1.6	C ₉ H ₁₆ N ₆ O ₃ P	0.4	16.2	43.0	-	-
16	132.1019	62	1.6	C ₆ H ₁₄ NO ₂	-0.3	2.2	161.6	-	-
17	319.0703	110	1.6	-	-	-	-	-	-
18	285.1223	202	1.6	C ₁₆ H ₁₇ N ₂ O ₃	3.6	13.8	-	-	-
19	325.2688	412	1.6	C ₂₀ H ₃₇ O ₃	-0.8	4.2	-	-	-

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list; ^c[M + H - C₂H₈NO₄P]⁺.

Biofilm cells response under copper stress

Similar analyses were done on biofilm cells of *P. lipolytica* TC8 cultured with or without copper. The resulting analysis of these data by PLS-DA were presented in Figure 79 and the statistical parameters for the corresponding model (1) were given in Table 33. Here, the main discrimination appeared between controls and Cu-treated cells (whatever the copper concentration). The first component explained 25.8% of the total variance within the whole dataset and allowed the discrimination between Cu-treated samples and controls. While metabolomes of Cu-treated (IC₂₅) and (IC₅₀) cultures could not be discriminated considering all the samples together (PI and Bf samples), the discrimination was made here along the second component with an explained variance of 12.2%. A total of 241 VIP of this model (1) showed a VIP score value higher than one. A second PLS-DA model (2) was built by including only these VIP. Quality parameters of model (2) (Table 33) attested the discrimination capacity of the method. Seventy-two metabolites of model (2) had a VIP score value greater than one. In the same way, a third model (3) was constructed with this set of VIP leading to a reduced number (20) of VIP with a VIP score value greater than one. A focus was then made on these twenty discriminant metabolites. Their expression level was analyzed (Figure 80) and some of them were putatively annotated (Table 34).

The distribution of biomarkers between biofilm samples were not as clear as that observed in the case of planktonic ones but several tendencies could be distinguished. In fact, there was no specific metabolite found for the Cu-treated (IC₂₅) or (IC₅₀) cultures but some metabolites were clearly linked to the presence of copper, whatever its concentration. This apparent lack of gradual effect of copper concentrations on the biofilm cell metabolism could result to the long exposure time and to an heterogeneous metabolic activity within the biofilm (Harrison et al., 2004, 2005). As previously shown for *P. aeruginosa*, such a heterogeneity could come from different cell types (fast- and slow-growers or persisters) living together within a heterogeneous biofilm. They can be differentially tolerant to copper but give a non-differentially metabolic expression when submitted to a copper exposure for a long time (Harrison et al., 2005).

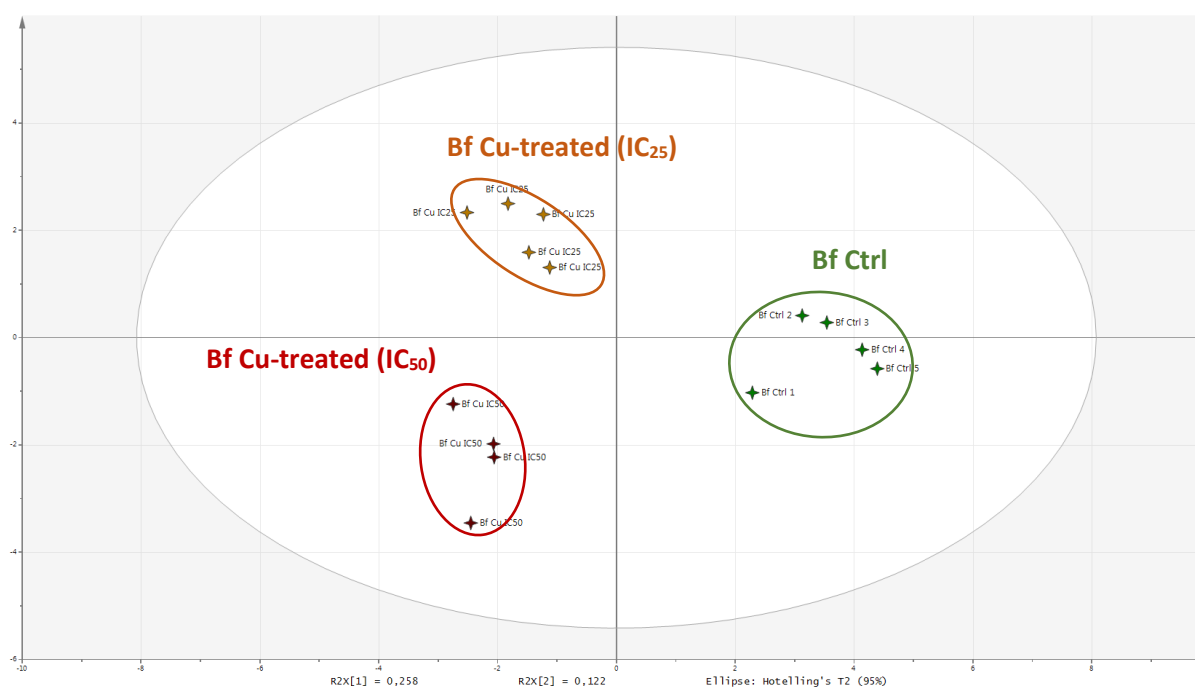


Figure 79: PLS-DA score plot based on UPLC-HRMS data of biofilm (Bf) control (Ctrl) and Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

Tableau 33 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS-DA models used for the discrimination of biofilm cultures of *P. lipolytica* TC8 according to copper exposure

	Models	N° ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
Model (1)	3 classes	3	0.499	0.960	0.672	0.721	-0.345	0.040
Model (2)	3 classes	3	0.654	0.975	0.924	0.560	-0.378	< 0.001
Model (3)	3 classes	3	0.772	0.980	0.944	0.375	-0.417	< 0.001

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modeled variation in X matrix; ^cCumulative modeled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; ^eR and Q intercepts obtained after permutation test ($n = 150$); ^f p value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA.

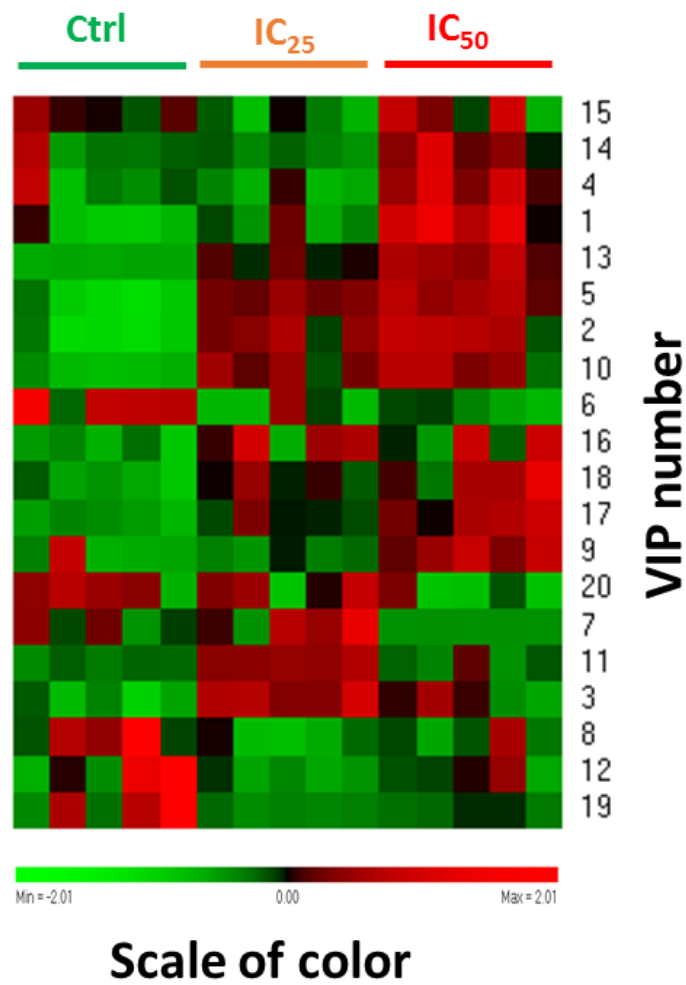


Figure 80: Heatmap of the twenty differential metabolites (VIP score value > 1) from the PLS-DA model (3) of biofilm control (Ctrl) and Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8.

Tableau 34 : List of the biomarkers (VIP score value > 1.0) identified by LC-HRMS for the discrimination of biofilm control and Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

VIP number	m/z	RT (s)	VIP value	Formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	I expl ^b (%)	MS/MS Fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
1	375.1455	202	1.9	C ₂₁ H ₁₉ N ₄ O ₃	0.6	6.6	37.3	-	-
2	391.1409	103	1.6	C ₂₁ H ₁₉ N ₄ O ₄	-1.5	1.3	54.0	-	-
3	285.0855	123	1.6	C ₁₁ H ₁₇ N ₄ OS ₂	-2.9	4.6	63.8	-	-
4	287.1015	204	1.6	C ₉ H ₁₆ N ₆ O ₃ P	0.4	16.2	43.0	-	-
5	229.0590	74	1.6	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₃	0.1	0.1	18.9	-	-
6	290.0939	280	1.3	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃ P	0.7	10.8	3.0	-	-
7	351.2473	411	1.3	C ₁₇ H ₃₁ N ₆ O ₂	-0.2	9.3	15.7	-	-
8	385.3794	345	1.3	C ₂₃ H ₄₉ N ₂ O ₂	-1.4	5.3	2.2	-	-
9	147.0557	65	1.3	C ₈ H ₇ N ₂ O	-3.1	6.8	84.0	-	-
10	413.1218	106	1.2	C ₂₂ H ₂₁ O ₈	3.2	4.1	48.8	-	-
11	347.1071	114	1.2	C ₁₄ H ₂₁ NO ₇ S	-2.1	15.6	6.9	-	-
12	355.4956	342	1.2	-	-	-	-	-	-
13	223.0690	62	1.2	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₃	-0.3	1.1	17.8	-	-
14	233.1058	133	1.1	-	-	-	-	-	-
15	393.2616	432	1.1	-	-	-	-	-	-
16	663.5662	424	1.1	C ₄₀ H ₇₅ N ₂ O ₅	0.9	3.4	45.2	645 (3) ^c , 413 (17) ^d , 395 (60) ^e , 377 (61) ^f , 159 (6), 141 (4) ^g , 133 (6) ^g , 115 (100) ^g , 70 (33) ^g	OL (C18:1, C16:1)
17	379.2819	427	1.1	-	-	-	-	-	-
18	688.4909	491	1.1	C ₃₇ H ₇₀ NO ₈ P	-0.3	11.7	3.1	547 (100) ^h	PE (C16:1, C16:1)
19	369.3267	344	1.1	-	-	-	-	-	-
20	284.2158	452	1.0	C ₁₈ H ₃₈ NO	-2.4	0.7	6.5	-	-

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list; ^c[M + H - H₂O]⁺; ^d[M + H - RCOH]⁺; ^e[M + H - H₂O - RCOH]⁺; ^f[M + H - 2 H₂O - RCOH]⁺; ^gOther typical OL ion fragments; ^h[M + H - C₂H₈NO₄P]⁺.

In another hand, the distinctions observed between biofilm metabolomes could be the direct result of copper toxicity or the effect of a specific response to stress, as mentioned by a previous study on a multimetal resistant *Pseudomonas fluorescens* strain (Booth et al. 2011). Considering that biofilm cells showed a higher resistance to copper toxicity due to many protective mechanisms compared to planktonic cells (Harrison et al 2007 : 10.1038/nrmicro1774), the most probable hypothesis was in favor of a metabolic response to stress (Booth et al. 2011). In this case, the metabolic variations observed here were due to the activation of defense or protective mechanisms. At this stage of the study, the lack of metabolite identification did not allow to highlight specific metabolic pathways involved in this resistance. But as described below, a quantitative proteomic approach has completed this work with the description of copper-resistance proteins specifically up-regulated in response to copper stress.

Metabolites which were common VIP of planktonic and biofilm cells in response to copper are given in bold in Tables 32 and 34. In both cases, 35% of the twenty first VIP (7/20) were common at both culture modes. Among the other 65%, some VIP were common but with lower VIP score values in the other culture condition.

Thus, despite a clear distinction between metabolic responses to copper stress of planktonic and biofilm cells, more than one-third of the VIP were shared. Taken into account these results, it was not possible to identify metabolites which would be specific of the planktonic or biofilm cell response to copper. In order to obtain such an information, metabolomes of biofilm and planktonic cells were finally analyzed together.

Compared biofilm and planktonic cell responses to copper stress

A PLS-DA model built with the UPLC-HRMS data of the samples obtained in the six culture conditions was already shown in the first part of this study (HCA based on PLS-DA, Figure 76). Statistical parameters of this model were presented in Table 35. As for the metabolomic analysis of planktonic and biofilm cell responses to copper, a selection of metabolites was done according to their VIP score value resulting in a final model (3) including thirty-eight metabolites with a VIP score value greater than one.

Tableau 35 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS-DA models used for the discrimination of planktonic and biofilm control and Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

	Models	N° ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
Model (1)	6 classes	7	0.727	0.96	0.799	0.576	-0.616	< 0.001
Model (2)	6 classes	8	0.813	0.962	0.818	0.568	-0.809	< 0.001
Model (3)	6 classes	9	0.880	0.963	0.825	0.553	-0.938	< 0.001

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modeled variation in X matrix; ^cCumulative modeled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; ^eR and Q intercepts obtained after permutation test ($n = 150$); ^f p value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA.

A heatmap representation was obtained (Figure 81) and the clustering revealed that on these thirty-eight first VIP, approximately three were over-produced in planktonic Cu-treated (IC₂₅) samples (Table 36), six were over-produced in planktonic Cu-treated (IC₅₀) samples (Table 37), eight were under-expressed in PI Cu-treated (IC₅₀) and not expressed in biofilm samples (Table 38), three were over-produced in biofilms whatever the copper concentration (Table 39) and finally, six were over-produced in biofilm cells whatever the copper concentration and in planktonic Cu-treated (IC₂₅) cells (Table 40). The expression of these metabolites was not enhanced when copper concentration was increased in planktonic Cu-treated (IC₅₀) cultures.

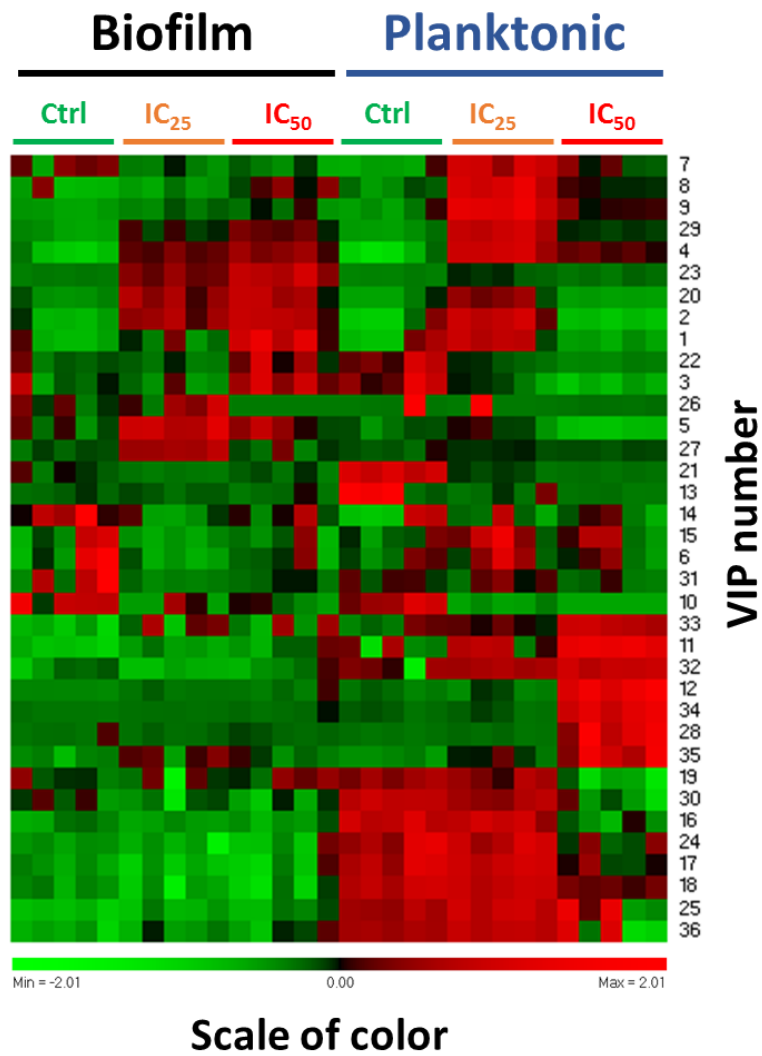


Figure 81: Heatmap of the thirty-eight differential metabolites (VIP score value > 1) from the PLS-DA model (3) of biofilm and planktonic control (Ctrl) or Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

Tableau 36 : List of the biomarkers (VIP score value > 1) identified by LC-HRMS as over-produced only in planktonic Cu-treated (IC₂₅) cultures of *P. lipolytica* TC8

VIP number	m/z	RT (s)	VIP value	Formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	I expl ^b (%)	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
7	347.2200	360	1.3	C ₁₇ H ₂₇ N ₆ O ₂	-3.0	5.1	0.7	-	-
8	147.0557	65	1.3	C ₈ H ₇ N ₂ O	-3.1	6.8	84.0	-	-
9	120.0449	297	1.2	C ₇ H ₆ NO	-0.5	4.6	76.0	-	-

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list.

Tableau 37 : List of the biomarkers (VIP score value > 1) identified by LC-HRMS as over-produced only in planktonic Cu-treated (IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

VIP number	m/z	RT (s)	VIP value	Formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	I expl ^b (%)	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
11	688.4909	491	1.2	C ₃₇ H ₇₀ NO ₈ P	-0.3	11.7	3.1	547 (100) ^j	PE (C16:1, C16:1)
12	702.5067	505	1.2	C ₃₈ H ₇₃ NO ₈ P	-0.5	3.5	78.9	561 (100) ^j	PE (C17:1, C16:0)
28	325.2688	412	1.1	C ₂₀ H ₃₇ O ₃	-0.8	4.2	-	Pas de MS/MS	-
32	132.1019	42	1.0	C ₆ H ₁₄ NO ₂	-2.4	0.7	6.5	-	-
33	663.5662	424	1.0	C ₄₀ H ₇₅ N ₂ O ₅	1.3	1.8	49.2	645 (2) ^c , 413 (13) ^d , 395 (46) ^e , 377 (46) ^f , 159 (5) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (34) ^g	OL (C18:1, C17:1)
34	676.4911	498	1.0	C ₃₆ H ₇₁ NO ₈ P	0.2	6.1	6.2	535 (100) ^h	PE (C16:1, C15:0)

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list. ^c[M + H - H₂O]⁺. ^d[M + H - RCOH]⁺. ^e[M + H - H₂O - RCOH]⁺. ^f[M + H - 2 H₂O - RCOH]⁺. ^gOther typical OL ion fragments. ^h[M + H - C₂H₈NO₄P]⁺.

Tableau 38 : List of the biomarkers (VIP score value > 1) identified by LC-HRMS as under-produced in planktonic Cu-treated (IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8 and not found in biofilms

VIP number	m/z	RT (s)	VIP value	Formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	I expl ^b (%)	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
16	413.3376	301	1.2	C ₂₄ H ₄₅ N ₂ O ₄	3.0	12.4	54.4	395 (3) ^c , 377 (5) ^d , 159 (1) ^e , 141 (3) ^f , 133 (7) ^g , 115 (100) ^g , 70 (54) ^g	LOL (C18:1)
17	621.5194	404	1.1	C ₃₇ H ₆₉ N ₂ O ₅	1.1	0.3	54.1	603 (2) ^c , 385 (11) ^d , 367 (38) ^e , 349 (37) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (28) ^g	OL (C16:1, C16:1)
18	597.5147	409	1.1	C ₃₅ H ₆₉ N ₂ O ₅	1.5	1.8	41.1	579 (2) ^c , 359 (8) ^d , 341 (29) ^e , 323 (32) ^f , 159 (3) ^g , 141 (2) ^g , 133 (4) ^g , 115 (100) ^g , 70 (26) ^g	OL (C14:0, C16:0)
19	677.5825	434	1.1	C ₄₁ H ₇₇ N ₂ O ₅	0.2	4.4	49.9	659 (3) ^c , 413 (18) ^d , 395 (68) ^e , 377 (68) ^f , 159 (5) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (27) ^g	OL (C18:1, C18:1)
24	595.5035	400	1.1	C ₄₀ H ₇₂ N ₂ O ₅	1.8	1.6	34.7	577 (2) ^c , 359 (6) ^d , 341 (21) ^e , 323 (23) ^f , 159 (4) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (38) ^g	OL (C14:0, C16:1)
25	311.2511	400	1.1	C ₁₉ H ₃₅ O ₃	1.3	12.8	22.3	-	-
30	625.5513	424	1.0	C ₃₇ H ₇₃ N ₂ O ₂	0.4	2.0	41.1	607 (2) ^c , 387 (11) ^d , 369 (41) ^e , 351 (44) ^f , 159 (6) ^g , 141 (3) ^g , 133 (5) ^g , 115 (100) ^g , 70 (24) ^g	OL (C16:0, C16:0)
36	329.2690	401	1.0	C ₁₉ H ₃₇ O ₄	3.1	4.3	48.2	-	-

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list; ^c[M + H - H₂O]⁺; ^d[M + H - RCOH]⁺; ^e[M + H - H₂O - RCOH]⁺; ^f[M + H - 2 H₂O - RCOH]⁺; ^gOther typical OL ion fragments.

Tableau 39 : List of the biomarkers (VIP score value > 1) identified by LC-HRMS as over-produced in biofilm Cu-treated cultures of *P. lipolytica* TC8 (whatever the copper concentration)

VIP number	m/z	RT (s)	VIP value	Formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	I expl ^b (%)	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
5	285.0848	123	1.3	C ₁₁ H ₉ N ₈ O ₂	-1.9	8.5	55	-	-
26	351.2473	411	1.0	C ₁₇ H ₃₁ N ₆ O ₂	-0.2	9.3	15.7	-	-
27	347.1042	114	1.0	C ₁₄ H ₂₁ NO ₇ S	-2.1	15.6	6.9	-	-

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list.

Tableau 40 : List of the biomarkers (VIP score value > 1) identified as over-produced in biofilm Cu-treated cultures of *P. lipolytica* TC8 (whatever the copper concentration) and common to planktonic Cu-treated (IC₂₅) samples

VIP number	<i>m/z</i>	RT (s)	VIP value	Formula	Mass Error (ppm)	$m\sigma^a$	I expl ^b (%)	MS/MS Fragment ions (relative abundance in %)	Putative identification
1	375.1455	202	1.7	C ₂₁ H ₁₉ N ₄ O ₃	0.6	6.6	37.3	-	-
2	391.1409	103	1.5	C ₂₁ H ₁₉ N ₄ O ₄	-1.5	1.3	54.0	-	-
4	229.0590	74	1.4	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₃	0.1	0.1	18.9	-	-
20	413.1216	106	1.1	C ₂₂ H ₂₁ O ₈	3.2	4.1	48.8	-	-
23	223.0690	62	1.1	C ₁₁ H ₁₉ N ₂ O ₃	-0.3	1.1	17.8	-	-
29	147.0557	74	1.0	C ₈ H ₇ N ₂ O	-3.1	6.8	84.0	-	-

^aConstructor statistical match factor obtained by comparison of the theoretical and observed isotopic pattern; ^bTotal intensity of the explained peaks with respect to the total intensity of all peaks in the fragment spectrum peak list.

As it was observed in the study of the planktonic cell response to copper, the presence of this metal at the highest concentration assayed (IC_{50}) led to the over-biosynthesis of PE compounds (VIP n°11, 12 and 34) and an ornithine lipid (OL) (VIP n°33) (Table 37). Concerning the metabolites identified as down-produced in planktonic Cu-treated (IC_{50}) cultures, almost all were OLs (VIP n°16 to 19, 24 and 30) and most of them (except VIP n°19) exhibited slightly shorter saturated or mono-unsaturated acyl chains than that of the OLs over-biosynthesized at the highest copper concentration (IC_{50}) (Table 38).

Thus, in presence of copper (IC_{50}), the increase of PEs synthesis (found to be more characteristic of *P. lipolytica* TC8 biofilm cells; Chapter V) by planktonic cells was associated with a global decrease of the synthesis of OLs (found to be characteristic of planktonic cells of *P. lipolytica* TC8) mostly identified with shorter acyl chains. These results supported the previous hypothesis that *P. lipolytica* TC8 defense against copper (IC_{50}) led the planktonic cells to switch to a metabolism closer to that of sessile lifestyle. This hypothesis was in accordance with a previous study on *P. aeruginosa* cells showing a slight increase of long chain PEs in sessile organisms as compared with their planktonic counterparts. The promotion of the synthesis of long chain lipids in biofilms can be related to an increase of the stability of the lipid bilayer by increasing lipid-lipid interactions and thereby reducing the membrane fluidity (Benamara et al., 2014). Such a modification of membrane composition in response to copper can be related to an increasing resistance capacity of bacteria at their interface with copper. Indeed, considering that the metal/bacteria interface is suggested to damage the cell envelope and then makes the cell susceptible to other damages (Mathews et al., 2013), an increase of the membrane stability could be one of the adaptive defense mechanisms against copper. However, differences in acyl chain lengths of the identified lipids (over- or down-biosynthesized) were here not sufficient to conclude on the modification of the membrane stability of cells under copper stress.

The present metabolomics study highlighted some lipid classes which were significantly differentially synthesized in presence of copper. The increase of PE shown for planktonic Cu-treated IC_{50} cells allowed to assume that copper stress promoted a metabolic shift of free-living cells towards a putative biofilm state. The difference between the metabolic profiles of planktonic and biofilm Cu-treated (IC_{50}) cells could be perhaps explained by the co-occurrence of free-living stressed cells and biofilm-forming cells in the Cu-treated planktonic cultures.

More broadly, this metabolomic study demonstrated the differential metabolic response to a copper stress of planktonic and biofilm cells of *P. lipolytica* TC8. A significant metabolic shift could be the result

of changes in gene expression or in regulation of transcript levels. In order to study the copper effect at the protein level, a quantitative proteomic analysis was then performed on *P. lipolytica* TC8 cultures.

VI.2.3.3. Proteome analysis in response to copper stress

Quantitative proteomic approaches were applied to study and compare the responses to copper stress of *P. lipolytica* TC8 as well in planktonic as in biofilm cultures. In both cases, cells were grown in the same medium (VNSS) in absence/presence of a same single sublethal copper concentration of 700 μ M, chosen as the IC₅₀ in this medium and corresponding to the EC₅₀ determined in the adhesion test in ASW (see Table 30, Figures 71 and 73) for 7h and 48h respectively.

Proteome quantification and profiling

Proteins were extracted from biological replicates of *P. lipolytica* TC8 cultivated in planktonic (Pl) and biofilm (Bf) modes either in absence (as control, Ctrl), or in presence of copper added to the culture (Cu-treated). For each of the four culture conditions, three sample replicates were obtained and analyzed for proteome profiling under the names of Pl/Bf Ctrl and Pl/Bf Cu-treated. This revealed a total of 2 114 proteins identified in the whole cell lysates. Of this set of proteins, 1 796 (almost 85%) were identified with at least two unique peptides, and among them 1 606 with three or more unique peptides. The whole proteome identified for the strain *P. lipolytica* TC8 was relatively compact (approximately 53%) compared to the complete set of proteins encoded by the sequenced *P. lipolytica* SCSIO 04301 strain and provided by UniProt (3 974 protein encoding genes) (Zeng et al., 2014). When considering only proteins identified in all replicates of each culture condition, we found roughly the same number with slightly more than 1 600 proteins per culture condition (Table 41). The proteins common to the three replicates have only been considered for the subsequent analyses.

Tableau 41 : Summary of the number of proteins identified in each culture condition of *P. lipolytica* TC8 and up- or down-regulated under copper stress

Culture condition		Number of identified proteins ^a	Up-regulated proteins ^b	Down-regulated proteins ^b
Planktonic	Ctrl	1 643		
	Cu-treated	1 609	56	61
Biofilm	Ctrl	1 649		
	Cu-treated	1 662	245	252

^aProteins identified in all 3 replicates of each culture condition; ^bUp- or down-regulated by at least 2-fold, with *p*-values smaller than 0.01.

The majority of them (1 395, *i.e.* ~75%) were shared by the four culture conditions (Figure 82). The Venn diagram presented herein revealed also that 81 (4.3%) proteins were only observed only in the absence of copper while 137 (7.3%) proteins were only observed the copper-treated cultures (planktonic and/or biofilm ones).

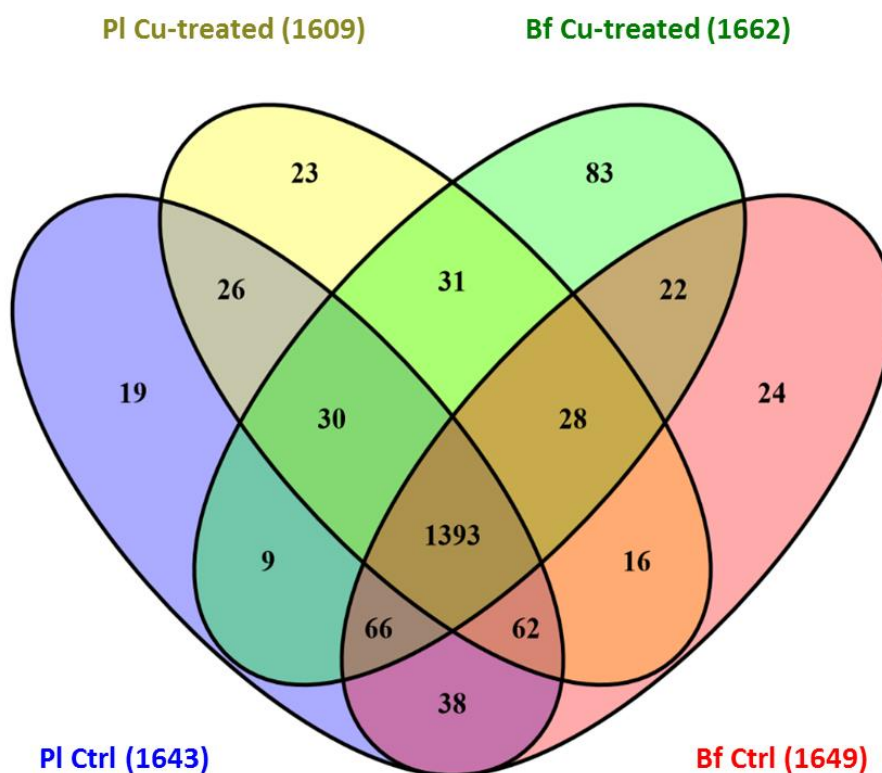


Figure 82: Venn diagram representing proteins identified in the three sample replicates of each culture condition of *P. lipolytica* TC8 (PI: planktonic, Bf: biofilm, Ctrl: control)

A total of fifty-six proteins were identified up-regulated and sixty-one were down-regulated in planktonic lifestyle in response to copper exposure (Table 41). Around 4-fold more proteins were identified as up- or down-regulated in biofilms (245 and 252, respectively). An advantage in this study came from the large number of proteins identified as significantly differentially expressed under copper treatment. This was particularly the case in biofilms (around 500 proteins, *i.e.* ~30%), even with the following restrictive criteria, fold change > 2 and *p*-value < 0.01 (using the Student's *t*-test). Volcano plots were then used to visualize proteins categorized as up- or down-regulated based on the 2-fold change (FC) threshold, and to display their statistical significance based on the *t*-test with peptide-level replicates (x-axis = \log_2 FC (Cu-treated/Ctrl), y-axis = $-\log_{10}$ *p*-value; Figure 83).

All these significantly differentially expressed proteins by at least a 2-fold change are listed in Annex I, Table AIII.2 and AIII.3 for biofilm and planktonic proteomes, respectively. The highest fold change range was exhibited in biofilm culture with values from -131 to +438 since the maximal fold change in planktonic culture condition was limited to +64. The top identified proteins with the highest fold changes in over- or under-expression (more than 10-fold change) were listed in Table 42.

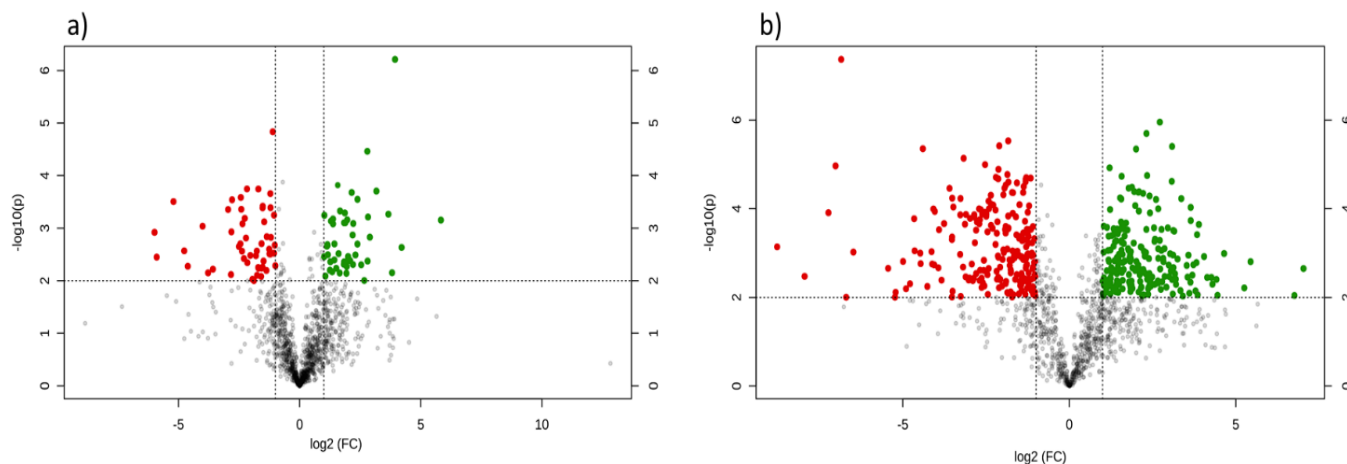


Figure 83: Volcano plots representing changes in protein expression with the fold change (x-axis) against $\log_2 p$ -value (y-axis) of all quantified proteins in a) planktonic and b) biofilm cultures of *P. lipolytica* TC8; up- and down-regulated proteins are colored in red and green, respectively

To identify common and specific proteins (between planktonic and biofilm cells) involved in copper response and differentially expressed, a Venn diagram was generated (Figure 84). The resulting distribution showed twenty-one common up-regulated proteins while eighteen proteins were commonly down-regulated. The influence of the culture mode could be analyzed by the fold change values in the expression of these proteins which were listed in Annex III, Table AIII.4 with, for each protein, its molecular weight (MW) and the ratio of its abundance in copper-treated *versus* untreated cultures.

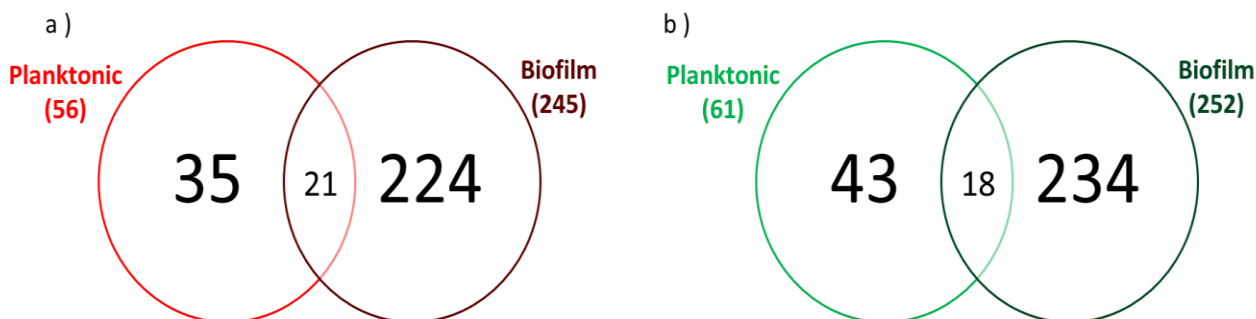


Figure 84: Venn diagrams representing the proteins a) up-regulated and b) down-regulated under copper exposure in planktonic and biofilm cultures of *P. lipolytica* TC8

Tableau 42 : Subset of proteins differentially expressed in response to copper exposure in a) planktonic and b) biofilm cultures of *P. lipolytica* TC8^a

a)				
Protein ID ^B	Protein name	Mol. weight [kDa]	Fold change Cu-treated/Ctrl	p-value
Z5XP59	RNA polymerase sigma factor RpoS	37.5	+64.5	0.0012
Z5XPD5	Fis family transcriptional regulator	11.0	+60.7	0.0036
Z5XN79	Hemolysin D	54.1	+36.9	0.0003
Z5XQ22	Transporter	48.8	+27.2	0.0027
Z5XLV1	Uncharacterized protein	17.8	+24.5	0.0053
Z5XLJ3	Copper resistance protein CopA	67.6	+16.1	0.0009
Z5XT64	tRNA 2-thiocytidine biosynthesis protein TtcA	34.2	+13.7	0.0071
Z5XQ57	Flagellar hook-length control protein Flg	79.2	-11.9	0.0060
Z5XTF3	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	66.5	-12.7	0.0005
Z5XSX1	TonB-dependent receptor	79.2	-14.1	0.0071
Z5XTE1	Acetylglutamate kinase	27.0	-15.3	0.0000
Z5XR01	Ribonucleotide reductase subunit alpha	13.6	-18.5	0.0023
Z5XSH2	Peptidase S8	74.7	-56.9	0.0007

b)				
Z5XVI2	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	50.3	438.3	0.0007
A0A0P7E5B7	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	70.8	247.4	0.0034
Z5XQ57	Flagellar hook-length control protein Flg	79.2	150.6	0.0001
Z5XKK6	Glyoxalase	16.1	129.9	0.0000
Z5XQF9	Uncharacterized protein	19.1	115.5	0.0000
Z5XQ22	Transporter	48.8	104.1	0.0099
Z5XNW4	Copper resistance protein CopC	15.1	89.6	0.0010
Z5XTP5	Cell division protein FtsZ	42.9	43.5	0.0022
Z5XMG6	Pilus assembly protein PilM	39.2	37.7	0.0099
Z5XN79	Hemolysin D	54.0	37.2	0.0077
Z5XMF1	RND transporter	41.6	31.9	0.0015
Z5XT39	30S ribosomal protein S20	9.5	29.9	0.0064
Z5XUW8	Membrane protein	26.4	27.6	0.0049
Z5XLV2	Transporter	20.2	25.3	0.0002
Z5XSD9	UPF0276 protein	32.3	25.0	0.0009
Z5XM32	Isocitrate lyase	59.4	22.3	0.0010
Z5XPK6	Transporter	42.1	22.1	0.0017
Z5XLV1	Uncharacterized protein	17.81	21.1	0.0000
Z5XQ55	Uncharacterized protein	9.96	19.2	0.0057
Z5XP26	Nitrate reductase	140.29	17.6	0.0009
Z5XN71	Phosphate transport regulator	26.04	17.4	0.0018
Z5XLJ3	Copper resistance protein CopA	67.56	16.9	0.0001
Z5XPFO	Energy transducer TonB	27.93	16.7	0.0018
Z5XSH7	Flagellar P-ring protein	38.24	16.4	0.0001
Z5XY20	Uncharacterized protein	10.58	15.3	0.0022

Réponse de *P. lipolytica* à un stress cuprique

Z5XPK0	Transcriptional regulator MraZ	17.68	15.1	0.0003
A0A0P7DX95	Hemolysin D	40.90	14.3	0.0041
Z5XSY6	Nucleoid-associated protein AOG27_03100	12.00	13.6	0.0002
Z5XL47	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	49.94	12.1	0.0000
Z5XQ66	Uncharacterized protein	27.09	11.5	0.0005
Z5XT07	Uncharacterized protein	17.20	11.5	0.0098
Z5XL96	Peptidase	77.78	11.5	0.0004
Z5XS22	Alkyl hydroperoxide reductase	21.05	11.4	0.0001
Z5XLL2	Uncharacterized protein	17.95	11.4	0.0073
Z5XSC5	Transcriptional regulator	25.83	11.2	0.0001
Z5XLS9	Ribonuclease P protein component	16.24	10.5	0.0028
A0A0P7E5L0	FMN reductase	17.90	10.5	0.0000
Z5XUB1	Flagellar L-ring protein	24.55	10.2	0.0001
Z5XV11	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	34.73	-10.1	0.0070
Z5XWB7	Sporulation control protein Spo0M	27.76	-10.3	0.0001
Z5XKN9	Thioesterase	14.99	-10.6	0.0093
Z5XWL0	Aspartate carbamoyltransferase	37.68	-11.5	0.0019
Z5XVPO	Uncharacterized protein	97.69	-11.7	0.0035
Z5XN07	NADP-binding protein	28.56	-11.9	0.0011
Z5XRN8	Glycogen operon protein GlgX homolog	77.06	-12.2	0.0081
Z5XTE3	SAM-dependent methyltransferase	25.28	-12.5	0.0046
Z5XRV9	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase	31.95	-12.5	0.0001
Z5XM85	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	22.82	-12.5	0.0002
A0A0P7DZD4	5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	24.91	-13.0	0.0031
Z5XP65	Uncharacterized protein	18.51	-13.2	0.0018
Z5XQQ8	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	35.31	-13.8	0.0072
Z5XLY3	Gluconolactonase	31.15	-14.1	0.0016
Z5XMB2	Carbon-nitrogen hydrolase	29.04	-14.3	0.0004
Z5XZ25	Riboflavin biosynthesis protein	34.13	-14.5	0.0088
Z5XKS0	Methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	22.57	-14.5	0.0085
Z5XMQ9	LOG family protein	50.01	-14.8	0.0002
Z5XMZ0	Metallo- β -lactamase	82.44	-16.5	0.0012
Z5XRL9	Diguanylate phosphodiesterase	82.34	-17.6	0.0036
Z5XT52	Uncharacterized protein	17.01	-19.3	0.0036
Z5XSF7	Chemotaxis protein CheC	37.1	-19.7	0.0051
Z5XWG2	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	42.5	-21.4	0.0039
Z5XTI5	S-formylglutathione hydrolase	31.1	-21.9	0.0090
Z5XPB5	Arginase	38.6	-25.1	0.0010
Z5XR10	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	49.4	-38.2	0.0061
A0A0P7D8Y1	TonB-dependent receptor	78.9	-43.6	0.0016
Z5XMU1	Glycogen synthase	57.0	-108.5	0.0091
Z5XSX1	TonB-dependent receptor	79.2	-131.1	0.0022

^aProteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed with an absolute fold change greater than 10, ^bAccording to Uniprot ID.

Functional annotation of proteins

The predicted global proteome was composed of a total of around 16% (335 out of 2 114) proteins with unknown function. Among the differentially expressed proteins, 11.5% (57) expressed with a significantly modified abundance in biofilms exposed to copper, and 10.3% (12) in planktonic cultures, could not be assigned any function. The bioinformatics analysis of the identified and functionally assigned proteins was performed on all differentially expressed proteins by more than 2-fold in response to copper (p -value < 0.01). This allowed to cluster the proteins in functional categories based on the Gene Ontology (GO) database (Figure 85). Proteins from each cell culture condition belonged to over ten functional categories. When comparing on the one hand, biological process profiles and, on the other hand, molecular function profiles of planktonic and biofilm proteomes, they showed a highly similar GO distribution. Genes influenced by copper in both culture modes were highly correlated to metabolic and cellular processes with about 65% of the total proteins identified. Most of them were related to catalytic activities and binding.

In this context, a more detailed analysis revealed that the presence of copper in the culture medium modulated the abundance of specific proteins functionally involved in copper cell homeostasis in both planktonic and biofilm modes. In Gram-negative bacteria, many membrane-embedded transporters (traversing either one membrane or both inner and outer membranes) participate in metal translocation across cell layers. They include ion gradient- (like H⁺ gradient-) and ATP-driven transport systems belonging to four superfamilies. While ATP-binding cassette (ABC) transporters mediate the accumulation of specific metal ions in the cytosol of bacterial cells, the export (efflux) of these metal ions is largely carried out by P-type ATPases, resistance-nodulation-cell division (RND) transporters and cation diffusion facilitators (CDFs) (Figure 86) (Klein and Lewinson, 2011; Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013). Proteins of the first three superfamilies cited above have been identified among the differentially expressed proteins by *P. lipolytica* TC8 in response to copper exposure. Among all these various related different types of copper transport proteins, the most ubiquitous ones in bacteria are copper exporting P-type ATPase (Klein and Lewinson, 2011). The major P-type ATPase copper exporter is the cytoplasmic CopA efflux pump which exports the excess of copper from the cytoplasm to the periplasm (Figure 86). Such a transporter was identified (Z5XLJ3) and was similarly up-regulated in both planktonic and biofilm Cu-treated cells with a fold-change around 16-17 (p -value<0.01) (Table 42). Two other related copper-binding proteins, CopB (Z5XN39) and CopC (Z5XNW4) were also identified. The outer membrane CopB, which has putative roles in copper translocation, was only present in all the replicates of biofilm Cu-treated cultures (Annex III, Table AIII.2). This explained why the over-

expression of this protein did not appear in the results of Cu-treated vs Ctrl proteomes (p -values >0.05). The periplasmic CopC was commonly found as an over-expressed protein in both planktonic and biofilm Cu-treated cells with high fold changes of +161 (p -value < 0.05) and +90 (p -value < 0.01) (Table 42), respectively. This protein either sequesters the metal or traffics it to copper-binding proteins (e.g. CopD located in the inner membrane, not identified here) or to the extracellular space via a RND-family copper efflux system (Ma et al., 2009).

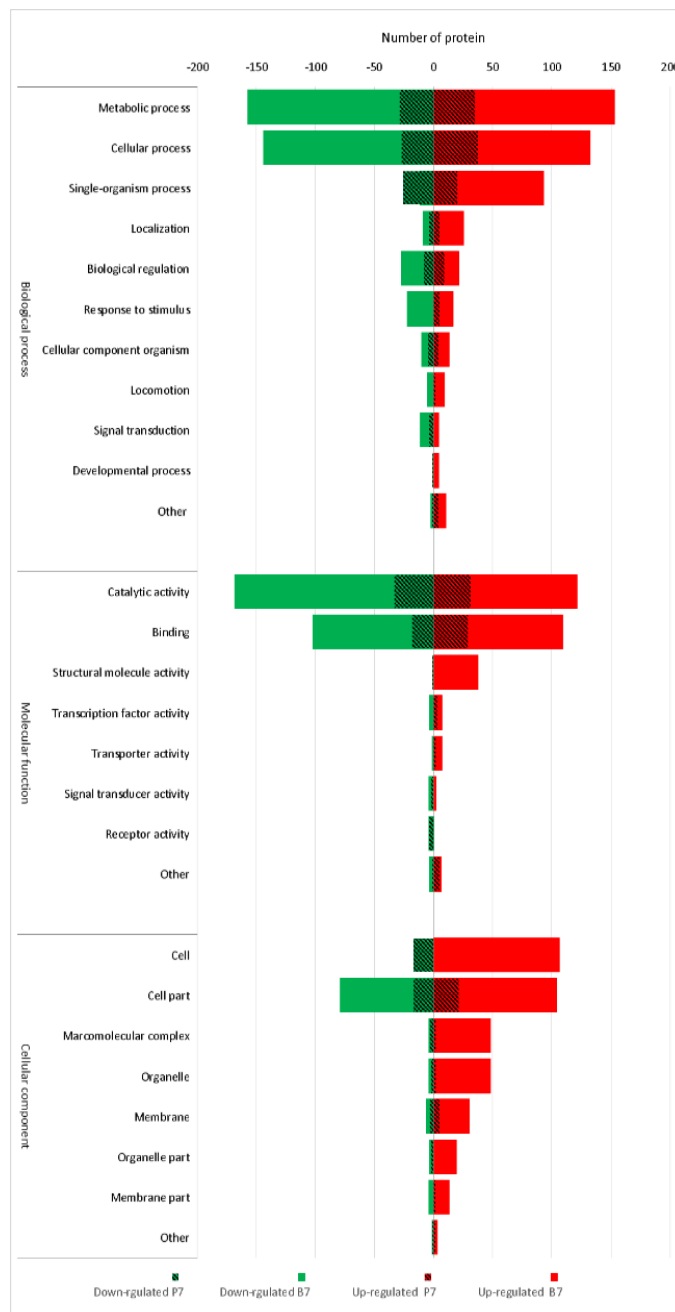


Figure 85: Function classification (based on gene ontology) of significantly up- and down-regulated proteins in *P. lipolytica* TC8 biofilm and planktonic cells under copper exposure

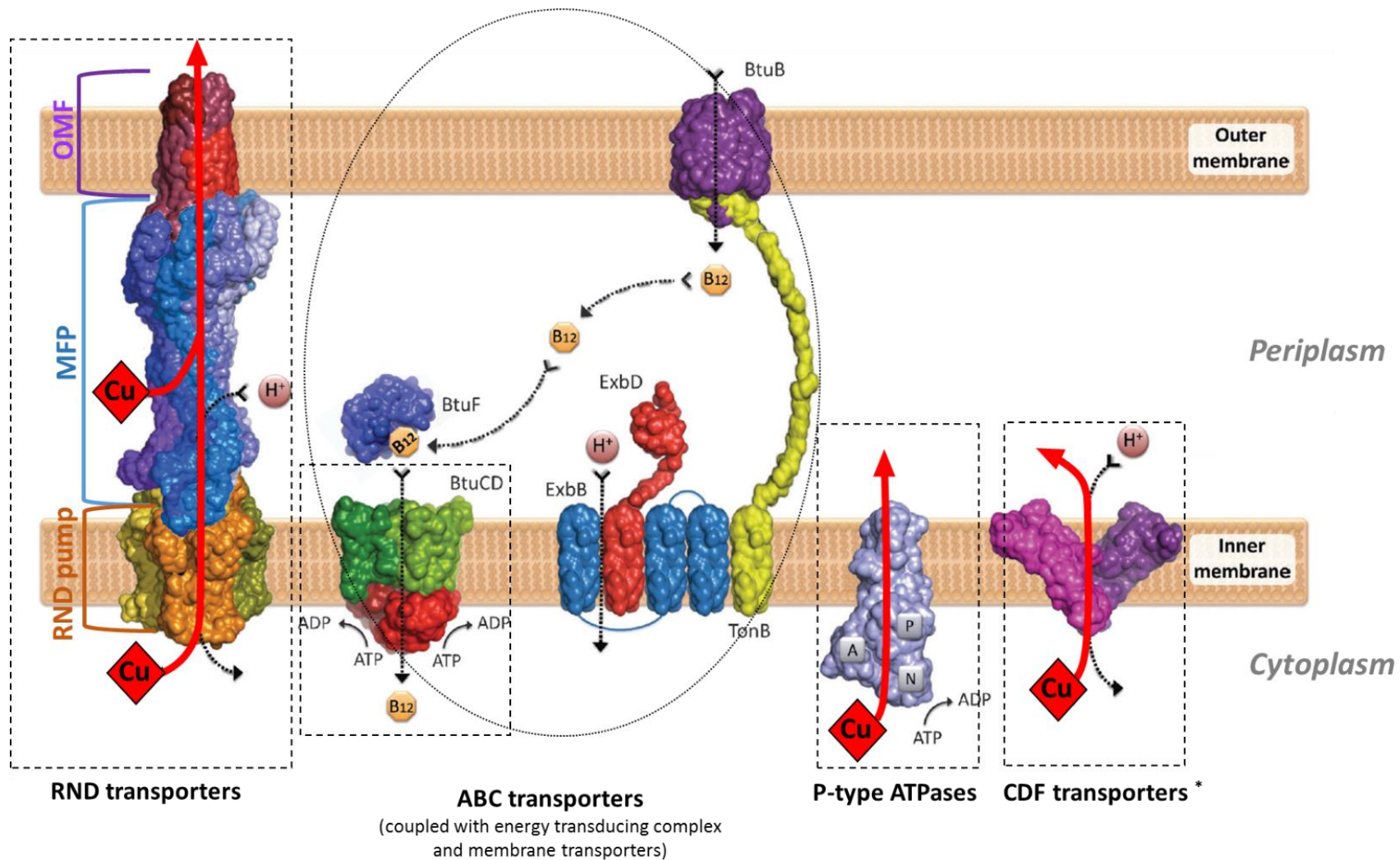


Figure 86: Different transporter types participating in transition copper (and metal in general) translocation in Gram-negative bacteria (Figure of Klein and Lewinson (2011) slightly modified (Klein and Lewinson, 2011; Bondarczuk and Piotrowska-Seget, 2013) (*not identified in this study)

The RND superfamily includes Gram-negative bacterial efflux transporters of different substrates, such as heavy metals, hydrophobic drugs or lipopolysaccharides (Zgurskaya and Nikaido, 2000). They are essential to the multi-drug resistance observed in many pathogens and are typically assembled as tripartite efflux complexes ions (Delmar et al., 2014). Hence, RND (resistance-nodulation-cell division)-type efflux system can also, like P-type ATPase, be involved in copper detoxification by having a specificity for heavy metals and carrying out their export. But variously, the assembled subunits of this system span the cellular envelope from the cytoplasmic membrane across the periplasm to the outer membrane, which allows copper translocation to the cell exterior, and not to the periplasm. Moreover, the RND transport system is coupled to a different energy source, as it depends on energetically favorable transfer of protons or other ions (Figure 86). Five RND transporters were herein identified (Z5XMF1, Z5XPZ1, A0A0P7E415, Z5XWK7 and Z5XKM1) under this name or as cation transporter. Two of them were up-regulated in both planktonic and biofilm cells. Z5XMF1 was quantified with a fold change of +32 in biofilm Cu-treated vs untreated (control) cultures while its ratio was about 2-fold lower in planktonic Cu-treated cells (fold change +17; *p*-value 0.0106). Z5XPZ1 displayed similar fold changes of about +5 in both biofilm and planktonic cells (Table 42 and Annex III, Table AIII.2 and Table AIII.3). In Gram-negative bacteria, the tripartite organization of RND transporters is shared by the majority of multidrug transporters. The assembled complex includes a transporter, often referred to as the RND “pump” protein and located in the inner membrane, an adapter protein, often referred to as the membrane fusion protein (MFP) and an outer membrane protein (OMF) (Figure 86) (Misra and Bavro, 2009). In the well-known CusCBA efflux system found in *E. coli* and conferring resistance to copper and silver ions, a fourth component of a tetrapartite system is a periplasmic metallochaperone (CusF, 10 kDa). This copper-binding protein may play a dual protective role by removing the excess of copper from the periplasm by sequestration and by delivering this metal to CusCBA, thus enhancing its export (Franke et al., 2003; Jung et al., 2015). Here, a copper chaperone (A0A0P7DXF0) and an outer membrane channel protein TolC (Z5XTK0) were identified. The last one was up-regulated in biofilm Cu-treated cells (fold change +2.2; *p*-value 0.0255). Their presence complete the report of efflux proteins referenced as RND transporters. It has to be noted that TolC could also be associated with other efflux pumps. Indeed, TolC, the most widely studied OMF from *E. coli*, is known to be a RND efflux transporter component. But, as an outer membrane component of Gram-negative efflux systems (OMF), TolC is interchangeable between different systems and can thus function with different pumps as in the case of the HlyBD-TolC efflux system (Figure 87). This hemolysin export system is known to secrete hemolysin A by a type I system across both membranes of *E. coli* and consists of the inner membrane ATPase hemolysin B (HlyB) and the MFP hemolysin D (HlyD) (Thanabalu et al., 1998; Zgurskaya and

Nikaido, 2000). So, TolC could also belong to this other trimeric efflux complex in *P. lipolytica* TC8. This was consistent with our results showing the presence of hemolysin D (Z5XN79) which was equally over-expressed in both planktonic and biofilm proteomes under copper treatment (fold change of +37 in each condition) (Table 42). Other hemolysin D proteins were identified (Z5XT90, Z5XRN0 and A0A0P7DX95). The last one was overexpressed in biofilm Cu-treated cultures (Table 42).

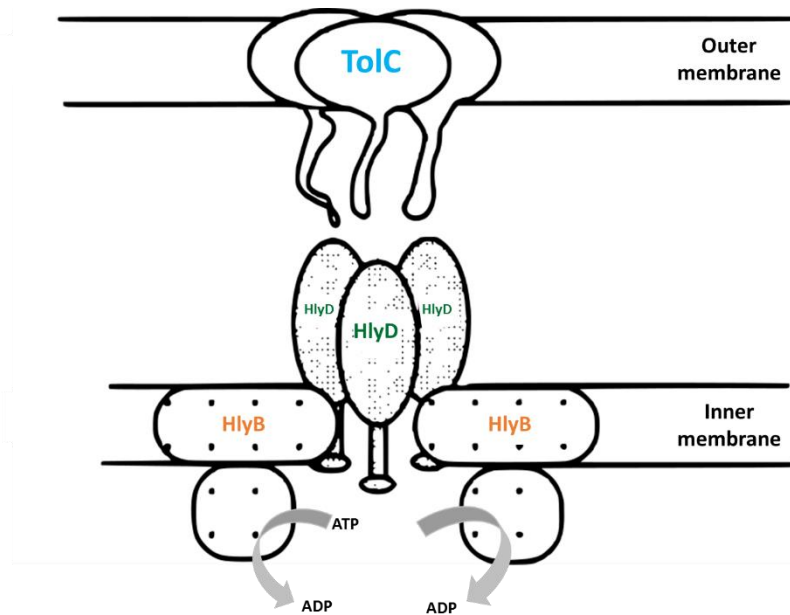


Figure 87: Hemolysin export system: HlyBD-TolC efflux system (Thanabalu et al, 1998)

Through this identification of P-type ATPase proteins (CopA) and RND transporters (subject to heavy metal specificity), the major copper efflux systems have been highlighted in *P. lipolytica* TC8 proteome. As indicated above, copper translocation involves also influx mechanisms, such as that driven by periplasmic binding ABC transporters. These proteins are, like P-type ATPase transporters, embedded in the inner membrane and use the energy of ATP hydrolysis on the cytoplasmic side. To drive metal influx from the cell exterior to the cytosol, ABC transporters partner with proteins including a periplasm-spanning complex composed of TonB, ExbB, and ExbD (Figure 86). This family of three cytoplasmic membrane proteins has been termed TonB-dependent receptors. Here, various ATP-binding cassette (ABC) transporters playing different roles have been identified (Z5XVV6, Iron ABC transporter substrate-binding protein; Z5XSK7, ABC transporter ATP-binding protein; Z5XV11, Amino

acid ABC transporter substrate-binding protein; Z5XSK4, Phosphate ABC transporter substrate-binding protein). These transporters were all significantly down-regulated in biofilm Cu-treated proteomes.

Moreover, two systems of functionally associated proteins were identified as TonB-dependent outer membrane receptors (Z5XSX1 and A0A0P7D8Y1). Z5XSX1 was the most down-regulated protein in biofilm Cu-treated proteomes (fold change -131) while the fold change between planktonic Cu-treated and control proteomes was lower (fold change-14). A0A0P7D8Y1, a TonB-dependent receptor expressed in biofilm control cultures but not under copper conditions, was also highly under-expressed (fold change -44). As expected in this study, while copper efflux system proteins were determined as up-regulated, the corresponding influx proteins were down-regulated. As part of TonB-dependent receptors, an ExbD protein was also identified (Z5XWD3) in Cu-treated biofilm without any significant differential expression (Annex III Table AIII.2).

Looking more widely at the differentially expressed proteins under copper treatment, we identified in biofilm culture conditions a succinate semi-aldehyde dehydrogenase (Z5XVI2) with the highest differential expression (fold-change Cu-treated/Ctrl of +438). This enzyme was also detected in planktonic cell proteomes but with a much lower up-regulation rate in the presence of copper (fold change +2.4; *p*-value 0.031). Another same function protein (Z5XKL5) was identified with similar fold changes (around +2.3) in planktonic and biofilm Cu-treated proteomes (*vs* Ctrl). One would expect an oxidoreductase activity of this enzyme and thus a protection against oxidative stress. Two other oxidoreductase enzymes, a glyoxalase (Z5XKK6) and a nitrate reductase (Z5XP26), were also over-expressed in Cu-treated biofilms (Table 42). The following highest differentially over-expressed protein in sessile cells was identified as an ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH (A0A0P7E5B7, +247-fold). This cytoplasmic membrane-bound protease has been shown to be essential for the viability of bacterial cells through various functions, including a regulatory role in stress response (Srinivasan et al., 2008). In addition, when now considering the copper effect on planktonic proteomes, we identified a RNA polymerase sigma factor RpoS with the highest differential expression (fold change Cu-treated/Ctrl of +63.50). This sigma factor is induced as cells enter the stationary phase of growth and is primarily involved in the regulation of stress response systems necessary for their survival under hunger conditions (Franchini et al., 2015). Identification of RpoS in planktonic proteomes (all replicates concerned) was thus in accordance with the stationary growth phase state of cultures when stopped for the proteomics analysis and its overexpression in planktonic Cu-treated samples could be induced by the presence of copper. A second transcription factor regulator was overexpressed in Cu-treated planktonic cultures and belonged to the Fis family transcriptional regulator (Z5XPD5). In a wider view

of all the proteins differentially expressed in both culture modes in response to copper treatment, we found several proteins involved in transport, transcription, translation, amino acids metabolism, motility and cell division. Booth et al, whose metabolomic analyses of *Pseudomonas fluorescens* was mainly conducted on polar compounds, found also that the amino acid metabolism was affected in presence of copper in planktonic and biofilm cells (Booth et al. 2011). They suggested, for planktonic cells, a link with an increased protein synthesis in order to replace damaged proteins and to synthesize stress proteins. In biofilm, it may be related to an increase of secreted proteins as components of the biofilm matrix.

Multivariate analysis on the proteome data

To have an additional view on key proteins than through the sole analysis of their fold change values, LC-MS data of the significantly regulated proteins in biofilm and planktonic (up- or down-expressed by at least 2-fold change with a p -value lower than 0.01) were exported into Simca 13.0.3 software for statistical multivariate analysis. The score plot of the resulting PCA (Figure 88a) showed a clear distinction along the first component between the proteomes of bacteria treated or untreated with copper. This distinction explained 59.7% of the total variance within the dataset. The second component allowed the discrimination of samples according to the culture mode and explained 18.2% of the total variance. A supervised discriminant analysis PLS was then constructed assigning two groups of samples (Ctrl vs Cu-treated) (Table 43). Clustering was performed using HCA (Hierarchical Cluster Analysis) where each of the four components of the PLS-DA was weighted with its eigenvalue (Figure 88b). The model allowed the discrimination of samples obtained from the four culture conditions. Tendencies observed with this model based on the proteomic data were very different than those observed during the metabolomic study. Indeed, while in metabolomics the higher discrimination was observed between planktonic and biofilm samples whatever the copper concentration, the contrary was observed in proteomics since the predominance of the copper effect beside the culture mode was shown. Nevertheless, the main discrimination observed between biofilm Cu-treated cultures and the two other classes of samples has to be noticed. This reinforced the notion that biofilm and planktonic states respond quite differently to antimicrobial stresses such as metal ions (Harrison et al. 2004; Booth et al. 2011).

Orthogonal projections to latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA) were then generated (model (1), not shown) with the aim to maximize the variation between control and Cu-treated cultures. This allowed to minimize variations between samples of one condition and thus to highlight

differences between the two culture modes. The 200 proteins with a VIP score value higher than one were only taken into account to build model (2). Quality parameters of these two OPLS-DA models were summarized in Table 43. The resulting biplot (Figure 88c) showed the distribution of these 200 variables in the samples. It highlighted differences in their expression level according to the presence or absence of copper but also the differential response of planktonic or biofilm cells. The most discriminative proteins were identified using a sigmoid-plot (Figure 88d). In this representation, the loading plot of each protein was displayed combining covariance and correlation coefficients. To be more selective, the twenty more discriminant proteins of model (2) were selected (represented in color in Figure 88d, orange in Figure 88c and listed in Table 44).

Tableau 43 : Summary of the parameters for the assessment of quality and validity of the PLS- and OPLS-DA models used for the discrimination planktonic and biofilm control and Cu-treated cultures of *P. lipolytica* TC8

	Models	N° ^a	R ² X _{cum} ^b	R ² Y _{cum} ^c	Q ² Y _{cum} ^d	R _{intercept} ^e	Q _{intercept} ^e	P ^f
PLS-DA	2 classes	4	0.748	0.988	0.980	0.294	-0.324	< 0.001
OPLS-DA Model (1)	2 classes	1+2+0	0.899	0.995	0.988	-	-	< 0.001
OPLS-DA Model (2)	2 classes	1+2+0	0.926	0.996	0.991	-	-	

^aNumber of components of the model; ^bCumulative modeled variation in X matrix; ^cCumulative modeled variation in Y matrix; ^dCumulative predicted variation in Y matrix; ^eR and Q intercepts obtained after permutation test ($n = 150$); ^f p value obtained from 7-fold cross validation ANOVA of PLS-DA.

Tableau 44 : List of the most significant proteins (VIP score value > 1.5) up- or down-regulated when biofilm and planktonic cultures of *P. lipolytica* TC8 were Cu-treated

VIP number	Protein ID ^a	Protein name	Mol. weight [kDa]	Fold Change Bf Cu-treated/ Bf Ctrl	Fold Change Pl Cu-treated/ Pl Ctrl
1	Z5XLV1	Uncharacterized protein	17.8	21.1	24.5
2	Z5XLJ3	Copper resistance protein CopA	67.6	16.9	16.1
3	Z5XR77	Argininosuccinate synthase	43.6	-5.0	-11.1
4	Z5XMZ8	ATP synthase subunit beta	49.7	5.8	2.3
5	Z5XNW4	Copper resistance protein CopC	15.1	89.6	161.0
6	Z5XQI4	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	76.2	21.1	24.5
7	Z5XM39	60 kDa chaperonin	57.3	6.1	2.7
8	AOA0P7EE38	Flagellin	33.5	-2.4	-4.3
9	Z5XN54	Trigger factor	47.7	5.3	1.6
10	Z5XQ72	50S ribosomal protein L1	24.8	6.3	1.6
11	Z5XP56	Long-chain fatty acid--CoA ligase	79.7	6.4	1.5
12	Z5XYN4	CTP synthase	60.2	-8.3	-1.7
13	Z5XKE6	Alkyl hydroperoxide reductase	22.6	3.3	7.7
14	Z5XKT4	50S ribosomal protein L5	20.2	7.1	1.4
15	Z5XW52	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	16.1	9.0	1.8
16	Z5XN71	Phosphate transport regulator	26.0	17.4	1.6
17	Z5XSH6	Protein GrpE	22.6	5.8	2.1
18	Z5XL47	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU	49.9	12.1	4.2
19	Z5XKY3	50S ribosomal protein L2	29.9	5.1	1.7
20	AOA0P7DQX9	Flagellin	33.5	-1.8	-3.7

^aAccording to Uniprot ID.

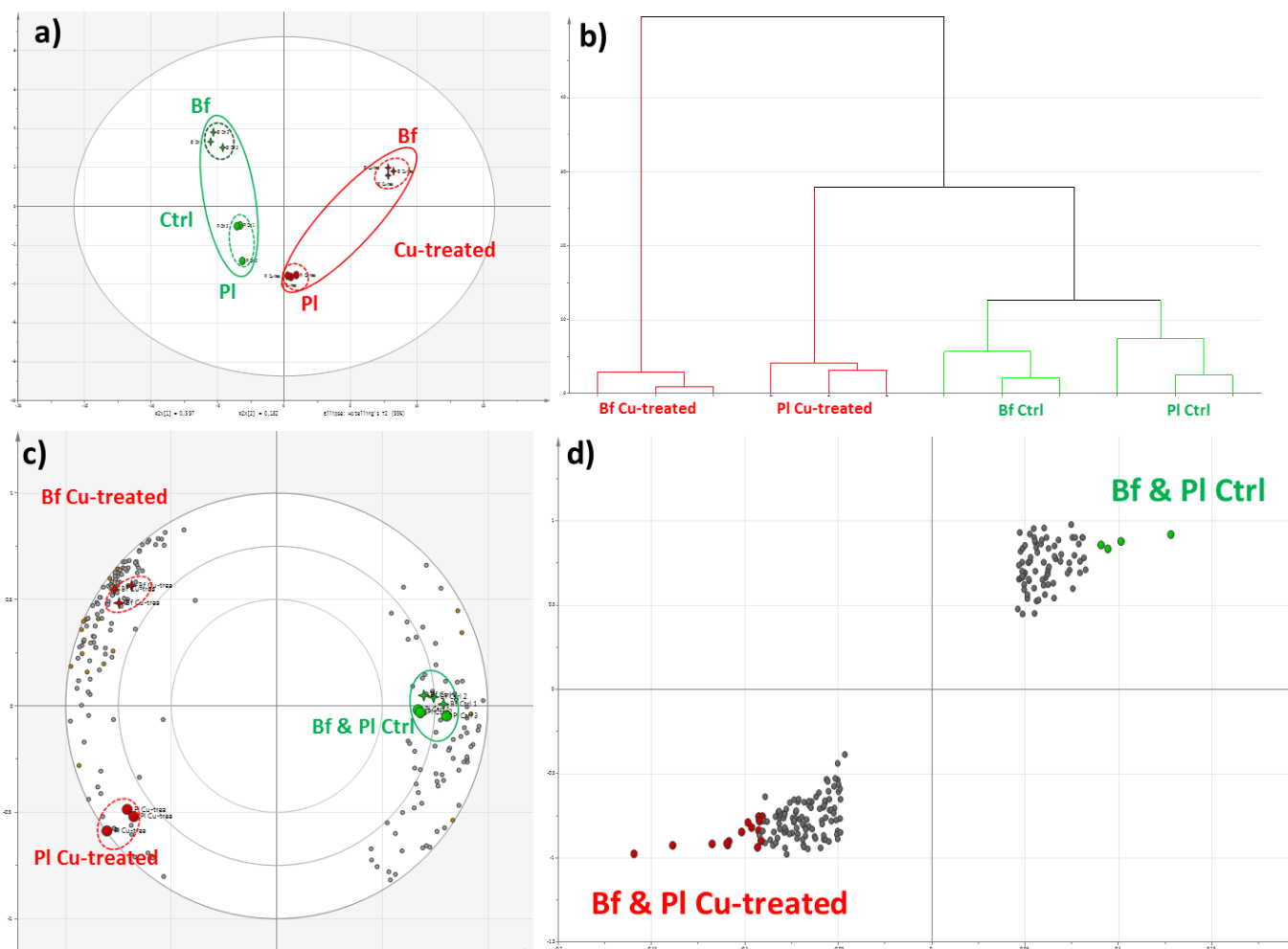


Figure 88: a) PCA score plot, b) HCA based on PLS-DA, c) bi-plot representing distribution of the 200 VIP > 1 of OPLS-DA and d) S-plot representing distribution of the 200 VIP > 1 of OPLS-DA based on LC-HRMS protein data of planktonic (PI) (●) and biofilm (Bf) (†) control (Ctrl) and Cu-treated (IC₂₅ and IC₅₀) cultures of *P. lipolytica* TC8

When now considering the most discriminative proteins identified using sigmoid-plot (Figure 88d and Table 44), it appears firstly that copper effect was the same in terms of up- or down-regulation of a given discriminative protein in both biofilm and planktonic proteomes. Among the twenty first VIP, only four corresponded to down-regulated proteins, all others being up-regulated in response to copper treatment. Among the last ones, copper resistance proteins, CopA and CopC previously mentioned and specific of cell response to copper, have been recovered (VIP n°2 and n°5, respectively). Moreover, an argininosuccinate synthase (Z5XR77, VIP n°3) was revealed. This enzyme, involved in arginine biosynthesis from citrulline and aspartate in the urea cycle, was down-regulated in biofilm (fold change -5) and planktonic (fold change -11) samples under copper treatment. This result was in agreement with a previous study on *Bacillus subtilis* which shows such a strongly down-regulation of arginine biosynthesis during copper stress (Chillappagari et al., 2010). Two other proteins linked to arginine metabolism, but specifically involved in arginine catabolism, have been also identified, an arginine decarboxylase (Z5XKU5) and an arginase (Z5XPB5). As the argininosuccinate synthase, both were found in the three replicates of each of the four conditions (PI- and Bf- Ctrl and Cu-treated). They were significantly (p -value<0.01) down-regulated in biofilm Cu-treated samples compared to controls (fold change -2.7 and -25, respectively). Arginase seemed to be also down-regulated (fold change -3.5; p -value=0.20) in planktonic Cu-treated samples with finally the highest expression in planktonic controls. Arginase producing ornithine (and urea) from arginine (Cunin et al., 1986), these results could explain a modulation in ornithine expression, and thus in ornithine lipids biosynthesis. These compounds were recognized as metabolomics biomarkers in planktonic controls. Thus, more broadly, all the identified proteins involved in arginine metabolism and including the argininosuccinate synthase pointed out by sigmoid-plot analysis, could play a role in regulation of the synthesis of the metabolomics biomarkers identified as OLs. This hypothesis would require deeper investigations to be confirmed.

Furthermore, among the first VIP, three growth-related proteins involved in translation (50S ribosomal proteins L1, Z5XQ72, L2, Z5XKY3 and L5, Z5XKT4) and two chaperones involved in protein folding (Z5XM39 and Z5XSH6) were identified. They were all significantly up-regulated under copper exposure with fold changes Cu-treated vs Ctrl more than twice higher in biofilms compared to planktonic samples. Finally, two other discriminant proteins were identified as flagellins (A0A0P7EE38 and A0A0P7DQX9), namely major filament subunits of the bacterial motility organelles. They both were found here to be down-regulated under copper treatment in biofilms and to a greater degree in planktonic samples. Since bacteria are non-motile in biofilms, these results supported the keeping in

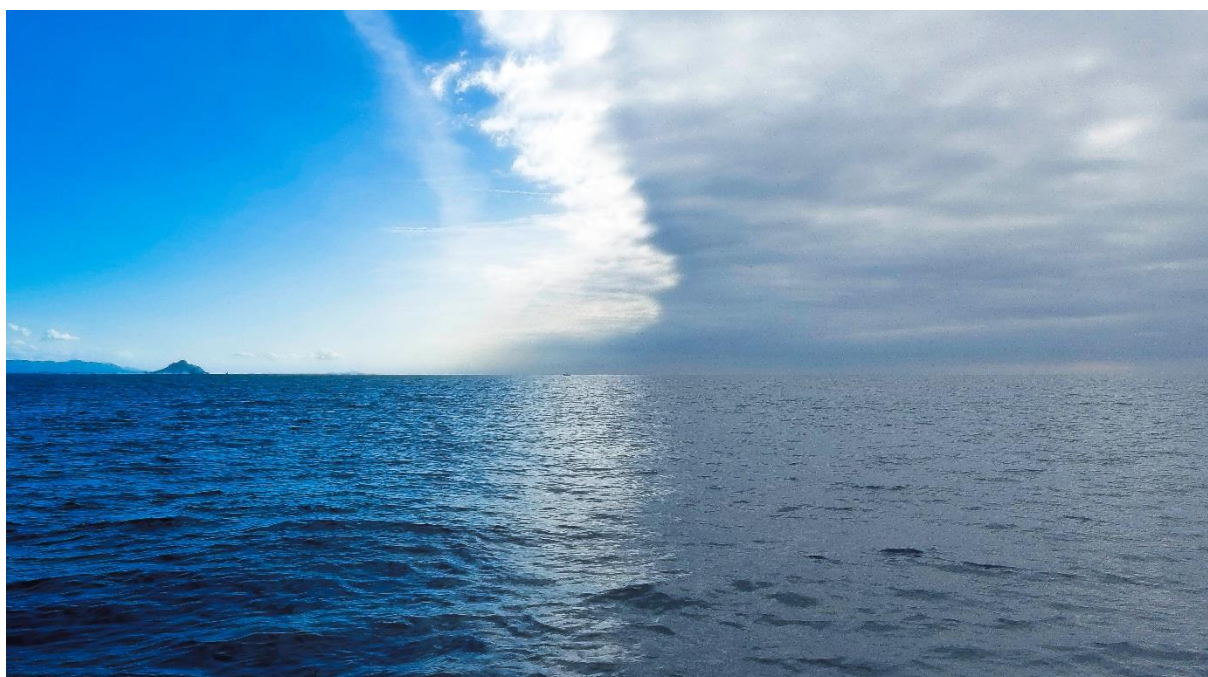
sessile state of biofilm cultivated bacteria under copper treatment. Moreover, they suggested a motility decrease of the planktonic state bacteria, induced by copper for biofilm formation. This switch of planktonic cells in a sessile state would be consistent with the previous metabolomics results. And in another hand, a similar regulation of expression of flagellins by low concentrations of various metal ions including copper has been previously reported in *E. coli* (Guzzo et al., 1991).

VI.2.4. Conclusion

This study aimed to compare differences between metabolomes and proteomes of *P. lipolytica* TC8, cultivated in planktonic and biofilm modes, in response to copper exposure. This double approach by metabolomics and proteomics gave a better global overview at a molecular level of the response to a potential environmental stress of a marine bacterial strain, depending on its mode of growth. As expected, because it cannot be chemically degraded, this toxic metal led to the induction of defense and detoxification mechanisms. Specific metabolic and protein profiles were thus observed in each condition (planktonic vs biofilm and Ctrl vs Cu-treated cultures). The metabolomics study revealed a great distinction between the metabolomes depending on the growth mode (greater than the copper effect), while proteomics indicated that copper treatment was more influent on *P. lipolytica* TC8 proteomes than the culture mode. Even though metabolic responses were divergent in biofilm and planktonic conditions, over one-third of the most important metabolites affected by copper presence were similar. Then, the resulting variations suggested a specific metabolic response to copper stress in biofilm and planktonic cells which seemed to induce drastic changes of the lipid membrane composition. Quantitative proteomic analysis revealed that the presence of copper caused the modulation of the abundance of proteins functionally known to be involved in copper cell homeostasis in both planktonic and biofilm culture modes. Much more proteins differentially expressed under copper stress were observed in biofilm than in planktonic cells. Nature and diversity of these identified proteins, added to high regulation levels, could indicate a better defense of biofilm cells against copper. The diversity of the involved pathways did not therefore allow to prioritize them in the cell response.

This study may be completed by the characterization of EPS secreted in metal stress conditions, in order to assess the capacity of these biopolymers, exopolysaccharides in particular, to sequester metals. Moreover, as metabolomics pointed out a differentiate lipid production, a study of the total membrane lipids may be useful in order to understand what happens under copper stress at the membrane level with potential impacts on permeability and/or adhesion properties.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



Conclusions

Les objectifs de cette thèse étaient de développer des méthodologies d'analyse métabolomique dédiées à l'étude de bactéries au sein de biofilms marins. Ce domaine de recherche constitue en effet un vaste champ d'étude à explorer, peu de travaux correspondants ayant été jusque-là décrits dans la littérature. La métabolomique est la dernière-née des techniques dites « omiques » arrivant au 4^{ème} niveau de caractérisation des systèmes biologiques après la génomique, la transcriptomique et la protéomique. Elle présente la particularité de pouvoir, entre autres, réaliser un diagnostic précis de l'état d'un organisme en lien avec son environnement. Ce type d'approche appliquée aux bactéries impliquées dans la colonisation de surfaces immergées en milieu marin peut ainsi conduire, via l'étude de leur production métabolique, à une meilleure compréhension des événements chimiques intra- et intercellulaires intervenant lors de la formation d'un biofilm. Elle peut également apporter des éléments de réponse quant à la capacité d'adaptation de souches bactériennes à des stress extérieurs tels que peuvent le constituer des surfaces *antifouling*.

En tout premier lieu, dans le cadre de deux projets de recherche distincts (PREVENT et DRACONS), il s'est agi de caractériser la production métabolique de biofilms formés *in situ* sur des surfaces artificielles immergées dans la rade de Toulon. Les deux projets avaient pour vocation de combiner des approches différentes visant à obtenir une caractérisation globale des biofilms dans des environnements et/ou sur des surfaces variés. Ils ont ainsi permis de corréler les jeux de données obtenus par métabolomique avec d'autres types de résultats issus des analyses des mêmes échantillons (abondances et structure des communautés bactériennes, données géochimiques, composition de la matrice exopolymérique (EPS), ...). L'aspect pluridisciplinaire de ces études, en lien avec la confrontation des données issues de l'ensemble des approches utilisées, constituait l'un des enjeux principaux de ces projets.

Dans le cadre du projet PREVENT, des biofilms naturels ont été prélevés sur des surfaces en PVC immergées à deux profondeurs et en différents sites de la rade de Toulon, le long d'un gradient de pollution (cinq sites). L'analyse métabolomique des échantillons par LC-MS a permis de mettre en évidence une nette distinction du métabolome des biofilms récoltés en fonction du site et de la profondeur d'immersion. Les paramètres principaux qui semblent entraîner une telle variation des profils métaboliques sont la lumière (variation en fonction de la profondeur d'immersion) et le degré de pollution (variation en fonction du site de récolte). En outre, il s'est avéré que les communautés microbiennes constituant les différents biofilms analysés variaient globalement de façon similaire aux

signatures chimiques, c'est-à-dire en lien avec le niveau de pollution du site et la profondeur d'immersion. Cette observation s'inscrit dans une logique selon laquelle la variation du métabolome associé aux biofilms récoltés est directement liée aux différences de composition en microorganismes de ces biofilms, elles-mêmes liées aux paramètres environnementaux des sites d'immersion. Enfin, la quantité et la nature des EPS de ces biofilms ont montré également de nettes variations en fonction des sites d'immersion. Ainsi, les échantillons provenant des sites les plus pollués sont caractérisés par des EPS composés majoritairement de polysaccharides avec la présence marquée d'acides uroniques. En revanche, les échantillons récoltés en zones moins contaminées se différencient par une matrice exopolymérique constituée essentiellement de protéines. En se focalisant sur l'effet du site d'immersion, et notamment sur les teneurs en polluants métalliques qui y sont détectées, cette étude démontre globalement que ces facteurs environnementaux ont un réel impact à l'échelle des populations microbiennes des biofilms formés *in situ*, de la composition de la matrice d'EPS sécrétée mais également de la production métabolique.

Dans le cadre du projet DRACONS, des biofilms formés *in situ* ont été prélevés sur trois types de revêtements (PVC et revêtements *antifouling* de types FRC et SPC) à sept temps d'immersion et au niveau de deux sites (rade de Toulon et baie de Banyuls-sur-Mer). L'étude par métabolomique de ces échantillons montre qu'il existe une nette discrimination entre les biofilms formés sur les trois types de revêtements, et ce quel que soit le temps d'immersion. En les analysant indépendamment, il est également possible d'observer, pour chacun d'entre-eux, une évolution de la signature chimique en fonction du temps d'immersion. Une corrélation a été établie entre les données de métabolomique et les résultats obtenus par ailleurs par métagénomique. Elle laisse penser que les variations métaboliques observées sont logiquement liées aux différences de structure des communautés microbiennes des biofilms et pourraient donc être indicatrices de leur composition. Ainsi, la différenciation du métabolome des biofilms formés sur des revêtements SPC après un mois d'immersion pourrait être liée à l'abondance remarquable en γ -Proteobacteria (Alteromonadales) tandis que, dans le cas des biofilms provenant des surfaces PVC ou des revêtements FRC, cette distinction serait plutôt attribuable à la présence majoritaire de Bacteroidetes. Enfin, la discrimination entre les signatures chimiques des biofilms formés sur ces deux derniers types de surfaces serait due à des différences d'abondance en γ -Proteobacteria (Alteromonadales) ainsi qu'en α -Proteobacteria (OCS116). Dans le domaine des revêtements *antifouling*, ces résultats sont les premiers à proposer un lien entre les communautés microbiennes constituant le biofilm et leur signature métabolique.

A la lumière de ces résultats, la seconde partie de cette thèse a porté sur la recherche de biomarqueurs taxonomiques destinés à mieux comprendre la diversité métabolique de biofilms naturels complexes. Pour cela, le potentiel de l'outil métabolomique dans la discrimination de quatre souches bactériennes issues de biofilms marins naturels a été évalué. Une première étape a supposé la mise au point d'un protocole permettant l'analyse par LC-MS de l'endo- et de l'exométabolome de ces souches cultivées dans des milieux riches. Ce protocole a ensuite été appliqué afin d'évaluer l'effet de plusieurs paramètres de culture (composition du milieu, phase de croissance et mode de culture) sur la production métabolique des souches sélectionnées. Des changements métaboliques ont ainsi été mis en évidence en fonction de ces différents paramètres de culture mais les variations intra-souches étaient toujours moins prononcées que celles observées entre les souches. Enfin, plusieurs classes de biomarqueurs ont été identifiées grâce à la construction de réseaux moléculaires basés sur des similarités de fragmentation en spectrométrie de masse d'une même famille de molécules. Les résultats montrent que des OLs sont spécifiquement produits par trois des bactéries étudiées et particulièrement par la souche *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. D'autres dérivés lipidiques (HOLs et GLs) sont quant à eux biosynthétisés, dans les conditions de culture appliquées, uniquement par les deux souches de l'espèce *Persicivirga mediterranea*.

Dans une troisième partie, la recherche de biomarqueurs d'état physiologique a été réalisée en étudiant plus spécifiquement la souche *P. lipolytica* TC8. Le but de cette étude était d'évaluer les variations de son métabolome ainsi que de son protéome en fonction du mode de culture (planctonique *versus* biofilm). Des profils métabolomiques et protéomiques ont ainsi été établis ; ils montrent chacun une spécificité liée à la condition de culture. Les analyses métabolomiques ont révélé une sur-expression de PE par les cellules cultivées en biofilm tandis que des OLs sont plutôt caractéristiques des cellules cultivées en suspension. Les OLs restent à l'heure actuelle des composés encore peu étudiés. Les études disponibles dans la littérature suggèrent l'implication de ces aminolipides dans la stabilité de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, et ce notamment dans des conditions où les teneurs en phosphore sont faibles. Ces dérivés seraient produits préférentiellement aux PE afin de réserver les ressources en phosphore à des fonctions cellulaires cruciales. La principale différence métabolique observée se situe donc au niveau de la nature de lipides membranaires discriminants entre les deux phénotypes de *P. lipolytica* TC8 suggérant que ces composés pourraient jouer un rôle crucial lors de la formation du biofilm. Concernant les analyses quantitatives de protéomique, elles ont permis la mise en évidence d'une majorité (90%) de protéines communes aux deux types d'échantillons ; environ 5% des protéines identifiées se sont avérées être

spécifiques de l'un ou l'autre phénotype. De plus, les principaux résultats indiquent l'existence de différenciations d'expression protéique, avec notamment la surexpression de protéines liées au métabolisme du soufre en mode planctonique tandis que, par exemple, des peptidases sont plus largement produites en biofilm. Enfin, l'analyse statistique multivariée du protéome de cellules de *P. lipolytica* TC8 cultivées en biofilm *versus* mode planctonique a montré l'importance de protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés dans la différenciation des deux modes de culture.

Finalement, la dernière partie de ces travaux de thèse a consisté à caractériser par métabolomique et par protéomique la réponse de *P. lipolytica* TC8 à un stress au cuivre, un élément que l'on retrouve aussi bien dans les eaux des sites d'étude des biofilms *in situ*, présentés précédemment, que dans la plupart des revêtements *antifouling*. Une première étape a permis d'évaluer l'impact de concentrations environnementales de cuivre sur les quatre souches bactériennes sélectionnées préalablement. Cette étude ne révélant aucun effet notable sur le métabolome, une recherche des concentrations de cuivre inhibitrices de la croissance bactérienne a été effectuée pour chacune des souches. *P. lipolytica* TC8 s'est avérée être celle qui montrait la plus grande résistance au cuivre ; elle a donc été choisie pour une étude plus approfondie, en commençant par la détermination de concentrations-clés (IC₂₅ et IC₅₀, pour l'effet du cuivre sur la croissance ; MIC et MBC, pour sa toxicité ; EC₅₀ pour son activité anti-adhésion). Des analyses en double approche, métabolomique et protéomique, ont alors été réalisées à deux concentrations de cuivre (IC₂₅ et IC₅₀) pour la première et à l'IC₅₀ pour la seconde. L'étude métabolomique comparative de cultures réalisées en présence ou non de cuivre et selon les deux modes, planctonique et biofilm, a montré une variation du métabolome plus importante selon le mode de culture que selon le niveau d'exposition au cuivre, aux concentrations appliquées. La plus grande variation du métabolome sous l'effet du cuivre est observée pour les cellules planctoniques exposées à l'IC₅₀ et se traduit par une diminution de la production d'ornithine lipides (OLs) et une augmentation de la production de phosphatidylethanolamines (PE). L'étude comparative des métabolomes, biofilm vs planctonique en absence de cuivre, ayant préalablement révélé des différences significatives de production d'OLs et de PEs entre les deux modes de culture, et la plus grande résistance vis-à-vis d'agents antimicrobiens de bactéries organisées en biofilm étant entendue, l'hypothèse d'un changement de métabolisme vers un phénotype biofilm a pu être émise ici. Cependant, dans les conditions d'étude (durée des cultures planctoniques réduite afin d'éviter le déclin de la culture), les profils métaboliques des cellules planctoniques et en biofilm ne convergeaient pas en réponse à la présence de cuivre.

Cette étude métabolomique s'est enrichie des résultats d'analyses quantitatives de protéomique destinée à examiner la réponse protéique au cuivre (à l'IC₅₀) de *P. lipolytica* TC8 cultivée en biofilm et en planctonique. D'importantes variations quantitatives et qualitatives ont été mises en évidence en particulier en biofilm, condition de croissance dans laquelle la régulation des protéines s'est révélée la plus importante (en nombre de protéines concernées et en niveau de sur- ou sous-expression). Au contraire de l'analyse des métabolomes qui a montré que le mode de culture entraîne de plus grandes variations que la présence de cuivre, c'est l'effet du cuivre plus que le mode croissance qui s'est avéré être plus important dans la différenciation des protéomes. Cependant, que ce soit en biofilm ou en planctonique, la présence du métal dans le milieu de culture a eu un effet sur l'abondance de protéines spécifiques connues pour être impliquées dans l'homéostasie cellulaire du cuivre. En particulier, de nombreux transporteurs membranaires de type RND- ou ABC-transporteurs ainsi que des ATPases de type P ou encore des enzymes ayant un rôle de protection contre le stress oxydatif ont pu être identifiés.

A la lumière de la littérature et des résultats de cette étude en double approche de l'effet du cuivre sur la bactérie marine *P lipolytica* TC8, une interrogation émerge. L'importante variation observée en métabolomique pour les cellules planctoniques pourrait indiquer une plus grande incidence du cuivre (liée à sa toxicité / au stress induit) avec un métabolome très différencié. La plus grande variation observée en protéomique pour des cellules cultivées cette fois en biofilm pourrait indiquer une plus grande capacité de ces dernières à résister au cuivre avec une activation plus importante de mécanismes de protection.

Perspectives

A propos de l'analyse du métabolome de biofilms marins naturels

A l'issue des travaux portant sur la caractérisation de biofilms marins naturels formés dans la rade de Toulon, plusieurs études sont envisageables.

Tout d'abord, dans le cadre des deux projets présentés, les molécules permettant la discrimination des biofilms naturels restent à identifier par spectrométrie de masse. Ainsi pour faire suite au projet PREVENT, il serait intéressant d'identifier les biomarqueurs présents dans les biofilms spécifiques des différents sites d'immersion, et donc potentiellement indicateurs d'un certain niveau de pollution. De plus, les résultats de métabolomique seront corrélés avec les données de métagénomique afin de pouvoir lier plus finement les variations de la production métabolique aux communautés microbiennes présentes, et de fait aux paramètres environnementaux, que constituent la lumière et la pollution, de chaque site d'immersion.

A la suite du projet DRACONS, les biomarqueurs responsables de la discrimination entre les signatures chimiques des biofilms formés sur les différents revêtements et à différents temps d'immersion pourraient être également caractérisés. En corrélant la présence de ces molécules dans un biofilm précoce avec le niveau de colonisation ultérieure du revêtement par des macro-organismes (observation sur du plus long terme), un outil de prévision d'efficacité d'un revêtement *antifouling* pourrait ainsi être développé. De plus, les données métabolomiques obtenues visent à être également corrélées avec l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques des revêtements étudiés (rugosité, module élastique, ...). Par ailleurs, lorsque l'ensemble des échantillons immergés dans des conditions dynamiques seront récoltés, les résultats de leur analyse métabolomique seront comparés à ceux obtenus avec le mode statique.

Enfin, que ce soit pour l'étude de l'effet de paramètres environnementaux (niveau de pollution) ou de revêtements, sur la nature des biofilms formés, il serait intéressant de récolter des échantillons provenant d'un plus large panel de sites affichant des conditions environnementales très contrastées.

A propos de la discrimination de bactéries marines sur la base de leur métabolome

Au cours de l'étude visant à caractériser, à l'échelle métabolique, la discrimination de quatre bactéries marines issues de la rade de Toulon, plusieurs familles de molécules ont été identifiées et décrites. Certaines sont caractéristiques de l'une des souches bactériennes étudiées. Pour ces molécules, aucun standard commercial n'est actuellement disponible. Aussi, afin de finaliser l'annotation des

métabolomes étudiés, des cultures bactériennes devront être réalisées à plus grande échelle ; elles permettront l'isolement de ces molécules d'intérêt en quantité suffisante pour la détermination de leur structure chimique par RMN.

Les OLS, et plus généralement les aminolipides, constituent l'une des familles de molécules caractéristiques identifiées au cours de notre étude, notamment chez *P. lipolytica* TC8. L'effet du manque de ressources disponibles en phosphore, qui est souvent une réalité en milieu marin, sur la production en OLS, a été démontré chez quelques bactéries modèles. Il serait donc intéressant de faire varier la concentration de cet élément dans des cultures *in vitro* afin d'en observer l'incidence sur le métabolome des souches déjà étudiées. Cela permettrait de mieux comprendre l'effet du manque d'un tel nutriment sur la régulation du métabolisme des souches étudiées et de se rapprocher des conditions environnementales. Plus généralement, le développement d'analyses métabolomiques à partir de cultures réalisées dans des conditions oligotrophes, donc avec une faible supplémentation en source de carbone, pourrait également conduire à une meilleure représentation des conditions naturelles de formation de biofilms marins. Dans ce même objectif visant à mieux caractériser des biofilms naturels, et ces derniers constituant des consortia complexes, il serait intéressant de développer des protocoles d'analyses métabolomiques adaptés à des co-cultures de micro-organismes. La mesure de l'impact de la production métabolique d'une bactérie sur une autre serait alors recherchée.

Au cours de cette thèse, quatre souches bactériennes issues de biofilms marins prélevés dans la rade de Toulon ont été étudiées. Une des perspectives à ces travaux initiaux serait de les étendre à l'ensemble de la souchothèque du laboratoire et plus largement à un plus vaste panel de souches bactériennes très représentées au sein des biofilms marins.

D'un point de vue plus méthodologique, il serait pertinent de créer une base de données spectrale (MS et MS/MS) regroupant l'ensemble des molécules déjà identifiées à partir des quatre souches bactériennes étudiées afin de faciliter l'annotation des métabolomes d'autres souches. Cette base de données pourrait naturellement être complétée à partir d'informations provenant de bases de données disponibles en ligne (Metlin, Lipidmaps, Kegg...).

Enfin, les protocoles expérimentaux développés dans le cadre de cette thèse permettent certes l'analyse d'une large gamme de molécules du métabolome mais ils ne sont pas particulièrement adaptés aux métabolites les plus polaires pour lesquels on pourrait envisager une recherche plus ciblée. En effet, ces composés, qui sont souvent des métabolites primaires, recèlent des informations

essentielles pour une compréhension globale des processus biosynthétiques. De nouvelles méthodes d'extraction et chromatographiques devront être développées à cette fin en liaison avec la possibilité d'utiliser des techniques d'analyses complémentaires à la LC-MS, telles que la RMN ou la GC-MS.

A propos de la discrimination phénotypique (biofilm vs planctonique) de *P. lipolytica* TC8

Dans les conditions d'analyses métabolomiques de la thèse, des lipides de type PE et OLs ont été identifiés comme biomarqueurs du mode de culture de *P. lipolytica* TC8, biofilm et planctonique respectivement. Une étude de la composition lipidique membranaire totale en fonction des conditions de culture permettrait de compléter cette observation par une appréciation plus globale du pouvoir de discrimination de tels composés.

Comme pour l'étude précédente, d'autres méthodes expérimentales d'extraction ou au moins d'analyses chromatographiques sont envisageables afin d'élargir la gamme de métabolites observés. Des travaux complémentaires d'analyses métabolomique et protéomique pourront également porter sur des biofilms plus matures ou obtenus dans des conditions de cultures différentes (apports en nutriments, cultures sur des revêtements *antifouling*, ...) de *P. lipolytica* TC8 et s'étendre à d'autres souches (cultures mono-spécifiques et co-cultures).

A propos de la variation du métabolome et du protéome de *P. lipolytica* TC8 en réponse à un stress cuprique

La résistance de bactéries vis-à-vis d'agents antimicrobiens augmentée par leur organisation en biofilm a clairement été démontrée par de nombreux travaux. Au cours de cette étude, il a été envisagé que l'un des principaux moyens de défense de *P. lipolytica* TC8 cultivée en mode planctonique en présence de cuivre serait de former un biofilm. Pour vérifier cela, il faudrait prolonger la culture planctonique dans le temps et contrôler le rapprochement éventuel des profils métaboliques planctoniques et biofilm. Une telle expérience ne peut être envisagée sans une observation parallèle des cellules par microscopie.

La corrélation des matrices de données issues des analyses protéomique et métabolomique, comme réalisé par Wilmes et al en 2016, est envisagée ; elle permettra de corréler les données obtenues en métabolomique et en protéomique et d'accéder ainsi à des liens plus évidents entre le protéome et le métabolome (Wilmes et al., 2010).

De la même manière que pour les précédentes études, l'examen de l'effet du cuivre sur la production de métabolites plus polaires et non détectés dans nos conditions, serait intéressante ne serait-ce que pour élargir le champ d'investigations.

Enfin, ce même type d'étude pourrait également être réalisé sur les autres souches bactériennes sélectionnées ici. Compte-tenu de leur résistance/tolérance au cuivre moins importante, cela pourrait permettre de mieux identifier les mécanismes de défense mis en jeu et associés à un niveau de résistance/tolérance et ainsi pourquoi pas de les hiérarchiser.

ANNEXE I

Chromatogrammes des échantillons caractéristiques étudiés

Figure AI.1: UPLC chromatograms of VNSS medium and planktonic samples of TC4, TC7, TC8 and TC11 (cultures in VNSS to the stationary phase, extraction with EtOAc).

Figure AI.2: UPLC chromatograms of planktonic samples of TC8 collected at 5 times of the growth curve (t_1 , t_2 , t_3 : exponential phase, t_4 and t_5 : stationary phase) in VNSS medium (extraction with EtOAc).

Figure AI.3: UPLC chromatograms of TC8 biofilm samples collected at 2 times (24h and 48 h) in VNSS medium (extraction with EtOAc).

Figure AI.4: UPLC chromatograms of TC8 samples cultured planktonically or in biofilm mode without or with Cu (IC₂₅ and IC₅₀) in MB medium (extraction with EtOAc).

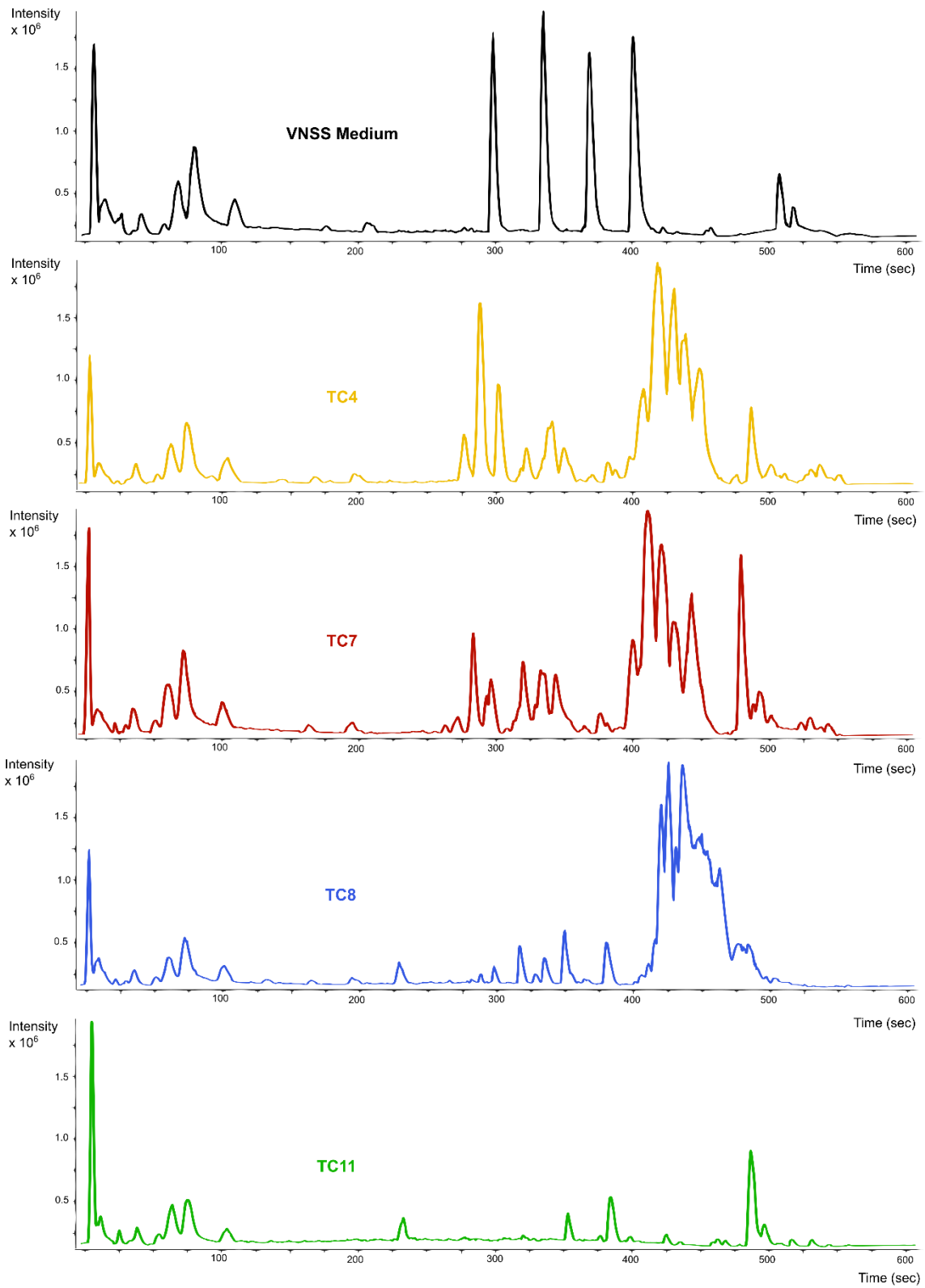


Figure AI.1: UPLC chromatograms of VNSS medium and planktonic samples of TC4, TC7, TC8 and TC11 (cultures in VNSS to the stationary phase, extraction with EtOAc)

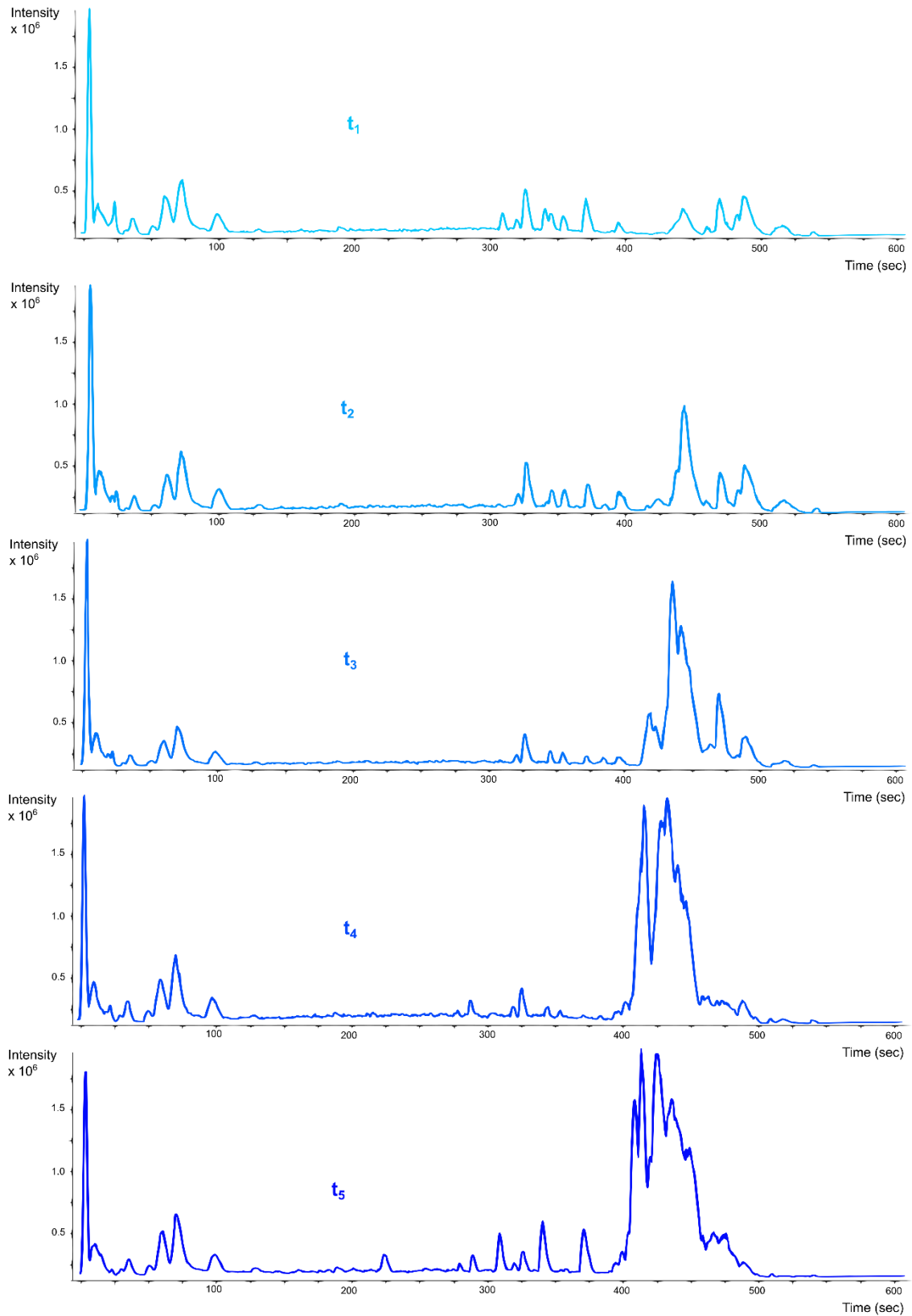


Figure AI.2: UPLC chromatograms of planktonic samples of TC8 collected at 5 times of the growth curve (t₁, t₂, t₃: exponential phase, t₄ and t₅: stationary phase) in VNSS medium (extraction with EtOAc)

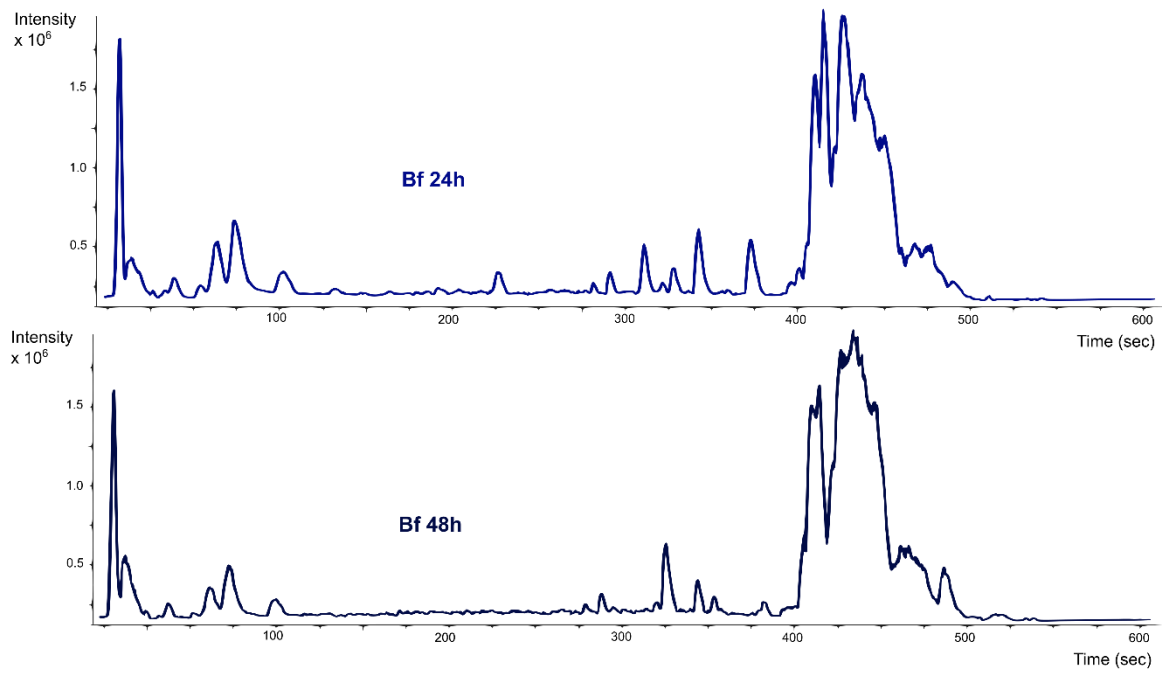


Figure A1.3: UPLC chromatograms of TC8 biofilm samples collected at 2 times (24h and 48 h) in VNSS medium (extraction with EtOAc)

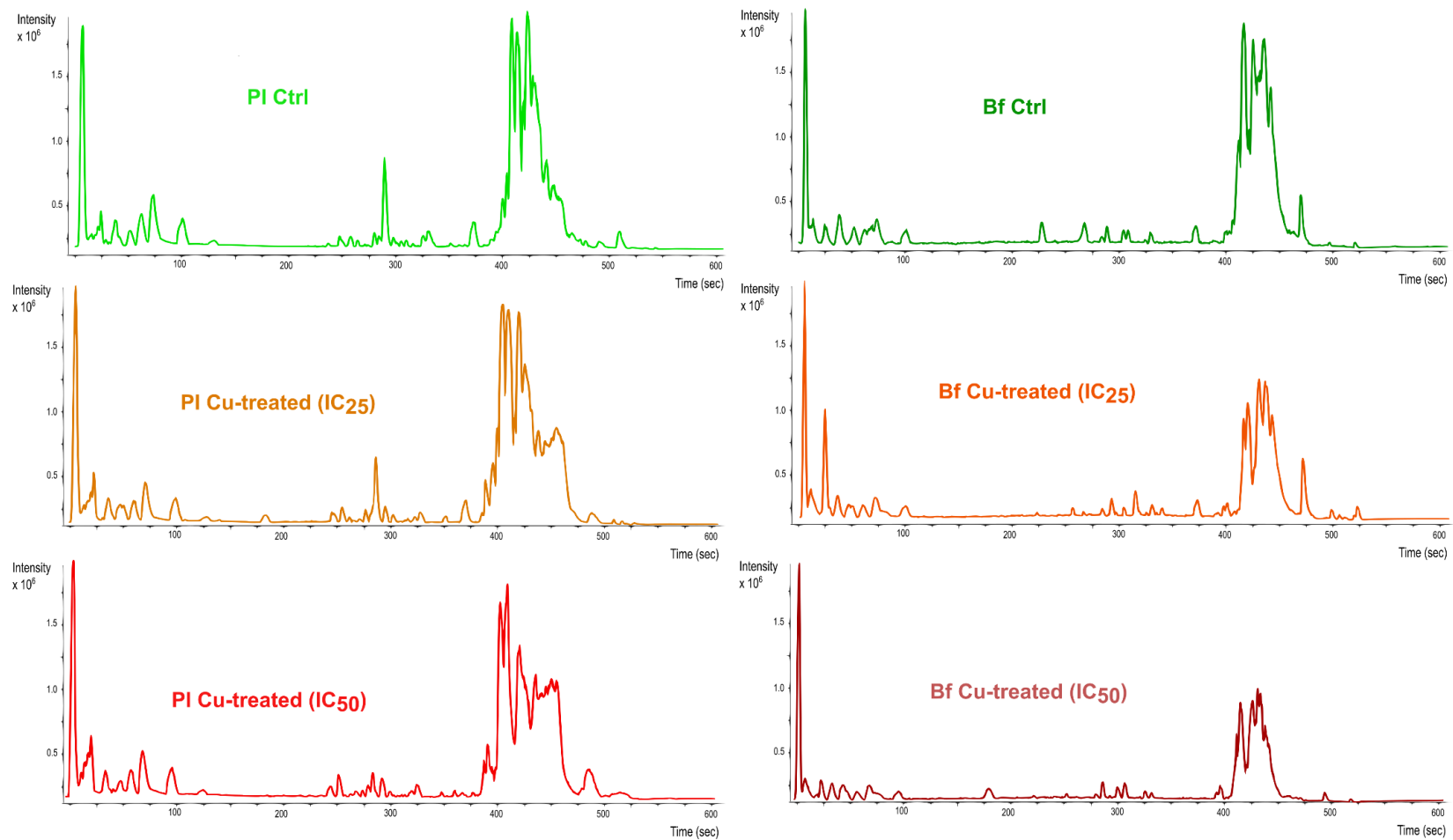


Figure AI.4: UPLC chromatograms of TC8 samples cultured planktonically or in biofilm mode without or with Cu (IC₂₅ and IC₅₀) in MB medium (extraction with EtOAc)

ANNEXE II

Spectres de masse et fragmentation proposée des métabolites d'intérêt

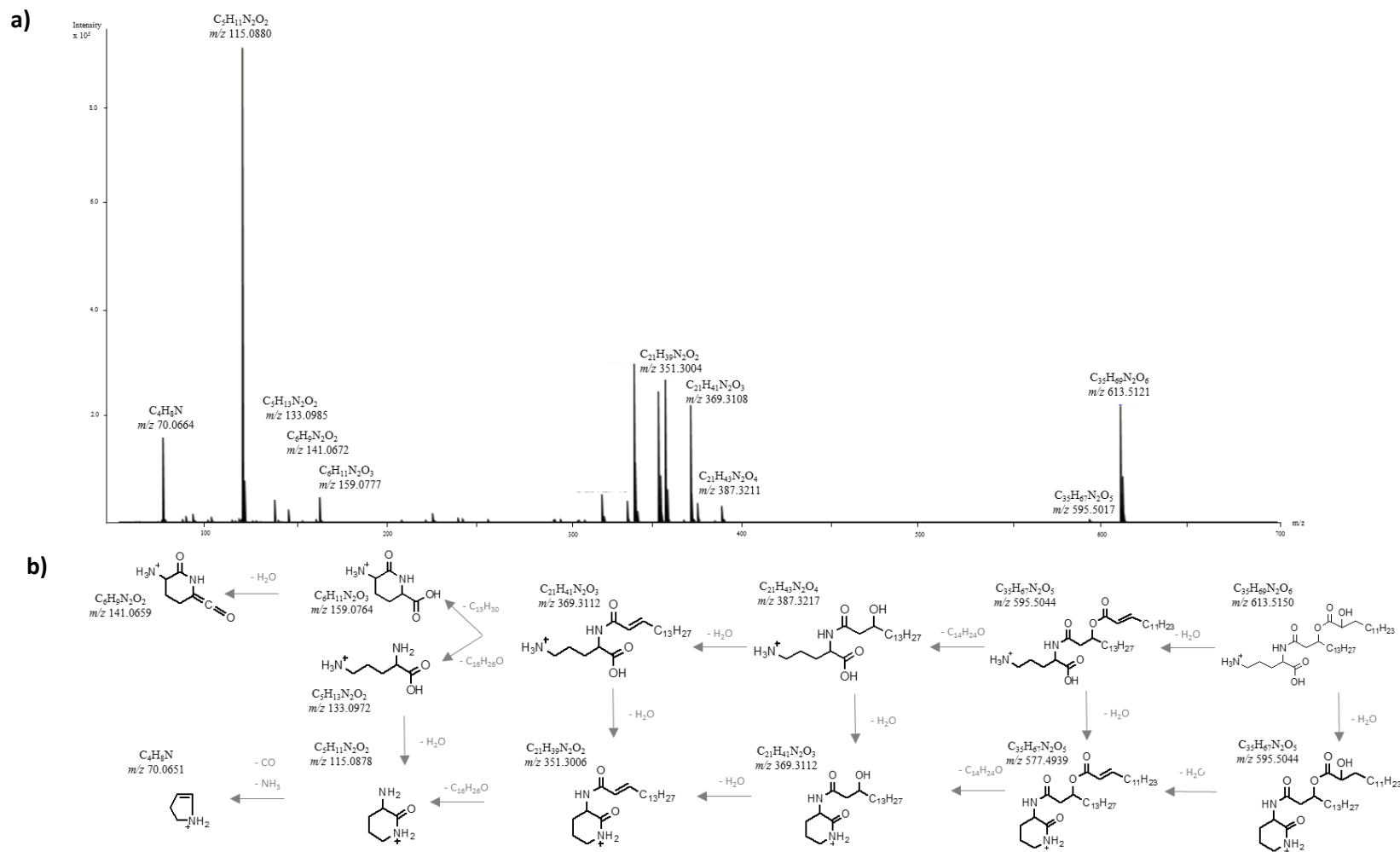
Figure AII.1: (a) HRMS mass spectrum of *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 hydroxylated ornithine lipid at m/z 613.5121 (VIP N°8). (b) Proposed fragmentation of VIP N°8.

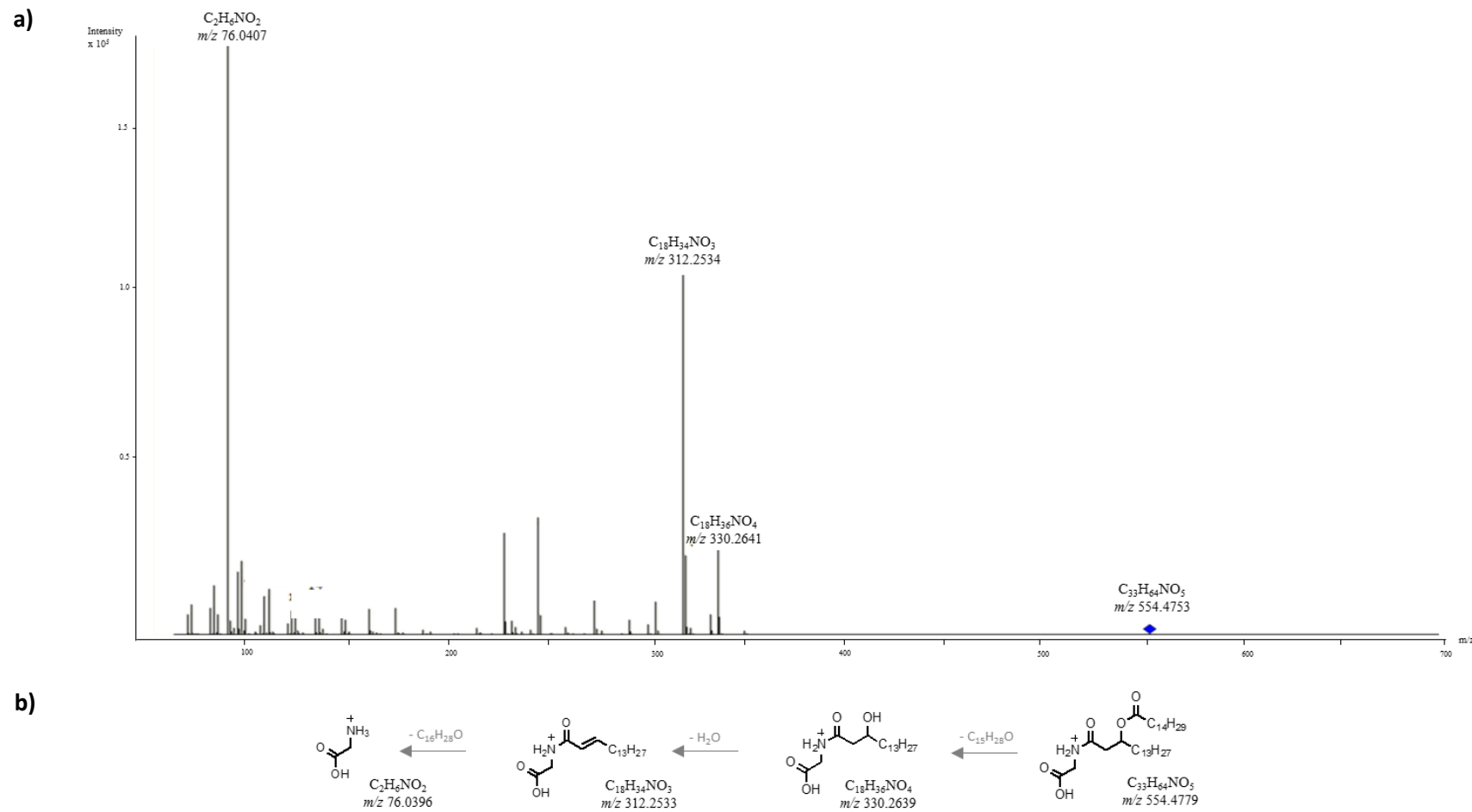
Figure AII.2: (a) HRMS mass spectra of *Persicivirga mediterranea* TC7 glycine lipid at m/z 554.4753. (b) Proposed fragmentation of the glycine lipid at m/z 554.4753.

Figure AII.3: (a) HRMS mass spectrum of *Persicivirga mediterranea* TC7 alanine lipid at m/z 582.5061 (b) Proposed fragmentation of the alanine lipid at m/z 582.5061.

Figure AII.4: (a) HRMS mass spectrum of *Persicivirga mediterranea* TC7 putrescine lipid at m/z 355.3685. (b) Proposed fragmentation of the putrescine lipid at m/z 355.3685.

Figure AII.5: (a) HRMS mass spectrum of *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 phosphatidylethanolamine at m/z 664.4971. (b) Proposed fragmentation of the phosphatidylethanolamine at m/z 664.4971.





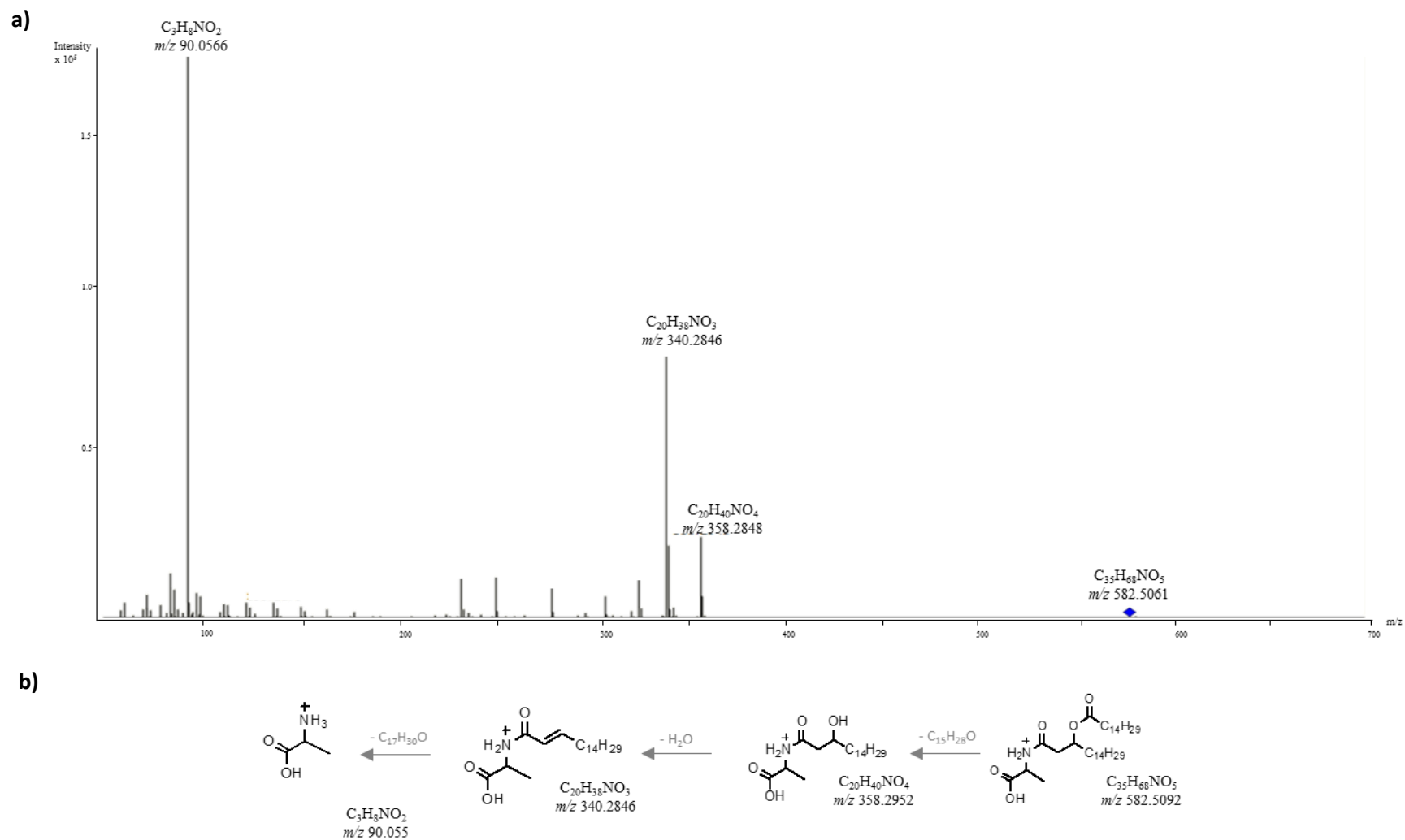


Figure AII.3: a) HRMS mass spectrum of *Persicivirga mediterranea* TC7 alanine lipid at m/z 582.5061; b) Proposed fragmentation of the alanine lipid at m/z 582.5061 (The elemental composition of fragment ions is indicated and the corresponding theoretical value of m/z is given in parentheses)

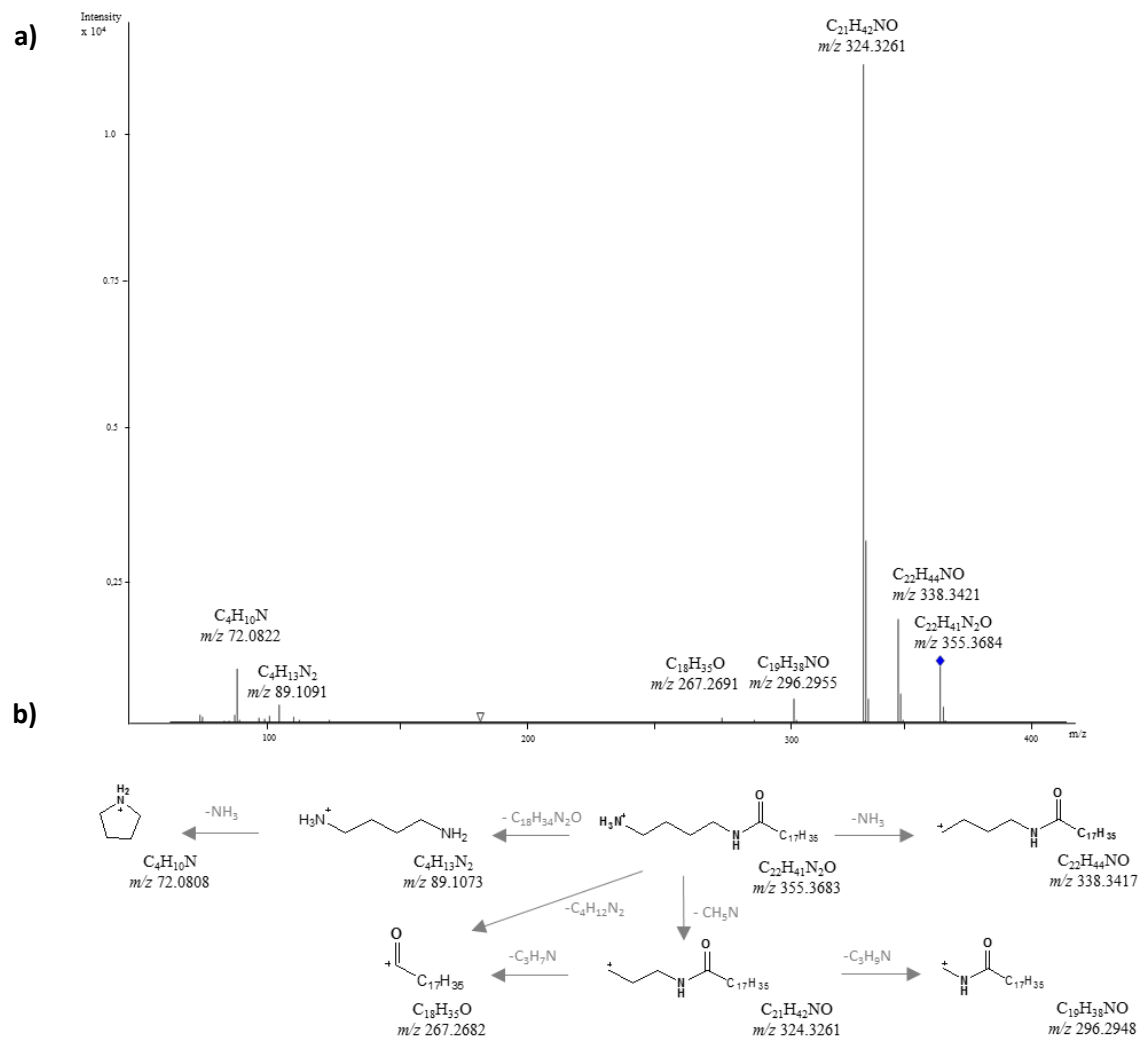
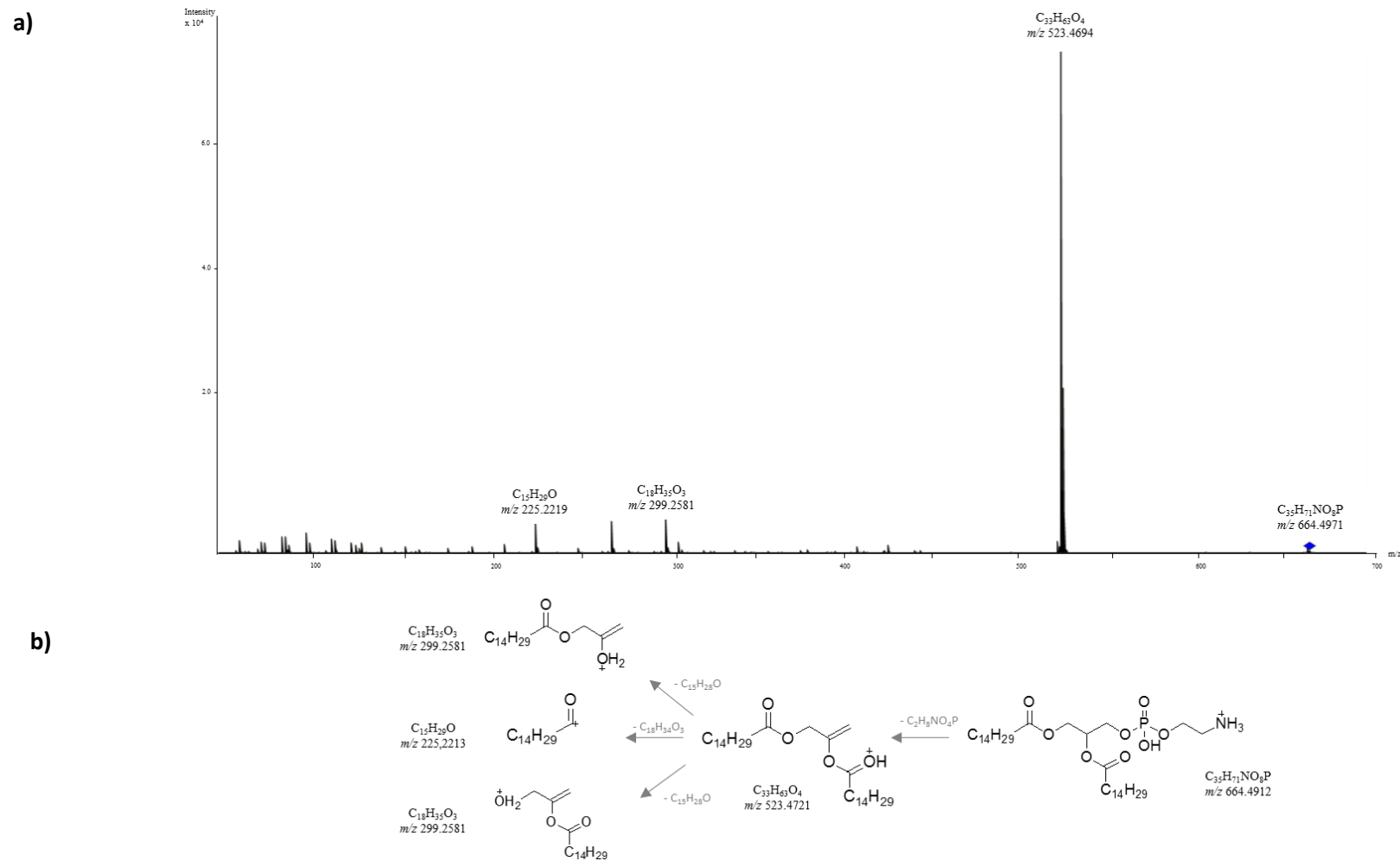


Figure AII.4: a) HRMS mass spectrum of *Persicivirga mediterranea* TC7 putrescine lipid at m/z 355.3685; b) Proposed fragmentation of the putrescine lipid at m/z 355.3685 (The elemental composition of fragment ions is indicated and the corresponding theoretical value of m/z is given in parentheses)



ANNEXE III

Liste des protéines identifiées chez

P. lipolytica

Tableau AIII.1: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in biofilm conditions

Tableau AIII.2: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in biofilm conditions and is treated with copper

Tableau AIII.3: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in planktonic conditions and treated with copper

Tableau AIII.4: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in planktonic and biofilm conditions and is treated with copper

Tableau AIII.1: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in biofilm conditions^a

Protein ID ^b	Protein Name	Mol. Weight [kDa]	Fold-Change Cu-treated/Ctrl	p-value
Z5XN25	General secretion pathway protein GspG	15.4	9.3	0.008
Z5XTQ3	Zn-dependent hydrolase	63.4	9.2	0.000
Z5XMT6	Uncharacterized protein	19.1	8.7	0.002
Z5XNJ3	Uncharacterized protein	44.6	8.4	0.005
Z5XV11	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	34.7	8.3	0.008
Z5XUQ7	Universal stress protein	31.1	8.0	0.004
Z5XR17	Glucan biosynthesis protein D	62.5	7.4	0.000
AOA0P7D8Y1	TonB-dependent receptor	78.9	7.0	0.003
Z5XN55	Diguanylate cyclase	57.7	6.4	0.004
Z5XQ89	Chitinase	127.7	5.7	0.001
Z5XQL0	Peptidoglycan-binding protein	61.6	5.7	0.009
Z5XLA3	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	26.6	5.7	0.002
AOA0P7EDF0	Uncharacterized protein	36.5	5.7	0.000
Z5XLZ8	Homoserine O-acetyltransferase	43.7	5.5	0.005
Z5XR13	S1/P1 Nuclease	32.3	5.5	0.004
Z5XNP9	Uncharacterized protein	23.0	5.5	0.002
Z5XLG5	Peptidase M13	77.3	5.3	0.001
Z5XPL6	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	28.4	5.2	0.001
Z5XUP0	Uncharacterized protein	27.7	5.2	0.009
Z5XNU4	Nikel transport family protein NikM	30.8	5.2	0.001
Z5XR51	Uncharacterized protein	106.5	4.9	0.000
AOA0P7DXK7	Uncharacterized protein	34.5	4.6	0.005
Z5XM94	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	27.4	4.5	0.000
Z5XNX2	Uncharacterized protein	67.9	4.5	0.001
Z5XTF1	Uncharacterized protein	37.0	4.4	0.005
Z5XTS6	Uncharacterized protein	47.3	4.3	0.008
Z5XW40	Peptidase S9	85.1	4.3	0.002
Z5XRU2	Sugar ABC transporter substrate-binding protein	38.3	4.2	0.006
Z5XQV8	Beta-glucosidase	93.3	4.2	0.003
Z5XPL0	Histidinol dehydrogenase	46.3	4.1	0.001
Z5XL25	Catalase-peroxidase	81.6	4.0	0.005
Z5XR73	Uncharacterized protein	26.3	3.9	0.000
Z5XW22	DNA mismatch repair protein MutT	19.5	3.8	0.003
Z5XM85	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	22.8	3.8	0.001
Z5XY45	Uncharacterized protein	34.6	3.8	0.005
Z5XRJ1	Histidine biosynthesis bifunctional protein HisIE	22.5	3.7	0.000
Z5XR60	Adhesin	19.5	3.7	0.005
Z5XKE7	ABC transporter substrate-binding protein	42.0	3.7	0.006
Z5XKA5	Uncharacterized protein	16.3	3.5	0.004
Z5XL46	Uncharacterized protein	22.3	3.5	0.009
Z5XTG9	4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase	15.1	3.5	0.009
Z5XSZ1	Redoxin	21.1	3.3	0.002
Z5XR97	Flagellar basal body-associated protein FilL-like protein	15.4	3.3	0.010
Z5XMQ9	LOG family protein	50.0	3.3	0.001
Z5XQ14	Uncharacterized protein	30.5	3.3	0.007
Z5XQ18	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	38.7	3.2	0.005
Z5XPP9	Uncharacterized protein	15.7	3.2	0.010
Z5XYF0	Cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	22.1	3.1	0.003
Z5XYZ6	1,4-D-glucanase	41.2	3.1	0.001
Z5XRT7	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase	30.7	3.1	0.009
Z5XP14	Cyanophycinase	61.6	3.1	0.005
Z5XR26	Uncharacterized protein	11.1	3.1	0.008
Z5XRI5	Aspartate aminotransferase	39.8	3.1	0.000
Z5XPG9	Xaa-Pro dipeptidase	45.4	3.0	0.008
Z5XRJ7	Uncharacterized protein	51.7	3.0	0.005
Z5XPN2	Lipopolysaccharide export system protein LptA	18.7	3.0	0.000
Z5XXQ4	Sorbosone dehydrogenase	40.4	3.0	0.007
Z5XLE8	Serine/threonine protein phosphatase	19.0	3.0	0.002
Z5XYV9	Uncharacterized protein	54.1	2.9	0.005

Annexe III

AOA0P7E812	Aminopeptidase	95.4	2.9	0.003
AOA0P7E810	Glycerophosphodiester phosphodiesterase	26.1	2.9	0.004
Z5XRA1	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase	21.2	2.8	0.003
Z5XQ34	Peptidase	56.1	2.8	0.008
AOA0N8HKH2	Sulfatase modifying factor 1	75.3	2.7	0.007
Z5XR92	a-synthase	45.5	2.7	0.001
Z5XL80	Lytic transglycosylase	38.8	2.7	0.000
AOA0N8HKN3	Aspartate aminotransferase	40.0	2.7	0.010
Z5XV60	Uncharacterized protein	17.2	2.7	0.005
Z5XWT5	Ribonuclease E	116.9	2.7	0.003
Z5XVM4	Toluene tolerance protein	25.9	2.7	0.001
Z5XNB9	Uncharacterized protein	32.6	2.7	0.001
Z5XLJ3	Copper resistance protein CopA	67.6	2.6	0.005
Z5XR18	Flavodoxin	19.8	2.5	0.004
Z5XRS3	Uncharacterized protein	14.0	2.5	0.006
Z5XPG8	Uncharacterized protein	96.8	2.4	0.006
Z5XX16	Peptidase M14	67.2	2.4	0.009
Z5XRM3	Uncharacterized protein	18.9	2.4	0.002
Z5XSW7	5-nucleotidase	58.8	2.4	0.002
Z5XMH5	GntR family transcriptional regulator	26.7	2.4	0.003
Z5XKU0	Uncharacterized protein	93.4	2.4	0.001
Z5XVV6	Iron ABC transporter substrate-binding protein	37.3	2.3	0.002
Z5XQE4	Ohr subfamily peroxiredoxin	14.5	2.3	0.008
Z5XTK3	Peptidase	89.6	2.3	0.001
Z5XLY3	Gluconolactonase	31.2	2.3	0.010
Z5XXW9	Peptidase M20	46.6	2.3	0.001
Z5XL94	Alkaline phosphatase	47.1	2.3	0.000
Z5XTR5	Pirin	30.5	2.3	0.006
Z5XVD0	Methyltransferase	29.9	2.3	0.001
Z5XNF0	Polysaccharide deacetylase	38.7	2.3	0.008
Z5XSN1	Dipeptidyl carboxypeptidase	80.9	2.2	0.006
Z5XRH3	Ribonuclease D	43.8	2.2	0.007
Z5XSK4	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein	14.3	2.2	0.009
Z5XQI7	Acireductone dioxygenase	20.2	2.2	0.000
Z5XKY1	Cytochrome C	16.3	2.2	0.009
Z5XU29	Acyl carrier protein	8.7	2.2	0.005
Z5XTG6	Chaperone SurA	48.4	2.2	0.000
Z5XMW5	Methionyl-tRNA formyltransferase	34.5	2.1	0.002
Z5XQ68	Anti-sigma factor antagonist	11.4	2.1	0.008
Z5XLV1	Uncharacterized protein	17.8	2.1	0.002
Z5XM22	XRE family transcriptional regulator	24.7	2.1	0.001
AOA0P7DTA7	XRE family transcriptional regulator	15.9	2.1	0.007
Z5XKE4	Hydrolase	92.9	2.0	0.005
Z5XWS9	Metal ABC transporter ATPase	35.3	2.0	0.007
Z5XTM2	Endonuclease	43.5	2.0	0.003
AOA0P7E4F4	Phosphoenolpyruvate carboxylase	98.8	2.0	0.009
Z5XTL6	Diguanylate phosphodiesterase	82.1	-2.0	0.009
Z5XMI3	Histidine ammonia-lyase	53.9	-2.1	0.003
Z5XT03	Glutamate synthase	52.4	-2.1	0.000
Z5XQ95	Agmatinase	33.7	-2.2	0.001
Z5XSH6	Protein GrpE	22.6	-2.2	0.009
Z5XNC7	Arginine N-succinyltransferase	37.6	-2.2	0.005
Z5XWT7	GTPase Era	35.6	-2.3	0.001
Z5XUN7	Propionate--CoA ligase	69.5	-2.4	0.002
Z5XPG4	Fructokinase	34.7	-2.4	0.010
Z5XSZ9	Phosphoenolpyruvate carboxylase	98.9	-2.5	0.004
Z5XNW2	L-arabinose isomerase	55.2	-2.5	0.002
Z5XW70	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	53.1	-2.5	0.000
Z5XN13	Fic family protein	56.7	-2.6	0.006
Z5XV74	Cytoplasmic asparaginase I	37.0	-2.6	0.009
Z5XSC3	UPF0250 protein AOG27_03855	10.4	-2.7	0.003
Z5XN10	Alcohol dehydrogenase	35.8	-2.7	0.006
Z5XVH8	Phosphoribulokinase	33.8	-2.7	0.005
Z5XKP8	Kynureninase	41.4	-2.8	0.005
Z5XP93	Ornithine carbamoyltransferase	33.0	-2.9	0.005
Z5XTB1	Ribonucleoside-diphosphate reductase	85.9	-2.9	0.003
Z5XV36	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	83.8	-2.9	0.000
Z5XP56	Long-chain fatty acid--CoA ligase	79.7	-3.0	0.004

Annexe III

Z5XW86	Acetyltransferase	17.1	-3.1	0.003
Z5XM08	Phosphatase	56.3	-3.2	0.002
Z5XPN6	Carbonic anhydrase	25.0	-3.3	0.001
Z5XKX1	Tryptophan 2,3-dioxygenase	44.3	-3.4	0.001
Z5XS79	Histidine phosphatase	17.7	-3.5	0.004
Z5XTR9	Uncharacterized protein	9.5	-3.6	0.006
Z5XMV3	Acetylornithine aminotransferase	43.1	-3.6	0.001
Z5XPN3	Threonine aldolase	36.1	-3.7	0.002
Z5XVG9	Histidine kinase	74.5	-3.8	0.009
Z5XQ16	Phosphate-specific transport system accessory protein PhoU	26.7	-3.8	0.006
Z5XNV1	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	50.3	-3.8	0.003
Z5XMV9	Glycosyltransferase	39.8	-3.9	0.007
Z5XQ77	Sulfate adenyltransferase subunit 1	52.5	-4.0	0.002
Z5XKR8	LuxR family transcriptional regulator	24.7	-4.0	0.002
Z5XU87	Tungsten formylmethanofuran dehydrogenase	43.1	-4.3	0.000
Z5XTE1	Acetylglutamate kinase	27.0	-4.3	0.000
Z5XPE1	Chaperone protein DnaJ	41.2	-4.7	0.003
Z5XQU6	Ribulose phosphate epimerase	25.9	-4.8	0.001
Z5XWA9	Ketol-acid reductoisomerase	54.0	-5.1	0.004
Z5XSL4	Quinolate synthase A	38.0	-5.2	0.009
Z5XLD4	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	49.1	-5.3	0.009
Z5XTM7	Sulfate adenyltransferase subunit 2	34.6	-5.3	0.003
Z5XKV9	Transketolase	72.2	-5.6	0.000
Z5XL51	Cysteine desulfurase	45.4	-5.8	0.000
Z5XNX0	Uncharacterized protein	26.3	-5.8	0.000
Z5XMY9	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG	69.7	-6.2	0.009
Z5XN71	Phosphate transport regulator	26.0	-6.4	0.007
Z5XUU7	NADH:flavin oxidoreductase	38.1	-6.9	0.004
Z5XQQ9	Chitin-binding protein	21.3	-6.9	0.007
Z5XUR7	tRNA-2-methylthio-N(6)-dimethylallyladenosine synthase	53.9	-7.9	0.001
Z5XKD3	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	25.8	-8.1	0.002
Z5XWU8	Uncharacterized protein	22.1	-8.2	0.003
Z5XR01	Ribonucleotide reductase subunit alpha	13.6	-8.4	0.004
Z5XQG2	Uncharacterized protein	28.8	-9.0	0.003

^aProteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed with an absolute fold change greater than 2 and lower than 10; ^bAccording to Uniprot ID.

Tableau AIII.2: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in biofilm conditions and is treated with copper^a

Protein ID ^b	Protein Name	Mol. Weight [kDa]	Fold-Change Cu-treated/Ctrl	p-value
AOA0P7EJ82	Protein phosphatase CheZ	28.4	9.7	0.0011
Z5XP53	Replicative DNA helicase	50.8	9.7	0.0001
Z5XUU7	NADH:flavin oxidoreductase	38.1	9.6	0.0001
Z5XSE7	GCN5 family acetyltransferase	22.2	9.6	0.0002
Z5XNF6	50S ribosomal protein L15	15.1	9.6	0.0095
Z5XNM8	Succinylglutamate desuccinylase	41.1	9.1	0.0021
Z5XW52	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	16.1	9.0	0.0000
Z5XQM7	Protein BatD	60.4	9.0	0.0001
Z5XR12	Nitrate reductase	58.3	8.8	0.0002
Z5XQF6	Phage shock protein A	24.9	8.7	0.0035
AOA0P7DZT8	Trigger factor	47.7	8.6	0.0001
Z5XWM9	Uncharacterized protein	19.7	8.1	0.0041
Z5XNH0	Uncharacterized protein	14.5	8.0	0.0078
Z5XLX6	50S ribosomal protein L17	14.9	8.0	0.0037
Z5XSY9	Uncharacterized protein	14.8	7.9	0.0050
Z5XLZ4	50S ribosomal protein L14	13.4	7.9	0.0002
Z5XNU8	Uncharacterized protein	94.8	7.9	0.0000
Z5XLZ5	Extracellular DNA degradation protein, EddB	97.2	7.6	0.0018
Z5XQ92	Protein phosphatase CheZ	28.5	7.5	0.0042
Z5XQG2	Uncharacterized protein	28.8	7.4	0.0002
Z5XLT6	Cobalamin biosynthesis protein CobQ	28.5	7.3	0.0034
AOA0P7E9Z8	50S ribosomal protein L19	13.4	7.3	0.0037
Z5XTV4	Phenylalanine 4-monooxygenase	30.4	7.2	0.0001
Z5XM20	Cold-shock protein	7.5	7.2	0.0002
Z5XKT4	50S ribosomal protein L5	20.2	7.1	0.0006
Z5XTT9	Anti-sigma B factor antagonist	11.2	7.1	0.0030
Z5XUK1	GTP cyclohydrolase FolE2	34.0	7.0	0.0003
Z5XMS0	Nucleoid occlusion factor SlmA	22.5	6.9	0.0029
Z5XTL2	Probable cytosol aminopeptidase	54.8	6.8	0.0002
Z5XSE8	Flagellar motor switch protein FliM	41.2	6.7	0.0002
Z5XLG5	Peptidase M13	77.3	6.5	0.0001
Z5XRT2	50S ribosomal protein L7/L12	12.1	6.5	0.0002
Z5XUH2	RNA polymerase subunit sigma	21.6	6.5	0.0041
Z5XP56	Long-chain fatty acid--CoA ligase	79.7	6.4	0.0002
Z5XLU5	FMN reductase	19.9	6.4	0.0025
AOA0P7DXG1	Nucleotide-binding protein AT00_11605	32.2	6.4	0.0098
Z5XQV5	Flagellar basal-body rod protein FlgG	28.0	6.4	0.0008
Z5XQ72	50S ribosomal protein L1	24.8	6.3	0.0001
Z5XS06	RNA polymerase sigma factor FliA	27.2	6.2	0.0060
Z5XNR9	50S ribosomal protein L22	12.0	6.2	0.0037
AOA0P7E7H0	Uncharacterized protein	23.2	6.2	0.0000
Z5XM39	60 kDa chaperonin	57.3	6.1	0.0001
Z5XQ95	Agmatinase	33.7	6.1	0.0047
Z5XME0	Xaa-Pro dipeptidase	47.1	6.0	0.0025
Z5XMC9	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	37.1	5.9	0.0015
Z5XNE9	Flagellar motor switch protein FliN	14.6	5.9	0.0055
Z5XMZ8	ATP synthase subunit beta	49.7	5.8	0.0001
Z5XSH6	Protein GrpE	22.6	5.8	0.0000
Z5XSN1	Dipeptidyl carboxypeptidase	80.9	5.6	0.0001
Z5XM80	50S ribosomal protein L4	21.9	5.6	0.0001
AOA0P7DT01	Urocanate hydratase	74.2	5.5	0.0031
Z5XPZ1	RND transporter	38.4	5.5	0.0003
Z5XW68	Uncharacterized protein	101.4	5.5	0.0055
Z5XPE5	Uncharacterized protein	49.0	5.4	0.0086
Z5XW70	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	53.1	5.4	0.0001
Z5XTR1	Enoyl-CoA hydratase	27.5	5.4	0.0022
AOA0P7E7U6	Peptidase S9	85.0	5.4	0.0035
Z5XN54	Trigger factor	47.7	5.3	0.0001
Z5XMC5	Oxidoreductase	36.3	5.2	0.0020
Z5XL85	30S ribosomal protein S19	10.5	5.1	0.0000
Z5XTL0	Keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	21.6	5.1	0.0002
Z5XKY3	50S ribosomal protein L2	29.9	5.1	0.0001

Annexe III

Z5XLQ8	Chemotaxis protein	58.2	5.0	0.0004
Z5XNS7	50S ribosomal protein L3	22.2	5.0	0.0003
AOA0P7DWQ0	Uncharacterized protein	23.7	4.9	0.0001
Z5XQN4	Membrane protein TolA	35.4	4.6	0.0074
Z5XRF7	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	43.2	4.6	0.0001
Z5XNR3	Uronate isomerase	54.4	4.6	0.0006
Z5XU35	Uncharacterized protein	69.4	4.6	0.0060
Z5XPM7	Cytochrome C oxidase subunit II	49.5	4.6	0.0000
Z5XPU0	Putative beta-barrel assembly-enhancing protease	54.3	4.5	0.0026
Z5XS30	Transcriptional regulator HU subunit alpha	9.2	4.5	0.0004
Z5XKE1	50S ribosomal protein L23	11.2	4.5	0.0039
Z5XTW0	Uncharacterized protein	23.3	4.5	0.0003
AOA0P7E5J5	Aldehyde dehydrogenase	55.4	4.5	0.0002
Z5XPC8	Uncharacterized protein	36.4	4.4	0.0012
Z5XU73	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36.0	4.4	0.0000
Z5XRJ9	50S ribosomal protein L13	15.9	4.4	0.0035
Z5XV43	Protein RecA	37.5	4.4	0.0012
Z5XQM3	AAA family ATPase	35.1	4.4	0.0000
Z5XT54	Lactoylglutathione lyase	20.2	4.3	0.0061
Z5XQ14	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	76.2	4.3	0.0000
Z5XU48	Membrane protein	33.1	4.3	0.0069
Z5XV64	50S ribosomal protein L20	13.5	4.2	0.0021
Z5XU64	Chemotaxis protein CheW	18.2	4.2	0.0040
Z5XS56	Ribosome-binding factor A	15.3	4.2	0.0039
Z5XM26	a-glutamyl phosphate reductase	44.6	4.1	0.0055
AOA0P7DP76	Amidohydrolase	42.5	4.0	0.0067
AOA0P7E746	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	75.9	4.0	0.0014
Z5XL22	50S ribosomal protein L28	9.0	3.9	0.0008
Z5XRF5	Aminopeptidase B	45.8	3.9	0.0000
Z5XL21	30S ribosomal protein S4	23.5	3.9	0.0010
Z5XLY7	50S ribosomal protein L6	19.2	3.9	0.0000
Z5XP62	50S ribosomal protein L9	15.7	3.8	0.0003
Z5XSB3	Energy transducer TonB	28.8	3.8	0.0049
Z5XQ90	Peptidase M14	94.9	3.8	0.0004
Z5XR76	Single-stranded DNA-binding protein	24.8	3.8	0.0003
Z5XR42	5-nucleotidase SurE	26.8	3.8	0.0000
Z5XTD8	Protein-export protein SecB	18.0	3.7	0.0044
Z5XVH8	Phosphoribulokinase	33.8	3.6	0.0008
AOA0P7EE63	RNA polymerase sigma factor FliA	26.3	3.6	0.0082
Z5XTM1	50S ribosomal protein L10	17.2	3.6	0.0078
Z5XPU4	ATP synthase epsilon chain	15.1	3.6	0.0000
AOA0P7E7V7	Lacl family transcriptional regulator	37.0	3.6	0.0018
Z5XKC4	50S ribosomal protein L24	11.3	3.6	0.0081
Z5XY08	Tryptophan synthase beta chain	42.5	3.6	0.0001
Z5XXU7	Peptidase M17	54.3	3.6	0.0000
Z5XXN8	Beta-ketoacyl synthase	68.3	3.6	0.0003
Z5XQR9	Malate synthase G	79.9	3.6	0.0000
Z5XPY8	30S ribosomal protein S2	26.9	3.6	0.0003
Z5XRC4	Peptide methionine sulfoxide reductase	47.5	3.5	0.0014
Z5XX38	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase	44.9	3.5	0.0019
Z5XR31	Ribosomal protein S6 modification protein	16.0	3.4	0.0077
Z5XXK3	50S ribosomal protein L27	9.1	3.4	0.0075
Z5XNG1	30S ribosomal protein S8	14.0	3.4	0.0024
Z5XMD5	Uncharacterized protein	9.4	3.4	0.0028
Z5XTC2	General secretion pathway protein GspB	40.3	3.4	0.0026
Z5XQJ1	DNA mismatch repair protein MutH	25.0	3.4	0.0027
Z5XNH8	Flagellar hook protein FlgE	47.0	3.3	0.0000
Z5XRB7	30S ribosomal protein S21	8.6	3.3	0.0098
Z5XKE6	Alkyl hydroperoxide reductase	22.6	3.3	0.0014
Z5XP68	30S ribosomal protein S30	13.2	3.3	0.0009
Z5XKU0	Uncharacterized protein	93.4	3.2	0.0001
Z5XLL9	Type II secretion system protein GspC	34.9	3.2	0.0002
Z5XTC3	Dihydropolipyllysine-residue succinyl	54.0	3.2	0.0000
Z5XL24	50S ribosomal protein L30	6.7	3.2	0.0087
Z5XTL5	30S ribosomal protein S7	17.5	3.2	0.0012
Z5XVI3	Cell division protein FtsA	44.4	3.1	0.0013
Z5XKQ2	Aldehyde reductase	42.0	3.1	0.0009
Z5XNE1	AMP-dependent synthetase	51.2	3.1	0.0039

Annexe III

Z5XRU5	3-5-bisphosphate nucleotidase	28.0	3.0	0.0002
Z5XP80	Glutathione reductase	49.0	3.0	0.0004
Z5XKA4	Phage-shock protein	25.1	3.0	0.0031
Z5XQ38	Aldolase	28.4	3.0	0.0000
Z5XST6	Amidohydrolase	117.8	2.9	0.0009
Z5XTG0	50S ribosomal protein L21	11.5	2.9	0.0083
Z5XVQ5	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	36.8	2.8	0.0005
Z5XUF0	Ribose-phosphate pyrophosphokinase	34.4	2.8	0.0001
Z5XKB0	Serine protease	127.5	2.8	0.0012
Z5XKL6	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	13.4	2.8	0.0004
Z5XS53	Hemin receptor	17.2	2.8	0.0044
Z5XKM9	Uncharacterized protein	41.2	2.8	0.0054
Z5XSD8	Lipoprotein	69.0	2.7	0.0045
Z5XS31	Uncharacterized protein	42.6	2.7	0.0052
Z5XKP2	Uncharacterized protein	15.2	2.7	0.0039
Z5XLS2	Aldehyde dehydrogenase	55.3	2.7	0.0029
Z5XPF3	Peptidase M16	108.7	2.7	0.0070
Z5XQ65	Lactoylglutathione lyase	15.0	2.7	0.0013
Z5XVC3	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase	35.2	2.7	0.0012
Z5XKE0	50S ribosomal protein L16	15.7	2.7	0.0033
Z5XKC8	Alkaline phosphatase	65.2	2.7	0.0005
Z5XVF0	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	39.8	2.7	0.0000
Z5XRR3	Phosphoheptose isomerase	21.3	2.6	0.0004
Z5XR1	Probable septum site-determining protein MinC	25.2	2.6	0.0014
Z5XL33	Rod shape-determining protein MreB	37.0	2.6	0.0043
Z5XXJ8	Dihydrolipoyl dehydrogenase	50.3	2.6	0.0000
Z5XVG7	3-ketoacyl-ACP reductase	26.7	2.6	0.0005
Z5XQ56	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	16.1	2.5	0.0038
Z5XQ01	2OG-Fe(II) oxygenase	31.5	2.5	0.0002
Z5XNM4	Uncharacterized protein	24.7	2.5	0.0007
Z5XM74	30S ribosomal protein S3	25.7	2.5	0.0085
AOA0P7EG17	DNA degradation protein EddB	98.7	2.5	0.0001
Z5XW40	Peptidase S9	85.0	2.5	0.0003
AOA0P7DTD4	30S ribosomal protein S9	14.6	2.5	0.0000
Z5XQR5	Acyltransferase	33.2	2.5	0.0000
Z5XS25	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase	17.8	2.5	0.0022
Z5XKK3	a chain	31.4	2.5	0.0013
Z5XMT9	Ribulose-phosphate 3-epimerase	23.8	2.5	0.0020
Z5XXF5	30S ribosomal protein S1	61.0	2.5	0.0007
Z5XTG2	Acyl-CoA dehydrogenase	41.8	2.5	0.0000
Z5XSD5	Magnesium transporter	33.1	2.4	0.0003
Z5XSC3	UPF0250 protein AOG27_03855	10.4	2.4	0.0018
Z5XMA8	Transcriptional regulator NarL	23.8	2.4	0.0062
Z5XPG9	Xaa-Pro dipeptidase	45.4	2.4	0.0011
Z5XKE4	Hydrolase	92.9	2.4	0.0004
Z5XM53	Glutamine synthetase	51.8	2.4	0.0001
Z5XMX9	Histidine ammonia-lyase	56.3	2.4	0.0040
Z5XVM0	Serine endoprotease DegQ	47.3	2.4	0.0010
Z5XKX1	Tryptophan 2,3-dioxygenase	44.3	2.3	0.0039
Z5XVA7	Bifunctional protein HldE	51.9	2.3	0.0049
Z5XSV8	RpiR family transcriptional regulator	30.1	2.3	0.0004
Z5XL89	30S ribosomal protein S10	11.7	2.3	0.0028
Z5XVV1	Malate dehydrogenase	32.0	2.3	0.0006
Z5XVM6	Ribosome maturation factor RimM	19.9	2.3	0.0003
Z5XKL5	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	51.7	2.3	0.0001
Z5XLM9	Uncharacterized protein	24.6	2.3	0.0097
Z5XMV3	Acetylmethionine aminotransferase	43.1	2.2	0.0000
Z5XTU9	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase	29.8	2.2	0.0003
Z5XL51	Cysteine desulfurase	45.4	2.2	0.0039
Z5XS08	Ribosome-recycling factor	20.4	2.2	0.0012
Z5XKT2	30S ribosomal protein S5	17.6	2.2	0.0071
Z5XMW7	Deoxyribose-phosphate aldolase	26.0	2.2	0.0010
Z5XMI3	Histidine ammonia-lyase	53.9	2.2	0.0006
Z5XUP4	Oxidoreductase	22.9	2.1	0.0023
Z5XNW2	L-arabinose isomerase	55.2	2.1	0.0058
Z5XMY8	Dihydrodipicolinate synthase	33.3	2.1	0.0021
Z5XQP1	Diguanylate phosphodiesterase	46.3	2.1	0.0003

Annexe III

Z5XLJ2	Iron-binding protein IscA	11.4	2.1	0.0085
Z5XTQ3	Zn-dependent hydrolase	63.4	2.1	0.0011
Z5XNW7	ADP-ribose diphosphatase	21.2	2.1	0.0071
Z5XV90	Succinylglutamate desuccinylase	39.1	2.1	0.0036
Z5XLD8	Anhydrase	19.2	2.1	0.0016
Z5XQ09	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	22.6	2.1	0.0005
Z5XVK6	Histidine triad (HIT) protein	15.2	2.1	0.0031
Z5XUG6	Tryptophan synthase alpha chain	28.9	2.	0.0016
Z5XWC0	GTP cyclohydrolase 1 type 2 homolog	27.1	2.0	0.0077
Z5XVN2	Fatty acid metabolism regulator protein	27.1	2.0	0.0091
Z5XT51	3-hydroxydecanoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	18.8	-2.0	0.0083
Z5XTA6	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	46.0	-2.0	0.0092
Z5XMW5	Methionyl-tRNA formyltransferase	34.5	-2.0	0.0010
Z5XQ59	Dihydroxy-acid dehydratase	66.0	-2.1	0.0002
Z5XV60	Uncharacterized protein	17.2	-2.1	0.0044
Z5XWP1	5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	38.9	-2.1	0.0054
Z5XKD1	Spermidine synthase	32.1	-2.2	0.0036
Z5XNI3	Chemotaxis protein CheW	34.3	-2.1	0.0047
AOA0N8HJK0	Chemotaxis protein	85.0	-2.1	0.0077
Z5XUM4	Phosphatase	49.9	-2.1	0.0054
Z5XWHO	AAA family ATPase	87.8	-2.1	0.0042
Z5XNF0	Polysaccharide deacetylase	38.7	-2.2	0.0063
Z5XQ68	Anti-sigma factor antagonist	11.4	-2.2	0.0025
Z5XQ99	Glucose-6-phosphate isomerase	60.4	-2.2	0.0003
Z5XSX7	ABC transporter ATP-binding protein	58.7	-2.2	0.0058
Z5XL14	Transcription termination factor Rho	47.1	-2.2	0.0041
Z5XVD0	Methyltransferase	29.9	-2.2	0.0009
Z5XR02	NUDIX hydrolase	15.1	-2.3	0.0050
Z5XPC4	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	140.4	-2.3	0.0014
Z5XVV6	Iron ABC transporter substrate-binding protein	37.3	-2.3	0.0004
Z5XM56	Thiopurine S-methyltransferase	23.8	-2.3	0.0016
Z5XKY1	Cytochrome C	16.3	-2.3	0.0015
Z5XRW3	6-phosphogluconolactonase	25.4	-2.3	0.0000
Z5XKV6	33 kDa chaperonin	31.6	-2.3	0.0001
Z5XX56	Uncharacterized protein	11.1	-2.3	0.0083
AOA0P7DQT4	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	80.2	-2.4	0.0046
AOA0P7EE38	Flagellin	33.5	-2.4	0.0009
Z5XW09	Valine--tRNA ligase	108.4	-2.4	0.0036
Z5XTX7	tRNA hydroxylase	29.2	-2.4	0.0038
Z5XRE0	Chemotaxis protein CheY	25.9	-2.4	0.0095
Z5XP14	Cyanophycinase	61.6	-2.4	0.0055
Z5XTI3	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	56.6	-2.4	0.0021
Z5XR11	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	32.1	-2.4	0.0028
Z5XQT3	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	51.9	-2.4	0.0004
Z5XTN0	NAD-dependent malic enzyme	62.5	-2.4	0.0025
Z5XRJ7	Uncharacterized protein	51.7	-2.4	0.0023
Z5XSN2	tRNA-modifying protein YgfZ	33.6	-2.5	0.0007
Z5XSP8	Probable transcriptional regulatory protein AOG27_12610	26.7	-2.5	0.0068
Z5XUY3	Chemotaxis protein CheY	14.0	-2.5	0.0003
Z5XQP8	N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase	32.8	-2.5	0.0004
Z5XNR4	Acyl-peptide hydrolase	75.0	-2.5	0.0025
Z5XTC0	Adenylate cyclase	57.8	-2.6	0.0015
Z5XXE7	GntR family transcriptional regulator	30.7	-2.6	0.0006
Z5XU85	Alpha-amylase	69.9	-2.6	0.0060
AOA0P7E1X8	Elongation factor G	76.1	-2.6	0.0075
Z5XNM3	UPF0061 protein AT00_20705	52.0	-2.6	0.0071
Z5XM90	Uncharacterized protein	26.7	-2.7	0.0074
Z5XRI5	Aspartate aminotransferase	39.8	-2.7	0.0005
Z5XTF9	Threonine--tRNA ligase	73.3	-2.7	0.0029
Z5XK99	Stress response kinase A	37.2	-2.7	0.0051
Z5XKU5	Arginine decarboxylase	69.6	-2.7	0.0072
AOA0P7EC28	Amino acid decarboxylase	71.4	-2.7	0.0013
Z5XUX6	Agmatine deiminase	39.3	-2.7	0.0042
AOA0N8HKN3	Aspartate aminotransferase	40.0	-2.7	0.0054
Z5XND2	Sucrose phosphorylase	54.2	-2.7	0.0003
Z5XUB9	Uncharacterized protein	45.8	-2.7	0.0029
Z5XLS6	DNA gyrase subunit B	90.4	-2.7	0.0004
Z5XP83	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	20.1	-2.7	0.0020

Annexe III

Z5XW22	DNA mismatch repair protein MutT	19.5	-2.8	0.0042
Z5XKM4	Oxidoreductase	25.5	-2.8	0.0003
Z5XVH7	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase	71.1	-2.8	0.0078
Z5XKN3	Cation tolerance protein CutA	12.2	-2.8	0.0013
Z5XTR2	Riboflavin biosynthesis protein RibD	40.8	-2.8	0.0047
Z5XT71	Succinyl-CoA--3-ketoacid-CoA transferase	22.9	-2.8	0.0011
AOA0P7ELC1	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase	17.9	-2.8	0.0049
Z5XVM9	Arabinose 5-phosphate isomerase	34.2	-2.8	0.0016
Z5XTM2	Endonuclease	43.5	-2.9	0.0003
Z5XLR9	GTP cyclohydrolase 1	20.8	-2.9	0.0001
Z5XN15	Protein translocase subunit SecA	102.8	-2.9	0.0025
Z5XV41	CDP-diaclyglycerol--serine O-phosphatidyltransferase	50.3	-2.9	0.0002
Z5XKK7	7,8-dihydro-8-oxoguanine-triphosphatase	14.9	-2.9	0.0001
Z5XKS7	Elongation factor G	76.1	-3.0	0.0009
Z5XNC3	RNA helicase	47.8	-3.0	0.0005
Z5XUR0	Carbamoyl-phosphate synthase small chain	41.0	-3.0	0.0000
Z5XKD6	GTP-binding protein TypA	66.9	-3.0	0.0006
Z5XV13	L-aspartate oxidase	60.0	-3.0	0.0027
Z5XR78	Glutamate decarboxylase	60.1	-3.0	0.0002
AOA0P7EGS3	Alpha,alpha-trehalase	57.4	-3.0	0.0055
Z5XR93	Phosphodiesterase	57.5	-3.0	0.0011
Z5XTN4	Glutathione S-transferase	22.4	-3.0	0.0064
Z5XZM4	Tryptophan halogenase	57.8	-3.0	0.0099
Z5XP77	Phosphodiesterase	44.6	-3.0	0.0041
Z5XSZ5	Peptide chain release factor 3	59.2	-3.0	0.0016
Z5XYZ6	1,4-D-glucanase	41.2	-3.0	0.0001
Z5XTE9	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	30.3	-3.1	0.0006
Z5XKD2	Aconitate hydratase B	93.8	-3.1	0.0024
Z5XYF0	Cob(II)yrinic acid a,c-diamide adenosyltransferase	22.1	-3.1	0.0006
Z5XSK4	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein	14.3	-3.1	0.0003
Z5XQR0	Peptide chain release factor 2	33.4	-3.2	0.0004
Z5XMI1	Ribulokinase	59.1	-3.2	0.0015
Z5XLX1	Guanosine-3,5-bis(Diphosphate) 3-pyrophosphohydrolase	55.1	-3.2	0.0083
AOA0P7E568	Peptide chain release factor 1	40.4	-3.3	0.0002
Z5XMA9	Uncharacterized protein	13.8	-3.3	0.0071
Z5XU47	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	39.9	-3.4	0.0003
Z5XRS5	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase D	23.1	-3.4	0.0011
Z5XUF5	Metal-dependent phosphohydrolase	58.0	-3.4	0.0008
Z5XPG4	Fructokinase	34.7	-3.4	0.0009
Z5XZG1	Glycerate dehydrogenase	33.9	-3.4	0.0000
Z5XV16	tRNA (guanine-N(1)-)-methyltransferase	28.1	-3.5	0.0031
Z5XQE6	Elongation factor Ts	30.4	-3.6	0.0045
Z5XKQ9	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	30.4	-3.5	0.0013
Z5XRT9	a-glutamyl cyclotransferase	19.0	-3.5	0.0051
Z5XUY5	LysR family transcriptional regulator	35.3	-3.5	0.0011
Z5XQH6	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	32.1	-3.6	0.0015
Z5XNS8	Arylsulfatase	56.1	-3.6	0.0074
Z5XN01	7-carboxy-7-deazaguanine synthase	24.9	-3.6	0.0049
Z5XQ80	Long-chain fatty acid--CoA ligase	56.1	-3.6	0.0061
Z5XTM9	Chemotaxis protein CheY	42.8	-3.6	0.0009
Z5XQ89	Chitinase	127.7	-3.6	0.0013
Z5XPP9	Uncharacterized protein	15.7	-3.7	0.0043
Z5XZH6	Twitching motility protein PilT	38.2	-3.7	0.0053
Z5XQ98	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	37.3	-3.7	0.0000
Z5XMV6	Shikimate dehydrogenase (NADP(+))	29.3	-3.7	0.0022
Z5XU20	Uncharacterized protein	16.5	-3.7	0.0063
Z5XLK4	LysR family transcriptional regulator	34.5	-3.7	0.0002
Z5XQ04	Oligoribonuclease	20.6	-3.8	0.0006
Z5XNK8	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	37.7	-3.9	0.0000
Z5XMY1	Chromosomal replication initiator protein DnaA	52.3	-3.9	0.0073
Z5XTB6	Glutamine--tRNA ligase	63.7	-4.0	0.0001
Z5XR64	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthase	41.4	-4.0	0.0025
AOA0P7DTA7	XRE family transcriptional regulator	15.9	-4.0	0.0000
Z5XVJ3	Isoleucine--tRNA ligase	105.2	-4.0	0.0016
Z5XS67	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase M	41.1	-4.1	0.0022
Z5XSF1	Adenosylcobinamide kinase	19.6	-4.1	0.0023
Z5XKR7	Uncharacterized protein	6.5	-4.1	0.0083
Z5XNJ8	DNA-binding protein	7.6	-4.1	0.0003

Annexe III

Z5XTL6	Diguanylate phosphodiesterase	82.1	-4.2	0.0010
Z5XRS7	Thioester dehydrase	13.0	-4.2	0.0090
Z5XN44	Histidine biosynthesis bifunctional protein HisB	38.7	-4.2	0.0019
Z5XSR9	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	32.1	-4.2	0.0000
Z5XRS6	Alanine--tRNA ligase	93.9	-4.2	0.0076
Z5XSG1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	44.4	-4.3	0.0001
Z5XU30	3-ketoacyl-CoA thiolase	46.2	-4.3	0.0000
Z5XW41	Methionine--tRNA ligase	75.9	-4.3	0.0023
Z5XW03	tRNA U34 carboxymethyltransferase	37.0	-4.3	0.0031
Z5XRG3	Glutathione peroxidase	21.5	-4.4	0.0044
Z5XSZ1	Redoxin	21.1	-4.4	0.0007
Z5XM83	Acyl-CoA thioesterase	29.5	-4.4	0.0062
Z5XS09	Anthranilate synthase component 1	57.3	-4.5	0.0007
Z5XUY1	Cyclic diguanosine monophosphate-binding protein	13.8	-4.5	0.0058
Z5XTH9	DNA primase	66.2	-4.5	0.0022
Z5XZC1	Uncharacterized protein	27.9	-4.6	0.0092
Z5XQ52	tRNA dimethylallyltransferase	34.8	-4.7	0.0000
Z5XXQ4	Sorbose dehydrogenase	40.4	-4.7	0.0024
Z5XPN5	Acetolactate synthase 3 regulatory subunit	18.4	-4.7	0.0088
Z5XTG5	Uncharacterized protein	21.5	-4.7	0.0031
Z5XSE4	Glyoxalase	14.2	-4.7	0.0009
Z5XRX6	7-cyano-7-deazaguanine synthase	24.2	-4.8	0.0010
Z5XQL0	Peptidoglycan-binding protein	61.6	-4.8	0.0095
Z5XLA3	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	26.6	-4.8	0.0012
Z5XPN1	Isoprenoid biosynthesis protein	22.9	-4.9	0.0029
Z5XKS1	FMN reductase	26.3	-4.9	0.0010
Z5XYF8	5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	23.0	-5.0	0.0015
Z5XR77	Argininosuccinate synthase	43.7	-5.0	0.0003
Z5XT14	Asparagine--tRNA ligase	52.5	-5.0	0.0000
Z5XKB2	UPF0502 protein AT00_21440	23.7	-5.0	0.0000
Z5XR87	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3	37.7	-5.1	0.0039
Z5XUF9	Uncharacterized protein	84.1	-5.1	0.0033
Z5XTK5	Probable transcriptional regulatory protein AOG27_02490	26.3	-5.1	0.0033
Z5XMR3	Tail fiber protein	109.1	-5.2	0.0085
Z5XR97	Flagellar basal body-associated protein Flil-like protein	15.4	-5.2	0.0064
Z5XQB5	Chloramphenicol acetyltransferase	24.9	-5.2	0.0059
Z5XNP9	Uncharacterized protein	23.0	-5.2	0.0013
Z5XTQ8	Aspartate kinase	86.9	-5.3	0.0029
Z5XN26	Glycosyl hydrolase	25.7	-5.3	0.0001
Z5XN52	2Fe-2S ferredoxin	12.4	-5.4	0.0049
Z5XRH3	Ribonuclease D	43.8	-5.4	0.0001
Z5XKS2	Methylthioribose kinase	45.4	-5.4	0.0009
Z5XTI8	Pyrroline-5-carboxylate reductase	29.3	-5.4	0.0041
Z5XPA1	a-D-glutamyl-meso-2,6-	49.1	-5.5	0.0056
Z5XRI2	Uncharacterized protein	21.4	-5.6	0.0064
Z5XN74	tRNA pseudouridine synthase B	34.4	-5.6	0.0035
Z5XVG4	Esterase	21.3	-5.6	0.0064
Z5XPR1	Uncharacterized protein	19.3	-5.6	0.0007
Z5XUP0	Uncharacterized protein	27.7	-5.6	0.0069
Z5XPL6	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF	28.4	-5.8	0.0003
Z5XL73	N-acylglucosamine 2-epimerase	47.3	-5.9	0.0051
Z5XTS7	Uncharacterized protein	12.2	-5.9	0.0005
Z5XR26	Uncharacterized protein	11.1	-6.0	0.0005
Z5XU71	Octanoyltransferase	24.6	-6.0	0.0050
Z5XTQ2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	55.7	-6.1	0.0001
Z5XRR5	3-hydroxylacyl-ACP dehydratase	16.8	-6.1	0.0000
Z5XUS5	Alanine acetyltransferase	16.7	-6.2	0.0002
Z5XM08	Phosphatase	56.3	-6.2	0.0004
Z5XRM6	Polynucleotide adenyltransferase	41.4	-6.3	0.0043
Z5XLL8	Uncharacterized protein	29.8	-6.4	0.0047
Z5XQI8	5-methyltetrahydropteroyltryglutamate--homocysteine methyltransferase	38.7	-6.4	0.0008
Z5XVK4	RNA helicase	49.2	-6.4	0.0001
Z5XLT7	Uncharacterized protein	14.1	-6.4	0.0013
Z5XSE9	Uncharacterized protein	23.5	-6.5	0.0050
Z5XLE8	Serine/threonine protein phosphatase	19.0	-6.6	0.0005

Annexe III

Z5XRJ1	Histidine biosynthesis bifunctional protein HisE	22.5	-6.6	0.0000
Z5XQV0	Peptidase S8	191.0	-6.6	0.0023
Z5XPY7	Uncharacterized protein	30.3	-6.7	0.0066
Z5XRA1	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase	21.2	-6.8	0.0009
Z5XQD6	Chemotaxis protein CheR	31.3	-6.8	0.0003
Z5XLV3	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase	52.6	-6.9	0.0045
Z5XKV2	Alpha-N-arabinofuranosidase	38.7	-7.0	0.0010
Z5XSF2	Recombination protein RecR	21.9	-7.1	0.0013
Z5XQM0	Exodeoxyribonuclease I	55.1	-7.1	0.0016
Z5XLU9	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	50.0	-7.3	0.0008
Z5XN55	Diguanylate cyclase	57.7	-7.3	0.0034
Z5XMP9	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	21.5	-7.5	0.0059
Z5XN16	2-isopropylmalate synthase	56.6	-7.6	0.0069
Z5XWC5	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	23.3	-7.8	0.0003
A0A0P7DV73	Transketolase	72.3	-7.9	0.0008
Z5XU72	Uncharacterized protein	19.0	-7.9	0.0011
Z5XWK0	Carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing)	117.3	-7.9	0.0019
Z5XR34	Uncharacterized protein	55.9	-8.0	0.0034
Z5XY81	Dihydropteroate synthase	30.8	-8.1	0.0010
Z5XTK9	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	30.5	-8.3	0.0025
Z5XU45	Chorismate mutase	42.3	-8.4	0.0000
Z5XYN4	CTP synthase	60.2	-8.5	0.0000
Z5XP09	Molybdopterin adenylyltransferase	19.4	-8.5	0.0040
Z5XUA3	Uracil-DNA glycosylase	25.1	-8.6	0.0084
Z5XK98	tRNA/tmRNA (uracil-C(5))-methyltransferase	42.2	-8.7	0.0011
Z5XTR8	Geranyl transferase	32.1	-8.7	0.0003
Z5XTS6	Uncharacterized protein	47.3	-8.7	0.0021
Z5XR51	Uncharacterized protein	106.5	-8.9	0.0003
Z5XPQ6	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B	48.0	-9.0	0.0029
Z5XUU3	Uncharacterized protein	35.8	-9.2	0.0039
Z5XVZ6	Acetate kinase	43.4	-9.2	0.0051
Z5XTP2	ABC transporter substrate-binding protein	34.5	-9.5	0.0014

^aProteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed with an absolute fold change greater than 2 and lower than 10; ^bAccording to Uniprot ID,

Tableau AIII.3: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in planktonic conditions and treated with copper^a

Protein ID ^b	Protein Name	Mol. Weight [kDa]	Fold-Change Cu-treated/Ctrl	p-value
Z5XKE6	Alkyl hydroperoxide reductase	22.6	7.7	0.0004
Z5XM32	Isocitrate lyase	59.4	7.1	0.0076
Z5XE1	Cyclic nucleotide-binding protein	71.6	7.0	0.0012
Z5XY08	Tryptophan synthase beta chain	42.5	6.9	0.0003
Z5XLJ6	Inositol monophosphatase	29.1	5.7	0.0022
Z5XSC8	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase H	17.6	5.4	0.0020
Z5XUH2	RNA polymerase sigma factor RpoE	21.6	5.4	0.0003
Z5XKU0	Uncharacterized protein	93.4	5.3	0.0004
Z5XPZ1	RND transporter	38.4	5.2	0.0027
Z5XMH0	ATP-dependent protease subunit HslV	18.4	5.1	0.0008
Z5XR14	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	9.8	4.9	0.0038
Z5XSC5	Transcriptional regulator	25.8	4.8	0.0006
Z5XVH9	Acyltransferase	64.7	4.6	0.0015
Z5XKL6	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	13.4	4.5	0.0002
Z5XQP7	Uridine kinase	24.0	4.5	0.0042
Z5XM60	Transcriptional regulator	35.2	4.5	0.0045
Z5XSB2	Transcriptional regulator	16.4	4.2	0.0028
Z5XNM7	Alpha-L-glutamate ligase	35.0	4.1	0.0033
AOA0P7E7H0	Uncharacterized protein	23.2	4.1	0.0043
Z5XMB1	TetR family transcriptional regulator	22.9	3.9	0.0009
Z5XQ35	ATP-dependent RNA helicase DeaD	68.5	3.9	0.0094
Z5XR70	Uncharacterized protein	33.6	3.5	0.0033
Z5XN55	Diguanylate cyclase	57.7	3.4	0.0027
Z5XSN1	Dipeptidyl carboxypeptidase II	80.9	3.4	0.0079
Z5XV10	RNA polymerase-binding transcription factor DksA	14.1	3.3	0.0056
Z5XLA0	ATP phosphoribosyltransferase	33.0	3.3	0.0002
Z5XVI3	Cell division protein FtsA	44.4	3.2	0.0058
Z5XPN5	Acetolactate synthase	18.4	3.0	0.0083
Z5XPA7	50S ribosomal protein L31	7.9	3.0	0.0020
Z5XSE8	Flagellar motor switch protein FliM	41.	3.0	0.0058
Z5XLA3	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase	26.6	3.0	0.0055
Z5XRM2	S-adenosylmethionine synthase	41.6	2.9	0.0004
Z5XPX8	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase	36.5	2.9	0.0004
Z5XPM6	Der GTPase-activating protein YihI	23.0	2.9	0.0042
AOA0P7DSZ1	Uncharacterized protein	48.9	2.8	0.0033
Z5XM39	60 kDa chaperonin	57.3	2.8	0.0008
Z5XLR4	Potassium transporter peripheral membrane component	50.1	2.6	0.0064
Z5XTZ7	Translation initiation factor IF-2	96.6	2.6	0.0015
Z5XNE8	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	36.2	2.4	0.0025
Z5XKL5	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	51.7	2.4	0.0031
Z5XMW0	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	149.5	2.3	0.0031
Z5XPL0	Histidinol dehydrogenase	46.3	2.3	0.0002
Z5XKX7	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	28.2	2.3	0.0004
Z5XND8	Uncharacterized protein	21.3	2.3	0.0015
Z5XQ14	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	76.2	2.2	0.0000
Z5XVM0	Serine endoprotease DegQ	47.3	2.1	0.0030
Z5XPQ2	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	154.4	2.1	0.0006
Z5XQ62	10 kDa chaperonin	10.3	2.0	0.0021
Z5XRZ3	Lipid-A-disaccharide synthase	42.6	-2.0	0.0006
Z5XRI4	Uncharacterized protein	23.9	-2.1	0.0082
Z5XZG1	Glycerate dehydrogenase	33.9	-2.2	0.0022
AOA0P7E568	Peptide chain release factor 1	40.4	-2.2	0.0021
Z5XST1	Aconitate hydratase	94.2	-2.2	0.0021
Z5XKE7	ABC transporter substrate-binding protein	42.0	-2.2	0.0011
Z5XNK8	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	37.7	-2.2	0.0032
Z5XVF1	Uncharacterized protein	33.3	-2.3	0.0091
Z5XSQ4	Monoxygenase	42.7	-2.4	0.0063
Z5XN26	Glycosyl hydrolase	25.7	-2.4	0.0043
Z5XPA1	a-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase	49.1	-2.4	0.0007
Z5XS79	Histidine phosphatase	17.7	-2.5	0.0068

Annexe III

Z5XM26	a-glutamyl phosphate reductase	44.6	-2.6	0.0007
Z5XQP0	Diguanylate phosphodiesterase	28.9	-2.6	0.0008
Z5XTH9	DNA primase	66.2	-2.6	0.0069
Z5XN10	Alcohol dehydrogenase	35.8	-2.7	0.0040
Z5XSZ6	TonB-dependent receptor	84.3	-2.7	0.0020
Z5XLY3	Gluconolactonase	31.3	-2.8	0.0058
Z5XSZ4	UPF0229 protein AT00_03740	48.9	-3.0	0.0002
Z5XZM4	Tryptophan halogenase	57.8	-3.0	0.0029
Z5XRZ5	Iron-sulfur cluster carrier protein	38.3	-3.0	0.0031
Z5XL03	Uncharacterized protein	57.7	-3.1	0.0071
Z5XTQ8	Aspartate kinase	86.9	-3.2	0.0005
Z5XMF0	Chemotaxis protein CheY	44.9	-3.5	0.0049
Z5XTA5	Citrate synthase	41.5	-3.6	0.0044
Z5XSG2	Serine/threonine protein kinase	73.6	-3.6	0.0008
Z5XTL6	Diguanylate phosphodiesterase	82.1	-3.6	0.0057
Z5XM14	Diguanylate cyclase	50.4	-3.6	0.0008
A0A0P7DQX9	Flagellin	33.5	-3.6	0.0005
Z5XLE8	Serine/threonine protein phosphatase	19.0	-3.7	0.0008
Z5XMV9	Glycosyltransferase	39.8	-3.8	0.0072
Z5XWLO	Aspartate carbamoyltransferase	37.7	-3.8	0.0054
Z5XPP3	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase	106.2	-3.9	0.0007
Z5XKA5	Uncharacterized protein	16.3	-4.0	0.0041
Z5XUY3	Chemotaxis protein CheY	14.0	-4.0	0.0035
Z5XRN8	Glycogen operon protein GlgX homolog	77.1	-4.2	0.0041
Z5XQI2	Diguanylate cyclase	37.2	-4.4	0.0002
Z5XTC3	Dihydropolypyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	54.0	-4.5	0.0013
Z5XPS0	Sugar ABC transporter substrate-binding protein	41.4	-4.6	0.0030
Z5XQA9	Transcriptional regulator	20.0	-4.6	0.0049
Z5XPN1	Isoprenoid biosynthesis protein	22.9	-4.6	0.0008
Z5XQZ4	Diguanylate cyclase	34.2	-4.7	0.0010
Z5XP55	Porin	42.1	-4.8	0.0016
Z5XQ34	Peptidase	56.1	-4.8	0.0002
Z5XKM9	Uncharacterized protein	41.2	-4.9	0.0032
Z5XPG8	Uncharacterized protein	96.8	-5.8	0.0050
Z5XVG9	Histidine kinase	74.5	-5.9	0.0058
Z5XSH5	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	28.7	-6.1	0.0013
Z5XTE6	General secretion pathway protein GspE	62.2	-6.3	0.0099
Z5XM97	Histidine kinase	26.4	-6.5	0.0040
Z5XTK9	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	30.5	-6.9	0.0000
Z5XV81	a-glutamyl-phosphate reductase	36.1	-7.0	0.0042
Z5XP93	Ornithine carbamoyltransferase	33.0	-7.1	0.0006
Z5XTP2	ABC transporter substrate-binding protein	34.5	-7.5	0.0015
Z5XVS8	GNAT family acetyltransferase	17.6	-8.4	0.0003
Z5XUN7	Propionyl-CoA synthetase	69.5	-9.0	0.0002

^aProteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed with an absolute fold change higher than 2 and lower than 10; ^bAccording to Uniprot ID.

Tableau AIII.4: Subset of proteins differentially expressed when *P. lipolytica* TC8 is cultured in planktonic and biofilm conditions and is treated with copper^a

Protein ID ^b	Protein Name	Mol. Weight [kDa]	Planktonic Culture		Biofilm Culture	
			Fold-Change Cu-treated/Ctrl	p-value	Fold-Change Cu-treated/Ctrl	p-value
Z5XQ22	Transporter	48.8	27.2	0.0027	104.1	0.0099
Z5XN79	Hemolysin	54.0	36.9	0.0003	37.2	0.0077
AOA0P7E7H0	Uncharacterized protein	23.2	4.1	0.0043	6.1	0.0000
Z5XQS7	Flagellar hook-length control protein	79.2	11.9	0.0060	150.6	0.0001
Z5XM32	Isocitrate lyase	59.4	7.1	0.0076	22.3	0.0010
Z5XLV1	Uncharacterized protein	17.8	24.5	0.0053	21.1	0.0000
Z5XLJ3	Copper resistance protein CopA	67.6	16.1	0.0009	16.9	0.0001
Z5XSC5	Transcriptional regulator	25.8	4.8	0.0006	11.2	0.0001
Z5XSE8	Flagellar motor switch protein FlIM	41.2	2.8	0.0058	6.7	0.0002
Z5XUH2	RNA polymerase sigma factor RpoE	21.6	5.3	0.0003	6.5	0.0041
Z5XM39	60 kDa chaperonin	57.3	2.8	0.0008	6.1	0.0001
Z5XSN1	Dipeptidyl carboxypeptidase II	80.9	3.4	0.0079	5.6	0.0001
Z5XPZ1	RND transporter	38.4	5.2	0.0027	5.5	0.0003
Z5XQI4	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	76.2	2.2	0.0000	4.3	0.0000
Z5XY08	Tryptophan synthase beta chain	42.5	6.9	0.0003	3.6	0.0001
Z5XKE6	Alkyl hydroperoxide reductase	22.6	7.7	0.0004	3.3	0.0014
Z5XKU0	Uncharacterized protein	93.4	5.3	0.0004	3.2	0.0001
Z5XVI3	Cell division protein FtsA	44.4	3.2	0.0058	3.1	0.0013
Z5XKL6	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	13.4	4.5	0.0002	2.8	0.0004
Z5XVM0	Serine endoprotease DegQ	47.3	2.1	0.0030	2.4	0.0010
Z5XKL5	Succinate-semialdehyde dehydrogenase	51.7	2.4	0.0031	2.3	0.0001
Z5XUY3	Chemotaxis protein CheY	14.0	-4.0	0.0035	-2.5	0.0003
Z5XZM4	Tryptophan halogenase	57.8	-2.9	0.0029	-3.0	0.0099
AOA0P7E568	Peptide chain release factor 1	40.4	-2.2	0.0021	-3.3	0.0002
Z5XZG1	Glycerate dehydrogenase	33.9	-2.2	0.0022	-3.4	0.0000
Z5XNK8	UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase	37.7	-2.2	0.0032	-3.9	0.0000
Z5XTL6	Diguanylate phosphodiesterase	82.1	-3.6	0.0057	-4.2	0.0010
Z5XTH9	DNA primase	66.2	-2.6	0.0069	-4.5	0.0022
Z5XPN1	Isoprenoid biosynthesis protein	22.9	-4.5	0.0008	-4.9	0.0029
Z5XTQ8	Aspartate kinase	86.9	-3.2	0.0005	-5.3	0.0029
Z5XN26	Glycosyl hydrolase	25.7	-2.4	0.0043	-5.3	0.0001
Z5XPA1	UDP-N-acetylmuramate--L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-2,6-diaminoheptandioate ligase	49.1	-2.4	0.0007	-5.4	0.0056
Z5XLE8	Serine/threonine protein phosphatase	19.0	-3.7	0.0008	-6.6	0.0005
Z5XTK9	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	30.5	-7.1	0.0000	-8.3	0.0025
Z5XTP2	ABC transporter substrate-binding protein	34.5	-7.7	0.0015	-9.5	0.0014
Z5XWLO	Aspartate carbamoyltransferase	37.7	-3.8	0.0054	-11.5	0.0019
Z5XRN8	Glycogen operon protein GlgX homolog	77.1	-4.2	0.0041	-12.2	0.0081
Z5XLY3	Gluconolactonase	31.2	-2.8	0.0058	-14.1	0.0016
Z5XSX1	TonB-dependent receptor	79.2	-14.3	0.0071	-131.1	0.0022

^aProteins listed in this table were found to be statistically differentially expressed with an absolute fold change higher than 2 and lower than 10; ^bAccording to Uniprot ID.

ANNEXE IV

Liste des molécules putativement identifiées chez les 4 souches TC4, TC7, TC8 et TC11

Tableau IV.1 : Liste des molécules putativement identifiées lors des analyses par UPLC-HRMS des souches TC4, TC7, TC8 et TC11

Annexe IV

Tableau IV.1 : Liste des molécules putativement identifiées lors des analyses par UPLC-HRMS des souches TC4, TC7, TC8 et TC11

Masse	t _r	TC4	TC7	TC8	TC11	Fragments MS/MS	Formule	Identification putative
359,2892	271			x		341 (4) ^a , 323 (3) ^f , 159 (1) ^e , 141 (4) ^e , 133 (9) ^e , 115 (100) ^e , 70 (40) ^e	C ₁₉ H ₃₉ N ₂ O ₄	LOL (C14:0)
385,3052	281	x		x		367 (2) ^a , 349 (2) ^f , 159 (2) ^e , 141 (4) ^e , 133 (7) ^e , 115 (100) ^e , 70 (44) ^e	C ₂₁ H ₄₁ N ₂ O ₄	LOL (C16:1)
373,3267	284	x	x			355 (3) ^a , 337 (5) ^f , 159 (2) ^e , 141 (4) ^e , 133 (7) ^e , 115 (100) ^e , 70 (74) ^e	C ₂₀ H ₄₁ N ₂ O ₄	LOL (C15:0)
343,2957	289	x	x	x	x	240 (100) ⁱ , 183 (4) ^k	C ₁₉ H ₃₉ N ₂ O ₃	Amide lipid (C12:0)
387,3218	294	x	x	x		369 (3) ^a , 351 (5) ^f , 159 (1) ^e , 141 (3) ^e , 133 (7) ^e , 115 (100) ^e , 70 (62) ^e	C ₂₁ H ₄₃ N ₂ O ₄	LOL (C16:0)
399,3207	295	x	x			381 (3) ^a , 363 (5) ^f , 159 (2) ^e , 141 (4) ^e , 133 (9) ^e , 115 (100) ^e , 70 (58) ^e	C ₂₂ H ₄₃ N ₂ O ₄	LOL (C17:1)
299,3059	299		x			282 (14) S, 268 (100) Q, 240 (<1) P, 211 (3) R, 89 (2) ^b , 72 (8) ⁿ	C ₁₈ H ₃₉ N ₂ O	PL (C14:0)
329,3161	302		x			311 (<1) ^a , 268 (100) ⁱ , 211 (2) ^m	C ₁₉ H ₄₁ N ₂ O ₂	HCL (C14:0)
313,3220	303		x			268 (100) ⁱ , 212 (7) ^m , 103 (<1) ^b , 86 (3) ⁿ	C ₁₉ H ₄₁ N ₂ O	CL (C14:0)
413,5187	304			x		395 (4) ^a , 377 (6) ^f , 159 (2) ^e , 141 (5) ^e , 133 (9) ^e , 115 (100) ^e , 70 (37) ^e	C ₂₃ H ₄₅ N ₂ O ₄	LOL (C18:1)
401,3373	305	x	x			383 (4) ^a , 365 (6) ^f , 159 (2) ^e , 141 (4) ^e , 133 (8) ^e , 115 (100) ^e , 70 (51) ^e	C ₂₂ H ₄₅ N ₂ O ₄	LOL (C17:0)
412,2029	310				x	271 (100) ⁱ	C ₁₈ H ₃₉ NO ₇ P	PE (C13:0)
327,3371	323		x			310 (14) S, 296 (100) Q, 268 (1) P, 239 (1) R, 89 (2) ^b , 72 (6) ⁿ	C ₂₀ H ₄₃ N ₂ O	PL (C16:0)
371,3667	324	x	x	x	x	268 (100) ⁱ , 211 (2) ^k	C ₂₁ H ₄₃ N ₂ O ₃	Amide lipid (C14:0)
438,2773	326	x	x			297 (100) ⁱ	C ₂₀ H ₄₁ NO ₇ P	PE (C15:1)
357,3472	328		x			339 (<1) ^a , 296 (100) ⁱ , 239 (1) ^m	C ₂₁ H ₄₅ N ₂ O ₂	HCL (C16:0)
426,2600	328			x		285 (100) ⁱ	C ₁₉ H ₄₁ NO ₇ P	PE (C14:0)
452,4014	336	x	x	x	x	311 (100) ⁱ	C ₂₁ H ₄₃ NO ₇ P	PE (16:1)
440,2784	339	x	x		x	299 (100) ⁱ	C ₂₀ H ₄₃ NO ₇ P	PE (C15:0)
355,3684	346		x			338 (16) S, 324 (100) Q, 296 (4) P, 267 (1) R, 89 (3) ^b , 72 (8) ⁿ	C ₂₂ H ₄₇ N ₂ O	PL (C18:0)
385,3784	349		x			367 (<1) ^a , 324 (100) ⁱ , 267 (<1) ^m	C ₂₃ H ₄₉ N ₂ O ₂	HCL (C18:0)
399,3581	353	x	x	x	x	296 (100) ⁱ , 239 (1) ^k	C ₂₃ H ₄₇ N ₂ O ₃	Amide lipid (C16:0)
466,1714	353	x	x	x	x	325 (100) ⁱ	C ₂₂ H ₄₅ NO ₇ P	PE (C17:1)
454,2917	357	x	x	x	x	313 (100) ⁱ	C ₂₁ H ₄₅ NO ₇ P	PE (C16:0)
480,2578	365			x	x	339 (100) ⁱ	C ₂₃ H ₄₇ NO ₇ P	PE (C18:1)
330,2647	369	x	x	x		312 (1) ^a , 76 (100) ^o	C ₁₈ H ₃₆ NO ₄	GL (β-OH C16:0)
427,3888	380	x	x	x	x	324 (100) ⁱ , 267 (<1) ^k	C ₂₅ H ₅₁ N ₂ O ₃	Amide lipid (C18:0)

Annexe IV

344,2802	382	x	x		326 (1) ^a , 76 (16) ^o	C ₁₉ H ₃₈ NO ₄	GL (β-OH C17:0)
599,4975	392	x	x		581 (1) ^a , 563 (<1) ^f , 373 (8) ^c , 355 (52) ^d , 337 (59) ^g , 159 (7) ^e , 141 (3) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (27) ^e	C ₃₄ H ₆₇ N ₂ O ₆	HOL (C15:0, C14:0)
613,5149	398	x	x	x	595 (1) ^a , 577 (<1) ^f , 387 (5) ^c , 369 (33) ^d , 351 (37) ^g , 159 (7) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (22) ^e	C ₃₅ H ₆₉ N ₂ O ₆	HOL (C16:0, C14:0)
639,5299	403	x	x	x	621 (1) ^a , 603 (<1) ^f , 399 (<1) ^g , 381 (58) ^d , 363 (56) ^g , 159 (7) ^e , 141 (3) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (21) ^e	C ₃₇ H ₇₁ N ₂ O ₆	HOL (C17:1, C15:0)
595,5012	403			x	577 (3) ^a , 359 (8) ^b , 341 (29) ^c , 323 (30) ^d , 159 (5) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (41) ^e	C ₃₅ H ₆₇ N ₂ O ₅	OL (C14:0, C16:1)
627,5304	408		x	x	609 (<1) ^a , 591 (<1) ^f , 387 (8) ^c , 369 (58) ^d , 351 (62) ^g , 159 (7) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (16) ^e	C ₃₆ H ₇₁ N ₂ O ₆	HOL (C16:0, C15:0)
621,5182	409			x	603 (2) ^a , 385 (15) ^b , 367 (54) ^c , 349 (52) ^d , 159 (5) ^e , 141 (3) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (36) ^e	C ₃₇ H ₆₉ N ₂ O ₅	OL (C16:1, C16:1)
609,5168	410			x	591 (3) ^a , 385 (5) ^b , 367 (19) ^c , 349 (19) ^d , 159 (5) ^e , 141 (3) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (44) ^e	C ₃₆ H ₆₉ N ₂ O ₅	OL (C16:1, C15:0)
583,502	412	x	x		565 (3) ^a , 373 (11) ^b , 355 (40) ^c , 337 (45) ^d , 159 (6) ^e , 141 (4) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (38) ^e	C ₃₆ H ₇₁ N ₂ O ₅	OL (C15:0, C14:0)
623,5321	415	x	x	x	605 (2) ^a , 385 (3) ^b , 367 (12) ^c , 349 (12) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (4) ^e , 115 (100) ^e , 70 (24) ^e 605 (2) ^a , 387 (4) ^b , 369 (20) ^c , 351 (18) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (4) ^e , 115 (100) ^e , 70 (24) ^e	C ₃₇ H ₇₁ N ₂ O ₅	OL (C16:1, C16:0) / OL (C16:0, C16:1)
653,5020	416				635 (1) ^a , 603 (<1) ^f , 399 (3) ^c , 381 (27) ^d , 363 (26) ^g , 159 (9) ^e , 141 (4) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (23) ^e	C ₃₈ H ₇₃ N ₂ O ₆	HOL (C17:1, C16:0)
635,5321	416			x	617 (3) ^a , 385 (12) ^b , 367 (49) ^c , 349 (47) ^d , 159 (6) ^e , 141 (4) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (41) ^e	C ₃₈ H ₇₁ N ₂ O ₅	OL (C16:1, C17:1)
641,5462	417	x	x		623 (1) ^a , 605 (<1) ^f , 401 (7) ^c , 383 (50) ^d , 365 (52) ^g , 159 (6) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (15) ^e	C ₃₇ H ₇₃ N ₂ O ₆	HOL (C17:0, C15:0)
597,5184	418	x	x	x	579 (2) ^a , 387 (2) ^b , 369 (8) ^c , 351 (10) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (36) ^e	C ₃₅ H ₆₉ N ₂ O ₅	OL (C16:0, C14:0)
625,5501	425	x	x	x	607 (2) ^a , 387 (11) ^b , 369 (41) ^c , 351 (44) ^d , 159 (6) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (24) ^e	C ₃₇ H ₇₃ N ₂ O ₅	OL (C16:0, C16:0)
611,5354	426	x	x		593 (2) ^a , 387 (12) ^b , 369 (43) ^c , 351 (48) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (4) ^e , 115 (100) ^e , 70 (25) ^e	C ₃₆ H ₇₁ N ₂ O ₅	OL (C16:0, C15:0)
651,5653	429			x	633 (3) ^a , 413 (6) ^b , 395 (24) ^c , 377 (24) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (4) ^e , 115 (100) ^e , 70 (21) ^e	C ₃₉ H ₇₅ N ₂ O ₅	OL (C18:1, C16:0)
649,5498	430			x	631 (2) ^a , 413 (7) ^b , 395 (27) ^c , 377 (27) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (4) ^e , 115 (100) ^e , 70 (23) ^e	C ₃₉ H ₇₃ N ₂ O ₅	OL (C18:1, C16:1)
655,5596	432	x	x		637 (1) ^a , 605 (<1) ^f , 401 (12) ^c , 383 (84) ^d , 365 (87) ^g , 159 (10) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (25) ^e	C ₃₈ H ₇₅ N ₂ O ₆	HOL (C17:0, C16:0)
637,5491	437	x	x	x	619 (2) ^a , 387 (7) ^b , 369 (25) ^c , 351 (27) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (26) ^e	C ₃₈ H ₆₉ N ₂ O ₅	OL (C16:0, 17:1)
677,5806	438			x	659 (3) ^a , 413 (16) ^b , 395 (62) ^c , 377 (62) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (25) ^e	C ₄₁ H ₇₇ N ₂ O ₅	OL (C18:1, C18:1)
653,5808	446		x	x	635 (2) ^a , 415 (8) ^b , 397 (28) ^c , 379 (29) ^d , 159 (5) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (35) ^e	C ₃₉ H ₇₇ N ₂ O ₅	OL (C18:0, C16:0)
691,5941	460			x	674 (2) ^a , 427 (14) ^b , 409 (54) ^c , 391 (54) ^d , 159 (7) ^e , 141 (4) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (34) ^e	C ₄₂ H ₇₉ N ₂ O ₅	OL (C19:1, C18:1)
665,5782	462			x	648 (1) ^a , 413 (9) ^b , 395 (38) ^c , 377 (36) ^d , 159 (7) ^e , 141 (4) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (38) ^e 648 (1) ^a , 401 (9) ^b , 383 (37) ^c , 365 (29) ^d , 159 (7) ^e , 141 (4) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (38) ^e	C ₄₀ H ₇₃ N ₂ O ₅	OL (C18:1, C17:0) / OL (C17:0, C18:1)
635,4144	463			x	494 (100) ⁱ	C ₃₃ H ₆₇ NO ₈ P	PE (C15:0, C13:0)
622,4193	466			x	481 (100) ⁱ	C ₃₂ H ₆₅ NO ₈ P	PE (C14:0, C13:0)
679,594	468			x	661 (2) ^a , 415 (8) ^b , 397 (42) ^c , 379 (34) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (32) ^e 663 (<1) ^a , 413 (7) ^b , 395 (27) ^c , 377 (28) ^d , 159 (4) ^e , 141 (3) ^e , 133 (5) ^e , 115 (100) ^e , 70 (32) ^e	C ₄₁ H ₇₅ N ₂ O ₅	OL (C18:0, C18:1) / OL (C18:1, C18:0)
648,3697	470			x	507 (100) ⁱ	C ₃₄ H ₆₇ NO ₈ P	PE (C13:0, C16:1)

Annexe IV

660,4832	470	x	x			519 (100) ^j	C₃₅H₆₇NO₈P	PE (C15:1, C15:1)
705,3100	476			x		687 (3) ^a , 441 (7) ^b , 423 (27) ^c , 405 (29) ^d , 159 (7) ^e , 141 (4) ^e , 133 (6) ^e , 115 (100) ^e , 70 (31) ^e	C₄₃H₈₁N₂O₅	OL (C20:1, C18:1)
662,4744	485	x	x	x	x	521 (100) ^j	C₃₅H₆₉NO₈P	PE (C15:0, C15:1)
650,4128	492				x	509 (100) ^j	C₃₄H₆₉NO₈P	PE (C14:0, C15:0)
688,3667	494			x	x	547 (100) ^j	C₃₇H₇₁NO₈P	PE (C16:1, C16:1)
676,4888	497	x	x	x	x	535 (100) ^j	C₃₆H₇₁NO₈P	PE (C16:1; 15:0)
664,3379	502		x		x	523 (100) ^j	C₃₅H₇₁NO₈P	PE (C15:0, C15:0)
702,3892	504			x	x	561 (100) ^j	C₃₈H₇₅NO₈P	PE (C17:1, C16:0)
566,4761	509	x	x			342 (21) ^b , 324 (53) ^c , 76 (100) ^o	C₃₄H₆₄NO₅	GL (C15:0, β-OH C17:1)
690,5397	510		x	x		550 (100) ^j	C₃₇H₇₃NO₈P	PE (C16:0, C16:1)
554,4753	514	x	x	x		330 (14) ^b , 312 (62) ^c , 76 (100) ^o	C₃₃H₆₄NO₅	GL (C15:0, β-OH C16:0)
576,4569	514	x	x			352 (2) ^b , 334 (58) ^c , 76 (100) ^o	C₃₅H₆₂NO₅	GL (C15:0, β-OH C18:3)
580,4909	518	x	x			356 (5) ^b , 338 (14) ^c , 76 (100) ^o	C₃₅H₆₆NO₅	GL (C15:0, β-OH C18:1)
568,4914	520	x	x			344 (13) ^b , 326 (53) ^c , 76 (100) ^o	C₃₄H₆₆NO₅	GL (C15:0, β-OH C17:0)
590,4731	521	x	x			366 () ^b , 348 () ^c , 76 () ^o	C₃₆H₆₄NO₅	GL (C15:0, β-OH C19:3)
580,4910	523	x	x			356 (16) ^b , 338 (35) ^c , 90 (100) ^j	C₃₅H₆₈NO₅	AL (C15:0, β-OH C17:1)
590,4731	527	x	x			366 (<1) ^b , 348 (100) ^c , 90 (47) ^j	C₃₆H₆₄NO₅	AL (C15:0, β-OH C18:3)
582,5066	533	x	x			358 (14) ^b , 340 (48) ^c , 90 (100) ^j	C₃₅H₆₆NO₅	AL (C15:0, β-OH C17:0)
604,4887	534	x	x			380 (<1) ^a , 362 (100) ^c , 90 (31) ^j	C₃₇H₆₆NO₅	AL (C15:0, β-OH C19:3)

^a[M+H-H₂O]⁺; ^b[M+h-RCOH]⁺; ^c[M+H-H₂O]⁺; ^d[M+H-2H₂O-RCOH]⁺; ^etypical OL ion fragments; ^f[M+H-2H₂O]⁺; ^g[M+H-3H₂O-RCOH]⁺; ^hcharacteristic fragment of AL; ⁱ[M+H-C₄H₉NO₂]⁺; ^k[M+H-C₇H₁₆N₂O₂]⁺; ^l[M+H-C₂H₇NO]⁺; ^m[M+H-C₅H₁₄N₂O]⁺; ⁿ[M+H-RCOH-NH₃]⁺; ^o[M-RC₃H₂O₂]⁺.

AL: Alanine Lipid; HOL: Hydroxylated ornithine lipid; GL: Glycine lipid; LOL: Lyso-ornithine lipid; OL: Ornithine lipid; PE: Phosphatidylethanolamine; PL: Putrescine lipid

LISTE DES COMMUNICATIONS



Article

L. Favre, A. Ortalo-Magné, S. Greff, T. Pérez, O.P. Thomas, J.-C. Martin, G. Culioli « Discrimination of four marine biofilm forming bacteria by LC-MS metabolomics and influence of culture parameters » Manuscrit soumis le 04/12/2016 à *Journal of Proteome Research* (N° pr-2016-01027p), corrections mineures demandées.

Communications Orales

L. Favre, A. Ortalo-Magné, C. Coclet, J-F. Briand, B. Misson, C. Garnier, G. Culioli « LC-MS based metabolomics in integrated field and laboratory approaches towards unravelling the impact of metal contamination on marine biofilms » *18th International Congress on Marine Corrosion and Fouling*, Toulon, juin 2016.

T. Pollet, **L. Favre**, C. Bressy, B. Misson, D. Debroas, C. Garnier, G. Culioli, J-F. Ghiglione, J-F. Briand « Responses of marine microbial biofilm communities to contrasted antifouling coatings in two french Mediterranean sites » *18th International Congress on Marine Corrosion and Fouling (ICMCF)*, Toulon, juin 2016.

L. Favre, L. Kerloch, J. Swaegers, C. Lapalus, C. Garnier, B. Misson, A. Ortalo-Magné, G. Culioli « Analyse par métabolomique de l'impact du cuivre sur des souches bactériennes issues de biofilms marins » *2^{ème} Journée scientifique du programme PREVENT*, Toulon, avril 2016.

L. Favre, C. Lapalus, C. Garnier, A. Ortalo-Magné, G. Culioli « Etude par métabolomique de l'impact du cuivre sur des souches bactériennes issues d'une zone côtière polluée : la rade de Toulon » *2^{èmes} journées du GDR MediatEC*, Banyuls-sur-Mer, octobre 2015.

L. Favre, A. Ortalo-Magné, G. Culioli « Etude par métabolomique (LC-MS) de souches bactériennes issues de biofilms marins » *9^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau Francophone de métabolomique et Fluxomique (RFMF)*, Lille, juin 2015.

L. Favre, A. Ortalo-Magné, J-C. Martin, G. Culioli « Etude par métabolomique de la chimiodiversité de souches bactériennes issues de biofilms marins » *Journée d'inauguration de la plateforme de Métabolomique Appliquée à L'étude de LA Biodiversité mARine (MALLABAR)*, Marseille, janvier 2015.

L. Favre, A. Ortalo-Magné, G. Culioli « Caractérisation par analyse métabolomique de biomarqueurs bactériens au sein de biofilms marins » *6^{èmes} Doctoriades Euro-méditerranéennes*, Toulon, octobre 2014.

L. Favre, A. Ortalo-Magné, J-C. Martin, G. Culioli « Research of biomarkers from marine biofilm-forming bacteria by metabolomic analysis (LC-MS) » *2^{èmes} Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs de Société Chimique de France (SCF)*, Marseille, octobre 2014.

Communications par affiche

L. Favre, A. Ortalo-Magné, J-C. Martin, J-F. Briand, R. Lami, G. Culioli « LC-MS based metabolic profiling of marine bacterial strains demonstrates variation between free-living and biofilm lifestyles » *18th International Congress on Marine Corrosion and Fouling (ICMCF)*, Toulon, juin 2016.

L. Favre, A. Ortalo-Magné, G. Culioli « Discrimination par métabolomique (LC-MS) de souches bactériennes issues de biofilms marins » *24^{èmes} Journées de la Chimie - SCF PACA*, Toulon, avril 2015.

L. Favre, A. Ortalo-Magné, G. Culioli « Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique à partir de bactéries issues de biofilms marins » *1^{ères} Journées du GDR MediateC*, Paris, octobre 2014.

L. Favre, A. Ortalo-Magné, J-C Martin, G. Culioli « Recherche de biomarqueurs par analyse métabolomique (LC-MS) d'une bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 issue d'un biofilm » *8^{èmes} Journées scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF)*, Lyon, mai 2014.

Autres présentations et participations

- Présentation de « Ma Thèse en 180 secondes » lors des *7^{èmes} Doctoriades Euro-méditerranéennes*, Toulon, octobre 2015.
- Participation à l'école thématique en écologie chimique « *Etudes des médiations chimiques en milieu terrestre et marin : Concepts et approches méthodologiques* », Marseille, juin 2014.
- Co-organisation de l'atelier « *La mer dans tous ses états* » lors des *6^{èmes} Doctoriades Euro-méditerranéennes*, Toulon, octobre 2014.
- Animation de l'atelier « *Orientations* » lors des *Journées de l'excellence et de la réussite du Lycée Raynouard*, Brignoles, avril 2014.

Références bibliographique



Abbott, A.; Abel, P. D.; Arnold, D. W.; Milne, A. Cost–benefit Analysis of the Use of TBT: The Case for a Treatment Approach. *Science of the Total Environment* **2000**, *258* (2000), 5–19.

Alam, M. T.; Merlo, M. E.; Hodgson, D. A.; Wellington, E. M.; Takano, E.; Breitling, R. Metabolic Modeling and Analysis of the Metabolic Switch in *Streptomyces Coelicolor*. *BMC genomics* **2010**, *11* (202).

Allen, J.; Davey, H. .; Broadhurst, D.; Heald, J. K. High-Throughput Classification of Yeast Mutants for Functional Genomics Using Metabolic Footprinting. *Nature Biotechnology* **2003**, *21* (6), 692–696.

Amann, R. I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H. Phylogenetic Identification and in Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological reviews* **1995**, *59* (1), 143–169.

Ammons, M. C. B.; Tripet, P.; Carlson, R. P.; Kirker, K. R.; Gross, M. A.; Stanisich, J. . J.; Copié, V. Quantitative NMR Metabolite Profiling of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus Aureus* Discriminates between Biofilm and Planktonic Phenotypes. *Journal of Proteome Research* **2014**, *13* (6), 2973–2985.

Anderson, D. M.; Morel, F. M. Copper Sensitivity of *Gonyaulax Tamarensis*. *Limnol Oceanogr* **1978**, *23* (2), 283–295.

Andrew, R. W.; Biesinger, K. E.; Glass, G. E. Effects of Inorganic Complexing on the Toxicity of Copper to *Daphnia Magna*. *Water Research* **1976**, *11*, 309–315.

Anjaneyulu, A. S. R.; Rao, N. S. . Juncins G and H: New Briarane Diterpenoids of the Indian Ocean Gorgonian *Juncea Pallas*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1997**, No. 6, 959–962.

Ankrah, N. Y. D.; May, A. L.; Middleton, J. L.; Jones, D. R.; Hadden, M. K.; Gooding, J. R.; LeCleir, G. R.; Wilhelm, S. W.; Campagna, S. R.; Buchan, A. Phage Infection of an Environmentally Relevant Marine Bacterium Alters Host Metabolism and Lysate Composition. *The ISME Journal* **2014**, *8* (5), 1089–1100.

Antón, J.; Lucio, M.; Peña, A.; Cifuentes, A.; Brito-Echeverría, J.; Moritz, F.; Tziotis, D.; López, C.; Urdiain, M.; Schmitt-Kopplin, P.; et al. High Metabolomic Microdiversity within Co-Occurring Isolates of the Extremely Halophilic Bacterium *Salinibacter Ruber*. *PLoS ONE* **2013**, *8* (5), e64701.

Aygun-Sunar, S.; Mandaci, S.; Koch, H.-G.; Murray, I. V. J.; Goldfine, H.; Daldal, F. Ornithine Lipid Is Required for Optimal Steady-State Amounts of c-Type Cytochromes in *Rhodobacter Capsulatus*. *Molecular Microbiology* **2006**, *61* (2), 418–435.

Ballard, T. E.; Richards, J. J.; Wolfe, A. L.; Melander, C. Synthesis and Antibiofilm Activity of a Second-Generation Reverse-Amide Oroidin Library: A Structure–Activity Relationship Study. *Chemistry - A European Journal* **2008**, *14* (34), 10745–10761.

Ballerig, K. S.; Kristich, C. J.; Grindle, S. M.; Oromendia, A.; Beattie, D. T.; Dunny, G. M. Functional Genomics of *Enterococcus Faecalis*: Multiple Novel Genetic Determinants for Biofilm Formation in the Core Genome. *Journal of Bacteriology* **2009**, *191* (8), 2806–2814.

Bao, W.-Y.; Lee, O.-O.; Chung, H.-C.; Li, M.; Qian, P.-Y. Copper Affects Biofilm Inductiveness to Larval Settlement of the Serpulid Polychaete *Hydroides Elegans* (Haswell). *Biofouling* **2010**, *26* (1), 119–128.

Baran, R.; Bowen, B. P.; Bouskill, N. J.; Brodie, E. L.; Yannone, S. M.; Northen, T. R. Metabolite Identification in *Synechococcus Sp. PCC 7002* Using Untargeted Stable Isotope Assisted Metabolite Profiling. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (21), 9034–9042.

Baran, R.; Bowen, B. P.; Northen, T. R. Untargeted Metabolic Footprinting Reveals a Surprising Breadth of Metabolite Uptake and Release by *Synechococcus Sp. PCC 7002*. *Molecular BioSystems* **2011**, *7* (12), 3200–3206.

Beale, D. J.; Morrison, P. D.; Key, C.; Palombo, E. A. Metabolic Profiling of Biofilm Bacteria Known to Cause Microbial Influenced Corrosion. *Water Science & Technology* **2014**, *69* (1), 1.

Beech, I. B.; Sunner, J. Biocorrosion: Towards Understanding Interactions between Biofilms and Metals. *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *15* (3), 181–186.

Benamara, H.; Rihouey, C.; Abbes, I.; Ben Mlouka, M. A.; Hardouin, J.; Jouenne, T.; Alexandre, S. Characterization of Membrane Lipidome Changes in *Pseudomonas Aeruginosa* during Biofilm Growth on Glass Wool. *PLoS ONE* **2014**, *9* (9), e108478.

Bennett, R. F. Industrial Manufacture and Applications of Tributyltin Compounds. *Cambridge Environmental Chemistry Series* **1996**, No. 8, 26–61.

Bernbom, N.; Ng, Y. Y.; Kjelleberg, S.; Harder, T.; Gram, L. Marine Bacteria from Danish Coastal Waters Show Antifouling Activity against the Marine Fouling Bacterium *Pseudoalteromonas Sp. Strain S91* and Zoospores of the Green Alga *Ulva Australis* Independent of Bacteriocidal Activity. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77* (24), 8557–8567.

Bertini, I.; Hu, X.; Luchinat, C. Global Metabolomics Characterization of Bacteria: Pre-Analytical Treatments and Profiling. *Metabolomics* **2014**, *10* (2), 241–249.

Bino, R. J.; Hall, R. D.; Fiehn, O.; Kopka, J.; Saito, K.; Draper, J.; Nikolau, B. J.; Mendes, P.; Roessner-Tunali, U.; Beale, M. H.; et al. Potential of Metabolomics as a Functional Genomics Tool. *Trends in Plant Science* **2004**, *9* (9), 418–425.

Blunt, J. W.; Copp, R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products. *Natural Product Reports* **2007**, *24* (1), 31–86.

Bode, H. B.; Bethe, B.; Hofs, R.; Zeeck, A. Big Effects from Small Changes : Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem* **2002**, *3* (7), 619–627.

Boening, D. W. Ecological Effects, Transport, and Fate of Mercury: A General Review. *Chemosphere* **2000**, *40* (12), 1335–1351.

Bondarczuk, K.; Piotrowska-Seget, Z. Molecular Basis of Active Copper Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Cell Biology and Toxicology* **2013**, *29* (6), 397–405.

Booth, S. C.; Workentine, M. L.; Wen, J.; Shaykhutdinov, R.; Vogel, H. J.; Ceri, H.; Turner, R. J.; Weljie, A. M. Differences in Metabolism between the Biofilm and Planktonic Response to Metal Stress. *Journal of Proteome Research* **2011**, *10* (7), 3190–3199.

Booth, S. C.; George, I. F. S.; Zannoni, D.; Cappelletti, M.; Duggan, G. E.; Ceri, H.; Turner, R. J. Effect of Aluminium and Copper on Biofilm Development of *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* KF707 and *P. Fluorescens* as a Function of Different Media Compositions. *Metallomics* **2013**, *5* (6), 723–735.

Booth, S. C.; Weljie, A. M.; Turner, R. J. Metabolomics Reveals Differences of Metal Toxicity in Cultures of *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* KF707 Grown on Different Carbon Sources. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*.

Bose, U.; Hewavitharana, A. K.; Vidgen, M. E.; Ng, Y. K.; Shaw, P. N.; Fuerst, J. A.; Hodson, M. P. Discovering the Recondite Secondary Metabolome Spectrum of *Salinispora* Species: A Study of Inter-Species Diversity. *PLoS ONE* **2014**, *9* (3), e91488.

Bose, U.; Hewavitharana, A.; Ng, Y.; Shaw, P.; Fuerst, J.; Hodson, M. LC-MS-Based Metabolomics Study of Marine Bacterial Secondary Metabolite and Antibiotic Production in *Salinispora Arenicola*. *Marine Drugs* **2015**, *13* (1), 249–266.

Bowman, J. P. Bioactive Compound Synthetic Capacity and Ecological Significance of Marine Bacterial Genus *Pseudoalteromonas*. *Marine drugs* **2007**, *5* (4), 220–241.

Boyd, T. J.; Wolgast, D. M.; Rivera-Duarte, I.; Holm-Hansen, O.; Hewes, C. D.; Zirino, A.; Chadwick, D. B. Effects of Dissolved and Complexed Copper on Heterotrophic Bacterial Production in San Diego Bay. *Microbial Ecology* **2005**, *49* (3), 353–366.

Braithwaite, R. A.; McEvoy, L. A. Marine Biofouling on Fish Farms and Its Remediation. *Advances in Marine Biology* **2004**, *47*, 215–252.

Briand, J.-F.; Djeridi, I.; Jamet, D.; Coupé, S.; Bressy, C.; Molmeret, M.; Le Berre, B.; Rimet, F.; Bouchez, A.; Blache, Y. Pioneer Marine Biofilms on Artificial Surfaces Including Antifouling Coatings Immersed in Two Contrasting French Mediterranean Coast Sites. *Biofouling* **2012**, *28* (5), 453–463.

Brian-Jaisson, F. Identification et Caractérisation Des Exopolymères de Biofilms de Bactéries Marines, Université de Toulon et du Var, 2014.

Brian-Jaisson, F.; Ortalo-Magné, A.; Guentas-Dombrowsky, L.; Armougom, F.; Blache, Y.; Molmeret, M. Identification of Bacterial Strains Isolated from the Mediterranean Sea Exhibiting Different Abilities of Biofilm Formation. *Microbial Ecology* **2014**, *68* (1), 94–110.

Brian-Jaisson, F.; Molmeret, M.; Fahs, A.; Guentas-Dombrowsky, L.; Culioli, G.; Blache, Y.; Cérantola, S.; Ortalo-Magné, A. Characterization and Anti-Biofilm Activity of Extracellular Polymeric Substances Produced by the Marine Biofilm-Forming Bacterium *Pseudoalteromonas Ulvae* Strain TC14. *Biofouling* **2016**, *32* (5), 547–560.

Brito-Echeverría, J.; Lucio, M.; López-López, A.; Antón, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Rosselló-Móra, R. Response to Adverse Conditions in Two Strains of the Extremely Halophilic Species *Salinibacter Ruber*. *Extremophiles* **2011**, *15* (3), 379–389.

Bull, A. T.; Stach, J. E. M. Marine Actinobacteria: New Opportunities for Natural Product Search and Discovery. *Trends in Microbiology* **2007**, *15* (11), 491–499.

Busscher, H. J.; Weerkamp, A. H. Specific and Non-Specific Interactions in Bacterial Adhesion to Solid Substrata. *FEMS Microbiology Reviews* **1987**, *3* (2), 165–173.

- Callow, M. E.; Callow, J. A. Marine Biofouling: A Sticky Problem. *Biologist* **2002**, *49* (1), 1–5.
- Camps, M.; Briand, J.-F.; Guentas-Dombrowsky, L.; Culioli, G.; Bazire, A.; Blache, Y. Antifouling Activity of Commercial Biocides vs. Natural and Natural-Derived Products Assessed by Marine Bacteria Adhesion Bioassay. *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *62* (5), 1032–1040.
- Camps, M.; Barani, A.; Gregori, G.; Bouchez, A.; Le Berre, B.; Bressy, C.; Blache, Y.; Briand, J.-F. Antifouling Coatings Influence Both Abundance and Community Structure of Colonizing Biofilms: A Case Study in the Northwestern Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **2014**, *80* (16), 4821–4831.
- Canelas, A. B.; ten Pierick, A.; Ras, C.; Seifar, R. M.; van Dam, J. C.; van Gulik, W. M.; Heijnen, J. J. Quantitative Evaluation of Intracellular Metabolite Extraction Techniques for Yeast Metabolomics. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (17), 7379–7389.
- Caraux, G.; Pinloche, S. PermutMatrix: A Graphical Environment to Arrange Gene Expression Profiles in Optimal Linear Order. *Bioinformatics* **2005**, *21* (7), 1280–1281.
- Carini, P.; Van Mooy, B. A.; Thrash, J. C.; White, A.; Zhao, Y.; Campbell, E. O.; Fredricks, H. F.; Giovannoni, S. J. SAR11 Lipid Renovation in Response to Phosphate Starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (25), 7767–7772.
- Carlson, C. Production and Removal Processes. In *Biogeochemistry of marine Dissolved Organic Matter*; Hansell CA, Carlson CA, 2002; pp 91–152.
- Carpentier, B.; Cerf, O. Biofilms and Their Consequences, with Particular Reference to Hygiene in the Food Industry. *Journal of Applied Bacteriology* **1993**, *75* (6), 499–511.
- de Carvalho, C. C. C. R.; Fernandes, P. Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environment. *Marine Drugs* **2010**, *8* (3), 705–727.
- Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D. M.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R. Systematic and Comprehensive Strategy for Reducing Matrix Effects in LC/MS/MS Analyses. *Journal of Chromatography B* **2007**, *852* (1–2), 22–34.
- Champ, M. A. A Review of Organotin Regulatory Strategies, Pending Actions, Related Costs and Benefits. *Science of the Total Environment* **2000**, *258* (1), 21–71.
- Chandramouli, K. H.; Dash, S.; Zhang, Y.; Ravasi, T.; Qian, P.-Y. Proteomic and Metabolomic Profiles of Marine *Vibrio* Sp. 010 in Response to an Antifoulant Challenge. *Biofouling* **2013**, *29* (7), 789–802.
- Chao, L.; Rakshe, S.; Leff, M.; Spormann, A. M. PdeB, a Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterase That Regulates *Shewanella Oneidensis* MR-1 Motility and Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology* **2013**, *195* (17), 3827–3833.
- Characklis, W. G.; Cooksey, K. E. Biofilms and Microbial Fouling. *Biofilms and Microbial Fouling* **1983**, *29*, 93–138.
- Charlier, D.; Glansdorff, N. Biosynthesis of Arginine and Polyamines. *EcoSal Plus*. 2004.
- Chavez-Dozal, A.; Gorman, C.; Nishiguchi, M. K. Proteomic and Metabolomic Profiles Demonstrate Variation among Free-Living and Symbiotic *Vibrio Fischeri* Biofilms. *BMC Microbiology* **2015**, *15* (226).

Chill, L.; Rudi, A.; Akin, M.; Loya, S.; Hizi, A.; Kashman, Y. New Sesterterpenes from Madagascan *Lendenfeldia* Sponges. *Tetrahedron* **2004**, *60* (47), 10619–10626.

Chillappagari, S.; Seubert, A.; Trip, H.; Kuipers, O. P.; Marahiel, M. A.; Miethke, M. Copper Stress Affects Iron Homeostasis by Destabilizing Iron-Sulfur Cluster Formation in *Bacillus Subtilis*. *Journal of Bacteriology* **2010**, *192* (10), 2512–2524.

Chiu, J.; Zhang, R.; Wang, H.; Thiyagarajan, V.; Qian, P.-Y. Nutrient Effects on Intertidal Community: From Bacteria to Invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* **2008**, *358*, 41–50.

Cho, B.-K.; Federowicz, S.; Park, Y.-S.; Zengler, K.; Palsson, B. Deciphering the Transcriptional Regulatory Logic of Amino Acid Metabolism. *Nature Chemical Biology* **2012**, No. 8, 65–71.

Chung, H. C.; Lee, O. O.; Huang, Y.-L.; Mok, S. Y.; Kolter, R.; Qian, P.-Y. Bacterial Community Succession and Chemical Profiles of Subtidal Biofilms in Relation to Larval Settlement of the Polychaete *Hydroides Elegans*. *The ISME Journal* **2010**, *4* (6), 817–828.

Clare, A. Marine Natural Product Antifoulants: Status and Potential. *Biofouling* **1996**, *9* (3), 211–229.

Collet, A.; Cosette, P.; Beloin, C.; Ghigo, J.-M.; Rihouey, C.; Lerouge, P.; Junter, G.-A.; Jouenne, T. Impact of *rpoS* Deletion on the Proteome of *Escherichia Coli* Grown Planktonically and as Biofilm. *Journal of Proteome Research* **2008**, *7* (11), 4659–4669.

Colwell, R. R., Morita, R. Y., Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities. Proceedings of the Second United States-Japan Conference on Marine Microbiology. *The Quarterly Review of Biology* **1975**, *50* (4), 466–466.

Compère, C.; Bellon-Fontaine, M.; Bertrand, P.; Costa, D.; Marcus, P.; Poleunis, C.; Pradier, C.; Rondot, B.; Walls, M. G. Kinetics of Conditioning Layer Formation on Stainless Steel Immersed in Seawater. *Biofouling* **2001**, *17* (2), 129–145.

Cossa, D.; Garnier, C.; Buscail, R.; Elbaz-Poulichet, F.; Mikac, N.; Patel-Sorrentino, N.; Tessier, E.; Rigaud, S.; Lenoble, V.; Gobeil, C. A Michaelis–Menten Type Equation for Describing Methylmercury Dependence on Inorganic Mercury in Aquatic Sediments. *Biogeochemistry* **2014**, *119* (1–3), 35–43.

Costello, M. J.; Bouchet, P.; Boxshall, G.; Fauchald, K.; Gordon, D.; Hoeksema, B. W.; Poore, G. C. B.; van Soest, R. W. M.; Stöhr, S.; Walter, T. C.; et al. Global Coordination and Standardisation in Marine Biodiversity through the World Register of Marine Species (WoRMS) and Related Databases. *PLoS ONE* **2013**, *8* (1), e51629.

Costerton, J. W.; Geesey, G. .; Cheng, K.-J. How Bacteria Stick. *Scientific American* **1978**, *238*, 86–95.

Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M. Microbial Biofilms. *Annual Reviews in Microbiology* **1995**, *49* (1), 711–745.

Coucheney, E.; Daniell, T. J.; Chenu, C.; Nunan, N. Gas Chromatographic Metabolic Profiling: A Sensitive Tool for Functional Microbial Ecology. *Journal of Microbiological Methods* **2008**, *75* (3), 491–500.

Cui, Q.; Lewis, I. A.; Hegeman, A. D.; Anderson, M. E.; Li, J.; Schulte, C. F.; Westler, W. M.; Eghbalnia, H. R.; Sussman, M. R.; Markley, J. L. Metabolite Identification via the Madison Metabolomics Consortium Database. *Nature Biotechnology* **2008**, *26* (2), 162–164.

- Cunin, R.; Glansdorff, N.; Pierard, A.; Stalon, V. Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria. *Microbiological reviews* **1986**, *50* (3), 314–352.
- Dang, H.; Lovell, C. R. Numerical Dominance and Phylotype Diversity of Marine *Rhodobacter* Species during Early Colonization of Submerged Surfaces in Coastal Marine Waters as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis and Fluorescence in Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68* (2), 496–504.
- Dang, H.; Lovell, C. R. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2016**, *80* (1), 91–138.
- Dang, H.; Li, T.; Chen, M.; Huang, G. Cross-Ocean Distribution of *Rhodobacterales* Bacteria as Primary Surface Colonizers in Temperate Coastal Marine Waters. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, *74* (1), 52–60.
- Dawes, E. A.; Ribbons, D. W. Some Aspects of the Endogenous Metabolism of Bacteria. *Bacteriological reviews* **1964**, *28* (2), 126.
- De Koning, W.; Van Dam, K. A Method for the Determination of Changes of Glycolytic Metabolites in Yeast on a Subsecond Time Scale Using Extraction at Neutral pH. *Analytical Biochemistry* **1992**, *204*, 118–123.
- Decho, A. W.; Frey, R. L.; Ferry, J. L. Chemical Challenges to Bacterial AHL Signaling in the Environment. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (1), 86–99.
- Delmar, J. A.; Su, C.-C.; Yu, E. W. Bacterial Multidrug Efflux Transporters. *Annual Review of Biophysics* **2014**, *43* (1), 93–117.
- Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26* (1), 51–78.
- Djinni, I.; Defant, A.; Kecha, M.; Mancini, I. Metabolite Profile of Marine-Derived Endophytic *Streptomyces Sundarbansensis WR1L1S8* by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Evaluation of Culture Conditions on Antibacterial Activity and Mycelial Growth. *Journal of Applied Microbiology* **2013**, *116*, 39–50.
- Dobretsov, S. *Marine Biofilms. Biofouling*; 2010.
- Dobretsov, S.; Qian, P.-Y. Facilitation and Inhibition of Larval Attachment of the Bryozoan *Bugula Neritina* in Association with Mono-Species and Multi-Species Biofilms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **2006**, *333* (2), 263–274.
- Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, *15* (2), 167–193.
- Drapal, M.; Perez-Fons, L.; Wheeler, P. R.; Fraser, P. D. The Application of Metabolite Profiling to *Mycobacterium Spp.*: Determination of Metabolite Changes Associated with Growth. *Journal of Microbiological Methods* **2014**, *106*, 23–32.

Dührkop, K.; Shen, H.; Meusel, M.; Rousu, J.; Böcker, S. Searching Molecular Structure Databases with Tandem Mass Spectra Using CSI:FingerID. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (41), 12580–12585.

Dunn, M. F. Key Roles of Microsymbiont Amino Acid Metabolism in Rhizobia-Legume Interactions. *Critical Reviews in Microbiology* **2015**, *41* (4), 411–451.

Dunne, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews* **2002**, *15* (2), 155–166.

Duportet, X.; Aggio, R. B. M.; Carneiro, S.; Villas-Bôas, S. G. The Biological Interpretation of Metabolomic Data Can Be Misled by the Extraction Method Used. *Metabolomics* **2012**, *8* (3), 410–421.

Ede, S. M.; Hafner, L. M.; Fredericks, P. M. Structural Changes in the Cells of Some Bacteria during Population Growth: A Fourier Transform Infrared—attenuated Total Reflectance Study. *Applied spectroscopy* **2004**, *58* (3), 317–322.

Ellis, D. I.; Dunn, W. B.; Griffin, J. L.; Allwood, J. W.; Goodacre, R. Metabolic Fingerprinting as a Diagnostic Tool. *Future Medicine* **2007**, *8* (9), 1243–1266.

Evans, L. V.; Clarkson, N. Antifouling Strategies in the Marine Environment. *Journal of Applied Bacteriology* **1993**, *74* (S22), 119S–124S.

Fayette, J.; Coquard, I. R.; Alberti, L.; Boyle, H.; Mééus, P.; Decouvelaere, A.-V.; Thiesse, P.; Sunyach, M.-P.; Ranchère, D.; Blay, J.-Y. ET-743: A Novel Agent with Activity in Soft-Tissue Sarcomas. *Current Opinion in Oncology* **2006**, *18* (4), 347–353.

Fekete, A.; Kuttler, C.; Rothballer, M.; Hense, B. A.; Fischer, D.; Buddrus-Schiemann, K.; Lucio, M.; Müller, J.; Schmitt-Kopplin, P.; Hartmann, A. Dynamic Regulation of *N*-Acyl-Homoserine Lactone Production and Degradation in *Pseudomonas Putida* IsoF. *FEMS Microbiology Ecology* **2010**, *72* (1), 22–34.

Fenical, W. Marine Pharmaceuticals. *Oceanography* **2006**, *19* (2), 110.

Fiehn, O. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comparative and functional genomics* **2001**, *2* (3), 155–168.

Fiehn, O.; Robertson, D.; Griffin, J.; van der Werf, M.; Nikolau, B.; Morrison, N.; Sumner, L. W.; Goodacre, R.; Hardy, N. W.; Taylor, C.; et al. The Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **2007**, *3* (3), 175–178.

Filloux, A.; Vallet, I. Biofilm : Mise En Place et Organisation D'une Communauté Bactérienne. *M/S: Médecine Sciences* **2003**, *19* (1), 77–83.

Flemming, H.-C.; Wingender, J. The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology* **2010**.

Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life. *Nature Reviews Microbiology* **2016**, *14* (9), 563–575.

Flint, S. H.; Brooks, J. .; Bremer, P. J. Properties of the Stainless Steel Substrate, Influencing the Adhesion of Thermo-Resistant *Streptococci*. *Journal of food engineering* **2000**, *43*, 235–242.

Forcisi, S.; Moritz, F.; Kanawati, B.; Tziotis, D.; Lehmann, R.; Schmitt-Kopplin, P. Liquid Chromatography–mass Spectrometry in Metabolomics Research: Mass Analyzers in Ultra High Pressure Liquid Chromatography Coupling. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1292*, 51–65.

Forner, D.; Berru , F.; Correa, H.; Duncan, K.; Kerr, R. G. Chemical Dereplication of Marine Actinomycetes by Liquid Chromatography–high Resolution Mass Spectrometry Profiling and Statistical Analysis. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *805*, 70–79.

Franchini, A. G.; Ihssen, J.; Egli, T. Effect of Global Regulators RpoS and Cyclic-AMP/CRP on the Catabolome and Transcriptome of Escherichia Coli K12 during Carbon-and Energy-Limited Growth. *PloS one* **2015**, *10* (7), e0133793.

Franke, S.; Grass, G.; Rensing, C.; Nies, D. H. Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of Escherichia Coli. *Journal of Bacteriology* **2003**, *185* (13), 3804–3812.

Fridman, E.; Pichersky, E. Metabolomics, Genomics, Proteomics, and the Identification of Enzymes and Their Substrates and Products. *Current Opinion in Plant Biology* **2005**, *8* (3), 242–248.

Fusetani, N. Biofouling and Antifouling. *Natural Product Reports* **2004**, *21* (1), 94–104.

Gade, D.; Stuhmann, T.; Reinhardt, R.; Rabus, R. Growth Phase Dependent Regulation of Protein Composition in *Rhodospirellula Baltica*. *Environmental Microbiology* **2005**, *7* (8), 1074–1084.

Geiger, O.; R hrs, V.; Weissenmayer, B.; Finan, T. M.; Thomas-Oates, J. E. The Regulator Gene *phoB* Mediates Phosphate Stress-Controlled Synthesis of the Membrane Lipid Diacylglyceryl-N, N, N-Trimethylhomoserine in Rhizobium (Sinorhizobium) Meliloti. *Molecular Microbiology* **1999**, *32* (1), 63–73.

Geiger, O.; González-Silva, N.; López-Lara, I. M.; Sohlenkamp, C. Amino Acid-Containing Membrane Lipids in Bacteria. *Progress in Lipid Research* **2010**, *49* (1), 46–60.

Gerlich, M.; Neumann, S. MetFusion: Integration of Compound Identification Strategies: MetFusion. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *48* (3), 291–298.

Gjersing, E. L.; Herberg, J. L.; Horn, J.; Schaldach, C. M.; Maxwell, R. S. NMR Metabolomics of Planktonic and Biofilm Modes of Growth in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (21), 8037–8045.

Godzien, J.; Ciborowski, M.; Martínez-Alc zar, M. P.; Samczuk, P.; Kretowski, A.; Barbas, C. Rapid and Reliable Identification of Phospholipids for Untargeted Metabolomics with LC–ESI–QTOF–MS/MS. *Journal of Proteome Research* **2015**, *14* (8), 3204–3216.

Golovastov, V. .; Mikhaleva, N. I.; Kadyrova, L. Y.; Nesmeyanova, M. A. The Major Phospholipid of Escherichia Coli, Phosphatidylethanolamine, Is Required for Efficient Production and Secretion of Alkaline Phosphatase. *Biochemistry (Mosc)* **2000**, *65* (9), 1097–1104.

González-Silva, N.; López-Lara, I. M.; Reyes-Lamothe, R.; Taylor, A. M.; Sumpton, D.; Thomas-Oates, J.; Geiger, O. The Dioxygenase-Encoding *olsD* Gene from *Burkholderia Cenocepacia* Causes the Hydroxylation of the Amide-Linked Fatty Acyl Moiety of Ornithine-Containing Membrane Lipids. *Biochemistry* **2011**, *50* (29), 6396–6408.

- Goulitquer, S.; Potin, P.; Tonon, T. Mass Spectrometry-Based Metabolomics to Elucidate Functions in Marine Organisms and Ecosystems. *Marine Drugs* **2012**, *10* (12), 849–880.
- Grasland, B.; Mitalane, J.; Briandet, R.; Quemener, E.; Meylheuc, T.; Linossier, I.; Vallee-Rehel, K.; Haras, D. Bacterial Biofilm in Seawater: Cell Surface Properties of Early-Attached Marine Bacteria. *Biofouling* **2003**, *19* (5), 307–313.
- Grégoire, D. S.; Poulain, A. J. A Little Bit of Light Goes a Long Way: The Role of Phototrophs on Mercury Cycling. *Metallomics* **2014**, *6* (3), 396–407.
- Grumbein, S.; Opitz, M.; Lieleg, O. Selected Metal Ions Protect *Bacillus Subtilis* Biofilms from Erosion. *Metallomics* **2014**, *6* (8), 1441–1450.
- van Gulik, W. M. Fast Sampling for Quantitative Microbial Metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology* **2010**, *21* (1), 27–34.
- Guo, Z.; Han, J.; Yang, X.-Y.; Cao, K.; He, K.; Du, G.; Zeng, G.; Zhang, L.; Yu, G.; Sun, Z.; et al. Proteomic Analysis of the Copper Resistance of *Streptococcus Pneumoniae*. *Metallomics* **2015**, *7* (3), 448–454.
- Guzzo, A.; Diorio, C.; DuBow, M. S. Transcription of the *Escherichia Coli* *fliC* Gene Is Regulated by Metal Ions. *Applied and environmental microbiology* **1991**, *57* (8), 2255–2259.
- Hadfield, M. G. Biofilms and Marine Invertebrate Larvae: What Bacteria Produce That Larvae Use to Choose Settlement Sites. *Annual Review of Marine Science* **2011**, *3* (1), 453–470.
- Hagstrom, A.; Pommier, T.; Rohwer, F.; Simu, K.; Stolte, W.; Svensson, D.; Zweifel, U. L. Use of 16S Ribosomal DNA for Delineation of Marine Bacterioplankton Species. *Applied and Environmental Microbiology* **2002**, *68* (7), 3628–3633.
- Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P. Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. *Nat Rev Micro* **2004**, *2* (2), 95–108.
- Hamada, M.; Toyofuku, M.; Miyano, T.; Nomura, N. *cbb3*-Type Cytochrome *c* Oxidases, Aerobic Respiratory Enzymes, Impact the Anaerobic Life of *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **2014**, *196* (22), 3881–3889.
- Haras, D. Biofilms et Altérations Des Matériaux : De L'analyse Du Phénomène Aux Stratégies de Prévention. *Matériaux & Techniques* **2005**, *93*, s.27-s.41.
- Harrison, J. J.; Ceri, H.; Stremick, C. A.; Turner, R. J. Biofilm Susceptibility to Metal Toxicity. *Environmental Microbiology* **2004**, *6* (12), 1220–1227.
- Harrison, J. J.; Turner, R. J.; Ceri, H. Persister Cells, the Biofilm Matrix and Tolerance to Metal Cations in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas Aeruginosa*. *Environmental Microbiology* **2005**, *7* (7), 981–994.
- Harrison, J. J.; Ceri, H.; Turner, R. J. Multimetal Resistance and Tolerance in Microbial Biofilms. *Nature Reviews Microbiology* **2007**, *5* (12), 928–938.
- Hastie, T.; Friedman, J.; Tibshirani, R. *The Elements of Statistical Learning*; Springer series in statistics Springer, Berlin, 2001; Vol. 1.

- Henderson, J. P.; Crowley, J. R.; Pinkner, J. S.; Walker, J. N.; Tsukayama, P.; Stamm, W. E.; Hooton, T. M.; Hultgren, S. J. Quantitative Metabolomics Reveals an Epigenetic Blueprint for Iron Acquisition in Uropathogenic *Escherichia Coli*. *PLoS Pathogens* **2009**, *5* (2), e1000305.
- Hengge, R. Principles of c-Di-GMP Signalling in Bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **2009**, *7*, 263–273.
- Herbst, F. A.; Danielsen, H. .; Wimmer, R.; Nielsen, P. H.; Dueholm, M. S. Label-Free Quantification Reveals Major Proteomic Changes in *Pseudomonas Putida* F1 during the Exponential Growth Phase. *Proteomics* **2015**, *15* (18), 3244–3252.
- Hidaka, T. On the Specificity of Mineral Requirements of Marine Bacteria. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University* **1965**, *14*, 127–180.
- Holden, M. T. G.; Ram Chhabra, S.; De Nys, R.; Stead, P.; Bainton, N. J.; Hill, P. J.; Manefield, M.; Kumar, N.; Labatte, M.; England, D.; et al. Quorum-Sensing Cross Talk: Isolation and Chemical Characterization of Cyclic Dipeptides from *Pseudomonas Aeruginosa* and Other Gram-Negative Bacteria. *Molecular Microbiology* **1999**, *33* (6), 1254–1266.
- Holmström, C.; Kjelleberg, S. Marine *Pseudoalteromonas* species Are Associated with Higher Organisms and Produce Biologically Active Extracellular Agents. *FEMS microbiology ecology* **1999**, *30* (4), 285–293.
- Horn, H.; Reiff, H.; Morgenroth, E. Simulation of Growth and Detachment in Biofilm Systems under Defined Hydrodynamic Conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *81* (5), 607–617.
- Howell, D. Testing the Impact on the Performance of Marine Antifouling Coatings. In *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*; Hellio, C., and Yebra, D., 2009; pp 422–438.
- Huang, Y.-L.; Ki, J.-S.; Lee, O. O.; Qian, P.-Y. Evidence for the Dynamics of Acyl Homoserine Lactone and AHL-Producing Bacteria during Subtidal Biofilm Formation. *The ISME journal* **2009**, *3* (3), 296–304.
- Hung, O. G.; Thiyagarajan, V.; Zhang, R.; Wu, R. S. S.; Qian, P. Y. Attachment of *Balanus Amphitrite* Larvae to Biofilms Originating from Contrasting Environments. *Marine Ecology Progress Series* **2007**, *333*, 229–242.
- Hwang, C. Y.; Lee, I.; Hwang, Y. J.; Yoon, S. J.; Lee, W. S.; Cho, B. C. *Pseudoalteromonas Neustonica* Sp. Nov., Isolated from the Sea Surface Microlayer of the Ross Sea (Antarctica), and Emended Description of the Genus *Pseudoalteromonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2016**, *66* (9), 3377–3382.
- Idborg, H.; Zamani, L.; Edlund, P.; Schuppekoistinen, I.; Jacobsson, S. Metabolic Fingerprinting of Rat Urine by LC/MS Part 1. Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2005**, *828* (1–2), 9–13.
- Jain, A.; Bhosle, N. B. Biochemical Composition of the Marine Conditioning Film: Implications for Bacterial Adhesion. *Biofouling* **2009**, *25* (1), 13–19.
- Jakubovics, N. S.; Robinson, J. C.; Samarian, D. S.; Kolderman, E.; Yassin, S. A.; Bettampadi, D.; Bashton, M.; Rickard, A. . Critical Roles of Arginine in Growth and Biofilm Development by *S. Treptococcus Gordonii*: Effects of Arginine on *Streptococcus Gordonii*. *Molecular Microbiology* **2015**, *97* (2), 281–300.

- Jefferson, K. What Drives Bacteria to Produce a Biofilm? *FEMS Microbiology Letters* **2004**, *236* (2), 163–173.
- Ji, C.; Zhao, J.; Wang, Q.; Lu, H. Responses of *Mytilus Galloprovincialis* to Bacterial Challenges by Metabolomics and Proteomics. *Fish & Shellfish Immunology* **2013**, *35* (2), 489–498.
- Jiang, S.; Huang, X.; Zhang, C.; Cai, Z.; Zou, T. Morphological and Proteomic Analyses of the Biofilms Generated by Streptococcus Mutans Isolated from Caries-Active and Caries-Free Adults. *Journal of Dental Sciences* **2015**, *10* (2), 206–215.
- Jin, Y.-X.; Shi, L.-H.; Kawata, Y. Metabolomics-Based Component Profiling of Halomonas Sp. KM-1 during Different Growth Phases in poly(3-Hydroxybutyrate) Production. *Bioresource Technology* **2013**, *140*, 73–79.
- Joghee, N. .; Jayaraman, G. Metabolomic Characterization of Halophilic Bacterial Isolates Reveals Strains Synthesizing Rare Diaminoacids under Salt Stress. *Biochimie* **2014**, *102*, 102–111.
- Jolliffe, I. *Principal Component Analysis*; Wiley Online Library, 2002.
- Jones, D. S.; Albrecht, H. L.; Dawson, K. S.; Schaperdoth, I.; Freeman, K. H.; Pi, Y.; Pearson, A.; Macalady, J. L. Community Genomic Analysis of an Extremely Acidophilic Sulfur-Oxidizing Biofilm. *The ISME journal* **2012**, *6* (1), 158–170.
- Jones, P. R.; Cottrell, M. T.; Kirchman, D. L.; Dexter, S. C. Bacterial Community Structure of Biofilms on Artificial Surfaces in an Estuary. *Microbial Ecology* **2007**, *53* (1), 153–162.
- de Jonge, L. P.; Douma, R. D.; Heijnen, J. J.; van Gulik, W. M. Optimization of Cold Methanol Quenching for Quantitative Metabolomics of *Penicillium Chrysogenum*. *Metabolomics* **2012**, *8* (4), 727–735.
- Jung, A.; Eisheuer, S.; Cserti, E.; Leicht, O.; Strobel, W.; Möll, A.; Schlimpert, S.; Kühn, J.; Thanbichler, M. Molecular Toolbox for Genetic Manipulation of the Stalked Budding Bacterium Hyphomonas Neptunium. *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, *81* (2), 736–744.
- Junka, A. F.; Deja, S.; Smutnicka, D.; Szymczyk, P.; Ziółkowski, G.; Bartoszewicz, M.; Mlynarz, P. Differences in Metabolic Profiles of Planktonic and Biofilm Cells in *Staphylococcus Aureus*-1H Nuclear Magnetic Resonance Search for Candidate Biomarkers. *Acta Biochimica Polonica* **2013**, *60* (4), 701–706.
- Kaliszan, R.; Marszał, M. P.; Jan Markuszewski, M.; Bączek, T.; Pernak, J. Suppression of Deleterious Effects of Free Silanols in Liquid Chromatography by Imidazolium Tetrafluoroborate Ionic Liquids. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1030* (1–2), 263–271.
- Kalnejais, L. H.; Martin, W. R.; Bothner, M. H. The Release of Dissolved Nutrients and Metals from Coastal Sediments due to Resuspension. *Marine Chemistry* **2010**, *121* (1–4), 224–235.
- Kanehisa, M. *The KEGG Database*; Novartis.Found.Symp; 2002; Vol. 247.
- Katajamaa, M.; Orešič, M. Processing Methods for Differential Analysis of LC/MS Profile Data. *BMC bioinformatics* **2005**, *6* (1), 1.

Kawai, Y.; Takasuka, N.; Inoue, K.; Akagawa, K.; Masahiro, N. Ornithine-Containing Lipids Stimulate CD14-Dependant TNF Production from Murine Macrophage-like J774.1 and RAW 264.7 Cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **2000**, *28*, 197–203.

Kearns, D. B.; Robinson, J.; Shimkets, L. J. Pseudomonas Aeruginosa Exhibits Directed Twitching Motility Up Phosphatidylethanolamine Gradients. *Journal of Bacteriology* **2001**, *183* (2), 763–767.

Keller, B. O.; Sui, J.; Young, A. B.; Whittall, R. M. Interferences and Contaminants Encountered in Modern Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *627* (1), 71–81.

Kennish, M. J. Environmental Threats and Environmental Future of Estuaries. *Environmental Conservation* **2002**, *29* (1), 78–107.

Kido Soule, M. C.; Longnecker, K.; Johnson, W. M.; Kujawinski, E. B. Environmental Metabolomics: Analytical Strategies. *Marine Chemistry* **2015**, *177*, 374–387.

Kim, E. H.; Mason, R. P.; Porter, E. T.; Soulen, H. L. The Impact of Resuspension on Sediment Mercury Dynamics, and Methylmercury Production and Fate: A Mesocosm Study. *Marine Chemistry* **2006**, *102* (3–4), 300–315.

Kim, S. H.; Yang, H. O.; Shin, Y. K.; Kwon, H. C. *Hasllibacter Halocynthiae* Gen. Nov., Sp. Nov., a Nutriacholic Acid-Producing Bacterium Isolated from the Marine Ascidian *Halocynthia Roretzi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Technology* **2011**, *62* (3), 624–631.

Klein, J. S.; Lewinson, O. Bacterial ATP-Driven Transporters of Transition Metals: Physiological Roles, Mechanisms of Action, and Roles in Bacterial Virulence. *Metallomics* **2011**, *3* (11), 1098–1108.

Kleiner, M.; Wentrup, C.; Lott, C.; Teeling, H.; Wetzel, S.; Chang, Y.-J.; Shah; VerBerkmoes, N. C.; Zaezycki, J.; Fuchs, G.; et al. Metaproteomics of a Gutless Marine Worm and Its Symbiotic Microbial Community Reveal Unusual Pathways for Carbon and Energy Use. *PNAS* **2012**, *109* (19), 1173–1182.

Krásný, L.; Hynek, R.; Hochel, I. Identification of Bacteria Using Mass Spectrometry Techniques. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *353*, 67–79.

Kuehnbaum, N. L.; Britz-McKibbin, P. New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. *Chemical Reviews* **2013**, *113* (4), 2437–2468.

Kumar, A.; Karig, D.; Acharya, R.; Neethirajan, S.; Mukherjee, P. P.; Retterer, S.; Doktycz, M. J. Microscale Confinement Features Can Affect Biofilm Formation. *Microfluidics and Nanofluidics* **2013**, *14* (5), 895–902.

Kumar, C. G.; Anand, S. K. Significance of Microbial Biofilms in Food Industry: A Review. *International Journal of Food Microbiology* **1998**, *42* (1), 9–27.

Ladomersky, E.; Petris, M. J. Copper Tolerance and Virulence in Bacteria. *Metallomics* **2015**, *7* (6), 957–964.

Lam, K. S. Discovery of Novel Metabolites from Marine Actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* **2006**, *9* (3), 245–251.

- Lattif, A. A.; Mukherjee, P. K.; Chandra, J.; Roth, M. R.; Welti, R.; Rouabhia, M.; Ghannoum, M. A. Lipidomics of *Candida Albicans* Biofilms Reveals Phase-Dependent Production of Phospholipid Molecular Classes and Role for Lipid Rafts in Biofilm Formation. *Microbiology* **2011**, *157* (11), 3232–3242.
- Lau, S. C. Roles of Bacterial Community Composition in Biofilms as a Mediator for Larval Settlement of Three Marine Invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology* **2005**, *38*, 41–51.
- Lau, S. C. K.; Thiyagarajan, V.; Cheung, S. C. K.; Qian, P.-Y. Roles of Bacterial Community Composition in Biofilms as a Mediator for Larval Settlement of Three Marine Invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology* **2005**, *38* (1), 41–51.
- Lear, G.; Turner, S. J.; Lewis, G. D. Effect of Light Regimes on the Utilisation of an Exogenous Carbon Source by Freshwater Biofilm Bacterial Communities. *Aquatic Ecology* **2009**, *43* (2), 207–220.
- Lee, J. S.; Kim, Y.-S.; Park, S.; Kim, J.; Kang, S.-J.; Lee, M.-H.; Ryu, S.; Choi, J. M.; Oh, T.-K.; Yoon, J.-H. Exceptional Production of Both Prodigiosin and Cycloprodigiosin as Major Metabolic Constituents by a Novel Marine Bacterium, *Zooshikella Rubidus* S1-1. *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, *77* (14), 4967–4973.
- Lee, J.-W.; Nam, J.-H.; Kim, Y.-H.; Lee, K.-H.; Lee, D.-H. Bacterial Communities in the Initial Stage of Marine Biofilm Formation on Artificial Surfaces. *The Journal of Microbiology* **2008**, *46* (2), 174–182.
- Lejars, M.; Margailan, A.; Bressy, C. Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings. *Chemical Reviews* **2012**, *112* (8), 4347–4390.
- Li, H.-J.; Tang, B.-L.; Shao, X.; Liu, B.-X.; Zheng, X.-Y.; Han, X.-X.; Li, P.-Y.; Zhang, X.-Y.; Song, X.-Y.; Chen, X.-L. Characterization of a New S8 Serine Protease from Marine Sedimentary Photobacterium Sp. A5–7 and the Function of Its Protease-Associated Domain. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7* (2016).
- Li, Z.; Nair, S. K. Quorum Sensing: How Bacteria Can Coordinate Activity and Synchronize Their Response to External Signals? *Protein Science* **2012**, *21* (10), 1403–1417.
- Liaw, C.-C.; Chen, P.-C.; Shih, C.-J.; Tseng, S.-P.; Lai, Y.-M.; Hsu, C.-H.; Dorrestein, P. C.; Yang, Y.-L. Vitroprocines, New Antibiotics against *Acinetobacter Baumannii*, Discovered from Marine *Vibrio* Sp. QWI-06 Using Mass-Spectrometry-Based Metabolomics Approach. *Scientific Reports* **2015**, *5* (12856).
- Liebeke, M.; Lalk, M. *Staphylococcus Aureus* Metabolic Response to Changing Environmental Conditions – A Metabolomics Perspective. *International Journal of Medical Microbiology* **2014**, *304* (3–4), 222–229.
- Liu, Y.-R.; Yu, R.-Q.; Zheng, Y.-M.; He, J.-Z. Analysis of the Microbial Community Structure by Monitoring an Hg Methylation Gene (*hgcA*) in Paddy Soils along an Hg Gradient. *Applied and Environmental Microbiology* **2014**, *80* (9), 2874–2879.
- Loeb, G. I.; Neihof, R. A. Marine Conditioning Films. **1975**, *145*, 319–335.
- Lopez, D.; Vlamakis, H.; Kolter, R. Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, *2* (7), a000398–a000398.

- López-Lara, I. M.; Gao, J.-L.; Soto, M. J.; Solares-Pérez, A.; Weissenmayer, B.; Sohlenkamp, C.; Verroios, G. P.; Thomas-Oates, J.; Geiger, O. Phosphorus-Free Membrane Lipids of *Sinorhizobium Meliloti* Are Not Required for the Symbiosis with Alfalfa but Contribute to Increased Cell Yields under Phosphorus-Limiting Conditions of Growth. *Molecular plant-microbe interactions* **2005**, *18* (9), 973–982.
- Lu, L.; Wang, J.; Xu, Y.; Wang, K.; Hu, Y.; Tian, R.; Yang, B.; Lai, Q.; Li, Y.; Zhang, W.; et al. A High-Resolution LC-MS-Based Secondary Metabolite Fingerprint Database of Marine Bacteria. *Scientific Reports* **2014**, *4* (6537).
- Lv, H. Mass Spectrometry-Based Metabolomics towards Understanding of Gene Functions with a Diversity of Biological Contexts. *Mass Spectrometry Reviews* **2013**, *32* (2), 118–128.
- Ma, Z.; Jacobsen, F. E.; Giedroc, D. P. Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. *Chemical Reviews* **2009**, *109* (10), 4644–4681.
- Macintyre, L.; Zhang, T.; Viegelmann, C.; Martinez, I.; Cheng, C.; Dowdells, C.; Abdelmohsen, U.; Gernert, C.; Hentschel, U.; Edrada-Ebel, R. Metabolomic Tools for Secondary Metabolite Discovery from Marine Microbial Symbionts. *Marine Drugs* **2014**, *12* (6), 3416–3448.
- MacLeod, R. A. The Question of the Existence of Specific Marine Bacteria. *Bacteriological reviews* **1965**, *29* (1), 9–20.
- Maneerat, S.; Bamba, T.; Harada, K.; Kobayashi, A.; Yamada, H.; Kawai, F. A Novel Crude Oil Emulsifier Excreted in the Culture Supernatant of a Marine Bacterium, *Myroides* Sp. Strain SM1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *70* (2), 254–259.
- Mansson, M.; Gram, L.; Larsen, T. O. Production of Bioactive Secondary Metabolites by *Marine Vibrionaceae*. *Marine Drugs* **2011**, *9* (12), 1440–1468.
- Marengo, E.; Robotti, E.; Bobba, M. Multivariate Statistical Tools for the Evaluation of Proteomic 2D-Maps: Recent Achievements and Applications. *Current Proteomics* **2007**, *4* (1), 53–66.
- Mathews, S.; Hans, M.; Mucklich, F.; Solioz, M. Contact Killing of Bacteria on Copper Is Suppressed If Bacterial-Metal Contact Is Prevented and Is Induced on Iron by Copper Ions. *Applied and Environmental Microbiology* **2013**, *79* (8), 2605–2611.
- Matz, C.; Webb, J. S.; Schupp, P. J.; Phang, S. Y.; Penesyan, A.; Egan, S.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S. Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. *PLoS One* **2008**, *3* (7), e2744.
- Maurel, A. *Dessalement de L'eau de Mer et Des Eaux Saumâtres*, 2nd ed. Lavoisier.; 2006.
- McElroy, D. J.; Doblin, M. A.; Murphy, R. J.; Hochuli, D. F.; Coleman, R. A. A Limited Legacy Effect of Copper in Marine Biofilms. *Marine Pollution Bulletin* **2016**, *109* (1), 117–127.
- Mendis, E.; Rajapakse, N.; Byun, H.-G.; Kim, S.-K. Investigation of Jumbo Squid (*Dosidicus Gigas*) Skin Gelatin Peptides for Their in Vitro Antioxidant Effects. *Life Sciences* **2005**, *77* (17), 2166–2178.

Menezes-Oliveira, V. B.; Damgaard, C.; Scott-Fordsmand, J. J.; Amorim, M. J. B. Interaction between Density and Cu Toxicity for *Enchytraeus Crypticus* – Comparing First and Second Generation Effects. *Science of The Total Environment* **2013**, 458–460, 361–366.

Menkissoglu; Lindow. Relationship of Free Ionic Copper and Toxicity to Bacteria in Solutions of Organics Compounds. *Phytopathology* **1991**, 81, 1263–1270.

Michael, A. J. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. *Journal of Biological Chemistry* **2016**, 291 (29), 14896–14903.

Miller-Fleming, L.; Olin-Sandoval, V.; Campbell, K.; Ralser, M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology* **2015**, 427 (21), 3389–3406.

Mishur, R. J.; Rea, S. L. Applications of Mass Spectrometry to Metabolomics and Metabonomics: Detection of Biomarkers of Aging and of Age-Related Diseases. *Mass Spectrometry Reviews* **2012**, 31 (1), 70–95.

Misra, R.; Bavro, V. N. Assembly and Transport Mechanism of Tripartite Drug Efflux Systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2009**, 1794 (5), 817–825.

Momo, R. A.; Povey, J. F.; Smales, C. M.; O'Malley, C. J.; Montague, G. A.; Martin, E. B. MALDI-ToF Mass Spectrometry Coupled with Multivariate Pattern Recognition Analysis for the Rapid Biomarker Profiling of *Escherichia Coli* in Different Growth Phases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405 (25), 8251–8265.

Monds, R. D.; O'Toole, G. A. The Developmental Model of Microbial Biofilms: Ten Years of a Paradigm up for Review. *Trends in Microbiology* **2009**, 17 (2), 73–87.

Moore, E. K.; Hopmans, E. C.; Rijpstra, W. I. C.; Villanueva, L.; Sinninghe Damsté, J. S. Elucidation and Identification of Amino Acid Containing Membrane Lipids Using Liquid Chromatography/high-Resolution Mass Spectrometry: LC/HRMS of Amino Acid Containing Membrane Lipids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2016**, 30 (6), 739–750.

Mora, C.; Tittensor, D. P.; Adl, S.; Simpson, A. G. B.; Worm, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology* **2011**, 9 (8), e1001127.

Morley, N. H.; Burton, J. D.; Tankere, S. P. C.; Martin, J.-M. Distribution and Behaviour of Some Dissolved Trace Metals in the Western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **1997**, 44 (3–4), 675–691.

Muthukrishnan, T.; Abed, R. M. M.; Dobretsov, S.; Kidd, B.; Finnie, A. A. Long-Term Microfouling on Commercial Biocidal Fouling Control Coatings. *Biofouling* **2014**, 30 (10), 1155–1164.

Myckatyn, T. M.; Cohen, J.; Chole, R. A. Clarification of the Definition of a “biofilm.” *Plastic and Reconstructive Surgery* **2016**, 137 (1), 237e–238e.

Nandagopal, N.; Elowitz, M. B. Synthetic Biology: Integrated Gene Circuits. *Science* **2011**, 333 (6047), 1244–1248.

Neufeld, J. D.; Wagner, M.; Murrell, J. C. Who Eats What, Where and When? Isotope-Labeling Experiments Are Coming of Age. *The ISME Journal* **2007**, 1 (2), 103–110.

- Ng, Y. K.; Hodson, M. P.; Hewavitharana, A. K.; Bose, U.; Shaw, P. N.; Fuerst, J. A. Effects of Salinity on Antibiotic Production in Sponge-Derived *Salinispora* Actinobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **2014**, *117* (1), 109–125.
- Nguyen, K. T. N.; Scapolla, C.; Di Carro, M.; Magi, E. Rapid and Selective Determination of UV Filters in Seawater by Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry Combined with Stir Bar Sorptive Extraction. *Talanta* **2011**, *85* (5), 2375–2384.
- Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Systems Biology: Metabonomics. *Nature* **2008**, *455* (7216), 1054–1056.
- Nies, D. H. Microbial Heavy-Metal Resistance. *Applied microbiology and biotechnology* **1999**, *51* (6), 730–750.
- Nikaido, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2003**, *67* (4), 593–656.
- Noor, E.; Eden, E.; Milo, R.; Alon, U. Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Molecular Cell* **2010**, *39* (5), 809–820.
- Offret, C.; Desriac, F.; Le Chevalier, P.; Mounier, J.; Jégou, C.; Fleury, Y. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Marine Drugs* **2016**, *14* (7), 129.
- Oliver, S. G.; Winson, M. K.; Kell, D. B.; Baganz, F. Systematic Functional Analysis of the Yeast Genome. *Technical Tips Online* **1998**, *16*, 373–378.
- Omae, I. General Aspects of Tin-Free Antifouling Paints. *Chemical Reviews* **2003**, *103* (9), 3431–3448.
- Ortega-Morales, B. O.; Chan-Bacab, M. J.; Miranda-Tello, E.; Fardeau, M.-L.; Carrero, J. C.; Stein, T. Antifouling Activity of Sessile *Bacilli* Derived from Marine Surfaces. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, *35* (1), 9–15.
- Ortiz-Castro, R.; Diaz-Perez, C.; Martinez-Trujillo, M.; del Rio, R. E.; Campos-Garcia, J.; Lopez-Bucio, J. Transkingdom Signaling Based on Bacterial Cyclodipeptides with Auxin Activity in Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (17), 7253–7258.
- O’Toole, G.; Kaplan, H. B.; Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Reviews in Microbiology* **2000**, *54* (1), 49–79.
- Palacios-Chaves, L.; Conde-Álvarez, R.; Gil-Ramírez, Y.; Zúñiga-Ripa, A.; Barquero-Calvo, E.; Chacón-Díaz, C.; Chaves-Olarte, E.; Arce-Gorvel, V.; Gorvel, J.-P.; Moreno, E.; et al. *Brucella Abortus* Ornithine Lipids Are Dispensable Outer Membrane Components Devoid of a Marked Pathogen-Associated Molecular Pattern. *PLoS ONE* **2011**, *6* (1), e16030.
- Palmer, J.; Flint, S.; Brooks, J. Bacterial Cell Attachment, the Beginning of a Biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2007**, *34* (9), 577–588.
- Patrauchan, M. A.; Sarkisova, S. A.; Franklin, M. J. Strain-Specific Proteome Responses of *Pseudomonas Aeruginosa* to Biofilm-Associated Growth and to Calcium. *Microbiology* **2007**, *153* (11), 3838–3851.

Patti, G. J.; Tautenhahn, R.; Siuzdak, G. Meta-Analysis of Untargeted Metabolomic Data from Multiple Profiling Experiments. *Nature Protocols* **2012**, 7 (3), 508–516.

Paul, C.; Mausz, M. A.; Pohnert, G. A Co-Culturing/metabolomics Approach to Investigate Chemically Mediated Interactions of Planktonic Organisms Reveals Influence of Bacteria on Diatom Metabolism. *Metabolomics* **2012**, 9 (2), 349–359.

Pena, A.; Teeling, H.; Huerta-Cepas, J.; Santos, F.; Yarza, P.; Brito-Echeverría, J.; Lucio, M.; Schmitt-Kopplin, P.; Meseguer, I.; Schenowitz, C.; et al. Fine-Scale Evolution: Genomic, Phenotypic and Ecological Differentiation in Two Coexisting *Salinibacter Ruber* Strains. *The ISME Journal* **2010**, 4 (7), 882–895.

Piciooreanu, C.; Van Loosdrecht, M. C. M.; Heijnen, J. J.; others. Two-Dimensional Model of Biofilm Detachment Caused by Internal Stress from Liquid Flow. *Biotechnology & Bioengineering* **2001**, 72 (2), 205–218.

Pierson, L. S.; Pierson, E. A. Metabolism and Function of Phenazines in Bacteria: Impacts on the Behavior of Bacteria in the Environment and Biotechnological Processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, 86 (6), 1659–1670.

Piola, R. F.; Dafforn, K. A.; Johnston, E. L. The Influence of Antifouling Practices on Marine Invasions. *Biofouling* **2009**, 25 (7), 633–644.

Plewniak, F.; Koechler, S.; Navet, B.; Dugat-Bony, E.; Bouchez, O.; Peyret, P.; Séby, F.; Battaglia-Brunet, F.; Bertin, P. N. Metagenomic Insights into Microbial Metabolism Affecting Arsenic Dispersion in Mediterranean Marine Sediments. *Molecular Ecology* **2013**, 22 (19), 4870–4883.

Poli, A.; Anzelmo, G.; Nicolaus, B. Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities. *Marine Drugs* **2010**, 8 (6), 1779–1802.

Polymenakou, P. N.; Lampadariou, N.; Mandalakis, M.; Tselepides, A. Phylogenetic Diversity of Sediment Bacteria from the Southern Cretan Margin, Eastern Mediterranean Sea. *Systematic and Applied Microbiology* **2009**, 32 (1), 17–26.

Pougnet, F.; Schäfer, J.; Dutruch, L.; Garnier, C.; Tessier, E.; Dang, D. H.; Lancelleur, L.; Mullot, J.-U.; Lenoble, V.; Blanc, G. Sources and Historical Record of Tin and Butyl-Tin Species in a Mediterranean Bay (Toulon Bay, France). *Environmental Science and Pollution Research* **2014**, 21 (10), 6640–6651.

Prasad Maharjan, R.; Ferenci, T. Global Metabolite Analysis: The Influence of Extraction Methodology on Metabolome Profiles Of *Escherichia Coli*. *Analytical Biochemistry* **2003**, 313 (1), 145–154.

Qian, P.-Y.; Lau, S. C. K.; Dahms, H.-U.; Dobretsov, S.; Harder, T. Marine Biofilms as Mediators of Colonization by Marine Macroorganisms: Implications for Antifouling and Aquaculture. *Marine Biotechnology* **2007**, 9 (4), 399–410.

Qian, P.-Y.; Xu, Y.; Fusetani, N. Natural Products as Antifouling Compounds: Recent Progress and Future Perspectives. *Biofouling* **2009**, 26 (2), 223–234.

Raamsdonk, L. M.; Teusink, B.; Broadhurst, D.; Zhang, N.; Hayes, A.; Walsh, M. C.; Berden, J. A.; Brindle, K. M.; Kell, D. B.; Rowland, J. J.; et al. A Functional Genomics Strategy That Uses Metabolome Data to Reveal the Phenotype of Silent Mutations. *Nat Biotech* **2001a**, 19 (1), 45–50.

Raamsdonk, L. M.; Teusink, B.; Broadhurst, D.; Zhang, N. A Functional Genomics Strategy That Uses Metabolome Data to Reveal the Phenotype of Silent Mutations. *Nature biotechnology* **2001b**, *19*, 45–50.

Railkin, A. I. *Marine Biofouling : Colonization Processes and Defenses*; Biofouling; 2004; Vol. 20.

Rascio, V. J. . Antifouling Coatings: Where Do We Go from Here. *Corrosion Reviews* **2000**, *18* (2–3), 133–154.

Rasmiena, A. A.; Ng, T. W.; Meikle, P. J. Metabolomics and Ischaemic Heart Disease. *Clinical Science* **2013**, *124* (5), 289–306.

Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. MEROPS: The Peptidase Database. *Nucleic Acids Research* **2010**, *38* (Database), D227–D233.

Ren, D.; Zuo, R.; Gonzalez Barrios, A. F.; Bedzyk, L. A.; Eldridge, G. R.; Pasmore, M. E.; Wood, T. K. Differential Gene Expression for Investigation of Escherichia Coli Biofilm Inhibition by Plant Extract Ursolic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, *71* (7), 4022–4034.

Rensing, C.; McDevitt, S. F. The Copper Metallome in Prokaryotic Cells. In *Metallomics and the Cell*; Banci, L., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2013; pp 417–450.

Rice, D.; Barone Jr, S. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives* **2000**, *108* (Suppl 3), 511.

von Roepenack-Lahaye, E. Profiling of *Arabidopsis* Secondary Metabolites by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Plant Physiology* **2004**, *134* (2), 548–559.

Romani, A. M.; Guasch, H.; Munoz, I.; Ruana, J.; Vilalta, E.; Schwartz, T.; Emtiazi, F.; S. Sabater. Biofilm Structure and Function and Possible Implications for Riverine DOC Dynamics. *Microbial Ecology* **2004**, *47* (4), 316–328.

Romano, S.; Dittmar, T.; Bondarev, V.; Weber, R. J. M.; Viant, M. R.; Schulz-Vogt, H. N. Exo-Metabolome of *Pseudovibrio* Sp. FO-BEG1 Analyzed by Ultra-High Resolution Mass Spectrometry and the Effect of Phosphate Limitation. *PLoS ONE* **2014**, *9* (5), e96038.

Romeo, T., Ed.; Compans, R. W., Cooper, M. D., Honjo, T., Koprowski, H., Melchers, F., Oldstone, M. B. A., Olsnes, S., Vogt, P. K., Series Eds.; Current Topics in Microbiology and Immunology; *Bacterial Biofilms*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2008**; Vol. 322

Rosselló-Mora, R.; Lucio, M.; Peña, A.; Brito-Echeverría, J.; López-López, A.; Valens-Vadell, M.; Frommberger, M.; Antón, J.; Schmitt-Kopplin, P. Metabolic Evidence for Biogeographic Isolation of the Extremophilic Bacterium *Salinibacter Ruber*. *The ISME Journal* **2008**, *2* (3), 242–253.

Rossi, E.; Motta, S.; Mauri, P.; Landini, P. Sulfate Assimilation Pathway Intermediate Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate Acts as a Signal Molecule Affecting Production of Curli Fibres in Escherichia Coli. *Microbiology* **2014**, *160* (9), 1832–1844.

Ryan, D.; Robards, K. Metabolomics: The Greatest Omics of Them All? *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (23), 7954–7958.

- Ryan, R. P.; Dow, J. M. Diffusible Signals and Interspecies Communication in Bacteria. *Microbiology* **2008**, *154* (7), 1845–1858.
- Salaün, S.; Kervarec, N.; Potin, P.; Haras, D.; Piotto, M.; La Barre, S. Whole-Cell Spectroscopy Is a Convenient Tool to Assist Molecular Identification of Cultivable Marine Bacteria and to Investigate Their Adaptive Metabolism. *Talanta* **2010**, *80* (5), 1758–1770.
- Salta, M.; Wharton, J. A.; Blache, Y.; Stokes, K. R.; Briand, J.-F. Marine Biofilms on Artificial Surfaces: Structure and Dynamics: Marine Biofilms: Structure and Dynamics. *Environmental Microbiology* **2013**, 2879–2893.
- Sandoval-Calderón, M.; Nguyen, D. D.; Kaponov, C. A.; Herron, P.; Dorrestein, P. C.; Sohlenkamp, C. Plasticity of *Streptomyces Coelicolor* Membrane Composition Under Different Growth Conditions and During Development. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6* (1465).
- Sauer, K. The Genomics and Proteomics of Biofilm Formation. *Genome Biology* **2003**, *4* (6), 219.
- Sauer, K.; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; Costerton, J. W.; Davies, D. G. *Pseudomonas Aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* **2002**, *184* (4), 1140–1154.
- Sauer, K.; Cullen, M. C.; Rickard, A. H.; Zeef, L. A. H.; Davies, D. G.; Gilbert, P. Characterization of Nutrient-Induced Dispersion in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1 Biofilm. *Journal of Bacteriology* **2004**, *186* (21), 7312–7326.
- Saulnier, I.; Mucci, A. Trace Metal Remobilization Following the Resuspension of Estuarine Sediments: Saguenay Fjord, Canada. *Applied Geochemistry* **2000**, *15* (2), 191–210.
- Sayers, E. W.; Barrett, T.; Benson, D. A.; Bolton, E.; Bryant, S. H.; Canese, K.; Chetvernin, V.; Church, D. M.; DiCuccio, M.; Federhen, S.; et al. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* **2011**, *39* (suppl 1), D38–D51.
- Schaefer, A. L.; Greenberg, E. P.; Oliver, C. M.; Oda, Y.; Huang, J. J. .; Bittan-Banin, G.; Peres, C. M.; Schmidt, S.; Juhaszova, K.; Sufrin, J. R.; et al. A New Class of Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals. *Nature* **2008**, *454* (7204), 595–599.
- Schmidt, C. W. Metabolomics: What's Happening Downstream of DNA. *Environmental Health Perspectives* **2004**, *112* (7), A410–A415.
- Schneemann, I.; Wiese, J.; Kunz, A. L.; Imhoff, J. F. Genetic Approach for the Fast Discovery of Phenazine Producing Bacteria. *Marine Drugs* **2011**, *9* (12), 772–789.
- Schue, M.; Fekete, A.; Ortet, P.; Brutescio, C.; Heulin, T.; Schmitt-Kopplin, P.; Achouak, W.; Santaella, C. Modulation of Metabolism and Switching to Biofilm Preval over Exopolysaccharide Production in the Response of *Rhizobium Alamii* to Cadmium. *PLoS ONE* **2011**, *6* (11), e26771.
- Schultz, M. P.; Bendick, J. A.; Holm, E. R.; Hertel, W. M. Economic Impact of Biofouling on a Naval Surface Ship. *Biofouling* **2011**, *27* (1), 87–98.

Serra, D. O.; Lücking, G.; Weiland, F.; Schulz, S.; Görg, A.; Yantorno, O. M.; Ehling-Schulz, M. Proteome Approaches Combined with Fourier Transform Infrared Spectroscopy Revealed a Distinctive Biofilm Physiology in *Bordetella Pertussis*. *PROTEOMICS* **2008**, *8* (23–24), 4995–5010.

Shemesh, M.; Tam, A.; Steinberg, D. Differential Gene Expression Profiling of *Streptococcus Mutans* Cultured under Biofilm and Planktonic Conditions. *Microbiology* **2007**, *153* (5), 1307–1317.

Shim, M. S.; Kim, J. . Fatty Acid and Lipid Composition in Mycelia from Submerged or Surface Culture of *Streptomyces Viridochromogenes*. *FEMS microbiology letters* **1993**, *108* (1), 11–14.

Shin, M. H.; Lee, D. Y.; Skogerson, K.; Wohlgemuth, G.; Choi, I.-G.; Fiehn, O.; Kim, K. H. Global Metabolic Profiling of Plant Cell Wall Polysaccharide Degradation by *Saccharophagus Degradans*. *Biotechnology and Bioengineering* **2010**, *105* (3), 477–488.

Shnayderman, M.; Mansfield, B.; Yip, P.; Clark, H. A.; Krebs, M. D.; Cohen, S. J.; Zeskind, J. E.; Ryan, E. T.; Dorkin, H. L.; Callahan, M. V.; et al. Species-Specific Bacteria Identification Using Differential Mobility Spectrometry and Bioinformatics Pattern Recognition. *Analytical Chemistry* **2005**, *77* (18), 5930–5937.

Smart, K. A.; Smart, H. L.; Jackson, C. R. The Effect of Fine Scale Environmental Variation on Microbial Community Structure and Function in Aquatic Environments. In *Environment Microbiology Research Trends*; G. V. Kurladze, 2007.

Smith, C. A.; O'Maille, G.; Want, E. J.; Qin, C. METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. *Ther. Drug Monit* **2005**, *27* (6), 747–751.

Smith, C. A.; Want, E. J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (3), 779–787.

Sohlenkamp, C.; Geiger, O. Bacterial Membrane Lipids: Diversity in Structures and Pathways. *FEMS Microbiology Reviews* **2015**, *40* (1), 133–159.

Spura, J.; Christian Reimer, L.; Wieloch, P.; Schreiber, K.; Buchinger, S.; Schomburg, D. A Method for Enzyme Quenching in Microbial Metabolome Analysis Successfully Applied to Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Yeast. *Analytical Biochemistry* **2009**, *394* (2), 192–201.

Srinivasan, R.; Rajeswari, H.; Ajitkumar, P. Analysis of Degradation of Bacterial Cell Division Protein FtsZ by the ATP-Dependent Zinc-Metalloprotease FtsH in Vitro. *Microbiological Research* **2008**, *163* (1), 21–30.

Stewart, P. S.; Franklin, M. J. Physiological Heterogeneity in Biofilms. *Nature Reviews Microbiology* **2008**, *6* (3), 199–210.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology* **2002**, *56* (1), 187–209.

Sumner, L. W.; Mendes, P.; Dixon, R. A. Plant Metabolomics: Large-Scale Phytochemistry in the Functional Genomics Era. *Phytochemistry* **2003**, *62* (6), 817–836.

Sunda; Guillard. The Relationship between Cupric Ion Activity and the Toxicity of Copper to Phytoplankton. *Water Research* **1976**, *34*, 513–529.

Takahashi, H.; Kai, K.; Shinbo, Y.; Tanaka, K.; Ohta, D.; Oshima, T.; Altaf-Ul-Amin, M. .; Kurokawa, K.; Ogasawara, N.; Kanaya, S. Metabolomics Approach for Determining Growth-Specific Metabolites Based on Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391* (8), 2769–2782.

Tankere-Muller, S.; Zhang, H.; Davison, W.; Finke, N.; Larsen, O.; Stahl, H.; Glud, R. N. Fine Scale Remobilisation of Fe, Mn, Co, Ni, Cu and Cd in Contaminated Marine Sediment. *Marine Chemistry* **2007**, *106* (1–2), 192–207.

Taylor, C. J.; Anderson, A. J.; Wilkinson, S. G. Phenotypic Variation of Lipid Composition in *Burkholderia Cepacia*: A Response to Increased Growth Temperature Is a Greater Content of 2-Hydroxy Acids in Phosphatidylethanolamine and Ornithine Amide Lipid. *Microbiology* **1998**, *144* (7), 1737–1745.

Teitzel, G. M.; Parsek, M. R. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas Aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, *69* (4), 2313–2320.

Tessier, E.; Garnier, C.; Mullot, J.-U.; Lenoble, V.; Arnaud, M.; Raynaud, M.; Mounier, S. Study of the Spatial and Historical Distribution of Sediment Inorganic Contamination in the Toulon Bay (France). *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *62* (10), 2075–2086.

Thanabalu, T.; Koronakis, E.; Hughes, C.; Koronakis, V. Substrate-Induced Assembly of a Contiguous Channel for Protein Export from *E. Coli*: Reversible Bridging of an Inner-Membrane Translocase to an Outer Membrane Exit Pore. *The EMBO Journal* **1998**, *17* (22), 6487–6496.

Theodoridis, G.; Gika, H. G.; Wilson, I. D. LC-MS-Based Methodology for Global Metabolite Profiling in Metabonomics/metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (3), 251–260.

Theodoridis, G.; Gika, H. G.; Wilson, I. D. LC-MS Based Non Targeted Metabolomics. In *Metabolomics in practise : succesful strategies to generate and analyse metabolic data*; 2013.

Theodoridis, G. A.; Gika, H. G.; Want, E. J.; Wilson, I. D. Liquid Chromatography–mass Spectrometry Based Global Metabolite Profiling: A Review. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *711*, 7–16.

Thomas, K. V.; Brooks, S. The Environmental Fate and Effects of Antifouling Paint Biocides. *Biofouling* **2010**, *26* (1), 73–88.

Tikunov, Y. A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiology* **2005**, *139* (3), 1125–1137.

Tokuda, H.; Sugasawa, M.; Unemoto, T. Roles of Na⁺ and K⁺ in α -Aminoisobutyric Acid Transport by the Marine Bacterium *Vibrio alginolyticus**. *The Journal of Biological Chemistry* **1981**, *257* (2), 788–794.

Tsai, Y.-P. Impact of Flow Velocity on the Dynamic Behaviour of Biofilm Bacteria. *Biofouling* **2005**, *21* (5–6), 267–277.

Tsueng, G.; Lam, K. S. A Low-Sodium-Salt Formulation for the Fermentation of Salinosporamides by *Salinispora Tropica* Strain NPS21184. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *78* (5), 821–826.

- Tsueng, G.; Teisan, S.; Lam, K. S. Defined Salt Formulations for the Growth of *Salinispora Tropica* Strain NPS21184 and the Production of Salinosporamide A (NPI-0052) and Related Analogs. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *78* (5), 827–832.
- Valiei, A.; Kumar, A.; Mukherjee, P. P.; Liu, Y.; Thundat, T. A Web of Streamers: Biofilm Formation in a Porous Microfluidic Device. *Lab on a Chip* **2012**, *12* (24), 5133.
- Valkirs, A. O.; Seligman, P. F.; Haslbeck, E.; Caso, J. S. Measurement of Copper Release Rates from Antifouling Paint under Laboratory and in Situ Conditions: Implications for Loading Estimation to Marine Water Bodies. *Marine Pollution Bulletin* **2003**, *46* (6), 763–779.
- Van Loosdrecht, M. C.; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G.; Zehnder, A. J. Electrophoretic Mobility and Hydrophobicity as a Measured to Predict the Initial Steps of Bacterial Adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* **1987**, *53* (8), 1898–1901.
- Vences-Guzmán, M. A.; Guan, Z.; Ormeño-Orrillo, E.; González-Silva, N.; López-Lara, I. M.; Martínez-Romero, E.; Geiger, O.; Sohlenkamp, C. Hydroxylated Ornithine Lipids Increase Stress Tolerance in *Rhizobium Tropicum* CIAT899: Hydroxylated Ornithine Lipids in *Rhizobium Tropicum*. *Molecular Microbiology* **2011**, *79* (6), 1496–1514.
- Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; Mustafa, N. R.; Kim, H. K. Metabolomics: Back to Basics. *Phytochemistry Reviews* **2008**, *7* (3), 525–537.
- Vilain, S.; Cosette, P.; Junter, G.-A.; Jouenne, T. Phosphate Deprivation Is Associated with High Resistance to Latamoxef of Gel-Entrapped, Sessile-like *Escherichia Coli* Cells. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* **2002**, No. 49, 315–320.
- Vilain, S.; Cosette, P.; Hubert, M.; Lange, C.; Junter, G.-A.; Jouenne, T. Comparative Proteomic Analysis of Planktonic and Immobilized *Pseudomonas Aeruginosa* Cells: A Multivariate Statistical Approach. *Analytical Biochemistry* **2004**, *329* (1), 120–130.
- de Villiers, A.; Lestremay, F.; Szucs, R.; Gélébart, S.; David, F.; Sandra, P. Evaluation of Ultra Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1127* (1–2), 60–69.
- Vollmer, W.; Joris, B.; Charlier, P.; Foster, S. Bacterial Peptidoglycan (Murein) Hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews* **2008**, *32* (2), 259–286.
- Voynikov, Y.; Zheleva-Dimitrova, D.; Gevrenova, R.; Lozanov, V.; Zaharieva, M. M.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H.; Yagi, S.; Almoulah, N. F.; Momekov, G. Hydroxycinnamic Acid Amide Profile of *Solanum Schimperianum* Hochst by UPLC-HRMS. *International Journal of Mass Spectrometry* **2016**, *408*, 42–50.
- Vreeland, R. H., *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*; Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2012.
- Vu, B.; Chen, M.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. P. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* **2009**, *14* (7), 2535–2554.
- Vynne, N. G.; Månsson, M.; Nielsen, K. F.; Gram, L. Bioactivity, Chemical Profiling, and 16S rRNA-Based Phylogeny of *Pseudoalteromonas* Strains Collected on a Global Research Cruise. *Marine Biotechnology* **2011**, *13* (6), 1062–1073.

- Wagner, A. B. SciFinder Scholar 2006: An Empirical Analysis of Research Topic Query Processing. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2006**, *46* (2), 767–774.
- Wagner-Döbler, I.; Beil, W.; Lang, S.; Meiners, M.; Laatsch, H. Integrated Approach to Explore the Potential of Marine Microorganisms for the Production of Bioactive Metabolites. In *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*; Springer, 2002; pp 207–238.
- Wahl, M. Marine Epibiosis. I. Fouling and Antifouling: Some Basic Aspects. *Marine Ecology Progress Series* **1989**, *58*, 175–189.
- Wahl, M.; Goecke, F.; Labes, A.; Dobretsov, S.; Weinberger, F. The Second Skin: Ecological Role of Epibiotic Biofilms on Marine Organisms. *Frontiers in Microbiology* **2012**, *3*.
- Wang, Y.; Fang, X.; An, F.; Wang, G.; Zhang, X. Improvement of Antibiotic Activity of *Xenorhabdus Bovienii* by Medium Optimization Using Response Surface Methodology. *Microbial cell factories* **2011**, *10* (1), 1.
- Wanner, B. L. Phosphorus Assimilation and Control of the Phosphate Regulon. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, 2nd ed.* ASM Press, Washington, DC **1996**, *41*, 1357–1381.
- Wassinger, A.; Zhang, L.; Tracy, E.; Munson, R. S.; Kathariou, S.; Wang, H. H. Role of a GntR-Family Response Regulator LbrA in *Listeria Monocytogenes* Biofilm Formation. *PLoS ONE* **2013**, *8* (7), e70448.
- Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Heath, B. S.; Yang, J. Y.; Kersten, R. D.; van der Voort, M.; Pogliano, K.; Gross, H.; Raaijmakers, J. M.; et al. Mass Spectral Molecular Networking of Living Microbial Colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (26), E1743–E1752.
- van Wezel, G. P.; McDowall, K. J. The Regulation of the Secondary Metabolism of *Streptomyces*: New Links and Experimental Advances. *Natural Product Reports* **2011**, *28* (7), 1311.
- Wietz, M.; Mansson, M.; Gotfredsen, C.; Larsen, T. O.; Gram, L. Antibacterial Compounds from Marine *Vibrionaceae* Isolated on a Global Expedition. *Marine Drugs* **2010**, *8* (12), 2946–2960.
- Wietz, M.; Månsson, M.; Gram, L. Chitin Stimulates Production of the Antibiotic Andrimid in a *Vibrio Coralliilyticus* Strain. *Environmental Microbiology Reports* **2011**, *3* (5), 559–564.
- Wilmes, P.; Bowen, B. P.; Thomas, B. C.; Mueller, R. S.; Deneff, V. J.; VerBerkmoes, N. C.; Hettich, R. L.; Northen, T. R.; Banfield, J. F. Metabolome-Proteome Differentiation Coupled to Microbial Divergence. *mBio* **2010**, *1* (5), e00246-10-e00246-14.
- Winder, C. L.; Dunn, W. B.; Schuler, S.; Broadhurst, D.; Jarvis, R.; Stephens, G. M.; Goodacre, R. Global Metabolic Profiling of *Escherichia Coli* Cultures: An Evaluation of Methods for Quenching and Extraction of Intracellular Metabolites. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (8), 2939–2948.
- Wishart, S. D. Computational Strategies for Metabolite Identification in Metabolomics. *Bioanalysis* **2009**, *1* (9), 1579–1596.
- Wolf, S.; Schmidt, S.; Müller-Hannemann, M.; Neumann, S. In Silico Fragmentation for Computer Assisted Identification of Metabolite Mass Spectra. *BMC bioinformatics* **2010**, *11* (148).

- Wong, H. S.; Maker, G. L.; Trengove, R. D.; O'Handley, R. M. Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolite Profiling of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Differentiates between Biofilm and Planktonic Phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology* **2015**, *81* (8), 2660–2666.
- Woods Hole Oceanographic Institution. *Marine Fouling and Its Prevention*; U.S. Naval Institute, 1952; Vol. 73.
- Xu, Y.-L.; Wang, C.; Ho, W. E.; Ong, C. N. Recent Developments and Applications of Metabolomics in Microbiological Investigations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *56*, 37–48.
- Yanes, O.; Clark, J.; Wong, D. M.; Patti, G. J.; Sánchez-Ruiz, A.; Benton, H. P.; Trauger, S. A.; Despons, C.; Ding, S.; Siuzdak, G. Metabolic Oxidation Regulates Embryonic Stem Cell Differentiation. *Nature Chemical Biology* **2010**, *6* (6), 411–417.
- Yang, J.; Bos, R.; Belder, G. F.; Engel, J.; Busscher, H. J. Deposition of Oral Bacteria and Polystyrene Particles to Quartz and Dental Enamel in a Parallel Plate and Stagnation Point Flow Chamber. *Journal of colloid and interface science* **1999**, *220*, 410–418.
- Yang, J.-L.; Shen, P.-J.; Liang, X.; Li, Y.-F.; Bao, W.-Y.; Li, J.-L. Larval Settlement and Metamorphosis of the Mussel *Mytilus Coruscus* in Response to Monospecific Bacterial Biofilms. *Biofouling* **2013**, *29* (3), 247–259.
- Yao, M.; Elling, F. J.; Jones, C.; Nomosatryo, S.; Long, C. P.; Crowe, S. A.; Antoniewicz, M. R.; Hinrichs, K.-U.; Maresca, J. A. Heterotrophic Bacteria from an Extremely Phosphate-Poor Lake Have Conditionally Reduced Phosphorus Demand and Utilize Diverse Sources of Phosphorus: Phosphorus Demand Corresponds to Environmental Supply. *Environmental Microbiology* **2016**, *18* (2), 656–667.
- Yebra, D. M.; Kiil, S.; Dam-Johansen, K. Antifouling Technology—past, Present and Future Steps towards Efficient and Environmentally Friendly Antifouling Coatings. *Progress in Organic Coatings* **2004**, *50* (2), 75–104.
- Yeom, J.; Shin, J.-H.; Yang, J.-H.; Kim, J.; Hwang, G.-S. 1H NMR-Based Metabolite Profiling of Planktonic and Biofilm Cells in *Acinetobacter Baumannii* 1656-2. *PLoS ONE* **2013**, *8* (3), e57730.
- Yildiz, F. H.; Visick, K. L. Vibrio Biofilms: So Much the Same yet so Different. *Trends in Microbiology* **2009**, *17* (3), 109–118.
- Zech, H.; Thole, S.; Schreiber, K.; Kalhöfer, D.; Voget, S.; Brinkhoff, T.; Simon, M.; Schomburg, D.; Rabus, R. Growth Phase-Dependent Global Protein and Metabolite Profiles of *Phaeobacter Gallaeciensis* Strain DSM 17395, a Member of the Marine *Roseobacter* -Clade. *Proteomics* **2009**, *9* (14), 3677–3697.
- Zeilstra-Ryalls, J. H.; Kaplan, S. Aerobic and Anaerobic Regulation in Rhodobacter Sphaeroides 2.4. 1: The Role of the fnrL Gene. *Journal of Bacteriology* **1995**, *177* (22), 6422–6431.
- Zeng, Z.; Dai, S.; Xie, Y.; Tian, X.; Li, J.; Wang, X. Genome Sequences of Two Pseudoalteromonas Strains Isolated from the South China Sea. *Genome Announcements* **2014**, *2* (2), e00305.
- Zgurskaya, H. I.; Nikaido, H. Multidrug Resistance Mechanisms: Drug Efflux across Two Membranes. *Molecular microbiology* **2000**, *37* (2), 219–225.

Zhang, L.; An, R.; Wang, J.; Sun, N.; Zhang, S.; Hu, J.; Kuai, J. Exploring Novel Bioactive Compounds from Marine Microbes. *Current Opinion in Microbiology* **2005**, *8* (3), 276–281.

Zhang, X.; Chen, H. Metabolomics: Concept, Methods and Potential Prospect in Marine Biology. *Chinese Science Bulletin* **2012**, *57* (25), 3253–3261.

Zhang, X.; Ferguson-Miller, S. M.; Reid, G. E. Characterization of Ornithine and Glutamine Lipids Extracted from Cell Membranes of *Rhodobacter Sphaeroides*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20* (2), 198–212.

Zhou, B.; Xiao, J. F.; Tuli, L.; Ressom, H. W. LC-MS-Based Metabolomics. *Molecular BioSyst.* **2012**, *8* (2), 470–481.

Zobell, C. E. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology* **1943**, *46* (1), 39–56.

.

Laurie FAVRE

Laboratoire MAPIEM, Université de Toulon

**CARACTERISATION PAR ANALYSE METABOLOMIQUE DE
BIOMARQUEURS BACTERIENS AU SEIN DE BIOFILMS MARINS**

En milieu marin, toute surface immergée est soumise à une colonisation par de nombreux organismes (*biofouling*). Le développement de biofilms est une étape clé du phénomène. Les systèmes de communication y sont contrôlés par le biais de signaux chimiques. Dans ce travail, l'étude de la signature métabolique de biofilms naturels formé *in situ* a été réalisée selon un gradient de pollution en contaminants métalliques dans la rade de Toulon et selon la nature du revêtement de la surface immergée. De nettes variations chimiques des biofilms prélevés sont observées et sont corrélées avec des variations en termes de communauté microbiennes. L'étude *in vitro* de 4 souches bactériennes issues de biofilms naturels a permis, après optimisation des méthodologies d'analyse, une discrimination selon leur profil métabolique. Des biomarqueurs ont été mis en évidence, avec notamment la production de lipides ornithine par la souche *Pseudoalteromonas lipolytica*. La réponse biologique de cette souche en fonction de son phénotype et face à un stress cuprique a été étudiée par métabolomique et protéomique révélant d'importantes modulations de certaines voies biosynthétiques.

Mot clés : Bactéries marines, Biofilm, Métabolomique.

**BACTERIAL BIOMARKERS CHARACTERIZATION BY
METABOLOMIC ANALYSIS IN MARINE BIOFILMS**

In the marine environment, any immersed surface is subjected to colonization by many organisms (*biofouling*). The biofilms development is a key stage of this phenomenon. Communication systems are controlled in these structures by chemical signals. In this work, the study of the chemical signature of natural biofilms formed *in situ* was carried out among a gradient of contamination of metal contaminants in the bay of Toulon and according to the nature of the coating on the immersed surface. Clear chemical variations of the biofilms collected were observed and were correlated with variations in microbial community. The *in vitro* study of 4 bacterial strains harvested from natural biofilms allowed, after optimization of the analysis methodologies, their discrimination according to their metabolic profile. Biomarkers were highlighted, particularly ornithine lipids production by the *Pseudoalteromonas lipolytica* strain. The biological response of this strain depending on its phenotype and face to copper stress was studied by metabolomics and proteomics revealing important modulations of certain biosynthetic pathways.

Keywords: Marine bacteria, Biofilm, Metabolomic.