



Caractérisation de la production métabolique de biofilms marins. : Vers une application à l'étude de biofilms complexes in situ

Nathan Carriot

► To cite this version:

Nathan Carriot. Caractérisation de la production métabolique de biofilms marins. : Vers une application à l'étude de biofilms complexes in situ. Chimie organique. Université de Toulon, 2022. Français. NNT : 2022TOUL0001 . tel-03857793

HAL Id: tel-03857793

<https://theses.hal.science/tel-03857793>

Submitted on 17 Nov 2022

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 548 – MER & SCIENCESLABORATOIRE MATERIAUX POLYMERES INTERFACES ENVIRONNEMENT MARIN
(MAPIEM)**THÈSE** présentée par :**Nathan CARRIOT**soutenue le : **04 février 2022**pour obtenir le grade de **Docteur en Chimie**

Spécialités : Métabolomique, biochimie

**Caractérisation de la production métabolique de
biofilms marins**Vers une application à l'étude de biofilms complexes *in situ*THÈSE dirigée par **Gérald CULIOLI et Annick ORTALO-MAGNÉ****JURY :**

M^{me} PRIGENT-COMBARET Claire	Directrice de recherche CNRS Université de Lyon	Rapporteure
M. BERTRAND Samuel	Maître de conférences, HDR Université de Nantes	Rapporteur
M^{me} MICHOTÉY Valérie	Professeure des universités Aix-Marseille Université	Examinatrice
M^{me} DUPUY Nathalie	Professeure des universités Aix-Marseille Université	Examinatrice
M. ARMENGAUD Jean	Directeur de recherche CEA CEA Marcoule	Examinatrice
M. CULIOLI Gérald	Professeur des universités Avignon Université	Directeur de thèse
M^{me} ORTALO-MAGNÉ Annick	Maître de conférences Université de Toulon	Co-encadrante de thèse

REMERCIEMENTS

Je vais essayer de n'oublier personne, je ne garantis rien ! Si j'oublie quelqu'un relisez les remerciements, sinon regardez à la fin des publications vous y êtes peut-être et si vous n'y êtes toujours pas venez me voir je vous payerai un verre pour me faire pardonner (après c'est peut-être juste que je ne vous aime pas).

Une thèse peut métaphoriquement être comparée à une aventure qui a duré 3 ans, on n'en ressort pas le même au grès des rencontres aussi bien professionnelles que personnelles. J'aimerais, à travers ces lignes, exprimer mes remerciements à toutes ces personnes qui ont contribué à ce passage de ma vie. Par définition, une aventure se constitue d'un avant, d'une progression et d'une fin.

Commençons par la fin. Je tiens à remercier les membres de mon jury qui ont accepté de juger ce travail. Tout d'abord les rapporteurs Madame Claire Pringent-Combaret et Monsieur Samuel Bertrand ainsi que les examinateurs Madame Virginie Michotey, Madame Nathalie Dupuy et Monsieur Jean Armengaud, pour avoir accepté de lire ce manuscrit et pour l'enthousiasme que vous avez manifesté en vue de l'évaluation de ce travail de thèse.

Cette thèse ayant eu lieu, je me dois de remercier le Pr Jean-François Chailan (jusqu'en 2020) ainsi que le Pr Hugues Brisset directeurs du laboratoire MAPIEM pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de ce laboratoire. Je remercie également le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation pour le financement de cette thèse.

Parlons maintenant de ceux dont je n'aurai pas croisé la route sans ces années toulonnaises. Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Pr. Gérald Culioli ainsi que ma co-encadrante de thèse le Dr. Annick Ortalo-Magné. Gérald, je me rappelle encore ton coup de fil il y a 4 ans pour le stage de Master 2 et aujourd'hui je suis sur le point de finir ma thèse. Sache que tu as été un mentor pour moi, merci de m'avoir transmis ta passion, de m'avoir fait progresser, de ta confiance et de ton enthousiasme. Annick merci pour tous tes conseils, pour ta disponibilité et ta gentillesse à toute épreuve. Ce fut et restera une fierté et un plaisir de travailler à vos côtés.

Un grand merci à tous ceux qui ont participé à des projets communs toulonnais. Mention spécial au Dr. Jean-François Briand pour ton implication dans mon travail, pour nos discussions et ta super technique de grattage des biofilms. J'adresse mes remerciements au Dr. Benjamin Misson pour son implication et pour sa gestion remarquable du projet C-COMICS auquel j'ai pris beaucoup de plaisir à participer. Merci à toutes les personnes ayant participé à ce projet : le Dr. Natacha Jean, le Dr. Véronique Lenoble, le Dr. Elisabeth Navarro, Seb, Gaël, Benji et Clara.

Direction Marseille où j'adresse un grand merci au Dr. Stéphane Greff pour son aide sur la plateforme MALLABAR. Merci pour ta bonne humeur et ton aide pour les analyses LC-MC, c'est toujours un plaisir d'échanger avec toi dans ce domaine. Merci au Dr. Thierry Pérez, pour l'accueil toujours très chaleureux à la station, et l'intérêt porté à nos travaux.

Restons à Marseille afin de remercier le Dr. Daudé, le Dr. Chabrière, le Dr. Plener ainsi que le Dr. Mion de l'IHU de Marseille pour notre collaboration plus qu'efficace. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous et de partager nos connaissances pour produire ce travail.

Comment ne pas remercier le RFMF (Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique) #BBBS ! Un grand merci aux membres du CA sénior (les vieux !) et du CA junior dont je fais partie. C'est toujours un plaisir d'organiser les différents événements (congrès, webinaires, écoles ...). J'apprends cette autre facette du métier à vos côtés et j'espère continuer cette aventure parallèle avec vous.

Revenons à Toulon et au laboratoire MAPIEM où je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé et accompagné durant ce travail. Merci Raphaëlle, Bruno, Marlène et Fanny pour l'aide apportée dans les laboratoires, les commandes, la gestion des stocks, la sécurité et tout le reste. Le laboratoire ne tournerait pas sans vous. Raph merci pour tes explications en microbio, pour le confocale et pour nos discussions.

Je tiens également à remercier les stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Merci Damien, Julia, Camille, Julien et Lisa d'avoir participé à ces travaux, vous avez chacun apporté votre touche à cette thèse. Julien on se rappellera nos longues visios pendant le confinement pour apprendre à réaliser les réseaux multi-omiques ! Je suis fier de votre réussite, certains d'entre vous sont maintenant en thèse, je vous souhaite le meilleur.

Une mention spéciale à tous les doctorants que j'ai rencontrés au laboratoire durant cette thèse, à ces amis sans lesquels le temps m'aurait paru plus long. A tous les moments de joie partagés.

Je vais commencer par les anciens thésards qui m'ont accueillis à mon arrivée. Merci à Laure, William et Elora d'avoir partagé le bureau X148bis, ça me fait bizarre d'être le dernier restant de ce bureau des légendes. Grandé Wiwi, le panier de basket est toujours dans le bureau, je me suis entraîné, c'est quand tu veux pour une revanche ! Laure alias mam's, merci de tes conseils, même si c'était gênant je te remercie pour tes histoires super bizarres qui m'ont toujours fait rire. Elora tu as été une coloc de bureau au top, on a failli réussir à lancer un projet ensemble, je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites vraiment. Coclet merci de m'avoir pris sous ton aile à mon arrivée, j'espère avoir pris la relève comme tu l'écrivais dans tes remerciements et ne t'inquiète pas la tradition de la tasse à café est toujours en vigueur. Benoit merci pour m'avoir encadré au cours de mon stage de M2, pour toutes les missions récolte et grattage d'algues, tu m'as beaucoup appris (le boss des stats), je t'en suis reconnaissant. J'ai une pensée pour tous les amis devenus docteur : Richard, Clém, Manu, Yacoub, Nersine, Ouassim, Margaux, Alain, Isis, Elisa, Vitalys, Nico.

Viens maintenant la nouvelle génération dont je fais partie. Le doctorat aurait perdu de la saveur sans vous ! Merci pour tous les moments passés ensemble : les soirées musiques et notre groupe « les burritos de la chica », on fera l'Olympia un jour les gars haha, les matchs de tennis, les sorties en voilier, les soirées plages après le travail, la campagne de jeu de rôle, la compétition universitaire de eSport où on a pris des raclées mais bon et toutes les pauses café où l'on débattait de l'utilité de poursuivre la thèse.

Aurélie, poulette, mon binôme au labo pendant deux ans, quelques fois on se saoul mais on s'adore, c'est ça une vraie amitié. Merci pour tous ces moments géniaux passés ensemble, tu vas faire une super thèse j'en suis persuadé ! Alex t'es le mec le plus gentil et altruiste que je connaisse, surtout ne change pas et essaye de t'affirmer un peu plus et n'oublie pas : « le SPORT ». Gauthier merci pour toutes nos discussions et débats footballistique et pour tes démonstrations de danse, ce fut un réel plaisir de t'avoir rencontré. Alex numéro 2 alias heimerdinger, merci pour ces moments passés en préparation du concours la thèse en 180 secondes et les sessions théâtre. Merci également à tous les autres doctorants : Abel, Manar, Sigrid, Farah, Linh, Yannis, Nacer, Alessio, Tanguy, ainsi que tous les membres du laboratoire MAPIEM et les membres du laboratoire SIM.

Un grand merci également à tous les autres doctorants du bâtiment X. On n'a pas la même discipline mais on a la même passion ! Fier d'avoir organisé les premières olympiades inter labo MAPIEM/LIS/MIO, c'était un plaisir de partager ces moments avec vous-même si le MIO se ventera à jamais d'avoir remporté la première édition. J'espère que cet événement continuera chaque année et permettra de rassembler les nouveaux doctorants. Merci Paulo et Will pour les

sorties voiliers, pour tous les moments passés ensemble #BTP #Constructeur d'igloo #Genep'. Baba merci pour les randos, je serai toujours ton copilote. Enfin merci à vous tous pour cette super ambiance : Maxence, Guillaume, Anatole, Pierre, Juliette, Kévin, Nico, Caro, Alex, Alix, Alexandro, Josef, Natacha, Antho, Mel, Bastien, Dylan et Axel.

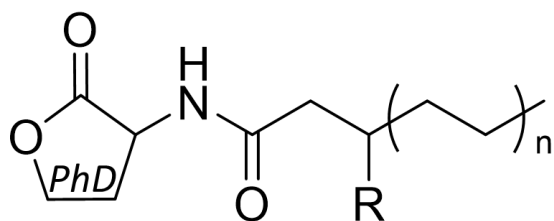
Enfin, je tiens à remercier tous ceux m'ont toujours soutenu, bien avant et pendant cette aventure. A tous mes amis pour leur soutien et leur affection, vous vous reconnaitrez. A mes amis de toujours avec qui j'ai grandi et qui sont toujours présents, mes camarades du fief : Théo, je t'ai toujours considéré comme un frère depuis petit, on a fait les 400 coups ensemble, merci d'être là à tout moment. Alex, merci pour tous nos coups de fils et nos débats scientifiques ou non qui portaient trop loin. Justin, toujours génial de préparer des projets avec toi, t'es un mec en or change pas. Guillaume et Holly prenez soin du premier petit de la bande. Les membres du quatre majeur Titou, Toumou, quid de la rigolade sans vous. Merci à vous tous pour votre amitié Maud, Fanny, Benich, Bouni, David, Quentin, Alexis, François, Léo, Jean, Simon et tous les autres. A mes amis de Corse, le #Ligninecrew, Guillaume, Tim, on va réussir à la monter notre start up un jour j'en suis sûr.

Plus le temps passe et plus je me rend compte de la chance que j'ai d'avoir une famille comme la mienne. Merci pour tout, pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez transmises. A mes oncles, tantes et cousins. Tata merci de m'avoir prêté l'argent pour m'acheter l'ordinateur avec lequel j'écris ces lignes, je pourrais toujours compter sur toi. A ma tante et mon oncle (et parrain) pour m'avoir accueilli en Corse, Vévé je n'aurais pas fait le même parcours sans toi. Gabin merci pour tous ces moments partagés, tu comptes beaucoup pour moi petit cousin. A mes grand parents, pour votre soutien sans faille depuis le début et pour les efforts que vous faites pour essayer de comprendre mon travail, vous êtes géniaux. A mon arrière-grand-mère pour sa sagesse et toutes ses histoires. A ma mère pour son amour et son soutien inconditionnel. A mon père pour sa bienveillance et tous ses encouragements, tu m'as transmis cette mentalité de ne jamais rien lâcher. Je suis fier d'être votre fils. A Antoine, je ne te le dis pas souvent mais je suis très fier d'avoir un petit frère comme toi, merci pour tout, tout ce que l'on partage depuis l'enfance.

C'est rare mais, au cours d'une aventure, il peut arriver de rencontrer une personne bien plus exceptionnelle que les autres. Merci Marion d'être à mes côtés, de me faire rire et de me soutenir dans tous ces moments. J'ai hâte de vivre les prochaines aventures qui nous attendent !

Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme

Lavoisier



VALORISATION SCIENTIFIQUE

Articles

Publications parues

- Mion Sonia*, **Carriot Nathan***, Lopez Julien, Plener Laure, Ortalo-Magné Annick, Chabrière Eric, Culioli Gérald, Daudé David
*These authors contributed equally
“Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*”
npj Biofilms and Microbiomes 7 (2021) 1-16
- **Carriot Nathan**, Paix Benoît, Greff Stéphane, Viguié Bruno, Briand Jean-François, Culioli Gérald
“Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms - The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*”
Talanta (2021) 225, 121925
- Paix Benoît, **Carriot Nathan**, Barry-Martinet Raphaëlle, Greff Stéphane, Misson Benjamin, Briand Jean-François, Culioli Gérald
“Multi-omics analysis suggests links between the differentiated surface metabolome and epiphytic microbiota along the thallus of a Mediterranean seaweed holobiont.”
Frontiers in Microbiology (2020) 11, 494

Publication en révision

Carriot Nathan, Barry-Martinet Raphaëlle, Briand Jean-François, Ortalo-Magné Annick, Culioli Gérald
“Impact of phosphate concentration on the metabolome of biofilms of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica*.”
Metabolomics (n° MEBO-D-21-00151), révisions mineures.

Publication en préparation

Carriot Nathan, Portas Aurélie, Briand Jean-François, Ortalo-Magné Annick, Culioli Gérald
“Study of the role of hydrodynamic parameters on the colonization of artificial surfaces by biofilms in the marine environment.”

Communications orales

- **Carriot Nathan**, Barry-Martinet Raphaëlle, Briand Jean-François, Ortalo-Magné Annick, Culioli Gérald
“Impact de la carence en phosphates sur la production métabolique d’une bactérie marine cultivée en biofilm”
1^{ères} Journées Scientifiques Numériques du Réseau Francophone de Métabolomique et de Fluxomique (RFMF), Perpignan (France), juin 2020.
- **Carriot Nathan**, Barry-Martinet Raphaëlle, Briand Jean-François, Ortalo-Magné Annick, Culioli Gérald
“Impact de la carence en phosphates sur la production métabolique d’une souche bactérienne marine formant un biofilm”
3^{ème} édition de l’école saisonnale du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique junior (RFMF-junior), Tours (France), novembre 2019.
- Paix Benoît, **Carriot Nathan**, Barry-Martinet Raphaëlle, Greff Stéphane, Misson Benjamin, Briand Jean-François, Culioli Gérald
“May differentiated surface metabolome along the thalli of the brown seaweed *Taonia atomaria* shape the epiphytic microbiota?”
Journées de la Société Phycologique de France, Paris (France), novembre 2019.
- **Carriot Nathan**, Paix Benoît, Greff Stéphane, Briand Jean-François, Culioli Gérald
“Variabilité zonale du métabolome de la macroalgue brune *Taonia atomaria* : annotation par l’approche des réseaux moléculaires et liens avec le microbiote associé”
MétaSUD 2019 - Journées de métabolomique en Région SUD - Provence Alpes Côte d’Azur, Toulon (France), juin 2019.
- Paix Benoît, Othmani Ahlem, **Carriot Nathan**, Debroas Didier, Briand Jean-François, Culioli Gérald
“Coupling metabolome and microbiome analyses for deciphering the chemical dialogue between the brown alga *Taonia atomaria* and its epiphytic bacterial communities”
5^{èmes} Journées du GDR MediatEC, Rennes (France), octobre 2018.

Communications par poster

- **Carriot Nathan**, Paix Benoît, Greff Stéphane, Briand Jean-François, Culioli Gérald
“Utilisation de l’approche des réseaux moléculaires pour l’annotation de nouvelles classes de glycérolipides au sein du métabolome de la macroalgue brune *Taonia atomaria*”
MétaSUD 2019 - Journées de métabolomique en Région SUD - Provence Alpes Côte d’Azur, Toulon (France), juin 2019.

- Paix Benoît, Othmani Ahlem, **Carriot Nathan**, Debroas Didier, Greff Stéphane, Briand Jean-François, Culioli Gérald
 “Couplage des analyses du métabolome et du microbiome pour comprendre les interactions chimiques saisonnières entre l’algue brune *Taonia atomaria* et ses communautés bactériennes épiphytes”
MétaSUD 2019 - Journées de métabolomique en Région SUD - Provence Alpes Côte d’Azur, Toulon (France), juin 2019.
- **Carriot Nathan**, Paix Benoît, Greff Stéphane, Briand Jean-François, Culioli Gérald
 “Annotation de nouvelles classes de gly  rolipides par l’approche des réseaux moléculaires au sein du métabolome de la macroalgue brune *Taonia atomaria*”
12  mes Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), Clermont-Ferrand (France), mai 2019.
- **Carriot Nathan**, Paix Benoît, Greff Stéphane, Briand Jean-François, Culioli Gérald
 “Annotation du métabolome de la macroalgue brune *Taonia atomaria* par l’approche des réseaux moléculaires”
26  me Journée de la Chimie SCF-PACA, Nice (France), avril 2019.
Prix du meilleur poster
- Paix Benoît, Othmani Ahlem, **Carriot Nathan**, Debroas Didier, Briand Jean-François, Culioli Gérald
 “Coupling metabolome and microbiome analyses for deciphering the chemical dialogue between the brown alga *Taonia atomaria* and its epiphytic bacterial communities”
11  mes Journées Scientifiques du Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF), Li  ge (Belgique), mai 2018.

Autres communications

- Participation au concours « *Ma Thèse en 180 secondes* » dans le cadre de *La recherche fait son show et des 14  me journées scientifiques de l’Université de Toulon*, Toulon (France), mars 2020
- Co-organisation de l’atelier « *Le fouling dans tous ses   tats* » lors des *10  mes Doctoriades Eurom  diterran  ennes de l’Université de Toulon*, Toulon (France), octobre 2021.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
VALORISATION SCIENTIFIQUE	8
TABLE DES MATIERES	12
TABLE DES ILLUSTRATIONS : FIGURES	17
TABLE DES ILLUSTRATIONS : TABLEAUX	24
LISTE DES ABBREVIATIONS	26
INTRODUCTION GENERALE	29
CHAPITRE I : Etude bibliographique	35
A. Biofilms et communautés microbiennes en milieu marin	37
1. Biofouling	37
1.1. Définitions	37
1.2. Impact du biofouling en milieu marin sur les activités humaines	38
1.2.1. Impact écologique	39
1.2.2. Impact économique	39
1.3. Stratégies antifouling	40
2. Biofilms en milieu marin	41
2.1. Définitions	41
2.2. Développement du biofilm	43
2.2.1. Etapes de formation	43
2.2.2. Rôle du <i>Quorum Sensing</i>	44
2.3. Composition biologique du biofilm marin	45
2.3.1. Composition générale	45
2.3.2. Diversité bactérienne au sein des biofilms marins	45
2.3.3. Composition biochimique des biofilms marins	47
2.3.3.1. Matrice des biofilms : les EPS	48
2.3.3.2. Autres molécules présentes aux seins du biofilm	52
2.4. Impact de l'environnement sur les biofilms marins	54
B. Analyses biochimiques des biofilms marins	56
1. Les approches « -omiques »	56
1.1. Généralités	56
1.2. Génomique – Transcriptomique	57
1.3. Protéomique	58
1.4. Métabolomique	59
1.5. Approches multi-omiques et autres approches omiques	60
2. Métabolomique	62
2.1. Intérêts et enjeux	62
2.2. Métabolomique et biofilms marins	63
2.3. Déroulement d'une analyse métabolomique non ciblée par LC-MS	64
2.3.1. <i>Workflow</i> analytique	65
2.3.2 Préparation des échantillons	66
2.3.3. Analyse par LC-MS	70
2.3.3.1. Chromatographie en phase liquide (HPLC)	70

2.3.3.2. Spectrométrie de masse	71
3. Autres approches analytiques utilisées	81
3.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (IRTF-ATR : <i>Attenuated Total Reflectance</i>)	81
3.2. Dosages colorimétriques	82
3.2.1. Quantification globale (Cristal violet)	82
3.2.2. Dosages des EPS	83
3.3. Microscopie	84
3.3.1. Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)	84
3.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)	85
C. Bilan des approches analytiques au service de la compréhension des biofilms marins & Objectifs de la thèse	86
1. Bilan des approches analytiques au service de la compréhension des biofilms marins	86
2. Objectifs de la thèse	88
CHAPITRE II : Matériels et méthodes générales	91
A. Culture des souches bactériennes marines	93
1. Milieux de culture	93
1.1. Milieu pauvre	93
1.2. Milieu riche	94
2. Conditions de cultures	95
2.1. Conservation des souches bactériennes	95
2.2. Condition et suivi de la croissance bactérienne	95
2.3. Culture <i>in situ</i>	96
B. Etude métabolomique	96
1. Collecte des biofilms, extraction et <i>quenching</i> du métabolome	96
2. Réalisation de l'analyse par LC-MS	98
2.1. Séquence d'injection	98
2.2. UPLC-ESI-QToF	99
3. Extraction et traitement des données brutes	100
3.1. MZmine2	100
3.2. Filtration de la matrice de données	105
3.2.1. Filtration en fonction du rapport signal/bruit	105
3.2.2. Filtration en fonction du coefficient de variation	105
3.2.3. Filtration en fonction du coefficient de corrélation	105
3.3. Analyses statistiques	106
3.4. Identification des biomarqueurs	108
C. Caractérisation des EPS	110
1. Extraction des EPS	110
2. Dosages colorimétriques	111
2.1. Protéines	111
2.2. Sucres	112
2.3. Acides uroniques	113
CHAPITRE III : Couplage d'une approche phytochimique classique et d'une approche par réseau moléculaire basée sur la LC/MS pour l'annotation approfondie du métabolome d'organismes non modèles. L'étude de cas de l'algue brune <i>Taonia atomaria</i>.	115
A. Avant-propos	117

B. Article : Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms - The case study of the brown seaweed <i>Taonia atomaria</i>	119
1. Abstract	120
2. Introduction	121
3. Experimental	123
3.1. Chemicals	124
3.2. Algal material	124
3.3. Isolation of chemical standards from <i>T. atomaria</i>	124
3.3.1. Extraction of the algal material and fractionation of the crude extracts by flash-chromatography	124
3.3.2. Purification and structural characterization of chemical standards from <i>T. atomaria</i>	125
3.4. Annotation of the metabolome of <i>T. atomaria</i> using molecular networking (MN)	126
3.4.1. UHPLC-ESI-QToF-MS/MS analyses	126
3.4.2. MS/MS molecular networking using GNPS	126
3.4.3. Metabolite annotation in the MNs	127
4. Results and discussion	128
4.1. Isolation of chemical standards from <i>T. atomaria</i> : a “phytochemical approach”	128
4.2. Annotation of the metabolome of <i>T. atomaria</i> using a restricted MN (MN-1)	129
4.2.1. Annotation of known lipid classes: clusters 1A to 1E	131
4.2.2. Putative annotation of new lipid classes: clusters 1F to 1J	133
4.2.2.1. Geranylgeranylglycerol derivatives (Clusters 1F and 1G)	133
4.2.2.2. Farnesylglycerol derivatives (Cluster 1H)	135
4.2.2.2. Farnesylglycerol derivatives (Cluster 1H)	136
4.2.2.3. Assessment of the annotation carried out using the restricted MN-1	138
4.3. Further annotation of the metabolome of <i>T. atomaria</i> using less restricted MNs (MN-2 and MN-3)	138
4.4. Taxonomical and ecological significance of the annotated metabolites of <i>T. atomaria</i> .	142
4.5. Taxonomical and ecological significance of the annotated metabolites of <i>T. atomaria</i> .	143
5. Conclusion	144
6. Acknowledgments	145
7. Data availability	145
8. Annexe Chapitre III	147

CHAPITRE IV : Impact de la concentration en phosphate sur le métabolome des biofilms produits par la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* **169**

A. Avant-propos	171
B. Article : Impact of phosphate concentration on the metabolome of biofilms of the marine bacterium <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	173
1. Abstract	174
2. Introduction	175
3. Materials and methods	177
3.1. Preparation of bacterial cultures	177
3.2. Characterization of the biofilms of <i>P. lipolytica</i> TC8	178
3.2.1. Biofilm quantification	178
3.2.2. Biofilm viability and cellular organization	179
3.2.3. Gross biochemical composition	180
3.3. Metabolomic analysis	180
3.3.1. Sample preparation	180
3.3.2. UHPLC-MS data acquisition	180
3.3.3. Data processing and statistical analysis	181

3.3.4. Feature annotation via molecular networking	182
4. Results and discussion	183
4.1. Selection of ecologically relevant phosphate concentrations for the culture of biofilms of <i>P. lipolytica</i> TC8	183
4.2. Impact of phosphate concentration on the amount and the structure of biofilms of <i>P. lipolytica</i> TC8	183
4.3. Discrimination of biofilms of <i>P. lipolytica</i> TC8 depending on the phosphate concentration by LC-MS-based metabolomics	185
4.4. Discrimination of biofilms of <i>P. lipolytica</i> TC8 depending on the phosphate concentration by LC-MS-based metabolomics	186
4.5. Membrane lipid adaptation of <i>P. lipolytica</i> TC8 under phosphate-limiting conditions	190
5. Conclusion	192
6. Acknowledgments	193
7. Data availability	193
8. Annexes Chapitre IV	195
CHAPITRE V : Effets de la perturbation du quorum sensing par l'action de la lactonase SsoPox sur la bactérie <i>Chromobacterium violaceum</i>	201
A. Avant-propos	203
B. Article : Disrupting quorum sensing alters social interactions in <i>Chromobacterium violaceum</i>	206
1. Abstract	207
2. Introduction	208
3. Results	210
3.1. Lactonase SsoPox W263I modulates <i>C. violaceum</i> proteome	210
3.2. SsoPox W263I changes the metabolomic profile of <i>C. violaceum</i>	212
3.3. SsoPox W263I hydrolyzes AHLs produced by <i>C. violaceum</i>	214
3.4. Lactonase drastically decreases the production of known QS- associated factors	216
3.5. Combined omics analysis identifies anisomycin as a new QS- regulated factor	219
3.6. <i>C. violaceum</i> toxicity toward Gram-positive <i>Bacillus cereus</i> is inhibited by QQ	221
3.7. SsoPox inhibits <i>C. violaceum</i> toxicity toward unicellular eukaryote <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	222
3.8. SsoPox decreases <i>C. violaceum</i> toxicity in higher eukaryotic models: murine macrophages and planarians	223
4. Discussion	226
5. Methods	227
5.1. Microbial strains and growth conditions	227
5.2. Protein production and purification	227
5.3. Proteome extraction	228
5.4. Label-free quantitative nano-LC-MS/MS proteomic analysis	229
5.5. Metabolite extraction	230
5.6. LC-ESI-MS and MS/MS data acquisition	230
5.7. Metabolomic data processing and analysis	231
5.8. Feature annotation via molecular networking approach	231
5.9. Multi-omic data processing	232
5.10. Lactonase activity measurement	232
5.11. Analysis of quorum sensing-regulated factors	233
5.12. Biofilm formation	233
5.13. Proteolytic activity	233
5.14. Violacein production	233
5.15. Hydrogen cyanide production	234
5.16. Competition assay with <i>B. cereus</i>	234
5.17. Bactericidal effect of <i>C. violaceum</i> supernatant against <i>B. cereus</i>	234

5.18. Toxicity effect of hydrogen cyanide and violacein against <i>B. cereus</i>	235
5.19. Antifungal activity of <i>C. violaceum</i> toward <i>S. cerevisiae</i> assay	235
5.20. Toxicity effect of <i>C. violaceum</i> supernatants and anisomycin against <i>S. cerevisiae</i>	235
5.21. Toxicity effect of anisomycin against <i>S. cerevisiae</i>	235
5.22. LDH cytotoxicity assay toward J774.1 macrophages	236
5.23. Toxicity assay using planarians	236
5.24. Toxicity effect of <i>C. violaceum</i> supernatants against <i>S. mediterranea</i>	237
6. Acknowledgments	237
7. Annexe Chapitre V	239
CHAPITRE VI : Projet ROTOR : Etude du rôle de l'hydrodynamisme sur la colonisation de surfaces artificielles par des biofilms en milieu mari	251
A. Introduction	253
B. Matériels & méthodes	254
1. Système hydrodynamique (rotor immergé)	254
2. Mesure des paramètres environnementaux	256
3. Collecte et analyse des échantillons permettant la réalisation des différentes analyses de caractérisation	256
3.1. Dosages biochimiques des fractions contenant les EPS	256
3.2. Analyse métabolomique non ciblée par UHPLC-HRMS	257
3.3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (IR-TF en mode ATR)	257
3.4. Observations par microscopies	258
C. Résultats & Discussion	259
1. Préambule : Paramètres environnementaux du site d'immersion et observations macroscopiques des biofilms formés <i>in situ</i>	259
1.1. Mesures des paramètres environnementaux au niveau du site d'immersion	259
1.2. Observation macroscopique de la colonisation des plaques immergées	260
2. Impact de l'hydrodynamisme sur la formation des biofilms marins au printemps	261
2.1. Techniques de microscopie	261
2.2. Analyse biochimique des biofilms par dosages colorimétriques	264
2.3. Etude des biofilms par IRTF-ATR	271
2.4. Etude des biofilms par métabolomique non-ciblée (UHPLC-HRMS)	275
3. Complémentarité des méthodes utilisées	279
4. Conclusion	281
5. Annexes Chapitre VI	283
CONCLUSION GENERALE	285
Conclusion générale	287
Perspectives	295
1. Amélioration et développement de méthodologies permettant la caractérisation d'un biofilm	295
2. Etude d'autres facteurs pouvant influencer la formation de biofilm	297
3. Projet C-OMICS EAU	298
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	305

TABLE DES ILLUSTRATIONS : FIGURES

CHAPITRE I : Etude bibliographique

Figure I.1. : Descriptif des différentes étapes conduisant à la colonisation des surfaces immergées (d'après Haras, 2005)	38
Figure I.2. : Biofouling présent sur diverses structures immergées en mer. A Coque d'un bateau (https://www.boatindustry.fr/article/34097/antifouling-durable-des-fonds-europeens-pour-les-nouveaux-revetements-de-coque). B Epave au large de Porquerolles (10m de profondeur). C Structure portuaire au Lazaret. D Hydrolienne (https://www.glofouling.imo.org/the-issue)	38
Figure I.3. : Développement du biofilm bactérien sur une surface immergée	43
Figure I.4. : Représentation de la matrice extracellulaire d'un biofilm (a et b). Représentation des types de liaisons entre les différents exopolymères (c) (Flemming et Wingender, 2010).	48
Figure I.5. : Représentation de la cascade « omique »	56
Figure I.6. : Courbe de l'évolution de publication traitant de la multiomique (Nombre de citations à la recherche TOPIC = « MULTIOMIC OR MULTI-OMIC* » dans WoS 07/09/2021)	60
Figure I.7. : Schématisation des différents processus biologiques étudiés grâce aux sciences « omiques » au sein d'une cellule (inspiré de Science & Vie n° 1242)	61
Figure I.8. : Evolution du nombre de publication traitant du métabolome (Nombre de citations à la recherche TOPIC = « METABOLOM* » dans WoS 14/09/2021)	63
Figure I.9. : Comparaison de la sensibilité relative ou des LDL (lower detection limits) des plates-formes métabolomiques couramment utilisées, notamment la RMN, la GC-MS et la chromatographie liquide LC-MS. masse (LeVatte et al. 2021).	65
Figure I.10. : Workflow général d'une analyse métabolomique non ciblée (par LC-MS)	66
Figure I.11. :	68
Figure I.12. : Schématisation de la paroi membranaire des bactéries Gram négative (à gauche) et Gram positive (à droite) (https://www.nemokennislink.nl/publicaties/zoeken-naar-nieuwe-antibiotica-kan-slimmer/)	69
Figure I.13. : Récapitulatif des différentes techniques d'ionisation et de séparation des ions utilisées en spectrométrie de masse (en rouge, les techniques utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse)	72
Figure I.14. : Ionisation par électrobulbisation (ElectroSpray Ionisation) (inspiré du livre : Identification spectrométrique de composés organiques - 3 ^e édition ; Silverstein, Webster, Kiemle et Bryce 2016)	72
Figure I.15. : Schéma d'un analyseur quadripolaire (inspiré du livre : Identification spectrométrique de composés organiques - 3 ^e édition ; Silverstein, Webster, Kiemle et al. 2016)	74
Figure I.16. : Schéma d'un spectromètre de masse avec un analyseur de masse de type QToF (d'après Allen & McWhinney 2019)	75
Figure I.17. : Représentation tridimensionnelles des données brutes produites en LC-MS (https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry)	76
Figure I.18. : Biofilms cultivés sur surface de verre à 20°C sous flux de milieu sans ajout de DBHB (Standard) et contenant du DBHB. Les biofilms de <i>Paracoccus</i> sp. (4M6), <i>Pseudoalteromonas</i> sp. (5M6) et <i>Bacillus</i> sp. (4J6) ont été détectés en colorant les cellules avec du Syto 9 (Le Norcy et al. 2017).	84
Figure I.19. : Observation du biofilm associé à la surface de la macroalgue brune <i>Taonia atomaria</i> par MEB au niveau de la zone basale. Les flèches désignent les microorganismes identifiés : en vert les bactéries, en rouge les diatomées et en bleu les cyanobactéries (d'après Othmani 2014).	85
Figure I.20. : Figure récapitulative des objectifs de la thèse	90

CHAPITRE II : Matériels et méthodes générales

Figure II.1. : Workflow expérimental pour l'extraction et le quenching du métabolome de biofilms marins	97
Figure II.2. : Organisation de la séquence d'injection pour une analyse métabolomique	98
Figure II.3. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (1/4)	101
Figure II.4. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (2/4)	102
Figure II.5. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (3/4)	103
Figure II.6. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (4/4)	104
Figure II.7. : Etapes de traitement de la matrice finale via MetaboAnalyst 5.0	107
Figure II.8. : Workflow des étapes permettant l'annotation du métabolome grâce aux réseaux moléculaires	110
Figure II.9. : Protocole expérimental permettant la séparation des différentes catégories d'EPS	111
Figure II.10. : Schéma des réactions impliquées lors du dosage colorimétrique des sucres par la méthode de Dubois	112
Figure II.11. : Schéma des réactions impliquées lors du dosage colorimétrique des acides uroniques	113

CHAPITRE III : Couplage d'une approche phytochimique classique et d'une approche par réseau moléculaire basée sur la LC/MS pour l'annotation approfondie du métabolome d'organismes non modèles. L'étude de cas de l'algue brune *Taonia atomaria*.

Figure III.1. : Analytical workflow used in this study	123
Figure III.2. : Restrained molecular network (MN-1) built with MS/MS data of fractions obtained from the crude extracts of the brown alga <i>Taonia atomaria</i> . Node colors were chosen according to the chemical classes (see color code below the network). Nodes with a diamond shape correspond to fragments ions while those with a triangle shape represent compounds with a distinct adduct from the rest of the cluster. Thickness of an edge between two nodes is proportional to the cosine score (CS, from 0.851 to 0.995). Only clusters with at least three nodes are represented. The whole network also includes 39 clusters of two nodes and 512 unbound nodes.	130
Figure III.3. : Annotation of geranylgeranylglycerol (GGG) derivatives in cluster 1F and proposed MS/MS fragmentation pattern for GGG, MGGG (18:4) and MGGG (O-17:2) (Abbreviations: MGGG: Monoradylgeranylgeranylglycerol) (Circles: metabolites; Diamonds: fragments).	135
Figure III.4. : Annotation of cluster 1I and proposed fragmentation pattern for the compound MFuA (20:4) (Abbreviation: MFuA: Monoacylfulvellic acid) (Circles: metabolites; Triangles: adducts)	137
Figure III.5. : Less restricted MN (MN-3) built with MS/MS data of fractions obtained from the crude extracts of the brown alga <i>Taonia atomaria</i>	139
Figure S.III.1. : BPC chromatograms of a selection of fractions obtained from the crude extracts of <i>Taonia atomaria</i>	152
Figure S.III.2. : Compounds isolated from <i>Taonia</i> spp.	153
Figure S.III.3. : Chemical structure of dictyol A and main correlations observed on the HMBC and ¹ H- ¹ H COSY 2D NMR spectra	154
Figure S.III.4-A. : ¹ H NMR spectrum of dictyol A (CDCl ₃ , 400 MHz)	155
Figure S.III.5. : (+)-ESI-HRMS spectrum of dictyol A	157
Figure S.III.6. : Annotation of cluster 1A and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compounds MGDG (14:0/18:1), SQDG(16:0/18:3) and TG (14:0/16:0/16:1) (Abbreviations: DG: Diacylglycerol; MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol; SQDG: Sulfoquinovosyldiacylglycerol; TG: Triacylglycerol)	158
Figure S.III.7. : Restrictive molecular network (MN-1) representing nodes with a color gradient according to their corresponding retention time (Abbreviations: DFG: Diacylfarnesylglycerol; DFuA: Diacylfulvellic acid; DG: Diacylglycerol; DGDG: Digalactosyldiacylglycerol; MFG: Monoacylfarnesylglycerol; MFuA: Monoacylfulvellic acid; MG: Monoacylglycerol; MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol; MGGG: Monoradylgeranylgeranylglycerol; MGGG-OH: Monoradylhydroxygeranylgeranylglycerol; MGMG: Monogalactosylmonoacylglycerol; MGTA: Monoacylglycerol-N,N,N-trimethyl-β-alanine; PC: Phosphatidylcholine;	

CHAPITRE V : Effets de la perturbation du quorum sensing par l'action de la lactonase SsoPox sur la bactérie *Chromobacterium violaceum*.

Figure V.1. : Workflow de l'analyse multi-omique liant métabolique et protéomique _____ 204

Figure V.2. : Réseau multi-omique liant une sélection de données de protéomique et de métabolomique. Seules les molécules associées au QS (rouge), à la biosynthèse de la violacéine (violet), de l'anisomycine (jaune) et du cyanure d'hydrogène ou HCN (bleu) sont représentées. Les corrélations entre protéines (carré) et métabolites (hexagone) sont positives (liens verts) ou négative (liens rouges) et présentent un cut-off supérieur à 0,5 ou inférieur à - 0,5, respectivement. _____ 205

Figure V.3. : PLS-DA analysis of proteomic and metabolomic data of *C. violaceum* cultures with and without lactonase treatment. Score plots of PLS-DA analysis of proteomic (**a**) ($n = 8$: four biological replicates $\times$ two technical replicates indicated by darker point) and metabolomic data (**b**) ($n = 3$: three biological replicates) of SsoPox W263I (0.5 mg ml^{-1}) treated samples (yellow) and untreated ones as negative controls (purple). ____ 210

Figure V.4. : Proteome analysis of *C. violaceum* cultures with and without lactonase treatment. **a** Functional distribution of all proteins detected in *C. violaceum* samples. **b** Functional distribution of proteins significantly impacted by SsoPox W263I treatment. **c** Impact of SsoPox W263I treatment on *C. violaceum* protein production. Heatmap represents the $\log_{10}$ fold change in protein production of SsoPox W263I-treated samples as compared to untreated ones as negative controls (selection criteria for significantly impacted proteins were $P \text{ value} < 0.05$ and fold change ≥ 1.5). Down- and upregulated protein expressions are presented in blue and red, respectively. _____ 211

Figure V.5. : Metabolome analysis of *C. violaceum* cultures with and without lactonase treatment. **a** Impact of SsoPox W263I treatment on *C. violaceum* metabolite production. Heatmap represents the fold change of the 21 most discriminating metabolites (identified by their VIP score through the PLS-DA analysis) between SsoPox W263I (0.5 mg ml^{-1}) treated samples and untreated ones as negative controls. Down- and upregulated metabolite expressions are presented in blue and red, respectively. **b** Molecular network of LC-MS metabolomic data and identification of molecules of interest in clusters. VIPs are circled in blue. For each metabolite, color ratio corresponds to its relative abundance in treated (yellow) and untreated (purple) samples. _____ 213

Figure V.6. : SsoPox W263I impacts production of AHLs in CV 12472. Chemical structures and LC-MS peak area intensities of AHLs and their hydrolyzed form in control (purple) and treated samples (yellow). **a** C9-HSL, **b** C10-HSL, **c** C11-HSL, and **d** other AHLs. Bars represent the mean and standard deviations of peak area intensities on the corresponding LC-MS chromatograms in three biological replicates (each represented by one point). * $P \text{ value} < 0.05$, ** $P \text{ value} < 0.01$, *** $P \text{ value} < 0.001$ according to Student's t test. _____ 215

Figure V.7. : SsoPox W263I inhibits QS-regulated factors production of *C. violaceum*. Mean levels of violacein (**a**) hydrogen cyanide (**b**), protease (**c**), and biofilm (**d**) production of *C. violaceum* untreated (purple) and treated cultures with 0.5 mg ml^{-1} SsoPox W263I (yellow). Error bars represent the standard deviations of $n = 3$ biological replicates (each represented by one point). * $P \text{ values} < 0.05$; ** $P \text{ values} < 0.01$ according to Student's t test. Representative pictures of untreated (yellow squares) and lactonase treated cultures (yellow squares) (**a**) and their biofilm formation after coloration with crystal violet (**d**) are given. Network represents correlation multi-omics networks where proteins (squares) and metabolites (hexagons) involved in violacein (**a**) and hydrogen cyanide production (**b**) production and significantly impacted by SsoPox W263I are positively (green) or negatively (red) connected _____ 217

Figure V.8. : Impact of SsoPox W263I on violacein biosynthesis in *C. violaceum*. **a** Organization of the violacein biosynthesis operon. Arrows indicate the direction of transcription. **b** Simplified representation of SsoPox W263I impact on violacein biosynthesis by CV 12472 untreated (purple) and treated cultures (yellow). Proteins (dashed line boxes) and metabolites (full-line boxes) normalized scaled intensities (NSI) are represented as the mean and standard deviations (Metabolomic: $n = 3$ biological replicates, Proteomic: $n = 8$, 4 biological replicates $\times$ 2 technical replicates). * $P \text{ value} < 0.05$, ** $P \text{ value} < 0.01$, *** $P \text{ value} < 0.001$ according to Student's t test. FC fold change. _____ 218

Figure V.9. : Impact of SsoPox W263I on anisomycin biosynthesis in *C. violaceum*. **a** Organization of the anisomycin biosynthesis operon and impact of SsoPox W263I on the anisomycin biosynthetic pathway. In operon representation, arrows indicate the direction of transcription. Pathway and nomenclature are from Zheng et al.⁴¹. Proteins (dashed line boxes) and metabolites (full-line boxes) normalized scaled intensities (NSI) are represented as the mean and standard deviations (metabolomic: $n = 3$ biological replicates, proteomic: $n =$

8, 4 biological replicates $\times$ 2 technical replicates). *P value <0.05, **P value <0.01, ***P value <0.001 according to Student's t test. FC fold change. b Correlation multi-omics network of the protein AniQ (square) and metabolites (hexagons) involved in the production of anisomycin. Metabolites significantly impacted by SsoPox W263I are positively (green) or negatively (red) connected with AniQ. _____ 220

Figure V.10. : *C. violaceum* interaction with prokaryotic and eukaryotic organisms. a Mean bacterial concentration in CFU ml⁻¹ of *B. cereus* after 8 h of cocultures with *C. violaceum* treated with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow) and untreated cultures as negative controls (purple). Error bars represent the standard deviations of n = 6 experiments (three biological replicates $\times$ two technical replicates). The dotted red line represents the mean bacterial concentration of *B. cereus* monoculture. Representative pictures of dilution on LB-Agar plate (dilution factor at 10⁻⁶) of *B. cereus* cultures with treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow square) and untreated cultures as negative controls (purple square) are given. ***P values <0.001 according to the Student's t test. ND not detected. b Mean yeast concentration in CFU ml⁻¹ of *S. cerevisiae* after 24 h growth on YPD-Agar infected by *C. violaceum* treated with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow) and untreated as negative controls (purple). Error bars represent the standard deviations of n = 3 biological replicates. The dotted red line represents the mean yeast concentration of *S. cerevisiae* on non-infected YPD-Agar. Representative pictures of dilution on YPD-Agar plate (dilution factor at 10⁻²) of *S. cerevisiae* growth on the plate infected by treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow square) and untreated cultures as negative controls (purple square) are given. ***P values <0.001 according to Student's t test. ND not detected. c Cytotoxicity of *C. violaceum* toward J774.1 macrophages with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow) or untreated as negative controls (purple) during a 1.5 h infection at a MOI of 1. Error bars represent the standard deviations of n = 3 replicated experiments. **P values <0.01 according to Student's t test. d Planarian survival in the presence of *C. violaceum* treated with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (dotted line) and untreated cultures as negative controls (full line) at 4 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ (red), 2 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ (blue), 4 $\times$ 10⁸ CFU ml⁻¹ (green). Curves represent survival proportions of ten planarians. According to log-rank (Mantel-Cox) test comparing survival curves in treated and untreated conditions P values <0.0001 for 4 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ and 2 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ conditions and P value = 0.0671 for 4 $\times$ 10⁸ CFU ml⁻¹ concentration. _____ 222

Figure S.V.1 : LC-MS extracted ion chromatograms of supernatant and whole culture extracts of cultures of *C. violaceum* not treated with SsoPox. (A) Identification of HSL in whole culture and supernatant extracts. (B) Identification of anisomycin and violacein in supernatant extracts. _____ 244

Figure S.V.2. : Impact of SsoPox W263I on violacein biosynthesis in *C. violaceum* - extended figure. (A) Organization of the violacein biosynthesis operon. Arrows indicate direction of transcription. (B) Representation of SsoPox W263I impact on violacein biosynthesis by CV 12472 untreated (purple) and treated cultures (yellow). Proteins (dashed line boxes) and metabolites (full line boxes) normalized scaled intensities (NSI) are represented as the mean and standard deviations (metabolomic: n = 3 biological replicates, proteomic: n = 8, 4 biological replicates $\times$ 2 technical replicates). *p-value < 0.05, **p-value < 0.01, ***p-value < 0.001 according to Student's t-test. FC: fold change. _____ 245

Figure S.V.3. : Identification of anisomycin biosynthesis gene cluster in *C. violaceum* ATCC 12472 and comparison with *Streptomyces hygrospinosus* ACCC40033. (A) Blast comparisons of proteins involved in anisomycin biosynthesis between *C. violaceum* and *S. hygrospinosus*. Genes written in green have been previously shown to be necessary for the full anisomycin biosynthesis from L-tyrosine in *S. hygrospinosus*; genes written in orange are those being involved in the glycosylation and deglycosylation steps of anisomycin and its intermediates; genes written in grey have not been shown as being involved in the anisomycin biosynthesis; aniF (blue) is involved in the anisomycin regulation and aniL (purple) codes for a transporter 1. (B) Comparison of *S. hygrospinosus* and *C. violaceum* gene cluster organizations. Full lines indicate sequence identities as revealed by Blast analyses and thickness of the lines represents E-values. The dashed line indicates a similar function without any sequence homology. _____ 246

Figure S.V.4. : Effect of *C. violaceum* supernatant (A), violacein (B) and hydrogen cyanide (C) on the growth of *B. cereus*. Mean bacterial concentration in CFU.ml⁻¹ of *B. cereus* after 8 hours of culture in the presence of 50% of supernatant from treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow bar) or untreated cultures as negative controls (purple bar) (A) and in the presence of violacein (B) and hydrogen cyanide (C) in quantity equivalent to the one in 50% of supernatant from treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow bar) or in untreated cultures (purple bar). Error bars represent the standard deviations of

$n = 6$ experiments (3 biological replicates $\times$ 2 technical replicates) or $n = 3$ biological replicates, each represented by one point. ** p -values < 0.01 according to Student's t -test. ND: Not detected. Dotted red line represents the mean bacterial concentration of *B. cereus* with 50% of culture medium alone. _____ 247

Figure S.V.5. : *C. violaceum* and anisomycin impact on colony size and growth of *S. cerevisiae*. **(A)** Representative pictures of colony formation of *S. cerevisiae* after 24 h at 30°C from left to right : on YPD-Agar infected by untreated *C. violaceum* (dilution factor at 10^{-2}), on YPD-Agar infected by *C. violaceum* treated with 0.5 mg.ml⁻¹ SsoPox W263I (dilution factor at 10^{-4}), on YPD-Agar containing 500 μ M of anisomycin (dilution factor at 10^{-4}), on YPD-Agar for control (dilution factor at 10^{-4}). Pictures are representative of $n = 3$ independent replicates. **(B)** Mean yeast concentration in CFU.ml⁻¹ of *S. cerevisiae* after 24 hours growth on YPD-agar containing anisomycin at concentrations ranging from 50 nM to 500 μ M. Error bars represent the standard deviations of $n = 3$ biological replicates. Dotted red line represents the mean yeast concentration of *S. cerevisiae* on YPD-Agar only. _____ 248

Figure S.V.6. : Evolution of bacterial concentration of *C. violaceum* with and without planarian over time. Bacterial concentration in CFU.ml⁻¹ of *C. violaceum* treated with 0.5 mg.ml⁻¹ SsoPox W263I (full line) and untreated cultures (dotted line) in well containing planarians **(A)** and well without worm **(B)**. _____ 249

Figure S.V.7. : SsoPox impacts jointly the biosynthesis of toxic metabolites and the production of AHLs. Multi-omics correlation network between AHLs (grey), their hydrolyzed form HSS (grey) and molecules involved in anisomycin (yellow), violacein (purple) and hydrogen cyanide (blue) production. _____ 250

CHAPITRE VI : Projet ROTOR : Etude du rôle de l'hydrodynamisme sur la colonisation de surfaces artificielles par des biofilms en milieu marin

Figure VI.1. : Immersion des échantillons en modes statique et dynamique. **(A)** Vue générale du rotor, **(B)** Vue générale du système d'immersion statique, **(C)** Schématisation globale des systèmes d'immersion et détails des plaques. _____ 255

Figure VI.2. : Organisation des surfaces immergées en fonction de chaque type d'analyses prévues en mode : **(A)** dynamique (rotor) et **(B)** statique _____ 256

Figure VI.3. : Mesures physico-chimiques de l'eau de mer au niveau du site d'immersion (Rade de Toulon). Les indices « **a** », « **b** », « **c** » correspondent aux résultats des analyses des tests post hoc (test de HSD Tukey). ____ 259

Figure VI.4. : Photographies de la colonisation biologique des plaques immergées en fonction de l'hydrodynamisme (V_0 : statique ; V_1 : 1 nœud ; V_2 : 2 nœuds ; V_3 : 3 nœuds ; V_4 : 4 nœuds) et de la saison d'immersion. _____ 260

Figure VI.5. : Observations MEB de biofilms soumis à des conditions hydrodynamiques variées, formés à la surface d'une plaque immergée durant 30 jours (mer Méditerranée). **A-E** : grossissement $\times 100$, **F** : grossissement $\times 800$. Les flèches rouges indiquent des diatomées, les vertes indiquent des bactéries et la flèche bleue indique la matrice d'EPS. _____ 263

Figure VI.6. : Observation par MCLB des biofilms soumis à des conditions hydrodynamiques variées, formés à la surface d'une plaque immergée durant 30 jours (mer Méditerranée). **A** : Vitesse 1 ; **B** : Vitesse 3. En vert les protéines (FITC, λ 523), en orange les polysaccharides (Concanavaline A, λ 573-600) et en rouge l'ADN (SYTO61, λ 651). _____ 264

Figure VI.7. : Hypothèse de localisation des différentes fractions d'EPS collectées (inspiré de Pierre et al. 2014). _____ 265

Figure VI.8. : Boxplots des teneurs en biomolécules dans les biofilms formés in situ [dosées par type (P : Protéines ; G : Glucides ; AU : Acides uroniques) et par fraction (FC : Fraction colloïdale ; FL : Fraction liée ; FR : Fraction résiduelle) selon les conditions hydrodynamiques. Les indices « **a** », « **b** », « **c** » correspondent aux résultats des analyses des tests post hoc (test de HSD Tukey). _____ 267

Figure VI.9. : ACP biplot selon les vitesses sur la FC (Fraction colloïdale) et la FL (Fraction liée). _____ 268

Figure VI.10. : Diagrammes circulaires représentant les proportions des différents EPS (AU/G : rapport acides uroniques sur glucides ; G/P : rapport glucides sur protéines) en fonction du stress hydrodynamique (V_0 : mode statique, V_1 : 1 nœud ; V_2 : 2 nœuds ; V_3 : 3 nœuds ; V_4 : 4 nœuds). _____ 270

Figure VI.11. : Spectres IR-TF (mode ATR) des échantillons de biofilms formés in situ. _____ 272

Figure VI.12. : Score plot de l'ACP obtenue à partir des données IR-TF des échantillons de biofilms formés in situ soumis aux différentes conditions hydrodynamiques (V : Vitesse ; V₀ : statique ; V₁ : 1 nœud ; V₂ : 2 nœuds ; V₃ : 3 nœuds ; V₄ : 4 nœuds ; rep : répliquat ; PC : composante principale). _____ 274

Figure VI.13. : Score plots de **A)** l'ACP et **B)** la PLS-DA obtenus à partir des données LC-(+)-ESI-MS d'échantillons de biofilms formés in situ soumis aux différentes conditions hydrodynamiques (V₀ : statique ; V₁ : 1 nœud ; V₂ : 2 nœuds ; V₃ : 3 nœuds ; V₄ : 4 nœuds ; PC : composante principale). _____ 277

Figure S.VI.1 : Score plots PLS-DA obtenus à partir des données LC-(+)-ESI-MS d'échantillons de biofilms formés in situ comparant : A) modes statique (V₀) et dynamique (V₁ à V₄) et B) Modes statique (V₀), à faible (V₁ et V₂) et fort hydrodynamisme (V₃ et V₄) _____ 284

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Figure VII.1. : Sites d'échantillonnage pour le projet C-OMICS EAU dans la rade de Toulon (mer Méditerranée, France). _____ 299

Figure VII.2. : Score plots de **A)** ACP et **B)** PLS-DA obtenus à partir des données LC-MS d'échantillons formés in situ aux 3 différents sites de prélèvements _____ 300

Figure VII.3. : Réseau moléculaire réalisé sur la plateforme GNPS regroupant les métabolites présents dans les trois types d'échantillons (biofilms, sédiments, eau). (PE : Phosphatidyléthanolamine ; PC : Phosphatidylcholine ; GPS : glycono-phosphoserine) _____ 301

Figure VII.4. : Score plots de **A)** ACP et **B)** PLS-DA obtenus à partir des données LC-MS d'échantillons formés in situ aux 3 différents sites de prélèvements _____ 302

TABLE DES ILLUSTRATIONS : TABLEAUX

CHAPITRE I : Etude bibliographique

Tableau I.1. : Tableau récapitulatif de l'impact du biofouling sur les activités humaines en milieu marin (Inspiré (de Carvalho 2018)).	40
Tableau I.2. : Composants chimiques principaux de la matrice exopolymérique d'un biofilm	49
Tableau I.3. : Fonctions des EPS impliqués dans la matrice de biofilms bactériens. (Inspiré (de Carvalho 2018))	52
Tableau I.4. : Récapitulatif des métabolites identifiés intervenant dans la communication intercellulaire au sein d'un biofilm. Inspiré de (Microbiologie de Prescott)	53
Tableau I.5. : Affectations des principales bandes vibrationnelles infrarouges de la région 3000-900 cm ⁻¹ du spectre ATR-FTIR des pastilles de <i>P. fluorescens</i> récoltées par centrifugation (v: stretching, δ : bending, τ : twist, α : asymmetric, s: symmetric, LPS: lipopolysaccharides) (Quilès et al. 2010).	82
Tableau I.6. : Tableau récapitulatif des études réalisées, en lien avec la bibliographie, par question scientifique liées au biofilms marin	87

CHAPITRE II : Matériels et méthodes générales

Tableau II.1. : Composition chimique du milieu de culture ASW	94
Tableau II.2. : Composition chimique du milieu de culture VNSS	94
Tableau II.3. : Programmation de la phase mobile utilisée lors du profilage par UHPLC des échantillons de biofilms	99

CHAPITRE III : Couplage d'une approche phytochimique classique et d'une approche par réseau moléculaire basée sur la LC/MS pour l'annotation approfondie du métabolome d'organismes non modèles. L'étude de cas de l'algue brune *Taonia atomaria*.

Tableau III.1. : Selected building parameters and results for the MNs constructed with the MS/MS data of fractions obtained from the crude extracts of the brown alga <i>Taonia atomaria</i> .	127
Tableau III.2. : Summary of the annotation of the metabolome of the brown alga <i>Taonia atomaria</i>	141
Tableau S.III.1. : Summary of the fractions obtained after fractionation of the crude extracts of <i>Taonia atomaria</i> by flash-chromatography	151

CHAPITRE IV : Impact de la concentration en phosphate sur le métabolome des biofilms produits par la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica*.

Tableau IV.1. : Culture media with various ecologically relevant phosphate concentrations used in this study for the growth of biofilms of <i>P. lipolytica</i> TC8.	178
Tableau IV.2. : List of the first ten biomarkers (VIPs) identified by LC-MS for the chemical discrimination of biofilm extracts of <i>P. lipolytica</i> TC8 according to the phosphate concentration.	190

CHAPITRE V : Effets de la perturbation du quorum sensing par l'action de la lactonase SsoPox sur la bactérie *Chromobacterium violaceum*.

Tableau S.V.1. : Proteins detected by proteomic analysis, raw data, fold change and functional classification	240
Tableau S.V.2. : Metabolome analysis filtration criteria	241
Tableau S.V.3. : List of VIP metabolites and proposed identification	242
Tableau S.V.4. : Kinetic parameters of SsoPox W263I for C9-HSL, C10-HSL, C11-HSL, C12-HSL, 3-OH-C10-HSL, 3-oxo-C10-HSL and 3-oxo-C12-HSL	243

CHAPITRE VI : Projet ROTOR : Etude du rôle de l'hydrodynamisme sur la colonisation de surfaces artificielles par des biofilms en milieu marin

Tableau VI.1. : Informations relatives aux fluorophores utilisés pour l'analyse des biofilms par MCBL (d'après (Chen et al. 2007)).	258
Tableau VI.2. : Composition biochimique des échantillons de biofilms exprimée en pourcentages de FC (Fraction colloïdale), de FL (Fraction liée) et de FR (Fraction résiduelle) en fonction des différentes conditions hydrodynamiques (V ₀ : Statique ; V ₁ : 1 nœud ; V ₂ : 2 nœuds ; V ₃ : 3 nœuds ; V ₄ : 4 nœuds)	266
Tableau VI.3. : Rapports d'aire des bandes d'absorbance observées par IR de certaines biomolécules (P : Protéines ; G : Glucides ; AU : Acides uroniques ; L : Lipides) entre échantillons de biofilms (V : Vitesse)	273
Tableau VI.4. : Liste des 10 métabolites possédant le VIP score le plus important ainsi que leur annotation putative.	278
Tableau S.VI.1. : Tableau des critères de filtration de l'analyse du métabolome	283

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Tableau VII.1. : Tableau récapitulatif des analyses développées pour la caractérisation des biofilms	293
Tableau VII.2. : Tableau récapitulatif des principaux résultats décrits durant cette thèse concernant la caractérisation des biofilms	294
Tableau VII.3. : Liste des 15 métabolites possédant le VIP score le plus important ainsi qu'une proposition de leur identification et une heatmap (rouge : fortement présent ; orange : moyennement présent ; bleu : peu présent)	303

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACN	: Acétonitrile
AcOEt	: Acétate d'éthyle
ACP	: Analyse en composantes principales
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AHL	: Acyl-homosérine lactone
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ASW	: <i>Artificial sea water</i> (Eau de mer artificielle)
AU	: Acide uronique
BDD	: Base de donnée
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i>
Can	: Cannier
CFU	: <i>Colony forming unit</i>
CID	: <i>Collision induced dissociation</i>
CMM	: <i>CEU Mass Mediator</i>
CNRS	: Centre national de la recherche scientifique
COSY	: <i>Correlated spectroscopy</i>
CS	: <i>Cosine score</i>
DB	: <i>Data base</i>
DBHB	: Dibromohémibastadine-1
DFuA	: <i>Diacylfulvellic acid</i>
DG	: <i>Diacylglycerol</i>
DGA	: Direction générale de l'armement
DGDG	: <i>Digalactosyldiacylglycerol</i>
DGF	: <i>Diacylfarnesylglycerol</i>
DI-MS	: <i>Direct Infusion-Mass Spectrometry</i>
DO - OD	: Densité optique - <i>Optical density</i>
DRACONS	: <i>Drag reducing antifouling coatings for navy ships</i>
EPS	: Extracellular polymeric substances
ESI	: <i>Electrospray ionisation</i>
FA	: <i>Fatty acid</i>
FAHFA	: <i>Fatty acid ester of hydroxy fatty acid</i>
FAL	: <i>Fatty aldehyde</i>
FC	: <i>Fold change</i>
FRC	: <i>Fouling release coating</i>
GC-MS	: <i>Gas chromatography-mass spectrometry</i>
GGG	: <i>Geranylgeranylglycerol</i>
GNPS	: <i>Global natural product social molecular networking</i>

HILIC	: <i>Hydrophilic interaction chromatography</i>
HMBC	: <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMF	: <i>Hydroxy-méthylfurfural</i>
HPLC	: <i>High-performance liquid chromatography</i>
HRMS	: <i>High-resolution mass spectrometry</i>
HSQC	: <i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IMO	: <i>International maritime organization</i>
INEE	: <i>Institut écologie et environnement</i>
IR	: <i>Infrarouge</i>
IRTF-ATR	: <i>Infrarouge à transformée de fourier-attenuated total reflectance</i>
Laz	: <i>Lazaret</i>
LB	: <i>Luria Bertani</i>
LC-MS	: <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LDL	: <i>Lower detection limits</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharides</i>
MAPIEM	: <i>Matériaux polymères interfaces environnement marin</i>
MassIVE	: <i>Mass spectrometry interactive virtual environnement</i>
MB	: <i>Marine broth</i>
MCBL	: <i>Microscopie confocale à balayage laser</i>
MEB	: <i>Microscopie électronique à balayage</i>
MeOH	: <i>Méthanol</i>
MF	: <i>Minimum matched fragment ions</i>
MFuA	: <i>Monoacylfulvellic acid</i>
MG	: <i>Monoacylglycerol</i>
MGDG	: <i>Monogalactosyldiacylglycerol</i>
MGF	: <i>Monoacylfarnesylglycerol</i>
MGGG	: <i>Monoacylgeranylgeranyl glycerol</i>
MGMG	: <i>Monogalactosylmonoacylglycerol</i>
MGTA	: <i>Monoacylglycerol-N,N,N-trimethyl-β-alanines</i>
MHDP	: <i>Meta-hydroxydiphényle</i>
MMM	: <i>Milieu minimum marin</i>
MN	: <i>Molecular networking</i>
MIO	: <i>Institut méditerranéen d'océanologie</i>
MS	: <i>Mass spectrometry</i>
NOESY	: <i>Nuclear overhauser spectroscopy</i>
NSI	: <i>Normalized scaled intensities</i>
OL	: <i>Ornithine lipid</i>
PC	: <i>Phosphatidylcholine</i>
PET	: <i>Polytéréphtalate d'éthylène</i>
PE	: <i>Phosphatidylethanolamine</i>
PLS-DA	: <i>Partial least square discriminant analysis</i>
PSM	: <i>Poste de sécurité microbiologique</i>
PVC	: <i>Polyvinyl chloride</i>

QQ	: <i>Quorum quenching</i>
QQE	: <i>Quorum quenching enzymes</i>
QS	: <i>Quorum sensing</i>
QSI	: <i>Quorum sensing inhibitors</i>
QToF	: <i>Quadrupole-time of flight</i>
rCCA	: <i>Regularized canonical correlation analysis</i>
RF	: <i>Radiofréquence</i>
RMN - NMR	: <i>Résonance magnétique nucléaire - Nuclear magnetic resonance</i>
RNA-seq	: <i>Ribonucleic acid sequencing</i>
RT	: <i>Retention time</i>
SD	: <i>Standard deviation</i>
SQDG	: <i>Sulfoquinovosyldiacylglycerol</i>
SQMG	: <i>Sulfoquinovosylmonoacylglycerol</i>
Suf	: <i>Suffren</i>
TBT	: <i>Tributylétain</i>
TC	: <i>Toulon collection</i>
TCO	: <i>Tomographie en cohérence</i>
TG	: <i>Triacylglycerol</i>
ToF	: <i>Time of flight</i>
t-SNE	: <i>t-distributed stochastic neighbor embeddin</i>
UHPLC	: <i>Ultra high-performance liquid chromatography</i>
UTLN	: <i>Université de Toulon</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
VIP	: <i>Variable importance in projection</i>
VNSS	: <i>Väätänen nine salt solution</i>
W4M	: <i>Workflow for metabolomics</i>
YPD	: <i>Yeast extract peptone dextrose</i>

INTRODUCTION GENERALE



La Terre est la seule planète connue pour accueillir la Vie. Du point de vue du Vivant, une molécule est directement corrélée avec les zones habitables de l'univers : l'eau ! Néanmoins, des conditions de température et de pression optimales sont nécessaires pour que l'eau soit présente à l'état liquide dans un environnement. La surface de notre « planète bleue » est recouverte à plus de 70% par l'eau (océans, lacs et rivières), les moins de 30% restants correspondent aux surfaces continentales et aux îles. Si l'Homme interagit avec le milieu terrestre et les plantes depuis des milliers d'années, l'étude du milieu marin (flore, faune, substances chimiques) est beaucoup plus récente (Joseph and Goulletquer 2017). Les mers et les océans constituent une source de richesses inestimables pour l'Homme, ils lui procurent nourriture et énergie en plus de l'eau essentielle et permettent de faire travailler et de nourrir des millions de personnes à travers le monde chaque jour (Dash et al. 2013). Ils offrent également les principales voies de circulation autour de notre planète. En outre, ces vastes étendues d'eau constituent des acteurs cruciaux de l'équilibre climatique de la planète. Le milieu marin est d'une importance majeure pour le bon fonctionnement de la Terre : il représente le poumon de la planète en procurant près de 50% de l'oxygène que nous respirons et prévient du réchauffement climatique (une grande partie du carbone sur la planète est stocké dans les mers et les océans) (Euzen et al. 2017; Nellemann and Corcoran 2009; Palumbi et al. 2009).

En terme de biodiversité, le monde marin constitue le plus important réservoir d'espèces vivantes (Costello et al. 2013). En effet, les rapports scientifiques évaluent le nombre d'espèces marines décrites de 150 000 à 274 000, et celles qui pourraient exister de 300 000 à plus de 10 millions (Appeltans et al. 2012). De plus, une variété impressionnante d'organismes est présente dans les écosystèmes marins, allant des grands mammifères (Poupard et al. 2021) aux microbes (Godfrin et al. 2018). En moyenne, un seul millilitre d'eau de mer prélevé à moins de 100m de profondeur concentre entre 10^5 et 10^6 bactéries. Bien qu'invisibles à l'œil nu, les bactéries marines sont de véritables actrices de l'équilibre des écosystèmes marins du fait de leur association aux processus de destruction et de recyclage des matières organiques et minérales (La Barre and Haras 2007). Les biotechnologies dites « bleues » (ou biotechnologies marines) concernent la valorisation du fort potentiel, et surtout encore mésestimé, des mers et des océans. En effet, la valorisation des capacités des microorganismes marins est de plus en plus étudiée pour de nombreux domaines d'applications. Un bon nombre d'entre eux peuvent être cités comme : la santé avec la production d'antibiotiques (Okami 1986), l'environnement avec la dégradation des débris plastiques (Derraik 2002) et la biodégradation du pétrole (Nweke and

Okpokwasili 2003), ou encore l'agroalimentaire avec la production d'antioxydants (Balakrishnan et al. 2014).

Cependant, ces microorganismes marins peuvent être une source de problèmes vis-à-vis de l'activité humaine dans le cadre de phénomènes tels que la corrosion ou la biocolonisation. En effet, les bactéries peuvent adopter deux modes de vie différents : sous forme libre (état planctonique) en suspension dans l'eau ou en biofilm adhérent à un substrat (Haras 2005). Ce dernier mode de vie est le plus répandu dans la Nature car il est le plus favorable pour les bactéries. En effet, on estime que plus de 80% de la biomasse microbienne de notre planète est établie sous la forme de biofilms (Richards and Melander 2009). Ce mode de vie communautaire repose sur l'édification d'une matrice extracellulaire par les microorganismes qui confère une intégrité structurelle, protectrice et fonctionnelle à l'ensemble du biofilm (Wingender et al. 1999). En milieu marin, toute surface immergée, biotique ou abiotique, est très rapidement sujette à la colonisation par des biofilms. En outre, ce phénomène biologique de formation des biofilms constitue souvent l'étape initiale d'une colonisation plus complexe, appelée *biofouling*, qui implique un plus large éventail d'autres organismes (notamment des macro-organismes). Le *biofouling* se met en place via des procédés mettant en jeu des mécanismes initiaux purement physico-chimiques (mise en place du film primaire) et évoluant vers des mécanismes biologiques très complexes (installation de larves d'invertébrés et de spores d'algues). Un large panel d'êtres vivants aquatiques (bactéries, eucaryotes unicellulaires, végétaux et animaux) vont former le *biofouling* (Qian et al. 2007).

La présence d'organismes colonisateurs sur les surfaces immergées en milieu marin est la cause de nombreux problèmes pour les activités humaines, principalement économiques (détérioration des structures immergées, ralentissement des navires, augmentation de la consommation en carburant) (Schultz et al. 2011) mais également écologiques (dissémination d'espèces invasives, emploi de biocides *antifouling*) (Alghamdi and Cordova 2019; Alzieu et al. 1986; Yebra et al. 2004). Afin de mieux lutter contre le *biofouling*, l'étude et la compréhension du fonctionnement du précurseur de celui-ci, à savoir le biofilm, est une étape indispensable. Le biofilm, défini comme un agrégat de micro-colonies de cellules microbiennes insérées dans une matrice polymérique extracellulaire, constitue un ensemble complexe et hétérogène. De ce fait, la caractérisation multi-échelles des biofilms marins ne peut se faire par le biais d'un seul type d'analyses. Pour cela, des techniques analytiques ont été développées et mises en place afin d'étudier ce phénomène parmi lesquelles peuvent être citées les diverses

techniques de microscopies, de chromatographies ou encore de spectrométries (De Tender et al. 2017; Favre et al. 2018; Guillonnet et al. 2018; Pan et al. 2010; Quilès et al. 2010).

Au sein d'un biofilm, des signaux chimiques (souvent des molécules de faibles masses moléculaires) peuvent non seulement contrôler l'état physiologique des cellules microbiennes (densité de population, expression de gènes spécifiques) mais ils ont également la capacité de contrôler de nombreux systèmes de communication intra- ou interspécifiques (Decho et al. 2011). Il est maintenant reconnu que cette communication moléculaire (ou *quorum sensing*) intervient également dans les interactions entre les micro-organismes et macro-organismes (algues, larves d'invertébrés, ...) (Yaniv et al. 2017). L'étude de la production métabolique des biofilms marins constitue un élément-clé dans la compréhension de leur formation, de leur composition (communautés), de leur adaptation et plus largement dans la compréhension du phénomène de *biofouling* (Haras 2005).

L'étude de cette composante moléculaire peut être menée de façon globale via une approche de métabolomique, la plus récente des techniques dites « omiques ». L'analyse du métabolome (ensemble des métabolites produits par un organisme) permet à la fois d'identifier et de quantifier des métabolites qui présentent un intérêt intrinsèque, ou qui sont le reflet d'une activité biologique d'intérêt à un temps donné (adhésion, communication, mécanisme de défense ou résistance, protection contre les métaux et les biocides, ...). Les données obtenues lors d'analyses métabolomiques sont d'une grande utilité pour comprendre les causes et/ou les effets de processus biologiques au sein d'un organisme (Johnson et al. 2016). Dans le cas des biofilms marins, ce type d'étude est extrêmement utile pour la compréhension de l'adaptation du biofilm à son environnement ou à un facteur de stress. Les nombreuses conditions (facteurs environnementaux, composition du milieu, type de substrat colonisé ...) auxquelles sont soumis les biofilms engendrent des variations de l'expression des protéines traduisant des modifications dans la biosynthèse des métabolites produits (Raamsdonk et al. 2001). L'intérêt de l'utilisation de cette technologie est de pouvoir mettre en lumière la réponse métabolique d'un biofilm face à un stress particulier (stress hydrodynamique, disponibilité en nutriment, *quorum quenching*, pollution, température, ...).

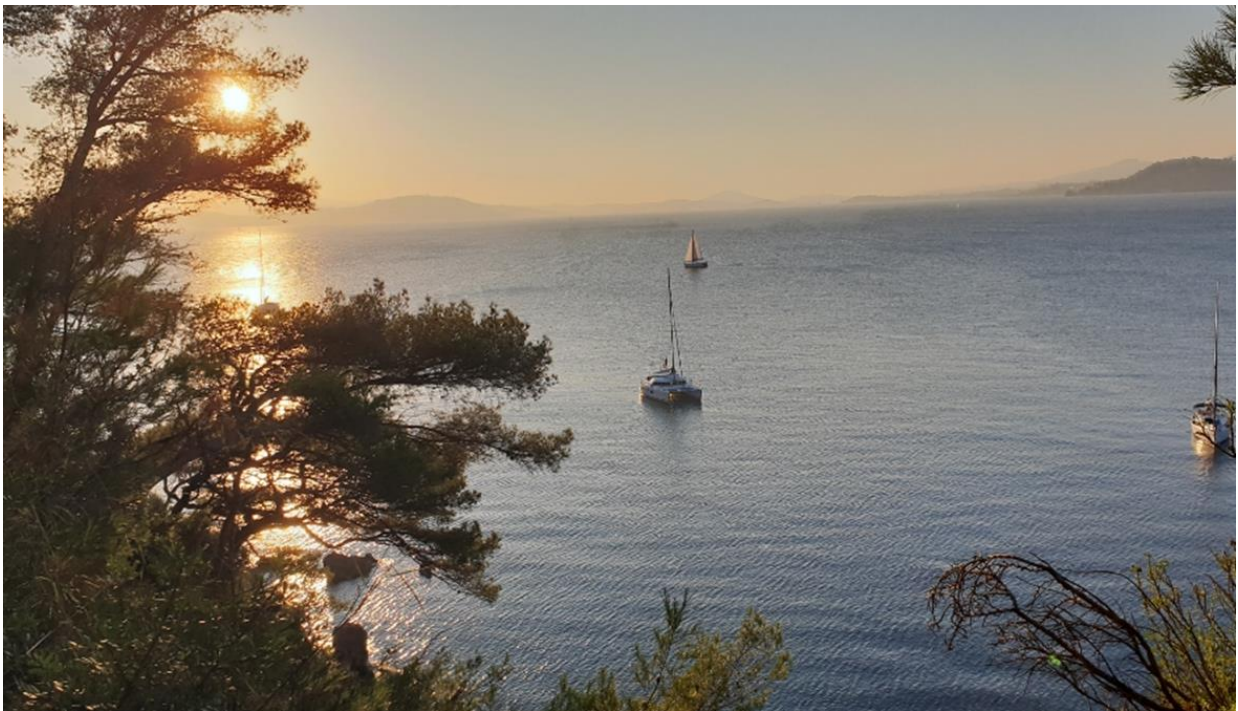
Ces travaux de thèse ont deux objectifs principaux : 1) la mise en place, le développement et/ou le couplage de méthodologies (techniques omiques, dosages colorimétriques, microscopies, spectrométries) permettant une caractérisation multi-échelles des biofilms marins, 2) apporter une meilleure compréhension des biofilms marins. Le développement et le couplage de

méthodologies permettant la caractérisation des biofilms vont, en premier lieu, être appliqués à des biofilms marins formés *in vitro* par des souches-modèles de bactéries marines. À la suite de cela, l'objectif final est la caractérisation globale d'un biofilm marin formé *in situ* grâce aux méthodologies développées.

Pour réaliser ces objectifs, ces travaux de thèse peuvent être divisés en quatre étapes. Dans un premier temps, le développement d'une méthode d'annotation originale du métabolome liant une approche phytochimique « classique » et l'utilisation approfondie de réseaux moléculaires a été effectué. Dans la deuxième partie de ce manuscrit, cette méthode d'annotation par réseau moléculaire a été appliquée dans le cadre d'une analyse métabolomique visant à évaluer l'impact d'une carence en phosphate sur des biofilms monospécifiques. Ces données, mises en relation avec celles obtenues par des techniques colorimétriques, ont permis une caractérisation biochimique plus globale permettant la mise en évidence de l'effet de la carence en phosphate sur le métabolome de biofilms formés *in vitro* par la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica*. Dans un troisième temps, une approche multi-omique liant protéomique et métabolomique a été développée afin de comprendre l'impact du *quorum quenching* (altération de la communication bactérienne) sur le métabolisme d'une bactérie modèle (*Chromobacterium violaceum*). Une large partie des méthodologies mises en place dans les trois premières parties ont ensuite été appliquées à des biofilms marins formés *in situ*. Avec l'aide d'autres techniques (microscopiques et spectroscopiques), l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation de biofilms marins naturels a été déterminé.

CHAPITRE I

Etude bibliographique



A. Biofilms et communautés microbiennes en milieu marin

Cette partie a pour but de présenter la problématique du *biofouling*, ainsi que l'étape de formation des biofilms marins au sein de ce processus naturel complexe. Les surfaces biotiques et abiotiques en milieu marin sont rapidement colonisées par des microorganismes. La colonisation de surface ainsi que le développement et la formation de biofilms engendrent de multiples avantages pour ces organismes, leur permettant de supporter les conditions biogéochimiques et écologiques critiques dans un environnement marin changeant (Dang and Lovell 2016). Néanmoins, ces biofilms ont des effets néfastes (*biofouling* ou la corrosion) vis-à-vis de certaines activités humaines en milieu marin.

1. Biofouling

1.1. Définitions

Le *biofouling* constitue un problème considérable dans beaucoup d'activités humaines. Les secteurs de l'agroalimentaire, de la cosmétique, de la médecine, de la pharmaceutique ou encore des activités marines sont touchés. Le *biofouling* est défini comme un phénomène naturel qui touche toutes les surfaces immergées, qu'elles soient naturelles ou artificielles (Flemming 2002). Bien qu'il soit décrit en milieu terrestre ou en eaux douces sur des surfaces immergées (Uher et al. 2017), le *biofouling* reste un phénomène typiquement marin au vu de la qualité nutritive de l'eau de mer. D'après cette définition, ce phénomène impacte négativement les activités humaines dans de nombreux domaines (Schultz et al. 2011).

Le *biofouling* est un phénomène impliquant des espèces extrêmement complexes et diversifiées. Il est formé par une succession d'étapes plus ou moins indépendantes les unes des autres et il est généralement initié, dès les premières heures d'immersion, par la fixation de bactéries sur un substrat (Figure I.1.). Ces dernières s'organisent ensuite en agrégats, nommés biofilms marins, insérés dans une matrice d'exopolymères (polysaccharides, protéines, ...) (O'Toole et al. 2000) qui constitue un élément-clé de la colonisation (Dang and Lovell 2016). L'organisation en biofilms permet aux micro-organismes de s'adapter rapidement et de faire face à différents types de stress environnementaux (fort hydrodynamisme, carence en nutriments, pH, température, agents toxiques...) (Jamal 2015). Les biofilms sont les précurseurs de l'adhésion de macro-organismes tels que les algues et les invertébrés.

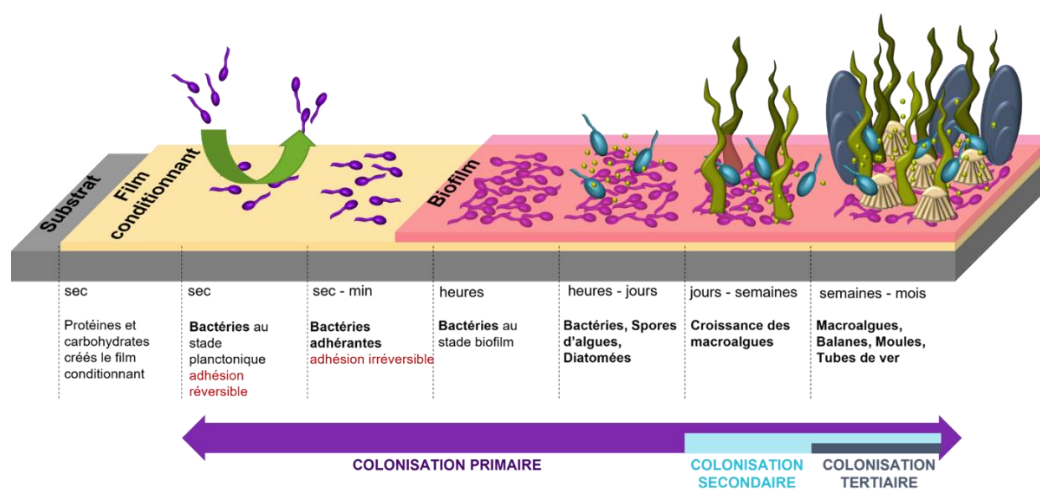


Figure I.1. : Descriptif des différentes étapes conduisant à la colonisation des surfaces immergées (d'après (Védie et al. 2021))

1.2. Impact du biofouling en milieu marin sur les activités humaines

Le *biofouling* est un processus biologique décrit par la colonisation de toute surface en milieu aqueux (coques de bateaux, structures portuaires, infrastructures pétrolières) par une large gamme d'organismes vivants (Figure I.2.). Ainsi, dans l'environnement marin, les substrats naturels ou artificiels sont rapidement sujets à ce phénomène d'encrassement biologique (Brading et al. 1995) qui implique différentes espèces de micro- et de macro-colonisateurs (Railkin 2003).

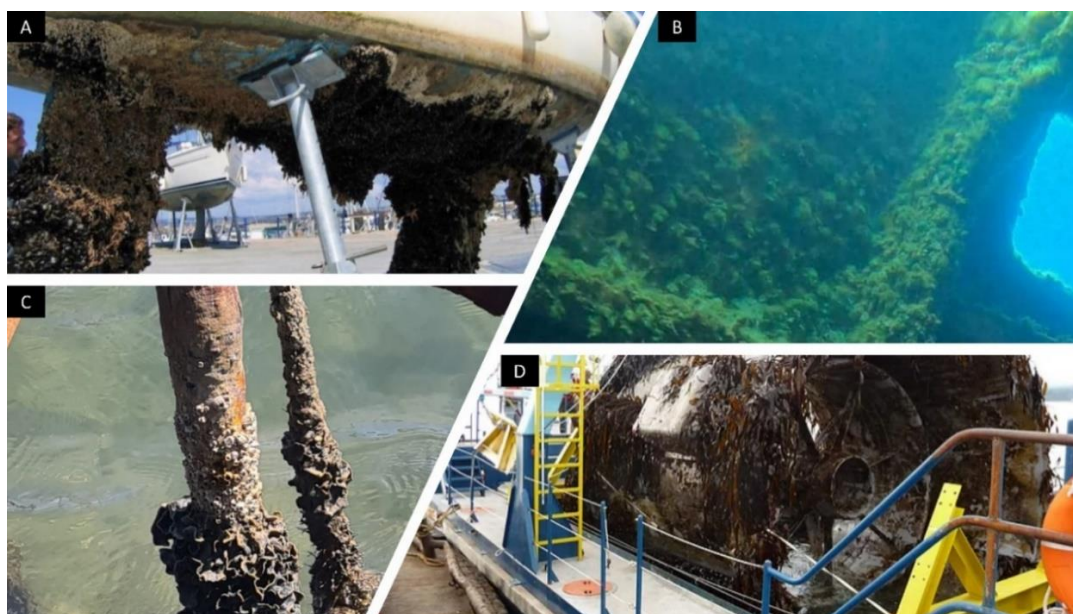


Figure I.2. : *Biofouling* présent sur diverses structures immergées en mer. **A** Coque d'un bateau (<https://www.boatindustry.fr/article/34097/antifouling-durable-des-fonds-europeens-pour-les-nouveaux-revetements-de-coque>). **B** Epave au large de Porquerolles (10m de profondeur). **C** Structure portuaire au Lazaret. **D** Hydrolienne (<https://www.glofouling.imo.org/the-issue>)

1.2.1. Impact écologique

Au cours des dernières années, les eaux de ballast étaient pointées du doigt comme principales responsables dans l'introduction d'espèces non indigènes. En effet, ces eaux de ballast contiennent différentes espèces qui vont être vidées aléatoirement dans les ports et les eaux du monde entier en fonction du trajet du bateau. Néanmoins, certaines recherches suggèrent que le *biofouling* est un vecteur sous-estimé et peut représenter le mécanisme le plus courant pour l'introduction d'espèces indigènes (Leclerc et al. 2018), cela a même été reconnu par l'organisation maritime internationale. Compte tenu des dimensions des coques des navires modernes et du grand nombre de navires marchands (estimé à plus de 55 000 en 2020 par <https://www.statista.com/statistics/264024/number-of-merchant-ships-worldwide-by-type/>) il y a lieu de s'inquiéter sur l'influence du *biofouling* dans la dissémination d'espèces non-indigènes à travers le globe (Alghamdi and Cordova 2019). L'introduction d'espèces non-indigènes va perturber, modifier voire détruire certains écosystèmes fragiles. La « mondialisation » du *biofouling* a un impact écologique important.

La toxicité des anciennes peintures *antifouling* à base de TBT (Tributylétain), pour combattre ce phénomène, a engendré également des effets désastreux sur le milieu marin à proximité des cales sèches et des ports occupés. L'utilisation de ce biocide a néanmoins été prohibée de toutes peintures de bateau en 2008 par l'IMO (*International Maritime Organization*) (Almeida et al. 2007) car il présentait un réel danger pour certains spécimens marins comme les huîtres (Alzieu et al. 1986) et les gastéropodes (Birchenough et al. 2002). Néanmoins beaucoup de peintures *antifouling* contemporaines utilisent encore les biocides et renferment des substances nocives pour les espèces marines et l'environnement marin (Bunet 2020).

1.2.2. Impact économique

Toutes les activités marines sont touchées et par conséquence d'importants impacts économiques vont être engendrés (Tableau I.1.). Les biosalissures génèrent divers effets négatifs sur les matériaux et équipements en milieu marin, notamment l'accélération de la corrosion (Compere 1999) mais surtout les activités de transport maritime. En effet, un biofilm d'une épaisseur de 1 mm peut provoquer une diminution de la vitesse d'un navire de 15% (Callow 1986). Ce phénomène, avec une très forte colonisation, peut générer une augmentation de la consommation de carburant avoisinant les 40% (Schultz et al. 2011) due aux forces de trainées et à la surcharge pondérale générée. Les différentes structures marines vont subir ce phénomène qui va affecter plusieurs domaines (Tableau I.1.) comme l'aquaculture,

l'énergétique ou encore les usines de dessalage (Fernandes et al. 2016; Fitridge et al. 2012; Flemming 1997; Ibrahim 2002; Lane and Willemsen 2004; Schultz et al. 2011; Skovhus et al. 2017).

Industrie	Problème	Coûts estimés	Références
Aquaculture	Encrassement des structures immergées	1,5 à 3 milliards de dollars américains par an	Fitridge et al. 2012
	Biofouling sur les cages à poissons et les sites de crustacés	5 à 10% de la valeur de l'industrie en Europe (environ 260 millions d'euros par an)	Lane and Willemsen, 2004
Echange de chaleur	Diminution du transfert de chaleur et induit la corrosion	7,5% des coûts de maintenance d'une usine de traitement	Ibrahim, 2012
Industrie de l'huile et du gaz	Corrosion microbienne	20 à 30% des coûts liés à la corrosion	Skovhus et al. 2017
Transport maritime	Augmentation de la trainée	Augmentation de la consommation de carburant de 35 à 50%	Schultz et al. 2011
	Encrassement de l'eau de ballast avec espèces non indigènes	1,6 à 4% du coût d'opération annuel d'un navire	Fernandes et al. 2016
Dessalinisation de l'eau	Biofouling des membranes d'osmose inverse	5 à 20% des coûts de fonctionnement du nettoyage	Flemming, 1997

Tableau I.1. : Tableau récapitulatif de l'impact du *biofouling* sur les activités humaines en milieu marin (Inspiré (de Carvalho 2018)).

1.3. Stratégies antifouling

Les revêtements *antifouling* marins développés par le passé contenaient des oxydes métalliques (étain, plomb, cuivre) comme matières actives. Elles ont prouvé une bonne efficacité, néanmoins elles sont toxiques à faibles concentrations pour un grand nombre d'organismes (Alzieu et al. 1980) et s'accumulent durablement dans les écosystèmes marins. Pour lutter contre cette colonisation indésirable et trouver des solutions plus respectueuses de l'environnement, il est nécessaire d'améliorer nos connaissances des mécanismes du *biofouling*, et notamment de l'étape cruciale qu'est la formation des biofilms par les micro-organismes marins.

A l'heure actuelle, sur le marché, il existe 2 grandes catégories de peintures *antifouling* : les revêtements à base de biocides qui vont empêcher l'adhésion des organismes colonisateurs grâce à des agents chimiques et les FRC (*Fouling Release Coating*) dépourvus de biocides

(Bressy and Lejars 2014). Fort de million d'années d'expériences, la nature est sans aucun doute la mieux armée dans la régulation des biosalissures. S'inspirer de cette expérience est donc une option tout à fait cohérente, c'est ce que l'on appelle le « biomimétisme ». Pour donner un exemple, la peau des requins est l'une des première surface naturelle étudiée et copiée (Kirschner and Brennan 2012), celle-ci étant dépourvu d'organismes colonisateurs. Toujours dans une optique de s'inspirer de la nature, il est démontré que certaines espèces marines ont des activités de défense chimique vis-à-vis des colonisateurs. C'est notamment le cas des algues marines qui possèdent un large panel de familles de composés tel que les stéroïdes, les alcaloïdes, les pyroles ou encore les terpénoïdes (Dahms and Dobretsov 2017). Une algue brune (*Taonia atomaria*) a fait l'objet d'une étude au laboratoire MAPIEM (Université de Toulon, France), les composés phytochimiques isolés de la surface de l'algue ont révélé des activités *antifouling* contre plusieurs organismes colonisateurs (Othmani, Briand, et al. 2016; Othmani, Bunet, et al. 2016). Une autre stratégie *antifouling* consiste à interférer le *quorum sensing* (QS) c'est-à-dire le mode de communication et de perception utilisé par les bactéries. Cette méthode d'inhibition du QS est nommé *quorum quenching* (QQ) a pour but de perturber la formation des biofilms (Paluch et al. 2020) via des enzymes ou autres types de molécules isolées à partir d'organismes tels que des bactéries, des champignons, des algues et des organismes marins (Kalia et al. 2015). Par exemple des souches bactériennes isolées de la mer Rouge par (Rehman and Leiknes 2018) ont montré leur capacité à dégrader les molécules du QS grâce à des enzymes QQ potentielles comme les lactonases et les acylases.

2. Biofilms en milieu marin

2.1. Définitions

Le biofilm est défini comme un assemblage de cellules microbiennes qui est associé, de manière irréversible (non éliminé par un rinçage doux), à une surface et enfermé dans une matrice composée principalement de polysaccharides (Donlan 2002). Il constitue une source d'infection microbienne qui présente un danger non-négligeable dans le domaine du soin et de la santé. On a estimé que jusqu'à 80% des infections microbiennes dans le corps humain impliquent des biofilms. La contamination de matériel médical (cathéters, tubes endotrachéaux ou encore articulations prothétiques) représente un réel danger : ces biofilms peuvent bioaccumuler des métaux et des composés toxiques (Hope and Bott 2004). L'utilisation d'antibiotiques est préconisée afin de combattre ces biofilms mais sont peu efficace, en effet les substances polymériques contenues dans la matrice sont connues pour retarder la diffusion des

antibiotiques (Costerton et al. 1999). Bien que présent dans de multiples domaines, c'est son implication dans les difficultés occasionnées concernant les activités marines qui va être souligné dans ces travaux.

Les microorganismes sont les premiers éléments colonisateurs des surfaces immergées. La diversité au sein de ce film précurseur est remarquable, celui-ci est aussi bien constitué de bactéries, d'archées, de cyanobactéries mais également d'eucaryotes unicellulaires comme les microalgues (les diatomées notamment), les champignons microscopiques ou encore les protozoaires (Kanavillil et al. 2015; Pochon et al. 2015). Ces microorganismes, notamment les bactéries, s'organisent en communautés formant des structures complexes de cellules intégrées dans une matrice d'exopolymères. D'un point de vue chimique, les microorganismes sont connus pour produire une vaste gamme de métabolites spécialisés présentant diverses activités biologiques (Favre et al. 2017). La formation de biofilms bactériens est considérée comme une condition préalable et indispensable à l'encrassement (*biofouling*) par des organismes plus gros, tels que les algues et les balanes (Grasland et al. 2003). C'est une stratégie de vie répandue, la croissance dans de telles structures offre de nombreux avantages biologiques importants. Une caractéristique importante des biofilms est leur capacité à modifier les propriétés de la surface à laquelle ils sont attachés. Le biofilm offre un atout majeur pour les microorganismes, en effet la plasticité phénotypique des bactéries est responsable du succès et de l'omniprésence de la formation de biofilm (de Carvalho 2018). De plus, il y a de nombreux autres avantages à la formation du biofilm comme l'accès aux ressources, la protection contre les prédateurs, les virus, les toxines chimiques. Pour survivre à la prédation, les cellules des biofilms peuvent produire des substances chimiques anti-prédateurs tels que la violaceine par exemple, un puissant composé antiprotozoaire (Matz et al. 2008). La structure du biofilm permet également une coopération des métabolites et des échanges génétiques ainsi qu'un haut niveau d'organisation dans les communautés bactériennes. Cet assemblage permet aux microorganismes de prospérer dans des environnements hostiles ou extrêmes (Costerton et al. 1999) où individuellement le maintien de leur activité et leur survie serait difficile. En effet, les biofilms constituent la forme de colonisation la plus réussie au monde, ils subsistent sur les sols, les sédiments, les surfaces minérales, végétales et animales et même les glaciers. Les biofilms peuvent même prospérer dans les zones fortement irradiées des centrales nucléaires (de Carvalho 2007).

2.2. Développement du biofilm

2.2.1. Etapes de formation

Un nombre considérablement plus élevé de bactéries a été observé sur les surfaces immergées que dans l'eau de mer, ainsi l'importance des surfaces solides pour la croissance et l'activité des cellules a été reconnue (de Carvalho 2018). De nombreux composés s'accumulent sur les surfaces immergées et les particules biogéniques sont principalement constituées de restes de squelettes riches en carbone, par exemple d'organismes planctoniques (Costerton et al. 1995; Dang and Lovell 2016). Les bactéries peuvent utiliser ces composés comme source de carbone et d'énergie, de micronutriments et de donneurs/accepteurs d'électrons dans des réactions métaboliques (Costerton et al. 1995; Dang and Lovell 2016). L'avantage le plus important pour les bactéries présentes dans les biofilms marins est probablement l'accès à ces ressources.

Le développement du biofilm bactérien se déroule en fonction d'une succession d'événements biologiques et chimiques spécifiques (Grasland et al. 2003). Ceux-ci incluent : 1) la formation d'un film de conditionnement dû à l'adsorption de molécules organiques et d'ions présents dans l'eau de mer à la surface, 2) les interactions de la bactérie pionnière avec la surface conditionnée, 3) l'adhérence de la bactérie, 4) la croissance de la communauté microbienne, maturation en biofilm et 5) le détachement des cellules (Filloux and Vallet 2003) (Figure I.3.).

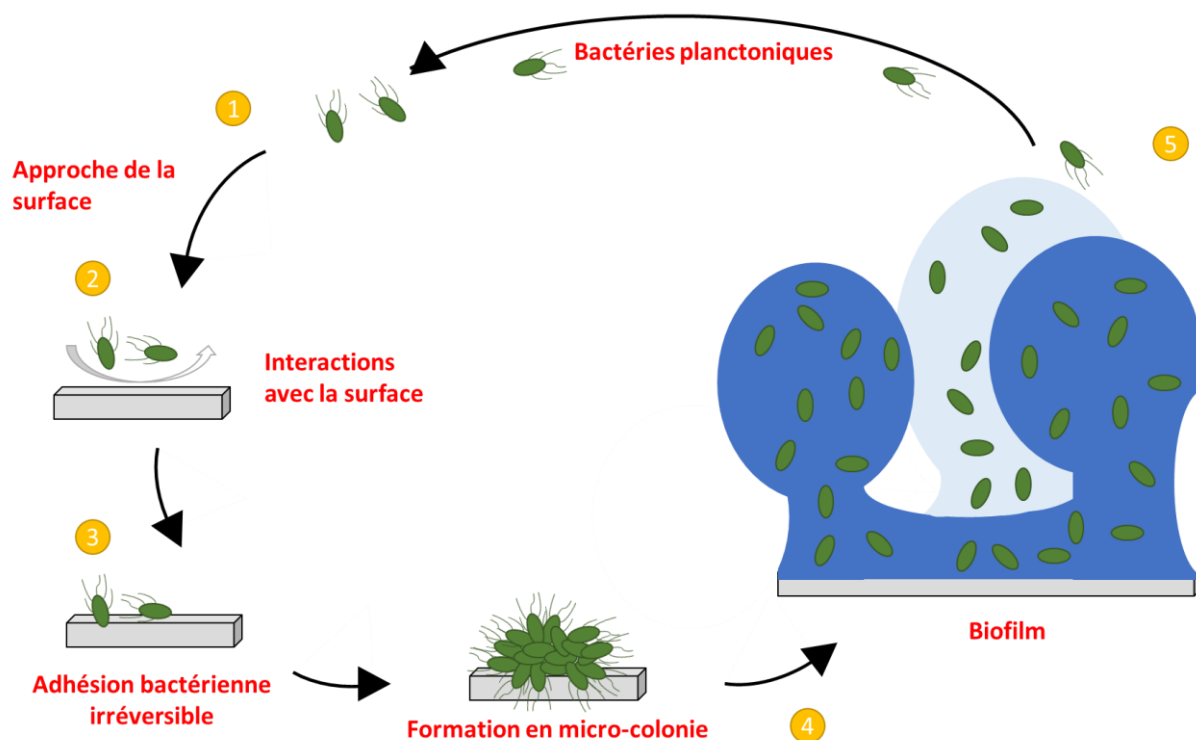


Figure I.3. : Développement d'un biofilm bactérien sur une surface immergée

2.2.2. Rôle du *Quorum Sensing*

Un mode de régulation remarquable chez les bactéries est de plus en plus mis en évidence dans la formation du biofilm, ce mode correspond à la communication entre les bactéries ou autrement nommé le *quorum sensing* (Yaniv et al. 2017). De nombreuses bactéries et archées utilisent le QS comme mécanisme de communication intraspécifique et interspécifique spécialisé pour la sensibilité, la signalisation et la réponse adaptative. Le QS est caractérisé par la production de petites molécules de communications appelé auto-inducteurs. Il joue un rôle important dans la régulation des interactions initiales des microorganismes à la surface, l'attachement à la surface microbienne, l'initiation de la formation de biofilm et le développement du biofilm.

Plusieurs souches bactériennes, comme *Roseobacter* ou *Chromobacterium*, produisent des homosérines lactones acylées comme signaux de communication lorsqu'elles sont attachées à des agrégats de neige marine (Gram et al. 2002). De plus, il a été démontré que les bactéries incapables de synthétiser des molécules de communication inter-bactéries formaient un biofilm radicalement différent de celui d'une souche sauvage, celles-ci ont perdu leur capacité à résister à certains traitements (Haras 2005).

Focus - *Chromobacterium violaceum* (Chapitre 5)

Chromobacterium violaceum est un bacille mobile, anaérobie facultatif, présent dans les sols et dans l'eau (Durán and Menck 2001), à Gram négatif possédant généralement un seul flagelle polaire plus un ou deux flagelles latéraux et pouvant pousser sur des milieux nutritif simple (Kumar 2012). Cette bactérie tellurique est un modèle-type pour l'étude de la biosynthèse de la violacéine (Durán et al. 2016), un pigment naturel présentant des propriétés antibiotiques. De plus, son génome a déjà été séquencé (Brazilian National Genome Project Consortium 2003). Ce pigment est responsable de sa couleur caractéristique et fait partie d'un ensemble de composés libérés par *C. violaceum*, actifs envers les prédateurs et les compétiteurs. De plus il a été démontré que *C. violaceum* utilise un *Quorum sensing* à base d'acyl-homosérine lactone (AHL) (Mion et al. 2021) qui sont des molécules de communication permettant de réguler effets comme la production de protéases ou encore de composés antimicrobiens tels que la violacéine.

De plus, son mutant CV026 est utilisé en tant que biosenseur d'AHLs produits par d'autres microorganismes grâce à sa production de violacéine visible à l'œil nu (Blosser and Gray 2000; McClean et al. 1997). *C. violaceum* ATTC 12472, est un biosenseur capable de produire plus spécifiquement de la violacéine en présence d'AHLs à longues chaînes carbonées (de C₁₀ à C₁₆) (Morohoshi et al. 2008). Ainsi, *C. violaceum* constitue un excellent modèle pour étudier l'action inhibitrice de l'enzyme *SsoPox* sur le QS.

Cette bactérie est donc un candidat de choix pour une étude du *quorum sensing* sur le biofilm étant donné sa production d'AHL impactant le protéome et le métabolome de cet organisme. La violacéine est un pigment bleu-violet produit par plusieurs bactéries dont *C. violaceum* (Durán and Menck 2001), mais également *Pseudoalteromonas luteoviolacea* (L. H. Yang et al. 2007), *Janthinobacterium lividum* (Pantanella et al. 2007) ou encore *Duganella violaceinigra* (Choi et al. 2015). Cette molécule montre une activité biocide dépendante de la densité bactérienne vis-à-vis de nombreux organismes, tels que les champignons, les bactéries, les nématodes et les virus (Durán et al. 2007). La biosynthèse de la violacéine chez *C. violaceum* est dirigée par un mécanisme de QS utilisant des AHLs ainsi qu'un couple de protéines cytoplasmiques CviI/CviR (McClean et al. 1997). Le complexe AHL-CviR stimule la transcription de l'opéron *vioABCDE* (August et al. 2000; Balibar and Walsh 2006; Sánchez et al. 2006) qui exprime cinq enzymes : VioA, VioB, VioC, VioD et VioE (Füller et al. 2016). Au total, la biosynthèse de la violacéine comprend six étapes : cinq réactions enzymatiques (VioA-E) et une étape non enzymatique de décarboxylation oxydative (Hoshino 2011).

2.3. Composition biologique du biofilm marin

2.3.1. Composition générale

L'étude d'un biofilm monospécifique en laboratoire et l'étude d'un biofilm complexe en milieu marin sont deux approches bien différentes. En effet la diversité des biofilms en milieu marin est due aux nombreuses espèces représentées et notamment des deux types d'organismes majoritaires que sont les bactéries et les diatomées (Briand et al. 2012). En plus de ces 2 types d'organismes, le biofilm peut contenir tout un panel de microorganismes tels que des procaryotes ou des eucaryotes unicellulaires (diatomées, flagellés hétérotrophes, amibes et ciliés sessiles), ainsi que des microalgues, des champignons, des protozoaires, des larves d'invertébrés ou encore des spores d'algues (Dürr and Thomason 2009; Pochon et al. 2015; Railkin 2003). Chaque biofilm est hétérogène, unique et changeant en fonction de l'environnement ce qui rend son étude complexe. En effet, la nature des espèces précurseurs du biofilm est déterminante dans la composition de la matrice et de la diversité du phénotype exprimé.

2.3.2. Diversité bactérienne au sein des biofilms marins

Les bactéries apparaissent comme les microorganismes les plus abondants dans les biofilms marins, la plupart de celles-ci sont des bactéries à Gram négatif. Des communautés

protéobactériennes très diversifiées sont présentes au sein de celui-ci. Parmi elles, les Rhodobacteraceae (α -Proteobacteria), les Alteromonodaceae et les Pseudoalteromonodaceae (γ -Proteobacteria) semblaient être les plus dominantes (Briand et al. 2017; Dang and Lovell 2000). D'autres bactéries appartenant aux Flavobacteriia (Pollet et al. 2018), aux Cyanobacteria, aux Bacteroidetes (Sanli et al. 2015) ou encore aux Firmicutes (Dobretsov et al. 2013), détectées par des techniques d'amplification d'ARN, sont également retrouvées au sein de biofilms marins.

Néanmoins l'abondance de ces communautés peut varier en fonction de différents paramètres et notamment du stade d'évolution du biofilm. Il a été décrit précédemment que toutes surfaces immergées en milieu marin sont rapidement sujettes (en quelques minutes) à l'adhésion de communautés bactériennes. Il apparaît que les bactéries pionnières de l'adhésion sont des *Alteromonas* et des *Pseudoalteromonas* ainsi que des *Roseobacter* (Dang et al. 2008; Dang and Lovell 2002; Lee et al. 2008). Le phylum des Proteobacteria étant le plus représenté au sein du biofilm et aligné dès les premiers instants de la colonisation bactérienne, l'étude d'une bactérie représentative de ce groupe (*Pseudoalteromonas lipolytica*) semble plus qu'intéressante pour ces travaux de thèse.

Focus - TC8 : *Pseudoalteromonas lipolytica* (Chapitre 4)

La bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 (TC : Toulon Collection) a été isolée dans la rade de Toulon en mer Méditerranée (Brian-Jaisson et al. 2014). Cette bactérie marine a pour la première fois été isolée par (Xu et al. 2010) dans le fleuve Yangtze. Les *Pseudoalteromonas* sont décrits comme un genre de bactéries marines à Gram négatif par (Gauthier et al. 1995). A l'origine, cette espèce de bactérie était membre du genre *Alteromonas* qui se trouvent dans l'eau de mer. A noter que le genre *Pseudoalteromonas* a été reclassé sous le genre *Agricola* en raison d'une réorganisation taxonomique basée sur l'analyse phylogénétique.

Le genre *Pseudoalteromonas* possède des caractéristiques qui lui sont propres, il regroupe des bacilles à Gram négatif, motiles (Jouault 2019) via une flagelle polaire simple, possédant un métabolisme strictement aérobie (Bowman 2007) et produisant des composés antibiotiques écologiquement et pharmacologiquement pertinents. Cette bactérie marine est utilisée au laboratoire MAPIEM pour la culture de biofilms monospécifiques *in vitro* du fait de sa facilité de croissance (Favre et al. 2017) et elle a fait l'objet de plusieurs études métabolomiques (Favre et al. 2018, 2019).

2.3.3. Composition biochimique des biofilms marins

La formation de la matrice du biofilm par les bactéries adhérentes est un élément-clé dans le phénomène de *biofouling*, en effet elle permet une cohésion du biofilm ainsi qu'un maintien de la structure tout en assurant la protection cellulaire. L'eau représente le constituant majeur de cet ensemble (50% à 95%) (Siegert 1999) dans laquelle des bactéries (2% à 5%) vont produire, via des communications intercellulaires, la matrice des biofilms (Flemming and Wingender 2001) qui représentent la majeure partie de la masse sèche des biofilms (plus de 90%) (Flemming and Wingender 2010). La matrice est le matériau extracellulaire, principalement produit par les organismes eux-mêmes, dans lequel les cellules du biofilm sont incluses. Il consiste en une agglomération de différents types de biopolymères, appelés substances polymériques extracellulaires (EPS) (Battin et al. 2001). Les EPS sont exportées de l'espace intracellulaire pour former la matrice polymérique extracellulaire (Battin et al. 2016), cette matrice est responsable de l'échafaudage du réseau polymère tridimensionnel (Kavita et al. 2013) qui permet le maintien de la structure via diverses interactions entre les exopolymères (Brian-Jaisson 2014). Les interactions permettant de maintenir l'unité du biofilm sont des interactions physico-chimiques faibles (liaisons hydrogènes, interactions électrostatiques et interactions de Van der Waals) représentées sur la figure I.4. (Flemming and Wingender 2010).

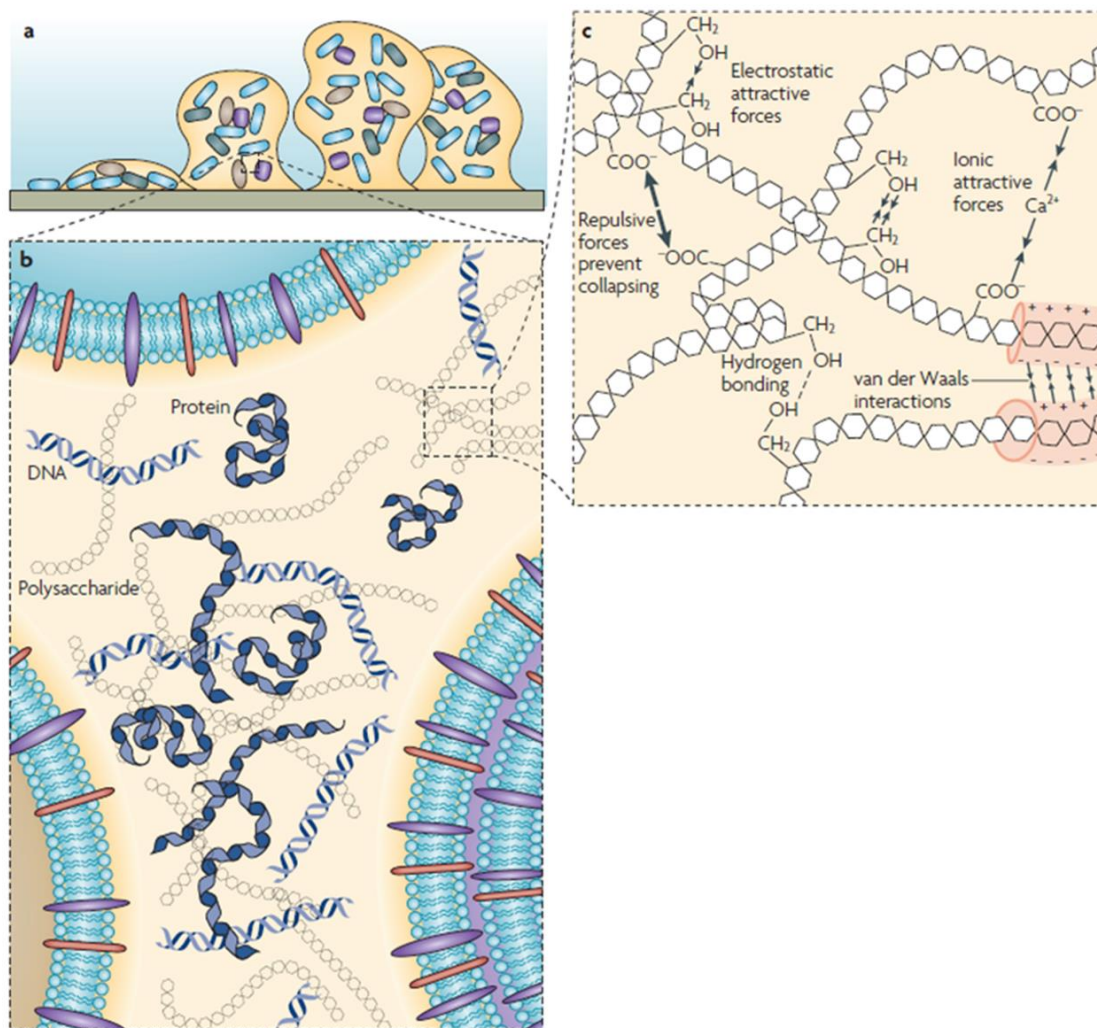


Figure I.4. : Représentation de la matrice extracellulaire d'un biofilm (**a** et **b**). Représentation des types de liaisons entre les différents exopolymères (**c**) (Flemming and Wingender 2010).

2.3.3.1. Matrice des biofilms : les EPS

Les EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) sont définies dès 1989 par (Characklis and Wilderer 1989) comme des « *polymères organiques souvent responsables, dans les biofilms, de la cohésion des cellules et de leur adhésion sur des substrats* ». Depuis, les EPS microbiens ont été identifiés comme responsables de la fixation de micro-organismes sur une matrice et donc de la formation de biofilms stables. De manière plus imagée, si les biofilms sont métaphoriquement comparés à une « *ville des microbes* » (Watnick and Kolter 2000), on peut représenter les EPS comme la « *maison des cellules du biofilm* » qui assure la protection.

Composition chimique des EPS

Les EPS sont principalement composées de macromolécules formées par polymérisation, mais peuvent aussi contenir des groupements non polymérisés de faible poids moléculaire qui modifient fortement la structure et les propriétés physico-chimiques des EPS. Derrière le terme EPS se cache de nombreuses substances connues mais certaines ne sont pas encore clairement identifiées du fait de la grande variété de composés dans la matrice qui peuvent être difficiles à isoler et analyser. (Flemming and Wingender 2010) ont affecté ces EPS comme la « *matière noire* » des biofilms, néanmoins même s'il reste des zones d'ombre sur la caractérisation précise de la totalité des composés, les majoritaires sont identifiés. Ce mélange complexe de biomolécules est composé de : polysaccharides (Sutherland 2001), protéines, acides nucléiques (ADN, ARN) (Jahn et al. 1999; Palmgren and Nielsen 1996) et lipides (Gehrke et al. 1998) (Tableau I.2.). La libération de ces composés à l'extérieur de la cellule, afin de former la matrice, est effectuée grâce à divers processus : sécrétions actives, libération spontanée à la surface cellulaire, la libération de vésicules membranaires ou encore la lyse cellulaire.

Composants	Proportions dans les EPS totaux
Polysaccharides	40-95%
Protéines	<1-60%
Acides nucléiques	<1-10%
Lipides	<1-40%

Tableau I.2. : Composants chimiques principaux de la matrice exopolymérique d'un biofilm

Les exopolysaccharides sont des polymères présentant des masses moléculaires élevées allant de 500 à 2000 kDa (Denkhaus et al. 2007). Les exopolysaccharides microbiens sont de longues molécules linéaires ou ramifiées, ce sont soit des homopolysaccharides soit des hétéropolysaccharides (Czacyk and Myszkka 2007). Les protéines, quant à elles, peuvent être classées en deux types : les protéines enzymatiques et les protéines non enzymatiques qui ont des rôles bien différents au sein du biofilm. Peu de travaux ont été réalisés sur la caractérisation des lipides de la matrice, la plupart de ces lipides sont mentionnés comme étant des exopolymères comme les lipopolysaccharides (LPS) qui sont les principaux composants des bactéries à gram négative. D'autres lipides de plus faible masse moléculaire (<1500 Da) sont présents dans cette matrice comme des phospholipides et ont commencé à être étudiés que très

récemment (Favre et al. 2018). On retrouve également de l'ADN extracellulaire qui peut provenir de la lyse cellulaire ou d'une sécrétion active par des bactéries vivantes lors du développement du biofilm (Brian-Jaisson 2014).

Malgré des similarités entre les biofilms, leur composition et leur quantité en EPS vont varier en fonction du type de microorganisme (Kavita et al. 2013), de l'âge du biofilm (Zhang et al. 2010), des conditions environnementales (Villeneuve et al. 2011; Vu et al. 2009) et également du type de substrat. De plus, la distribution de ces composés est hétérogène au sein du biofilm. Selon leur distribution spatiale, les EPS peuvent être subdivisés en plusieurs groupes. On retrouve les EPS solubles, faiblement liés avec les cellules ou dissous dans la solution, également dénommés EPS colloïdaux. Ces derniers ont une structure souple et de faible densité (Yu et al. 2018; Zhang et al. 2010), ils sont plus sensibles à leur environnement du fait de leur localisation en périphérie du biofilm (Zhang et al. 2010). En se rapprochant du centre de la matrice, on va retrouver les EPS liés (structure EPS double couche dynamique) (Sheng et al. 2010) se subdivisant en deux catégories : les EPS faiblement liés (ou lâchement liés) et les EPS fortement (ou étroitement) liés (Chen et al. 2013). Les plus à même de subir une dégradation sont dans l'ordre les EPS colloïdaux, faiblement liées puis fortement liées. La matrice d'EPS forme donc une structure en bicouche se divisant en 3 types d'EPS (Chen et al. 2013; Poxon and Darby 1997; Yu et al. 2009).

Rôle des EPS

La production d'EPS pour les bactéries adhérentes à un substrat est très rapide, cette production catalysée par les molécules de communications intercellulaires permet de créer un environnement stable et forme un « toit » protecteur pour les bactéries (de Carvalho and Fernandes 2010). Les EPS déterminent les conditions de vie immédiate des cellules du biofilm vivant dans ce microenvironnement en modifiant la porosité, la densité, la teneur en eau, la charge, les propriétés de sorption, le caractère hydrophobe et la stabilité mécanique (Flemming et al. 2007). Ces composés sont primordiaux pour la survie des bactéries et à leur adaptation à l'environnement (Decho 2000), en effet les biofilms ont une capacité exceptionnelle à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes (température, pH, exposition aux rayonnements ou encore biocide) (Nichols et al. 2005) en modifiant notamment leur composition chimique notamment face à un stress osmotique ou une carence en nutriments (azote, phosphate, soufre ou potassium).

Les EPS sont primordiaux lors de la formation et la pérennité du biofilm, les fonctions premières de ces composés sont la protection et l'adaptation du biofilm en fonction de l'environnement, la cohésion et la stabilité au biofilm (Higgins and Novak 1997) et l'adhésion irréversible du biofilm sur le substrat. De plus, les EPS participent à de nombreuses autres fonctions à savoir : piéger les nutriments et minéraux qui favorisent la croissance bactérienne, la stabilisation des enzymes extracellulaires en amortissant les fluctuations de pH et de salinité, l'échange d'informations génétiques, la protection contre la prédation (de Carvalho and Fernandes 2010; Decho and Gutierrez 2017), ou encore la rétention en eau (Wingender et al. 1999). La forte diversité des polysaccharides et des protéines est de plus en plus étudiée et fait ressortir certaines capacités comme la régulation de la synthèse de la matrice (Branda et al. 2006). Il a également été suggéré par (Zhang and Bishop 2003) une utilisation plus rapide des polysaccharides que des protéines lorsque le biofilm est dans un état de restriction. De nombreuses recherches ont démontré la large gamme d'avantages proposés par les EPS, les composés variés de cet ensemble permettent l'obtention de différentes fonctions du biofilm, celles-ci sont détaillées dans le tableau I.3. inspiré des travaux de (Flemming and Wingender 2010).

Fonctions	Action du biofilm	EPS impliqués
Adhésion	Permet les premières étapes de la colonisation des surfaces biotiques et abiotiques par les cellules planctoniques, ainsi que la fixation à long terme de biofilms sur des surfaces	Polysaccharides, protéines, ADN, lipides et molécules amphiphiles
Agrégation de cellules bactériennes	Permet le pontage entre les cellules, l'immobilisation temporaire des populations bactériennes, l'augmentation de la densité cellulaire et la reconnaissance cellule-cellule	Polysaccharides, protéines, ADN, phospholipides
Cohésion et maintien de l'intégrité du biofilm	Forme un réseau de polymères hydratés (la matrice du biofilm), assurant la stabilité mécanique des biofilms et, par le biais de la structure des EPS, déterminant l'architecture du biofilm et permettant la communication	Polysaccharides, protéines (non enzymatiques) et ADN
Rétention d'eau	Maintient un micro-environnement hautement hydraté autour des organismes du biofilm, leur permettant de tolérer la dessiccation dans des environnements déficients en eau	Polysaccharides hydrophiles et protéines
Barrière protectrice	Confère une résistance aux défenses non spécifiques et spécifiques de l'hôte au cours d'une infection, une tolérance à divers agents antimicrobiens	Polysaccharides et protéines
Sorption de composés organiques	Permet l'accumulation de nutriments provenant de l'environnement et de la sorption de xénobiotiques (contribuant ainsi à la désintoxication de l'environnement)	Polysaccharides chargés ou hydrophobes et protéines
Sorption des ions inorganiques	Favorise la formation d'un gel de polysaccharide, l'échange d'ions, la formation de minéraux et l'accumulation d'ions métalliques toxiques (contribuant ainsi à la détoxification de l'environnement)	Polysaccharides et protéines chargées, y compris les substituants inorganiques tels que le phosphate et le sulfate
Activité enzymatique	Permet la digestion de macromolécules exogènes pour l'acquisition de nutriments. Permet la dégradation des EPS structurel, permettant la libération de cellules à partir de biofilms	Protéines
Source de nutriments	Fournit une source de composés contenant du carbone, de l'azote et du phosphore utilisé par les communautés bactériennes des biofilms	Potentiellement tous les EPS
Echange de l'information génétique	Facilite le transfert de gènes horizontaux entre les cellules de biofilm	ADN
Accepteur et donneur d'électrons	Permet une activité rédox dans la matrice de biofilm	Protéines
Exportation de composants cellulaires	Libère du matériel cellulaire en raison du renouvellement métabolique	Vésicules membranaires contenant des acides nucléiques, des enzymes, des lipopolysaccharides et des phospholipides
Excès d'énergie	Stocke l'excès de carbone dans des rapports carbone/azote non équilibrés	Polysaccharides
Liaison d'enzymes	Entraîne l'accumulation, la rétention et la stabilisation des enzymes grâce à l'interaction avec les polysaccharides	Polysaccharides et enzymes

Tableau I.3. : Fonctions des EPS impliqués dans la matrice de biofilms bactériens. (Inspiré (de Carvalho 2018)).

2.3.3.2. Autres molécules présentes aux seins du biofilm

Métabolites liés au Quorum sensing

D'autres types de composés de faible masse moléculaire jouent un rôle très important dans la formation du biofilm comme les peptides ou les enzymes. Les bactéries utilisent également des signaux moléculaires pour communiquer c'est ce qu'on appelle le « *quorum sensing* » découvert il y a environ 40 ans. On sait par exemple que de nombreuses bactéries Gram-négatives fabriquent des acyl-homosérine lactone (AHL) (Stickler et al. 1998)

responsables de la communication intercellulaire et donc du début de la production d'exopolymères. Depuis d'autres molécules représentatives de la communication intercellulaire ont été identifiées régulant diverses fonctions, ces molécules sont décrites dans le tableau I.4.

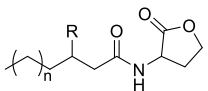
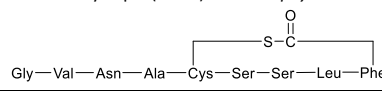
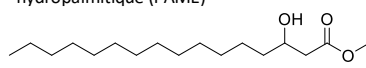
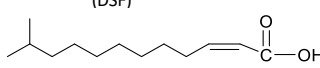
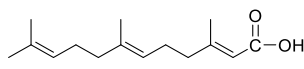
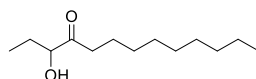
Signal et structure	Organisme représentatif	Fonction régulée
N-acyl-homosérine lactone (AHL) 	<i>Vibrio fischeri</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Erwinia carotovora</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burholderia cepacia</i>	Bioluminescence Transfert de plasmide Virulence et production d'antibiotique Virulence et formation de biofilm Virulence
Furanosylborate (AIP-II) 	<i>Vibrio harveyi</i>	Bioluminescence
Thiolactone cyclique (AIP-II) 	<i>Staphylococcus aureus</i>	Virulence
Méthyl ester acide hydropalmitique (PAME) 	<i>Raistonia solanacearum</i>	Virulence
Acide méthyl-dodécénoïque (DSF) 	<i>Xanthomonas campestris</i>	Virulence
Acide farnésioïque 	<i>Candida albicans</i>	Transition dimorphique et virulence
3-hydroxytridécano-4-one 	<i>Vibrio cholerae</i>	Virulence

Tableau I.4. : Récapitulatif des métabolites identifiés intervenant dans la communication intercellulaire au sein d'un biofilm. Inspiré de (Microbiologie de Prescott)

Autres métabolites

D'autres composés de faible poids moléculaire interviennent dans la matrice et ont des rôles importants dans la cohésion et la formation du biofilm. La détection et l'identification de ces molécules sont, pour la plupart, identifiées grâce à des techniques de spectrométries de masse. Des lipides de faible masse moléculaire sont retrouvés dans les biofilms marins à savoir les glycines lipides, les lipides diamines, les ornithine lipides ou encore les phosphatidyléthanolamines (Favre et al. 2018), ces composés jouent un rôle dans la stabilité de la paroi membranaire des bactéries. Ces petites molécules présentes au sein des biofilm restent peu étudiées, néanmoins elles jouent un rôle clef pour une meilleure compréhension du fonctionnement des biofilms. L'étude par métabolomique des métabolites dans les biofilms

marins n'en n'est qu'à ses tout débuts. C'est pourquoi l'étude de ces composés et la création d'une base de données interne est un enjeu majeur de ces travaux de thèse.

2.4. Impact de l'environnement sur les biofilms marins

La formation de ces structures complexes est influencée par de nombreux facteurs environnementaux et donc spécifique dans des conditions de croissance déterminée. La formation de biofilm peut être affectée par 3 variables en milieu marin : le type de surface (matériaux) colonisée, les variables spatiales et temporelles et les paramètres physico-chimiques (Coclet 2019).

Les types de surfaces colonisables sont très diverses et chacune est caractérisée par des propriétés physico-chimiques qui lui sont propres. Il est de circonstance d'affirmer que les bactéries ont développé des mécanismes adaptatifs dans la colonisation d'un large panel de surfaces, néanmoins le type de surface influence également le type de bactéries colonisatrices et parallèlement les caractéristiques du biofilm formé (Salta et al. 2013). En plus du type de substrat, le biofilm peut être influencé par la rugosité, l'hydrophobie ou encore la couleur du substrat (Dobretsov et al. 2013).

L'effet du type de substrat sur les communautés n'est plus à prouver, néanmoins d'après certaines études récentes, les variations spatiales et temporelles des paramètres environnementaux auraient d'avantage d'influence sur la composition des biofilms marins (Lee et al. 2014; Oberbeckmann et al. 2014). En effet, la diversité de composition des biofilms marins peut s'expliquer par la localisation géographique (Zhang et al. 2019), la profondeur (Bellou et al. 2012) ou encore la saisonnalité (Pinnell and Turner 2020; Witt et al. 2011). La différenciation du biofilm dans ces différentes conditions est dû à la variation des paramètres physico-chimiques. Quel que soit l'espace ou la temporalité dans lequel le biofilm se forme, il est confronté à un large panel de paramètres qui vont le moduler, à ce titre chaque biofilm est différent. De ce fait, les scientifiques utilisent des sondes pour mesurer ces paramètres et connaître leurs impacts. Les paramètres les plus fréquemment observés sont : la qualité et la quantité des nutriments disponibles (Lawes et al. 2016), la concentration de certains métaux, la salinité, la température, le pH, l'oxygène dissous (Briand et al. 2017; Lau et al. 2005) ou encore l'hydrodynamisme. L'étude de (Belando et al. 2017) a permis de mettre en évidence l'impact de certains métaux (Zn et Pb) et nutriments (N et P) sur des biofilms marins *in situ*. Les expériences réalisées ont pu conclure que les métaux semblaient agir comme un facteur sélectif

des espèces tolérantes aux métaux, et les nutriments favorisaient la prolifération de certaines espèces formant des colonies en zigzag (*Neosynedra provincialis*), des tubes muqueux (*Berkeleya spp.*) et des diatomées mobiles (*Navicula salinicola*, *Nitzschia incognita*), conséquence de la formation de biofilms avec une architecture plus complexe.

L'hydrodynamisme est un facteur très important pour connaître l'évolution du biofilm sur les structures humaines immergées comme les bateaux ou les hydroliennes. Une étude réalisée par (Catão et al. 2019) a mis en évidence, avec succès, l'influence des forces hydrodynamique sur le biofilm. Dans cette étude, 3 modes d'immersions (dynamique, cyclique et statique) ont été testés dans la baie de Toulon (Mer Méditerranée). Ces forces hydrodynamiques ont affecté la composition de la communauté procaryote mais également limité la densité cellulaire et par conséquent retardé la maturation du biofilm. Etant peu étudiée pour des questions techniques et expérimentales, une étude sera consacrée à l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation de biofilm marin dans cette thèse afin de mettre en lumière son impact sur la qualité et la quantité de biofilm formé.

B. Analyses biochimiques des biofilms marins

1. Les approches « -omiques »

Le suffixe « -ome », qui vient du grec *-ôma* [-ome, -oma], entre dans la composition des mots désignant un ensemble ou un système ; quant au suffixe « -omique », il se rapporte à la science qui étudie cet ensemble. Le terme « méta-omique » désigne l'ensemble des technologies permettant d'appréhender des systèmes biologiques complexes et dynamiques dans leur globalité.

1.1. Généralités

Les études méta-omiques peuvent utiliser une technique ou en combiner plusieurs pour répondre à une multitude de questions (Morgan and Huttenhower 2014); le but étant de fournir une vue générale d'un phénomène au sein d'un système biologique spécifique (Zhang and Chen 2012). Au cours des dernières décennies, les améliorations continues de certaines technologies telles que le séquençage à haut débit, la spectrométrie (spectrométrie de masse, Résonance magnétique nucléaire(RMN)) ou encore la chromatographie permettent maintenant d'analyser des échantillons complexes avec toujours plus de précision et des temps d'analyse de plus en plus courts. Ainsi, superposés les différents niveaux « omiques » (génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique) permettent d'offrir un aperçu global de toute l'activité moléculaire au sein d'une cellule (Figure I.5.).

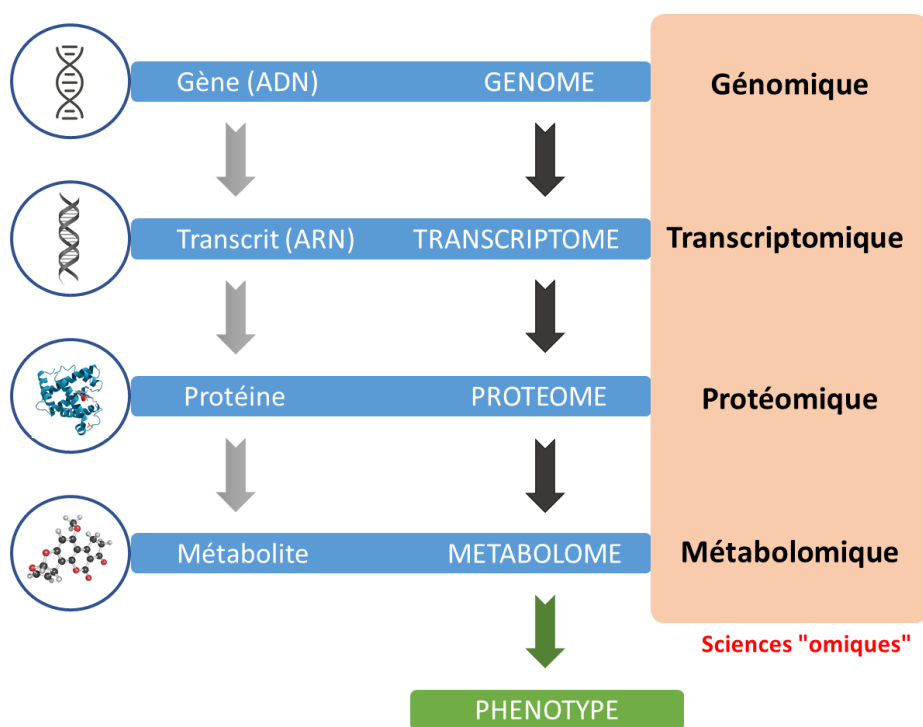


Figure I.5. : Représentation de la cascade « omique »

Cette approche n'offre rien de moins qu'un panorama complet des différents processus biologiques ou un schéma élargi avec les différents détails, variations ou anomalies qui diffèrent entre différents individus ou échantillons.

1.2. Génomique – Transcriptomique

En génétique, le phénotype décrit l'ensemble des caractères observables d'un organisme, il est le point de conclusion de toute la cascade « -omique ».

Le génome désigne l'ensemble des gènes et de l'ADN présents au sein des cellules d'un individu. La génomique est la base de la cascade « -omique », elle a pour vocation d'analyser les génomes via l'étude de leur structure, de leur organisation et de leur fonctionnement. Les premières cartes génétiques et l'étude des gènes chez l'Homme sont apparues dans les années 1980 permettant une première localisation des gènes et depuis une vingtaine d'années, la génomique bouleverse la recherche en génétique et en biologie (Bidanel et al. 2008). Les progrès technologiques pour l'analyse de l'ADN ont permis de ne plus travailler sur des gènes pris un par un mais d'étudier l'ensemble du génome et de son expression. Par opposition avec la génétique, qui étudie spécifiquement les gènes et leur hérédité, la génomique s'intéresse à la quantification et à la caractérisation de l'ensemble des gènes responsables de la production de protéines d'un organisme (Barbier Saint-Hilaire 2019).

La génomique constitue une avancée majeure, notamment dans le domaine de la santé où elle permet d'approfondir les prédispositions génétiques de certaines pathologies, telles que les tumeurs cancéreuses (Abida et al. 2019). Elle représente un espoir pour l'amélioration du diagnostic et du traitement pour un grand nombre de pathologies (Pang 2002).

En ce qui concerne plus précisément les biofilms marins, la génomique constitue une approche qui a été utilisée pour améliorer notre compréhension de ces consortia de microorganismes, principalement dans le but de déterminer la diversité bactérienne présente (Grimaud et al. 2012; Lee et al. 2003; Majzoub et al. 2021).

Les progrès de la génomique ont engendré, par effet boule de neige, le renouvellement des études transcriptomiques. En effet, les premières tentatives d'étude de l'ensemble du transcriptome ont vu le jour au début des années 1990 et les progrès technologiques qui ont suivi quelques années plus tard ont conduit à faire de la transcriptomique une discipline de plus en plus répandue (Lowe et al. 2017). La transcriptomique vise à étudier le transcriptome d'un

organisme, en d'autres termes la somme de toutes ses transcriptions d'ARN. Le génome d'un organisme contient l'ensemble du contenu informationnel qui est ensuite exprimé par transcription. C'est l'ARN messager (ARNm) qui sert de molécule intermédiaire transitoire. Il faut retenir que la transcriptomique donne une image, à un instant donné, de la totalité des transcriptions présentes dans une cellule ou plus largement dans un échantillon. Actuellement, la technologie la plus répandue pour identifier et quantifier les transcrits d'un ou plusieurs individus est le séquençage à haut débit de l'ARN, appelée également RNA-seq (Lopez-Maestre et al. 2017).

Cette technique, souvent associée à la génomique (Zhang et al. 2016), a également sa place dans le panel des techniques utilisées pour la caractérisation des biofilm marins (Rodrigues et al. 2018 ; Chavez-Dozal et al. 2021). Pour citer un exemple, une publication récente de Wang et al. 2021 a notamment utilisé l'analyse transcriptomique comparative étudier la transduction du signal, via des molécules du QS, dans la formation de biofilm marins. Cette étude par transcriptomique a démontré l'importance des molécules de signalisation dans le développement des biofilms marins.

1.3. Protéomique

La protéomique constitue le 3^{ème} maillon de la cascade « -omique », elle a pour but d'analyser l'ensemble des éléments traduits par les ARNm, c'est-à-dire le protéome qui correspond à l'ensemble des protéines d'un échantillon dans des conditions données. Complémentaire aux sciences « -omique » précédentes, la protéomique émerge au milieu des années 1990 (Wasinger et al. 1995; Wilkins et al. 1996). Son succès est lié au fait que la protéine, produit final du gène, est plus représentative de la fonction d'une cellule que le gène lui-même (Zaccaria 2013). Décrire et quantifier l'expression des protéines sous l'influence de certaines conditions définies permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les grandes fonctions cellulaires et la physiologie des organismes vivants. Pour répondre à cet enjeu, diverses technologies de pointe ont été développées telles que l'électrophorèse ou la chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse. Cette dernière est décrite comme l'outil le plus complet et le plus polyvalent pour l'étude de la protéomique à grande échelle (Yates et al. 2009). Le développement de ces techniques est primordial pour étudier l'ensemble d'un protéome, à titre de comparaison le génome humain comporte 27 000 gènes contre 700 000 protéines différentes estimées.

L'analyse du protéome d'un organisme reflète donc l'expression de son génome dans des conditions et en un temps donné. Ainsi, une fonction essentielle des protéines est d'alimenter la cellule en métabolites, ceux-ci jouant des rôles primordiaux dans le maintien et le fonctionnement d'un organisme (Hermier and Mariotti 2018).

La protéomique a été récemment utilisée dans plusieurs études portant sur des biofilms marins (Chandramouli et al. 2013; Romeu et al. 2021; Wu et al. 2021). Pour citer un exemple, elle a permis de comparer l'expression protéique induite, en mode planctonique et en mode biofilm, par la bactérie *Pseudoalteromonas sp.* La protéomique a permis la mise en lumière de plusieurs protéines cytosoliques régulées différemment entre le mode biofilm et planctoniques. D'après Ritter et al. 2012), cela reflète probablement des changements métaboliques concernant l'absorption d'azote, la biosynthèse des acides aminés ou encore le cycle des acides tricarboxyliques.

1.4. Métabolomique

Dernière-née des sciences « -omique » (Tautenhahn, Patti, et al. 2012), la métabolomique a pris son essor à la fin des années 1990 à la suite du développement des techniques « omiques » vues précédemment (Nicholson et al. 1999). Sur le plan méthodologique, une analyse métabolomique a vocation d'établir, en un minimum d'étapes et en un minimum de temps, une image exhaustive du profil métabolique d'un échantillon. Le but est de caractériser qualitativement (donner une structure chimique ou un nom) et quantitativement (fournir une quantité, une teneur, une concentration) tous les analytes d'un échantillon afin de caractériser les phénotypes biochimiques du système étudié (Hounoum et al. 2016).

Grâce aux récentes avancées de technologies telles que la chromatographie ou la spectrométrie de masse, la métabolomique offre la possibilité d'obtenir une vue, aussi complète et précise que possible, d'un grand ensemble de métabolites appelé métabolome. Le métabolome d'un échantillon biologique reflète l'état métabolique des cellules en lien avec la spécificité de leur patrimoine génétique et du contexte environnemental. Le terme métabolome désigne l'ensemble des molécules organiques de faible masse moléculaire (de nature non polymérique) présentes dans un organisme, ou plus généralement dans un échantillon biologique (Cristobal et al. 2014; Oliver et al. 1998).

Deux grands types d'approches métabolomiques sont définies. Une étude métabolomique peut-être ciblée, c'est-à-dire orientée spécifiquement vers l'analyse d'une famille précise de métabolites à détecter et à quantifier. Ce type d'étude est souvent utilisé pour répondre à un questionnement bien précis lié à la variation d'un ou plusieurs métabolites d'intérêts et nécessite l'utilisation de standards chimiques. L'approche métabolomique non-ciblée ou globale est quant à elle utilisée sans à priori sur la nature chimique des analytes.

1.5. Approches multi-omiques et autres approches omiques

Les sciences « omiques » étant très récentes, leur association l'est d'autant plus. Ainsi, l'évolution du nombre d'études scientifiques utilisant des approches multi-omiques a connu une augmentation exponentielle depuis 2015 (Figure I.6.).

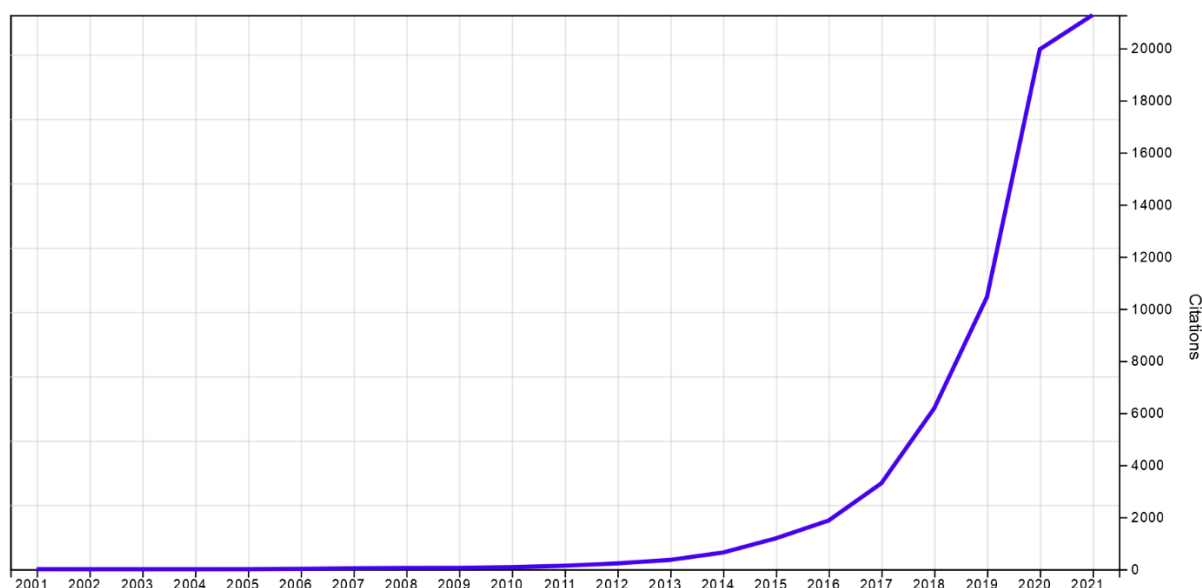


Figure I.6. : Courbe de l'évolution de publications traitant de la multiomique (Nombre de citations à la recherche TOPIC = « MULTIOMIC OR MULTI-OMIC* » dans WoS 07/09/2021)

Les approches multi-omiques visent à donner un panorama complet des processus biologiques permettant de déceler des variations entre individus (Beale et al. 2016) (Figure I.7.). Elles utilisent la bio-informatique et les statistiques pour aborder un phénomène biologique dans son ensemble (Paul et al. 2019). Il existe également d'autres approches « -omiques », plus spécialisées, telles que la lipidomique (uniquement basée sur les lipides) (Holčapek et al. 2018), la fluxomique (analyse des flux métaboliques) (Gopalakrishnan et al. 2020), la toxicogénomique (génomique appliquée à l'identification des gènes affectés par l'exposition de la cellule à une substance toxique) (Chen et al. 2012), la nutriginomique (compréhension des

effets de l'apport alimentaire sur la santé) (Tucker et al. 2013), la glycomique (étude des sucres et de leurs activités) (Ruhaak et al. 2018) ou encore la foodomique (discipline étudiant les domaines de l'alimentation et nutrition dans le but d'améliorer le bien-être et la confiance des consommateurs) (Valdés et al. 2013).

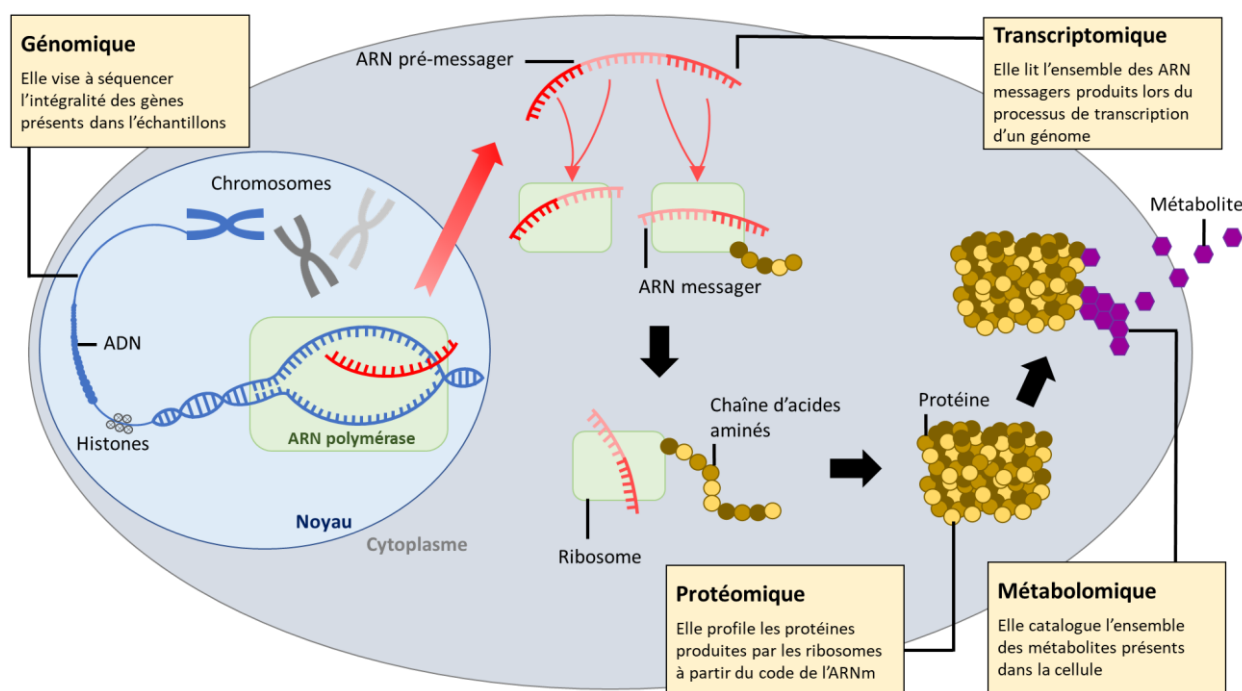


Figure I.7. : Schématisation des différents processus biologiques étudiés grâce aux sciences « omiques » au sein d'une cellule (inspiré de Science & Vie n° 1242)

Dans la littérature, il existe de nombreux exemples récents d'études multi-omiques combinant différents niveaux d'intégration. La plupart d'entre-elles combinent deux jeux de données omiques différents. Dans la majeure partie des cas, ces analyses combinent, d'une part, des ensembles de données de génomique/transcriptomique avec, d'autre part, une matrice de données obtenue par protéomique (Chai et al. 2017; Wood et al. 2017) ou métabolomique (Schorn et al. 2021; H. C. Wu et al. 2017). Ces études ont pour vocation de démontrer comment le métabolisme fonctionnel (génomique) ou l'expression des gènes (transcriptomique) agissent sur l'expression des protéines et des métabolites produits en aval de la cascade « omique ». De plus en plus d'études combinant protéomique et métabolomique voient également le jour ; elles visent notamment à mieux décrire les voies de biosynthèse de métabolites d'intérêt (indole-3-acetonitrile, leucine, ...) au sein des organismes étudiés (Chen et al. 2012; Der Agopian et al. 2020).

Du fait de l'émergence très récente des approches multi-omiques et des multiples appareillages et connaissances requis, rares sont les travaux combinant plusieurs analyses omiques et portant spécifiquement sur les biofilms marins (Favre et al. 2017). Des travaux très récents utilisent cette combinaison de technologie pour répondre à des problématiques actuelles, par exemple la formation de biofilms sur les plastiques en milieu marin. La métagénomique a en premier lieu permis de détecter un grand nombre d'enzymes codées impliquées dans la dégradation du polytéréphtalate d'éthylène (PET). L'analyse combinée par protéomique et métabolomique a ensuite conduit à la proposition d'une voie de dégradation du PET par certaines familles de bactéries (*Alteromonadaceae*, *Thalassospiraceae*, *Alcanivoraceae* et *Vibrionaceae*) (Wright et al. 2021), mettant ainsi en évidence le potentiel de biodégradation des débris plastiques par les communautés bactériennes en milieu marin.

2. Métabolomique

La métabolomique, définit précédemment, est dirigée par un ensemble d'hypothèses qui visent, de manière non spécifique, à annoter de manière globale l'ensemble du métabolome d'un organisme (Patti, Yanes, et al. 2012; Zamboni et al. 2015). Le but de cette partie du manuscrit est de présenter l'intérêt d'utiliser une approche métabolomique, notamment dans le cadre de l'étude des biofilms marins, mais également de décrire de façon détaillée et spécifique le déroulement d'une analyse métabolomique menée par LC-MS.

2.1. Intérêts et enjeux

Au cours des dernières années, la dernière des sciences omiques est de plus en plus utilisée et développée (Figure I.8.).

En effet, la métabolomique permet le développement d'outils analytiques à l'interface entre la biologie et la chimie, des biostatistiques et de la bioinformatique. Ces données sont valorisables dans de nombreux domaines des sciences du Vivant tels que la médecine personnalisée ou clinique (pour identifier des biomarqueurs de pathologie), les études environnementales (afin de caractériser la réponse du métabolome d'un organisme en fonction de son environnement), la recherche en sciences du végétal, l'agroalimentaire, et les biotechnologies.

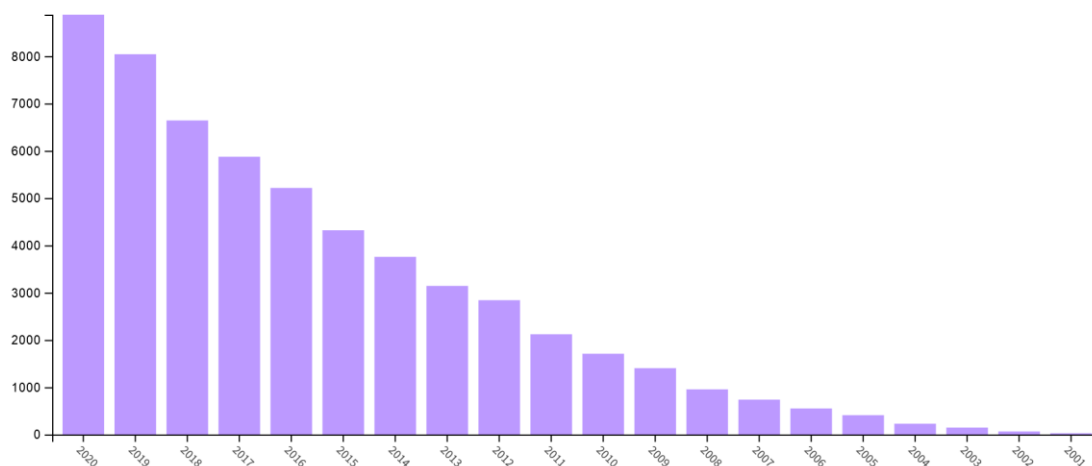


Figure I.8. : Evolution du nombre de publications traitant du métabolome (Nombre de citations à la recherche TOPIC = « METABOLOM* » dans WoS 14/09/2021)

D'un point de vue écologique, il est possible, au sein d'un même génotype, de mettre en évidence une variabilité phénotypique vis-à-vis de facteurs tels que la disponibilité en nutriments, la présence de polluants, la température ou encore les interactions biotiques (Sardans et al. 2011).

2.2. Métabolomique et biofilms marins

L'écologie chimique marine constitue un domaine d'étude récent qui traite du rôle de la communication chimique au sein des écosystèmes marins. Les molécules exprimées par les organismes peuvent jouer un rôle primordial dans la façon dont ces derniers vont se comporter (recherche de nourriture, défense, reproduction...) dans leur milieu (Hay 2009).

Au niveau des biofilms marins, la métabolomique est aussi utilisée pour l'étude de biofilms modèles cultivés en laboratoire (généralement en cultures mono-souches) que sur des biofilms complexes formés *in situ*. Par exemple, dans le cas de cultures de la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, la métabolomique a permis de souligner des disparités du métabolome, et notamment de la composition lipidique membranaire, en fonction du mode de culture (biofilm/planctonique). Ainsi, une surproduction de phosphatidyléthanolamines (PE) a été observée en mode biofilm tandis que des aminolipides, de type ornithine lipides (OL), étaient plus spécifiquement biosynthétisés dans les cultures planctoniques de *P. lipolytica* TC8 (Favre et al. 2018). Dans le cas de biofilms complexes formés *in situ* sur différents types de revêtements au niveau de deux sites contrastés lors d'un suivi saisonnier, l'approche métabolomique a montré une nette discrimination en fonction de l'origine géographique des échantillons, et ce en accord avec les données de métabarcoding 16S. Dans un second temps,

alors qu'une nette divergence dans la composition des communautés bactériennes était observée en fonction des saisons, la métabolomique a plutôt mis en avant une discrimination biochimique des biofilms suivant le type de surface utilisé (Briand et al. 2018).

2.3. Déroulement d'une analyse métabolomique non ciblée par LC-MS

Les outils analytiques utilisés en métabolomique sont la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou les techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (GC-MS et LC-MS) (Roux et al. 2011). Différents types de chromatographies ont été utilisés pour des études de métabolomique parmi lesquelles la chromatographie en phase gazeuse ou la chromatographie en phase liquide (Patti 2011; Soga et al. 2003), le choix se faisant notamment en fonction du type des métabolites présents dans les échantillons étudiés.

La spectroscopie RMN est également utilisée pour la métabolomique, elle fournit une large couverture du métabolome ainsi qu'une analyse quantitative, rapide et non destructive (DeFeo et al. 2011). Cependant seuls les composés présents en quantités suffisantes (de l'ordre du millimolaire) sont analysables par RMN. De plus, la principale limite de la RMN est son manque de sensibilité par rapport à la spectrométrie de masse (Dunn et al. 2013; LeVatte et al. 2021) (Figure I.9.). Ces limites ne permettent pas à la RMN d'être la technique numéro 1 pour une analyse non ciblée. La plupart des études en RMN sont focalisées sur la découverte de biomarqueurs plutôt que sur une analyse complète du métabolome. La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) présente certains avantages pour une analyse métabolomique, en effet elle convient aux composés apolaires et volatils et l'élucidation de la structure des composés est facilitée par l'existence d'une base de données universelle. Néanmoins cette technique nécessite une préparation d'échantillons plus élevée et la fragmentation extensive conduit à une redondance dans les informations générées et des ions moléculaires difficilement identifiables (Courant et al. 2014).

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) est la plus communément utilisée pour la métabolomique non-ciblée car elle présente l'avantage d'analyser un vaste pool de métabolites avec une sensibilité et une résolution élevée (Want et al. 2007). En effet des milliers de signaux sont détectés et apportent une information sur le métabolome de l'extrait biologique (Patti, Tautenhahn, et al. 2012). Cependant, l'identification des métabolites présents au sein de l'organisme, grâce aux spectres de masse, est l'étape la plus contraignante et difficile. Néanmoins la possibilité que des centaines ou des milliers de signaux de LC-MS correspondent à des métabolites inconnus qui doivent encore être décrits est l'un des

aspects les plus intéressants de la métabolomique non-ciblée (Zamboni et al. 2015). Cette technique présentant de nombreux atouts (sensibilité et résolution élevées (Figure I.9.)), préparation minimale de l'échantillon, convient aussi bien au composé polaire et apolaire (Courant et al. 2014) sera utilisée dans ces travaux de thèse pour la réalisation d'analyses métabolomiques non-ciblées. Des analyses complémentaires peuvent être mises en place comme l'UV et l'IR afin d'affiner un peu plus cette annotation.

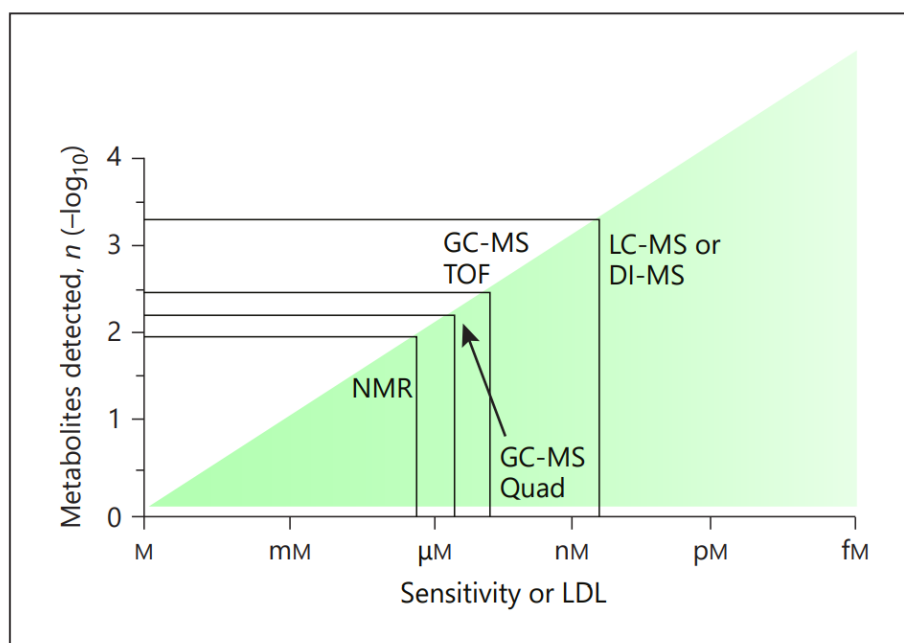


Figure I.9. : Comparaison de la sensibilité relative ou des LDL (*lower detection limits*) et du nombre de métabolites détectés en fonction des plates-formes métabolomiques les plus couramment utilisées, notamment RMN, GC-MS et LC-MS (LeVatte et al. 2021).

2.3.1. Workflow analytique

La mise en œuvre d'une approche métabolomique non ciblée (ici réalisée par LC-MS) nécessite le développement d'un processus expérimental composé de plusieurs étapes qui affecteront toute la quantité et la qualité des données obtenues (Courant et al. 2014). En amont à toute étude métabolomique, la définition précise de la question scientifique à traiter constitue une condition préalable indispensable. Des questions simples mais précises se doivent d'être clarifiées ; elles concernent notamment le type et le nombre d'échantillons utilisés et permettent d'établir les contraintes analytiques liées au *design* expérimental envisagé.

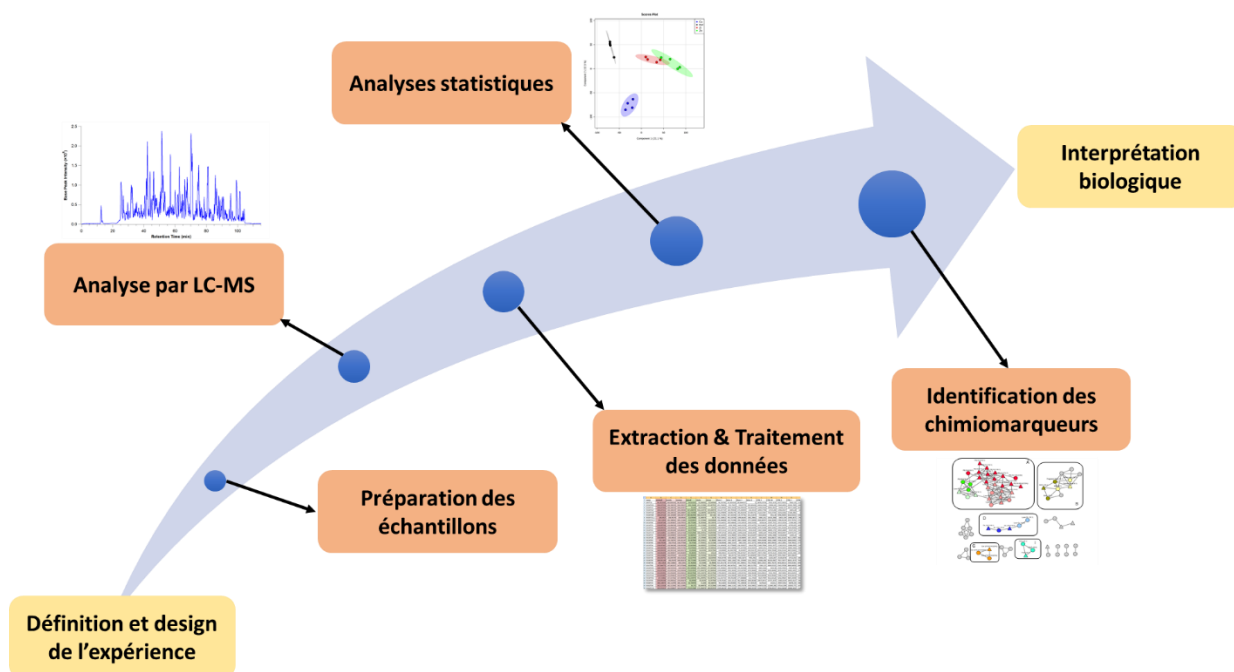


Figure I.10. : Workflow général d'une analyse métabolomique non-ciblée (par LC-MS)

La succession d'étapes (Figure I.10.) réalisées dans le cadre d'une analyse métabolomique non ciblée comprend : 1) la préparation de l'échantillon qui comprend le *quenching*, l'extraction ainsi que la préparation de l'échantillon avant injection, 2) l'analyse la plus exhaustive possible du métabolome (par LC-MS), 3) l'extraction et le traitement des données LC-MS conduisant à une matrice de données exploitables, 4) l'analyse statistique de la matrice permettant de visualiser la similarité ou les différences entre échantillons et de déterminer des chimiomarqueurs, 5) la caractérisation de ces chimiomarqueurs, et plus globalement l'annotation du métabolome, et 6) l'interprétation globale de ces résultats dans le cadre de la question scientifique posée. Ces différentes étapes vont être spécifiquement développées dans les paragraphes qui vont suivre.

2.3.2 Préparation des échantillons

La métabolomique est complexe du fait de la variabilité lors de la formation et de la transformation des métabolites dans un organisme ainsi que par la grande diversité de molécules présentes au sein d'un échantillon biologique. Ceci engendre l'impossibilité de décrire ce procédé, alliant extraction et *quenching*, par un protocole simple et universel (Baidoo and Teixeira Benites 2019).

Le but de la métabolomique est d'obtenir une image précise et figée du métabolome global de l'échantillon à un instant précis. Celui-ci doit correspondre au maximum au moment exact du prélèvement de l'échantillon biologique (Pinu et al. 2017). Par exemple, le retrait des échantillons issus d'une culture, d'un organisme ou de l'environnement doit être rapide afin d'éviter des changements significatifs de concentration des métabolites résultant de l'activité métabolique en cours (van Gulik et al. 2013). Pour obtenir une matrice de données analysable en aval, certaines étapes primordiales sont à suivre lors de la préparation de l'échantillon en amont (S. Kim et al. 2013). Le protocole d'échantillonnage comprend deux étapes importantes : le *quenching* et l'extraction.

Quenching

Le « *quenching* » ou « désactivation métabolique » correspond à la mise en œuvre de la cessation de toute activité cellulaire régie par les protéines et les acides nucléiques (Baidoo and Teixeira Benites 2019). Cet arrêt sur image est obtenu en modifiant radicalement l'environnement cellulaire par un processus de dénaturation au cours duquel les protéines et les acides aminés perdent leur structure native (Murzin et al. 1995). Les techniques d'échantillonnage en métabolomique incorporent des procédures de *quenching* variées suivant le type d'échantillon étudié. Ainsi, plusieurs contraintes extrêmes peuvent être imposées tel que l'application de températures basses ou de pH extrêmes, ou encore l'utilisation de solvants organiques (van Gulik et al. 2013). De nombreux facteurs peuvent influencer sur l'efficacité d'une méthode de *quenching*. Parmi ceux-ci, le temps entre l'échantillonnage et l'arrêt réel du métabolisme cellulaire est considéré comme l'un des plus important. Un *quenching* parfait est donc difficile à mettre en œuvre en raison de la vitesse de certaines voies métaboliques ou du fait de la présence d'intermédiaires propres à plusieurs réactions métaboliques : certains métabolites ont ainsi des temps de demi-vie très faibles (de l'ordre de la seconde).

La procédure de *quenching* choisie ne doit pas non plus causer de dommage et/ou lyser la paroi cellulaire, et ce afin d'éviter toute éventuelle perte de métabolites à l'extérieur de la paroi cellulaire (Figure I.3.). Dans le cas précis d'études en métabolomique microbienne, la méthode la plus couramment utilisée est le *quenching* à froid (-20°C) avec du méthanol et associant une étape de centrifugation (de Koning and van Dam 1992; Patejko et al. 2017; Zhang et al. 2018).

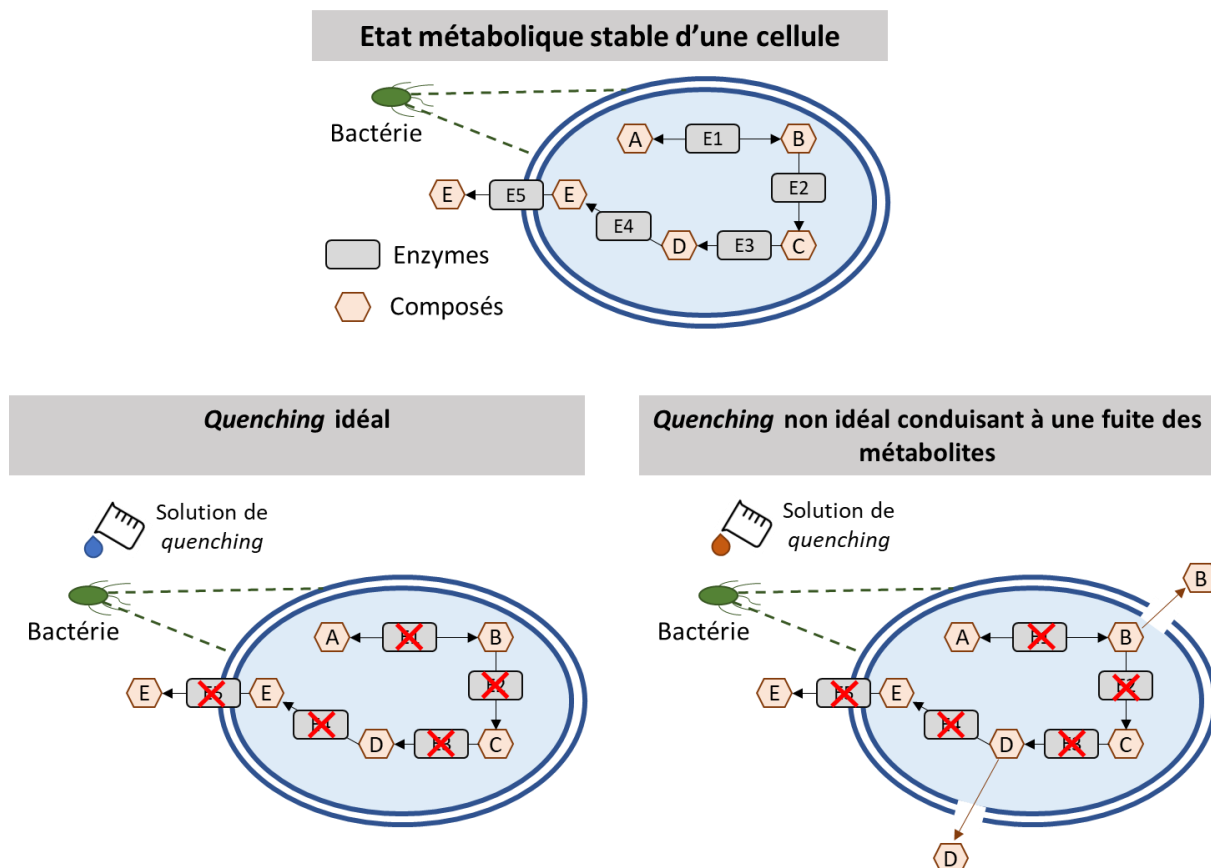


Figure I.11. : Figure représentant le *quenching* idéal et non idéal d'une cellule bactérienne

Extraction

Cette étape ne doit pas être sélective et doit conduire à la récupération de l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon, et ce de façon reproductible sans causer aucune décomposition chimique du métabolome. Comme cela a déjà été largement décrit dans la littérature, la méthode d'extraction utilisée a un fort impact sur le métabolome résultant (Duportet et al. 2012; Winder et al. 2008).

Dans le domaine de la métabolomique microbienne, il faut savoir que les cellules des micro-organismes sont encapsulées dans la paroi cellulaire qui protège la cellule de la pression osmotique tout en lui apportant force et forme. Dans la plupart des bactéries, la paroi cellulaire est composée de lipides, de polysaccharides, de peptides et de glycopeptides. La plupart des cellules bactériennes présentent une couche épaisse ou mince de peptidoglycanes liés à des polymères anioniques (tels que l'acide téichoïque, par exemple) et une couche continue de glycopeptides entourés de phospholipides et de lipopolysaccharides (Huang et al. 2008). Le test simple de coloration de Gram est le premier indicateur de la solidité de la membrane cellulaire : les bactéries à Gram positif sont plus difficiles à lyser que les bactéries à Gram négatif (Figure

I.12.) car elles présentent une épaisse couche de peptidoglycane à l'extérieur de la membrane. L'utilisation de solvant d'extraction permet de rendre l'enveloppe cellulaire poreuse ou perméable. Une méthode idéale pour extraire les métabolites intracellulaires serait reproductible, capable de libérer de manière égale des métabolites intracellulaires de différentes classes tout en prévenant la dégradation chimique (Canelas et al. 2009).

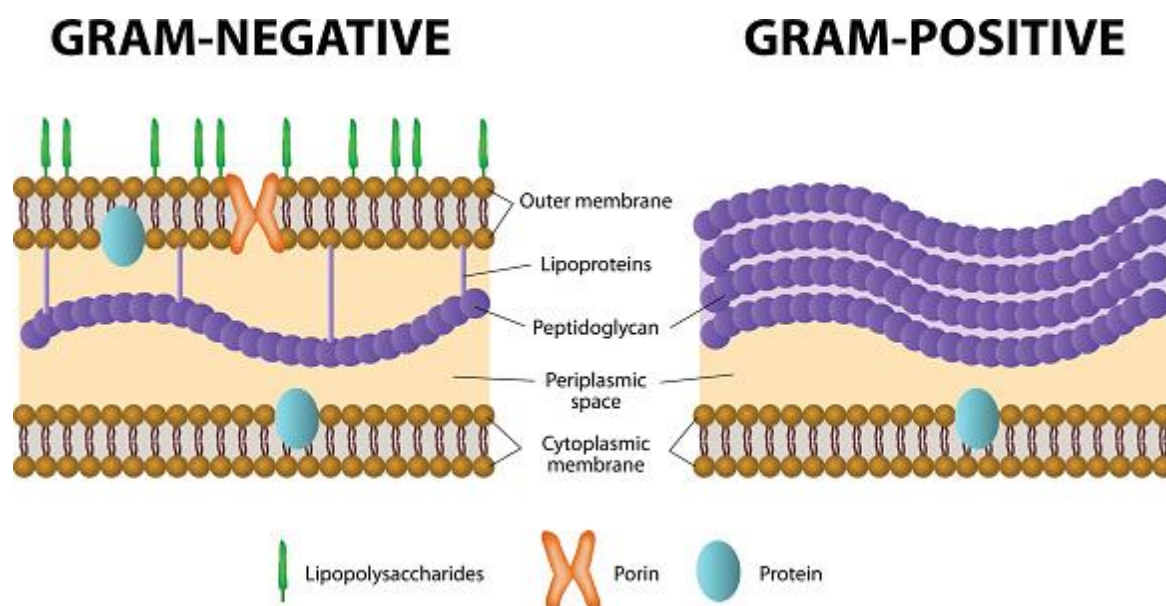


Figure I.12. : Schématisation de la paroi membranaire des bactéries à Gram négatif (à gauche) et positif (à droite) (<https://www.nemokennislink.nl/publicaties/zoeken-naar-nieuwe-antibiotica-kan-slimmer/>)

Plus généralement, la complexité de l'enveloppe d'une cellule microbienne dépend principalement de sa composition polymérique structurale ainsi que du degré de réticulation entre ces polymères et d'autres composants moléculaires de la paroi cellulaire. Compte tenu de la différence structurale et des morphologies variées des microorganismes, aucun protocole universel d'extraction ne peut être appliqué à tout type d'échantillon.

Les extractions à base de méthanol ou d'acétate d'éthyle sont des méthodes couramment utilisées pour les micro-organismes car elles se caractérisent par leur simplicité, leur grande efficacité et leurs faibles coûts (Favre et al. 2017). De plus, ce processus permet le *quenching* et l'extraction de la culture bactérienne en une seule étape pour ces solvants. Ainsi, une extraction efficace des métabolites à partir de cellules microbiennes est obtenue par une lyse complète des cellules, une interaction forte entre l'agent d'extraction et les analytes ainsi qu'une perte et une dégradation minimale des analytes (Baidoo and Teixeira Benites 2019).

L'acétate d'éthyle est un solvant qui a montré une certaine efficacité et a été utilisé avec succès sur des souches bactériennes marines telle que *Pseudoalteromonas* (Favre et al. 2017; Macintyre et al. 2014; Timmermans et al. 2019). Une extraction liquide/liquide a été utilisée par Favre et al. 2017 afin de caractériser le métabolome de diverses souches de bactéries marines (*Pseudoalteromonas lipolytica*). Trois solvants ont été comparés à savoir : l'acétate d'éthyle, le méthanol et un mélange méthanol/dichlorométhane (1:1, v/v). Ces travaux ont montré que les paramètres d'extraction avaient un effet non seulement sur le nombre de métabolites détectés, mais également sur leur concentration. L'utilisation de l'acétate d'éthyle couplée à la sonication s'avère être la méthode la plus efficace dans le cadre de ces travaux, permettant ainsi d'extraire des métabolites ayant des propriétés physico-chimiques très différentes, tels que des lipides ou des dipeptides. Généralement, l'utilisation conjointe d'un solvant et d'un traitement par ultra-sons conduit à une augmentation du nombre de composés récupérés (Duportet et al. 2012).

2.3.3. Analyse par LC-MS

2.3.3.1. Chromatographie en phase liquide (HPLC)

La chromatographie en phase liquide est une technique analytique permettant la séparation de plusieurs constituants à partir d'un mélange complexe. Le principe de la chromatographie consiste à faire migrer les composants à séparer sur une phase stationnaire à l'aide d'une phase mobile liquide. Chaque molécule aura un temps d'élution plus ou moins long en fonction de son affinité pour chacune des deux phases, permettant ainsi la séparation des analytes en fonction du temps.

A ce jour, plusieurs mécanismes de séparation ont été décrits et sont utilisés en chromatographie liquide. Parmi les plus populaires peuvent être citées la chromatographie d'exclusion stérique, la chromatographie par échange d'ions, la chromatographie d'adsorption ou encore la chromatographie de partage. Cette dernière est en règle générale la plus couramment utilisée et c'est aussi vrai en métabolomique, c'est pourquoi seule celle-ci sera détaillée.

Classiquement, la HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) peut être utilisée de deux manières : soit la phase stationnaire est polaire (HPLC en phase normale), soit elle est apolaire (HPLC en phase inverse).

En phase inverse, des fines particules de gel de silice sont utilisées sur lesquelles des chaînes apolaires (alkyles en C4, C6, C8, C18, Phényle) ont été greffées et nécessitent un éluant polaire.

En fonction de la nature et de la longueur des chaînes greffées, on obtient des colonnes plus ou moins hydrophobes qui seront choisies selon la nature de la composition de l'échantillon. En phase inverse, les analytes seront élués par polarité décroissante. Actuellement, la quasi-totalité des études métabolomiques non ciblées se font grâce à des colonnes à phase inverse (Theodoridis et al. 2013). Outre les phases stationnaires polaire ou apolaire, de nouvelles phases stationnaires sont désormais disponibles. C'est notamment le cas de la chromatographie à interaction hydrophile (HILIC : *Hydrophilic interaction chromatography*) qui est une technique de chromatographie permettant la séparation de composés très polaires tout en conservant la possibilité d'utiliser une phase mobile polaire (composée ou miscible avec l'eau).

Encore plus rapide et précise en termes de résolution que la HPLC, la chromatographie liquide UHPLC ou UPLC (ultra haute performance), est utilisée principalement pour identifier, quantifier et séparer les composants d'un mélange complexe. Utilisant une haute pression pour pousser les solvants à travers la colonne ainsi que des tailles de particules inférieures à 2 μm , elle offre une meilleure séparation que l'HPLC où la taille des particules est limitée à 5 μm . Ces particules plus petites nécessitent des pressions de pompe plus élevées (1000 bar contre 400 bar), ce qui rend cette technique très efficace pour les études métabolomiques.

2.3.3.2. Spectrométrie de masse

L'analyse d'une molécule par spectrométrie de masse peut être décomposée en différentes étapes : 1) l'analyte est ionisé au sein de la source d'ionisation, 2) les ions obtenus sont séparés selon leur rapport masse/charge (m/z) dans l'analyseur de masse, 3) les ions séparés sont détectés et 4) les données restituées sous la forme d'un spectre (abscisse : rapport m/z et ordonnée : intensité du signal). A l'aide d'un spectre de masse, il est possible par comparaison à un standard de confirmer l'identification d'un analyte mais il est également envisageable de remonter à la structure chimique d'un composé inconnu. Un spectromètre de masse peut être couplé à un système chromatographique phase gazeuse (GC-MS) ou liquide (LC-MS) comme vu dans la partie précédente. De nombreuses techniques d'ionisation et de séparation des ions ont été développées afin de s'adapter à tous les types d'échantillons (Figure I.13.). Il serait long et fastidieux de décrire tous les types d'ionisation et de séparation des ions aussi seule l'ionisation par électronébulisation couplée à un analyseur à temps de vol (ToF ; *Time of Flight*), utilisée dans le cadre de ces travaux de thèse, sera décrite ci-après.

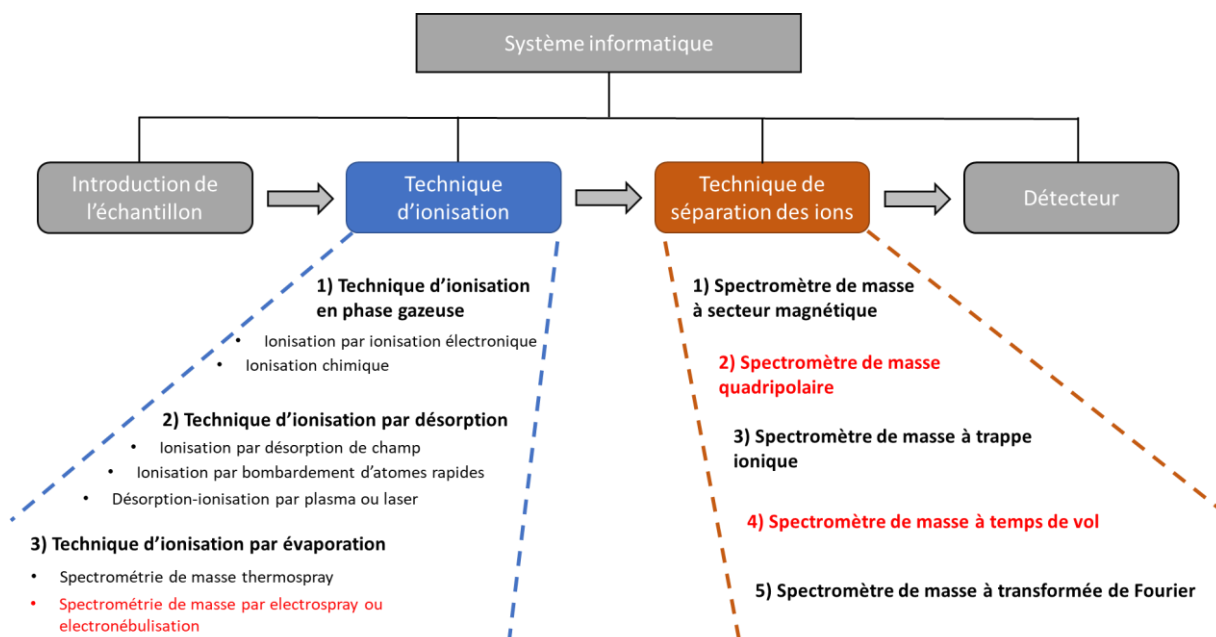


Figure I.13. : Récapitulatif des différentes techniques d'ionisation et de séparation des ions utilisées en spectrométrie de masse (en rouge, les techniques utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse)

Spectrométrie de masse par électronébulisation (ESI ; *ElectroSpray Ionisation*)

L'ionisation par électronébulisation est une méthode d'ionisation dite « douce », récompensée par un prix Nobel en 2002. Elle permet l'ionisation de solutés non chargés en les faisant passer d'un état liquide à un état gazeux à pression atmosphérique. Comme décrit au niveau de la Figure I.14., cette génération d'ions comporte 2 étapes principales : La nébulisation et la désorption.

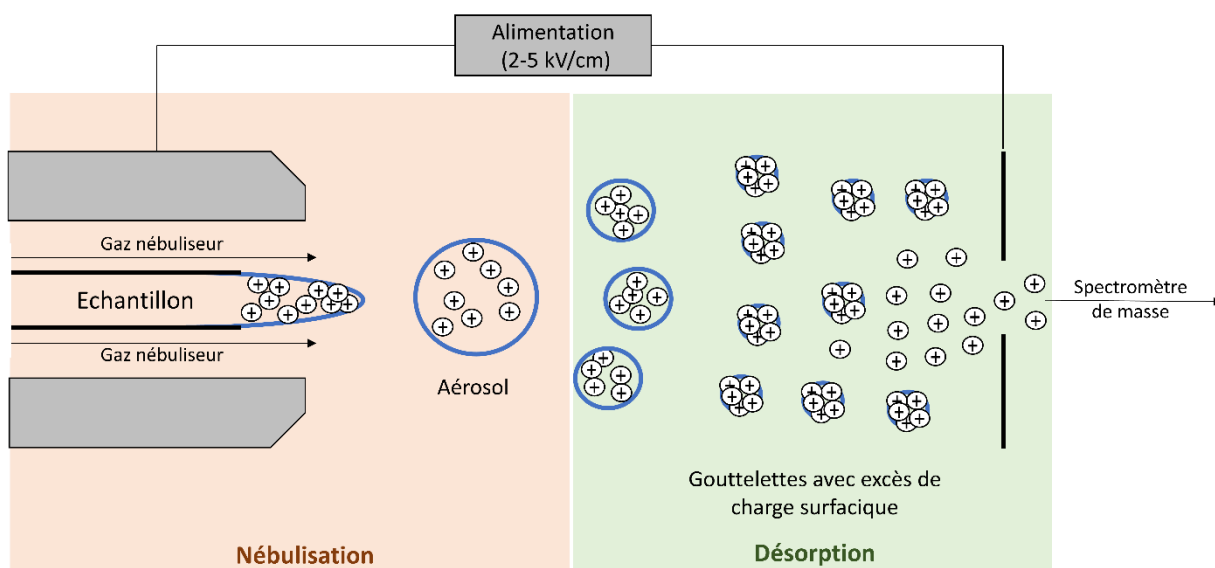


Figure I.14. : Ionisation par électronébulisation (*ElectroSpray Ionisation*) (inspiré du livre : Identification spectrométrique de composés organiques - 3^e édition ; Silverstein, Webster, Kiemle et Bryce 2016)

- La nébulisation : L'échantillon analysé est en général solubilisé dans un solvant polaire, celui-ci pénètre la source d'ions via un capillaire (en acier inoxydable) entouré d'un flux d'azote coaxiale : le gaz nébuliseur. L'extrémité du capillaire est soumise à une tension élevée, la différence de potentiel (par rapport à une contre-électrode) entraîne un gradient de champ pouvant aller de 2 à 5 kV/cm.
- La désorption : La taille des gouttelettes, présentes dans l'aérosol formé, diminue avec l'évaporation du solvant entraînant ainsi une augmentation des charges de surface. Au moment où la répulsion électrostatique entre les ions atteint un point critique, que l'on nomme la limite de Rayleigh, les gouttelettes subissent une « explosion coulombique ». Elles vont alors former de plus petites gouttelettes permettant la libération des ions dans la phase gazeuse.

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

L'analyseur est le cœur du spectromètre de masse, son but étant de séparer le mélange d'ions générés lors de l'ionisation par ordre de m/z afin d'obtenir un spectre.

L'analyseur quadripolaire se compose de quatre barreaux cylindriques (de 10 à 20 cm de long) parallèles entre eux et formant deux couples d'électrodes (Figure I.15.). Un champ électrique oscillant est appliqué entre ces deux couples, entraînant les ions dans une trajectoire sinusoïdale. Le quadripôle agit comme un filtre de masse réglable, en effet seuls les ions ayant une valeur de m/z donnée à un instant précis vont pouvoir traverser le quadripôle et atteindre le détecteur, ces ions sont qualifiés d'« ions en résonance ». Inversement, tous les ions ayant des valeurs de m/z différentes de celle définie ont des trajectoires instables et vont percuter un des barreaux ou sortir du quadripôle, ce sont les « ions en non-résonance » qui n'atteindront pas le détecteur. Le quadripôle est un élément complémentaire, situé en amont de l'analyseur à temps de vol.

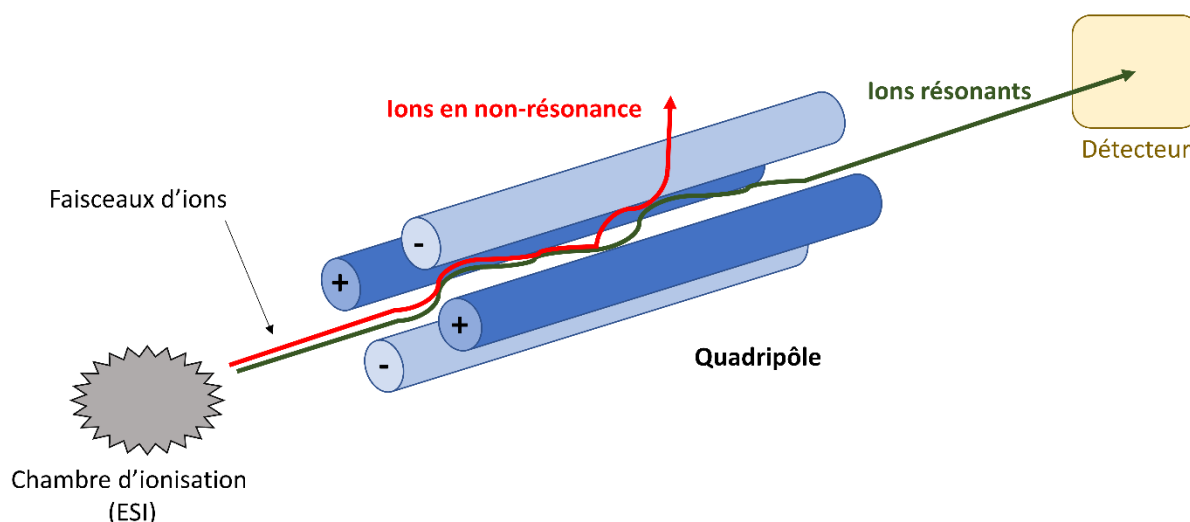


Figure I.15. : Schéma d'un analyseur quadripolaire (inspiré du livre : Identification spectrométrique de composés organiques - 3e édition ; Silverstein, Webster, Kiemle et al. 2016)

Un spectromètre de masse de type QToF est un instrument dit « hybride » qui combine des technologies quadripolaires avec un analyseur de masse à temps de vol. L'instrumentation QToF ressemble beaucoup à celle d'un spectromètre de masse à triple quadripôles, à la différence que le 3^{ème} quadripôle est remplacé par un tube à temps de vol (Figure I.16.). Dans le cas d'un spectromètre QToF, le premier quadripôle (Q1) est capable de fonctionner comme un filtre de masse (comme dans la partie précédente) afin de sélectionner spécifiquement des ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z), ou uniquement en mode radiofréquence (RF) où tous les ions sont transmis. Le deuxième quadripôle (Q2) agit comme une cellule de collision. Dans ce compartiment les ions sont bombardés par des molécules d'un gaz neutre (généralement l'argon), entraînant une fragmentation des ions par un processus nommé la dissociation induite par collision (CID, *Collision Induced Dissociation*) (Chernushevich et al. 2001). En sortie du deuxième quadripôle, les ions résonnants sont réaccélérés, pulsés par un champ électrique et finalement accélérés orthogonalement à leur direction d'origine. Tous les ions ayant acquis la même énergie cinétique pénètrent maintenant dans le tube de vol où se produit la séparation en fonction de la masse de chacun. En effet, les ions présentant une faible masse auront un temps de vol plus long, tandis que les ions plus lourds mettront moins de temps à parcourir la trajectoire de vol vers le détecteur.

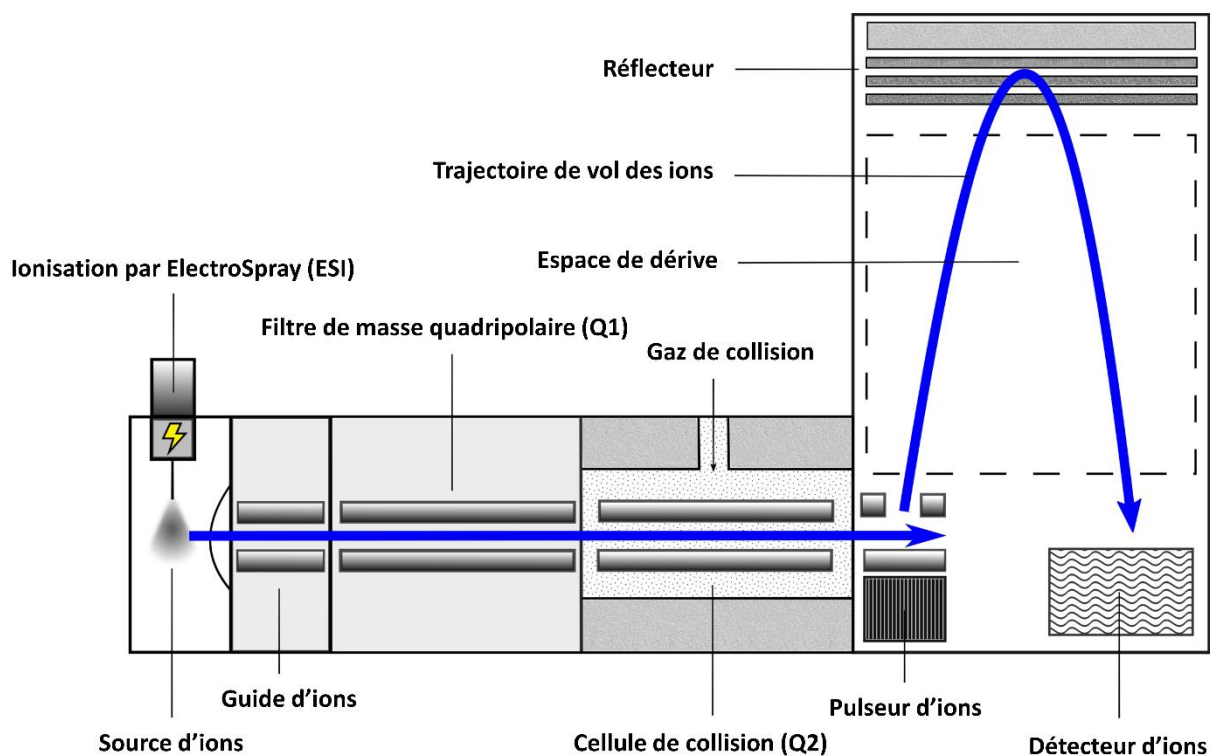


Figure I.16. : Schéma d'un spectromètre de masse avec un analyseur de masse de type QToF (d'après Allen & McWhinney 2019)

Les analyseurs à temps de vol modernes utilisent également un dispositif à réflectron qui permet d'améliorer la résolution des masses détectées en augmentant la longueur de la trajectoire de vol. Deux types de balayages peuvent être sélectionnés pour traiter un échantillon :

- Le mode MS : Le premier et le deuxième quadripôles sont en mode RF uniquement pour fournir un balayage de masse précis de l'ion précurseur non fragmenté. Le Q1 peut également être utilisé pour sélectionner une masse spécifique ou une plage de masse à transmettre à l'analyseur ToF.
- Le mode MS/MS : Le Q1 peut être utilisé en mode RF uniquement ou en filtre de masse pour transmettre des ions dans la cellule de collision (Q2) où se produit la CID. Les ions générés dans la cellule de collision et tous les ions précurseurs non fragmentés sont ensuite transmis à l'analyseur ToF où une mesure de masse précise est réalisée. Ce mode permet d'obtenir les spectres MS/MS des ions précurseurs les plus intenses ou sélectionnés communiquant ainsi une information précieuse pour leur identification. Ce mode va permettre également de créer des réseaux moléculaires qui seront décrits ultérieurement.

2.3.4. Extraction & Traitement des données LC-MS

Les fichiers bruts à analyser en sortie d'une analyse LC-MS renferment un grande quantité d'informations rendant l'analyse de ces données complexe. Pour chaque échantillon, un fichier brut contenant une information multidimensionnelle. Comme montré sur la figure I.17., en chaque point (*scan*) du chromatogramme (en violet), en plus de l'information concernant le temps de rétention et l'intensité du signal, un spectre de masse correspondant est également obtenu dans une troisième dimension.

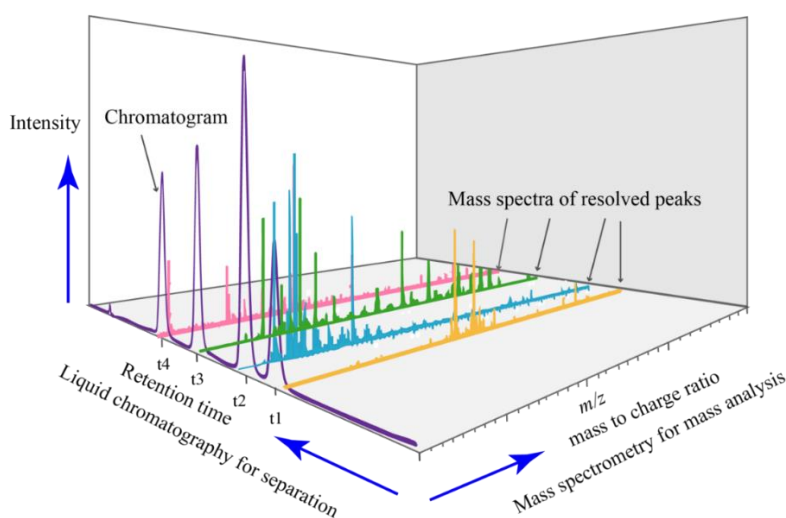


Figure I.17. : Représentation tridimensionnelle des données produites en LC-MS
(https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry)

Plusieurs logiciels « *open source* » sont disponibles pour le traitement de ces données complexes, leur but étant de transformer les données brutes obtenues par LC-MS en format matriciel regroupant tous les échantillons de l'analyse. La matrice ainsi obtenue donnera un aperçu de toutes les molécules (ions) détectées et de leur intensité et sera utilisée pour l'analyse statistique ultérieure. Le traitement de ce type de données de métabolomique non-ciblée a été popularisé dès 2006 grâce à deux outils largement utilisés dans ce domaine à savoir : XCMS (Smith et al. 2006) et MZmine (Katajamaa et al. 2006). Actuellement, ce sont encore deux outils très utilisés lors du traitement de données LC-MS pour une analyse métabolomique.

XCMS existe à la fois sous forme de package sous l'environnement R et de plate-forme basée sur un *cloud* nommé XCMS Online (Tautenhahn, Patti, et al. 2012). Cette plateforme permet de s'affranchir de codage sous R et permet aux utilisateurs de télécharger et de traiter facilement des données LC-MS. Dans les deux cas, le fonctionnement de XCMS se déroule généralement en 4 étapes : 1) la detection des métabolites présents dans chaque échantillon en fonction de

leur temps de rétention et de leur rapport m/z , 2) l'alignement des pics des métabolites identifiés dans les différents échantillons, 3) la correction de leur temps de rétention, 4) la recherche et l'ajout des pics manquants (métabolite non détecté dans un échantillon mais présent dans un autre).

Dans le cadre de cette thèse, le logiciel pour le traitement de données brutes qui sera utilisé est MZmine 2. Ce logiciel a fait son apparition en 2010 et a été développé à l'aide de la technologie Java. Contrairement à XCMS, MZmine 2 simplifie le traitement grâce à la séparation des nombreuses fonctionnalités de base et des modules de traitement de données (Pluskal et al. 2010). Des outils spécifiques permettent une visualisation des données à chaque étape autorisant l'utilisateur à modifier, corriger et adapter certains paramètres en temps réel à la suite de chaque étape. Toutes les étapes utilisées lors d'un traitement d'une série d'analyses LC-MS sont décrites dans la partie « Matériel & Méthodes » de ce manuscrit.

D'autres interfaces web ont également été mises à la disposition de la communauté scientifique au cours des dernières années telles OpenMS (Röst et al. 2016), MS-DIAL (Tsugawa et al. 2015) ou encore W4M (*Workflow for metabolomics*). Cette dernière, développée dans le cadre d'une collaboration française (entre le consortium MetaboHUB et l'Institut Français de Bio-informatique), propose des workflows modulaires et extensibles composés de packages existants (ex. : XCMS) mais également un large panel d'outils destinés au traitement des données (Giacomoni et al. 2015).

2.3.5. Analyses statistiques

À la suite de ce traitement des données brutes, une matrice comprenant les différentes variables à analyser est récupérée. L'objectif des analyses statistiques est de faire ressortir les différences entre les groupes d'échantillons afin de répondre à une question précise, et ce en utilisant des méthodes univariées ou multivariées. Différents types de logiciels et de package sous l'environnement R peuvent être utilisés à cette fin mais, dans le cadre de ces travaux, la majeure partie des analyses statistiques a été effectuée grâce à la plateforme en ligne Metaboanalyst (Pang et al. 2021). Avant la visualisation des données, deux étapes sur Metaboanalyst sont conseillées afin d'améliorer les résultats à savoir la filtration des données et la normalisation. Lors d'une analyse métabolomique non-ciblée, les analyses statistiques multivariées permettent d'étudier simultanément plusieurs variables c'est-à-dire tous les métabolites contenus dans la matrice. En effet ces outils traitent l'ensemble de la matrice comme un seul élément en réduisant la dimensionnalité des données et permettant une visualisation globale et immédiate de la

disparité des échantillons. Parmi ces analyses multivariées, il existe deux classes principales de méthodes statistiques utilisées en métabolomique :

- Les méthodes non supervisées permettent de mettre en lumière la variance présente dans la matrice de données sans à priori sur la nature des échantillons (Ringnér 2008). La méthode non supervisée la plus utilisée en métabolomique est l'analyse en composantes principales (ACP). Celle-ci a pour but de décrire un jeu de données métabolomiques de grande dimension afin d'en extraire les tendances les plus pertinentes en termes de variabilité. La « réduction des dimensions » induit une visualisation des résultats sous forme de carte en deux dimensions permettant de synthétiser l'information et donc les variations biochimiques au sein du jeu d'échantillons.
- Les méthodes supervisées ont pour but de faire ressortir des variables explicatives, c'est-à-dire dans notre cas les métabolites les plus discriminants entre des groupes d'échantillons prédéfinis. Contrairement à l'ACP, ce type d'analyse vise à différencier des groupes d'échantillons définis en amont et d'identifier les variables ayant le plus d'impact sur la séparation entre ces groupes spécifiques. Les variables les plus discriminantes ainsi mises en valeur et appelées chimiomarqueurs vont être utilisées pour répondre à la question scientifique initialement posée. Il existe différents types d'analyses supervisées, la plus couramment utilisée en métabolomique est la PLS-DA (*Partial Least Square Discriminant Analysis*) (Szymańska et al. 2012). Etant donné les nombreuses variables en métabolomique, le caractère aléatoire de l'analyse peut influencer sur les résultats obtenus. C'est pourquoi deux tests statistiques sont fréquemment utilisés pour valider le modèle PLS-DA à savoir le test de « *Cross validation* » et le test de permutation. Le test de « *Cross validation* » estime la capacité prédictive du modèle grâce aux indices Q^2 et R^2 . Idéalement les valeurs de ces deux paramètres doivent être proches de 1, Q^2 étant toujours plus petit que R^2 . Q^2 représente l'estimation de la capacité prédictive du modèle alors que R^2 explique l'appartenance aux différentes classes. Un modèle est considéré comme bon quand R^2 et Q^2 sont supérieurs à 0,5 (Henseler et al. 2009; Triba et al. 2015). Le test de permutation quant à lui permet de tester une hypothèse d'absence d'effet, il est considéré comme satisfaisant pour une p value $< 0,05$ (Szymańska et al. 2012).

Outre les statistiques multivariées, les outils statistiques univariés ont également leur place pour traiter cet ensemble de données. Ces outils, tel que le t -test ou encore l'ANOVA (*ANalysis Of VAriance*), ont pour but de comparer les différents groupes d'échantillons métabolites par métabolites. Ils ne permettent donc pas d'avoir une vue d'ensemble des données mais sont utiles

dans deux cas de figures : (1) lors de l'analyse métabolomique ciblée (2) lors de la recherche d'un biomarqueur défini par la PLS-DA.

2.3.6. Identification des biomarqueurs

Lors d'une analyse métabolomique non-ciblée, l'identification des métabolites est généralement le facteur limitant pour mener à bien une interprétation approfondie des données en lien avec la question scientifique posée et l'échantillon biologique étudié (Chaleckis et al. 2019).

Par analyse directe des chromatogrammes combinés au spectres de masses

Bien que la précision, la résolution et la vitesse d'acquisition des spectromètres de masse se soient améliorées au cours de la dernière décennie, la complexité du métabolome reste telle que la caractérisation de tous les analytes présents dans un échantillon constitue encore à l'heure actuelle un défi majeur (en effet, un seul échantillon peut contenir des milliers de métabolites). Afin d'identifier de manière fiable un métabolite par LC-MS, il est possible d'utiliser : 1) le temps de rétention chromatographique (RT), celui-ci est une information complétant l'analyse et la supposition de la formule chimique bien qu'il soit dépendant du type de colonne utilisée dans le système chromatographique (Allard et al. 2017), 2) la valeur du rapport masse/charge (m/z) du (ou des) ions pseudo-moléculaire(s), pouvant conduire lorsque la précision est suffisante et en lien avec l'analyse du massif isotopique correspondant, à l'obtention de la formule brute de l'analyte (Eichhorn et al. 2012), 3) l'analyse des données de fragmentation MS/MS (Patti, Tautenhahn, et al. 2012). Néanmoins, l'identification complète d'un métabolite est difficilement réalisable avec seulement ces données et en outre, dans ce contexte, la distinction d'isomères reste souvent délicate (Kind and Fiehn 2006). En définitive, l'identité d'un métabolite doit être confirmée par l'injection d'un standard.

La comparaison des spectres MS et MS/MS avec des bases de données (BDDs) constitue une stratégie de plus en plus répandue d'autant plus que leur enrichissement connaît une croissance exponentielle. Ces dernières décennies, l'émergence de BDDs telles que METLIN ou Lipidmaps procurent ainsi une aide précieuse pour l'identification de métabolites (Tautenhahn, Cho, et al. 2012). Dernièrement, l'outil en ligne CEU Mass Mediator (CMM, <http://ceumass.eps.uspceu.es>) a été mis en place afin de regrouper et d'interroger simultanément toutes les BDDs utilisées en métabolomique (Gil-de-la-Fuente et al. 2019). D'autre part, un outil tel que SIRIUS (<https://bio.informatik.uni-jena.de/sirius/>) permet, contrairement à une

simple BDD, de simuler la fragmentation la plus probable d'un métabolite via son spectre MS/MS en proposant des formules brutes pour les fragments ionisés (Dührkop et al. 2019).

Des fragmentations caractéristiques sont également une source d'identification, en effet une fragmentation spécifique peut permettre de décrire rapidement une appartenance à une famille et donc à son identification. Pour prendre un exemple, la fragmentation de la tête polaire de certaines familles de lipides va générer un m/z caractéristique et précis. C'est le cas notamment des phosphatidylcholines générant un fragment m/z de 184,0733 (da Costa et al. 2018; Suárez-García et al. 2017) ou encore les lipides d'ornithine (*ornithine lipid*) générant un fragment m/z de 115,0866 (Favre et al. 2017).

Par utilisation de réseaux moléculaires (GNPS)

Lors d'une analyse MS/MS, un ion précurseur est sélectionné par le premier analyseur (un quadripôle). Cet ion est fragmenté par CID et les fragments ainsi formés sont analysés conduisant à l'obtention d'un spectre MS/MS. Le principe des réseaux moléculaires est basé sur un postulat stipulant que des molécules ayant des structures chimiques proches présentent des schémas de fragmentations similaires en spectrométrie de masse (Nothias et al. 2015). Lorsque des similarités globales sont enregistrées entre plusieurs molécules, le réseau moléculaire obtenu forme des *clusters* (regroupements de plusieurs molécules). A partir de spectres MS/MS, la création d'un réseau moléculaire permet : (1) de créer des clusters composés de molécules similaires, (2) de détecter un ensemble d'analogues structuraux à une molécule de référence et (3) de disposer d'un outil de visualisation permettant de comparer la production métabolique de différents échantillons.

Les réseaux moléculaires sont générés via la plateforme web GNPS (*The Global Natural Product Social Molecular Networking* ; <http://gnps.ucsd.edu>) (Bouslimani et al. 2014). Cette plateforme permet le stockage, l'analyse et la diffusion des connaissances des spectres MS/MS (Wang et al. 2016a). La force de cet outil est la communauté de plus en plus nombreuse à partager, analyser et annoter les données (Wang et al. 2017). En plus de l'annotation des molécules grâce aux spectres MS/MS référencés publiquement sur GNPS, il est également possible de propager une annotation à une molécule inconnue en utilisant la mise en réseau moléculaire (J. Y. Yang et al. 2013). L'annotation d'un métabolite peut être propagée en utilisant les différences entre les formules moléculaires. Par exemple, une différence de 14 Da entre deux ions précurseurs peut suggérer une différence d'un CH₂ putatif (Nothias et al. 2018).

3. Autres approches analytiques utilisées

D'autres méthodes ont été développées afin de caractériser des échantillons de biofilms ainsi que les EPS présents au sein de la matrice du biofilm. Elles vont de méthodes analytiques simples à mettre en place (dosages, dosages colorimétriques) à d'autres beaucoup plus sophistiquées (spectroscopies, microscopies...).

3.1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier en mode Réflexion Totale Atténuée (IRTF-ATR : *Attenuated Total Reflectance*)

Le rayonnement infrarouge (IR) occupe la région du spectre électromagnétique comprise entre 4000cm^{-1} et 400 cm^{-1} et donc située entre celle de l'UV-visible et celle des micro-ondes. Il s'agit de l'une des techniques les plus utilisées pour la caractérisation d'échantillons biologiques de nature variée (Delille 2018; Naumann et al. 1991). Les macromolécules biologiques tels que les EPS (Caccamo et al. 2020; Quilès et al. 2010) ainsi que des systèmes biologiques complexes comme les tissus ou les cellules peuvent être étudiés par cette méthode. Dans cette thèse, cette technique spectroscopique va compléter les analyses métabolomiques et les dosages des EPS en apportant une information sur les fonctions chimiques présentes. Cette technique est très utilisée, de ce fait de nombreuses compilations de spectres et de recueil sont disponibles permettant d'identifier les différentes bandes caractéristiques rencontrées.

L'IRTF-ATR représente une technique de choix pour étudier les systèmes biologiques complexes comme les biofilms (Quilès et al. 2010; Schmitt et al. 1995; Wang et al. 2013). Dans la littérature, l'IRTF-ATR a déjà été utilisé pour le suivi de croissance de biofilms de certaines bactéries, telles que *Pseudomonas fluorescens* (Quilès et al. 2010) ou *Pseudomonas aeruginosa* (Pink et al. 2005). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier à réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) est une méthode utile pour surveiller le biofilm *in situ*. Elle a notamment permis d'évaluer, en temps réel, la stabilité de l'eau potable en surveillant l'évolution de l'empreinte infrarouge à transformée de Fourier atténuée d'un biofilm de référence (*P. fluorescens*) naissant exposé à l'eau testée (Delille et al. 2007).

Elle présente l'avantage de caractériser le biofilm dans son ensemble, de plus elle est rapide, facile à mettre en place et nécessite peu de préparation de l'échantillon. Elle permet de déterminer, dans notre cas, les bandes caractéristiques des différents constituants des biofilms et notamment des EPS présents en son sein (protéines, lipides, sucres ...) (Delille et al. 2007; Karunakaran et al. 2011; Quilès et al. 2010). Dans la littérature, certaines études ont caractérisé

les bandes caractéristiques des différents constituants d'un biofilm (Delille 2018; Hede and Khandeparker 2020; Humbert and Quilès 2011; Legal et al. 1991; Parikh and Chorover 2006; Pink et al. 2005; Schmitt et al. 1995; Wang et al. 2013). Le tableau I.5. ci-dessous proposé par (Quilès et al. 2010) regroupe les bandes caractéristiques retrouvées dans les biofilms. En complément à ce tableau, un large pic étiré à 3400 cm^{-1} (plage $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$), correspondant au groupe hydroxyle (Kavita et al. 2013; Nwodo and Okoh 2013) et un pic à 1103 cm^{-1} (plage de $1000\text{ à }1125\text{ cm}^{-1}$) peut être attribué à la liaison de liaison ester O-acétylique de l'acide uronique (Bramhachari and Dubey 2006; Kavita et al. 2014).

Wavenumber (cm^{-1})	Assignment	Principal compounds and/or functions	Main corresponding cellular compounds
2961 2925 2897 2874 2854 1736 1713 1700-1580 1693-1627 1568-1531 1468; 1455 1400 1317; 1281 1238	$\nu_3\text{CH}_3$ $\nu_3\text{CH}_2$ νCH tertiary $\nu_3\text{CH}_3$ $\nu_3\text{CH}_2$ $\nu\text{C}=\text{O}$ $\nu\text{C}=\text{O}$ $\nu\text{C}=\text{O}$, $\nu\text{C}=\text{N}$, $\nu\text{C}=\text{C}$, δNH Amide I ($\nu\text{C}=\text{O}$ coupled with $\delta\text{N}-\text{H}$), $\delta\text{H}_2\text{O}$ Amide II ($\delta\text{N}-\text{H}$ coupled with $\nu\text{C}-\text{N}$) δCH_2 , $\delta_3\text{CH}_3$ $\nu_3\text{COO}^-$ τCH_2 , ρCH_2 , Amide III ($\nu\text{C}-\text{N}$ coupled with $\delta\text{N}-\text{H}$) $\nu_3\text{PO}_2^-$	Fatty chains Esters from lipids Esters, carboxylic acids ADN/ARN bases Proteins, water (1640 cm^{-1}) Proteins Lipids Amino acids, fatty acid chains Fatty acid chains, proteins Phosphodiester, phospholipids, LPS, nucleic acids, ribose	Membranes Membranes Nucleoid, ribosomes Nucleoid, ribosomes Membranes, cytoplasm, flagella, pili, ribosomes Membranes, cytoplasm, flagella, pili, ribosomes Membranes Capsule, peptidoglycan Membranes, cytoplasm, flagella, pili, ribosomes Membranes, nucleoid, ribosomes
1220 1200-900 1172; 1153 1118 1086 1058 1041 1026 993 970	$\nu\text{C}-\text{O}-\text{C}$ $\nu\text{C}-\text{O}$, $\nu\text{C}-\text{C}$, $\delta\text{C}-\text{O}-\text{H}$, $\delta\text{C}-\text{O}-\text{C}$ $\nu_3\text{C}-\text{OH}$, $\nu\text{C}-\text{O}$ $\nu_3\text{CC}$ $\nu_3\text{PO}_2^-$ $\nu_3\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $\nu_3\text{P}-\text{O}-\text{C}$ ($\text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{R}'$) $\nu\text{O}-\text{H}$ coupled with $\delta\text{C}-\text{O}$ CH_2OH $\nu\text{C}-\text{C}$, $\nu\text{P}-\text{O}-\text{P}$	Polysaccharides Proteins, carbohydrates, esters ARN, ADN Phosphodiester, phospholipids, LPS, nucleic acids Polysaccharides Polysaccharides Carbohydrates Ribose skelet (ARN) RNA backbone	Capsule, storage inclusions Nucleoid, ribosomes Membranes, nucleoid, ribosomes Capsule, peptidoglycan Capsule, peptidoglycan Storage inclusion Ribosomes Ribosomes

Tableau I.5. : Affectations des principales bandes vibrationnelles infrarouges de la région $3000\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ du spectre ATR-FTIR des pastilles de *P. fluorescens* récoltées par centrifugation (ν : stretching, δ : bending, τ : twist, a: asymmetric, s: symmetric, LPS: lipopolysaccharides) (Quilès et al. 2010).

3.2. Dosages colorimétriques

Un dosage colorimétrique est possible lorsqu'une réaction chimique donne des produits colorés et que l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'entité moléculaire à doser. Les dosages colorimétriques s'appuient sur la loi de Beer-Lambert qui définit l'Absorbance (A) d'une solution comme étant la fraction de l'intensité lumineuse la traversant, cette loi s'appuie sur l'équation : $A = \varepsilon \cdot d \cdot C$.

3.2.1. Quantification globale (Cristal violet)

La coloration au Cristal Violet est une technique simple et rapide utilisée pour le suivi de l'évolution du biofilm. Le cristal violet est défini comme un colorant qui se fixe sur divers types de molécules telles que l'ADN dans les noyaux. Ce colorant de type triarylméthane permet de

mesurer la formation du biofilm dans sa globalité (la matrice exopolymérique ainsi que les bactéries) (Lays 2015). La coloration étant directement proportionnelle à la biomasse cellulaire, la croissance des espèces bactériennes formant un biofilm marin peut être mesurée. Par exemple, (Inbakandan et al. 2013) ont pu montrer, grâce à la quantification au cristal violet, que des nanoparticules d'argent (50 µg/mL) pouvaient inhiber la formation de biofilm marin (16 biofilms formés par 16 souches bactériennes marines ont été utilisées).

3.2.2. Dosages des EPS

Une analyse des EPS est indispensable pour étudier la structure et la stabilité des biofilms marins. Actuellement, les EPS (protéines, polysaccharides, acides uroniques) sont caractérisées par des méthodes colorimétriques ces dernières sont rapides, faciles à mettre en œuvre et leur coût reste faible (Felz et al. 2019). Ces méthodes ont cependant été développées sur la base de standards et la qualité de l'information obtenue peut être impactée par des composés interférents (Dubois et al. 1956; Lowry et al. 1951).

Parmi les différentes méthodes utilisées pour le dosage colorimétrique des protéines, trois sont utilisées fréquemment à savoir la méthode à l'acide bicinchonique (Smith et al. 1985), la méthode de Lowry (Lowry et al. 1951) et la méthode de Bradford (Bradford 1976). Cette dernière a été utilisée récemment pour le dosage des protéines produites par des bactéries marines (*Aeromonas hydrophila*, *Halomonas aquamarina*, et *Vibrio parahaemolyticus*). (Dharmaraj et al. 2021) ou pour étudier le rendement de différents protocoles d'extraction d'EPS produit par un biofilm (Pan et al. 2010). Elle a été choisie pour le dosage des protéines dans ces travaux de thèse pour sa sensibilité et sa facilité de mise en place.

La caractérisation totale des sucres dans un biofilm peut être effectuée grâce à différentes méthodes colorimétriques simples, telle que la méthode à l'orcinol (Rimington 1931), la méthode à l'antrone (Dreywood 1946) ou encore la méthode de (Dubois et al. 1956). Cette dernière méthode repose sur une réaction mettant en jeu le phénol et l'acide sulfurique, elle permet un dosage global des sucres (incluant les acides uroniques). Cette méthode a déjà été utilisée pour le dosage des carbohydrates dans la matrice d'EPS d'un biofilm, formé *in situ*, afin de décrire les effets de différentes procédures d'extraction sur les teneurs en EPS (Aguilera et al. 2008) ou pour caractériser et comparer la composition chimique des EPS produite en mode planctonique et biofilm par une souche bactérienne marine (*Amphota rostrata*). (Khandeparker and Bhosle 2001). La méthode de Dubois sera choisie pour le dosage des sucres dans ces travaux de thèse.

Comme pour les dosages précédents, les acides uroniques peuvent être quantifiés à l'aide de diverses méthodes, les plus fréquemment rencontrées étant la méthode au carbazole (Bitter and Muir 1962) et celle au *meta*-hydroxydiphényle (MHDP) (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973). Cette dernière sera choisie dans le cadre de ces travaux de thèse du fait de sa simplicité et de sa rapidité. De plus, cette méthode a été testée sur un biofilm formé par une bactérie marine isolée d'un biofilm naturel (*Cytophaga lytica*) par (Mojica et al. 2007).

3.3. Microscopie

3.3.1. Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Contrairement à la microscopie à champ large, la Microscopie Confocale à Balayage Laser (MCBL) permet une analyse tridimensionnelle des microorganismes, des EPS et de leur organisation. C'est l'un des outils les plus populaires pour la visualisation de la structure 3D des biofilms car il permet l'étude non destructive des structures multicellulaires natives à l'aide de marqueurs fluorescents spécifiques (Bridier et al. 2010; Guillonnet al. 2018). Cette technique a par exemple été utilisée pour l'étude de l'effet d'un agent antifouling, la dibromohémibastadine-1 (DBHB) sur la formation de biofilms de plusieurs bactéries marines (*Paracoccus* sp., *Pseudoalteromonas* sp. et *Bacillus* sp.) (Figure I.18.) (Le Norcy et al. 2017).

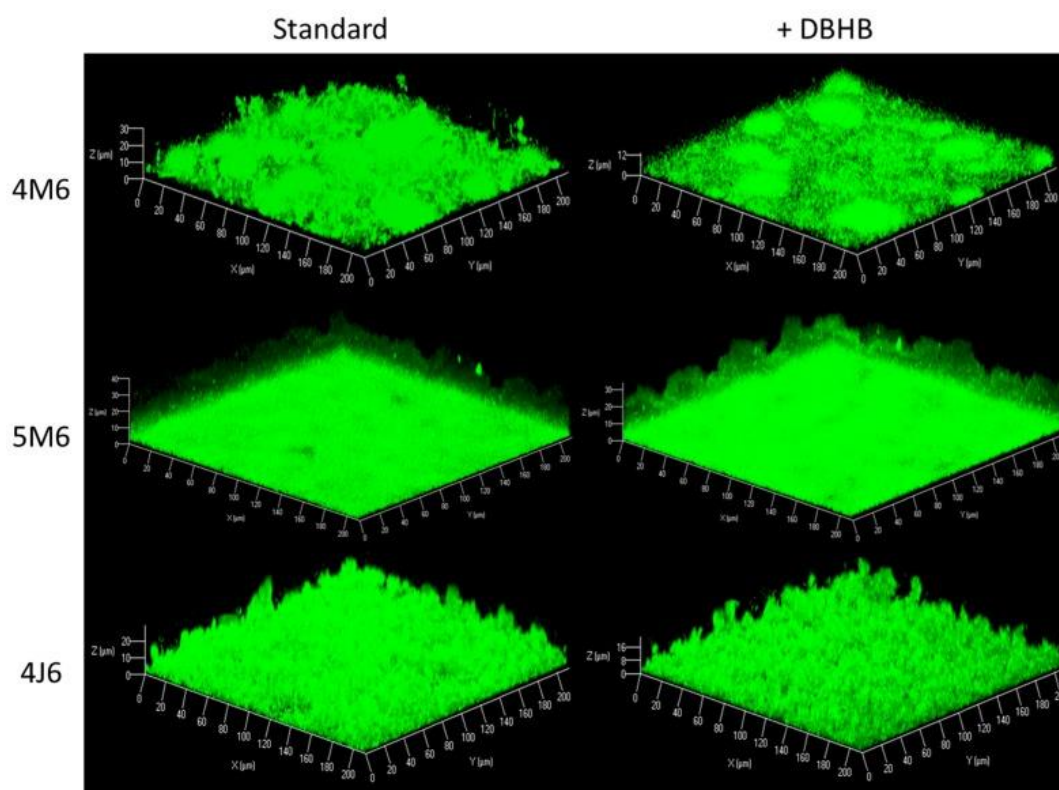


Figure I.18. : Biofilms cultivés sur surface de verre à 20°C sous flux de milieu sans ajout de DBHB (Standard) et contenant du DBHB. Les biofilms de *Paracoccus* sp. (4M6), *Pseudoalteromonas* sp. (5M6) et *Bacillus* sp. (4J6) ont été détectés en colorant les cellules avec du Syto 9 (Le Norcy et al. 2017).

3.3.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Afin d'obtenir une image et une vision globale de la structure tridimensionnelle d'un biofilm, la microscopie électronique à balayage est classiquement utilisée (De Tender et al. 2017). Le MEB est une technique de microscopie capable de produire des images de la surface d'un échantillon grâce à un balayage de la surface par un faisceau d'électrons. L'interaction entre le faisceau d'électrons et la matière va générer trois types d'émissions à savoir : les électrons rétrodiffusés, les photons X et les électrons secondaires permettant d'imager le contraste topographique de la surface de l'échantillon. Le MEB permet, lors de l'étude d'un biofilm marin, de visualiser la matrice d'EPS et les différents types de microorganismes présents (bactéries, diatomées...) (Figure I.19.) et ainsi de décrire la variabilité morphologique (type de microorganisme, organisation, matrice) visible entre des échantillons ou groupes d'échantillons (Siddik and Satheesh 2019).

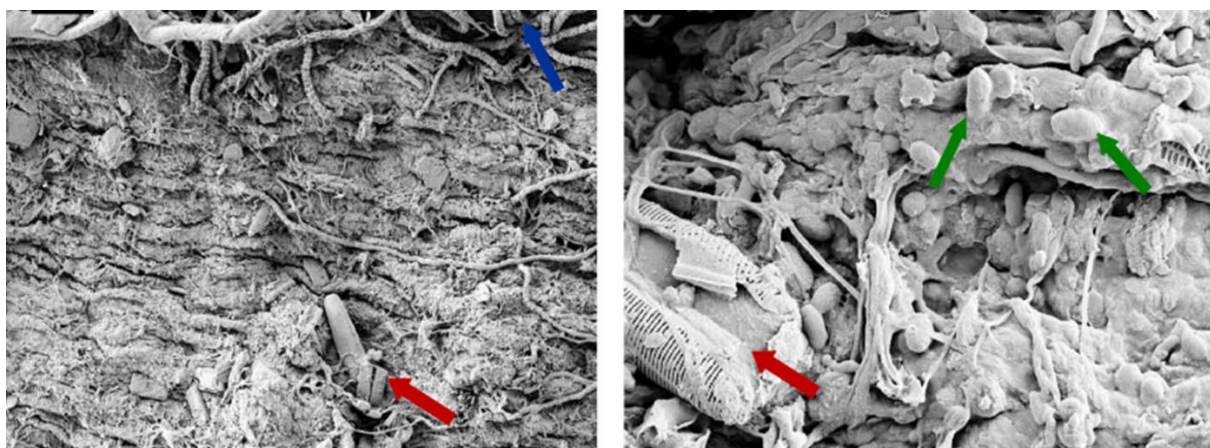


Figure I.19. : Observation du biofilm associé à la surface de la macroalgue brune *Taonia atomaria* par MEB au niveau de la zone basale. Les flèches désignent les microorganismes identifiés : en vert les bactéries, en rouge les diatomées et en bleu les cyanobactéries (d'après (Othmani 2014)).

C. Bilan des approches analytiques au service de la compréhension des biofilms marins & Objectifs de la thèse

1. Bilan des approches analytiques au service de la compréhension des biofilms marins

Cette partie a pour but de présenter un rapide bilan du large panel des techniques utilisées pour la compréhension et l'étude des biofilms marins. Comme vu dans la partie précédente, il existe de nombreuses techniques utilisées pour la caractérisation des biofilms marins. Chacune de ces techniques apportant une information et une caractérisation spécifique. La synergie de ces différentes techniques analytiques va permettre d'obtenir plusieurs types d'informations variées (concernant le métabolome, le protéome, la composition des EPS ou encore la visualisation de la structure du biofilm), donc une caractérisation plus élargie du biofilm. En fonction de la question scientifique posée concernant le biofilm (composition des communautés microbiennes, effets des nutriments, de la pollution, de l'hydrodynamisme ou encore de l'impact *quorum sensing* sur la formation de biofilm), certaines techniques d'analyse ou synergie de techniques vont permettre d'apporter des informations pertinentes. Le but de cette partie est de classer les études réalisées sur les biofilms marins par questions scientifiques et de recenser les techniques analytiques utilisées pour y répondre. Le tableau I.6. dresse un bilan des études réalisées durant cette thèse, par question scientifique, en décrivant les approches utilisées, les études réalisées ainsi que les organismes étudiés (Allan et al. 2002; Ayé et al. 2015; Briand et al. 2018; Carriot et al. 2021; Catão et al. 2018; Coclet et al. 2021; Mion et al. 2021; Paix et al. 2020). Un exemple tiré de la biblio est également décrit dans ce tableau pour chacune des questions scientifiques

Questions scientifiques	Approches utilisées	Etudes réalisées	Organismes étudiés	Références
Taxonomie	Métabolomique - Métabarcoding - Microscopie confocale	Etude des variations intra-thalle des métabolites de surface des communautés bactériennes épiphyte de <i>T. atomaria</i>	Biofilm formé <i>in situ</i> sur la surface de la macro algue brune <i>Taonia atomaria</i>	(Paix et al. 2020) <i>Second auteur</i>
	Métabolomique - Analyse phytochimique	Etude de la composition élargie du métabolome de <i>T. Atomaria</i>	Macro algue brune <i>Taonia atomaria</i>	Chapitre 3 (Carriot et al. 2021) <i>Premier auteur</i>
	Métabarcoding - Métabolomique	Etude de la composition taxonomique et la diversité des communautés des biofilm formé <i>in situ</i>	Biofilm marin formé <i>in situ</i> (Mer Méditerranée, océan Atlantique)	(Briand et al. 2018)
Nutriments	Métabolomique - Dosage des EPS - Microscopie confocale	Etude de l'impact global de la teneur en phosphate sur des biofilms formés <i>in vitro</i> par une bactérie marine modèle	Biofilm marin formé <i>in vitro</i> par <i>Pseudoalteromonas lipolytica</i>	Chapitre 4 (Carriot et al. 2021) <i>Soumis dans Metabolomics, premier auteur</i>
	Microscopie confocale - MEB	Etude du biofilm formé par <i>Citrobacter sp.</i> en fonction de limitation de carbone, de phosphore ou d'azote	Biofilm formé <i>in vitro</i> par la bactérie <i>Citrobacter sp.</i>	(Allan et al. 2002)
Pollution	Métabolomique - Dosage des EPS - IR	Etude des facteurs de contrôle principaux de la diversité et du fonctionnement microbien planctonique dans la rade de Toulon	Biofilm marin formé <i>in situ</i> (Mer Méditerranée, Toulon)	Perspectives
	Métabarcoding	Etude de l'influence d'une contamination multichimique (Cu, Mn, Zn) sur le fonctionnement des communautés de biofilms marins	Biofilm marin formé <i>in situ</i> (Mer Méditerranée, Toulon)	(Coclet et al. 2021)
Hydrodynamique	Métabolomique - Dosage des EPS - IR - Microscopie confocale - MEB - Métabarcoding	Etude du comportement global d'un biofilm formé <i>in situ</i> soumis à un stress hydrodynamique	Biofilm marin formé <i>in situ</i> (Mer Méditerranée, Toulon)	Chapitre 6 (Carriot et al.) <i>En cours de rédaction</i>
	Métabarcoding	Etude de la composition de la communauté procaryote en fonction du mode d'immersion et du revêtement	Biofilm marin formé <i>in situ</i> (Mer Méditerranée, Toulon)	(Catão et al. 2018)
Quorum Sensing/ Quorum Quenching	Protéomique - Métabolomique - Multiomique	Etude de l'impact <i>quorum quenching</i> (via l'enzyme <i>SsoPox</i>) sur la production métabolique et protéomique lié au <i>quorum sensing</i> d'un biofilm	Biofilm formé <i>in vitro</i> par <i>Chromobacterium violaceum</i>	Chapitre 5 (Mion et al. 2021) <i>Co premier auteur</i>
	LC-MS	Etude du <i>quorum sensing</i> impliquant les N-acylhomosérine lactones (AHL) dans la souche méditerranéenne <i>Pseudoalteromonas ulvae</i>	Souche méditerranéenne <i>Pseudoalteromonas ulvae</i> (mode planctonique et biofilm)	(Ayé et al. 2015)

Tableau I.6. : Tableau récapitulatif des études réalisées, en lien avec la bibliographie, par question scientifique liées au biofilms marin

2. Objectifs de la thèse

Le but de cette thèse est de poursuivre les développements méthodologiques destinés à la caractérisation biochimique de biofilms marins et qui ont été initiés ces dernières années au laboratoire MAPIEM (Brian-Jaisson et al. 2016; Favre et al. 2017, 2018), notamment dans le cadre des projets de recherche DRACONS (financement DGA, 2014-2018) et PREVENT (financement Université de Toulon, 2015-2018). Ces développements visent plus précisément à caractériser la production métabolique globale (analyse combinée des métabolites et des EPS) de biofilms *in vitro* mais également de biofilms naturels, donc plus complexes, formés *in situ*. L'originalité des études conduites dans ce projet de thèse réside dans le développement et l'utilisation de la métabolomique et des outils permettant l'identification des métabolites, mais également de la corrélation avec d'autres techniques et méthodologies permettant de caractériser le biofilm. La métabolomique permet d'avoir une vue globale sur l'ensemble du métabolome. Intégrer des données issues d'autres techniques de caractérisations permettra d'étendre la caractérisation du biofilm notamment concernant les EPS ou plus spécifiquement les protéines (par protéomique).

Les méthodologies ainsi développées pourront ensuite être appliquées à des échantillons de biofilms ou de cultures bactériennes provenant d'autres programmes de recherche (RESSAC - *Enzymatic Coatings Inhibiting Fouling and Corrosion*, financement DGA 2018-2020) mais également à des systèmes plus complexes, à savoir des biofilms formés *in situ* après immersion de surfaces, en milieu marin dans différentes conditions (ROTOR, COMICS).

Cette thèse pluridisciplinaire (chimie/biochimie/microbiologie) comporte deux objectifs principaux (Figure I.20.). Le premier est méthodologique et a pour but le développement d'outils et de techniques permettant une approche multi-échelles des biofilms marins. Le deuxième est d'apporter une meilleure compréhension des biofilms sur la base des questions scientifiques spécifiques. On peut scinder cette thèse en quatre étapes :

- La première étant le développement d'une méthode d'annotation originale liant une approche phytochimique « classique » ainsi qu'une utilisation approfondie de réseaux moléculaires. Cette méthode a été élaborée dans le cadre de l'annotation du métabolome d'un organisme marin non-modèle, la macro-algue brune *T. atomaria* (**Chapitre 3**).

- Une fois cette méthode mise en place, elle a été en partie appliquée à la caractérisation de l'effet de la carence en phosphate sur le métabolome de biofilms de la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 formés *in vitro*. Lors de cette étude les données issues de l'étude métabolomique ont été mises en relation avec celles obtenues par des techniques colorimétriques permettant une **caractérisation biochimique** plus globale de ces biofilms **(Chapitre 4)**.
- La troisième étape a consisté à lier des jeux de données issus d'études métabolomique et protéomique et ainsi à mettre en place une **approche multi-omiques**. Ces travaux ont été réalisés sur la souche modèle *Chromobacterium violaceum* et ont eu pour vocation de mieux comprendre l'impact du QQ sur le métabolisme de cette bactérie **(Chapitre 5)**.
- La dernière étape a consisté à coupler des données de métabolomique à celles pouvant permettre une caractérisation biochimique de la matrice d'EPS (IRTF-ATR, dosages colorimétriques). Cette méthodologie a été appliquée à des **biofilms marins formés *in situ*** afin de déterminer l'impact du facteur hydrodynamique sur leur production métabolique **(Chapitre 6)**.

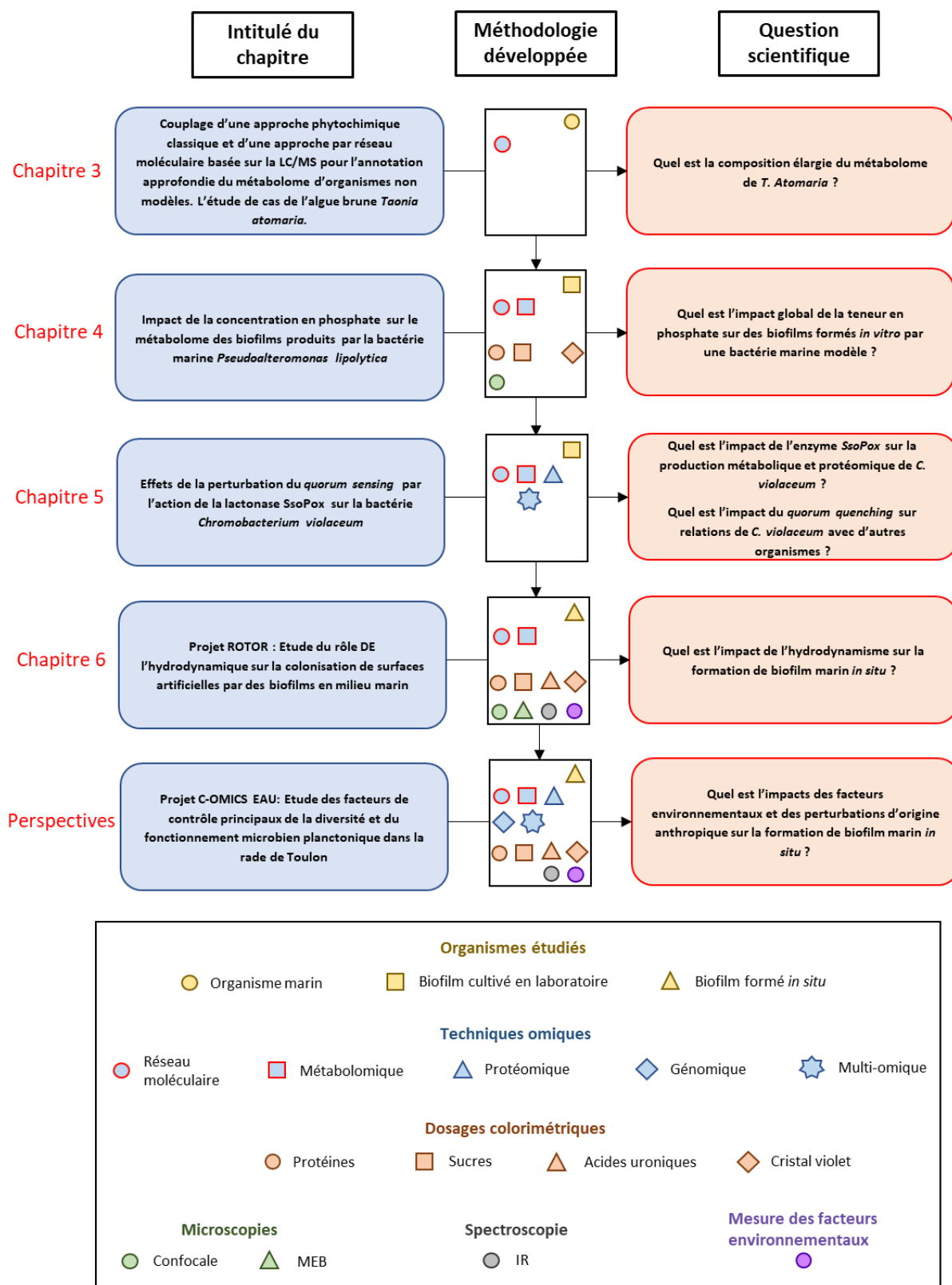


Figure I.20. : Figure récapitulative des objectifs de la thèse

CHAPITRE II

Matériels et méthodes générales



Ce chapitre sera consacré uniquement aux procédés généraux utilisés au cours des différents travaux de thèse. En effet, pour une meilleure compréhension de lecture, les méthodes spécifiques utilisées seront présentées plus en détails dans les chapitres correspondants. Dans cette partie, les milieux de culture et les conditions utilisées seront détaillés. Les différents paramètres et méthodes pour la conduite d'une analyse métabolomique, ainsi que pour la caractérisation des EPS, seront décrits.

A. Culture des souches bactériennes marines

1. Milieux de culture

En microbiologie, le matériel ainsi que les milieux de culture utilisés sont soumis à une stérilisation par autoclavage afin d'éviter toute contamination (cycle de 20 min, 120°C, 1 bar ; autoclave Systec, 5050 MLV, Linden, Allemagne). Seuls les deux milieux fréquemment utilisés au cours de cette thèse vont être décrits, à savoir le VNSS (*Väätänen nine salt solution*) et l'ASW (*Artificial SeaWater*). D'autres milieux de culture ont été utilisés pour des expériences spécifiques, tels que les milieux MMM (Milieu Minimum Marin) (Ostling et al. 1991), LB (*Luria Bertani*) ou encore MB (*Marine Broth*) (BD®, Franklin Lakes, NJ, USA).

1.1. Milieu pauvre

Le milieu de culture ASW, ou eau de mer artificielle (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), est un milieu pauvre, adapté à la culture des bactéries marines, et qui est utilisé afin de mimer les conditions naturelles retrouvées dans l'environnement marin. L'ASW contient uniquement des sels et donc aucune source de carbone (contrairement aux milieux dits riches). Sa composition est détaillée dans le tableau II.1. Il est présenté sous forme de poudre à diluer (36 g/L) dans de l'eau osmosée. Le mélange doit être porté à ébullition pour assurer une bonne solubilisation et un mélange homogène.

Composant	Concentration (g/L)
Chlore (Cl)	19,00 à 22,00
Sodium (Na)	10,70 à 11,00
Sulfate (SO ₄)	2,66
Magnesium (Mg)	1.32
Potassium (K)	0,30 à 0,40
Calcium (Ca)	0,40
Carbonate (HCO ₃ ⁻)	0,14 à 0,20
Strontium (Sr)	0,09
Bore (B)	0,06

Tableau II.1. : Composition chimique du milieu de culture ASW

1.2. Milieu riche

Le milieu VNSS est considéré comme un milieu riche pour la culture des bactéries marines (Little and Ray 2002). Il sera utilisé comme milieu pour la pré-culture des bactéries. La composition de ce milieu, préparé entièrement au laboratoire, est décrite dans tableau II.2. La première étape dans l'élaboration de ce milieu est la préparation du NSS ajusté à pH 6,5 (Thermo Scientific GENESYS 20) puis l'ajout, dans l'ordre, des composés décrits dans le tableau II.2. ci-dessous. A noter que le mélange doit être agité et chauffé à 125°C pour une meilleure homogénéité.

Produit	Concentration (g/L)	
NaCl	17,60	NSS
Na ₂ SO ₄	1,47	
NaHCO ₃	0,08	
KCl	0,25	
KBr	0,04	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1,87	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,31	
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0,01	
H ₃ BO ₃	0,01	
Peptone	1,00	VNSS
Glucose	0,50	
Extrait de levure	0,50	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01	
Na ₂ HPO ₄	0,01	
Amidon	0,50	

Tableau II.2. : Composition chimique du milieu de culture VNSS

2. Conditions de cultures

2.1. Conservation des souches bactériennes

La majorité des souches bactériennes utilisées proviennent de la mer Méditerranée et sont conservées dans un « souchier » à -80°C . Afin d'éviter toute contamination des cryotubes contenant les souches-mères, il nous faut préparer des cryotubes filles contenant la souche bactérienne à étudier. Le cryotube mère est placé dans un bac froid (-20°C) sous PSM (Poste de Sécurité Microbiologique), le mélange contenant les bactéries sous forme solide est récupéré via une oese et placé dans 10 mL de milieu MB (Marine Broth). Ce prélèvement est incubé une nuit (120 rpm, 20°C) dans ce milieu spécifique pour la croissance des bactéries marines. La DO, mesurée à 600nm, est ajustée à 0,1 dans le milieu MB puis le mélange est incubé une seconde fois (120 rpm, 20°C) afin d'atteindre la phase exponentielle de la bactérie. Six mL sont ensuite prélevés, transférés dans un tube Falcon puis centrifugés (6000g, 10 min, 20°C). Le surnageant est éliminé tandis que le culot est repris dans un mélange 60% MB / 40% glycérol puis stocké à -80°C en attendant les futures analyses.

2.2. Condition et suivi de la croissance bactérienne

Afin d'effectuer une culture bactérienne, les souches (conservées à -80°C dans un cryotube) sont récupérées à l'aide d'une oese. Deux méthodes de pré-cultures sont utilisées en fonction de l'expérience envisagée et de la souche bactérienne utilisée :

- Sans étalement sur boîte : Déposer directement l'échantillon de souche bactérienne dans un milieu riche (VNSS), laisser incubé une nuit sous agitation à 120 rpm, 20°C .
- Avec étalement sur boîte de Petri : Etaler l'échantillon de souche bactérienne sur une boîte de Petri (milieu solide : VNSS + Agar-agar) avec la méthode des cadrans. Laisser incubé une nuit à 20°C . Récupérer une colonie formée puis la déposer dans un milieu riche (VNSS). Laisser incubé une nuit sous agitation (120 rpm) à 20°C . Cette méthode, plus longue, a l'avantage de permettre une vérification de la non-contamination de la souche bactérienne utilisée et de prévenir une éventuelle contamination du cryotube.

Après une nuit d'incubation, la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de la culture est mesurée (ThermoFisher Scientific, Genesys 20, 4001/4). La culture est ensuite diluée dans le même milieu afin d'obtenir une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ égale à 0,1. L'incubation de la culture bactérienne est ensuite effectuée (120 rpm, 20°C). Par la suite, la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ est mesurée toutes les 30 min jusqu'à 2h d'incubation puis toutes les heures jusqu'à la fin de la phase exponentielle. Pour une culture en mode biofilm, une fois

la phase exponentielle atteinte, la culture bactérienne s'effectue pendant 24h, sans agitation à 20°C dans des boîtes de Petri en verre.

2.3. Culture *in situ*

L'échantillonnage des biofilms naturels étudiés dans le cadre des projets ROTOR et COMICS a été réalisé *in situ*. Ici, seul le protocole de prélèvement du biofilm sera décrit, le design expérimental spécifique à chaque projet sera détaillé dans les chapitres correspondants.

Des plaques en PVC, préalablement sablées (pour une meilleure accroche du biofilm), sont immergées dans la rade de Toulon (mer Méditerranée). Après un temps donné, suivant le projet concerné, les plaques colonisées sont rincées à l'ASW puis posées sur du papier-filtre. Elles sont ensuite raclées avec une lame de scalpel en inox (stérile). La lame de scalpel est changée entre chaque échantillon. Le biofilm est directement récupéré dans un tube préalablement rempli avec de l'acétate d'éthyle (AcOEt) (15 mL) pour l'analyse métabolomique. La lame est laissée dans le tube jusqu'au retour au laboratoire. Les tubes sont fermés et stockés à 4°C avant l'extraction et le *quenching* du matériel biologique au laboratoire. Pour l'analyse des EPS, le biofilm est directement récupéré dans 15 mL d'ASW stérile. Lorsque toute la plaque a été grattée, la lame est rincée 2 fois avec 1 mL d'ASW stérile.

B. Etude métabolomique

1. Collecte des biofilms, extraction et *quenching* du métabolome

Pour cette étape qui concerne l'extraction et le *quenching*, deux types d'échantillons de biofilms vont être traités dans les travaux qui vont suivre : 1) biofilms mono-souches cultivés en laboratoire, 2) biofilms formés *in situ* en conditions naturelles (mer Méditerranée). Le traitement de ces deux types d'échantillons va différer légèrement (Figure II.1.). Néanmoins le solvant d'extraction (AcOEt) ainsi que le traitement par ultrasons (Branson 2510MT, Sigma-Aldrich, Lyon) sont similaires.

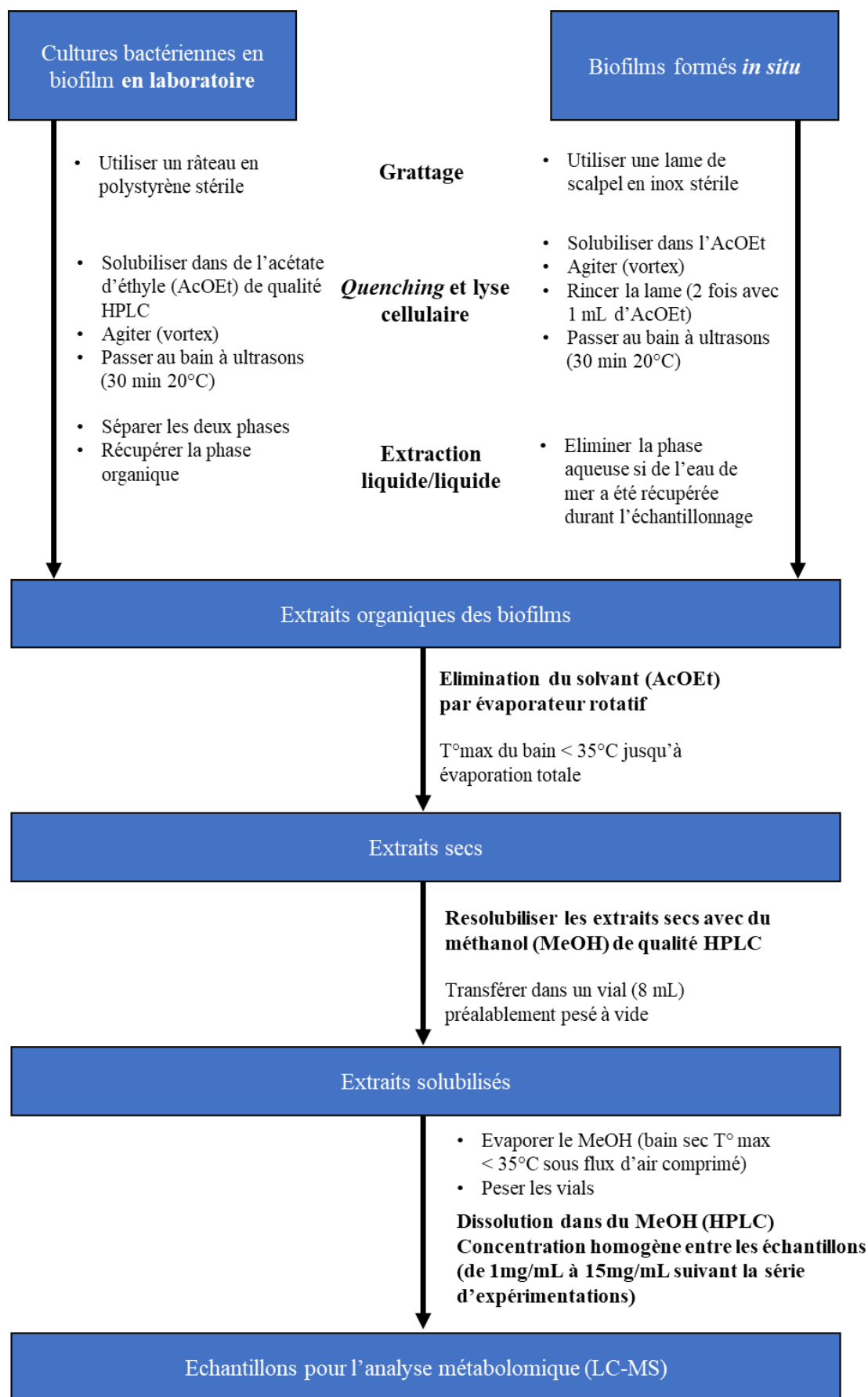


Figure II.1. : Workflow expérimental pour l'extraction et le quenching du métabolome de biofilms marins

2. Réalisation de l'analyse par LC-MS

2.1. Séquence d'injection

Une fois les échantillons extraits, ils sont solubilisés dans MeOH à la même concentration. La concentration des échantillons (pouvant aller de 1 mg/mL à 15 mg/mL) dépend de l'analyse et de l'information recherchée mais également de l'appareillage à disposition et de la méthode utilisée. En métabolomique, la séquence d'injection comporte quelques particularités qui sont indispensables pour le bon traitement des données. La séquence d'injection couramment utilisée est décrite ci-dessous (Figure II.2.).

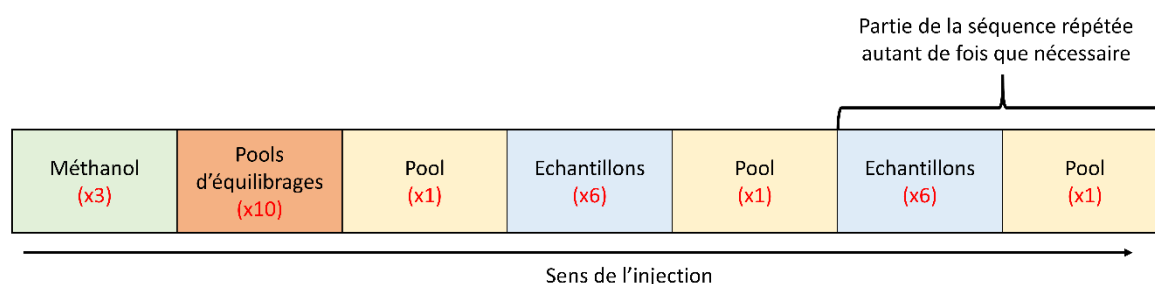


Figure II.2. : Organisation de la séquence d'injection pour une analyse métabolomique

- **Méthanol :** Les premières injections sont effectuées avec le solvant d'élution afin de nettoyer la colonne et de s'assurer de la propreté du système.
- **Pools d'équilibrages :** Ils sont constitués d'un mélange à volume égal de tous les échantillons ainsi que des blancs. Ce mélange sera injecté 10 fois en début de séquence afin de stabiliser le système analytique.
- **Pool :** Comme le pool d'équilibrage, il est constitué de tous les échantillons et blancs en proportion égal. Les pools sont injectés entre chaque série de 6 échantillons, ces injections permettront de vérifier la variation des métabolites au cours de la séquence afin d'appliquer une filtration ultérieure ou une correction au niveau de la matrice de données finale.
- **Echantillons :** Les échantillons constituent le cœur de l'analyse, ils sont injectés de manière aléatoire tout au long de la séquence afin d'éviter toutes tendances liées à des facteurs extérieurs.
- **Blancs :** Les blancs sont injectés de la même manière que les échantillons. Ils suivent le même traitement, en amont, que les échantillons mais sans matériel biologique à analyser. Par exemple les « blancs d'extraction » utilisés lors de culture bactériennes contiennent l'extraction des milieux de culture seuls, sans bactérie. Ces blancs vont

permettre à la fois de retirer de la matrice finale des métabolites présent dans les milieux de culture mais également des contaminants pouvant s'accumuler au cours des étapes de manipulations.

2.2. UPLC-ESI-QToF

Les échantillons ont été analysés par UPLC-ESI-QToF-MS en modes positif et négatif. L'instrumentation consistait en un système chromatographique à ultra haute performance (*Ultra high Performance Liquid Chromatography* ; UPLC) Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) équipé d'un four à colonnes ($T = 40^{\circ}\text{C}$) et d'un injecteur automatique thermostaté à 4°C . Ce système chromatographique est couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (*Quadrupole Time Of Flight* ; QToF) Impact II (Bruker Daltonics) équipé d'un système d'ionisation par électronébulisation (*ElectroSpray Ionisation* ; ESI). Les séparations sont réalisées sur une colonne en phase inverse (Phenomenex Kinetex ; Phenylhexyl, 150 mm $\times$ 2,1 mm, 1,7 μm) équipée d'une pré-colonne (SecurityGuard, Phenomenex). Le débit de l'éluant est fixé à 0,5 mL/min et le volume injecté est de 5 ou 10 μL par échantillon en fonction des expérimentations. La phase mobile est constituée d'un mélange eau/acétonitrile (Chromasolv ; Sigma-Aldrich-Merck) contenant chacun 0,1% (v/v) d'acide formique (Ultra grade ; Fluka, Fischer Scientific) dont les proportions (gradient d'élution) évoluent au cours du temps comme décrit dans le tableau II.3.

Temps d'analyse (min)	0	2	10	14	14,01	16
Acétonitrile	5%	5%	100%	100%	5%	5%
Eau	95%	95%	0%	0%	95%	95%

Tableau II.3. : Programmation de la phase mobile utilisée lors du profilage par UHPLC des échantillons de biofilms

La tension du capillaire du spectromètre de masse a été réglée à 4500V (en mode positif) et les paramètres de nébulisation ont été définis de la manière suivante : pression du gaz de nébulisation (N_2) à 0,4 bar, débit du gaz de séchage (N_2) à 4 L/min et température de séchage à 180°C . Les spectres de masses ont été enregistrés de m/z 50 à 1200 avec un pouvoir de résolution de masse de 25 000 et à une fréquence de 2 Hz. Des analyses de spectrométrie de masse en tandem ont été réalisées grâce à une dissociation induite par collision (CID), fragmentant les deux ions précurseurs les plus intenses par balayage, avec une gamme d'énergie

de collision allant de 15 à 45 eV. Une solution de formate/acétate formant des clusters a été automatiquement injectée avant chaque échantillon pour l'étalonnage de masse interne et le spectromètre de masse a été étalonné avec la même solution au début de chaque séquence d'injection.

3. Extraction et traitement des données brutes

3.1. MZmine2

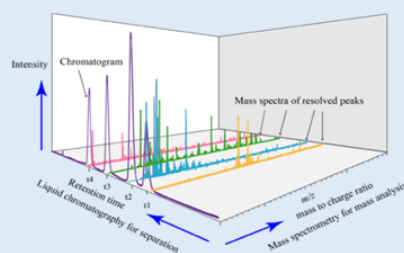
Les données brutes LC-MS et LC-MS/MS ont été converties respectivement au format « *.netCDF* » et « *.mzXML* » à l'aide du logiciel DataAnalysis (vers. 4.3, Bruker). Ces fichiers ont fait l'objet d'une analyse en utilisant MZmine 2 (vers. 2.53) (Pluskal et al. 2010). Les différentes étapes d'extraction des données avec ce logiciel sont détaillées et présentées dans les figures ci-dessous (Figure II.3., Figure II.4., Figure II.5., Figure II.6.). Les étapes avec un fond bleu sont celles qui sont indispensables et qui doivent être effectuées pour chaque analyse. Les étapes avec un fond gris ne seront pas utilisées systématiquement pour toutes les expérimentations. Un large panel de paramètres doit être renseigné pour la conduite de l'extraction des données, à noter que chaque paramètre doit être renseigné en accord avec le type d'échantillon et d'appareillage. La complexité de ce type d'analyse réside dans le fait qu'il n'existe pas de paramètres généraux permettant de traiter tous les types d'analyses.

1) Data import



- MS → .netCDF
- MS² → .mzXML

Raw data methods/Raw data import/Select the files



Toutes les données importées comprennent les échantillons, les QC (pools) ainsi que les blancs.

Ces données contiennent les chromatogrammes ainsi que les spectres de masses visant à être traités via MZmine 2.

2) Mass detection

Row data methods/Feature detection/Mass detection

- **Mass detector : Centroid**
- **Noise level : 1000**



Scan 515 / rt 6,06 min

Niveau du bruit
(Noise level)

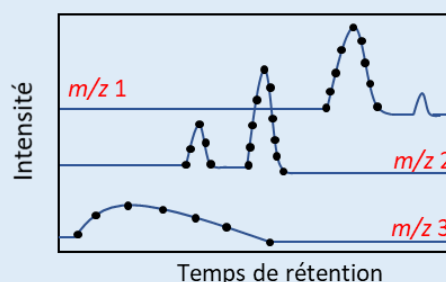
Cette étape permet de créer des listes de spectres de masse à partir des données brutes LC-MS et LC-MS/MS, le module de détection de masse génère une liste de masses (ions) pour chaque balayage (*scan*) dans le fichier de données brutes. Les chromatogrammes de chaque échantillon sont découpés en scans de 0,015 min qui sont tous soumis à cette détection.

- **Mass detector** : Plusieurs algorithmes sont fournis pour cette étape. Le choix de l'algorithme optimal dépend des caractéristiques des données brutes (résolution de masse, précision de masse, forme des pics, bruit). Dans le cas où les données brutes sont déjà centroïdes, un seul algorithme (détecteur de masse centroïde) peut être utilisé.
- **Noise level** : Valeur au dessus laquelle chaque pic est détecté comme un ion et sa valeur de *m/z* est placée dans la liste. Cette valeur est définie manuellement en fonction du chromatogramme des échantillons, il est courant de multiplier par 3 l'intensité de la ligne de base pour définir cette valeur.

3) Chromatogram builder

Row data methods/Feature detection/ADAP Chromatogram builder

- **Min group size in # of scans : 3**
- **Group intensity threshold : 1000**
- **Min highest intensity : 2000**
- ***m/z* tolerance : 0,025**



Le générateur de chromatogramme ADAP prend la liste des masses générées précédemment et construit un chromatogramme pour chaque masse détectée sur la durée de l'acquisition.

- **Min group size in # of scans** : Nombre minimum de scans pour un pic devant être supérieurs à la valeur ci-dessous.
- **Mass detector** : Voir au dessus.
- **Min highest intensity** : Au moins un point sur le pic doit être supérieur à cette valeur.
- ***m/z* tolerance** : Variation maximale autorisée entre plusieurs valeurs de *m/z* afin d'être connectée au même chromatogramme, cette valeur est définie manuellement par l'utilisateur en regardant la variabilité d'une masse au sein d'un pic (de préférence le plus intense).

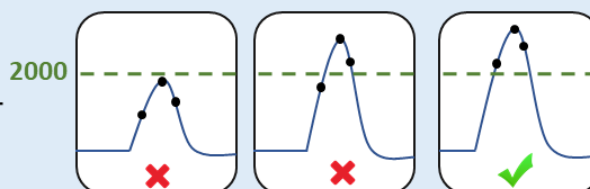
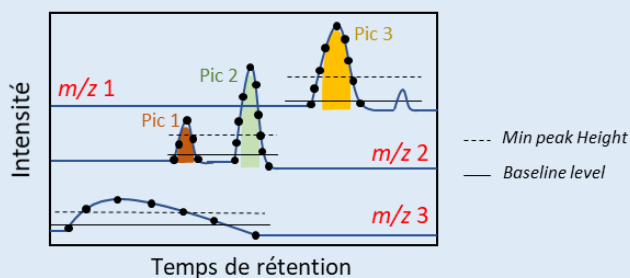


Figure II.3. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (1/4)

4) Deconvolution

Feature list methods/Feature detection/Chromatogram deconvolution

- **Algorithm** : Baseline cut-off
- **Min peak height** : 2000
- **Peak duration range (min)** : 0,01/0,5
- **Baseline level** : 500



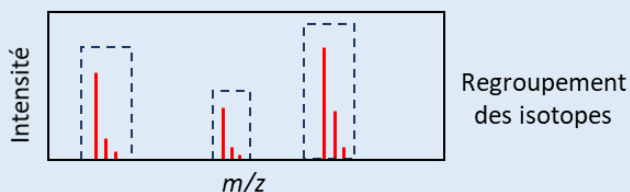
Cette étape permet de déconvoluer l'ensemble des chromatogrammes obtenus à l'étape précédente en pics individuels.

- L'algorithme « *Baseline cut-off* » permet de définir le début et la fin d'un pic en fonction de plusieurs paramètres notamment en fonction de la hauteur et de la durée du pic. En effet, à chaque fois que le signal croise la ligne de base, un nouveau pic est créé.
- *Min peak height* : Hauteur minimale du pic pour être accepté (intensité absolue).
- *Min peak height* : Plage de durées acceptées. Pour qu'un pic soit validé, il faut que sa durée soit comprise entre 2 valeurs définies.
- *Baseline level* : Niveau en dessous duquel tous les points du chromatogramme sont supprimés (intensité absolue).

5) Chromatogram deisotoped

Feature list methods/Isotopes/Isotopic peaks grouper

- **m/z tolerance** : 0,05
- **Retention time tolerance** : 0,25
- **Maximum charge** : 2
- **Representative isotope** : Most intense



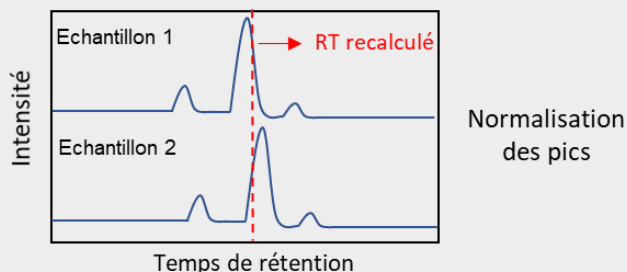
Ce module tente de trouver les pics formant un massif isotopique. Dès lors que des pics qui correspondent à des isotopes sont détectés, les pics isotopiques supplémentaires sont supprimés de la liste des pics. Seul l'isotope le plus élevé est conservé.

- *m/z tolerance* : Variation maximale autorisée de l'emplacement prévu d'un pic en m/z.
- *Retention time tolerance* : Variation maximale autorisée de l'emplacement prévu d'un pic en RT.
- *Representative isotope* : Permet de conserver uniquement l'isotope le plus intense.

6) RT Normalisation

Feature list methods/Normalisation/Retention time calibration

- **m/z tolerance** : 0,05
- **Retention time tolerance** : 0,25
- **Minimum standard intensity** : 10000



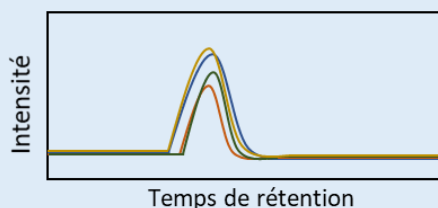
Cette étape est nécessaire si des variations de RT sont observées entre les différents échantillons. Le but étant de réduire l'écart des RT entre les listes de pics, en recherchant des pics majoritaires communs dans ces listes de pics et en les utilisant comme standards de normalisation.

- *m/z tolerance* : Différence maximale autorisée en m/z entre différents pics pour permettre la normalisation.
- *Retention time tolerance* : Différence maximale autorisée en RT entre différents pics pour permettre la normalisation.
- *Minimum standard intensity* : Intensité minimale d'un pic pouvant être utilisé comme standard de normalisation.

Figure II.4. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (2/4)

7) Peak list aligned*Feature list methods/Alignement/Join aligner*

- ***m/z tolerance*** : 0,05
- ***Retention time tolerance*** : 0,25
- ***Weight for m/z*** : 1
- ***Weight for RT*** : 1

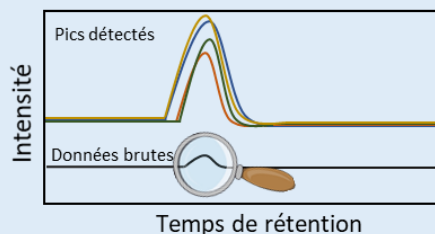
Alignements
des pics

Cette étape permet d'aligner les pics détectés dans différents échantillons via un score de correspondance. Ce score est calculé en fonction de la masse et du RT de chaque pic.

- *m/z tolerance* : Différence maximale autorisée en *m/z* entre différents pics pour permettre l'alignement.
- *Retention time tolerance* : Différence maximale autorisée en RT entre différents pics pour permettre l'alignement.
- *Weight for m/z* : Poids attribué pour la différence en *m/z* pour le calcul du score.
- *Weight for RT* : Poids attribué pour la différence du RT pour le calcul du score.

8) Peak finder*Feature list methods/Gap filling/Peakfinder*

- ***Intensity tolerance*** : 0.5%
- ***m/z tolerance*** : 0,05
- ***Retention time tolerance*** : 0,25

Recherche des
pics manquants

Après l'étape d'alignement, la liste des pics obtenue peut contenir des pics manquants (pics faibles dans certains chromatogrammes). L'absence d'un pic n'implique pas qu'il ne soit pas présent, le « *gap filled* » tente de combler les lacunes dans la liste des pics. Les paramètres définissent la fenêtre dans laquelle l'algorithme doit trouver le nouveau pic. Il est centré sur la moyenne *m/z* et la moyenne du RT de la liste des pics sources. Une fois que le meilleur candidat est trouvé à l'intérieur de la fenêtre, son intensité et sa forme sont vérifiées pour attribuer des valeurs d'intensités et d'aires.

- *Intensity tolerance* : Cette valeur définit l'écart maximal autorisé par rapport à la forme attendue d'un pic.
- *m/z tolerance* : Cette valeur définit la plage, en *m/z*, pour rechercher un pic manquant dans les données brutes. C'est la différence maximale autorisée en *m/z*.
- *Retention time tolerance* : Cette valeur définit la plage, en RT, pour rechercher un pic manquant dans les données brutes. C'est la différence maximale autorisée en RT.

Figure II.5. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (3/4)

9) Suppression des doublons*Feature list methods/Filtering/Duplicate peak filter*

- **Filter mode : New average**
- **m/z tolerance : 0,05**
- **Retention time tolerance : 0,25**

Ce filtre est très utile pour éliminer les doublons. Le RT moyen et la valeur m/z sont utilisés afin de détecter et de supprimer les doublons dans la liste des pics. Le pic dont la valeur de l'aire est la plus élevée est conservé.

- *New average* : Compare les lignes dans la liste des pics avec la moyenne en m/z et la moyenne du RT.
- *m/z tolerance* : Différence maximale en m/z entre les pics en double.
- *Retention time tolerance* : Différence maximale en RT entre les pics en double.

10) Filtration et validation manuelle

- **Regarder l'allure des pics dans la liste finale** : Vérifier que les variables sélectionnées par les différents algorithmes correspondent à des pics bien définis.
- **Eliminer les variables avec des RT faibles** : Correspondant au pic d'élution du chromatogramme.

11) Export .csv*Feature list methods/Export/Export to CSV file*

Etape finale permettant d'exporter la matrice au format .csv pour des analyses statistiques ultérieures.

- **Export common elements** : Row ID, Row m/z , Row retention time.
- **Export data file elements** : Peak area.

Figure II.6. : Traitement des données LC-MS par MZmine 2 (4/4)

3.2. Filtration de la matrice de données

Une fois la matrice obtenue par MZmine 2, une série de trois filtrations va être effectuée. L'objectif est d'éliminer toutes les variables qui ne sont pas issues des échantillons ou présentant une variabilité analytique ne permettant pas leur interprétation. Une troisième étape de filtration permet d'éliminer des signaux redondants qui correspondent à une même variable. Ces filtrations, mises en œuvre sous R, ont été utilisées totalement ou en partie dans les travaux décrits dans ce manuscrit. Les paramètres utilisés ont été ajustés en fonction des échantillons traités.

3.2.1. Filtration en fonction du rapport signal/bruit

Cette filtration est effectuée pour chaque traitement métabolomique dans les chapitres qui vont suivre, son objectif étant l'élimination de toutes variables ne provenant pas de l'échantillon de biofilm mais étant issues des milieux de culture ou dues à des contaminations. La valeur du rapport signal/blanc est déterminante pour cette étape. Pour une variable, le « signal » correspond à la moyenne des intensités de cette variable dans les pools tandis que le terme « blanc » correspond à la moyenne des intensités de cette même variables mais dans les blancs. Si le rapport signal/blanc est fixé à 3, il faut que l'intensité moyenne d'un métabolite soit au minimum trois fois supérieure dans les pools à celle observée au niveau des blancs.

3.2.2. Filtration en fonction du coefficient de variation

L'objectif de cette seconde filtration est l'élimination des variables fluctuantes dues à la variabilité analytique de la plateforme UPLC-ESI-Q-ToF. En effet, les pools sont injectés tout au long de la séquence d'injection et ont une composition chimique identique, une variation de l'intensité d'une variable au sein des pools indique une variabilité due à la plateforme analytique et non pas à un facteur biologique. La valeur du coefficient de variation est fixée (de 0% à 100%). Prenons l'exemple d'un coefficient de variation fixé à 40%, une variable dont la variation d'intensité est supérieure 40% entre les différents pools sera éliminée de la matrice.

3.2.3. Filtration en fonction du coefficient de corrélation

Cette filtration est utilisée afin de supprimer des variables redondantes. Elle concerne uniquement les échantillons. En effet, des variables ayant le même temps de rétention mais avec des rapports m/z différents pourraient correspondre en fait à deux ions d'un même métabolite

(adduits, ions fragments...). Pour vérifier que ces deux variables correspondent bien à deux métabolites différents, un coefficient de corrélation est calculé entre les deux variables. Par exemple s'il est fixé à 80%, pour un même temps de rétention, deux variables ayant une corrélation de plus de 80% seront considérées comme correspondant au même métabolite donc apportant la même information. S'il s'avère que ces deux variables sont corrélées, celle ayant le rapport m/z le plus faible sera éliminée de la matrice finale.

3.3. Analyses statistiques

A la suite de ces étapes, les données sont regroupées dans la matrice avec les échantillons en lignes et les variables en colonnes. La première colonne décrit le nom de l'échantillon et la deuxième le groupe auquel il appartient. La matrice est enregistrée en format « .csv » puis est analysée via le site MetaboAnalyst. Les étapes de traitement via MetaboAnalyst sont explicitées dans la figure II.7. ci-dessous.

Etapes de traitement statistique des données Par MetaboAnalyst 5.0

- 1) Aller sur le site : <https://www.metaboanalyst.ca/>.
- 2) Cliquer sur « *Click here to start* », puis « *Statistical Analysis* ».
- 3) Dans la fenêtre « *Upload your data* », dans la catégorie « *A plain text file (.txt or .csv):* », réaliser dans l'ordre les étapes suivantes :
 - Choisir « *Peak intensity table* » dans l'onglet « *Data Type* ».
 - Choisir « *Samples in rows (unpaired)* » dans l'onglet « *Format* ».
 - Cliquer sur « *Submit* » puis « *Skip* ».
- 4) Dans la fenêtre « *Data Filtering* », choisir « *Standard Deviation (SD)* ». Cliquer sur « *Submit* » pour valider le choix puis cliquer sur « *Proceed* ».
- 5) Dans la fenêtre « *Normalization overview* », réaliser dans l'ordre les étapes suivantes :
 - Choisir « *Normalization by sum* » dans l'onglet « *Sample Normalization* ».
 - Choisir « *Log transformation* » dans l'onglet « *Data transformation* ».
 - Choisir « *Mean centering* » dans l'onglet « *Data Scaling* ».
 - Cliquer sur « *Normalize* », puis sur « *Proceed* ».
- 6) Cliquer sur « *Principal Component Analysis (PCA)* ». Effectuer les étapes suivantes :
 - Cliquer sur l'onglet « *Scree Plot* » et vérifier le pourcentage de représentativité des composantes.
 - Cliquer sur l'onglet « *2D plot* » et vérifier la représentation graphique de l'ACP. Pour valider l'ACP, il faut que les blancs soient bien distincts des échantillons et que les pools se situent au centre du *Score plot*.

Note : Si la représentation graphique de l'ACP est validée à l'étape 6, éliminer les blancs et les pools de l'analyse pour conserver uniquement les échantillons « vrais ». Cliquer sur « *Processing* », puis « *Data Editor* » et enfin sur l'onglet « *Edit groups* ». Réitérer les étapes 4, 5 et 6.

- 7) Cliquer sur « *PLSDA* ». Effectuer les étapes suivantes :
 - Décocher le « *Class Order Matters* » et cliquer sur « *Update* » si nécessaire.
 - Cliquer sur l'onglet « *Cross Validation* » et vérifier la valeur de R^2 et Q^2 (R^2 et $Q^2 > 0,5$).
 - Cliquer sur l'onglet « *Permutation* », choisir une valeur de « *Set permutation numbers* » puis cliquer sur « *Submit* ». Vérifier la valeur de la p -value. Plus la valeur de la p -value est faible, plus les résultats du modèle ne sont pas liés à un phénomène aléatoire. On considère une p -value $< 0,05$ comme une valeur indiquant une bonne fiabilité du modèle statistique obtenu.
 - Cliquer sur « *Imp.Feature* ». Choisir le nombre de VIPs avec l'onglet « *Show top feature number* ».
- 8) Cliquer sur « *ANOVA* » et choisir « *Fisher's LSD* » dans l'onglet « *Post-hoc analysis* ». Regarder la p -value des VIPs pour vérifier la significativité entre les groupes ($p < 0,05$).

Note : D'autres représentations que l'ACP et la PLSDA sont disponibles sous MetaboAnalyst. Elle peuvent permettre d'avoir une vue d'ensemble des données comme par exemple avec les représentations de type « *Dendrogram* » ou « *Heatmap* ».

Figure II.7. : Etapes de traitement de la matrice finale via MetaboAnalyst 5.0

3.4. Identification des biomarqueurs

L'identification des VIPs, et donc des biomarqueurs, est la clef de l'interprétation biologique d'une étude par métabolomique. Les réseaux moléculaires constituent des alliés de taille pour cet objectif comme cela a été décrit dans le chapitre I. Les données brutes UHPLC-MS/MS ont été converties en fichiers « .*mzXML* » à l'aide du logiciel DataAnalysis (vers. 4.3 ; Bruker Daltonics). Les fichiers sont ensuite transférés sur la plateforme MassIVE en utilisant le client FTP Filezilla (hôte : massive.ucsd.edu, port : 21). Les données sont traitées sous MassIVE (*Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment*, <https://massive.ucsd.edu>). A la suite de l'analyse, un numéro d'identification est généré dans le but de partager les données avec la communauté scientifique et/ou de créer un réseau moléculaire. L'importation du numéro MassIVE dans la plateforme GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking* (<http://gnps.ucsd.edu>)) permet l'importation des données LC-MS/MS. Ces données peuvent être réunies en groupes en fonction des différentes conditions pour une meilleure représentation par la suite. Des paramètres sont à renseigner pour la construction d'un réseau moléculaire en fonction de l'appareillage, de la nature des échantillons analysés ainsi que du résultat attendu :

- *Precursor Ion Mass Tolerance* : Cette valeur (exprimée en Dalton) influence le regroupement de spectres MS/MS presque identiques en fonction de l'ion précurseur fragmenté. Pour des spectres réalisés en haute résolution, cette valeur est fixée à 0.02 Da (cela correspond à une erreur maximale de 40 ppm à m/z 500, 20 ppm à m/z 1000 ou encore 13 ppm à m/z 1500).
- *Fragment Ion Mass Tolerance* : Pour chaque groupe de spectres MS/MS envisagés pour un regroupement (création d'un spectre consensuel), cette valeur spécifie de combien les ions fragmentés peuvent être décalés par rapport à leurs valeurs m/z attendues. Pour des spectres réalisés en haute résolution, cette valeur est fixée à 0,02 Da.
- *Min Pairs Cos* : Valeur comprise entre 0 (aucune similarité entre deux spectres MS/MS) et 1 (les deux spectres MS/MS sont identiques). C'est la valeur de *Cosine score* minimum entre 2 spectres MS/MS nécessaire pour créer un lien entre les 2 nœuds correspondants (deux métabolites). Elle est fixée par défaut à 0,7. Une valeur plus faible augmentera la taille des clusters en induisant le regroupement de spectres MS/MS moins apparentés, une valeur plus élevée aura un effet inverse.
- *Minimum Matched Fragment Ions* : Cette valeur correspond au nombre minimum de fragments communs (entre deux spectres MS/MS) pour créer un lien entre deux nœuds. Elle est fixée par défaut à 6. Une valeur plus faible permettra des liaisons entre les

spectres de molécules avec peu d'ions fragments similaires. Une valeur plus élevée fera le contraire.

- *Network TopK* : Nombre maximal de nœuds voisins pour un même nœud.

A noter également que des paramètres sont à renseigner pour la recherche d'annotation dans la base de données de GNPS. La valeur du « *Library Search Min Matched Peaks* » correspond au nombre minimal d'ions fragments communs pour l'annotation et doit être identique à celle renseignée pour « *Fragment Ion Mass Tolerance* ». Même chose pour « *Score Threshold* » (*Cosine score* minimal pour l'annotation avec les bases de données) et « *Min Pairs Cos* ».

Une fois les paramètres renseignés, le réseau est généré, visualisé et mis en forme grâce au logiciel Cytoscape (vers. 3.7.0).

L'annotation du réseau peut être réalisée de trois manières :

- 1) Annotation des métabolites directement par confrontation avec les bases de données disponibles sous GNPS (Option « *View All Library Hits* »).
- 2) Annotation par comparaison avec les bases de données en ligne. Recherche d'un métabolite (par le biais de la valeur de son rapport m/z obtenu à haute résolution) sur la plateforme CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es>) regroupant plusieurs bases de données. Recherche d'un métabolite dans différents types de bases de données (METLIN, HMDB, LIPIDMAPS, KEGG...) à l'aide de sa formule brute déterminée avec l'outil "*SmartFormula*" de DataAnalysis
- 3) Interprétation du spectre MS/MS. L'annotation des métabolites est réalisée en cherchant la formule moléculaire la plus probable avec l'outil "*SmartFormula*" de DataAnalysis et en analysant leurs masses précises et leur schéma de fragmentation en lien avec les données issues de la littérature.

Les différentes étapes allant du traitement des données brutes, de la création du réseau moléculaire jusqu'à l'annotation des biomarqueurs sont représentées dans la figure II.8. ci-dessous.

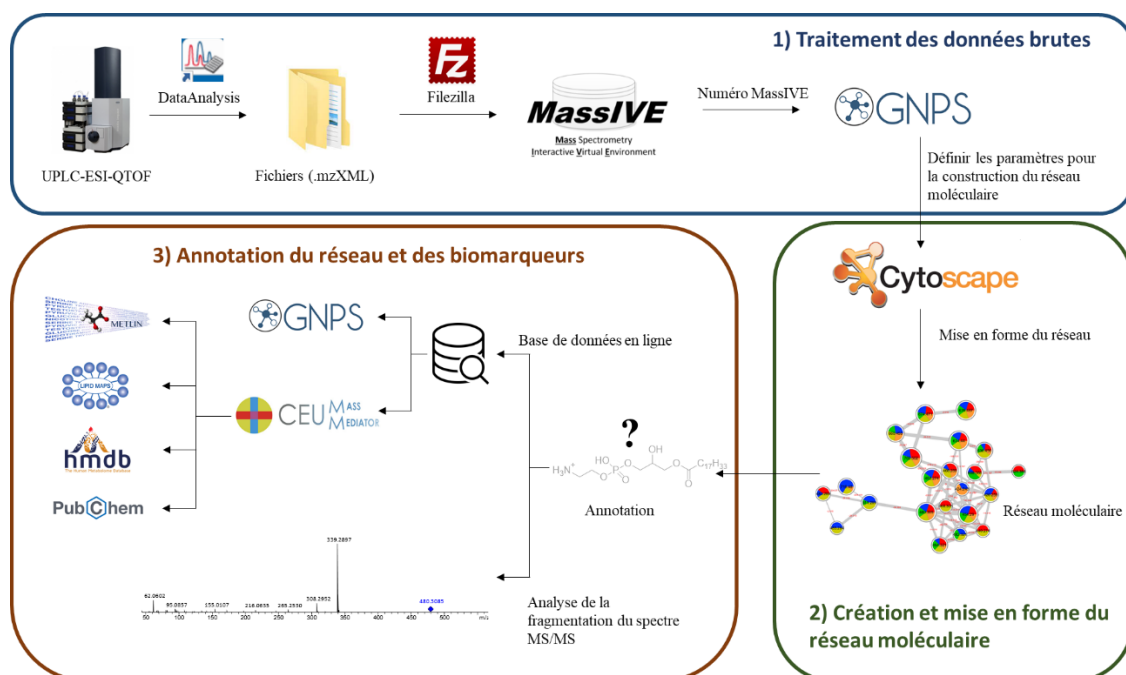


Figure II.8. : Workflow des étapes permettant l'annotation du métabolome grâce aux réseaux moléculaires

C. Caractérisation des EPS

1. Extraction des EPS

Les substances polymériques extracellulaires sont, dans un biofilm, plus ou moins liées entre elles et aux cellules. Trois fractions ont été extraites grâce à une succession d'étapes de centrifugation. Il s'agit de la Fraction Colloïdale (FC) (composés des EPS colloïdales), de la Fraction Liée (FL) (regroupant les EPS liées et potentiellement les polymères intracellulaires) et la Fraction Résiduelle (FR) (constituée des cellules intactes et des débris cellulaires). Les différentes étapes du protocole sont détaillées dans la figure II.9.

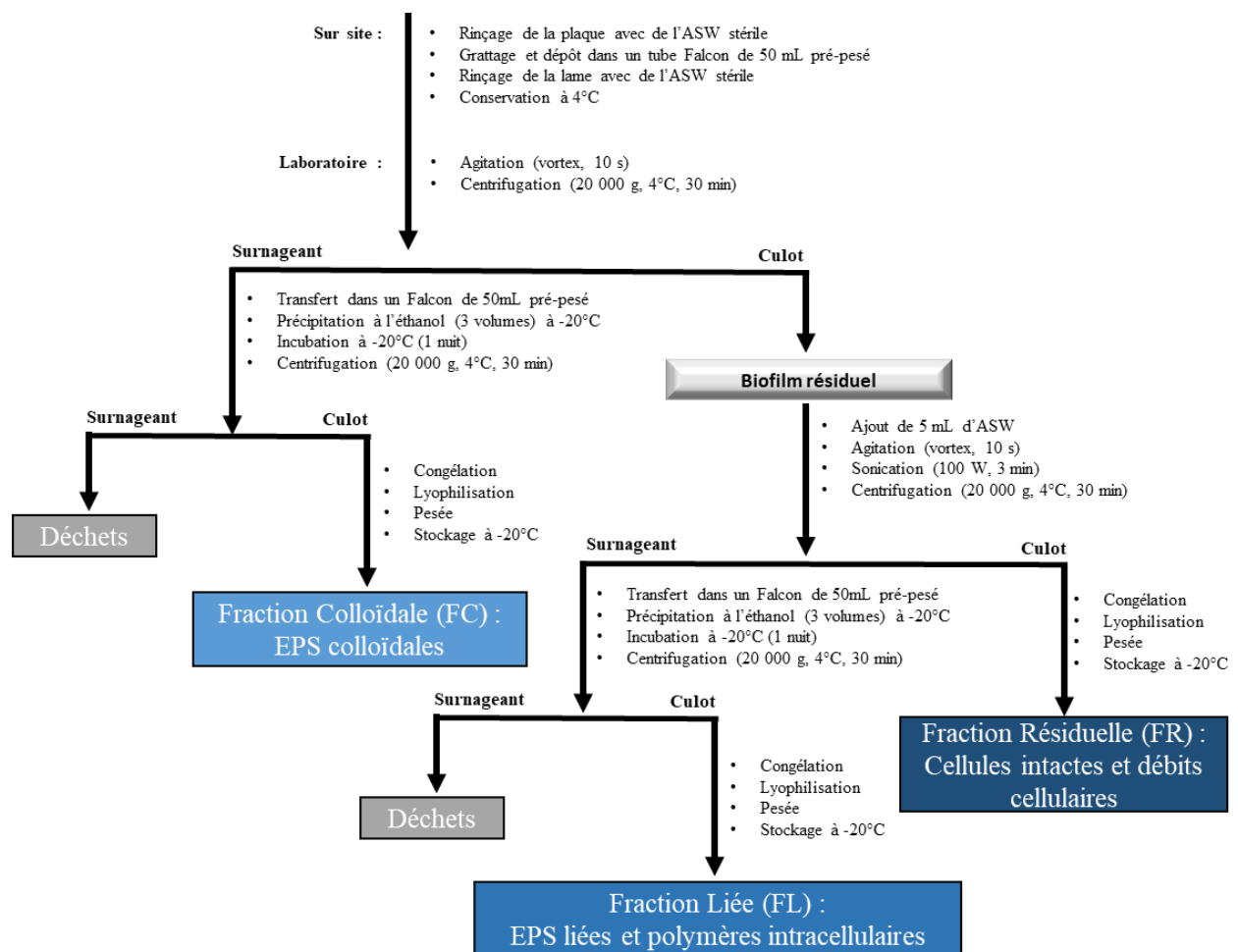


Figure II.9. : Protocole expérimental permettant la séparation des différentes catégories d'EPS

2. Dosages colorimétriques

2.1. Protéines

(Bradford 1976) ont développé une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu méthanolique acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. De nombreuses variantes ont été développées par la suite et on peut se procurer dans le commerce des trousse ("kits") de divers fabricants. Cette adsorption se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques (arg, his, et lys) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes). La liaison du colorant à une protéine provoque un déplacement du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm ; l'augmentation de l'absorption à 595 nm est analysée. Ce test est très reproductible et rapide, le processus de liaison du colorant est pratiquement achevé en environ 2 min et une bonne stabilité de la couleur est obtenue

pendant 1h. Cette technique permet donc d'effectuer un dosage colorimétrique conduisant à une estimation de la quantité totale de protéines dans un échantillon.

Les dosages de protéines ont été effectués en respect du protocole de la méthode choisie (Coo Protein Assay, Uptima) et permettant le choix de plusieurs gammes de sensibilité. Dans le cas présent, une sensibilité intermédiaire a été choisie (*Intermediate Sensitivity* ; 50-800 $\mu\text{g/mL}$ de protéines). Ainsi, une solution standard de BSA (2 mg/mL) a été préparée. Les échantillons à doser ont été dilués à une concentration égale à 2 mg/mL. Toutes les solutions ont été transférées en triplicat dans une microplaque 96 puits transparente et mélangées après ajout du réactif Coomassie®. Le remplissage de la microplaque est effectué selon les ratios suivants : volume standard-échantillon/réactif : 10/300 (en μL). Après 1 min de repos et 15s de mélange, les absorbances ont été mesurées à 595 nm (TECAN, Infini 200 Pro).

2.2. Sucres

Les concentrations en glucides totaux ont été estimées selon la méthode de Dubois et al. 1956. Le principe de cette méthode met en jeu l'acide sulfurique concentré qui provoque à chaud plusieurs déshydratations à partir des oses. Cette réaction entraîne la formation d'un hydroxyméthylfurfural (HMF) pour les hexoses et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces dérivés de type furfural réagissent dans un second temps avec le phénol entraînant la formation d'un complexe orangé (Figure II.10). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en oses. Celle-ci est donnée grâce à la densité optique mesurée à 490 nm.

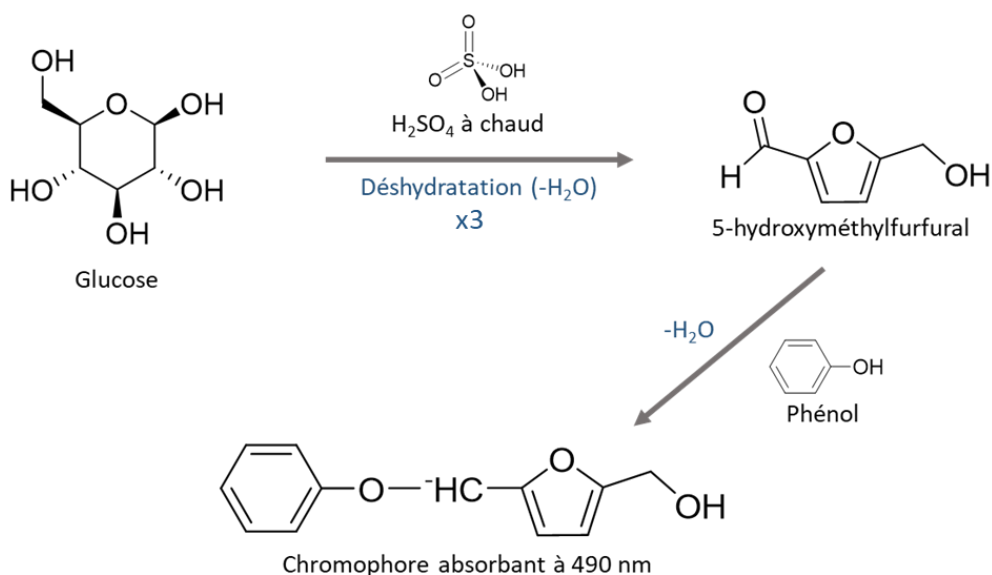


Figure II.10. : Schéma des réactions impliquées lors du dosage colorimétrique des sucres par la méthode de Dubois

A partir d'une solution-mère standard de glucose (3 mg/mL), six solutions de concentration allant de 0 à 150 $\mu\text{g/mL}$ ont été préparées pour la réalisation d'une courbe d'étalonnage. Les échantillons à doser ont été dilués à une concentration de 1 mg/mL. Dans des tubes à hémolyse, les solutions standards et les échantillons ont été mélangés aux réactifs : 200 μL de solution de phénol (5%) et 1 mL d'acide sulfurique (95%). Après 10 min, les solutions ont été mélangées et une coloration orange est apparue après 30 min. Toutes les solutions ont été transférées en triplicat dans une microplaque 96 puits transparente (200 μL /puits) et les absorbances ont été mesurées à 490 nm (TECAN, Infini 200 Pro).

2.3. Acides uroniques

Les concentrations en acides uroniques ont été déterminées selon la méthode au MHDP (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973). Dans ce dosage, la première réaction entre les acides uroniques et l'acide sulfurique entraîne une déshydratation et la formation de dérivés d'acide 5-formylfuroïque. La deuxième étape correspond à la réaction entre les dérivés d'acide 5-formylfuroïque et le MHDP formant un chromophore absorbant à 520 nm (Figure II.11.).

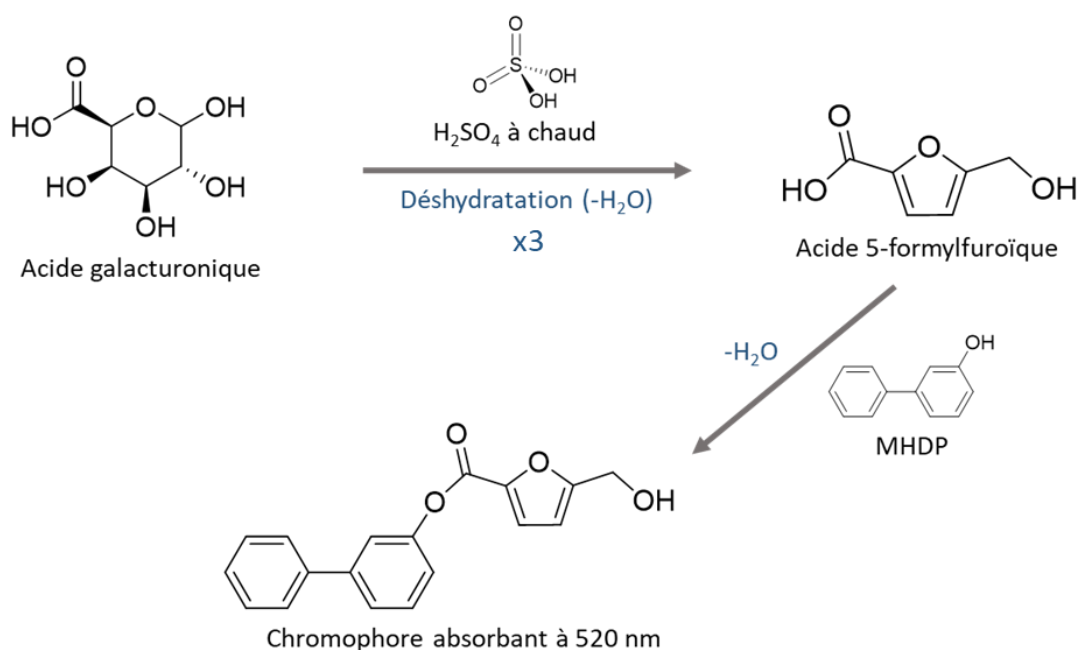


Figure II.11. : Schéma des réactions impliquées lors du dosage colorimétrique des acides uroniques

A partir d'une solution-mère d'acide glucuronique (1 mg/mL), six solutions de concentration allant de 0 à 200 $\mu\text{g/mL}$ ont été préparées afin d'obtenir une courbe d'étalonnage. Les

échantillons à doser ont été dilués à une concentration de 2 mg/mL. Les solutions standards et les échantillons ont été ensuite mélangés à 1,2 mL d'une solution de tétraborate de sodium (12,5 mM) dans de l'acide sulfurique (95%). Les tubes ont été agités (vortex), puis placés au bain marie à 90°C (Fisher Scientific, Polystat 36) pendant 10 min. Après refroidissement des tubes dans un bain de glace, 20 μ L d'une solution constituée de 0,15% de MHDP dans du NaOH (0,5%) ont été ajoutés dans chaque tube. Après agitation (vortex), toutes les solutions ont été transférées en triplicat dans une microplaque 96 puits transparente (200 μ L/puits) et les absorbances ont été mesurées à 520 nm.

CHAPITRE III

Couplage d'une approche phytochimique classique et d'une approche par réseau moléculaire basée sur la LC/MS pour l'annotation approfondie du métabolome d'organismes non modèles. L'étude de cas de l'algue brune *Taonia atomaria*.



A. Avant-propos

Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms - The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*

Nathan Carriot, Benoît Paix, Stéphane Greff, Bruno Viguier, Jean-François Briand, Gérald Culioli

Article 1 : Publié dans **Talanta** le 04/12/2020

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121925>

Contexte de l'étude :

Dans le milieu marin, toute surface immergée est rapidement colonisée par des bactéries, ainsi que par d'autres micro-organismes, formant des structures tridimensionnelles appelées biofilms. L'algue cosmopolite *Taonia atomaria* est un modèle biologique relativement peu colonisé et dont certains métabolites de surface présentent une activité anti-adhésion vis-à-vis de bactéries marines (Othmani, Briand, et al. 2016). Dans le but de développer (via des approches par métabolomique) des travaux en écologie chimique visant à mieux comprendre les mécanismes de défense chimique de cette algue, une annotation exhaustive de sa production métabolique est essentielle.

Méthodologie appliquée :

L'enjeu majeur de ce chapitre concerne l'annotation large du métabolome d'un organisme modèle via deux approches différentes, l'une basée sur des travaux classiques de chimie de substances naturelles et l'autre sur une approche plus novatrice faisant appel à la construction de réseaux moléculaires. La première mettant en avant le fractionnement de l'extrait brut (chromatographie flash), la purification des composés (HPLC) et la caractérisation structurale (RMN 1D et 2D). L'approche par réseau moléculaire a été utilisée en deuxième approche pour l'annotation du métabolome. Cette approche récente a été optimisée dans cette étude avec l'utilisation de réseaux plus ou moins contraints. La variation de certains paramètres dans la construction du réseau va permettre de développer un workflow optimal permettant l'annotation la plus globale possible du métabolome d'un organisme non-modèle.

Question scientifique :

Ce travail repose avant tout sur le développement méthodologique par le couplage de deux approches pour la caractérisation du métabolome de la macro-algue brune *T. Atomaria*. Les questions globales de cette partie peuvent être : Quelle est la composition élargie du métabolome de *T. Atomaria* ? Quels sont les différents types de molécules présentes au sein de cet organisme ?

Pour aller plus loin, l'annotation approfondie de cet ensemble de molécules a été profitable à un autre projet validé par la publication « *A Multi-Omics Analysis Suggests Links Between the Differentiated Surface Metabolome and Epiphytic Microbiota Along the Thallus of a Mediterranean Seaweed Holobiont* » (Benoît Paix, Nathan Carriot, Raphaëlle Barry-Martinet, Stéphane Greff, Benjamin Misson, Jean-François Briand et Gérald Culioli) (Paix et al. 2020). La connaissance du métabolome spécifique de cette algue a aidé à répondre à la question : Dans quelles mesures les variations intra-thalle des métabolites de surface des algues peuvent façonner les communautés bactériennes épiphyte de *T. atomaria* ?

Résumé des résultats :

Dans le cas de *T. atomaria*, la construction initiale d'un réseau simplifié a conduit à l'identification de plusieurs dizaines de métabolites répertoriés dans 14 familles chimiques, dont certaines étaient constituées de dérivés lipidiques originaux. Deux de ces familles rassemblent des molécules comportant une chaîne terpénique liée à une unité glycérol et ont été identifiées comme étant des monoacylgéranylgéranylglycérols et des di- et monoacylfarnésylglycérols. Une autre famille de molécules décrites dans cette étude, à savoir les acides monoacylglycérylfulvelliens, n'avaient été décrites à ce jour que chez l'algue brune *Sargassum fulvellum*.

La construction de réseaux plus complexes a permis d'approfondir l'annotation globale du métabolome de *T. atomaria*. En effet, au terme de cette étude, plus de 200 métabolites ont finalement pu être putativement identifiés. Cette première annotation détaillée permettra ensuite de mieux comprendre, à l'aide d'études métabolomiques, les mécanismes de défense chimique et d'adaptation métabolique de *T. atomaria* vis-à-vis des microorganismes qui colonisent sa surface.

B. Article : Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms - The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*

Talanta 225 (2021) 121925



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta



Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms - The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*

Nathan Carriot^{a,1}, Benoît Paix^{a,1}, Stéphane Greff^b, Bruno Viguière^a, Jean-François Briand^a, Gérald Culioli^{a,*}

^a Université de Toulon, MAPIEM, Toulon, EA 4323, France

^b Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et Continentale (IMBE), Station Marine d'Endoume, Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Molecular networking
Metabolomics
Lipidomics
UHPLC-MS/MS
Macroalga
Taonia atomaria

ABSTRACT

Untargeted LC-MS based metabolomics is a useful approach in many research areas such as medicine, systems biology, environmental sciences or even ecology. In such an approach, annotation of metabolomes of non-model organisms remains a significant challenge. In this study, an analytical workflow combining a classical phytochemical approach, using the isolation and the full characterization of the chemical structure of natural products, together with the use of MS/MS-based molecular networking with various levels of restrictiveness was developed. This protocol was applied to the marine brown seaweed *Taonia atomaria*, a cosmopolitan algal species, and allowed to annotate more than 200 metabolites. First, the algal organic crude extracts were fractionated by flash-chromatography and the chemical structure of eight of the main chemical constituents of this alga were fully characterized by means of spectroscopic methods (1D and 2D NMR, HRMS). These compounds were further used as chemical standards. In a second step, the main fractions of the algal extracts were analyzed by UHPLC-MS/MS and the resulting data were uploaded to the Global Natural Products Social Molecular Networking platform (GNPS) to create several molecular networks (MNs). A first MN (MN-1) was built with restrictive parameters and allowed the creation of clusters composed by nodes with highly similar MS/MS spectra. Then, using database hits and chemical standards as "seed" nodes and/or similarity between MS/MS fragmentation pattern, the main clusters were easily annotated as common glycerolipids and phospholipids, much rare lipids -such as acylglycerylhydroxymethyl-N,N,N-trimethyl-β-alanines or fulvellic acid derivatives- but also new glycerolipids bearing a terpene moiety. Lastly, the use of less and less constrained MNs allowed to further increase the number of annotated metabolites.

1. Abstract

Untargeted LC-MS based metabolomics is a useful approach in many research areas such as medicine, systems biology, environmental sciences or even ecology. In such an approach, annotation of metabolomes of non-model organisms remains a significant challenge. In this study, an analytical workflow combining a classical phytochemical approach, using the isolation and the full characterization of the chemical structure of natural products, together with the use of MS/MS-based molecular networking with various levels of restrictiveness was developed. This protocol was applied to the marine brown seaweed *Taonia atomaria*, a cosmopolitan algal species, and allowed to annotate more than 200 metabolites. First, the algal organic crude extracts were fractionated by flash-chromatography and the chemical structure of eight of the main chemical constituents of this alga were fully characterized by means of spectroscopic methods (1D and 2D NMR, HRMS). These compounds were further used as chemical standards. In a second step, the main fractions of the algal extracts were analyzed by UHPLC-MS/MS and the resulting data were uploaded to the Global Natural Products Social Molecular Networking platform (GNPS) to create several molecular networks (MNs). A first MN (**MN-1**) was built with restrictive parameters and allowed the creation of clusters composed by nodes with highly similar MS/MS spectra. Then, using database hits and chemical standards as “seed” nodes and/or similarity between MS/MS fragmentation pattern, the main clusters were easily annotated as common glycerolipids and phospholipids, much rare lipids -such as acylglycerylhydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanines or fulvellic acid derivatives- but also new glycerolipids bearing a terpene moiety. Lastly, the use of less and less constrained MNs allowed to further increase the number of annotated metabolites.

2. Introduction

Marine chemical ecology is a field of research that aims to address the role of chemicals in marine ecosystems. Indeed, molecules expressed by marine organisms have preponderant ecological functions, e.g. foraging, defense or reproduction (Hay 2009). There is a growing interest in this field of study because it benefits from many recent technical advances including those of environmental metabolomics (Kuhlish and Pohnert 2015).

Metabolomics is the latest in the so-called “omics” sciences that brings together genomics, transcriptomics and proteomics (Tautenhahn, Cho, et al. 2012). Ultimately, in such a research area the aim is to decipher the metabolome, which represents the whole set of low-molecular-weight organic compounds present in an organism or more generally in a biological sample, and to evaluate and interpret its variations (Oliver et al. 1998). The metabolome is constituted by all quantifiable metabolites and appears to be highly complementary with other “omics” sciences for a global systems biology approach (Dittami et al. 2014; Monte et al. 2014; Patti, Tautenhahn, et al. 2012).

Untargeted LC-MS-based metabolomic studies are currently the most common ones but metabolite identification is generally the limiting factor when interpreting the resulting data (Chaleckis et al. 2019). Indeed, the diversity of the metabolism is vast in nature and metabolites implied in the discrimination between sample groups often remain unidentified (Vaniya and Fiehn 2015). With an estimation of less than 2% of mass spectra which can be annotated from untargeted studies, the characterization of the chemical structures is the most challenging step of the metabolomic workflow (da Silva et al. 2015). Knowing that each LC-MS analysis generates a large number of spectra (Kind et al. 2012; Scheubert et al. 2017), spectral identification of each compound, one by one, using classical dereplication tools with reference databases (DBs) such as NCBI, Metlin, NIST or MassBank, is a too time-consuming approach. For the past few years, MS/MS molecular networking (MN) has been proposed as a new emerging tool to optimize this dereplication process (J. Y. Yang et al. 2013). Based on the idea that MS/MS fragmentation patterns are similar for molecules sharing close chemical structures, the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) Web-platform (<http://gnps.ucsd.edu>) allows to generate MNs where compounds are linked according to their molecular relatedness (Aron et al. 2020; Nothias et al. 2018; Wang et al. 2016a). The resulting MNs show then diverse clusters composed by several m/z features (defined as “nodes”)

characterized by their MS/MS data. The clusters generated in a MN could then gather metabolites belonging to a same chemical family or sharing closely related chemical structures.

In this study, the use in a first step of a restricted MN will allow to gather compounds having very similar chemical structures in order to facilitate their annotation. Indeed, to unlock clusters and to putatively identify all nodes of a cluster, two situations are expected: (i) if a compound is identified, all nodes of a cluster could be annotated using mass differences from this “seed node” (Duncan et al. 2015; Grim et al. 2019; Ramos et al. 2019), (ii) if all compounds remain unidentified, the annotation can be done by determining the common structural characteristics of the nodes thanks to the comparison of their MS/MS spectra. The enlargement of the MN is then considered in order to continue the annotation of the metabolome by using less restrictive parameters for the connection between nodes.

The selected model in this study was *Taonia atomaria*, a brown alga commonly reported along the Mediterranean and North-Eastern Atlantic coasts. To date, several types of chemical compounds, mainly sesquiterpenes (De Rosa et al. 1994; Jerković et al. 2019; Othmani, Briand, et al. 2016; Othmani, Bunet, et al. 2016; Tringali et al. 1995), meroditerpenes (Abatis et al. 2005; González et al. 1973, 1974; Pellegrini et al. 1997; Tziveleka et al. 2005) and geranylgeranylglycerol (GGG) (Tringali et al. 1995), have been characterized from the genus *Taonia* by natural products chemistry. Because of its morphology and distribution, this algal species represents a model of choice for studies in chemical ecology, and more particularly for those dealing with interactions between algae and their associated microbiota. For this reason and in order to carry out metabolomic analyses, the metabolome of this alga needs to be better characterized.

In this context, the aim of the present study was to develop an optimal workflow dedicated to the annotation of a largely unexplored metabolome of a non-model species, namely *T. atomaria*. The proposed workflow was based on three successive steps: (i) a classical phytochemical approach permitting to isolate chemical standards which can then be used as seed nodes, initiating a “in-house” MS/MS DB; (ii) a GNPS networking approach with high restrictiveness allowing only the most structurally-related metabolites to cluster together and to enrich the DB, and (iii) a GNPS networking approach with less restrictive parameters allowing to gather other related metabolites in order to complete the DB.

The present approach is expected to significantly extend our knowledge on algal metabolomes through the MS/MS fragmentation pattern of lipid families presumed to be new and at the same time to propose new solutions for the annotation of the metabolome of little-studied species.

3. Experimental

The metabolome of *T. atomaria* was investigated through an original workflow (Figure III.1.) including the analysis of its main chemical constituents by natural products chemistry and the building of several less and less restricted MNs coupled to DB queries and MS/MS data analysis.

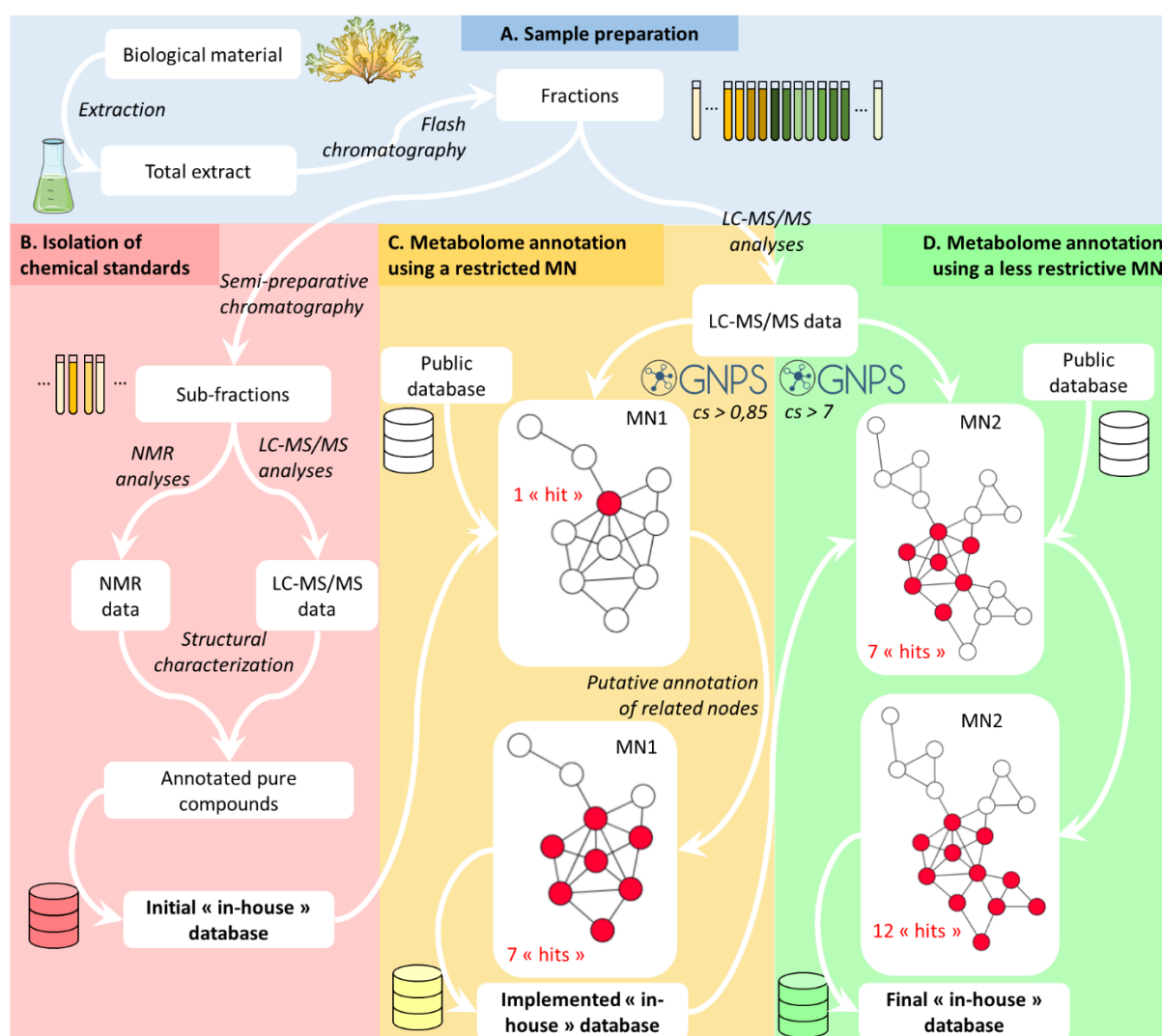


Figure III.1. : Analytical workflow used in this study

3.1. Chemicals

Methanol (MeOH) and dichloromethane (CH₂Cl₂) used for the extraction of the algal material were of analytical grade. MeOH, CH₂Cl₂ and acetonitrile (ACN) used for Flash-chromatography and semi-preparative HPLC experiments were of HPLC grade. ACN and MeOH used for UHPLC-MS experiments were of LC-MS grade. All these solvents were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Milli-Q water was generated by a Millipore ultrapure water system (Waters-Millipore Corporation, Milford, MA, USA). Formic acid of LC-MS grade (99%) used for UHPLC analysis and deuterated chloroform and methanol (99.8%; CDCl₃ and CD₃OD, respectively) used for NMR experiments were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

3.2. Algal material

Thalli of the brown alga *Taonia atomaria* (Woodward) J. Agardh (family Dictyotaceae, class Phaeophyceae, phylum Ochrophyta) were collected by hand (0.5 m depth) on the south eastern French Mediterranean coast (Tamaris; N 43°5' 35.56, E 5°54' 31.81) in February 2017. Algal samples were placed in plastic bags filled with surrounding seawater and transported within an hour to the laboratory in a cool box maintaining the seawater temperature.

3.3. Isolation of chemical standards from *T. atomaria*

3.3.1. Extraction of the algal material and fractionation of the crude extracts by flash-chromatography

The collected algal samples were air-dried for 48h in the dark at room temperature (22 ± 3 °C), crushed and weighed. The dried algae (140g) were extracted using a mixture of MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, v/v; 3 × 500 mL). The extracts were combined, filtered (filter paper), concentrated *in vacuo*, and weighted (25g; extraction yield: 17.9%, w/w).

A part of the resulting crude extracts (4.7g) was submitted to fractionation by flash chromatography (Spot Flash system; Armen Instruments, Saint Ave, France) on a reversed-phase column (SuperVarioFlash D40-RP18 model, 40–63 µm, 84g; Merck, Darmstadt, Germany). For fractionation, the extracts were dissolved in 25 mL MeOH and mixed with 15g of reversed-phase silica gel (Septra C18e, 50 µm; Phenomenex, Le Pecq, France), dried under reduced pressure and loaded on a guard column on the top of the column. The fractionation was

monitored by UV detection at 205 nm. For the flow rate, a linear ramp was used from 2 to 32 mL/min during 2 min and then this final flow rate was maintained throughout the entire experiment. The separation process was carried out using a ternary eluent system: H₂O (solvent A), MeOH (solvent B) and CH₂Cl₂ (solvent C). After an initial isocratic step with 90% of A and 10% of B from 0 to 3 min, a linear gradient up to 100% of B from 3 to 13 min, an isocratic step with 100% of B from 13 to 18 min, and a linear gradient up to 100% of C from 18 to 29 min, an isocratic step with 100% of C was finally used from 29 to 40 min. This process led to 39 fractions which were dried *in vacuo*, weighted and stored at - 20 °C (more details are given in Supporting Information, Tableau S.III.1.).

3.3.2. Purification and structural characterization of chemical standards from *T. atomaria*

For sixteen of the 39 fractions obtained by flash chromatography, selected according to available quantities, an aliquot (5–10 mg) was solubilized in the appropriate deuterated solvent (CDCl₃ or CD₃OD) and analyzed by ¹H NMR (400 MHz Avance NMR; Bruker BioSpin, Wissembourg, France) at room temperature. Six fractions were selected based on the available quantities (*m* > 150 mg) and the presence of NMR signals due to algal compounds other than common fatty acid derivatives. These fractions were then fractionated using a semi-preparative HPLC system (Prostar 210; Varian) equipped with a refractive index detector (Varian Prostar Model 350 RI) and a 50 µL injection loop. Purifications were done by iterative injections using various isocratic eluent conditions (mixtures of H₂O/ACN) at a flow rate of 3 mL/min on a reversed-phase C18 semi-preparative column (Purospher Star RP-18e, 5 µm, 10 × 250 mm; Merck) maintained at room temperature. This purification step yielded sub-fractions which were checked by ¹H NMR and allowed the obtention of eight pure compounds.

The chemical structure of these pure compounds was determined through extensive 1D and 2D-NMR analysis (¹³C, DEPT experiments, ¹H–¹H COSY, ¹H–¹H NOESY, HSQC and HMBC) and by comparison with data previously reported in the literature. The chemical shifts of the different spectra were fixed with respect to the residual signals of the solvent used: δ_{H} 7.26 and δ_{C} 77.16 for CDCl₃ and δ_{H} 3.31 and δ_{C} 49.00 for CD₃OD. All the purified compounds were analyzed by UHPLC-ESI-QToF-MS/MS and these data [accurate mass, fragmentation pattern and retention time (RT)] were implemented in our in-house DB.

3.4. Annotation of the metabolome of *T. atomaria* using molecular networking (MN)

3.4.1. UHPLC-ESI-QToF-MS/MS analyses

For this analysis, the sixteen fractions selected in Part 2.3.2. were solubilized in MeOH (5 mg/mL) and injected on a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation chromatographic system (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) coupled via an ESI interface to a QToF Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Champs-sur-Marne, France). Chromatographic separations were performed on an analytical core-shell reversed-phase column (150 × 2.1 mm, 1.7 μ m, Kinetex Phenyl- Hexyl; Phenomenex) with a flow rate fixed at 0.5 mL/min. The column was maintained at 40 °C, the injected sample volume was 5 μ L and the autosampler temperature was kept at 4 °C. An elution gradient involving a binary programming of acidified H₂O and ACN (0.1% of formic acid, v/v), was applied. The elution gradient started with 5% ACN and was kept for 2 min, then reached 100% ACN (linear ramp) in 8 min and was kept for 4 min; then came back to 5% ACN over 0.01 min and was maintained 1.99 min, for a total run time of 16 min (See Supporting information Figure S.III.1. for the chromatograms of these sixteen fractions).

The MS acquisition was performed in positive ionization and full scan range (m/z 50 to 1200 at a frequency of 2 Hz) modes. The following MS conditions were used: nebulizing gas (N₂) pressure: 0.4 bars, drying gas (N₂) flow: 4 L/min, drying temperature: 180 °C, capillary voltage: 4.5 kV. The mass spectrometer was calibrated with a solution of formate/acetate forming clusters at the beginning of the sequence run and the same solution was automatically injected before each sample for internal mass calibration. MS/MS acquisition experiments were conducted by collision induced dissociation (CID) on each sample. Three major precursor ions were used and, after the acquisition of three MS/MS spectra per precursor ion, the corresponding m/z value was excluded from the precursor ion selection for 1 min.

3.4.2. MS/MS molecular networking using GNPS

Raw UHPLC-MS/MS data were converted into “.mzXML” files using DataAnalysis software (version 4.3; Bruker Daltonics). The files corresponding to the sixteen fractions previously selected (See Part 2.3.2.) were grouped into six folders corresponding to six polarity ranges. The Global Natural Products Social Molecular Networking online workflow (GNPS; <http://gnps.ucsd.edu>) was used to create MNs of related compounds based on the similarity of their MS/MS fragmentation patterns [14]. Three MNs (MN-1 to MN-3, from the most to the

least restricted MN) were then generated using various values of “*Minimum cosine score (CS)*” (a similarity score between two MS/MS spectra allowing the creation of a link between them), “*Minimum matched fragment ions (MF)*” (the minimum number of common fragment ions that are shared by two MS/MS spectra in order to be connected by an edge in the MN) and “*Network TopK*” (the maximum number of neighbor nodes for a single node) (Tableau III.1.). Data from GNPS were imported into Cytoscape (version 3.7.0) using nodes to represent each spectrum (each m/z feature) and edges to represent the similarity of MS/MS fragmentation between two connected nodes (Wang et al. 2016a). A specific color was attributed to each node according to the chemical family of the annotated metabolite or to the corresponding RT. Width of edges connecting each node was proportional to the spectral similarity using CS as a default parameter.

Molecular network	Minimum cosine score	Minimum Matched fragment ions	Network TopK	Annotated metabolites	Number of Clusters with 5 or more nodes
MN-1	0.85	10	7	147	15
MN-2	0.80	8	7	198	19
MN-3	0.70	6	10	212	21

Tableau III.1. : Selected building parameters and results for the MNs constructed with the MS/MS data of fractions obtained from the crude extracts of the brown alga *Taonia atomaria*.

3.4.3. Metabolite annotation in the MNs

The strategy was to focus on clusters with the highest number of nodes. In such clusters, each node could be tentatively annotated by one or several of the following possibilities: (1) during the computational process dedicated to the construction of MNs on the GNPS platform, fragment similarity searches were performed in several public DBs (e.g. MassBank, HMDB, MoNA, Metlin...) for each m/z feature and the results were directly available into the MNs subsequently generated by Cytoscape, (2) MS data (accurate mass and fragmentation pattern) of a specific metabolite can also be compared with those found in other DBs (PubChem, ChemSpider...) using various tools (Tautenhahn, Patti, et al. 2012), (3) MS data and RT of the detected m/z features were compared with those of pure compounds isolated from *T. atomaria* (See Part 2.3.2.), and (4) in the case of absence of a hit in a DB, the MS data of all the nodes in

a same cluster were carefully analyzed to highlight specific common fragments or mass losses which could allow the identification of a specific chemical family in relation to the data available in the literature or through mass fragmentation pattern analysis.

In all these cases, once one m/z feature was annotated in a cluster, the main part of the corresponding cluster could be annotated from this seed node according to similarity of MS/MS spectra and to accurate masses differences between nodes.

4. Results and discussion

4.1. Isolation of chemical standards from *T. atomaria*: a “phytochemical approach”

Previous studies related to compounds isolated from extracts of the brown alga *T. atomaria* allowed the isolation and the structural characterization of GGG (Amico et al. 1977; Othmani, Briand, et al. 2016; Othmani, Bunet, et al. 2016; Tringali et al. 1995) and other terpenes (mainly germacrane and cadinane sesquiterpenoids) (Amico et al. 1977, 1979; De Rosa et al. 1994; Jerković et al. 2019; Othmani, Briand, et al. 2016; Othmani, Bunet, et al. 2016; Tringali et al. 1995).

In this study, after the fractionation by flash-chromatography of the crude extracts of *T. atomaria* and the purification by semi-preparative HPLC of the main chemical components from a selection of fractions, eight metabolites were characterized. Seven of these compounds were already described from *T. atomaria*: cadina-4(14),5-diene, cubebol, 4- *epi*-cubebol, (+)-gleenol, germacra-4(15),5,10(14)-trien-9-ol, (1*S*, 5*E*, 7*S*) 1-acetoxygermacra-4(15),5,10(14)-triene and geranylgeranylglycerol (De Rosa et al. 1994; Othmani, Briand, et al. 2016; Tringali et al. 1995) (Figure S.III.2.). An additional compound was identified as dictyol A, a diterpene previously reported from the Phaeophyceae *Dictyota dichotoma* (Fattorusso et al. 1976) but described here for the first time from *T. atomaria* (Figure S.III.3., Figure S.III.4., Figure S.III.5.). As *Dictyota* spp. are morphologically and taxonomically close to *T. atomaria* and in order to avoid a possible contamination of the crude extracts studied here, the presence of this compound was confirmed by LC-MS/MS on specific crude extracts obtained within a single thallus of *T. atomaria*.

The MS data and RT of these eight compounds allowed to initiate the elaboration of an in-house DB dedicated to this algal model.

4.2. Annotation of the metabolome of *T. atomaria* using a restricted MN (MN-1)

The building of a MN (named **MN-1**) with very restrictive parameters allowed to obtain a simplified MN keeping only strong similarities between nodes. Three parameters have been specifically optimized to have a more restricted MN: (i) the minimum CS which was fixed at 0.85 (default value: 0.7) for a higher similarity between the MS/MS spectra of two connected nodes, (ii) the minimum matched fragment ions (MF) was set at 10 (default value: 6) and (iii) the Network TopK value was 7 (default value: 10). Many studies using MNs for annotation of the metabolome of microorganisms use low values of CS and MF (Crüseman et al. 2017; Saurav et al. 2019) in order to increase the size of the clusters by inducing the clustering of less similar MS/MS spectra. This strategy allows to obtain a lot of links between nodes and less unbound nodes.

Our proposed strategy for annotation is completely opposite, the creation at first of a constrained network will give small clusters with highly correlated nodes which would allow an easier and faster determination of their characteristic MS/MS fragmentation patterns. The enlargement of the network, by using less restrictive parameters values, would connect some unbound nodes in clusters already annotated and should allow their quick annotation.

The building of a highly restricted MN (**MN-1**) showed the occurrence of ten main clusters named **1A** to **1J** which were carefully analyzed (Figure III.2.).

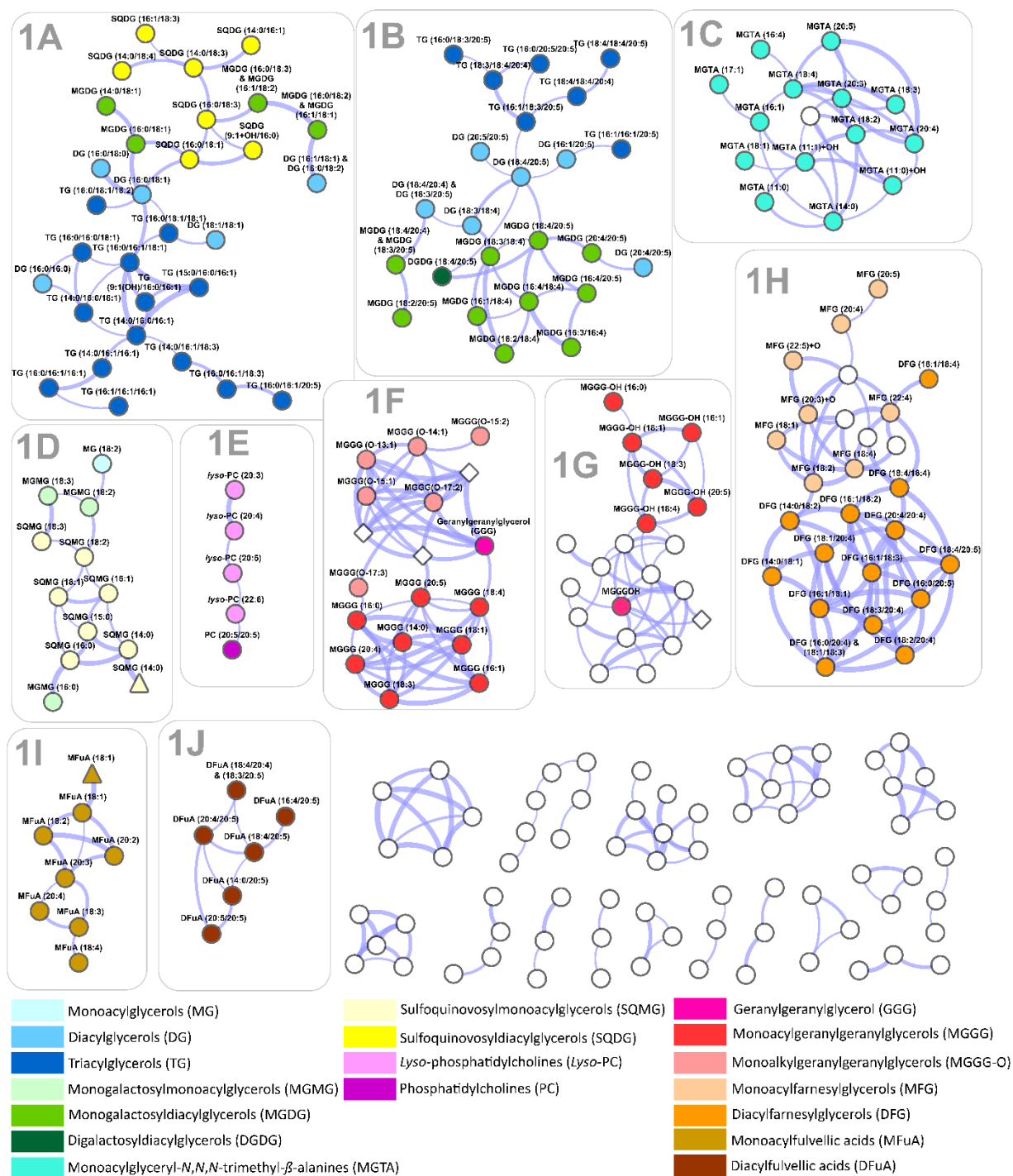


Figure III.2. : Restrained molecular network (MN-1) built with MS/MS data of fractions obtained from the crude extracts of the brown alga *Taonia atomaria*. Node colors were chosen according to the chemical classes (see color code below the network). Nodes with a diamond shape correspond to fragments ions while those with a triangle shape represent compounds with a distinct adduct from the rest of the cluster. Thickness of an edge between two nodes is proportional to the cosine score (CS, from 0.851 to 0.995). Only clusters with at least three nodes are represented. The whole network also includes 39 clusters of two nodes and 512 unbound nodes.

4.2.1. Annotation of known lipid classes: clusters **1A** to **1E**

During the building process of **MN-1**, the only m/z feature matching within a DB (MoNA) belonged to cluster **1A** and was identified as a triacylglycerol (TG). This node at m/z 794.7233 ($[C_{49}H_{96}NO_6]^+$) was annotated as TG (14:0/16:0/16:1) (See Supporting information for MS/MS data and fragmentation pattern, Figure S.III.6.) (Samburova et al. 2013). Just using mass differences from this seed node (Figure III.2.), thirteen other TGs were readily detected in the neighboring nodes and their annotation was confirmed after examination of their MS/MS data. RT constitutes an essential parameter when analyzing lipids. In reversed phase chromatography, retention increases with the number of carbon atoms and decreases with the number of unsaturations, in a homologous series. In that respect, a RT-based representation of **MN-1** (See supporting information, Figure S.III.7.) confirmed that these nodes belong to the same lipid family. Interestingly, several nodes connected to TGs in the same cluster showed a lower retention: a similar MS/MS fragmentation pattern and lower molecular masses were then used to easily annotated these nodes as diacylglycerols (DGs). It's noteworthy that a TG which was connected to other TGs or DGs always bore with these nodes two common acyl chains [e.g. TG (14:0/16:0/16:1) and TG (15:0/16:0/16:1), TG (16:0/16:0/18:1) and DG (16:0/16:0) or TG (16:0/18:1/18:2) and DG (16:0/18:1)]. In cluster **1A**, a detailed analysis of the MS data of the remaining non-annotated nodes allowed to gather them in two subgroups. Some of these nodes showed a characteristic neutral loss of 261 Da which is typical of the loss of the polar sulfoquinovosyl group from the ammoniated adduct of sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) [37]. Seven of these lipids were then identified in cluster **1A**, including the node at m/z 834.5396 ($[C_{43}H_{80}NO_{12}S]^+$) annotated as SQDG (16:0/18:3) (See Supporting information for MS/MS data and fragmentation pattern, Figure S.III.6.). MS data of nodes of the second subgroup were characterized by a neutral loss of m/z 197 which allowed to annotate them as monogalactosyldiacylglycerols (MGDGs) (Isaac et al. 2007; Popendorf et al. 2013). For example, the node at m/z 746.5770 ($[C_{41}H_{80}NO_{10}]^+$) was annotated as MGDG (14:0/18:1) (See Supporting information for MS/MS data and fragmentation pattern, Figure S.III.6.). Ultimately, all the nodes of cluster **1A** were annotated. The corresponding metabolites belonged to four lipid classes but the acyl chains of all these glycerolipids were mainly C16:0, C16:1 and C18:1. It can be noticed that MGDG (16:0/18:2) and MGDG (16:1/18:1) corresponded to the same single node on the network because of their identical m/z value and their similar RT and MS fragmentation pattern.

Interestingly, seven nodes with characteristic RT of TGs were observed in cluster **1B** (See supporting information, Figure S.III.8.) and the detailed analysis of their MS data confirmed their annotation. As reported for cluster **1A**, the same approach allowed to annotate the other nodes as DGs and MGDGs. However, the MS data of the node at m/z 976.5977 ($[C_{53}H_{86}NO_{15}]^+$) matched with none of the chemical families previously defined in this MN. This m/z feature was then annotated as a digalactosyldiacylglycerol, DGDG (18:4/20:5) (See Supporting information for MS/MS data and proposed fragmentation pattern, Figure S.III.8.) (Isaac et al. 2007; Popendorf et al. 2013). It could be pointed out that glycerolipids of cluster **1B** were composed by longer FAs (eg. C18:4, C20:4 and C20:5) than those found in metabolites of cluster **1A**.

A third cluster (**1C**) consisted of nodes showing a MS/MS fragment ion at m/z 236 ($[C_{10}H_{22}NO_5]^+$) which is typical of mono- and diacylglycerylhydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanines (MGTAAs and DGTAs) (Kind et al. 2012). This class of betaine lipids has already been observed in *T. atomaria* (Paix et al. 2019, 2020) and such glycerolipids can be differentiated from the very similar mono- and diacylglyceryl-*N,N,N*-trimethylhomoserines (MGTSs and DGTSSs) via the absence of a characteristic mass loss of m/z 87 (Roche and Leblond 2010). Fifteen MGTAAs were identified in cluster **1C** using the MGTA (14:0) at m/z 446.3481 ($[C_{24}H_{48}NO_6]^+$) as a seed node. (See Supporting information for MS/MS data and proposed fragmentation pattern, Figure S.III.9.).

A fourth cluster (**1D**) gathered nodes among which some showed a characteristic neutral loss of 261 Da on their MS/MS spectra. Based on the annotation previously carried out for the SQDGs and considering their MS and MS/MS data, the compounds of this cluster were annotated as sulfoquinovosylmonoacylglycerols (SQMGs). For example, the node at m/z 600.3411 ($[C_{27}H_{54}NO_{11}S]^+$) was thus annotated as SQMG (18:1) (See Supporting information for MS/MS data and proposed fragmentation pattern, Figure S.III.10.). Six other SQMGs were identified in cluster **1D** together with several structurally related lipids: three monogalactosylmonoacylglycerols (MGMGs) and a monoacylglycerol (MG). It can be noticed that in this restricted MN the SQMGs appeared in a separate cluster than the SQDGs (only found in cluster **1A**) showing that the fragment ions due to the acyl chains were in this context more important for the gathering than those of the sulfoquinovosyl part.

A further cluster (**1E**) was composed by five compounds showing in their MS/MS spectrum a characteristic fragment ion at m/z 184 of phosphatidylcholines (PCs) (Suárez-García et al.

2017). As an example, the node with m/z 542.3237 ($[C_{28}H_{49}NO_7P]^+$) was annotated as *lyso*-PC (20:5) (See Supporting information for MS/MS data and proposed fragmentation pattern, Figure S.III.11.). Thus, using further fragment ions, such as acylium ions, it was possible to identify the five other nodes as four *lyso*-PCs and a PC.

4.2.2. Putative annotation of new lipid classes: clusters 1F to 1J

4.2.2.1. Geranylgeranylglycerol derivatives (Clusters 1F and 1G)

Geranylgeranylglycerol (GGG), previously isolated using the “phytochemical approach”, was identified in cluster 1F using the experimental data (RT, MS and MS/MS data) obtained from the chemical standard. In this situation, this known metabolite served as a seed node to annotate the rest of this cluster as no other metabolites matched with a hit. Thanks to the MS fragmentation of the precursor adduct ion of GGG at m/z 382.3322 ($[C_{23}H_{44}NO_3]^+$, calc. m/z 382.3316, Δ -1.6 ppm; $[M + NH_4]^+$), many of the resulting fragment ions observed on the MS/MS spectrum of GGG were also found in the MS/MS spectra of the other compounds of this cluster (Figure III.3.). More particularly, the characteristic fragment ion at m/z 273.2577 ($[C_{20}H_{33}]^+$ corresponding to the geranylgeranyl (GG) moiety was observed for all nodes of the cluster 1F. After a detailed analysis of their MS/MS data, most of the nodes of this cluster have been putatively annotated as belonging to a new class of glycerolipids, monoradylgeranylgeranylglycerols (MGGGs), which could be divided in two main groups, namely monoacyl and monoalkyl derivatives of GGG. Eight monoacyl derivatives were then identified by first using the high similarity (CS = 0.90) between the MS/MS data of GGG and those of the node at m/z 640.5293 ($[C_{41}H_{70}NO_4]^+$, calc. m/z 640.5299, Δ 1.0 ppm; $[M + NH_4]^+$) (Fig. 3). For this particular node, in addition to the characteristic ion fragment of the GG moiety at m/z 273.2577 ($[C_{20}H_{33}]^+$, calc. m/z 273.2577, Δ -0.2 ppm), a fragment ion at m/z 351.2534 ($[C_{21}H_{35}O_4]^+$ calc. m/z 351.2530, Δ -1.1 ppm; $[M - GG + H]^+$) resulting from the loss of the GG part and an acylium ion at m/z 259.2056 ($[C_{18}H_{27}O]^+$, calc. m/z 259.2056, Δ 0.0 ppm) together with its dehydrated counterpart at m/z 241.1950 ($[C_{18}H_{25}]^+$, calc. m/z 241.1951, Δ 0.4 ppm) were also observed allowing its annotation as MGGG (18:4). Seven other nodes of the cluster with acyl chains varying from C16 to C20 with various unsaturations levels were then easily identified in the same way. In the same cluster, six other nodes showed molecular formulae lacking one oxygen atom which were inconsistent with a substitution of GGG by an acyl chain but in accordance with the occurrence of an ether-linked chain. For example, in addition to characteristic fragment ions of the GG chain, MGGG (O-17:2) was characterized by an adduct

ion at m/z 616.5652 ($[C_{40}H_{74}NO_3]^+$, calc. m/z 616.5663, Δ 1.9 ppm; $[M + NH_4]^+$), a fragment ion at m/z 327.2892 ($[C_{20}H_{39}O_3]^+$, calc. m/z 327.2894, Δ 0.4 ppm; $[M - GG + H]^+$) resulting of the loss of the GG moiety, and two fragment ions specific to the alkyl chain at m/z 252.2680 ($[C_{17}H_{34}N]^+$, calc. m/z 252.2686, Δ 2.3 ppm; $[C_{17}H_{30} + NH_4]^+$) and m/z 235.2418 ($[C_{17}H_{31}]^+$, calc. m/z 235.2420, Δ 1.2 ppm) (Fig. 3). Five other nodes with a similar fragmentation pattern were putatively annotated as monoalkyl derivatives of GGG in cluster **1F**.

Another cluster (**1G**) was composed of m/z features which showed a similar fragmentation pattern than those of cluster **1F**, the main differences in their MS/MS data being a greater number of oxygen atoms in their molecular formulae and a characteristic ion fragment at m/z 271.2419 ($[C_{20}H_{31}]^+$, calc. m/z 271.2419, Δ 0.6 ppm). An in-depth analysis of the MS/MS spectra of these nodes allowed to putatively annotate them as GGG derivatives bearing an oxidized GG side chain. More particularly, the node at m/z 398.3273 ($[C_{23}H_{44}NO_4]^+$, calc. m/z 398.3265, Δ -2.1 ppm; $[M + NH_4]^+$) was characterized using the fragment ions at m/z 289.2529 ($[C_{20}H_{33}O]^+$, calc. m/z 289.2529, Δ -1.1 ppm; $[M - \text{glycerol} + H]^+$) and m/z 271.2427 ($[C_{20}H_{31}]^+$, calc. m/z 271.2420, Δ -2.5 ppm; $[M - \text{glycerol} - H_2O + H]^+$) as an analog of GGG with one hydroxyl group on the GG chain (named here GGGOH). Through their characteristic MS/MS fragmentation pattern, six other nodes of cluster **1G** were easily identified as monoacyl derivatives of GGGOH. For example, among these derivatives MGGOH (18:4) was characterized through the adduct ion at m/z 656.5245 ($[C_{41}H_{70}NO_5]^+$, calc. m/z 656.5249, Δ 0.5 ppm; $[M + NH_4]^+$), the characteristic fragment ions at m/z 351.2527 ($[C_{21}H_{35}O_4]^+$, calc. m/z 351.2530, Δ 0.8 ppm; $[M - GGGOH + H]^+$) and m/z 289.2526 ($[C_{20}H_{33}O]^+$, calc. m/z 289.2526, Δ -0.0 ppm; $[M - \text{Glycerol} - C_{18:4} + H]^+$) and their respective dehydrated counterparts at m/z 333.2426 ($[C_{21}H_{33}O_3]^+$, calc. m/z 333.2424, Δ -0.4 ppm) and m/z 271.2419 ($[C_{20}H_{31}]^+$, calc. m/z 271.2424, Δ 0.6 ppm), and the acylium ion at m/z 259.2057 ($[C_{18}H_{27}O]^+$, calc. m/z 259.2056, Δ 0.4 ppm) (See Supporting information for MS/MS data and proposed fragmentation pattern, Figure S.III.12.).

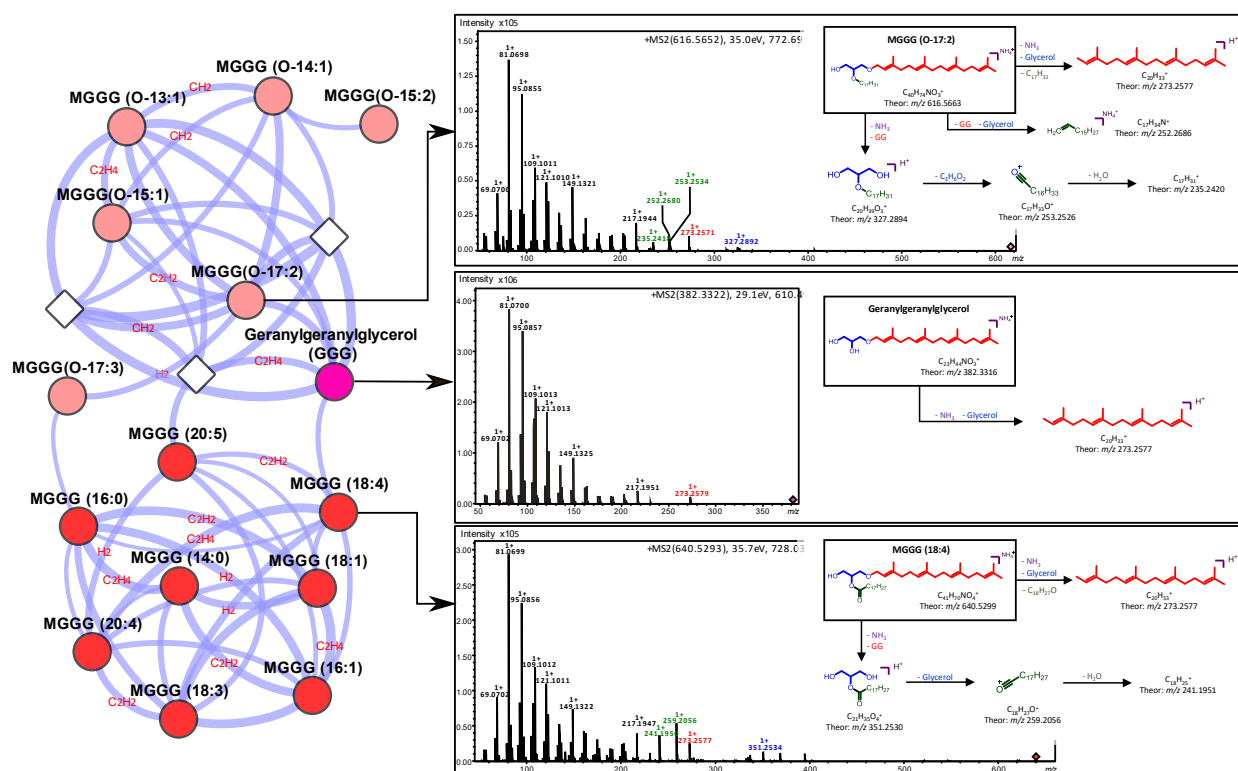


Figure III.3. : Annotation of geranylgeranylgeracyl (GGG) derivatives in cluster **1F** and proposed MS/MS fragmentation pattern for GGG, MGGG (18:4) and MGGG (O-17:2) (**Abbreviations:** MGGG: Monoradylgeranylgeranylgeracyl) (Circles: metabolites; Diamonds: fragments).

4.2.2.2. Farnesylglycerol derivatives (Cluster 1H)

Cluster (**1H**) was composed by nodes showing a characteristic ion fragment at m/z 205.1951 $[C_{15}H_{25}]^+$ which matched with the occurrence of a farnesyl (i.e. C₁₅-terpenoid) side chain. This putative assumption was strengthened by the strong similarity of the MS/MS fragmentation pattern of this ion with that of farnesol found in online DBs (e.g. Metlin).

A detailed analysis of the MS/MS data of the nodes of cluster **1H** allowed to putatively annotate them as mono- and diacyl derivatives of farnesylglycerol (MFGs and DFGs, respectively). For example, the node at m/z 578.5146 $[C_{36}H_{68}NO_4]^+$, calc. m/z 578.5143, Δ -0.5 ppm; $(M + NH_4)^+$ was characterized as MFG (18:1) through: (i) a fragment ion at m/z 357.3010 $[C_{21}H_{41}O_4]^+$, calc. m/z 357.2999, Δ -2.8 ppm, $[M - FG + H]^+$ resulting from the loss of the farnesyl part and the corresponding dehydrated ion at m/z 339.2891 $[C_{21}H_{39}O_3]^+$, calc. m/z 339.2894, Δ 0.9 ppm; $[M - FG - H_2O + H]^+$, (ii) the characteristic ion fragment of the farnesyl chain at m/z 205.1950 $[C_{15}H_{25}]^+$, calc. m/z 205.1951, Δ 0.6 ppm; $[M - Glycerol - C_{18:1} + H]^+$ and (iii) an acylium ion at m/z 283.2632 $[C_{18}H_{35}O_2]^+$, calc. m/z 283.2632, Δ 0.0 ppm) and its dehydrated counterpart at m/z 265.2529 $[C_{18}H_{33}O]^+$, calc.

m/z 265.2526, Δ -1.0 ppm) (See Supporting information for MS/MS data and proposed fragmentation pattern, Figure S.III.13.). A similar MS fragmentation was also observed for five other nodes while two other nodes showed the occurrence of oxygenated acyl chains.

In the same cluster, 14 other nodes showing higher molecular masses and retention times were annotated as DFGs. For example, DFG (18:1/16:1) was putatively identified on the basis of the adduct ion at m/z 814.7280 ($[C_{52}H_{96}NO_5]^+$, calc. m/z 814.7283, Δ 0.3 ppm; $[M + NH_4]^+$) and the characteristic fragment ions at m/z 575.5034 ($[C_{37}H_{67}O_4]^+$, calc. m/z 575.5034, Δ 0.0 ppm; $[M - FG - H_2O + H]^+$), m/z 339.2889 ($[C_{21}H_{39}O_3]^+$, calc. m/z 339.2894, Δ 1.4 ppm; $[M - FG - H_2O - C_{16:1} + H]^+$) and m/z 311.2579 ($[C_{19}H_{35}O_3]^+$, calc. m/z 311.2581, Δ 0.5 ppm; $[M - FG - H_2O - C_{18:1} + H]^+$) due to the respective losses of the farnesyl chain, a molecule of water and one acyl chain.

4.2.2.2. Farnesylglycerol derivatives (Cluster 1H)

Two other clusters (**1I** and **1J**) were composed by nodes which showed molecular formulae and MS/MS fragmentation pattern, more particularly the characteristic fragment ion at m/z 85.0284 $[C_4H_5O_2]^+$, corresponding to those of mono- and diacylglycerols substituted by a $C_4H_5O_2$ additional chemical group. These findings were in accordance with the chemical structure of fulvellic acid derivatives (i.e. acylglycerols bearing a methacrylic acid moiety) which have been previously described from Japanese samples of the brown alga *Sargassum fulvellum* (Kusumi et al. 1981). Thus, we proposed to putatively annotate these compounds as fulvellic acid derivatives even if the lack of MS/MS data in the literature did not allow their unambiguous characterization.

In more detail, the seven nodes of cluster **1I** were described as monoacyl fulvellic acid derivatives (MFuAs) based on their MS/MS fragmentation. For example, MFuA (20:4) was characterized through the adduct ion at m/z 480.3329 ($[C_{27}H_{46}NO_6]^+$, calc. m/z 480.3320, Δ -1.8 ppm; $[M + NH_4]^+$) and the following ion fragments found on its MS/MS spectrum such as: (i) the ion at m/z 445.2963 ($[C_{27}H_{41}O_5]^+$, calc. m/z 445.2949, Δ -3.2 ppm, $[M - H_2O + H]^+$) resulting of a loss of water, (ii) the ion at m/z 361.2746 ($[C_{23}H_{37}O_3]^+$, calc. m/z 361.2737, Δ -2.4 ppm; $[M - H_2O - C_4H_5O_2 + H]^+$) due to the subsequent loss of the methacrylic acid part, (iii) the acylium ion at m/z 287.2376 ($[C_{20}H_{31}O]^+$, calc. m/z 287.2369, Δ -2.4 ppm) and (iv) the characteristic fragment ion of the methacrylic acid moiety at m/z 85.0288 ($[C_4H_5O_2]^+$, calc. m/z 85.0284, Δ -4.6 ppm) (Figure III.4.).

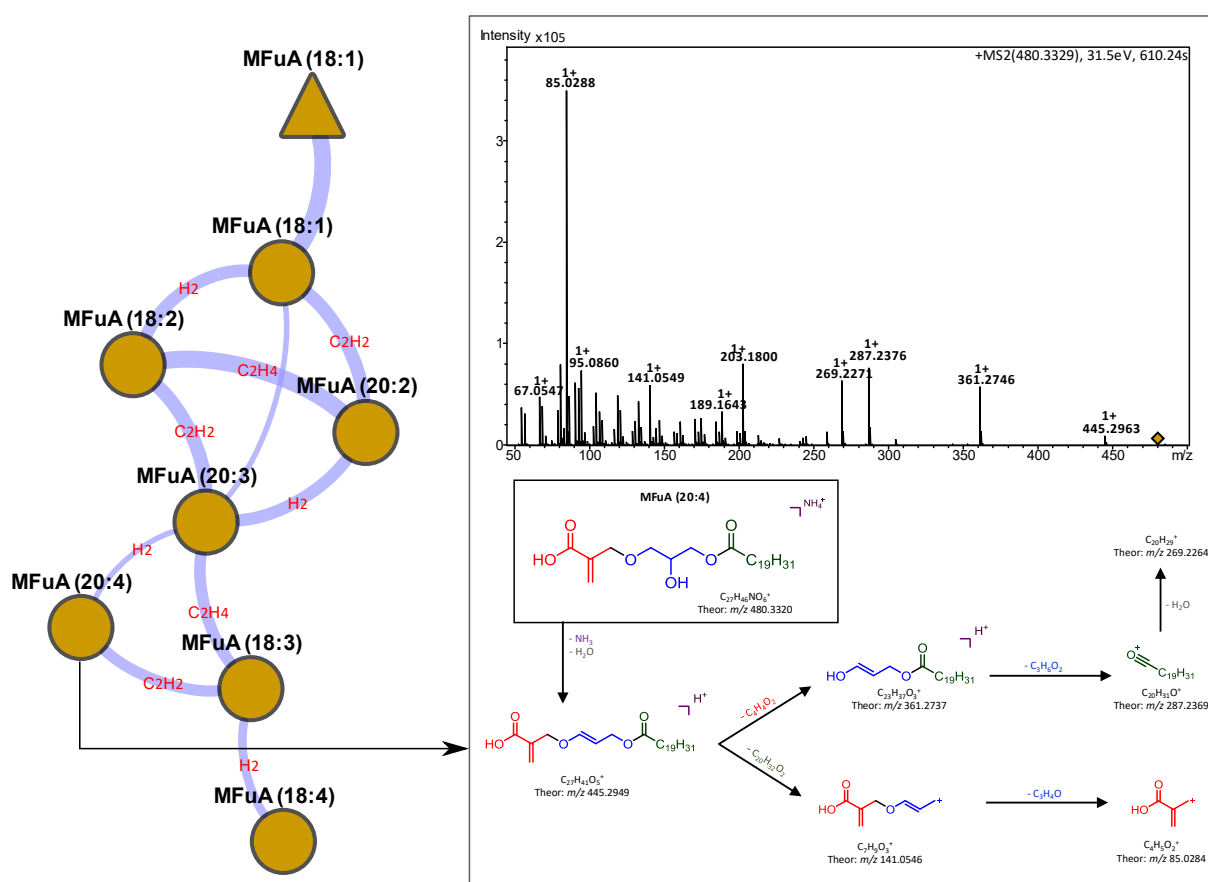


Figure III.4. : Annotation of cluster **1I** and proposed fragmentation pattern for the compound MFuA (20:4)
(Abbreviation: MFuA: Monoacylfulvellic acid) (Circles: metabolites; Triangles: adducts)

Concerning the six nodes of cluster **1J**, their RT, molecular formulae and MS/MS data were in accordance with their putative annotation as diacyl fulvellic acid derivatives (DFuAs). As an example, DFuA (20:4/20:5) was characterized on the basis of the adduct ion at m/z 764.5455 ($[C_{47}H_{74}NO_7]^+$, calc. m/z 764.5460, Δ 0.7 ppm; $[M + NH_4]^+$), the fragment ions characteristic of the presence of the fulvellic acid part at m/z 645.4867 ($[C_{43}H_{65}O_4]^+$, calc. m/z 645.4877, Δ 1.5 ppm, $[M - H_2O - C_4H_5O_2 + H]^+$) and at m/z 85.0282 ($[C_4H_5O_2]^+$, calc. m/z 85.0284, Δ 2.6 ppm), the fragment ions due to the loss of an acyl chain at m/z 445.2943 ($[C_{27}H_{41}O_5]^+$, calc. m/z 445.2949, Δ 1.1 ppm, $[M - H_2O - C_{20:5} + H]^+$) and m/z 443.2788 ($[C_{27}H_{39}O_5]^+$, calc. m/z 443.2792, Δ 0.9 ppm; $[M - H_2O - C_{20:4} + H]^+$), and the acylium ions at m/z 287.2368 ($[C_{20}H_{31}O]^+$, calc. m/z 287.2369, Δ 0.5 ppm) and m/z 285.2214 ($[C_{20}H_{29}O]^+$, calc. m/z 285.2213, Δ -0.2 ppm) (See Supporting information for MS/MS data and proposed fragmentation pattern, Figure S.III.14.).

4.2.2.3. Assessment of the annotation carried out using the restricted MN-1

This MN approach allowed to quickly identify chemically related compounds gathered in a same cluster because these metabolites showed common MS fragment ions and/or similar MS/MS fragmentation patterns. Indeed, as soon as a metabolite was annotated (seed node), the chances of annotating the whole cluster were very strong. In the case of **MN-1**, nearly 90% of the metabolites belonging to a cluster where a seed node has been identified were annotated. Nevertheless, it should be pointed out that to isobaric molecules [e.g. DG (16:1/18:1) & DG (16:0/18:2)] constituted one limitation of this type of approach as they are commonly detected in a same node.

Finally, the careful analysis of **MN-1** led to the annotation of 147 metabolites distributed in eighteen chemical classes (Figure III.2.). Even if the nodes belonging to the major clusters were annotated, certain compounds and/or clusters are still to be determined. Then, the use of less restricted MNs would allow to include them within a cluster where most of the nodes were already annotated, which could facilitate their identification.

4.3. Further annotation of the metabolome of *T. atomaria* using less restricted MNs (MN-2 and MN-3)

The previous MN (**MN-1**) was based on restrictive parameters that only permitted to highlight strong similarities between the MS/MS spectra of metabolites within a same cluster. In order to further enrich the chemical DB of *T. atomaria*, the metabolites previously identified by the phytochemical approach and the analysis of **MN-1** were incorporated into a less restricted MN (MN-2; See Supporting information , Fig. S15), and then an even less restricted (**MN-3**) network (Figure III.5.). Reducing this restriction allowed certain unbound metabolites (self-loop nodes) to be gathered in clusters containing known compounds. Their annotation became easier by highlighting fragment ions and MS/MS fragmentation pathways which were common with previously identified nodes.

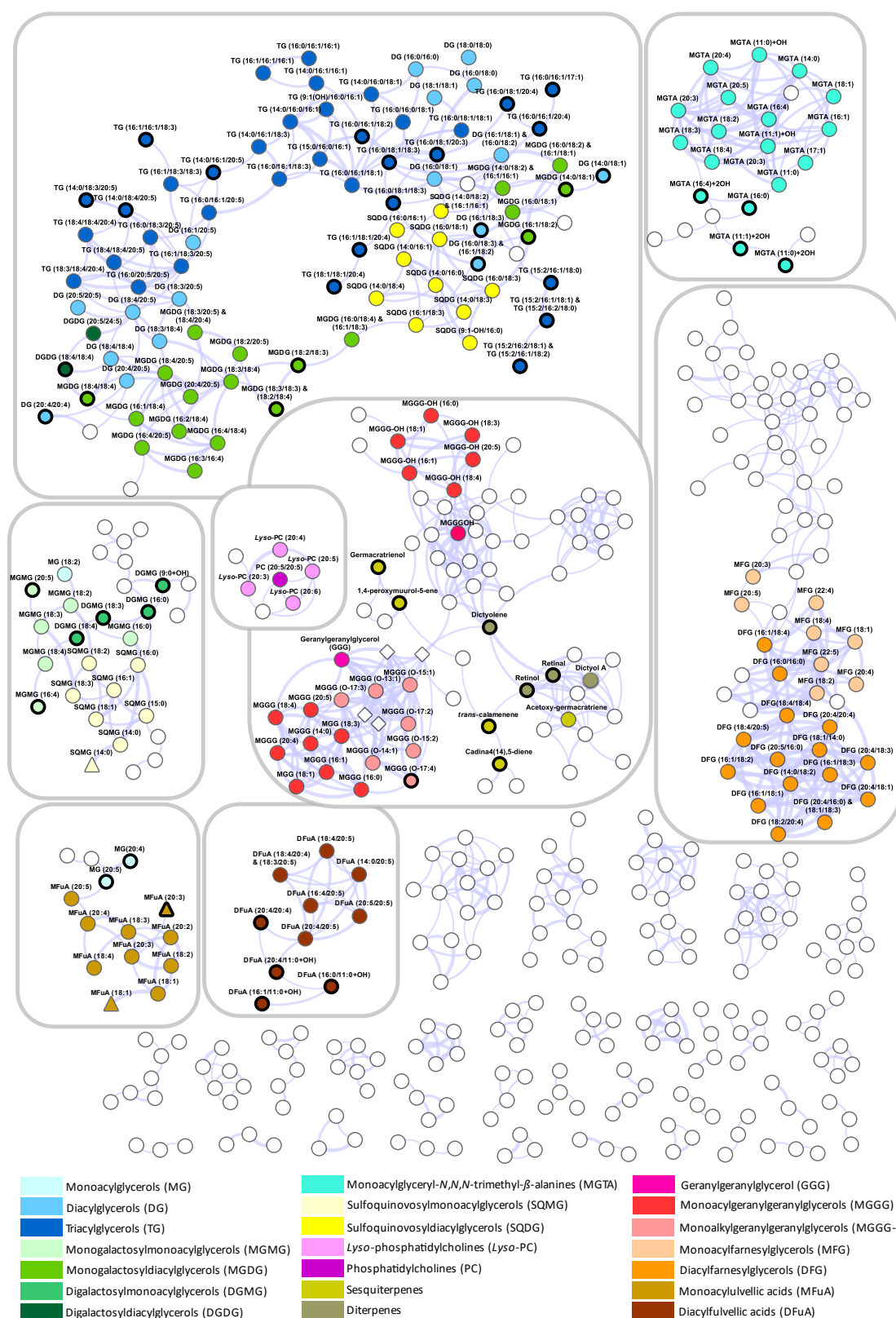


Figure III.5. : Less restricted MN (MN-3) built with MS/MS data of fractions obtained from the crude extracts of the brown alga *Taonia atomaria*

Node colors were chosen according to their chemical classes (see color code below the network). Nodes with a diamond shape correspond to fragments ions, while those with a triangle shape represent compounds with a distinct adduct from the rest of the cluster. Nodes with a thick border correspond to newly annotated compounds via the MN enlargement. Thickness of an edge between two nodes is proportional to the cosine score (CS, from 0.701 to 0.995). Only clusters with at least three nodes were represented. The whole network also includes 37 clusters of two nodes and 326 unbound nodes.

Moreover, the use of less restricted MNs allowed the gathering of nodes belonging to close chemical classes in a same cluster. Thus, MN enlargement with **MN-2** and **MN-3** brought together two clusters (**1A** and **1B**), which were separated in **MN-1**, in a single cluster (**2A-B** and **3A-B**, respectively) gathering several classes of structurally related lipids (DGs, TGs, MGDGs and SQDGs). In the same way, the two clusters **1F** and **1G** comprising various GGG derivatives grouped together (**3F-G**). Moreover, several terpenes, some of which have been identified in the phytochemical approach, namely dictyol A, (1*S*, 5*E*, 7*S*) 1-acetoxygermacra-4(15),5,10(14)-triene and germacra-4(15),5,10(14)-trien-9-ol, which appeared previously in **MN-1** as self-loop nodes, were found clustered with the MGGs in **MN-2** (cluster **2G**) and in **MN-3** (cluster **3F-G**). These clusters also allowed to confirm the annotation of other terpenes, such as retinol, retinal, and dictyolene identified through online DBs and *trans*-calamenene and 1,4-peroxymurol-5-ene already isolated by our group from this algal species and referenced in our in-house DB, which appeared as self-loop nodes in **MN-1**. This strategy made it possible to annotate 61 additional metabolites very easily and to further enrich the DB. Finally, a total of 212 metabolites (Tableau III.2.) were putatively identified within the metabolome of *T. atomaria* using the workflow described in this study.

Chemical family	Abbreviation	Color code	Characteristic ion fragment (Bold: most intense fragment ions)	Characteristic neutral mass loss	Other MS/MS fragmentation pattern	Annotated nodes (MN-1)	Annotated nodes (MN-1 to MN-3)
Monoacylglycerol	MG		–	–	[R-CO] ⁺	1	3
Diacylglycerol	DG		–	–	[M - FA] ⁺ , [R-CO] ⁺	13	20
Triacylglycerol	TG		–	–	[M - FA] ⁺ , [M - 2FA + OH] ⁺ , [R-CO] ⁺	21	38
Monogalactosylmonoacylglycerol	MGMG		–	<i>m/z</i> 197.0900 [-Gal; -NH ₃]	[R-CO] ⁺	3	6
Monogalactosyldiacylglycerol	MGDG		–	–	[M - Gal - FA] ⁺ , [R-CO] ⁺	17	25
Digalactosylmonoacylglycerol	DGMG		–	<i>m/z</i> 359.1428 [-2Gal; -H ₂ O; -NH ₃]	[R-CO] ⁺	0	4
Digalactosyldiacylglycerol	DGDG		–	<i>m/z</i> 341.1322 [-2Gal; -NH ₃]	[M - 2 Gal - FA] ⁺ , [M - 2 Gal - H ₂ O - FA] ⁺ , [R-CO] ⁺	1	2
Monoacylglycerolhydroxymethyl- <i>N,N,N</i> -trimethyl- β -alanine	MGTA		<i>m/z</i> 236.1493 [C ₁₀ H ₂₂ NO ₅] ⁺ <i>m/z</i> 218.1387 [C ₁₀ H ₂₀ NO ₄] ⁺ <i>m/z</i> 162.1125 [C ₇ H ₁₆ NO ₃] ⁺ <i>m/z</i> 144.1019 [C ₇ H ₁₄ NO ₂] ⁺ <i>m/z</i> 100.1121 [C ₆ H ₁₄ N] ⁺	<i>m/z</i> 161.1052 [-C ₇ H ₁₂ O ₃ ; -NH ₃]	–	14	19
Sulfoquinovosylmonoacylglycerol	SQMG		–	<i>m/z</i> 261.0519 [-C ₆ H ₁₂ O ₆ S; -NH ₃]	[R-CO] ⁺	7	7
Sulfoquinovosyldiacylglycerol	SQDG		–	<i>m/z</i> 243.0413 [-C ₆ H ₁₀ O ₇ S]	[M - C ₆ H ₁₂ O ₆ S - FA] ⁺ , [R-CO] ⁺	7	11
Lyso-Phosphatidylcholine	Lyso-PC		<i>m/z</i> 258.1101 [C ₆ H ₂₁ NO ₆ P] ⁺ <i>m/z</i> 184.0733 [C ₅ H ₁₄ NO ₄ P] ⁺ <i>m/z</i> 104.1070 [C ₄ H ₁₄ NO] ⁺ <i>m/z</i> 86.0964 [C ₃ H ₁₂ N] ⁺	<i>m/z</i> 183.0660 [-C ₅ H ₁₄ NO ₄ P]	–	4	4
Phosphatidylcholine	PC		–	–	–	1	1
Terpene (and GGG)	–		–	–	–	1	9
Monoacylgeranylgeranyl glycerol	MGGG		<i>m/z</i> 273.2577 [C ₂₀ H ₃₃] ⁺	<i>m/z</i> 289.2770 [-GGG; -NH ₃]	[R-CO] ⁺	8	8
Monoalkylgeranylgeranyl glycerol	MGGG (O)		–	–	–	6	7
Monoacylhydroxy-geranylgeranyl glycerol	MGGG-OH		<i>m/z</i> 289.2526 [C ₂₀ H ₃₃ O] ⁺ <i>m/z</i> 271.2420 [C ₂₀ H ₃₁] ⁺	<i>m/z</i> 323.2824 [-C ₂₀ H ₃₄ O ₂ ; -NH ₃]	[R-CO] ⁺	6	6
Monoacylfarnesyl glycerol	MFG		<i>m/z</i> 205.1951 [C ₁₅ H ₂₅] ⁺	<i>m/z</i> 239.2249 [-FG; -H ₂ O; -NH ₃]	[R-CO] ⁺	8	8
Diacylfarnesyl glycerol	DFG		–	<i>m/z</i> 221.2144 [-FG; -NH ₃]	[M - FG - FA] ⁺ , [R-CO] ⁺	15	15
Monoacylglycerylfulvellic acid	MFuA		<i>m/z</i> 141.0546 [C ₇ H ₉ O ₃] ⁺ <i>m/z</i> 85.0284 [C ₄ H ₅ O ₂] ⁺	<i>m/z</i> 119.0583 [-FuA; -H ₂ O; -NH ₃]	[R-CO] ⁺	7	8
Diacylglycerylfulvellic acid	DFuA		–	–	[M - FA] ⁺ , [R-CO] ⁺	7	11
Total:						147	212

Tableau III.2. : Summary of the annotation of the metabolome of the brown alga *Taonia atomaria*

4.4. Taxonomical and ecological significance of the annotated metabolites of *T. atomaria*.

In line with previous observations on *T. atomaria* from the French Mediterranean coasts (Othmani, Briand, et al. 2016; Othmani, Bunet, et al. 2016; Paix et al. 2019, 2020), no meroditerpenes were observed here either with the phytochemical approach or using MNs. In these previous studies and in the present one, the main isolated terpenes were GGG and sesquiterpenes with cadinane, germacrane or spiroaxane carbon skeletons. The same trend was also observed for specimens of *T. atomaria* collected in the Adriatic Sea (Croatia) (De Rosa et al. 1994; Jerković et al. 2019), or for samples of *Taonia pseudociliata* from the Gulf of Catania (Sicily, Italy) (previously identified as *Dilophus fasciola*, (Amico et al. 1977, 1979; Tringali et al. 1995)) and no meroditerpenes were reported either in these studies.

However, several meroditerpenes were identified in previous works focusing on algal species reported as *T. atomaria* from Canary Islands (e.g. taondiol and atomaric acid) (A. G. González et al. 1973, 1974), or from the Aegean Sea (e.g. taondiol, atomaric acid, sargaquinone, and atomarianones A and B) (Abatis et al. 2005; Nahas et al. 2007; Tziveleka et al. 2005). In these studies, which did not report any sesquiterpenes or GGG, such a chemical composition appeared to be strikingly close to those of *Stypopodium* species widely reported for their meroditerpenes production (Gerwick and Fenical 1981; Gil et al. 1995; Rovirosa et al. 1992; Sabry et al. 2005; Wessels et al. 1999). For instance, atomaric acid and taondiol have been previously isolated from *Stypopodium zonale* (Soares et al. 2003) while *epi*-taondiol and sargaquinone were described from *Stypopodium flabelliforme* (Areche et al. 2010). *Stypopodium* and *Taonia* are morphologically and phylogenetically close genera among the Dictyotaceae family (Paula et al. 2011) and, as already suggested (Soares et al. 2003), the hypothesis of a botanical misidentification of *Stypopodium* spp. samples as *T. atomaria* could be a plausible scenario to consider. However, more thorough chemotaxonomic studies are necessary to confirm this hypothesis and an integrative approach coupling morphological, phylogenetic and metabolomics analyses could provide the information needed to clarify this situation.

In an ecological point of view, sesquiterpenes and GGG produced by *T. atomaria* have demonstrated anti-adhesion activities against several epiphytes including diverse bacterial strains (Othmani, Briand, et al. 2016; Othmani, Bunet, et al. 2016) and barnacle larvae (Othmani, Bunet, et al. 2016), with gleenol and GGG showing the strongest activities. Through a specific extraction procedure developed for this seaweed (Othmani, Briand, et al. 2016), these

two compounds were also characterized as main components of the surface metabolome of *T. atomaria* (Othmani, Briand, et al. 2016; Othmani, Bunet, et al. 2016; Paix et al. 2019, 2020). These studies brought evidence that these chemical compounds may be implied in the regulation of the epibiosis at the algal surface. Sesquiterpenes have been noticed mainly in apical parts, where the meristem -which is composed of cells involved in the algal growth- is located. In line with the optimal defense theory which assumes that chemical resources are allocated within the organism to maximize the plant fitness (McKey 1979), these molecules, known as defense compounds, may allow to protect the merismatic cells against fouling organisms (Paix et al. 2020). The biosynthetic pathway and mechanisms allowing the expression of these compounds at the algal surface remain uncertain and not documented, implying the need to improve the annotation of its metabolome.

In this study, we also annotated two new lipid classes, GGG and FG derivatives, which are likely to play an important role in the biogenesis and storage of GGG and sesquiterpenes, respectively, since glycerides are generally known for their fundamental storage role. More precisely, GGG derivatives could act as a lipid form of storage for GGG; while mono- and di-FG, harboring a farnesyl chain, could be used by the alga as storage compounds for biosynthetic precursors of sesquiterpenes.

Concerning the fulvellic acid derivatives, their description remains uncertain because they have only been described from the Japanese alga *Sargassum fulvellum* (Kusumi et al. 1981), but their presence, in addition to those of all the other lipid families described here, shows that *T. atomaria*, and more broadly marine macroalgae, constitute an immeasurable source of still untapped lipid derivatives.

4.5. Taxonomical and ecological significance of the annotated metabolites of *T. atomaria*.

Several studies have already successfully combined phytochemical approaches and the building of MNs but the main part of them were implemented with purposes different from the one driving the present work. Thus, a first set of such studies has employed MNs as a dereplication tool, using in-house or online DBs fed with experimental or *in silico* MS/MS data, to focus isolation efforts on putatively new compounds (e.g. (Alcover et al. 2020; Ren et al. 2020)). A second set of studies using MNs has been implemented in order to target specific families of chemical compounds (e.g. (Ding et al. 2018; Y. Li et al. 2020)). Finally, a large third set of studies has described the use of MNs for the identification or the targeted isolation of bioactive

compounds (e.g. (Buedenbender et al. 2020; Olivon et al. 2017)). In our case, starting from a non-model species, the aim was to isolate the main chemical components of the extracts of *T. atomaria* and to use them, in combination with MNs, to annotate as much as possible the metabolome of this alga without any condition of novelty or bioactivity of the characterized metabolites.

The first particularity of the present study was to include a fractionation step of the crude extracts of *T. atomaria* and the subsequent MS/MS analysis of the resulting fractions in order to maximize the annotation of the metabolome of this alga. By way of comparison, it can be noted that most of the previous studies dealing with MNs have only analyzed crude extracts that can hamper the detection of numerous compounds, probably due to lower detection limits and competition between molecules during the ionization process.

The second particularity of the present analytical workflow consisted of the use of less and less restrictive parameters for the construction of more and more complex MNs. As most studies to date use the default set of values proposed on the GNPS platform (CS: 0.70; Minimum matched fragments ions: 6; Network TopK: 10), only a limited number of them have discussed the impact of such parameters on the structure of the MNs and on the annotation process. However, these parameters need to be appropriate for each analysis according to the expected results (Aron et al. 2020). Consistently, in several previous studies the use of default parameters gives complex MNs with large clusters composed by mostly unknown metabolites (e.g. (Millán-Aguíñaga et al. 2019; Purves et al. 2016)). In such cases, the use of less stringent conditions for the building of MNs could have allowed an easiest determination of common MS/MS fragmentation patterns between nodes, which composed the same cluster and thus could have led to a better annotation.

5. Conclusion

An efficient method dedicated to the annotation of the metabolome of a non-model organism, the brown alga *T. atomaria*, has been developed by coupling two types of approaches, one based on a classical study of the organic extracts of this alga by natural products chemistry and the other, more recent, highlighting the power of annotation of MNs built with fractions of these extracts. Following the elaboration of a first very restricted MN (i.e. implying a very high similarity between the MS/MS data of the metabolites within a same cluster), the annotation was carried out using either seed nodes (i.e. metabolite identified through the interrogation of online DBs or isolated standards during the phytochemical analysis of the alga) or by analyzing

the similarities and/or interpreting the MS/MS data of the nodes belonging to a same cluster. This first step allowed to annotate 147 compounds in the ten main clusters of the restricted MN (**MN-1**) and to putatively characterize two new lipid classes including a geranylgeranyl or a farnesyl part together with a rare class of acylglycerols bearing a methacrylic acid moiety (fulvellic acid derivatives). The implementation, in a second phase, of less constrained MNs allowed to enlarge the size of the clusters and to annotate 65 additional metabolites.

The use of such a method, which is simple to implement, could allow to broaden our knowledge of the metabolome of species, particularly marine ones, which are still little studied to date. This method could thus be an essential tool for the study of such organisms by environmental metabolomics.

6. Acknowledgments

This work was financially supported by the French “Sud Provence-Alpes-Côte d’Azur (Sud PACA)” regional council (PhD grant of Benoît Paix) and the MAPIEM laboratory of the University of Toulon (Master internship grant of Nathan Carriot). LC-MS experiments were conducted on the regional platform MALLABAR funded by the Institute of Ecology and Environment (INEE) of the French National Centre for Scientific Research (CNRS), the Total Foundation and the French Sud PACA regional council. The authors are grateful to François Audrezet and Damien Devilly (MAPIEM laboratory, University of Toulon, France) for their help during the isolation and the structural characterization of the chemical standards.

7. Data availability

Raw data for LC-ESI-(+)-MS/MS experiments were deposited and are publicly available in the MassIVE platform under the IDs MSV000082235.

8. Annexe Chapitre III

Supplementary information for

Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms - The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*

*Nathan Carriot^{a,1}, Benoît Paix^{a,1}, Stéphane Greff^b, Bruno Viguière^a, Jean-François Briand^a,
Gérald Culioli^{a,*}*

^a Université de Toulon, MAPIEM, EA 4323, Toulon, France

^b Aix Marseille Université, CNRS, IRD, Avignon Université, Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), Station marine d'Endoume, Marseille, France.

¹These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author.

E-mail addresses: culioli@univ-tln.fr and gerald.culioli@univ-avignon.fr (G. Culioli)

New affiliation: Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale, UMR CNRS-IRD, Avignon Université, Aix-Marseille Université, Avignon, France.

Detailed MS/MS fragmentation of a selection of nodes

Cluster 1A (See Figure S.III.6.)

- **Example of TG:** node at m/z 794.7233 ($[C_{49}H_{96}NO_6]^+$, calc. m/z 794.7232, Δ -0.1 ppm; $[M + NH_4]^+$)

This m/z feature was identified as TG (46:1) which ionized as a cationic adduct $[M + NH_4]^+$. The analysis of its MS/MS fragmentation pattern allowed its annotation as **TG (14:0/16:0/16:1)** since three groups of fragment ions were observed in the MS/MS spectrum of this compound: (i) diglyceride ions resulting of the loss of one fatty acid chain at m/z 549.4879 ($[C_{35}H_{65}O_4]^+$, calc. m/z 549.4877, Δ -0.3 ppm; $[M - C_{14:0} + H]^+$), m/z 523.4720 ($[C_{33}H_{63}O_4]^+$, calc. m/z 523.4721, Δ 0.3 ppm; $[M - C_{16:1} + H]^+$), and m/z 521.4567 ($[C_{33}H_{61}O_4]^+$, calc. m/z 521.4564, Δ -0.4 ppm; $[M - C_{16:0} + H]^+$), (ii) monoglyceride ions obtained after the loss of two fatty acids at m/z 313.2741 ($[C_{19}H_{37}O_3]^+$, calc. m/z 313.2737, Δ -1.1 ppm; $[M - C_{14:0} - C_{16:1} + H]^+$), m/z 311.2581 ($[C_{19}H_{35}O_3]^+$, calc. m/z 311.2581, Δ -0.1 ppm; $[M - C_{14:0} - C_{16:0} + H]^+$) and m/z 285.2429 ($[C_{17}H_{33}O_3]^+$, calc. m/z 285.2424, Δ -1.5 ppm; $[M - C_{16:0} - C_{16:1} + H]^+$), and (iii) acylium ions at m/z 239.2367 ($[C_{16}H_{31}O]^+$, calc. m/z 239.2369, Δ 1.2 ppm), m/z 237.2213 ($[C_{16}H_{29}O]^+$, calc. m/z 237.2213, Δ -0.1 ppm) and m/z 211.2053 ($[C_{14}H_{27}O]^+$, calc. m/z 211.2056, Δ 1.5 ppm).

- **Example of SQDG:** node at m/z 834.5396 ($[C_{43}H_{80}NO_{12}S]^+$, calc. m/z 834.5396, Δ 0.0 ppm; $[M + NH_4]^+$)

This m/z feature was annotated as **SQDG (16:0/18:3)**, which ionized as a cationic adduct $[M + NH_4]^+$, using: (i) fragment ions at m/z 573.4883 ($[C_{37}H_{65}O_4]^+$, calc. m/z 573.4877, Δ -1.0 ppm; $[M - C_6H_9O_7S - H_2O + H]^+$) and m/z 591.4988 ($[C_{37}H_{67}O_5]^+$, calc. m/z 591.4983, Δ -0.2 ppm; $[M - C_6H_9O_7S + H]^+$) caused by the detachment of the polar head and generating neutral losses of m/z 261 and 243 Da from the adduct ion, respectively, and (ii) two other fragment ions at m/z 335.2582 ($[C_{21}H_{35}O_3]^+$, calc. m/z 335.2581, Δ -0.5 ppm; $[M - C_6H_9O_7S - H_2O - C_{16:0} + H]^+$) and m/z 313.2739 ($[C_{19}H_{37}O_3]^+$, calc. m/z 313.2737, Δ -0.4 ppm; $[M - C_6H_9O_7S - H_2O - C_{18:3} + H]^+$) which allowed to defined the two acyl chains as C16:0 and C18:3, respectively.

- **Example of MGDG:** node at m/z 746.5770 ($[C_{41}H_{80}NO_{10}]^+$, calc. m/z 746.5777, Δ 0.9 ppm; $[M + NH_4]^+$)

This m/z feature (ionized as a cationic adduct $[M + NH_4]^+$) was identified as a MGDG (32:1) on the basis of the fragment ion at m/z 549.4874 ($[C_{35}H_{65}O_4]^+$, calc. m/z 549.4877, Δ 0.7 ppm; $[M - Gal + H]^+$) which corresponded to a neutral loss of 197.0900 Da. Its annotation as **MGDG (14:0/18:1)** was fulfilled thanks to fragment ions at m/z 339.2890 ($[C_{21}H_{39}O_3]^+$, calc. m/z 339.2894, Δ 1.2 ppm; $[M - Gal - C_{14:0} + H]^+$), and m/z 285.2420 ($[C_{17}H_{33}O_3]^+$, calc. m/z 285.2424, Δ 1.5 ppm; $[M - Gal - C_{18:1} + H]^+$), and the two acylium ions at m/z 265.2524 ($[C_{18}H_{33}O]^+$, calc. m/z 265.2526, Δ 0.7 ppm) and m/z 211.2054 ($[C_{14}H_{27}O]^+$, calc. m/z 211.2056, Δ 1.2 ppm).

Cluster 1B (See Figure S.III.8.)

- **Example of DGDG:** node at m/z 976.5977 ($[C_{53}H_{86}NO_{15}]^+$, calc. m/z 976.5992, Δ 1.6 ppm; $[M + NH_4]^+$)

This m/z feature was observed as an adduct ion ($[M + NH_4]^+$) and its MS/MS spectrum showed fragment ions at m/z 617.4559 ($[C_{41}H_{61}O_4]^+$, calc. m/z 617.4564, Δ 0.8 ppm; $[M - 2 \text{ Gal} - H_2O + H]^+$) and m/z 635.4668 ($[C_{41}H_{63}O_5]^+$, calc. m/z 635.4670, Δ 0.4 ppm; $[M - 2 \text{ Gal} + H]^+$). These two fragment ions corresponding to neutral losses of 359 and 341 Da from the adduct ion were characteristic of digalactosylacylglycerols (DGDGs). Further fragment ions attributed to monoglyceride ions at m/z 359.2580 ($[C_{23}H_{35}O_3]^+$, calc. m/z 359.2581, Δ 0.2 ppm; $[M - 2 \text{ Gal} - H_2O - C_{18:4} + H]^+$) and m/z 333.2423 ($[C_{21}H_{33}O_3]^+$, calc. m/z 333.2424, Δ 0.5 ppm; $[M - 2 \text{ Gal} - H_2O - C_{20:5} + H]^+$), and to acylium ions at m/z 285.2213 ($[C_{20}H_{29}O]^+$, calc. m/z 285.2213, Δ 0.0 ppm) and m/z 259.2057 ($[C_{18}H_{27}O]^+$, calc. m/z 259.2056, Δ -0.2 ppm) allowed the annotation of this metabolite as **DGDG (18:4/20:5)**.

Cluster 1C (See Figure S.III.9.)

- **Example of MGTA:** node at m/z 446.3481 ($[C_{24}H_{48}NO_6]^+$, calc. m/z 446.3476, Δ 2.0 ppm)

This m/z feature, annotated as **MGTA (14:0)**, showed a characteristic MS fragmentation pathway with: (i) a fragment ion at m/z 428.3379 ($[C_{24}H_{46}NO_5]^+$, calc. m/z 428.3370, Δ -2.1 ppm; $[M - H_2O + H]^+$) resulting from the loss of water from the molecular ion, (ii) a fragment ion at m/z 285.2429 ($[C_{17}H_{33}O_3]^+$, calc. m/z 285.2424, Δ -1.8 ppm; $[M - C_7H_{15}NO_3]^+$) resulting from the loss of the hydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine group, and (iii) several ions, including the characteristic fragment ion at m/z 236.1496 ($[C_{10}H_{22}NO_5]^+$, calc. m/z 236.1492, Δ -1.5 ppm) resulting from the loss of the acyl chain, obtained by successive fragmentations of the polar head group, such as at m/z 218.1387 ($[C_{10}H_{20}NO_4]^+$, calc. m/z 218.1387, Δ -0.3 ppm; loss of water), m/z 162.1127 ($[C_7H_{16}NO_3]^+$, calc. m/z 162.1125, Δ -1.4 ppm; loss of glycerol) and m/z 144.1023 ($[C_7H_{14}NO_2]^+$, calc. m/z 144.1019, Δ -2.9 ppm; loss of glycerol and water).

Cluster 1D (See Figure S.III.10.)

- **Example of SQMG:** node at m/z 600.3411 ($[C_{27}H_{54}NO_{11}S]^+$, calc. m/z 600.3412, Δ 0.1 ppm; $[M + NH_4]^+$)

This m/z feature, observed as an adduct ion ($[M + NH_4]^+$), was annotated as **SQMG (18:1)** on the basis of the characteristic fragment ions at m/z 339.2895 ($[C_{21}H_{39}O_3]^+$, calc. m/z 339.2894, Δ -0.3 ppm; $[M - C_6H_9O_7S - H_2O + H]^+$) and m/z 357.3002 ($[C_{21}H_{41}O_4]^+$, calc. m/z 357.2999, Δ -0.7 ppm; $[M - C_6H_9O_7S + H]^+$), which corresponded to the loss of the sulfoquinovosyl group (neutral losses of 261 and 243 Da, respectively, from the ammoniated adduct), and the acylium ion at m/z 265.2525 ($[C_{18}H_{33}O]^+$, calc. m/z 265.2526, Δ 0.2 ppm).

Cluster 1E (See Figure S.III.11.)

- **Example of PC:** node at m/z 542.3237 ($[\text{C}_{28}\text{H}_{49}\text{NO}_7\text{P}]^+$, calc. m/z 542.3241, Δ 0.8 ppm; $[\text{M} + \text{H}]^+$)

This m/z feature was annotated as **lyso-PC (20:5)** using the typical fragment ion of the polar head at m/z 184.0729 ($[\text{C}_5\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{P}]^+$, m/z 184.0733, Δ 2.5 ppm), but also those due to its subsequent fragmentation at m/z 104.1069 ($[\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}]^+$, calc. m/z 104.1070, Δ 0.8 ppm) and m/z 86.0964 ($[\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}]^+$, calc. m/z 86.0964, Δ 0.6 ppm), while the acyl chain was deduced from the molecular formula and the fragment ions at m/z 359.2576 ($[\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{O}_3]^+$, calc. m/z 359.2581, Δ 1.2 ppm; $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{P} + \text{H}]^+$), and m/z 258.1099 ($[\text{C}_8\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{P}]^+$, calc. m/z 258.1101, Δ 0.9 ppm; $[\text{M} - \text{C}_{20:5} + \text{H}]^+$).

Tableau S.III.1. : Summary of the fractions obtained after fractionation of the crude extracts of *Taonia atomaria* by flash-chromatography

Fraction N°	Elution gradient			Color	Mass (mg)	Semi- preparative HPLC	Purified compounds*	LC-MS/MS analysis
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	H ₂ O					
1	0	10	90	Colorless	< 0.5			
2	0	10	90	Colorless	< 0.5			
3	0	18	82	Light pink	< 0.5			
4	0	27	73	Light purple	< 0.5			
5	0	36	64	Light yellow	< 0.5			
6	0	45	55	Light yellow	< 0.5			
7	0	54	46	Light yellow	< 0.5			
8	0	63	37	Light yellow	< 0.5			
9	0	72	28	Light yellow	< 0.5			
10	0	81	19	Light yellow	< 0.5			X
11	0	90	10	Yellow/Orange	< 0.5			
12	0	99	1	Yellow/Orange	22			
13	0	100	0	Orange	4			
14	0	100	0	Orange	12			X
15	0	100	0	Orange	99			X
16	0	100	0	Orange	241	X		X
17	0	100	0	Dark orange	326	X	20, 22, 24	X
18	0	100	0	Dark green	257	X	20, 22, 25	X
19	9	91	0	Green	216	X	10, 12, 13, 20, 22, 23, 24	X
20	19	81	0	Green	213	X	10, 23	X
21	29	71	0	Light green	152	X	23	X
22	39	61	0	Light green	97			X
23	49	51	0	Green	64			X
24	59	41	0	Dark green	43			X
25	69	31	0	Dark green	53			X
26	79	21	0	Green	78			X
27	89	11	0	Green	132			X
28	99	1	0	Green	116			X
29	100	0	0	Green	32			
30	100	0	0	Green	28			
31	100	0	0	Yellow	20			
32	100	0	0	Yellow	10			
33	100	0	0	Light yellow	16			
34	100	0	0	Light yellow	8			
35	100	0	0	Light yellow	7			
36	100	0	0	Light yellow	11			
37	100	0	0	Light yellow	1			
38	100	0	0	Colorless	< 0.5			
39	100	0	0	Colorless	< 0.5			

*See Fig. S2 for the corresponding chemical structures. **10**: cadina-4(14),5-diene; **12**: cubebol; **13**: 4-*epi*-cubebol; **20**: (+)-gleenol; **22**: (1S, 5E, 7S) 1-acetoxygermacra-4(15),5,10(14)-triene; **23**: germacra-4(15),5,10(14)-trien-9-ol; **24**: geranylgeranylglycerol; **25**: dictyol A.

Figure S.III.1. : BPC chromatograms of a selection of fractions obtained from the crude extracts of *Taonia atomaria*

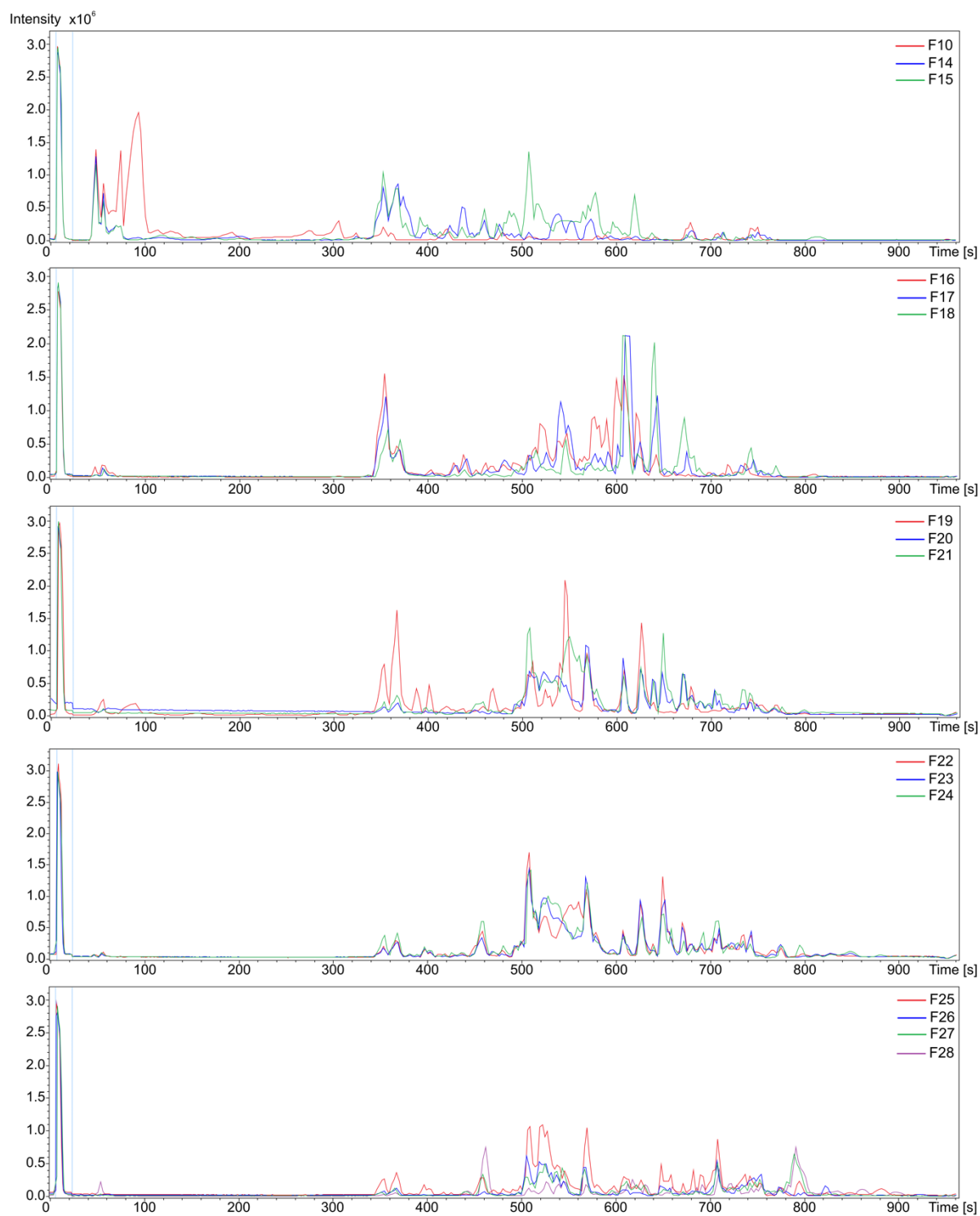
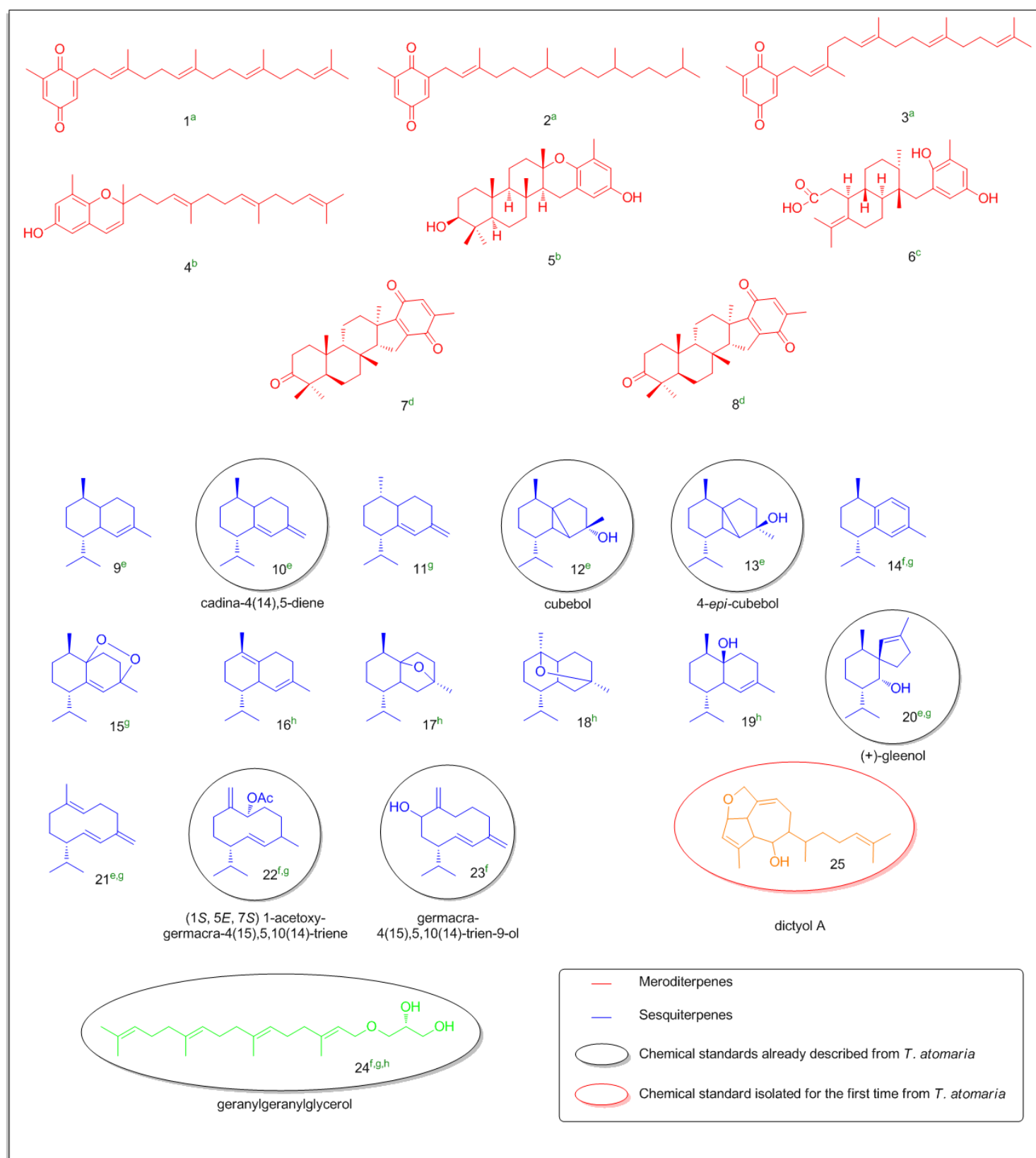


Figure S.III.2 : Compounds isolated from *Taonia* spp.



^aTziveleka *et al.* Chem. Biodivers. 2 (2005) 901; ^bGonzález *et al.* Tetrahedron. 29 (1973) 1605; ^cGonzález *et al.* Tetrahedron Letters. 15 (1974) 3951; ^dAbatis *et al.* Tetrahedron Letters. 46 (2005) 8525; ^eDe Rosa *et al.* Phytochemistry. 37 (1994) 1327; ^fOthmani *et al.* Biofouling. 32 (2016) 801; ^gOthmani *et al.* J. Appl. Phycol. 28 (2016) 1975; ^hTringali *et al.* Phytochemistry. 40 (1995) 827.

Figure S.III.3 : Chemical structure of dictyol A and main correlations observed on the HMBC and ^1H - ^1H COSY 2D NMR spectra

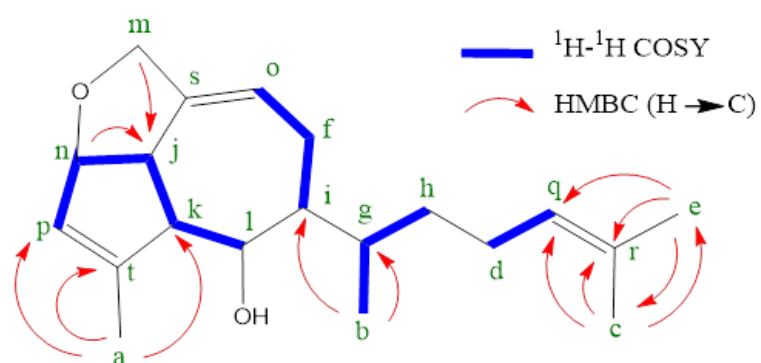


Figure S.III.4-A. : ^1H NMR spectrum of dictyol A (CDCl_3 , 400 MHz)

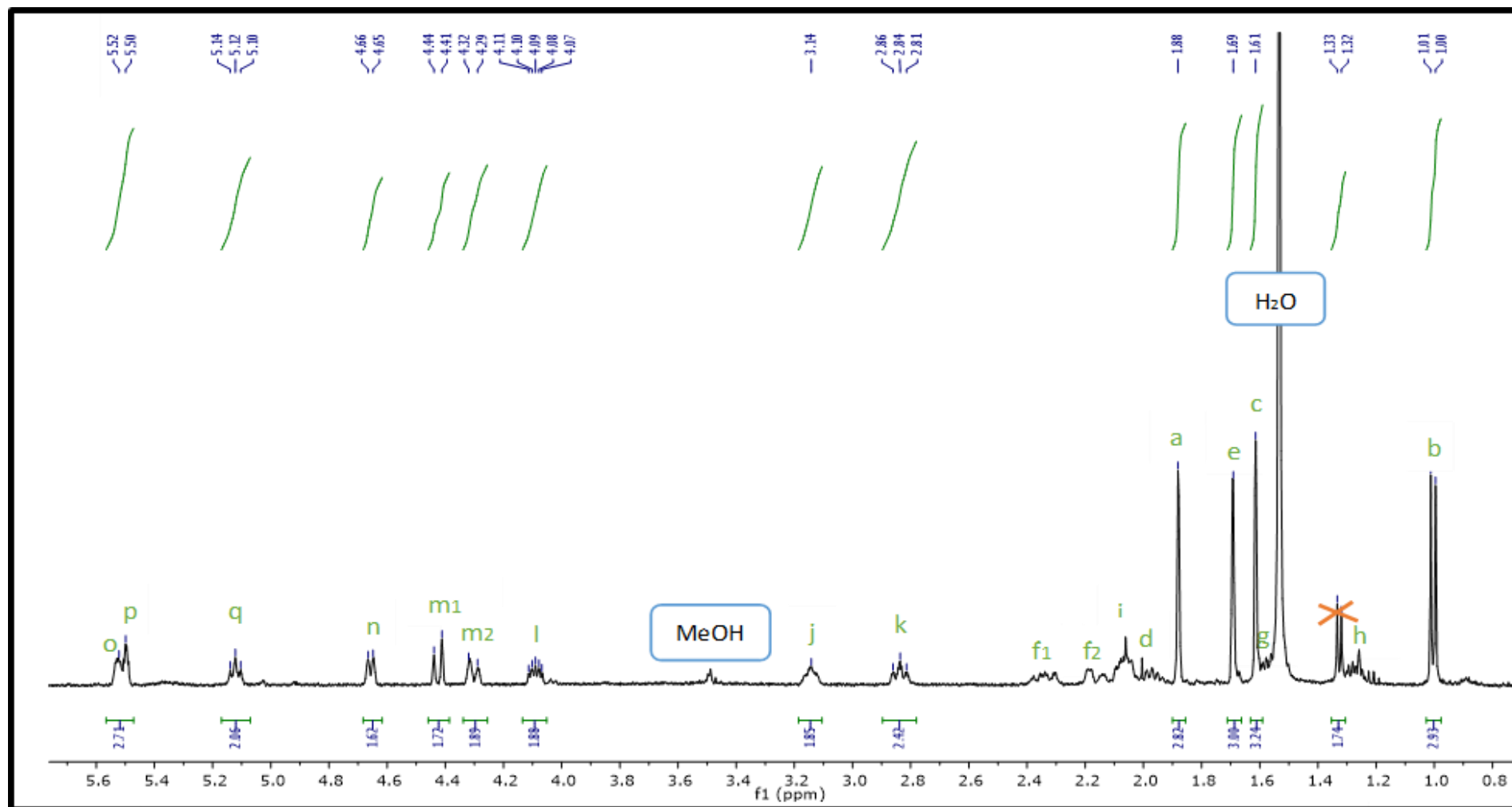


Figure S.III.4-B : ^{13}C NMR spectrum of dictyol A (CDCl_3 , 100 MHz)

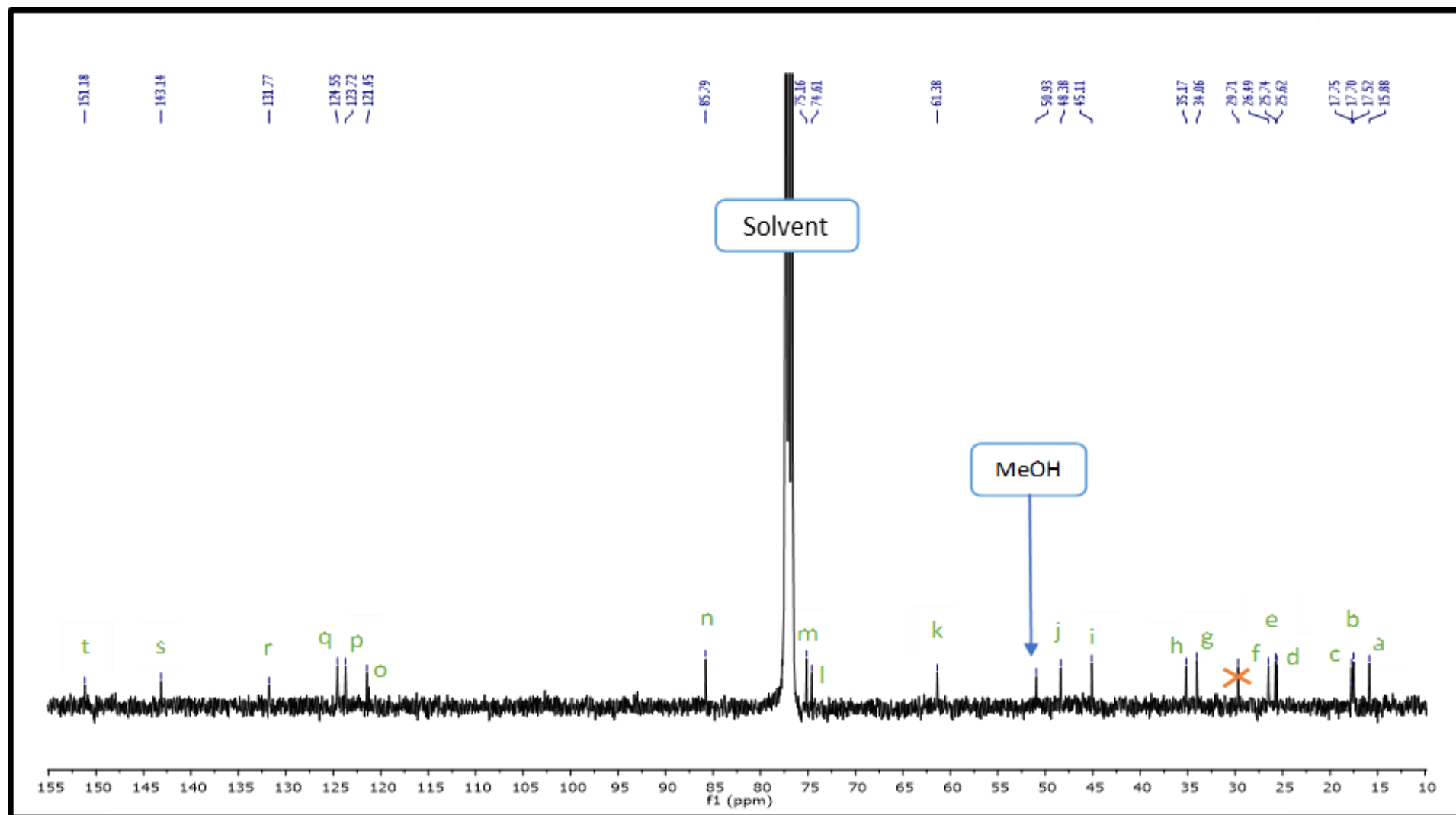
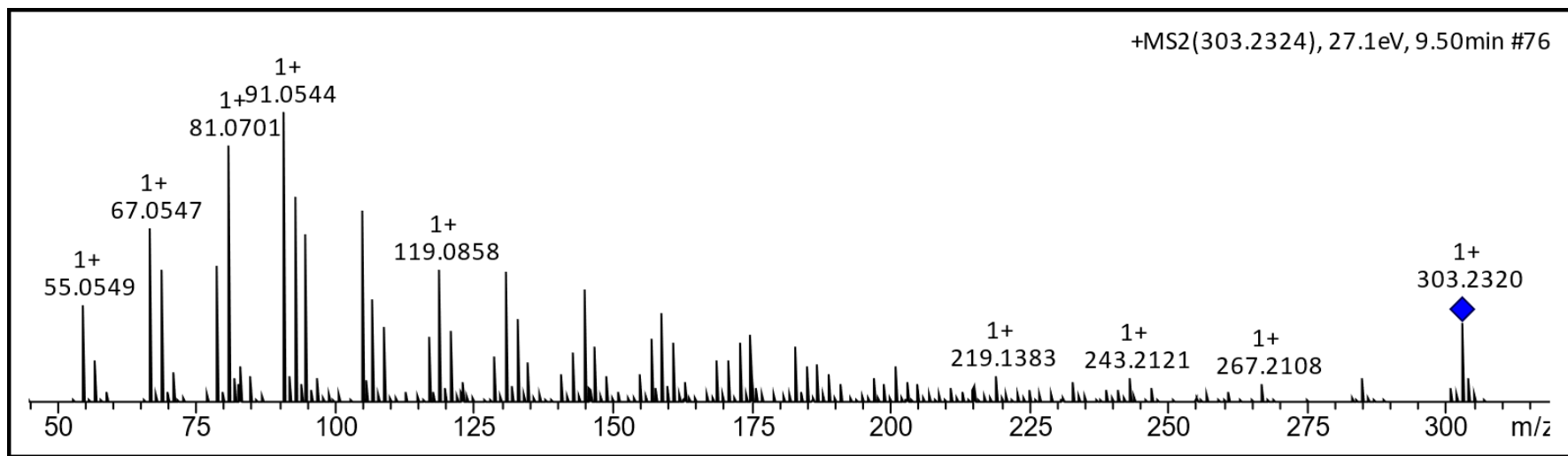


Figure S.III.5 : (+)-ESI-HRMS spectrum of dictyol A



: Annotation of cluster **1A** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compounds MGDG (14:0/18:1), SQDG(16:0/18:3) and TG (14:0/16:0/16:1) (**Abbreviations:** DG: Diacylglycerol; MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol; SQDG: Sulfoquinovosyldiacylglycerol; TG: Triacylglycerol)

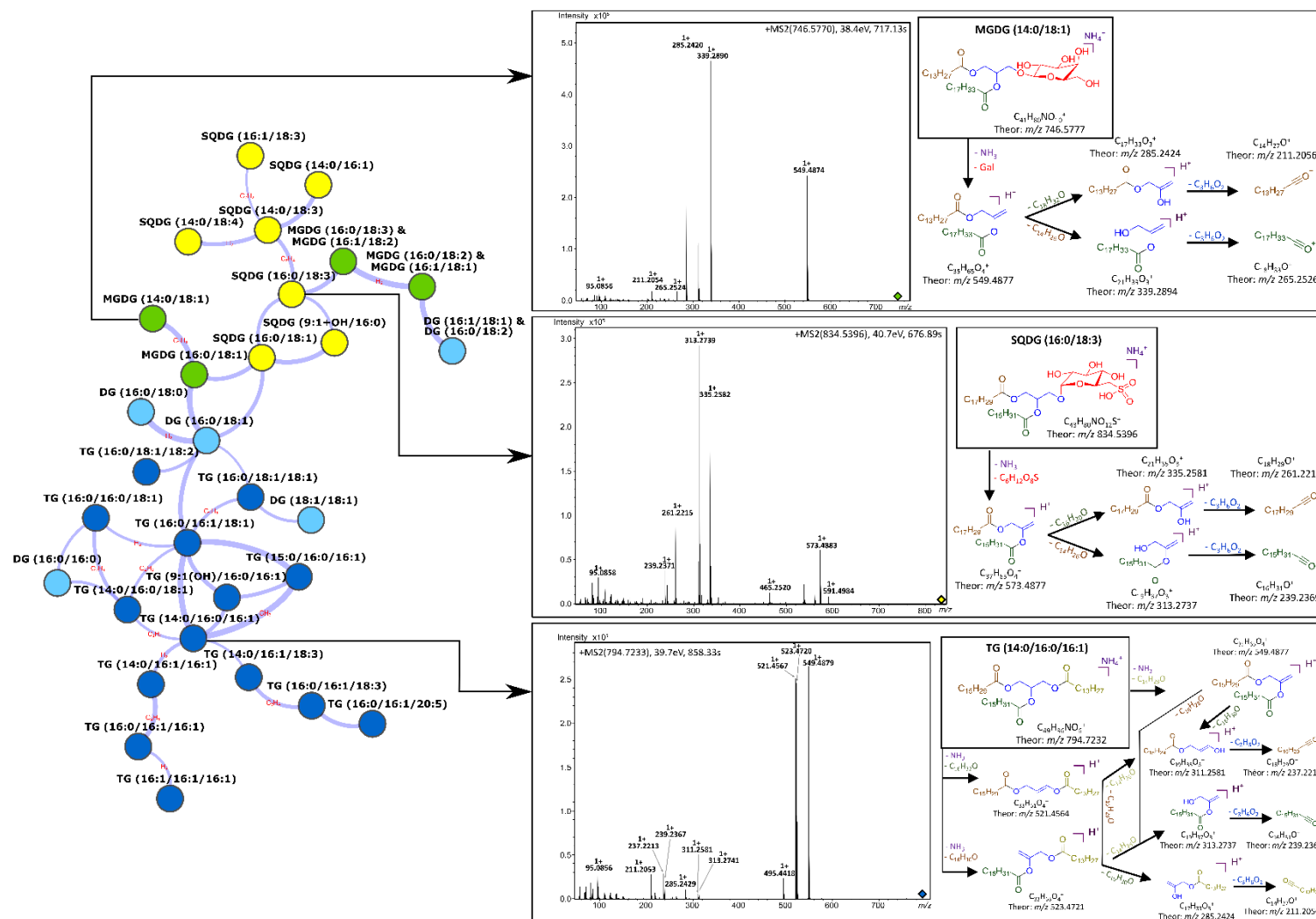


Figure S.III.7 : Restrictive molecular network (**MN-1**) representing nodes with a color gradient according to their corresponding retention time (**Abbreviations:** DFG: Diacylfarnesylglycerol; DFuA: Diacylfulvellic acid; DG: Diacylglycerol; DGDG: Digalactosyldiacylglycerol; MFG: Monoacylfarnesylglycerol; MFuA: Monoacylfulvellic acid; MG: Monoacylglycerol; MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol; MGGG: Monoradylgeranylgeranyl glycerol; MGGG-OH: Monoradylhydroxygeranylgeranyl glycerol; MGMG: Monogalactosylmonoacylglycerol; MGTA: Monoacylglyceryl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine; PC: Phosphatidylcholine; SQDG: Sulfoquinovosyldiacylglycerol; SQMG: Sulfoquinovosylmonoacylglycerol; TG: Triacylglycerol) (Circles: metabolites; diamonds: fragments; triangles: adducts)

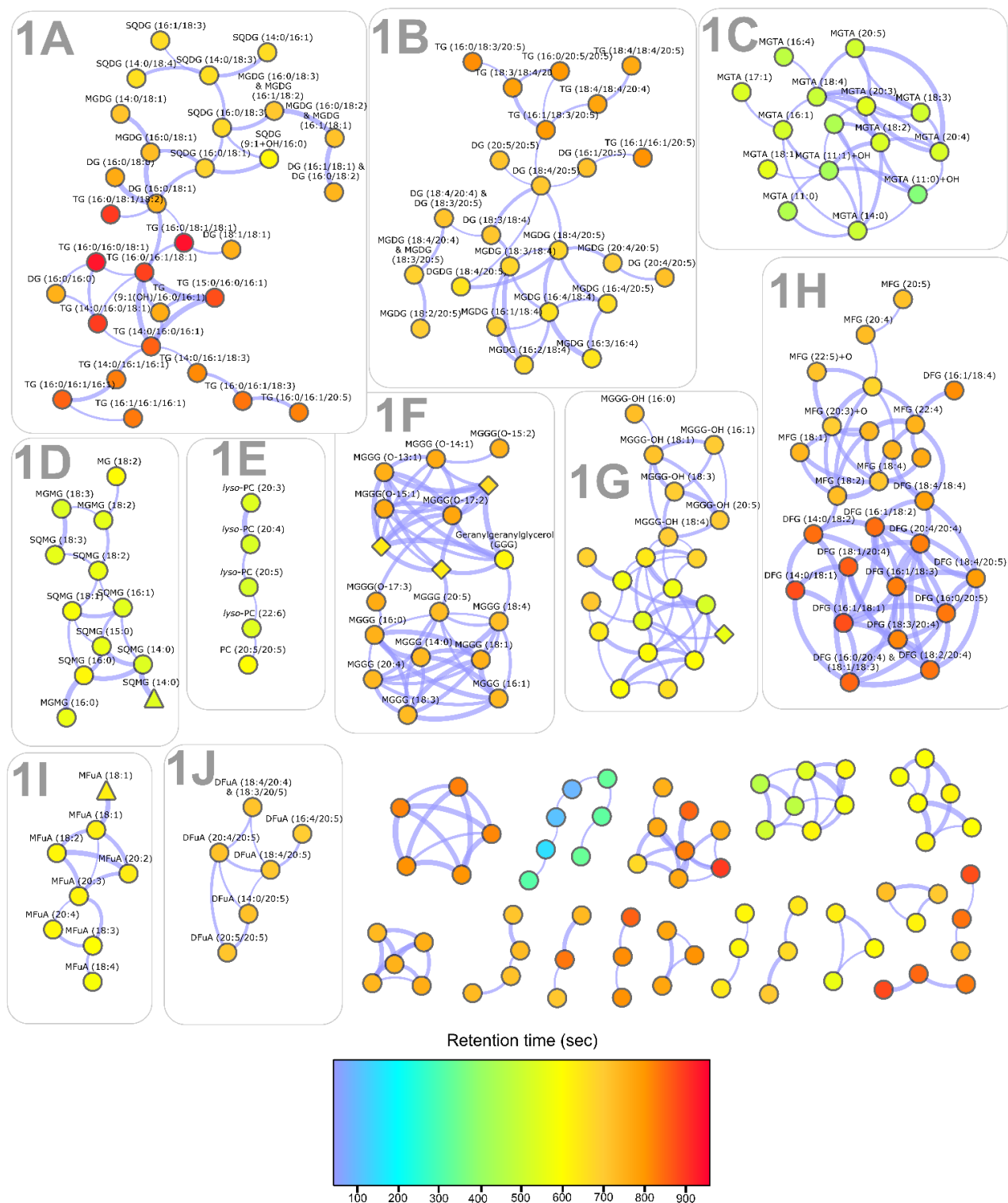


Figure S.III.8 : Annotation of cluster **1B** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compound DGDG (18:4/20:5) (**Abbreviations:** DG: Diacylglycerol; DGDG: Digalactosyldiacylglycerol; MGDG: Monogalactosyldiacylglycerol, TG: Triacylglycerol)

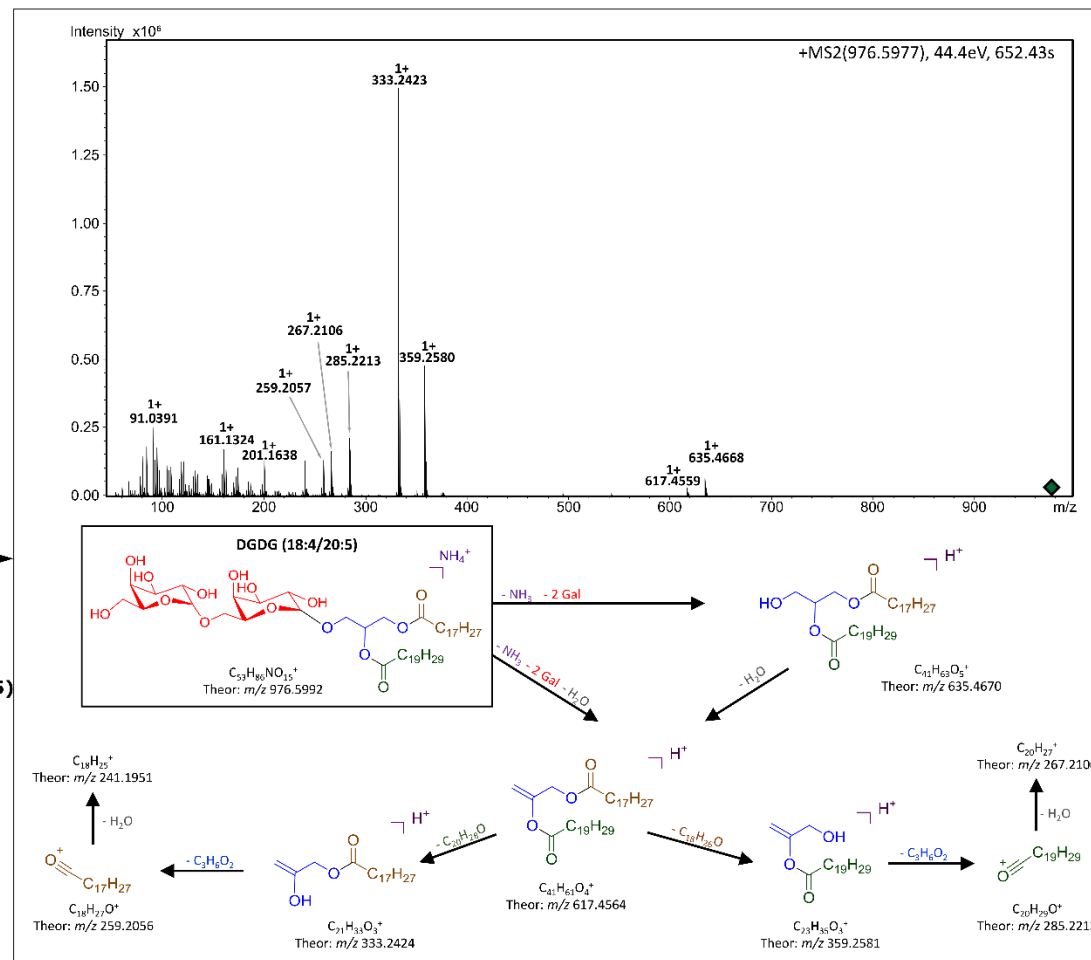
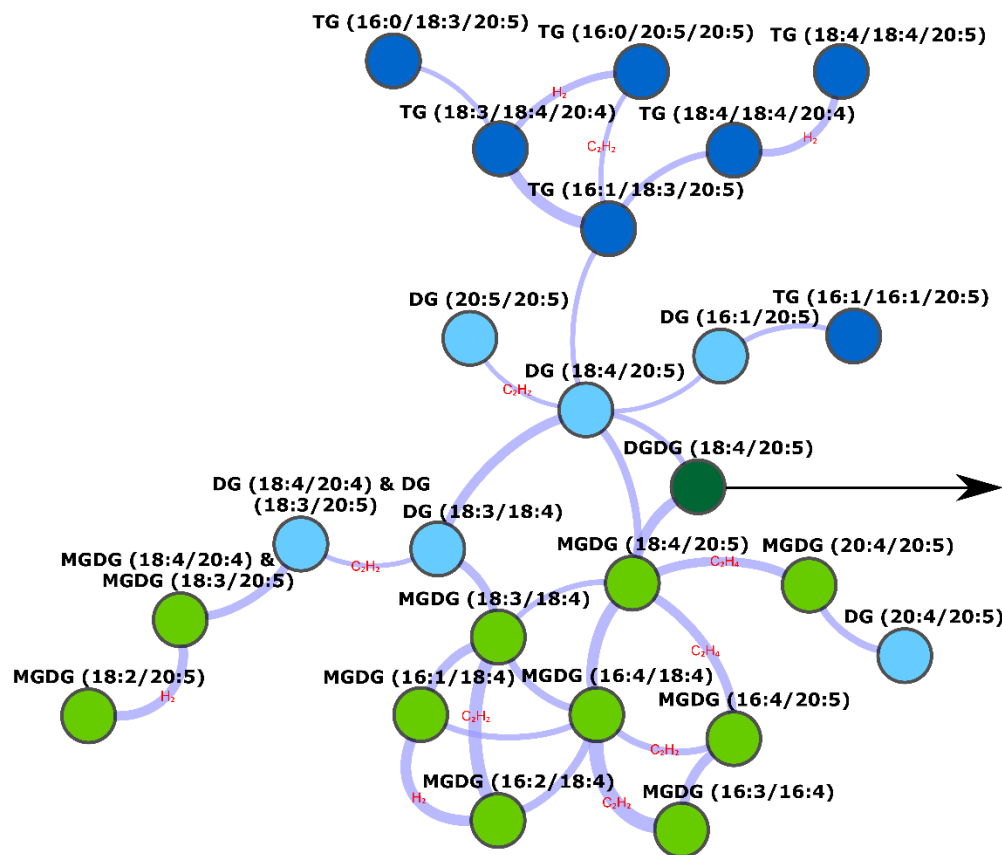


Figure S.III.9. : Annotation of the cluster **1C** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compound MGTA (14:0) (**Abbreviation:** MGTA: Monoacylglyceryl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine)

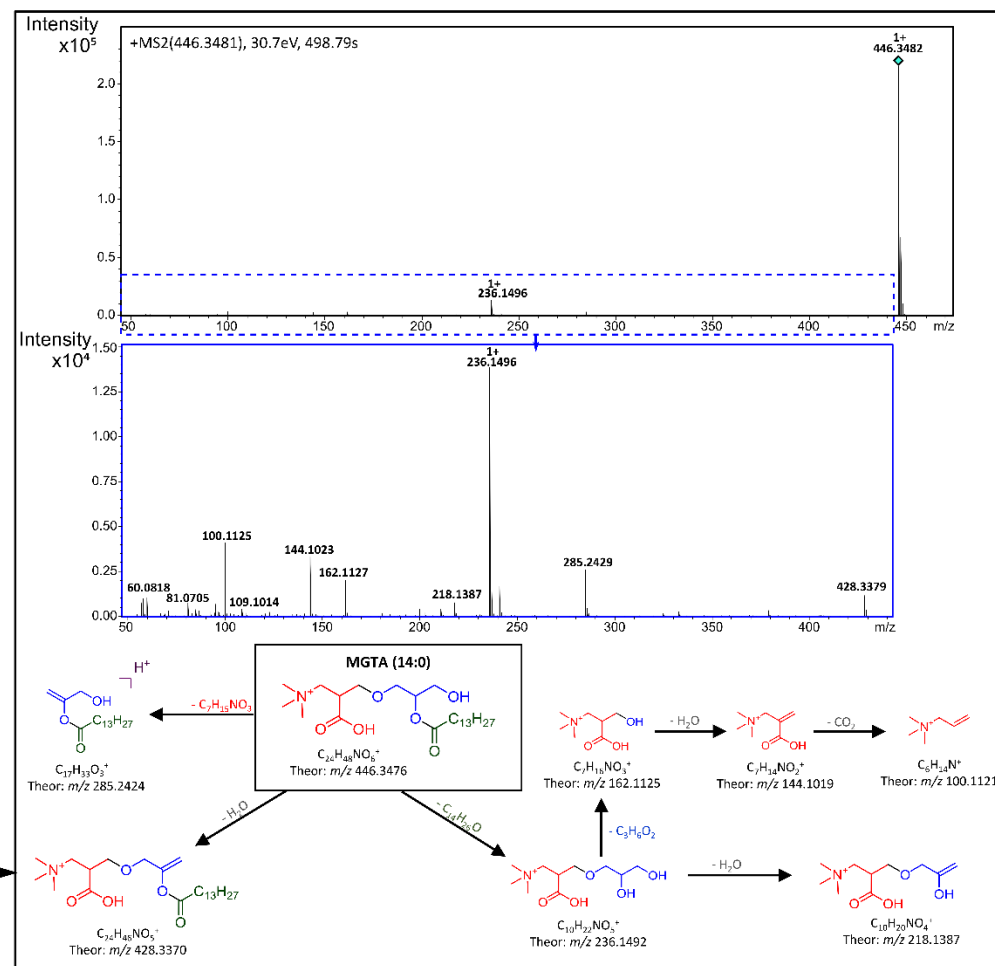
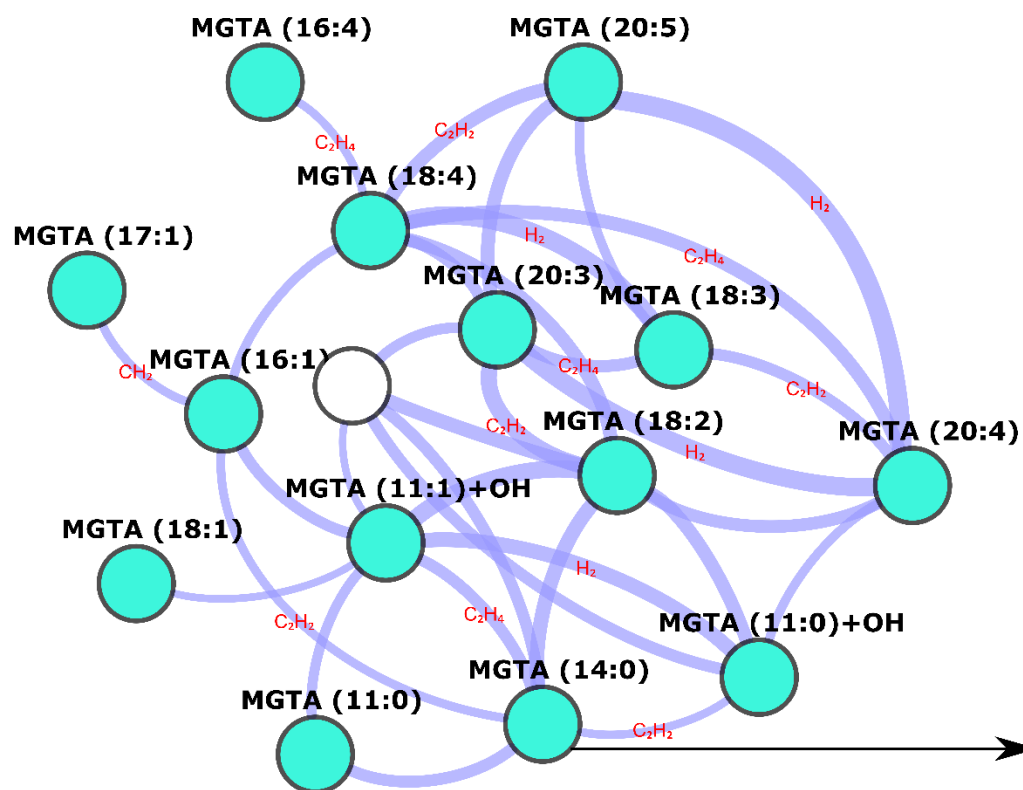


Figure S.III.10 : Annotation of cluster **1D** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compound SQMG (18:1) (**Abbreviations**: MG: Monoacylglycerol; MGMG: Monogalactosylmonoacylglycerol; SQMG: Sulfoquinovosylmonoacylglycerol) (circles: metabolites; triangle: adduct)

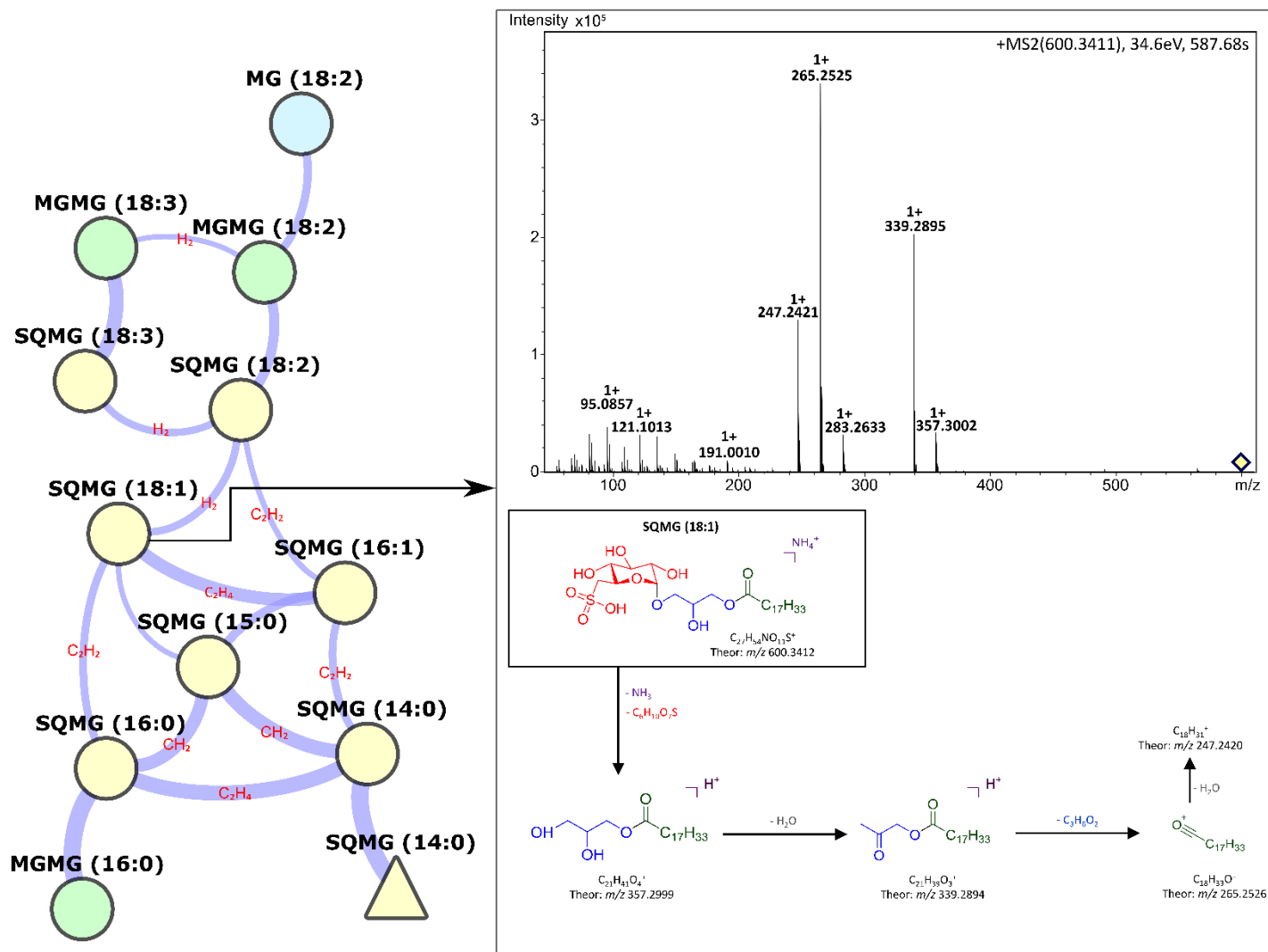


Figure S.III.11 : Annotation of cluster **1E** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compound *lyso*-PC (20:5) (**Abbreviation**: PC: Phosphatidylcholine)

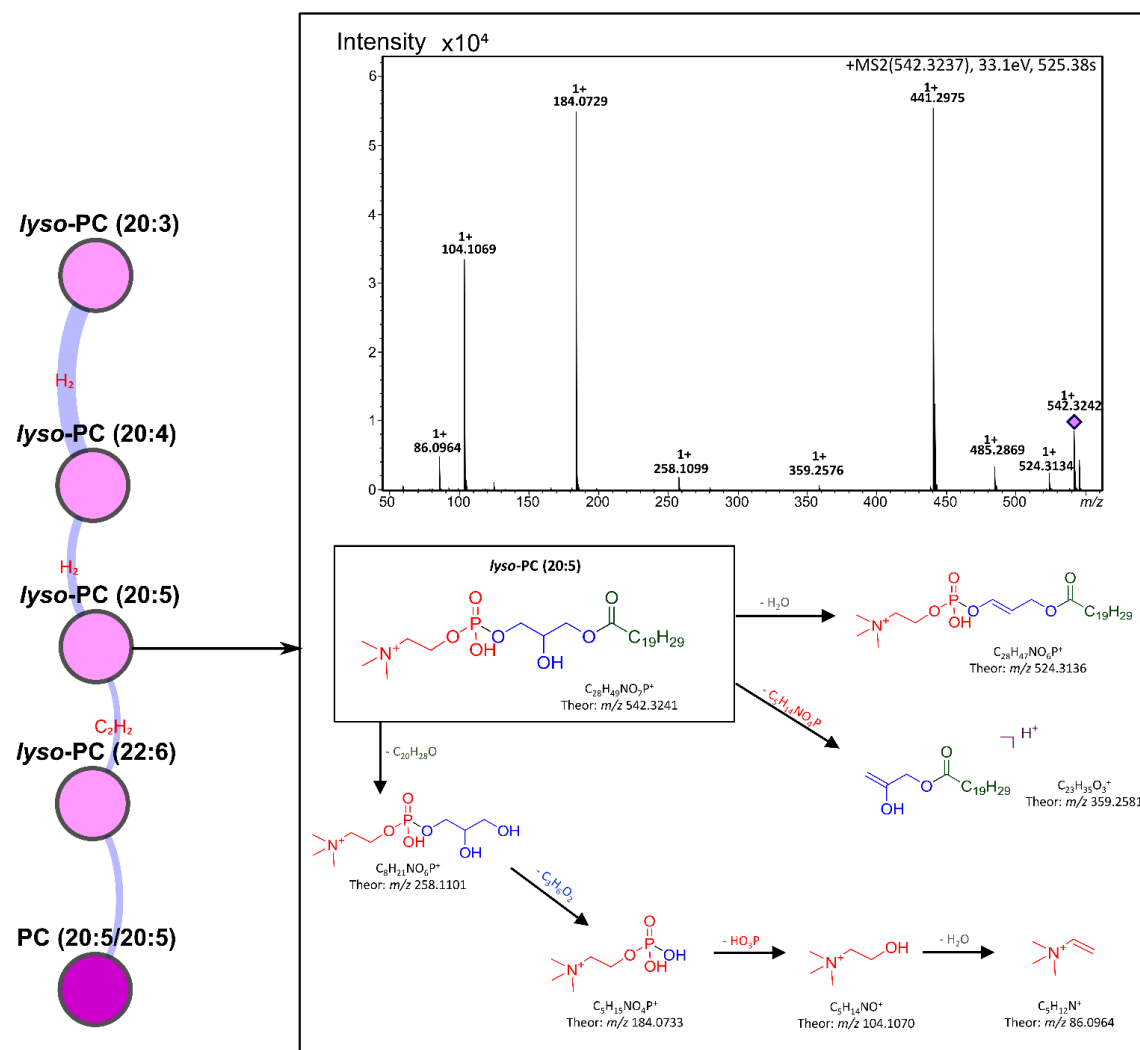


Figure S.III.12. : Annotation of cluster **1G** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compound MGGG-OH (18:4) (**Abbreviation:** MGGG-OH: Monoradylhydroxygeranylgeranyl glycerol) (Circles: metabolites; diamond: fragment)

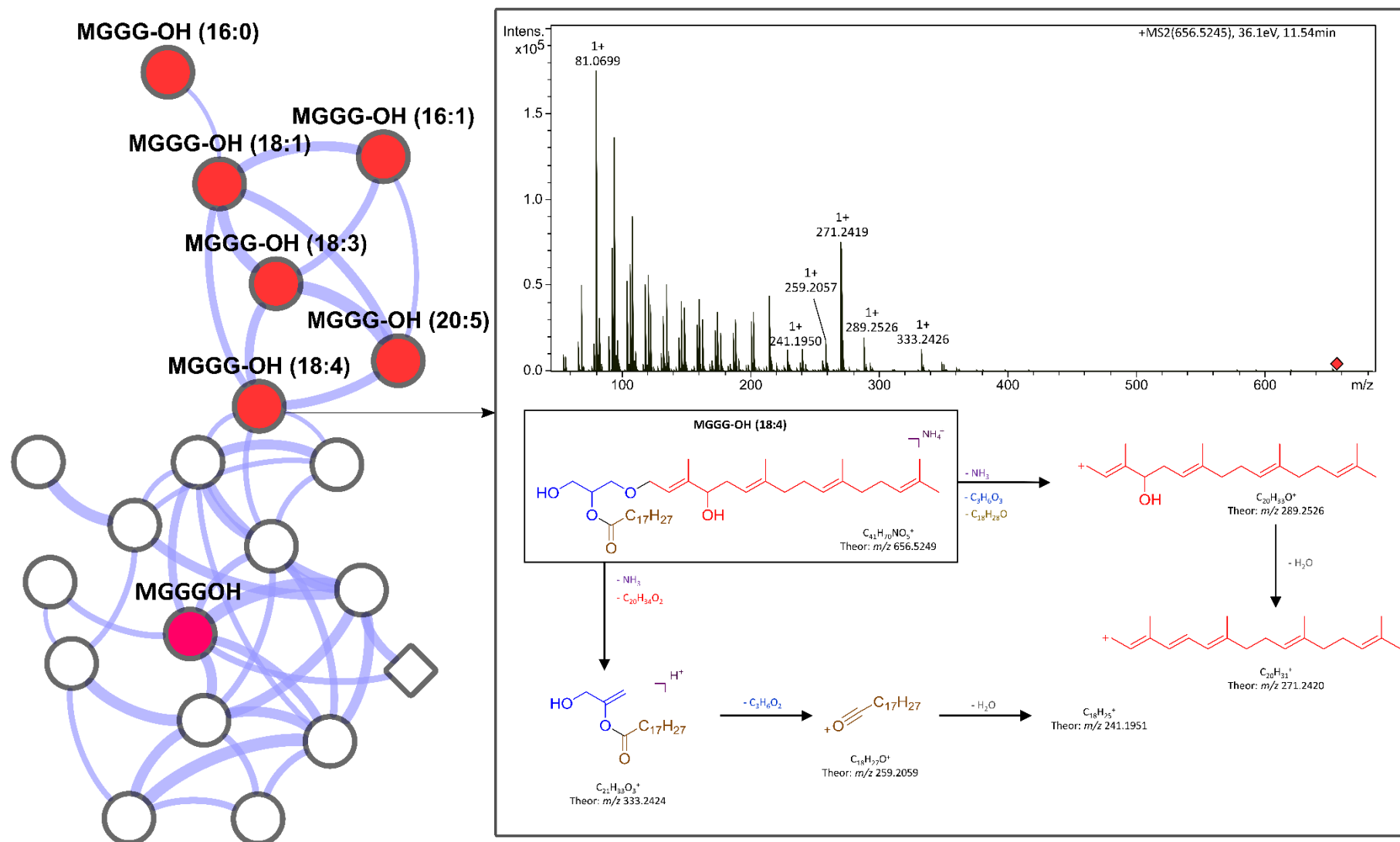


Figure S.III.13. : Annotation of cluster **1H** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compound MFG (18:1) (**Abbreviations:** DFG: Diacylfarnesylglycerol; MFG: Monoacylfarnesylglycerol)

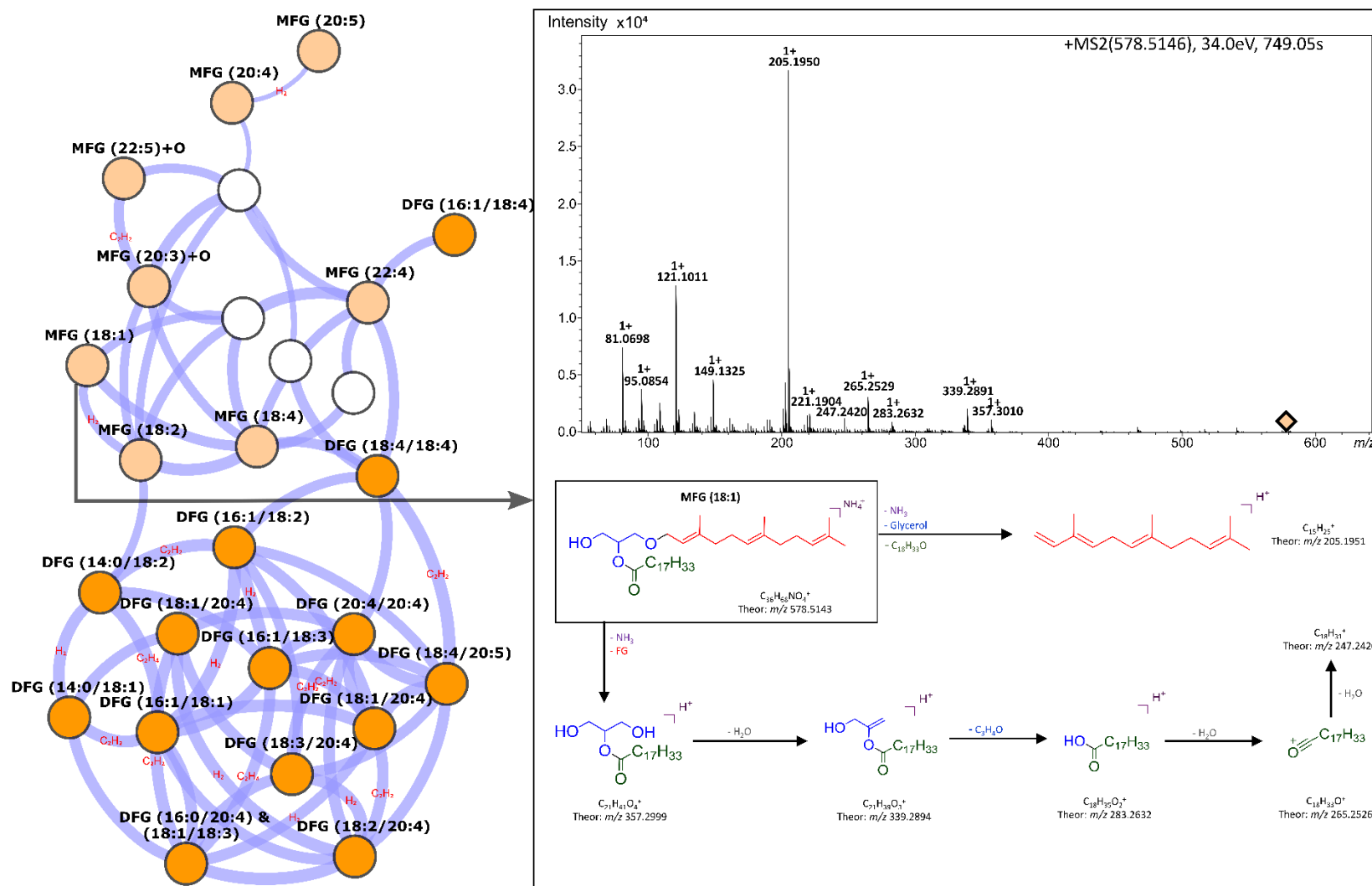


Figure S.III.14. : Annotation of cluster **1J** and proposed MS/MS fragmentation pattern for the compound DFuA (20:4/20:5) (**Abbreviation:** DFuA: Diacylfulvellic acid)

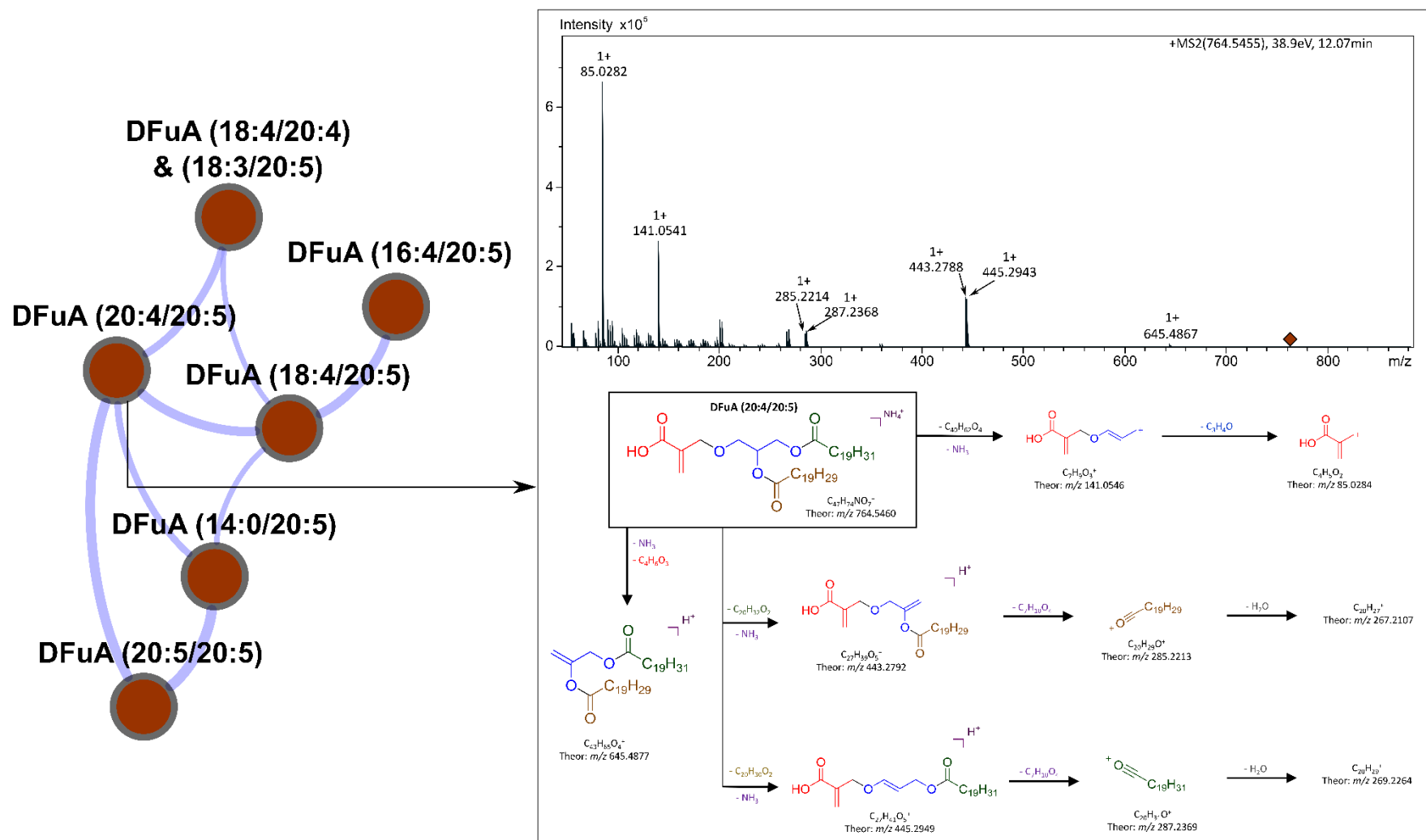
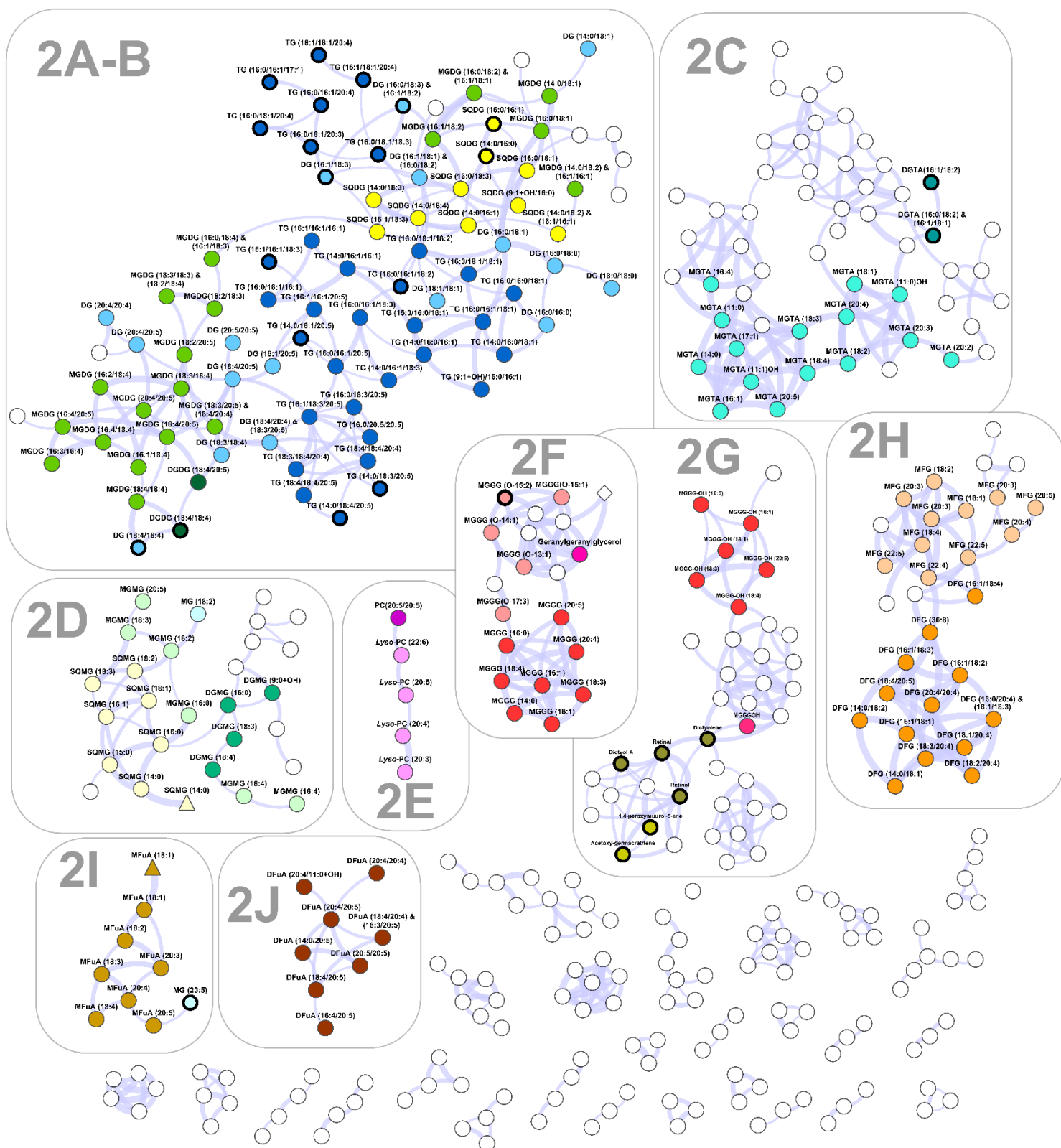


Figure S.III.15. : Less restrictive molecular network (MN-2) built with MS/MS data of fractions obtained from the crude extracts of the brown alga *Taonia atomaria* (Black circles: *m/z* features annotated using MN-2) (Circles: metabolites; diamonds: fragments; triangles: adducts)



CHAPITRE IV

**Impact de la concentration en phosphate
sur le métabolome des biofilms produits
par la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica***



A. Avant-propos

Impact of phosphate concentration on the metabolome of biofilms of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica*

Nathan Carriot, Raphaëlle Barry-Martinet, Jean-François Briand, Annick Ortalo-Magné, Gérald Culioli

Article 2 : Soumis dans **Metabolomics** le 16/08/2021 (n° MEBO-D-21-00151), révisions mineurs

Contexte de l'étude :

L'existence des microorganismes et des microbes est reconnue depuis le XIX^e siècle notamment grâce à Pasteur et sa communication sur la théorie des germes. Pourtant, c'est depuis quelques décennies seulement qu'ils sont étudiés sous leur forme d'organisation la plus répandue, celle de communautés adhérees à une surface : les biofilms. Les microorganismes représentant 60% de la biomasse sur Terre et 90% des espèces (Douarche et al. 2018), ils constituent donc le mode de vie le plus répandu sur Terre. Du fait de leur forte présence en milieu marin, ils sont impliqués dans la plupart des cycles géochimiques des éléments et notamment dans celui du phosphore (P). Cet élément, inégalement répandu dans les mers et océans du globe, est essentiel pour de nombreux processus biologiques tels que les mécanismes de transfert d'énergie, le stockage de l'information biologique ou encore le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires.

Méthodologie appliquée :

Dans ce chapitre, l'étude de biofilms monospécifiques (*Pseudoalteromonas lipolytica* TC8) cultivés *in vitro* est réalisée, avec 5 concentrations en phosphate différentes allant de 10⁻⁴ mM à 1.32 mM. L'étude de ce type de biofilms « simple », formés à partir d'une souche-modèle connue, va permettre de répondre à une question biologique précise grâce à la mise en relation de plusieurs méthodologies et techniques de caractérisation. Parmi ces dernières, la métabolomique est la technique optimale pour identifier et caractériser les variations de la production biochimique, à l'échelle des biomolécules de faible masse moléculaire (< 1500 Da), dans un biofilm afin de comprendre son fonctionnement. L'annotation des biomarqueurs a été réalisée grâce à l'utilisation de réseaux moléculaires et de l'analyse des fragmentations MS/MS. Néanmoins, d'autres approches mises en place ont permis d'enrichir la caractérisation globale

de ce type d'échantillons complexes. La caractérisation biochimique des biofilms, par le biais d'une détermination de leur composition globale (dosages colorimétriques des protéines et glucides), la quantité de biofilm (marquage au cristal violet) ou encore des informations concernant la viabilité et la structure du biofilm (microscopie confocale) vont ainsi venir compléter les informations obtenues par métabolomique. D'un point de vue méthodologique, le but ici est de mettre en relation différentes techniques de caractérisation permettant d'évaluer différentes caractéristiques afin de répondre à une question biologique précise.

Question scientifique :

La composition chimique des mers et océans de la planète n'étant pas homogène, les microorganismes et les biofilms qu'ils forment vont évoluer différemment en fonction de ces conditions environnementales. Le but de notre étude est d'accroître les connaissances scientifiques ayant trait à l'impact de l'environnement sur la formation des biofilms marins. Du fait de l'importance du phosphore dans les processus biologiques et de son inégale répartition dans les écosystèmes marins, la question à laquelle ce chapitre va tenter de répondre est la suivante : Quel est l'impact global de la teneur en phosphate sur des biofilms formés *in vitro* par une bactérie marine modèle ?

Résumé des résultats :

Les méthodologies appliquées ont permis de montrer que la teneur en phosphate dans le milieu de culture avait un effet non seulement sur la quantité et la structure des biofilms obtenus mais également sur leur production métabolique. Pour les faibles concentrations en phosphate (qui correspondent écologiquement à des conditions que l'on pourrait retrouver en mer Méditerranée ou dans l'océan Atlantique), la biomasse, la teneur en glucides ainsi que les structures tridimensionnelles des biofilms ont tendance à diminuer. Le processus d'identification des métabolites, alliant réseau moléculaire et analyse des spectres MS/MS, a permis l'annotation putative de 53 métabolites appartenant à huit familles chimiques distinctes. L'analyse métabolomique non-ciblée a permis, quant à elle, la discrimination du métabolome des biofilms en fonction des 5 concentrations en phosphate utilisées. Le changement majeur concerne les aminolipides (ornithine lipides) observés en quantité croissante lorsque la concentration en phosphates diminue, alors que la tendance inverse est observée pour certains phospholipides [phosphatidyléthanolamines (PE) oxydées]. Cette étude montre une adaptation de la production en lipides membranaires au niveau des biofilms de *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8 en fonction de la concentration en phosphates dans le milieu de culture.

B. Article : Impact of phosphate concentration on the
metabolome of biofilms of the marine bacterium
Pseudoalteromonas lipolytica

Impact of phosphate concentration on the metabolome of biofilms of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica*

Nathan Carriot¹, Raphaëlle Barry-Martinet¹, Jean-François Briand¹, Annick Ortalo-Magné^{1,*},
Gérald Culioli^{1,2*}

¹Université de Toulon, Laboratoire MAPIEM, EA 4323, La Garde, France

²Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), UMR
CNRS-IRD-Avignon Université-Aix-Marseille Université, Avignon, France

Corresponding authors: Annick Ortalo-Magné (annick.ortalo-magne@univ-tln.fr),
Gérald Culioli (gerald.culioli@univ-avignon.fr)

Orcid ID: Nathan Carriot (0000-0001-8732-2755)
Raphaëlle Barry-Martinet (0000-0002-9147-7503)
Jean-François Briand (0000-0001-8729-2621)
Annick Ortalo-Magné (0000-0001-8899-3067)
Gérald Culioli (0000-0001-5760-6394)

1. Abstract

Introduction Marine biofilms are the most widely distributed mode of life on Earth and drive biogeochemical cycling processes of most elements. Phosphorus (P) is essential for many biological processes such as energy transfer mechanisms, biological information storage and membrane integrity.

Objectives Our aim was to analyze the effect of a gradient of ecologically relevant phosphate concentrations on the biofilm-forming capacity and the metabolome of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8.

Methods In addition to the evaluation of the effect of different phosphate concentration on the biomass, structure and gross biochemical composition of biofilms of *P. lipolytica* TC8, untargeted metabolomics based on liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis was used to determine the metabolites impacted by P-limiting conditions. Annotation of discriminant metabolites was performed through the concomitant use of molecular networking and MS/MS fragmentation pattern interpretation.

Results At the lowest phosphate concentration, biomass, carbohydrate content and three-dimensional structures of biofilms tended to decrease. Furthermore, untargeted metabolomics allowed for the discrimination of the biofilm samples obtained at the five phosphate concentrations and the highlighting of a panel of metabolites mainly implied in such a discrimination. The annotation procedure permitted the putative identification of a large part of the metabolites of the dataset. Ornithine lipids were found in increasing quantity when the phosphate concentration decreased, while the opposite trend was observed for oxidized phosphatidylethanolamines (PEs).

Conclusion This study demonstrated the suitability of LC-MS-based untargeted metabolomics for evaluating the effect of culture conditions on marine bacterial biofilms. More precisely, these results supported the high plasticity of the membrane of *P. lipolytica* TC8, while the role of the oxidized PEs remains to be clarified.

Keywords Marine biofilms . LC-MS-based metabolomics . Phosphate depletion . Membrane remodeling . Ornithine lipids

2. Introduction

Biofilms constitute a mode of life widely distributed in marine environments. These complex communities of marine microorganisms mainly composed of bacteria (but also diatoms) can develop on most biotic and abiotic surfaces immersed in seawater (Carvalho 2018; Dang and Lovell 2016). In biofilms, microbial cells are embedded in a three-dimensional, highly hydrated matrix of self-produced extracellular polymeric substances (EPS) mainly composed of polysaccharides and proteins, even if lipids and extracellular DNA have been also described as matrix constituents (Flemming 2016; Flemming et al. 2016). This matrix promotes adhesion processes on surfaces and maintains the cohesion between biofilm microorganisms. Furthermore, the biofilm matrix acts as a nutrient source by trapping nutrient elements and molecules, or by the degradation of constitutive EPS, and protects the microbial cells against a wide range of environmental stresses (Flemming and Wingender 2010). Thus, the biosynthesis by biofilm cells of biopolymers and metabolites reflects the adaptive capacities of microbial communities to environmental constraints.

Marine biofilms play crucial roles in marine ecosystems through their implication in biogeochemical cycles and trophic interactions. In such living structures, the phenotypic plasticity of some bacteria results in their quick responses to the highly fluctuating marine conditions (Stocker 2012). Similar to hydrodynamic conditions or the nature of the colonized substrate, the availability of nutrients in the marine environment is one of the most important factors influencing biofilm development, as well as its species and biochemical compositions (Allan et al. 2002; Lawes et al. 2016). More particularly, phosphorus (P) is an essential micronutrient for living organisms (Karl 2014). Whether in its organic or inorganic forms, P is present in most compartments of both terrestrial and marine ecosystems, such as water, soil or sediment. In living microorganisms, P is considered an essential element, as it is involved through adenosine phosphates or NADPH in a wide range of energy-requiring reactions. P also enters, in the form of a phosphate group, the composition of DNA and RNA molecules, phosphoproteins, polyphosphates, as well as phospholipids which are key components of cell membranes (Violaki et al. 2018). The main sinks of organic P are nucleic acids, phosphoproteins and phospholipids whose biosynthesis creates a demand for this nutrient. While nucleic acids and phosphoproteins cannot be synthesized without P, the strategy of polar lipids remodeling is widespread among phytoplankton and diverse marine heterotrophic bacteria (Carini et al. 2015; Sebastián et al. 2016; Van Mooy et al. 2009). Under P deficiency, these organisms have developed strategies to maintain the membrane integrity by replacing

amphiphilic membrane phospholipids with non-P lipids whose variable polar head groups contain sulfur (sulfolipids), mono- or disaccharides (glycolipids), betaines (betaine lipids) or amino acids (aminolipids) (Diercks et al. 2015; Geiger et al. 2010). Therefore, while it is well accepted that the biochemical composition of bacterial membranes varies from one microorganism to another, such a variability has been also demonstrated within a same species depending on environmental factors, and more particularly P limitations (Sohlenkamp and Geiger 2015).

The Mediterranean Sea is overall one of the most oligotrophic marine environments in the world, with the exception of specific coastal locations with anthropogenic inputs, where mineral nutrients, and particularly P, are present in limited quantity (Van Wambeke et al. 2002). P concentrations are so low in such locations that this nutrient is often considered to be the major limiting element for bacterial growth in Mediterranean marine environments (Dyhrman et al. 2007; Pinhassi et al. 2006). Among different groups from the heterotrophic bacterial community of the eastern Mediterranean Sea tested for their response to P availability, previous results have shown contrasting responses, with γ -proteobacteria being the most affected (Sebastián and Gasol 2013).

For the present study, the impact of P starvation was evaluated on a marine bacterial strain belonging to the *Pseudoalteromonas* genus (γ -proteobacteria class) which is commonly represented in marine environments. Moreover, bacteria species of the genus *Pseudoalteromonas* show adaptative advantages such as the ability to exude a large number of EPS (Poli et al. 2010) and to produce a wide range of bioactive chemicals (Offret et al. 2016). The strain selected for this study, *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8, had previously been isolated from a natural biofilm formed on a silicone coupon immersed in the bay of Toulon, France (NW Mediterranean Sea) (Brian-Jaisson et al. 2014; Camps et al. 2011). *P. lipolytica* TC8 was chosen as a suitable candidate to study the impact of P starvation on marine biofilms formed *in vitro* due to its capacity to easily grow *in vitro* in biofilm mode. Moreover, previous investigations of *P. lipolytica* TC8 biochemical production have shown the propensity of this bacterial strain to biosynthesize aminolipids (Favre et al. 2017, 2018, 2019).

In this context, LC-MS-based untargeted metabolomics appears as a well-suited approach to assess the effect of an environmental factor on organisms and has already proven effective for the analysis of marine biofilms (Bauermeister et al. 2019; Favre et al. 2017). Over the past decades, technological progress in chromatography and mass spectrometry has revolutionized this field of metabolomics. For example, these advances allow for the comparison of the metabolism of living organisms under different conditions and, more precisely, for the

identification of metabolites which were differently expressed (Chang et al. 2021). For this last point, statistical analyses combined with the powerful *molecular networking* approach (Aron et al. 2020; Nothias et al. 2018; Wang et al. 2016b) help in the annotation of specific chemomarkers.

In this study, the aim was to investigate the impact of P starvation on the metabolism of a model biofilm-forming marine bacterium, *P. lipolytica* TC8, by mimicking relevant environmental conditions. For that purpose, five minimal culture media, in which phosphate concentration was modified in an ecologically-relevant manner to correspond to different ocean and sea conditions over the world, were used to evaluate the resulting changes on the biofilm-forming capacity and the metabolome of *P. lipolytica* TC8.

3. Materials and methods

3.1. Preparation of bacterial cultures

Pseudoalteromonas lipolytica TC8 is a γ -proteobacterium isolated from an artificial substratum immersed in the bay of Toulon (NW Mediterranean Sea, France; 43°06'23"N, 5°57'17"E) (Brian-Jaisson et al. 2014; Camps et al. 2011). Cells of *P. lipolytica* TC8, stored at -80°C, were placed in a sterile flask containing 30 mL of Vääänen nine salt solution (VNSS) (Mårdén et al. 1985). Precultures were made in triplicate and the flasks were placed for 48h at 20°C in an incubator shaker (120 rpm). Bacterial precultures were subsequently diluted in VNSS in three Erlenmeyer flasks to reach an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1. The resulting precultures were incubated at 20°C with stirring at 120 rpm. The optical density was monitored every hour until the end of the exponential phase (OD₆₀₀ 0.6) with a spectrophotometer (Genesys 20 spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Medium blanks were also prepared in parallel with only VNSS. Once the precultures reach an OD₆₀₀ equal to 0.6, 30 mL of the bacterial cultures were placed in 50 mL Falcon tubes in triplicate for each culture medium. The tubes were centrifuged (Z 200 A; Hermle LaborTechnik GmbH, NJ, USA) at 6000 rpm for 10 min at room temperature and the supernatants were removed. The resulting pellets were suspended in 15 mL of nine salt solution (NSS) (Dahlbäck et al. 1981) and then vortexed. The tubes were centrifuged at 4000 rpm for 15 min at room temperature. The supernatants were removed and the pellets were diluted in marine minimal medium (MMM) (Ostling et al. 1991) with different phosphate concentrations (Tableau IV.1.) chosen to mimic different realistic environmental conditions. The optical densities were adjusted (OD₆₀₀ 0.5) at that time.

Growth media	Phosphate concentration (mM)	Abbreviation
Marine minimum medium	1.32	C5
Intermediate medium	10 ⁻¹	C4
Baltic Sea medium	10 ⁻²	C3
Atlantic Ocean medium (Lorient)	10 ⁻³	C2
Mediterranean Sea medium (Toulon)	10 ⁻⁴	C1

Tableau IV.1. : Culture media with various ecologically relevant phosphate concentrations used in this study for the growth of biofilms of *P. lipolytica* TC8.

3.2. Characterization of the biofilms of *P. lipolytica* TC8

3.2.1. Biofilm quantification

Biofilm forming ability and monitoring of the evolution of bacterial biofilms according to phosphate concentration were carried out through crystal violet (CV) staining. CV allows the quantification of biofilm biomass, exopolymeric matrix and bacterial (living and dead) cells being stained (Kragh et al. 2019). More precisely, 5 mL of a bacterial preculture were placed in each well of a 6-well plate (Cellvis, Sunnyvale, CA, USA). Biofilms and medium blanks were made in triplicate. The plates were then incubated at 20°C. After 24h, the plates were removed and rinsed three times with 6 mL of NSS. The plates were subsequently dried in an oven (50°C, 30 min) and 5 mL of a CV solution (0.01%) were deposited in each well. After 10 min, the plates were rinsed three times with 5 mL of Milli-Q water (Waters-Millipore, Milford, MA, USA), dried at room temperature for 10 min, and 5 mL of 95% ethanol (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) were added directly in the wells. An incubation time of 10 min at 20°C under stirring (120 rpm) was performed. Finally, 200 µL of the solution of each well were transferred to a 96-well plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and analyzed with a microplate reader (Infinite® M200 pro; TECAN, Switzerland) at 595 nm (Figure IV.1A.).

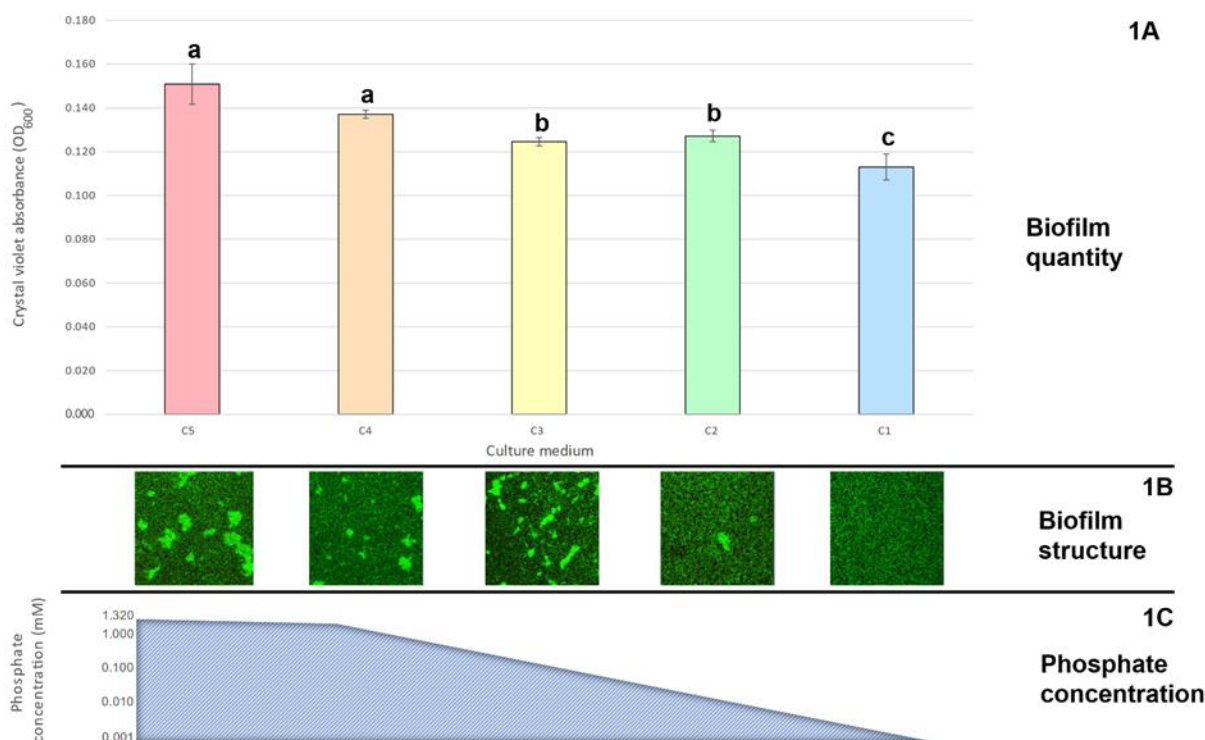


Figure IV.1. : Effect of phosphate concentrations (**1C**) on biofilms of *P. lipolytica* TC8 in terms of biomass (crystal violet staining) (**1A**) and structure (CLSM images of living/dead stained cells) (**1B**).

3.2.2. Biofilm viability and cellular organization

The monitoring of cell evolution was performed using the “live/dead” kit (Bacterial Viability Kit; Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA) which consists of two fluorescent markers: SYTO® 9 (labelling all the bacterial cells) and propidium iodide (PI) (labelling only dead cells). The staining was done directly in 96-well black microplates with a glass-bottom (Corning Incorporated, NY, USA). Bacterial samples and medium blanks were tested in triplicate. 200 μ L of preculture were placed in each well and incubated at 20°C. After 24h, the wells were rinsed three times with 200 μ L of a NaCl solution (36 g/L). 0.3 μ L of the staining solution (PI at 20 mM/SYTO® 9 at 3.34 mM; 1/1, v/v) were then introduced in each well. Incubation was done at room temperature in the dark for 15 min. Each well was rinsed three times (NaCl at 36 g/L, 200 μ L/well) in order to remove the excess of fluorescent markers. 200 μ L of NaCl (36 g/L) were put in the wells which were then analyzed by a microplate reader. The absorbance wavelengths used were those of PI (538/617 nm) and SYTO® 9 (470/515 nm). A confocal microscope reading (Zeiss LSM 510 meta, Göttingen, Germany) was also performed to highlight the viability and the cellular organization of the biofilms (Figure IV.1B.).

3.2.3. Gross biochemical composition

The protein content of the biofilm samples was quantified by the Bradford-based Uptima coo protein assay (Interchim, Montluçon, France). The carbohydrate content was determined by a colorimetric method with glucose as a standard (Dubois et al. 1956). Each quantification experiment was performed in triplicate (Supplemental Figure S.IV.1.).

3.3. Metabolomic analysis

3.3.1. Sample preparation

The biofilm cultures were done in Petri dishes in which 25 mL of preculture (OD₆₀₀ 0.5) were inoculated (24h, 20°C) and each medium was tested in triplicate. The supernatants of the Petri dishes were removed to keep only the biofilms and to eliminate the bacterial planktonic cells. Each Petri dish was rinsed two times with 3 mL of the corresponding culture medium. The resulting solution containing the adherent biofilm was placed in a tube. For each sample, the quenching and the extraction were carried out simultaneously by adding 5 mL of ethyl acetate (analytical grade; Carlo Erba, Val-de-Reuil, France) in each tube and by vortexing the mixture (Favre et al. 2017). The tubes were then placed in an ultrasonic bath (Bransonic 2150E-DTH; Danbury, CT, USA) for 30 min at a temperature of 20°C. The upper phase containing the organic extract was placed in 8 mL vials and dried under N₂. The vials were then filled with argon and kept at -20°C. Medium blanks (in triplicate for each culture condition) were also prepared using the same protocol, however without bacterial cells.

3.3.2. UHPLC-MS data acquisition

The bacterial dried extracts and the medium blanks were solubilized in 1 mL of LC-MS grade methanol (Fisher, Loughborough, UK). Quality control samples (QCs) were prepared by mixing an aliquot of all the samples. Bacterial samples and medium blanks were randomly injected, and a QC was injected every five samples. At the beginning of the injection sequence, two different analytical blanks (methanol only) and a QC (×10) were injected prior to the samples.

Sample were analyzed by UHPLC-ESI-QToF-MS in positive mode. The UHPLC-MS instrumentation consisted of a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) chromatographic system coupled via an ESI interface to a QToF Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Champs-sur-Marne, France). The

separations were carried out on a reverse phase column (150×2.1 mm, $1.7 \mu\text{m}$, Kinetex Phenyl-Hexyl; Phenomenex, Le Pecq, France) equipped with a pre-column (SecurityGuard cartridge; Phenomenex). The column oven temperature was maintained at 40°C and the flow rate was set at 0.5 mL/min . The autosampler temperature was set at 4°C and the injection volume was $5 \mu\text{L}$. Mobile phases were: (A) water and (B) acetonitrile (VWR) containing each 0.1% (v/v) of formic acid (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). The elution gradient started at 5% B and was maintained for 2 min , then increased to 100% B (linear ramp) in 8 min and was maintained for 4 min . The composition of the mobile phase was restored at 5% B (linear ramp) over 0.01 min and was maintained for 1.99 min , for a total run time of 16 min . The capillary voltage of the MS spectrometer was set at 4500V (positive mode), and the nebulizing parameters were set as follows: nebulizing gas (N_2) pressure at 0.4 bar , drying gas (N_2) 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 at 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), fragmenting the two most intense precursor ions by scan, with a collision energy selected on the basis of the ion mass (ramp from 15 to 45eV). 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 at the beginning of the injection sequence.

3.3.3. Data processing and statistical analysis

LC-MS raw data were respectively converted into “.netCDF” files using DataAnalysis (version 4.3; Bruker Daltonics) and processed with MZmine-2.51 (Pluskal et al. 2010). The data matrix was submitted to three filtering steps using an in-house script on R. Each step of the script consisted of removing successively experimental and analytical bias according to signal/noise ratio (using blanks), coefficient of variation (using QCs), and coefficient of correlation (using samples). For multivariate analyses, the resulting data matrix was $\log_{10}$ -transformed, mean-centered and analyzed using MetaboAnalyst 5.0 online webtool (<https://www.metaboanalyst.ca/>; Chong et al. 2019). Data were analyzed using principal component analysis (PCA), followed by partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to reveal differences between biofilms of *P. lipolytica* TC8 grown with various phosphate concentrations. The VIPs (variable importance in the projection) representing the most discriminating m/z features between the different culture conditions were classified according

to their VIP score (the most discriminating metabolite having the highest VIP score) (Tableau IV.2. and Supplemental Tableau S.IV.1.).

3.3.4. Feature annotation via molecular networking

Raw UPLC-MS/MS data were converted into “.mzXML” files using DataAnalysis. For each culture condition, the MS/MS data of one biofilm sample and one medium blank were used to build a molecular network (MN). The Global Natural Products Social Molecular Networking online workflow (GNPS web platform; <http://gnps.ucsd.edu>) was used to create a MN of related compounds based on the similarity of their tandem MS fragmentation patterns (M. Wang et al. 2016b). The principle of MN was based on the fact that molecules with similar chemical structures share similar MS/MS fragmentation pathways leading to common fragment ions and neutral losses. From MS/MS spectra, the creation of a MN allowed for: (i) the identification of clusters of related compounds, (ii) the detection of a set of structural analogues of a reference molecule, and (iii) the comparison of the metabolic production of different samples. The parameters used are: precursor ion mass tolerance (Da): 0.02, fragment ion mass tolerance (Da): 0.02, minimum cosine score: 0.70, minimum matched fragment ions: 6 and network TopK: 10. Data from GNPS platform were imported into Cytoscape (version 3.7.0), using nodes to represent each spectrum and edges to represent a similarity of MS/MS fragmentation between two connected nodes (Figure IV.3.).

The MN thus created was used to annotate metabolites of *P. lipolytica* TC8, and more specifically the VIPs. Various identification methods were used to identify a metabolite: (i) during the computational process for generating the network, GNPS platform performed a fragment similarity search of each m/z feature in several public databases (e.g. MassBank, HMDB and the results of this search were directly available into the Cytoscape network, (ii) MS and MS/MS data were compared with other databanks, such as PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), ChemSpider (www.chemspider.com), Lipidmaps (<http://www.lipidmaps.org>), CEU mass mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es/>) and Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) (Tautenhahn, Patti, et al. 2012), (iii) MS and MS/MS data as well as retention times were compared with those of molecules of our in-house database, and (iv) MS data and MS/MS fragmentation patterns of nodes belonging to a same cluster of the MN were manually interpreted using their similarity and the related bibliographic data.

4. Results and discussion

The general monitoring of biofilm formation was carried out through staining with CV, confocal laser scanning microscopy, and gross biochemical characterization, while untargeted LC-MS metabolomics coupled to molecular networking allowed for observation of changes at the metabolome level.

4.1. Selection of ecologically relevant phosphate concentrations for the culture of biofilms of *P. lipolytica* TC8

The aim of this study was to evaluate the effect of a gradient of relevant environmental P concentrations on biofilms of *P. lipolytica* TC8 (Tableau IV.1.). The lowest concentration chosen corresponded to the phosphate concentration experienced by this bacterial strain in the environment from which it has been isolated (i.e. bay of Toulon, NW Mediterranean Sea). This geographical area is typically defined as nutrient limited, mostly due to a lack of phosphate (Lazzari et al. 2016), but its coastal bay waters contain higher levels of phosphate ($C1 = 10^{-4}$ mM). The second concentration ($C2 = 10^{-3}$ mM) corresponded to maximum phosphate concentrations observed in coastal locations from the NE Atlantic Ocean (Michaels et al. 1996)) and mean phosphate concentrations observed in the Baltic Sea (Frumin 2013). The third concentration ($C3 = 10^{-2}$ mM) tended to mimic phosphate levels reached in estuarine ecosystems with higher river discharges (Lochet and Leveau 1990). The last concentration corresponded to the concentration of the marine minimal medium ($C5 = 1.32$ mM), often used to isolate and grow marine bacteria in “realistic” conditions (Patrauchan et al. 2005). Finally, an intermediate concentration between C3 and C5 ($C4 = 10^{-1}$ mM) was selected in order to keep a similar gap between phosphate concentrations along the selected gradient.

4.2. Impact of phosphate concentration on the amount and the structure of biofilms of *P. lipolytica* TC8

Growing bacteria in minimum and well-defined culture media has several advantages, such as promoting biofilm formation (due to the limited availability of certain nutrients) and allowing for the observation of the specific effects of some nutrients (e.g. phosphate in this study) on the biofilm growth and properties. Through a simple crystal violet (CV) staining assay, the influence of medium composition on the amount of biofilm formed can be investigated (Haney et al. 2018). Such a monitoring is frequently used as it allows for the evaluation of the total

biofilm biomass, including the microbial cells and the surrounding exopolymeric matrix (Barraud et al. 2014).

Regarding the biofilm cultures of *P. lipolytica* TC8, a decrease in their amount was observed in connection with the decrease of phosphate concentration (Figure. IV.1A. & Figure. IV.1C.). With phosphate being the only modified nutrient, a direct correlation between the decrease in the P content of the culture medium and the biomass of biofilms formed was highlighted. More precisely, significant shifts of the quantity of biofilm were observed between the three following groups of samples: i) C5/C4, ii) C3 and C2, and iii) C1. These results echoed previous works which have also observed a decrease in the biofilm formation under P-limiting conditions (Ghosh et al. 2019; Lehtola et al. 2002; Rinaudi et al. 2006), even if the impact of phosphate starvation on cultured marine bacterial biofilms has never been studied to date.

Confocal imaging was used to quantify living/dead bacterial cells, as well as to examine the structure of biofilms of *P. lipolytica* TC8 grown under various phosphate concentrations. No differences were observed in the ratio between living and dead cells in the different culture media (data not shown). The reduction of the biofilm amounts observed by CV staining did not only come from a cell mortality induced by P starvation, but also from a reduction of the living biomass. Regardless of the culture conditions, biofilms formed by *P. lipolytica* TC8 always displayed a highly compact layer covering the entire surface. Differences, however, can be noted in the biofilm structure (Figure IV.1B.). While CLSM images revealed a carpet-like appearance of the biofilm formed at the lowest phosphate concentration (C1), three dimensional clusters began to be observed at the C2 conditions. Given that an established biofilm is structured by microbial cells and EPS, the differences in the defined architecture could be due to growth rates and EPS production. Among EPS, polysaccharides participate to the structuration of biofilms by providing aggregative properties (Karygianni et al. 2020) . Here, an increased secretion of such exopolymers could be correlated with the P content of the culture medium and would be responsible of clusters formation. This hypothesis was supported by results of protein and carbohydrate measurements by colorimetric methods which revealed a significant decrease of carbohydrates with the lowest phosphate concentration (C1), while the amount of proteins did not vary significantly (Supplemental Figure S.IV.1.). These results revealed that the quantity and the structure of biofilms of *P. lipolytica* TC8 were only impacted by P starvation at the lowest phosphate concentration used in this study (C1: 10^{-4} mM).

4.3. Discrimination of biofilms of *P. lipolytica* TC8 depending on the phosphate concentration by LC-MS-based metabolomics

The untargeted LC-(+)-ESI-MS metabolomics approach designed for the analysis of biofilms of *P. lipolytica* TC8 cultured with different phosphate concentrations produced a first dataset with 728 m/z features. Three drastic filtering steps were applied in order to facilitate the detection and the selection of chemically-relevant ions and to focus the annotation effort on these specific metabolites. At the end of this treatment, only 62 m/z features were kept in the final data matrix (Supplemental Tableau S.IV.1). A first PCA analysis including blanks and QCs was implemented (Supplemental Figure S.IV.2.). First, a clear discrimination between blanks and the other samples was observed on the corresponding PCA score plot. Moreover, QCs were centered near the origin of the PCA score plot and were sparsely scattered, relative to the observed dispersion of biofilm samples, which is in accordance with high quality data (Broadhurst et al. 2018).

When only biofilm samples of *P. lipolytica* TC8 were analyzed and plotted (Figure IV.2A.), the resulting PCA score plot showed a clear distinction between the biofilm samples according to the phosphate concentration used for each bacterial culture. Thus, these samples were discriminated along the first component, which accounted for 32.6% of the total variance. In accordance with the effect of the C1 conditions on the amount and the structure of biofilms of *P. lipolytica* TC8, the samples obtained at the lowest phosphate concentration showed a more marked difference from all other samples along the first component of the PCA.

In order to find chemomarkers linked with the P starvation, a PLS-DA five-class model was built (one class for each phosphate concentration). The corresponding PLS-DA score plot showed a similar trend to the one observed for the PCA score plot (Figure IV.2B.). The different biofilm samples were distinguished due to the first component (32.3% of the total variance) from the richest (C₅) phosphate-containing culture medium to the lowest (C₁). The second component (10.1% of the total variance) accentuated the difference between C₂ and the other culture conditions. The overall quality of the model was evaluated as good through a 10-fold internal cross-validation giving R^2 , Q^2 and Q^2/R^2 values greater than 0.5 ($R^2_{1 \text{ comp.}} = 0.86$, $Q^2_{1 \text{ comp.}} = 0.69$ and $Q^2_{1 \text{ comp.}}/R^2_{1 \text{ comp.}} = 0.80$) while a permutation test ($n = 100$, $p = 0.01$) allowed for its validation (Triba et al. 2015).

So, the fluctuations of the metabolome of biofilms of *P. lipolytica* TC8 through the progressive variation of phosphate concentration in the culture medium induced a progressive and correlated biosynthetic response of bacterial cells.

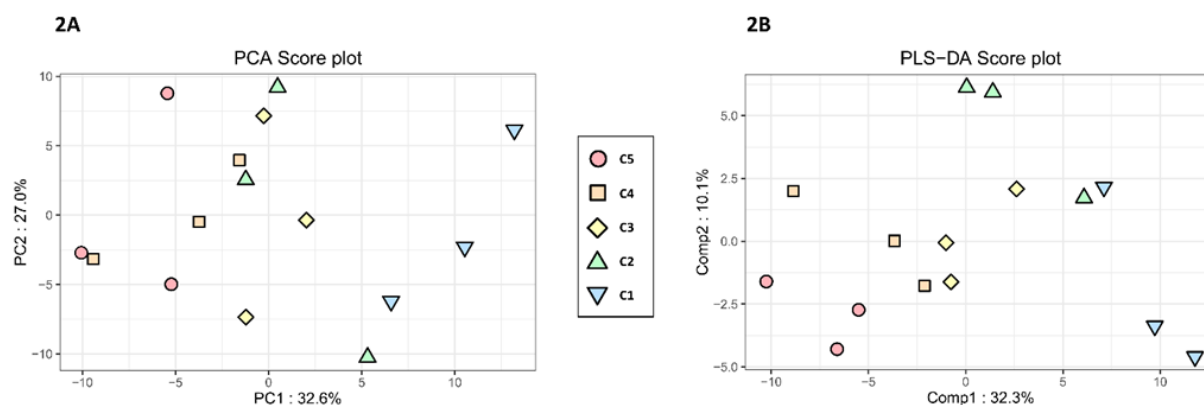


Figure IV.2. : PCA (2A) and PLS-DA (2B) score plots obtained from (+)-ESI-LC-MS profiles of extracts ($n = 3$) of biofilms of *P. lipolytica* TC8 obtained with various phosphate concentrations (from C1: 10^{-4} nM to C5: 1.32 nM).

4.4. Discrimination of biofilms of *P. lipolytica* TC8 depending on the phosphate concentration by LC-MS-based metabolomics

The next step of this study was to identify the metabolites which were the most differentially expressed by biofilms of *P. lipolytica* TC8 according to the five different culture conditions. Through the predictive PLS-DA five-model, the most discriminant m/z features were determined among the whole dataset using their VIP score (Tableau IV.2. and Supplemental Tableau S.IV.1.). The annotation of metabolites of interest is always a delicate step in LC-MS-based metabolomics, as many of the LC-MS signals are inherent to samples collection and treatment (e.g. contaminants, degradation products), or related to a single molecule (e.g. adducts, fragments). At the beginning of the annotation process, a m/z feature can be defined by: (i) retention time, (ii) accurate mass and then molecular formula, and eventually (iii) MS/MS fragmentation pattern (fragment ions, neutral losses). If a chemical standard is available, the comparison of these three criteria (or at least of the first two) with those of the unknown feature leads easily to a robust and efficient annotation. If this is not the case, the search for accurate mass/molecular formula with or without MS/MS data in the literature regarding the studied organism and/or in specialized databases (e.g. PubChem, HMDB, MetLin, Lipidmaps) can also allow for the annotation of a specific m/z feature, however with a lower level of confidence (Chaleckis et al. 2019). More recently, a bioinformatic tool known as molecular networking (MN) has been developed and allows, on the theoretical basis that similar chemical structures tend to give closely-related MS/MS data, for the facilitation of the annotation step of the LC-MS-based metabolomics workflow (Watrous et al. 2012). Such a MN provides a map of the chemical space of a set of samples where nodes can be annotated not only

by spectral comparison with spectral libraries and commercial/in-house compound databases (Ramos et al. 2019), but also by comparing their MS/MS data with those of other nodes found in a common cluster (e.g. (Carriot et al. 2021)).

From the LC-MS/MS data obtained with the biofilm samples of *P. lipolytica* TC8, a molecular network (MN) was built (Figure IV.3.). It was constituted by 109 nodes, most gathered in seven main clusters (labelled from A to I), from which 36 were also found in the filtered MS data matrix used for the building of the five-class PLS-DA model (58% of the metabolites of the matrix appeared in the MN). The differences between the number of nodes detected in the MN and the number of m/z features of the filtered data matrix were due to: (i) the data dependent acquisition parameters used here which did not allow for the weaker ions in a first stage of tandem MS to be analyzed in MS/MS, and (ii) the filtering steps used for the MS data matrix (but not for the MS/MS data from which the MN was built).

When focusing on the ten main VIPs (Tableau IV.2.) of the five-class PLS-DA model, seven of them were detected in the MN. VIPs n°1, 2, and 4 were found in cluster B, together with two other nodes (Figure IV.3.). The MS/MS fragmentation pattern of these five m/z features has already been observed in previous studies of this same bacterial strain (Favre et al. 2017, 2018, 2019). These compounds all showed an intense diagnostic fragment ion at m/z 115.09 ($C_5H_{11}N_2O_2$), as well as other ions at m/z 133 ($C_5H_{13}N_2O_2$) and 70 (C_4H_8N) (Supplemental Figure S.IV.3), which are characteristic of amino-acid lipids known as ornithine lipids (OLs) (Moore et al. 2016). The characteristic MS/MS fragmentation of OLs included the sequential loss of (i) H_2O from the ornithine part, (ii) the fatty acid chain esterified to the hydroxyl group of the ornithine-linked fatty acid, and (iii) the amide-linked fatty acid (Zhang et al. 2009). On the basis of this MS/MS fragmentation pattern, VIPs n°1, 2 and 4 were annotated as OL (18:1/18:1), OL (16:0, 16:0) and OL (18:1/16:0), respectively. In the same way, the two other nodes of cluster B were unambiguously identified as *lyso*-OL (18:1) and *lyso*-OL (16:0). For VIP n°3, a specific tandem MS/MS run specifically targeted on the corresponding ion allowed for an interpretable MS/MS spectrum and the annotation of this VIP as OL (14:0, 18:0).

VIP n°5 was detected in cluster C and revealed a molecular formula ($C_{19}H_{36}O_4$) and a MS/MS fragmentation pattern in accordance with those of a monoacylglycerol bearing a C16:1 fatty acyl chain (Figure IV.3., Tableau IV.2. and Supplemental Figure S.IV.3.) (Gao et al. 2016). More precisely, from the protonated molecule (m/z 329.2693, $[C_{19}H_{37}O_4]^+$), the observed fragment ions on the MS/MS spectrum were assigned to the loss of: (i) H_2O through the ion observed at m/z 311.2580 $[C_{19}H_{35}O_3]^+$ ($[M - H_2O + H]^+$), (ii) the glycerol part on the basis of the acylium ion at m/z 237.2216 $[C_{16}H_{29}O]^+$ and the corresponding dehydrated ion at

m/z 219.2111 $[\text{C}_{16}\text{H}_{27}]^+$, and (iii) the acyl chain through the ion at m/z 75.0442 $[\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2]^+$ ($[\text{M} - \text{RCOOH} + \text{H}]^+$). The same detailed analysis of MS/MS data of the other nodes of this cluster allowed for the annotation of another monoacylglycerol derivative and three fatty acids (Figure IV.3.).

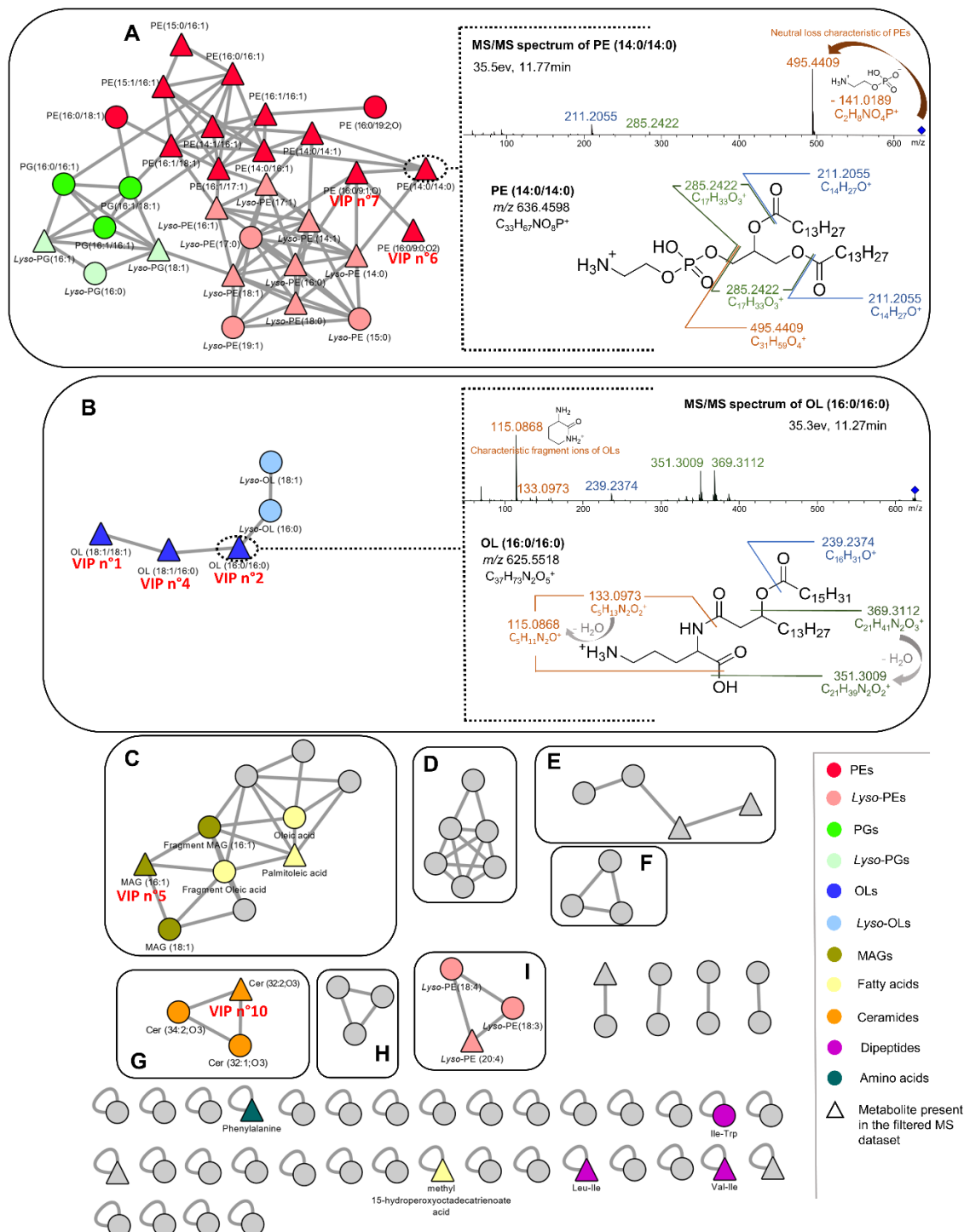


Figure IV.3. : Molecular network built with (+)-ESI-LC-MS/MS data of extracts of biofilms of *P. lipolytica* TC8 with putatively annotated nodes and also MS/MS spectra and MS/MS fragmentation patterns of two specific compounds [PE (14:0/14:0) and OL (16:0/16:0)].

VIPs n° 6 and 7 were included in the largest cluster of the MN (cluster A, Figure IV.3.). A large part of the nodes constituting this cluster were characterized by a MS/MS spectrum showing the most intense fragment ion obtained following a neutral loss of m/z 141.02 ($C_2H_8NO_4P$) from the precursor ion (Supplemental Figure IV.3.). Such a fragmentation pattern is typical of phosphatidylethanolamines (PEs) and corresponds to the loss of the phosphoethanolamine moiety (Godzien et al. 2015; Suárez-García et al. 2017). Thus, VIP n°6 (m/z 624.3879, $[C_{30}H_{59}NO_{10}P]^+$) was putatively annotated as the oxidized PE (16:0/9:0, O2) using fragment ions at m/z 313.2732 $[C_{19}H_{37}O_3]^+$ ($[M - C_2H_8NO_4 - C_{9:0(2O)} + H]^+$) and 245.1381 $[C_{12}H_{21}O_5]^+$ ($[M - C_2H_8NO_4 - C_{16:0} + H]^+$) for the characterization of the fatty acid groups (Tableau IV.2.). Using the same procedure, the VIP n°7 was annotated as the oxidized PE (16:0/9:1; O), while 12 nodes of the same cluster were identified as PEs and 10 others as *lyso*-PEs. Moreover, the six remaining nodes observed in cluster A were annotated as phosphatidylglycerol lipids (PGs) on the basis of a neutral loss of m/z 172.01 from the precursor ion, giving intense fragment ions observed on their MS/MS data (Murphy and Axelsen 2011). Three additional *lyso*-PEs were also detected in the MN and constituted cluster I. The fact that these three nodes were not included into the cluster A can be explain by the occurrence of highly unsaturated acyl chains in their chemical structure, which should give specific MS/MS fragment ions. As for VIP n°3, a specific LC-MS/MS run allowed for the fragmentation of the ion corresponding to VIP n°8 and the annotation of this metabolite as the oxidized PE (16:1/9:1; O).

VIP n°10 was observed in cluster G (Figure IV.3.) and, as with the two other nodes of this cluster, showed a molecular formula and a MS/MS fragmentation pattern in accordance with those of ceramide lipids (Tableau IV.2. and Supplemental Figure S.IV.3.) (Hsu 2016).

Other compounds, such as dipeptides or phenylalanine, were also identified in the MN leading to the final annotation of 53 metabolites belonging to eight chemical families.

Thus, using MN and analysis of MS/MS fragmentation pattern, nine from the ten first VIPs and 32 from the 62 m/z features of the final data matrix were putatively annotated (Tableau IV.2., Supplemental Tableau S.IV.1. and Figure S.IV.3.).

VIP number	m/z	RT (min)	VIP score	Molecular formula ^a	Mass error (ppm)	mσ ^b	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative annotation
1	677.5837	11.35	4.21	C ₄₁ H ₄₈ N ₂ O ₅	-1.5	2.9	395.3274 [C ₂₇ H ₄₂ N ₂ O ₃] ⁺ (88); 377.3168 [C ₂₇ H ₄₁ N ₂ O ₃] ⁺ (82); 280.2653 [C ₁₈ H ₂₆ NO] ⁺ (1); 263.2373 [C ₁₈ H ₂₅ O] ⁺ (12); 159.0770 [C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₃] ⁺ (7); 141.0662 [C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃] ⁺ (2); 133.0977 [C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂] ⁺ (6); 115.0870 [C ₉ H ₁₁ N ₂ O] ⁺ (100); 70.0652 [C ₆ H ₈ N] ⁺ (26)	OL (18:1/18:1)
2	625.5501	11.16	3.16	C ₃₇ H ₄₂ N ₂ O ₅	1.8	8.0	369.3112 [C ₂₁ H ₄₁ N ₂ O ₃] ⁺ (47); 351.3010 [C ₂₁ H ₃₉ N ₂ O ₃] ⁺ (46); 254.2479 [C ₁₈ H ₂₇ NO] ⁺ (1); 239.2374 [C ₁₈ H ₂₅ O] ⁺ (3); 159.0769 [C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₃] ⁺ (6); 141.0661 [C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃] ⁺ (5); 133.0975 [C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂] ⁺ (5); 115.0868 [C ₉ H ₁₁ N ₂ O] ⁺ (100); 70.0653 [C ₆ H ₈ N] ⁺ (23)	OL (16:0/16:0)
3	625.5519	11.77	2.92	C ₃₇ H ₄₂ N ₂ O ₅	-0.9	7.9	341.2808 [C ₁₉ H ₃₇ N ₂ O ₃] ⁺ (2); 323.2699 [C ₁₉ H ₃₅ N ₂ O ₃] ⁺ (2); 133.0975 [C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂] ⁺ (5); 115.0868 [C ₉ H ₁₁ N ₂ O] ⁺ (100); 70.0653 [C ₆ H ₈ N] ⁺ (23)	OL (14:0/18:0) ^c
4	651.5677	11.25	2.81	C ₃₉ H ₄₄ N ₂ O ₅	-1.0	4.4	395.3280 [C ₂₃ H ₄₃ N ₂ O ₃] ⁺ (37); 377.3172 [C ₂₃ H ₄₁ N ₂ O ₃] ⁺ (36); 280.2657 [C ₁₈ H ₂₆ NO] ⁺ (1); 237.2219 [C ₁₈ H ₂₅ O] ⁺ (6); 159.0768 [C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₃] ⁺ (6); 141.0661 [C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₃] ⁺ (4); 133.0975 [C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₂] ⁺ (6); 115.0869 [C ₉ H ₁₁ N ₂ O] ⁺ (100); 70.0654 [C ₆ H ₈ N] ⁺ (28)	OL (18:1/16:0)
5	329.2693	10.12	1.87	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	-2.1	15.8	311.2580 [C ₁₉ H ₃₀ O ₃] ⁺ (11); 237.2216 [C ₁₈ H ₂₉ O] ⁺ (30); 219.2111 [C ₁₈ H ₂₇] ⁺ (36); 81.0700 [C ₆ H ₈] ⁺ (100); 75.0442 [C ₆ H ₇ O ₂] ⁺ (4)	MAG (16:1)
6	624.3879	9.81	1.27	C ₃₈ H ₄₈ NO ₁₀ P	-1.2	17.8	483.3675 [C ₂₈ H ₄₀ O ₄] ⁺ (100); 313.2732 [C ₁₈ H ₂₇ O ₃] ⁺ (4); 245.1381 [C ₁₇ H ₂₇ O ₃] ⁺ (5); 239.2370 [C ₁₈ H ₂₅ O] ⁺ (4); 216.0636 [C ₉ H ₁₅ NO ₈ P] ⁺ (1); 171.102 [C ₉ H ₁₅ O ₃] ⁺ (9); 155.0102 [C ₉ H ₁₀ O ₃ P] ⁺ (1); 62.0606 [C ₂ H ₆ NO] ⁺ (11)	PE (16:0/9:0;O2)
7	608.3920	10.18	1.19	C ₃₈ H ₄₈ NO ₁₀ P	0.2	3.5	467.3729 [C ₂₈ H ₄₀ O ₄] ⁺ (100); 313.2734 [C ₁₈ H ₂₇ O ₃] ⁺ (4); 239.2365 [C ₁₈ H ₂₅ O] ⁺ (7); 229.1436 [C ₁₂ H ₂₁ O ₄] ⁺ (5); 216.0636 [C ₉ H ₁₅ NO ₈ P] ⁺ (1); 155.1064 [C ₉ H ₁₅ O ₃] ⁺ (7); 155.0091 [C ₉ H ₁₀ O ₃ P] ⁺ (1); 62.0600 [C ₂ H ₆ NO] ⁺ (1)	PE (16:0/9:1;O)
8	606.3770	9.90	0.98	C ₃₈ H ₄₈ NO ₁₀ P	-1.9	22.6	465.3577 [C ₂₈ H ₄₀ O ₄] ⁺ (100); 311.2586 [C ₁₈ H ₂₇ O ₃] ⁺ (5); 237.2221 [C ₁₈ H ₂₅ O] ⁺ (7); 229.1440 [C ₁₂ H ₂₁ O ₄] ⁺ (5); 155.1062 [C ₉ H ₁₅ O ₃] ⁺ (4); 155.0108 [C ₉ H ₁₀ O ₃ P] ⁺ (1); 62.0597 [C ₂ H ₆ NO] ⁺ (1)	PE (16:1/9:1;O) ^c
9	421.2234	10.80	0.97	C ₂₃ H ₃₂ O ₇	-3.1	34.5	Not fragmented	—
10	524.4680	12.0	0.91	C ₃₂ H ₄₂ NO ₄	-1.3	5.7	506.4571 [C ₂₇ H ₄₀ NO ₃] ⁺ (1); 342.3001 [C ₂₀ H ₃₀ NO ₃] ⁺ (7); 324.2896 [C ₂₀ H ₂₈ NO ₃] ⁺ (3); 281.2480 [C ₁₈ H ₂₈ O ₃] ⁺ (4); 270.2424 [C ₁₈ H ₂₆ NO ₃] ⁺ (100); 227.2013 [C ₁₈ H ₂₇ O ₃] ⁺ (3); 106.0865 [C ₉ H ₁₂ NO ₂] ⁺ (6); 88.0758 [C ₈ H ₁₀ NO] ⁺ (9)	Cer (32:2;O3)

^a All these metabolites were observed as protonated molecules [M+H]⁺. ^b Constructor statistical match factor (comparison of theoretical and experimental isotopic patterns). ^c VIP fragmented by targeted MS/MS analysis

Tableau IV.2. : List of the first ten biomarkers (VIPs) identified by LC-MS for the chemical discrimination of biofilm extracts of *P. lipolytica* TC8 according to the phosphate concentration.

4.5. Membrane lipid adaptation of *P. lipolytica* TC8 under phosphate-limiting conditions

Depending on the phosphate concentration, the amounts of the most representative VIPs were given as boxplots in Figure IV.4. These results revealed that several OLs (VIPs n°1 to 4) and a monoacylglycerol (VIP n°5) were increasingly biosynthesized by the bacterial cells as soon as the phosphate concentration decreased in the culture medium. About 50% of the sequenced bacteria (mainly Gram-negative bacteria) can biosynthesize OLs and these non-phosphorous glycolipids are found more abundantly in the outer part of bacterial membranes (Sohlenkamp and Geiger 2015). In several studies, the occurrence of OLs has been demonstrated to be related to abiotic stresses such as nutrient-limiting conditions (in most cases, phosphate-limiting conditions; e.g. Lewenza et al. 2011), osmotic stress (e.g. Lopalco et al. 2013), increased temperatures or acidic conditions (Vences-Guzmán et al. 2012). The role of these aminolipids in non-stress related phenotypes has been also addressed (See in (Sohlenkamp 2019). Our findings were thus in accordance with previous studies dealing with the effect of P limitations

on bacterial membranes through an increase in the production of non-phosphorous lipids (Barbosa et al. 2018; Benning et al. 1995; Geiger et al. 2010; Lewenza et al. 2011).

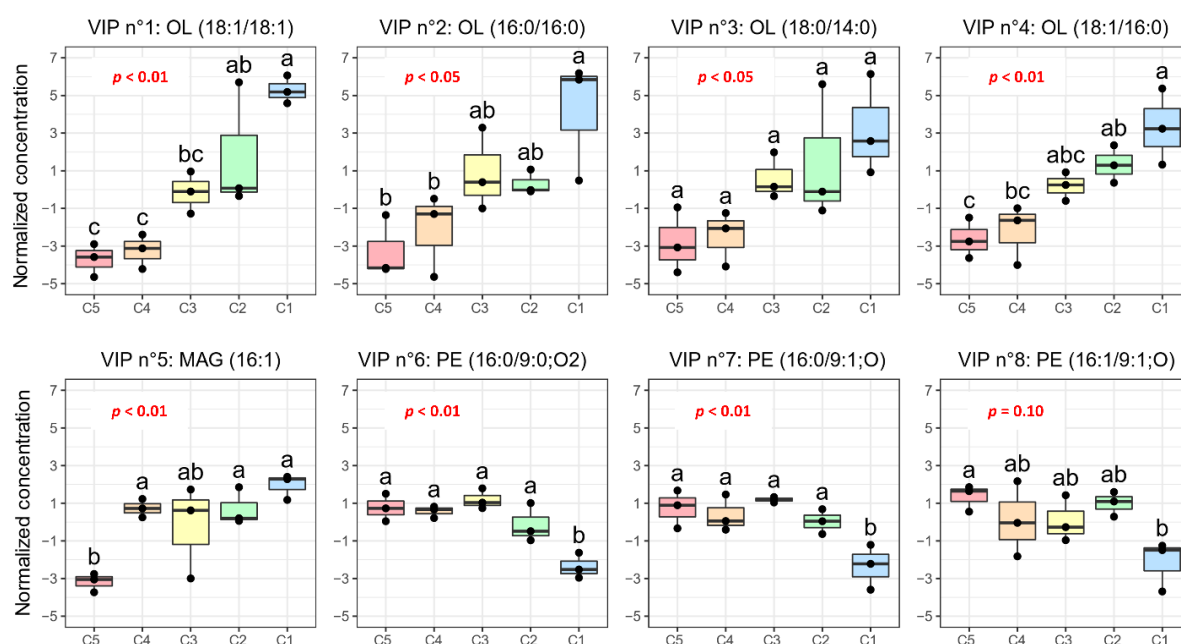


Figure IV.4. : Normalized concentrations of the eight metabolites with the highest VIP scores implied in the chemical discrimination between biofilms of *P. lipolytica* TC8 grown with various phosphate concentrations (from C1: 10⁻⁴ nM to C5: 1.32 nM). p -values and “a,” “b,” “c” indexes corresponded to the results of one-way ANOVA analyses and post hoc tests (HSD Tukey’s test), respectively.

Consistent with these first findings, three PEs (VIPs n°6 to 8) were under-expressed when the phosphate concentration decreased. Surprisingly, these three metabolites are oxidized PEs, while all the other annotated “non-oxidized” phospholipids (i.e. PEs, lyso-PEs, PGs and lyso-PGs) of the final dataset were not differentially expressed depending on the different phosphate concentrations. These results agreed with a previous study dealing on *P. lipolytica* TC8 cultures in non-limited phosphate conditions which has highlighted that PEs were mainly produced in biofilms rather than in planktonic cultures (Favre et al. 2018). They differed from several other studies which have described an important shift in the bacterial membrane composition, leading to a decrease production of phospholipids, such as PEs, and their subsequent substitution with non-phosphorous lipids, such as OLs, under P-limiting conditions (i.e. (Sandoval-Calderón et al. 2015).

The fact that only oxidized PEs were impacted by phosphate concentration was quite interesting given that oxidized phospholipids have been attracting more and more interest over the past few years, especially in the medical field (Nie et al. 2020). In the case of membranes, the

occurrence of oxidized phospholipids can drastically affect their properties and their organization (Tyurina et al. 2019).

5. Conclusion

The objective of this work was to evaluate the impact of phosphate-limiting conditions on biofilms of the bacterial strain *P. lipolytica* TC8 which had already shown its propensity to biosynthesize alternative non-phosphorous analogues to phospholipids (Favre et al. 2017, 2018). If the effect of various environmentally-relevant phosphate concentrations was moderate on the biomass, the gross polymeric composition and the structure of the biofilms of *P. lipolytica* TC8 formed *in vitro*, an untargeted LC-MS-based metabolomics analysis revealed clear differences at the metabolome level. Combining drastic filtering steps and annotation through MN, this metabolomics approach demonstrated that phosphate concentration generated significant changes in the chemical composition of membranes with higher amounts of the non-phosphorous OLs at low phosphate concentrations. Conversely, a decrease of oxidized PEs was observed in the same culture conditions, while the biosynthesis of non-oxidized PEs remained globally unchanged. Together with and in addition to previous works (Favre et al. 2017, 2018, 2019), all results agreed with the fact that *P. lipolytica* TC8 testified to a certain plasticity of membrane lipid composition in response to phenotypic and environmental changes. In the marine environment, bacteria must be able to adapt their membranes to maintain their biological functions. As environmental conditions are multiple and changing, associating a modification of the cytoplasmic membrane with an environmental condition is complicated in marine environment. Here, the fact of studying a single fluctuation allowed us to describe the impact of phosphate deficiency on the adaptation of the membrane of a marine bacterial strain cultivated in biofilm. This mechanism could be a selective advantage for bacteria present in environments experiencing rapid and massive P concentration changes, such as those found in estuaries (Li et al. 2017; Lochet and Leveau 1990).

Further research should focus on the specific roles of the oxidized PEs described here and on the full characterization of their chemical structure through targeted natural products chemistry and annotation using MN (Carriot et al. 2021). Moreover, the coupling of such a metabolomics approach with other omics and their application to natural biofilms sampled in marine environments with P-contrasted conditions could be useful to better understand the adaptative strategies developed by marine bacteria upon P deficiency.

6. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr S. Greff (Aix-Marseille University, IMBE, France) for the acquisition of LC-MS profiles and for the helpful discussions, and J. Dechaux (Université de Toulon, MAPIEM) for her help during the culture of biofilms and their subsequent extraction and analysis. The authors are also grateful to S. Ortalo-Magné for her careful English language editing of the manuscript. JFB, AOM and GC conceived and designed research. NC and RBM conducted experiments. NC, AOM and GC analyzed data. NC, JFB, AOM and GC wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript. This work was funded by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation and the University of Toulon (PhD. grant of N. Carriot). LC-MS experiments were conducted on the regional metabolomics platform MALLABAR funded by the Institute of Ecology and Environment (INEE) of the French National Centre for Scientific Research (CNRS), the Total Foundation and the French Sud-PACA regional council.

7. Data availability

The metabolomics and metadata reported in this paper are available as supplementary material (Table S1). Raw data for LC-ESI-(+)-MS/MS experiments were deposited and are publicly available on the MassIVE platform under the IDs MSV000083860.

8. Annexes Chapitre IV

Supporting information for

Impact of phosphate concentration on the

metabolome of biofilms of the marine bacterium

Pseudoalteromonas lipolytica

Nathan Carriot¹, Raphaëlle Barry-Martinet¹, Jean-François Briand¹, Annick Ortalo-Magné^{1,*},
Gérald Culioli^{1,2*}

¹Université de Toulon, Laboratoire MAPIEM, EA 4323, La Garde, France

²Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), UMR
CNRS-IRD-Avignon Université-Aix-Marseille Université, Avignon, France

Corresponding authors: Annick Ortalo-Magné (ortalo@univ-tln.fr),
Gérald Culioli (gerald.culioli@univ-avignon.fr)

Orcid ID: Nathan Carriot (0000-0001-8732-2755)
Raphaëlle Barry-Martinet (0000-0002-9147-7503)
Jean-François Briand (0000-0001-8729-2621)
Annick Ortalo-Magné (0000-0001-8899-3067)
Gérald Culioli (0000-0001-5760-6394)

Figure S.IV.1 : Carbohydrate (**A**) and protein (**B**) contents (DuBois and modified Bradford methods, respectively) of biofilms of *P. lipolytica* TC8 according to the phosphate concentration in the culture media. “a,” “b,” “c” indexes corresponded to the results of post hoc tests (HSD Tukey’s test).

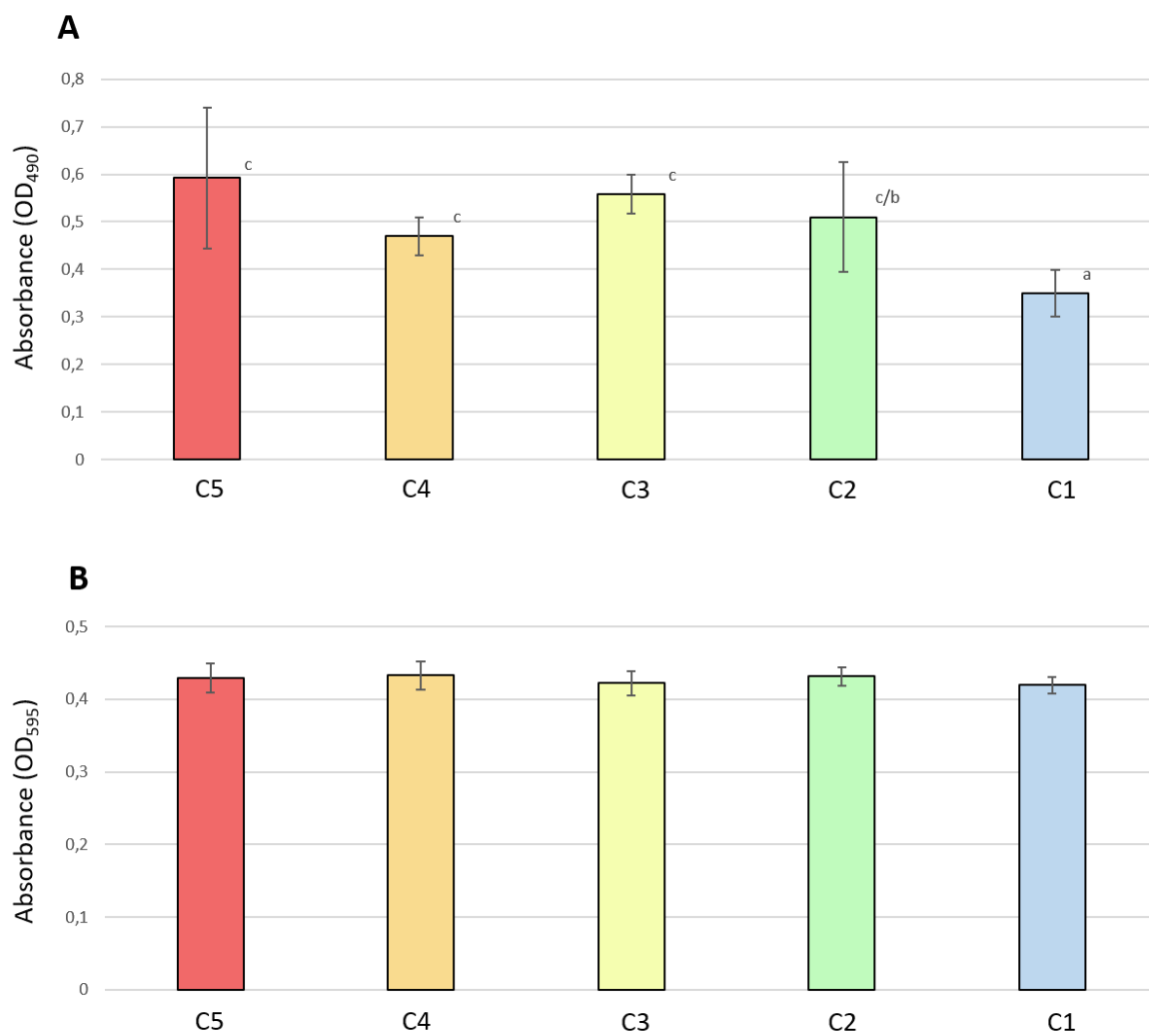


Figure S.IV.2 : PCA score plot obtained from (+)-ESI-LC-MS profiles of extracts of biofilms of *P. lipolytica* TC8 obtained in culture media with various phosphate concentrations (from C1: 10^{-4} nM to C5: 1.32 nM; $n = 15$), QC samples ($n = 6$) and blanks ($n = 16$).

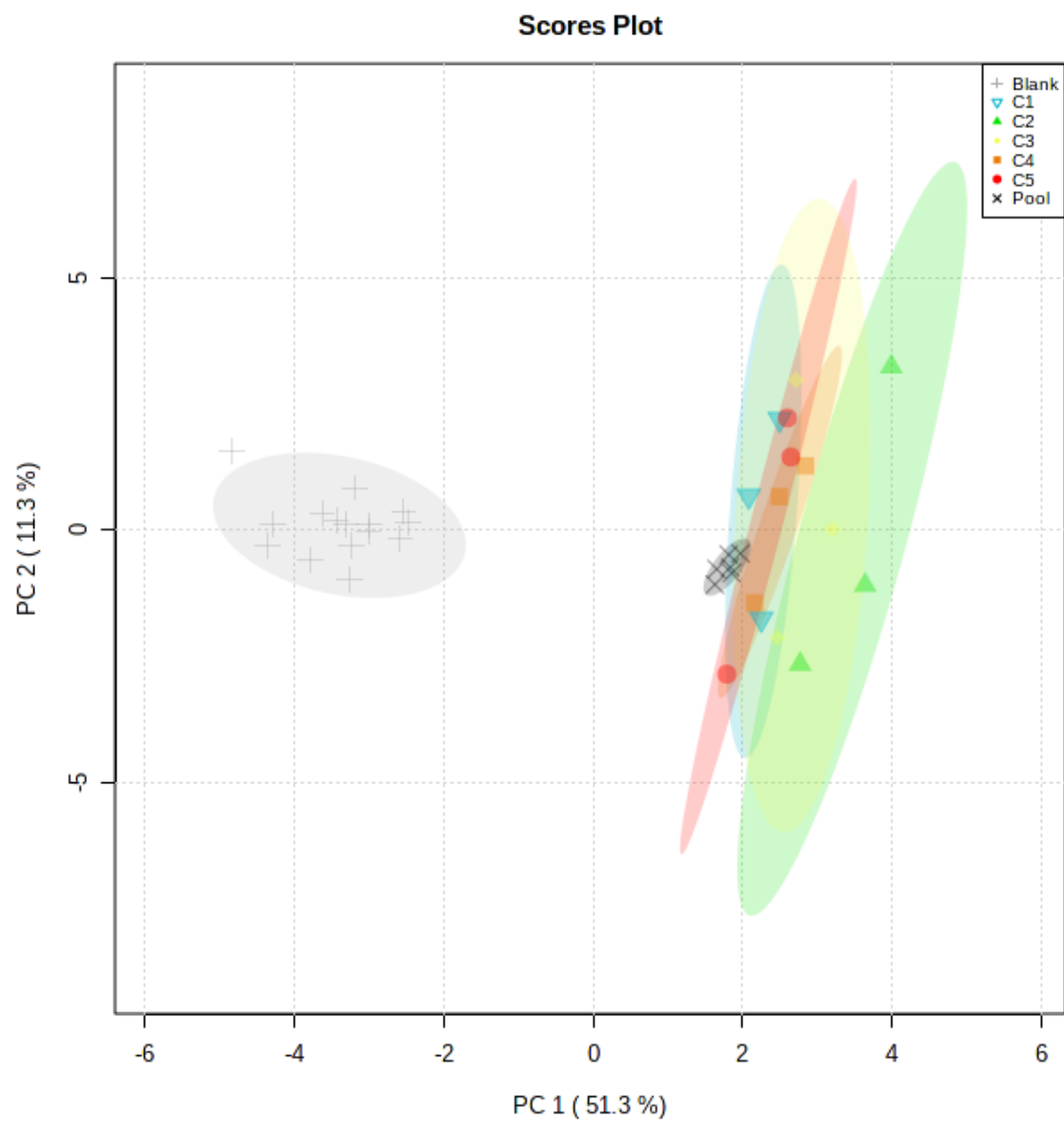


Figure S.IV.3 : MS/MS spectra of nine of the ten first VIPs implied in the chemical discrimination of biofilm extracts of *P. lipolytica* TC8 according to the phosphate concentration (**Part 1/2**).

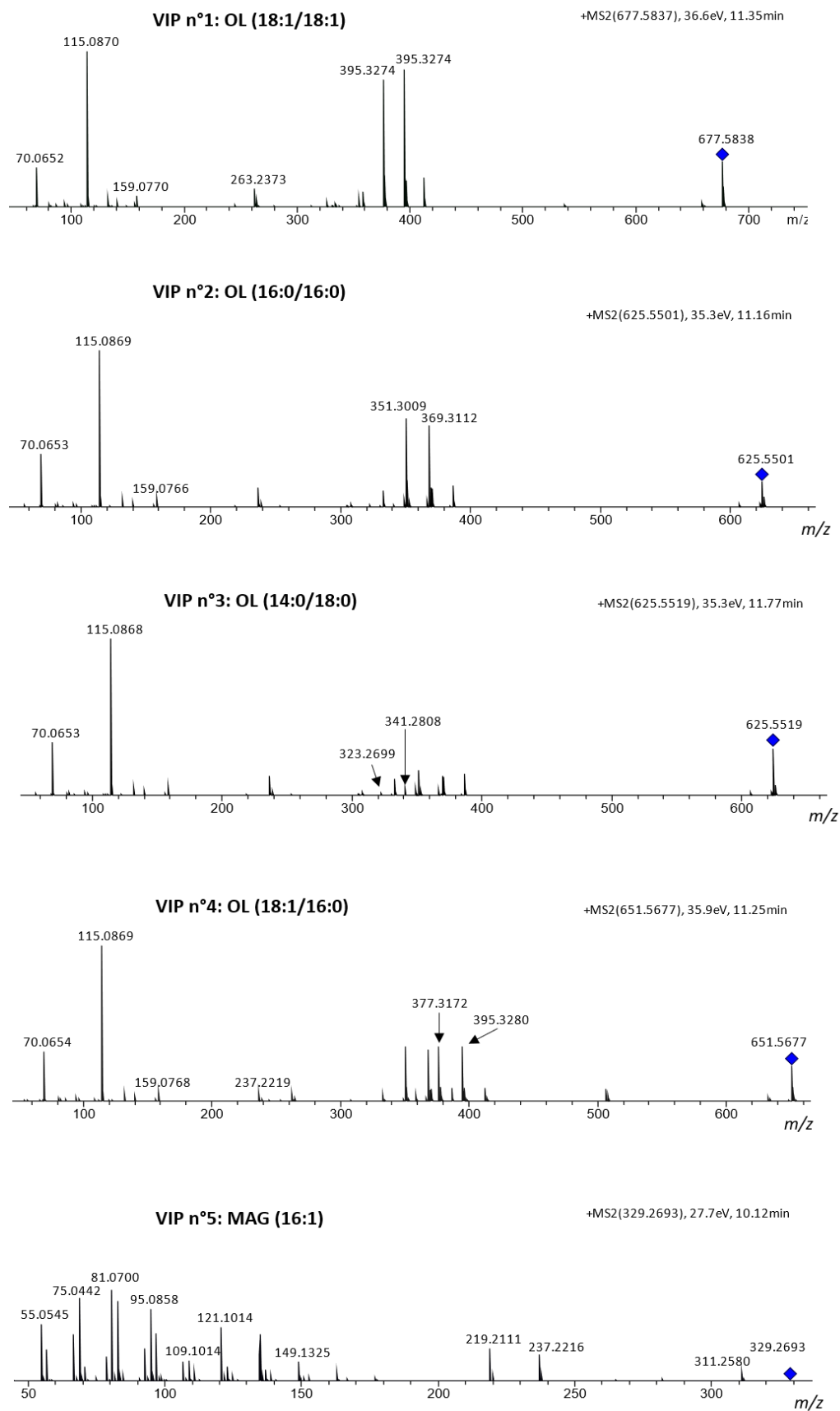
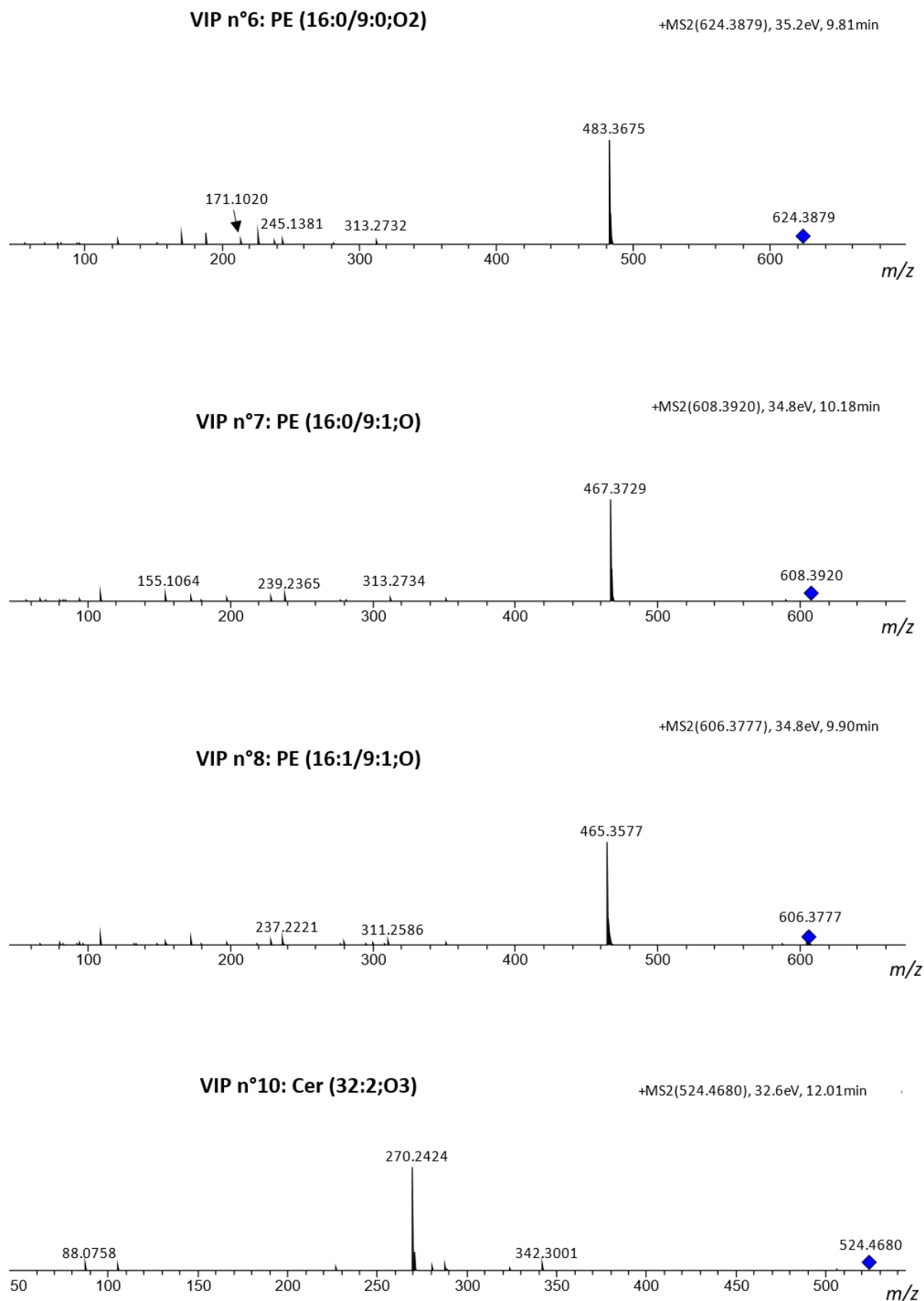


Figure S.IV.4. : MS/MS spectra of nine of the ten first VIPs implied in the chemical discrimination of biofilm extracts of *P. lipolytica* TC8 according to the phosphate concentration (**Part 2/2**).



CHAPITRE V

Effets de la perturbation du *quorum sensing*
par l'action de la lactonase *SsoPox*
sur la bactérie *Chromobacterium violaceum*



A. Avant-propos

Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*

Sonia Mion[#], Nathan Carriot[#], Julien Lopez, Laure Plener, Annick Ortalo-Magné, Éric Chabrière, Gérald Culioli & David Daudé

[#] Ces auteurs ont contribué à parts égales

Article 3 : Publié dans **npj Biofilm and Microbiomes** le 22/04/2021

<https://doi.org/10.1038/s41522-021-00211-w>

Contexte de l'étude :

Les biofilms sont connus pour accélérer la dégradation des matériaux utilisés en milieu marin. L'inhibition de la formation des biofilms marins est donc un enjeu économique crucial à l'échelle planétaire. Une stratégie de lutte originale consisterait à inhiber des mécanismes de communication bactérienne (*quorum sensing*, QS), cellule-cellule, impliqués dans la formation et le maintien des biofilms (par *quorum quenching*, QQ) (Galloway et al. 2012). Ainsi, la découverte de la lactonase *SsoPox*, capable de dégrader spécifiquement des molécules de communication bactérienne et présentant une stabilité lui permettant d'être potentiellement utilisée dans une large gamme d'applications, constitue une piste prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies *antifouling* plus respectueuses de l'environnement. Les techniques dites « omiques » permettent d'étudier l'ensemble de la production métabolique (ADN, ARNm, protéines, métabolites) d'un organisme. Les approches omiques ont permis d'explorer le vivant sous un nouvel angle et offrent la visualisation totale des processus biologiques mis en jeu. L'application de ces approches à l'étude de microorganismes a ainsi déjà conduit à l'identification de molécules et de voies biosynthétiques d'intérêt comme celle des flavonoïdes par exemple (Li et al. 2021).

Méthodologie appliquée :

Dans ce chapitre, une première analyse multi-omique va être mise en place couplant les informations issues d'approches métabolomique et protéomique. Associée à l'identification d'enzymes impliquées dans le QS via une analyse protéomique, la métabolomique peut améliorer la compréhension des voies de biosynthèse de signaux chimiques directement impliqués dans le QS ou de molécules dont la production est induite via le QS. De plus, l'approche multi-omique par réseau mis

en place avec le package R MixOmics (<http://mixomics.org/>) est un outil très utile pour représenter les corrélations entre protéines et métabolites en fonction des conditions appliquées. Le workflow de l'analyse multi-omique liant protéomique et métabolomique est représenté dans la figure V.1.

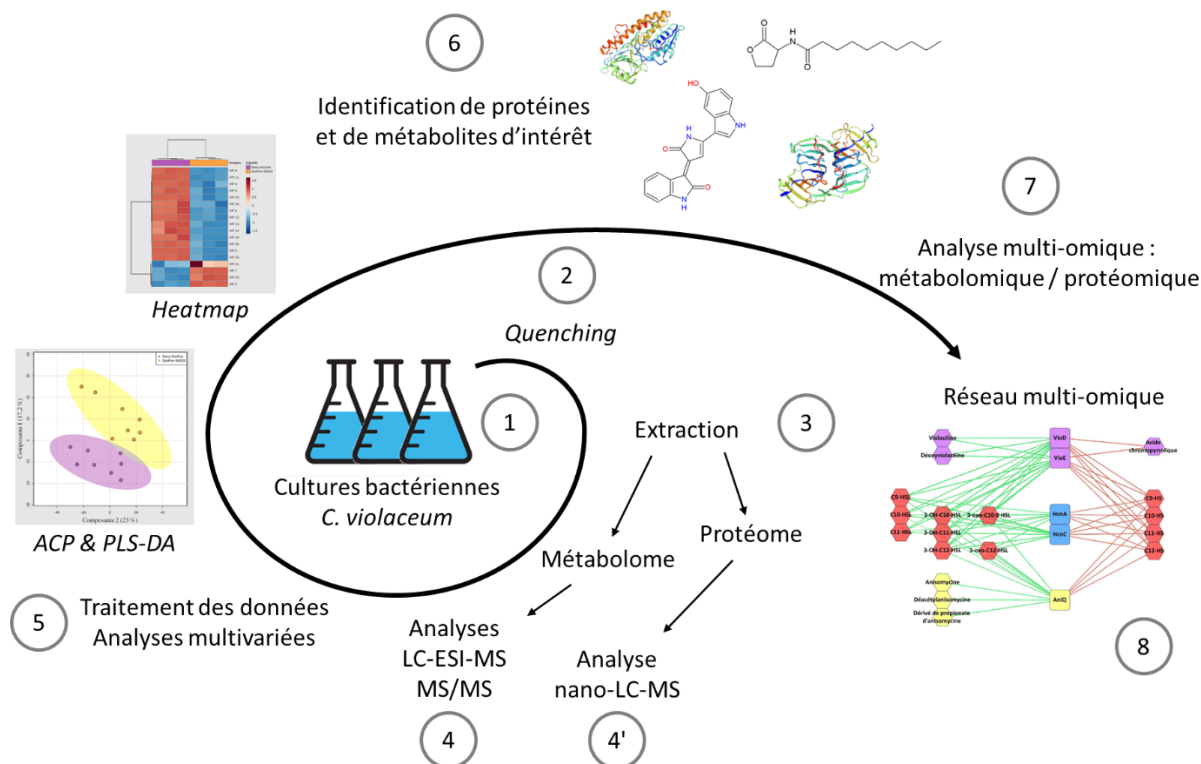


Figure V.1. : Workflow de l'analyse multi-omique liant métabolique et protéomique

Question scientifique :

Le but de cette étude est de déterminer l'action inhibitrice du QS de la lactonase *SsoPox*-W263I vis-à-vis de la bactérie *Chromobacterium violaceum* ATTC 12472, un biosenseur connu pour produire spécifiquement un pigment violet (la violacéine) en présence de certaines molécules de communication impliquées dans le QS (AHLs). Pour cela, une méthodologie analytique basée sur une approche multi-omique associant métabolomique et protéomique a été utilisée. Dans ce contexte, il nous faut répondre à la question suivante : Quel est l'impact de l'enzyme *SsoPox* sur la production métabolique et protéomique de *C. violaceum* ? En répondant à cette question et en étudiant la production métabolique de certains composés connus pour agir dans les interactions du QS (Violacéines, AHLs, ...), une question plus large peut être posée : Quel est l'impact du QQ sur les relations de *C. violaceum* avec d'autres organismes ?

Résumé des résultats :

De manière globale, les résultats démontrent une action inhibitrice du QS de la lactonase *SsoPox*-W263I sur *C. violaceum* ATTC 12472 induisant des modifications majeures de son métabolome et mineures de son protéome. Le variant *SsoPox*-W263I est donc une enzyme présentant un grand potentiel pour des applications en QQ dans différents domaines. L'approche multi-omique par réseau a permis de faciliter l'identification de protéines en lien avec des métabolites d'intérêt (Figure V.2.). L'effet de l'enzyme *SsoPox* W263I a été confirmé par la diminution de la production des AHL dans les échantillons traités et la détection des formes hydrolysées de certains d'entre eux (C9-HS, C10-HS, C11-HS et C12-HS). De plus, *SsoPox* W263I a également induit une diminution de la production de cyanure d'hydrogène et de violacéine observée aux niveaux protéomique, métabolomique et phénotypique.

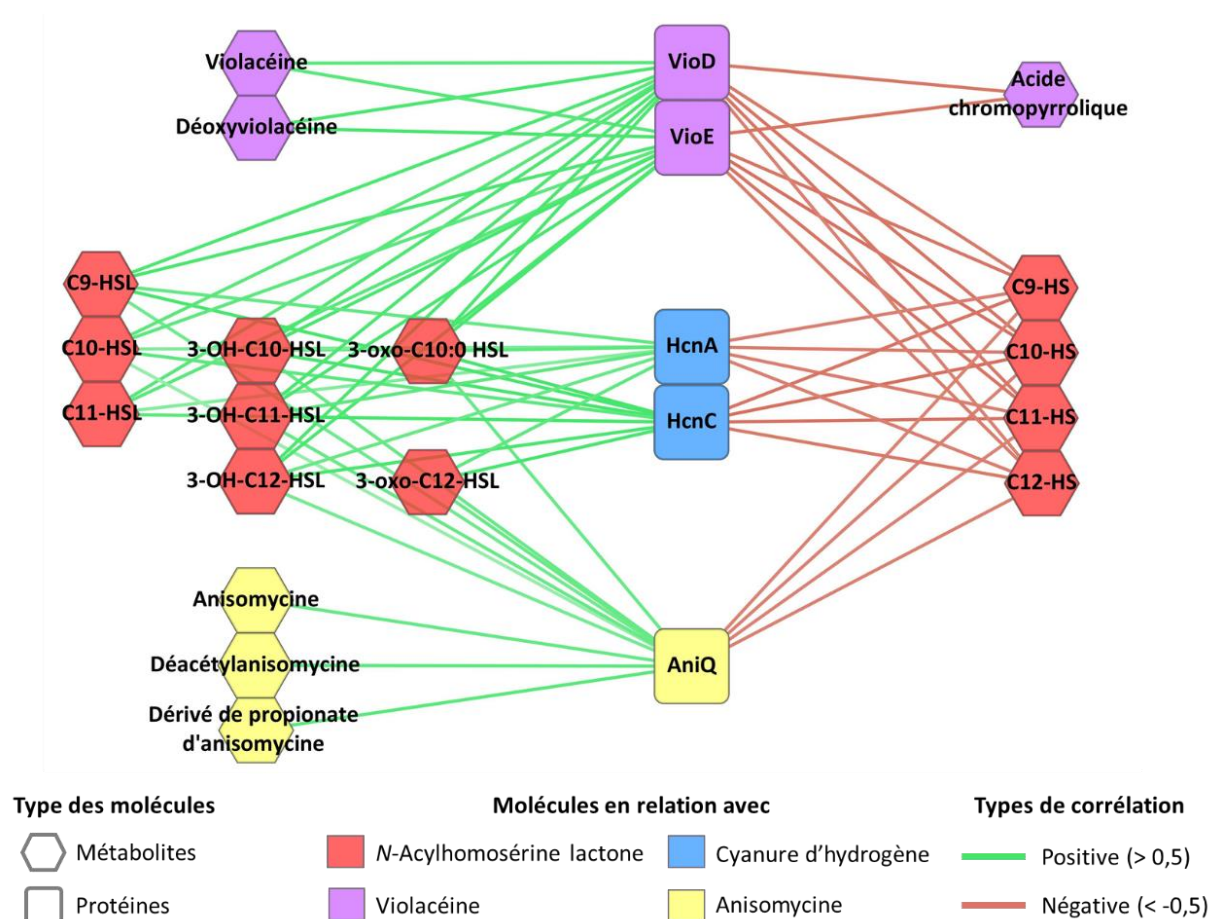


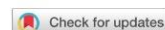
Figure V.2. : Réseau multi-omique liant une sélection de données de protéomique et de métabolomique. Seules les molécules associées au QS (rouge), à la biosynthèse de la violacéine (violet), de l'anisomycine (jaune) et du cyanure d'hydrogène ou HCN (bleu) sont représentées. Les corrélations entre protéines (carré) et métabolites (hexagone) sont positives (liens verts) ou négative (liens rouges) et présentent un cut-off supérieur à 0,5 ou inférieur à -0,5, respectivement.

B. Article : Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*

npj | Biofilms and Microbiomes

www.nature.com/npjbiofilms

ARTICLE OPEN



Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*

Sonia Mion^{1,5}, Nathan Carriot^{2,5}, Julien Lopez², Laure Plener³, Annick Ortalo-Magné², Eric Chabrière¹ ,
Gérald Culioli^{2,4} and David Daudé³

Quorum sensing (QS) is a communication system used by bacteria to coordinate a wide panel of biological functions in a cell density-dependent manner. The Gram-negative *Chromobacterium violaceum* has previously been shown to use an acyl-homoserine lactone (AHL)-based QS to regulate various behaviors, including the production of proteases, hydrogen cyanide, or antimicrobial compounds such as violacein. By using combined metabolomic and proteomic approaches, we demonstrated that QS modulates the production of antimicrobial and toxic compounds in *C. violaceum* ATCC 12472. We provided the first evidence of anisomycin antibiotic production by this strain as well as evidence of its regulation by QS and identified new AHLs produced by *C. violaceum* ATCC 12472. Furthermore, we demonstrated that targeting AHLs with lactonase leads to major QS disruption yielding significant molecular and phenotypic changes. These modifications resulted in drastic changes in social interactions between *C. violaceum* and a Gram-positive bacterium (*Bacillus cereus*), a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), immune cells (murine macrophages), and an animal model (planarian *Schmidtea mediterranea*). These results underscored that AHL-based QS plays a key role in the capacity of *C. violaceum* to interact with micro- and macroorganisms and that quorum quenching can affect microbial population dynamics beyond AHL-producing bacteria and Gram-negative bacteria.

npj Biofilms and Microbiomes (2021)7:40; <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00211-w>

1. Abstract

Quorum sensing (QS) is a communication system used by bacteria to coordinate a wide panel of biological functions in a cell density-dependent manner. The Gram-negative *Chromobacterium violaceum* has previously been shown to use an acyl-homoserine lactone (AHL)-based QS to regulate various behaviors, including the production of proteases, hydrogen cyanide, or antimicrobial compounds such as violacein. By using combined metabolomic and proteomic approaches, we demonstrated that QS modulates the production of antimicrobial and toxic compounds in *C. violaceum* ATCC 12472. We provided the first evidence of anisomycin antibiotic production by this strain as well as evidence of its regulation by QS and identified new AHLs produced by *C. violaceum* ATCC 12472. Furthermore, we demonstrated that targeting AHLs with lactonase leads to major QS disruption yielding significant molecular and phenotypic changes. These modifications resulted in drastic changes in social interactions between *C. violaceum* and a Gram-positive bacterium (*Bacillus cereus*), a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), immune cells (murine macrophages), and an animal model (planarian *Schmidtea mediterranea*). These results underscored that AHL-based QS plays a key role in the capacity of *C. violaceum* to interact with micro- and macroorganisms and that quorum quenching can affect microbial population dynamics beyond AHL-producing bacteria and Gram-negative bacteria.

2. Introduction

Many proteobacteria use acyl-homoserine lactones (AHLs) to orchestrate their behavior in a cell density-dependent manner (Miller and Bassler 2001). This communication system, referred to as quorum sensing (QS), plays a key role in bacterial adaptation to the environment. QS is involved in many mechanisms, including biofilm formation, production of virulence factors, and biosynthesis of antimicrobial compounds, such as phenazine (Déziel et al. 2004), bactobolinn (Seyedsayamdost et al. 2010), or violacein (McClellan et al. 1997). Furthermore, several studies have shown that QS plays a part not only in intra- or interspecies bacterial interactions (K. C. Evans et al. 2018; Federle and Bassler 2003; Miller and Bassler 2001) but also in interkingdom interactions (Moura-Alves et al. 2019).

Disrupting QS has appeared as a promising way to counteract bacterial behavior in fields of application useful for human healthcare and agriculture (Rémy et al. 2018). To this end, many strategies have been considered, including inhibition of QS signals using chemical inhibitors (QSI), their sequestration by antibodies, or the use of quorum-quenching enzymes (QQE). QQE have been particularly investigated as they can be used extracellularly to interact with signaling molecules, especially AHLs. Among QQE, lactonases, and especially those issued from extreme environments, have been shown to efficiently alter social behaviors in many proteobacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* (Guendouze et al. 2017; Mahan et al. 2020), *Acinetobacter baumannii* (Bergonzi et al. 2018, 2019), *Burkholderia cenocepacia* (Koch et al. 2014), and *Chromobacterium violaceum* (Mion et al. 2019). Although most studies involving lactonases relied on the use of pure bacterial cultures, recent reports underlined that these biocatalysts may impact complex bacterial communities both in vitro and in situ (Huang et al. 2019; Schwab et al. 2019). Lactonase-mediated QS disruption was shown to change bacterial population dynamics and concomitantly to reduce biofilm formation in a recirculating bioreactor (Schwab et al. 2019) and also to reduce biocorrosion induced by microbial communities on steel surfaces immersed in a lake water (Huang et al. 2019). Strikingly, metagenomic analyses revealed that lactonases did not only affect the proportion of AHL-using proteobacteria but also Gram-positive and -negative bacteria that are not known to use or sense AHLs. These results suggest that altering AHL-based QS with lactonases may drive global population changes although the mechanisms and molecular determinants of these alterations remain poorly understood.

Considering the abundance of QS-regulated traits, particularly those involved in the biosynthesis of antimicrobials, the use of exogenous QQE appeared to be a relevant approach to modulate bacterial interspecies competition (Whiteley et al. 2017).

Here, we considered the use of the lactonase SsoPox W263I, a QQE able to degrade a wide spectrum of AHLs and to affect microbial communities from soil and freshwater ecosystems, to decipher how

QQ can modulate molecular mechanisms involved in social interactions (Hiblot et al. 2013a) in a single proteobacteria species representative from these ecosystems. The impact of the lactonase *SsoPox* W263I on the model environmental bacterium *C. violaceum* ATCC 12472 (CV 12472) (Morohoshi et al. 2008, 2010) was thus investigated. Through a multi-omics approach, coupling metabolomics and proteomics together with phenotypic and microbiological investigations, the impact of enzymatic quenching on the strain behavior was deeply analyzed with a special focus on the production of antibiotic compounds (Stauff and Bassler 2011). We reported the production of newly observed AHLs and described, for the first time, the production of the antibiotic anisomycin in CV 12472. We further provided a series of experiments suggesting that *SsoPox* W263I alters the ability of *C. violaceum* to produce QS-regulated antimicrobials and to compete with prokaryotic and eukaryotic organisms. Taken as a whole, these results indicate that disrupting QS may broadly impact interspecies interactions and microbial population dynamics.

3. Results

3.1. Lactonase *SsoPox W263I* modulates *C. violaceum* proteome

Proteomes of CV 12472 with and without treatment by the QQ lactonase *SsoPox W263I* were analyzed. The use of a statistical PLS-DA analysis revealed a significant impact of the enzyme on the proteome of CV 12472 as the control and treated groups were found distinctly separated on the first component (15.2% of the total variance) (Figure V.3.).

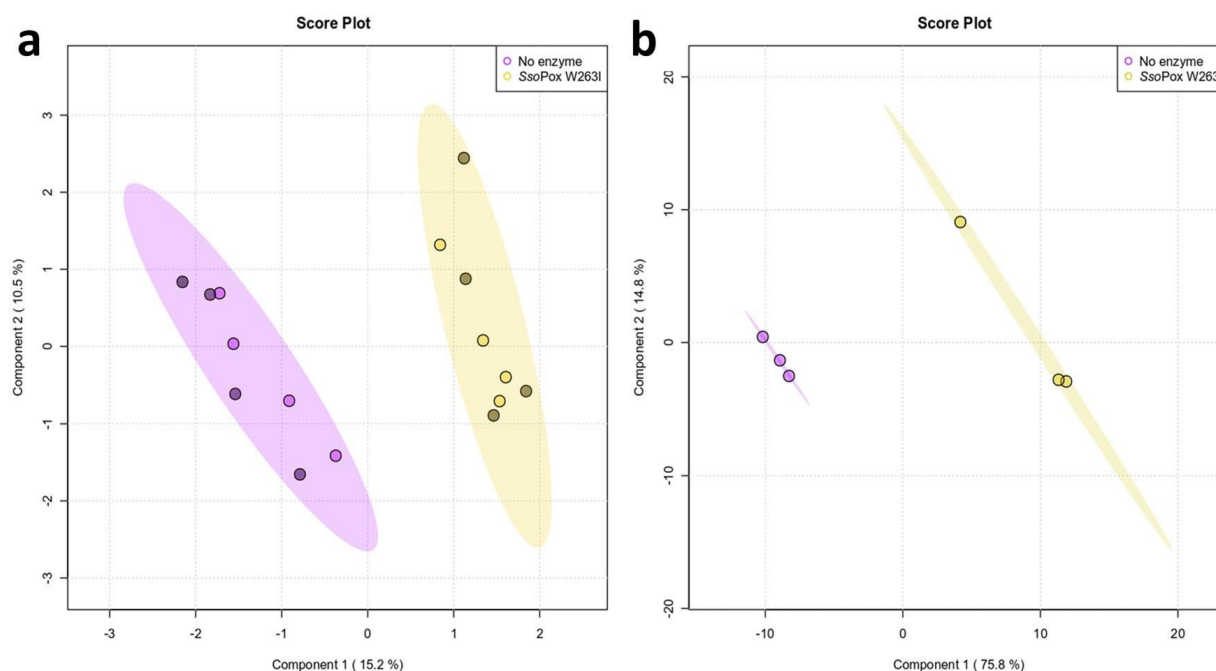


Figure V.3. : PLS-DA analysis of proteomic and metabolomic data of *C. violaceum* cultures with and without lactonase treatment. Score plots of PLS-DA analysis of proteomic (a) ($n = 8$: four biological replicates $\times$ two technical replicates indicated by darker point) and metabolomic data (b) ($n = 3$: three biological replicates) of *SsoPox W263I* (0.5 mg ml⁻¹) treated samples (yellow) and untreated ones as negative controls (purple).

A total of 889 out of the 4 397 (i.e., 20.2%) proteins of CV 12472 were detected and identified (Uniprot database) (Supplementary Data 1). These 889 proteins were clustered by biological functions according to the GO database using the DAVID bioinformatic tool (Lima et al. 2016) (Figure V.4.a.). This method allowed to assign of biological functions to 82.6% of this set of proteins. Proteins were mainly involved in metabolic processes (31%), followed by translation (8.3%) and transcription (6.6%).

Relative abundances of 38 proteins were found to be significantly impacted upon *SsoPox W263I* treatment (i.e., fold change ≥ 1.5 and P value < 0.05) (Figure V.4.b., Figure V.4.c.) and were further clustered by biological function (Figure V.4.b.). Among these proteins, ten were associated with metabolic pathways, including amino acids and cofactor biosynthesis as well as the metabolism of carbohydrates, energy, and fatty acids.

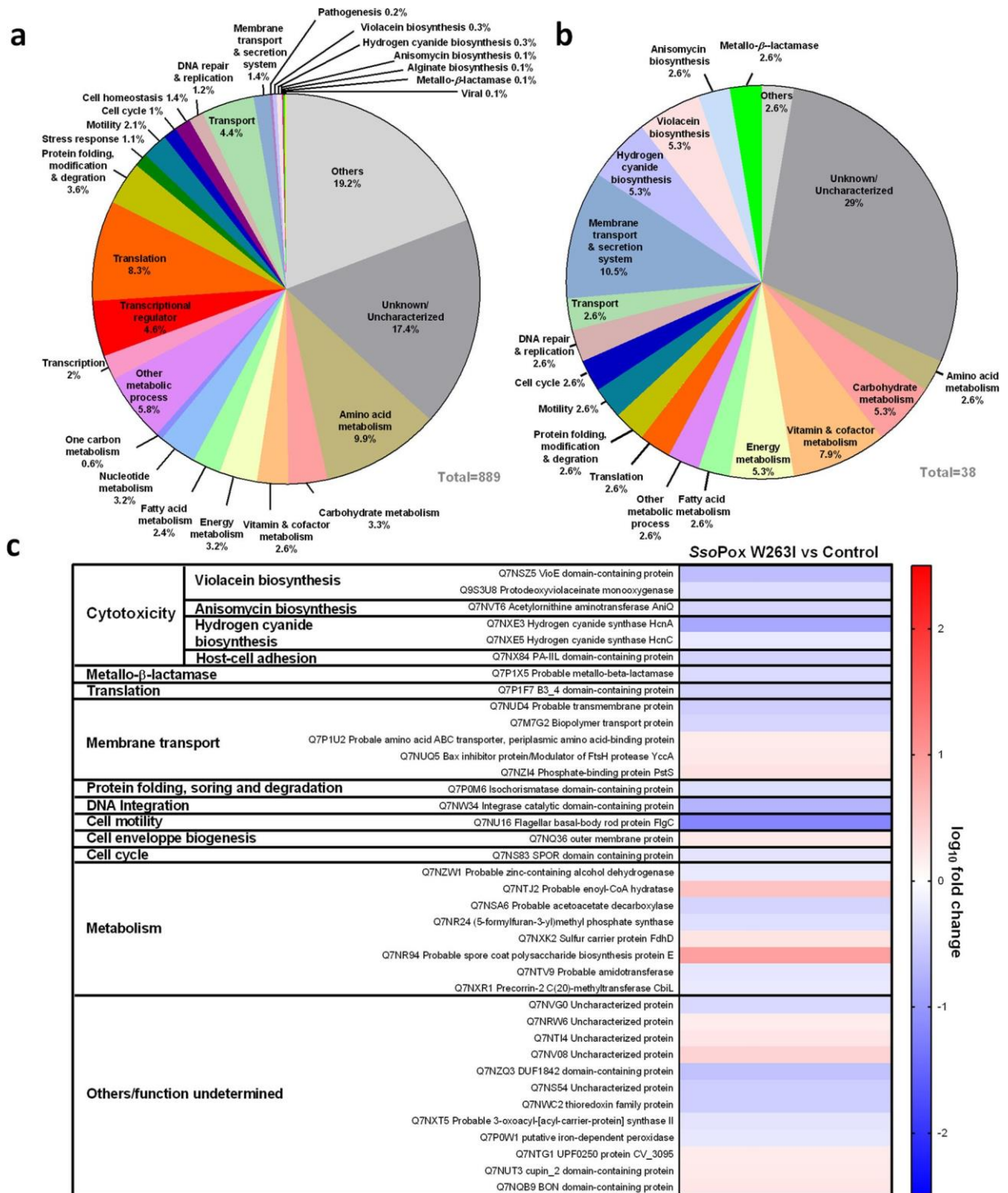


Figure V.4. : Proteome analysis of *C. violaceum* cultures with and without lactonase treatment. **a** Functional distribution of all proteins detected in *C. violaceum* samples. **b** Functional distribution of proteins significantly impacted by SsoPox W263I treatment. **c** Impact of SsoPox W263I treatment on *C. violaceum* protein production. Heatmap represents the log₁₀ fold change in protein production of SsoPox W263I-treated samples as compared to untreated ones as negative controls (selection criteria for significantly impacted proteins were *P* value <0.05 and fold change ≥1.5). Down- and upregulated protein expressions are presented in blue and red, respectively.

One protein was detected in each of the following functions: translation mechanisms, DNA repair and replication, cell cycle, and protein modification and degradation. The abundance of five proteins involved in membrane transport and secretion systems decreased upon enzymatic treatment. Interestingly, changes in proteins involved in the biosynthesis of diverse cytotoxic compounds such as hydrogen cyanide, violacein, and anisomycin were observed. These latter proteins were all downregulated by SsoPox W263I treatment (Figure V.4.c). Finally, twelve proteins significantly affected by the enzymatic treatment remained unknown or uncharacterized.

3.2. SsoPox W263I changes the metabolomic profile of *C. violaceum*

To further associate proteome modifications to molecular changes, metabolomic investigations were undertaken. LC-(+)-ESI-MS metabolomic analysis enabled the identification of a primary dataset of 8 496 m/z features from raw LC-MS data, which was further refined and reduced down to a final dataset of 406 metabolites thanks to three filtration steps (Supplementary Tableau S.V.1.). The concentration of several metabolites was found to be significantly different between enzymatically treated and control samples (Figure V.5.c.).

PLS-DA analysis revealed two distinct groups formed by treated and control samples, separated on the first component (75.8% of the total variance) (Figure V.3.b.), thus indicating a significant effect of the enzymatic treatment on the metabolome of CV 12472. The PLS-DA model showed high predictive accuracy and relevance with $R^2 = 0.94$ and $Q^2 = 0.84$. This analysis was used to determine the variable importance in projection (VIP) score values, indicating the importance of each m/z feature in the discrimination between treated and control samples. Twenty-one m/z features with the higher VIP scores (VIP score >1.5) were selected (Figure V.5.a.), and the corresponding molecular formulae were determined based on accurate mass measurement, isotopic patterns, and MS/MS data analysis. In most cases, a putative identification was proposed (Supplementary Tableau S.V.2.).

Global Natural Products Social (GNPS) molecular networking workflow was further used to organize the whole MS/MS metabolomic dataset so as to obtain a global view of the different groups of chemical compounds (called “clusters”) containing VIPs (Figure V.5.b.) (Wang et al. 2016b) for annotation purposes. Such a representation allowed to gather metabolites with similar MS/MS data, and thus with putatively close chemical structures, in the same cluster. Cosine score (CS) and minimum matched fragment ions (MF) are crucial parameters to link similar metabolites together (called “nodes”) and then to build molecular networks. In this study, the use of low values of CS and MF (CS = 0.7, MF = 4) was adopted to create a maximum of links between annotated nodes and non-identified VIP nodes (Carriot et al. 2021). Some nodes observed into AHLs-, violacein- and anisomycin-containing clusters

were then identified and will be further discussed. Through this analytical procedure, more than sixty metabolites of the metabolome of CV 12472 were identified, some of which being among the VIPs that will be important in the following discussions.

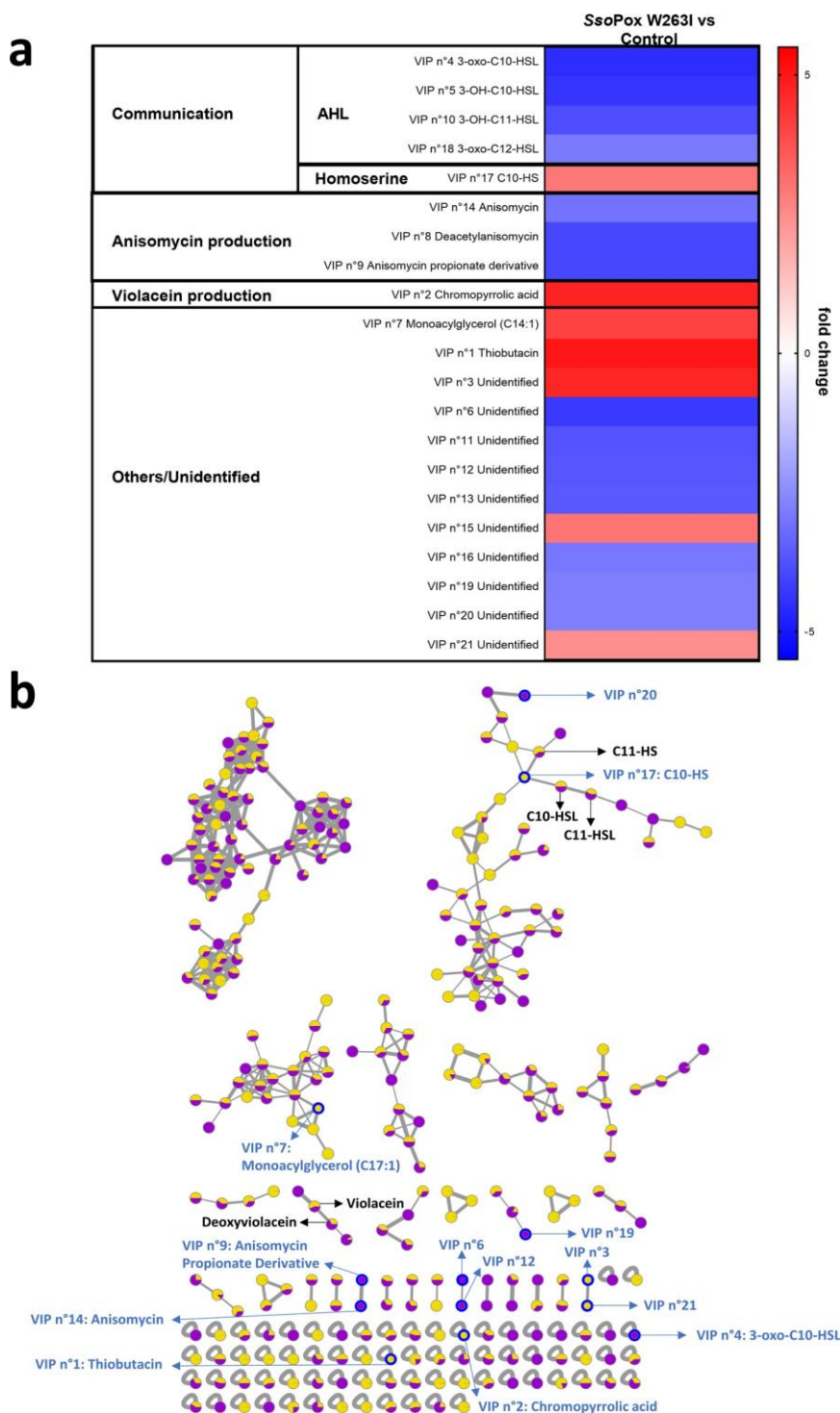


Figure V.5. : Metabolome analysis of *C. violaceum* cultures with and without lactonase treatment. **a** Impact of SsoPox W263I treatment on *C. violaceum* metabolite production. Heatmap represents the fold change of the 21 most discriminating metabolites (identified by their VIP score through the PLS-DA analysis) between SsoPox W263I (0.5 mg ml⁻¹) treated samples and untreated ones as negative controls. Down- and upregulated metabolite expressions are presented in blue and red, respectively. **b** Molecular network of LC-MS metabolomic data and identification of molecules of interest in clusters. VIPs are circled in blue. For each metabolite, color ratio corresponds to its relative abundance in treated (yellow) and untreated (purple) samples.

3.3. SsoPox W263I hydrolyzes AHLs produced by *C. violaceum*

Both metabolome and proteome analyses revealed a significant impact of SsoPox W263I on CV 12472 metabolism. To evaluate whether these discrepancies are related to QS disruption, AHLs and their potential degradation products were specifically analyzed in the cultures of CV 12472.

This analysis of whole-culture extracts led to the identification of several AHLs (Figure V.6.). Among these, the main AHLs observed on the chromatograms, and already known to be produced by CV 12472, were *N*-decanoyl-homoserine lactone (C10-HSL) and *N*-(3-hydroxydecanoyl)-homoserine lactone (3-OH-C10-HSL) (W.-J. Cheng et al. 2020; Morohoshi et al. 2008, 2010; Stauff and Bassler 2011). Furthermore, non-targeted metabolomics allowed the detection and identification of AHLs reported to our knowledge, for the first time in CV 12472: *N*-nonanoyl-homoserine lactone (C9-HSL), *N*-undecanoyl-homoserine lactone (C11-HSL), *N*-(3-oxodecanoyl)-homoserine lactone (3-oxo-C10-HSL), *N*-(3-hydroxyundecanoyl)-homoserine lactone (3-OH-C11-HSL), and *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL). In addition, while *N*-dodecanoyl-homoserine lactone (C12-HSL) was not observed, its open form *N*-dodecanoyl-homoserine (C12-HS) was detected. Supernatant extracts obtained after removal of bacterial cells by centrifugation were also analyzed by LC-MS and allowed the detection of the same AHLs in the same proportions as those observed in the whole-culture extracts (Supplementary Figure S.V.1a.).

The detection of diverse AHLs in CV 12472, albeit reported for the first time, is comparable to many bacterial species known to use different AHLs to regulate their QS (Schuster et al. 2013). Although C10-HSL and 3-OH-C10-HSL have been previously reported to be the main AHLs produced by CV 12472, other AHLs including 3-oxo-C10-HSL and 3-oxo-C12-HSL, have been shown to exogenously increase the production of violacein in CV 12472 (Morohoshi et al. 2008). C11-HSL and 3-OH-C11-HSL are not common in soil bacteria and have mainly been reported in Vibrionaceae species (Liu et al. 2018; Rasmussen et al. 2014). C9-HSL is also rarely detected in bacteria but has already been reported in *Burkholderia cepacia* strain GG4 isolated from the ginger rhizosphere (Hong et al. 2012), and in *Vibrio fischeri* (also called *Aliivibrio fischeri*) strains associated with the squid *Euprymna scolopes* (Girard et al. 2019). Interestingly, C6-HSL, a molecule described as the cognate AHL used by ATCC 31532 (Morohoshi et al. 2010), another well-described strain of *C. violaceum*, was not detected in this study, adding proof that the array of AHLs generated by *C. violaceum* appears to be strain-specific.

Although C10-HSL, and to a lesser extent 3-OH-C10-HSL and 3-oxo-C10-HSL, appeared as the main AHLs of CV 12472 whole-culture and supernatant extracts (Supplementary Figure S.V.1a.), respective quantities of each detected AHLs and their specific impact on CV 12472 behavior are not precisely

known. Further studies are necessary to determine each AHL exact concentration and contribution to QS or if some may represent inactive metabolic intermediates.

This study focused on the impact of QQE on CV 12472 behavior, to do so the impact of SsoPox W263I on the relative abundance of AHLs was further analyzed. The quantity of all detected AHLs decreased significantly in the treated samples (Figure V.6.).

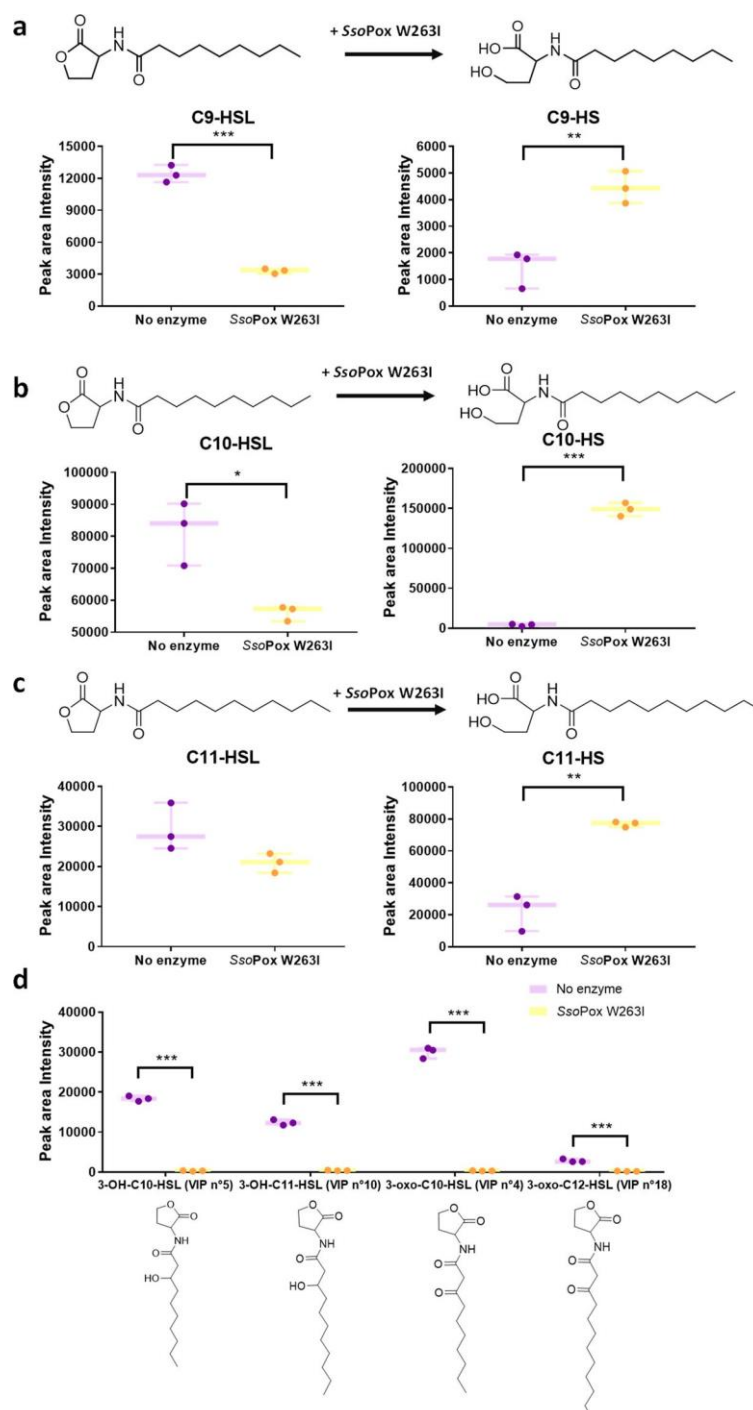


Figure V.6. : SsoPox W263I impacts production of AHLs in CV 12472. Chemical structures and LC-MS peak area intensities of AHLs and their hydrolyzed form in control (purple) and treated samples (yellow). a C9-HSL, b C10-HSL, c C11-HSL, and d other AHLs. Bars represent the mean and standard deviations of peak area intensities on the corresponding LC-MS chromatograms in three biological replicates (each represented by one point). * P value <0.05 , ** P value <0.01 , *** P value <0.001 according to Student's t test.

Furthermore, the open forms of C9-HSL, C10-HSL, C11-HSL, and C12-HSL, respectively, *N*-nonanoyl-homoserine (C9-HS), *N*-decanoyl-homoserine (C10-HS), *N*-undecanoyl-homoserine (C11-HS), and C12-HS, were detected in greater amounts in treated samples than in untreated ones (Figure V.6.a., Figure V.6.c.). Such an observation is consistent with the previously reported mechanism of SsoPox (Elias et al. 2008) and with the catalytic performance of SsoPox W263I toward the AHLs detected in this study (Supplementary Tableau. S.V.3.) and the autoinduction mechanism described in CV 12472 (Stauff and Bassler 2011).

These results confirmed the hydrolytic action of SsoPox W263I on the AHLs produced by CV 12472 and highlighted its QQ potential.

3.4. Lactonase drastically decreases the production of known QS- associated factors

To evaluate how molecular modifications could be related to phenotypic variations, the impact of SsoPox W263I was investigated on QS-related behaviors of CV 12472 (Figure V.7.).

C. violaceum is known to produce the characteristic purple pigment violacein under the regulation of QS (Morohoshi et al. 2008, 2010). As expected, the addition of a lactonase to the culture medium suppresses the production of this pigment (Figure V.7.a.). Linking metabolomic and proteomic analyses allowed us to observe the impact of enzymatic treatment on different steps of the biosynthetic pathway of violacein (Figure V.8 and Supplementary Figure S.V.2.). The main benefits of the QQ treatment were a fourfold decrease in VioE production and a 700-fold increase of chromopyrrolic acid. This latter is known to be formed spontaneously in the absence of VioE (Figure V.8.) (Hirano et al. 2008; Hoshino 2011) and was thus found to be significantly negatively correlated to this protein (Figure V.7.a.). Together with VioE, the abundance of VioD was significantly reduced, leading to a drastic decrease in the production of violacein and its derivatives (i.e., deoxyviolacein, proviolacein, prodeoxyviolacein, and deoxyviolacein) (Figure V.8 and Supplementary Figure S.V.2.). Proteomic and metabolomic data matrices were further processed by regularized Canonical Correlation Analysis (rCCA) (González et al. 2008; Leurgans et al. 1993; Vinod 1976) with a cut-off value of 0.5 chosen to create a multi-omics correlation network. This network showed significant positive relationships between the proteins VioD and VioE, on the one hand, and violacein, deoxyviolacein, and the AHLs, on the other, while these two proteins were negatively correlated with chromopyrrolic acid and the hydrolyzed AHLs (Figure V.7.a.).

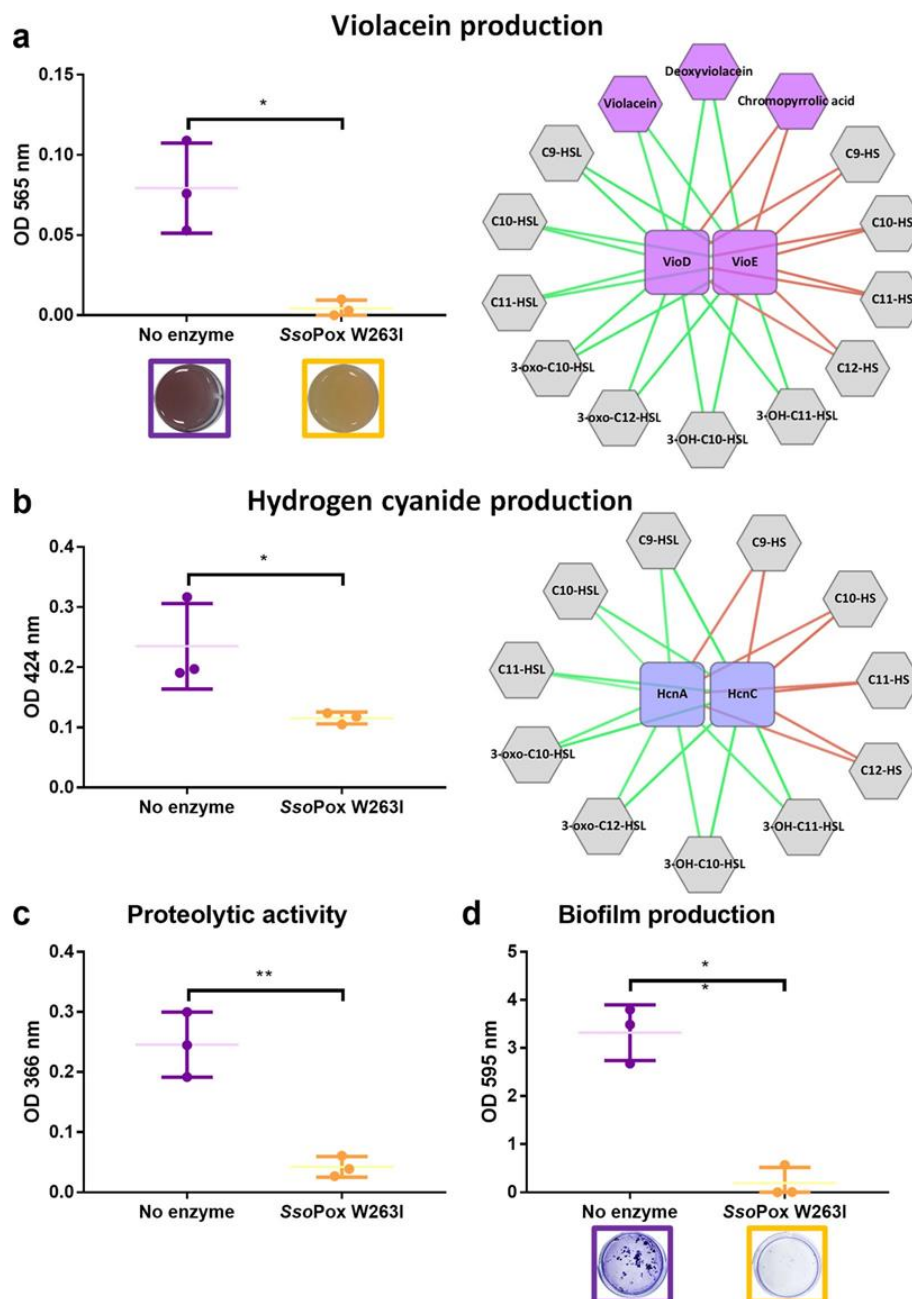


Figure V.7. : SsoPox W263I inhibits QS-regulated factors production of *C. violaceum*. Mean levels of violacein (a) hydrogen cyanide (b), protease (c), and biofilm (d) production of *C. violaceum* untreated (purple) and treated cultures with 0.5 mg ml^{-1} SsoPox W263I (yellow). Error bars represent the standard deviations of $n = 3$ biological replicates (each represented by one point). * P values <0.05 ; ** P values <0.01 according to Student's t test. Representative pictures of untreated (yellow squares) and lactonase treated cultures (yellow squares) (a) and their biofilm formation after coloration with crystal violet (d) are given. Network represents correlation multi-omics networks where proteins (squares) and metabolites (hexagons) involved in violacein (a) and hydrogen cyanide production (b) production and significantly impacted by SsoPox W263I are positively (green) or negatively (red) connected

Chromobacterium species are also known for their ability to produce the toxic metabolite hydrogen cyanide (Carepo et al. 2004; Short et al. 2018). This production is under QS regulation in *C. violaceum* (Stauff and Bassler 2011). In this study, enzymatic treatment reduced by $>50\%$ the level of hydrogen

cyanide in the supernatant (Figure V.7.b.). HcnC and HcnA, two proteins involved in hydrogen cyanide biosynthesis (Blumer and Haas 2000), were found significantly downregulated by SsoPox W263I treatment (fold change of -7.27 and -1.65, respectively, as compared to control) (Figure V.4.c.) and their variations were positively correlated with AHLs and negatively correlated with hydrolyzed AHLs (Figure V.7.b.).

Finally, a strong inhibitory effect of the lactonase on the production of proteases as well as on the biofilm formation was also observed with fold changes of -6 and -17, respectively. Nevertheless, neither proteins nor metabolites could be clearly associated with these phenotypes (Figure V.7.c., Figure V.7.d.). Altogether, these results suggested that SsoPox W263I constitutes a potent QQ agent for the bacterial strain CV 12472, inducing major phenotypic and metabolic changes.

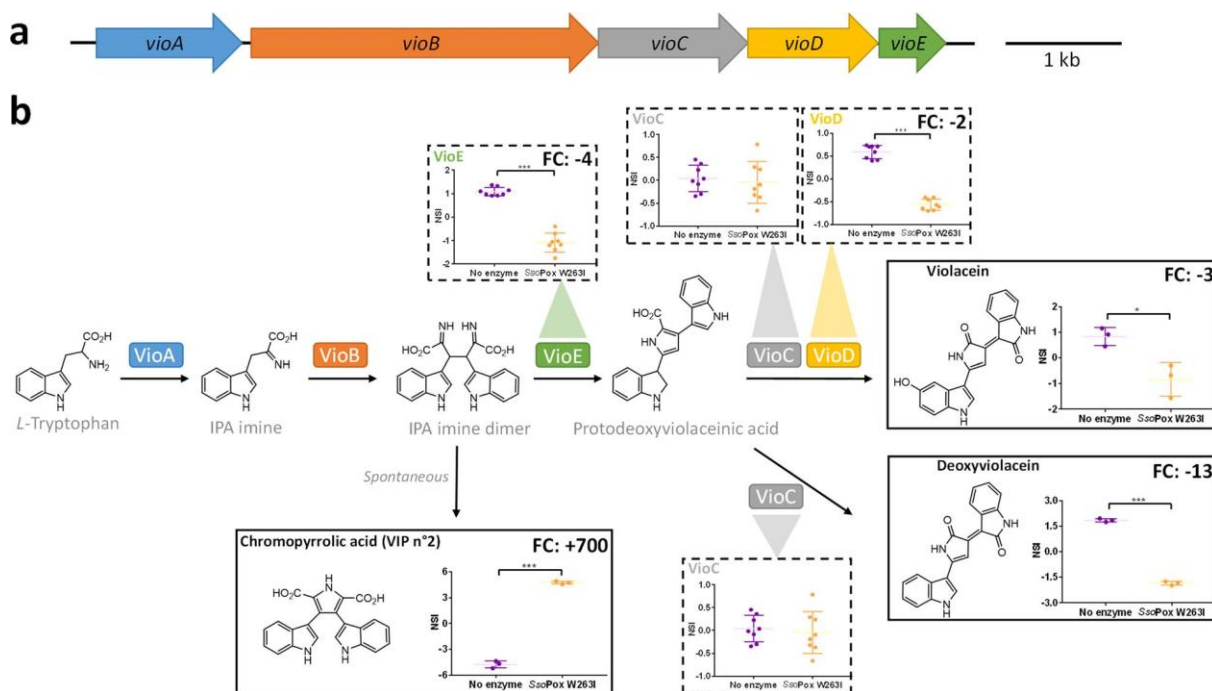


Figure V.8. : Impact of SsoPox W263I on violacein biosynthesis in *C. violaceum*. **a** Organization of the violacein biosynthesis operon. Arrows indicate the direction of transcription. **b** Simplified representation of SsoPox W263I impact on violacein biosynthesis by CV 12472 untreated (purple) and treated cultures (yellow). Proteins (dashed line boxes) and metabolites (full-line boxes) normalized scaled intensities (NSI) are represented as the mean and standard deviations (Metabolomic: $n = 3$ biological replicates, Proteomic: $n = 8$, 4 biological replicates $\times$ 2 technical replicates). * P value < 0.05 , ** P value < 0.01 , *** P value < 0.001 according to Student's t test. FC fold change.

3.5. Combined omics analysis identifies anisomycin as a new QS- regulated factor

Besides known QS-regulated metabolites of CV 12472, further analysis of the metabolome of CV 12472 led to the identification of anisomycin, deacetylanisomycin, and anisomycin propionate derivative molecules (Figure V.5., Figure V.9.). Anisomycin is an antibiotic interfering with proteins and DNA synthesis in eukaryotes and is mainly described in *Streptomyces* species (Sobin and Tanner 1954). Recently, the biosynthetic gene cluster of anisomycin in *Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis* has been reported. It mainly consists in five proteins (AniQ, AniP, AniN, AniI, and AniK) for the biosynthesis of anisomycin and two additional proteins being involved in its glycosylation. Homologs of AniQ, AniP, and AniN have been previously identified in *C. violaceum* genome but the production of anisomycin by *C. violaceum* and the functionality of the identified homologs have not been confirmed (Zheng et al. 2017). Here, we provided the first evidence of anisomycin production in CV 12472 and a thorough comparison of *S. hygrospinosus* ACCC40033 and CV 12472 anisomycin gene clusters. Our data confirmed the identification of the biosynthetic gene cluster of anisomycin in the CV 12472 genome between the loci CV_2255 and CV_2262. Anisomycin was also identified in cell-free supernatants (Supplementary Figure S.V.1b.), suggesting that CV 12472 is also equipped for the secretion of this antibiotic. This analysis revealed that *C. violaceum* possesses all the required proteins to biosynthesize anisomycin from L-tyrosine although glycosylation proteins were not identified (Supplementary S.V.3.). Here, we further showed, by combining proteomic and metabolomic analyses, that anisomycin was drastically downregulated by QQ treatment (Figure V.9.). Not all molecules involved in anisomycin biosynthesis were detected by the multi-omics approach, but insightful observations highlighted the impact of SsoPox W263I on its production. The protein CV_2256, now identified as AniQ and involved in the formation of several biosynthetic intermediates of anisomycin, was found

significantly downregulated by the enzymatic treatment (Figure V.9.a.). Deacetylanisomycin, a precursor of anisomycin was also downregulated, along with the anisomycin propionate derivative (also known as 3097-B1, formed by an unknown mechanism and already detected in *Streptomyces* strain SA3097 (Hosoya et al. 1993)) (Figure V.9.a.). AniQ, deacetylanisomycin, anisomycin and its propionate derivative, were all positively correlated with the production of AHLs and negatively correlated with the occurrence of hydrolyzed AHLs (Figure V.9.b.).

Altogether, the results of this multi-omics approach showed that CV 12472 can biosynthesize anisomycin and that this production is under QS regulation.

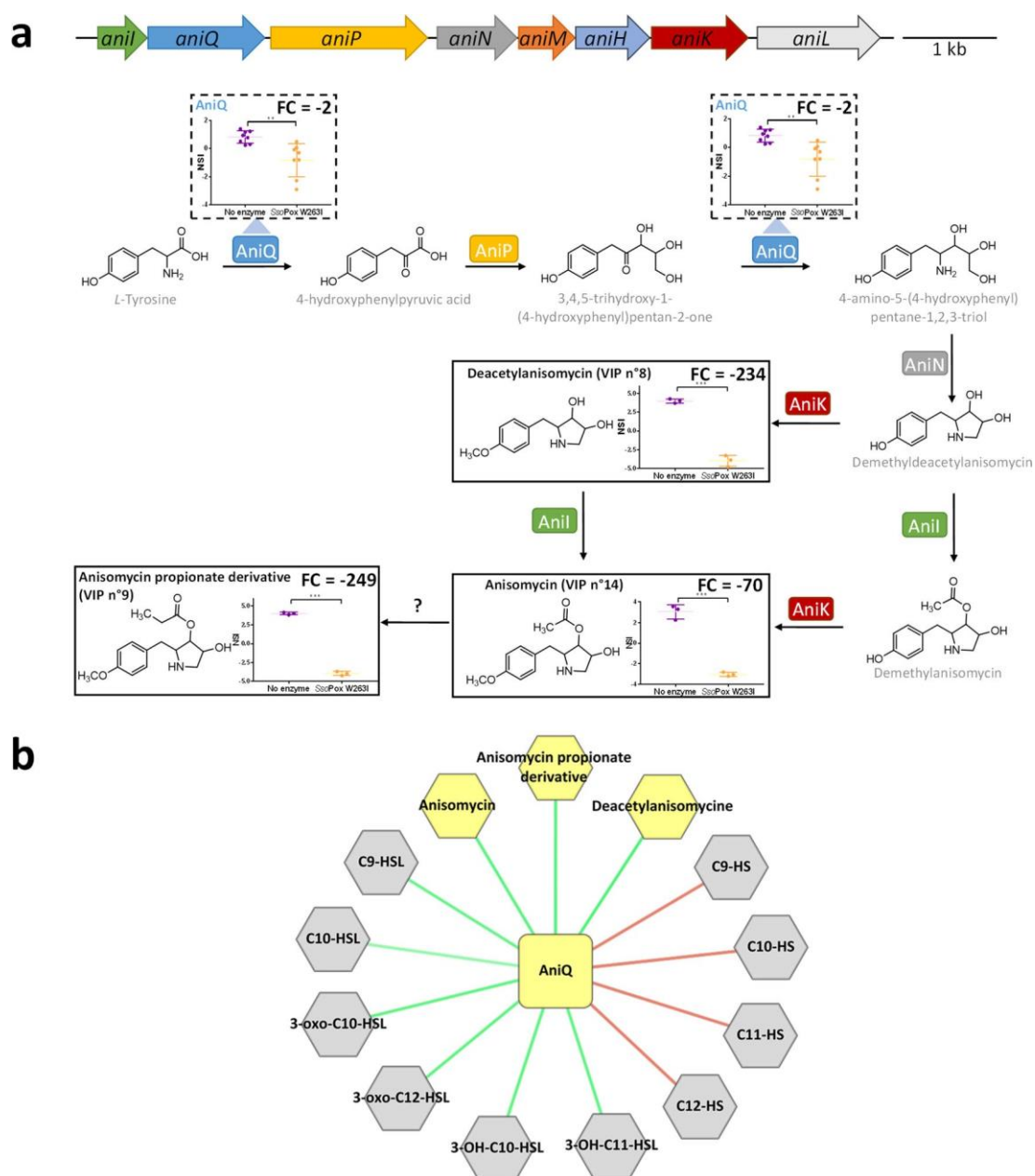


Figure V.9. : Impact of SsoPox W263I on anisomycin biosynthesis in *C. violaceum*. a Organization of the anisomycin biosynthesis operon and impact of SsoPox W263I on the anisomycin biosynthetic pathway. In operon representation, arrows indicate the direction of transcription. Pathway and nomenclature are from Zheng et al.⁴¹. Proteins (dashed line boxes) and metabolites (full-line boxes) normalized scaled intensities (NSI) are represented as the mean and standard deviations (metabolomic: $n = 3$ biological replicates, proteomic: $n = 8$, 4 biological replicates $\times$ 2 technical replicates). * P value < 0.05 , ** P value < 0.01 , *** P value < 0.001 according to Student's t test. FC fold change. b Correlation multi-omics network of the protein AniQ (square) and metabolites (hexagons) involved in the production of anisomycin. Metabolites significantly impacted by SsoPox W263I are positively (green) or negatively (red) connected with AniQ.

3.6. *C. violaceum* toxicity toward Gram-positive *Bacillus cereus* is inhibited by QQ

C. violaceum uses QS to induce antimicrobial metabolites production, including the Gram-positive targeting violacein and hydrogen cyanide (Choi et al. 2020; Rijavec and Lapanje 2016). To evaluate how QQ may affect the capacity of CV 12472 to compete with invaders, a co-culture model with *Bacillus cereus* was developed and tested with and without lactonase. Without enzymatic treatment, CV 12472 was lethal to *B. cereus* and completely inhibited its growth. Conversely, when CV 12472 was enzymatically quenched, *B. cereus* was able to grow (Figure V.10.a.). Similar results were obtained when *B. cereus* was grown in the presence of 50% CV 12472 supernatant, demonstrating that *C. violaceum* produced one or several extracellular toxic compounds for *B. cereus* under QS regulation (Supplementary Figure S.V.4a.). These effects could be due to the impact of SsoPox W263I on different QS-regulated mechanisms of CV 12472, such as violacein or hydrogen cyanide production. Violacein is known to disrupt Gram-positive strains' cellular membrane integrity (Aruldass et al. 2018) and hydrogen cyanide is also known to be toxic to some bacterial strains and to be involved in bacterial competition (Rijavec and Lapanje 2016). The downregulation of hydrogen cyanide and violacein production by SsoPox W263I could indeed play a significant role in altering the ability of CV 12472 to eliminate *B. cereus*.

To determine whether these metabolites were involved in the toxicity against *B. cereus*, hydrogen cyanide and violacein were evaluated independently (Supplementary Figure S.V.4b., Figure S.V.4c.). First, the amounts of violacein and hydrogen cyanide were estimated in CV 12472 supernatants: violacein was found at a concentration of $4 \pm 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in untreated cultures and $0.3 \pm 0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in treated ones while hydrogen cyanide concentration was $7 \pm 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in untreated cultures and $3 \pm 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ in treated ones. The effect of both molecules on *B. cereus* growth was assayed at the concentration found in CV 12472 supernatants. At $4 \mu\text{g ml}^{-1}$, violacein inhibited *B. cereus* growth in the same proportion as in untreated supernatants. Consistently, as for the treated cultures of CV 12472, a concentration of $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ violacein did not affect the growth of *B. cereus* (Supplementary Figure S.V.4b.). Conversely, hydrogen cyanide had no impact on *B. cereus* growth at any tested concentrations (Supplementary Figure S.V.4c.). These results underlined that the toxic effect of CV 12472 supernatants on *B. cereus* could be mainly attributed to violacein and this effect is drastically decreased by SsoPox W263I.

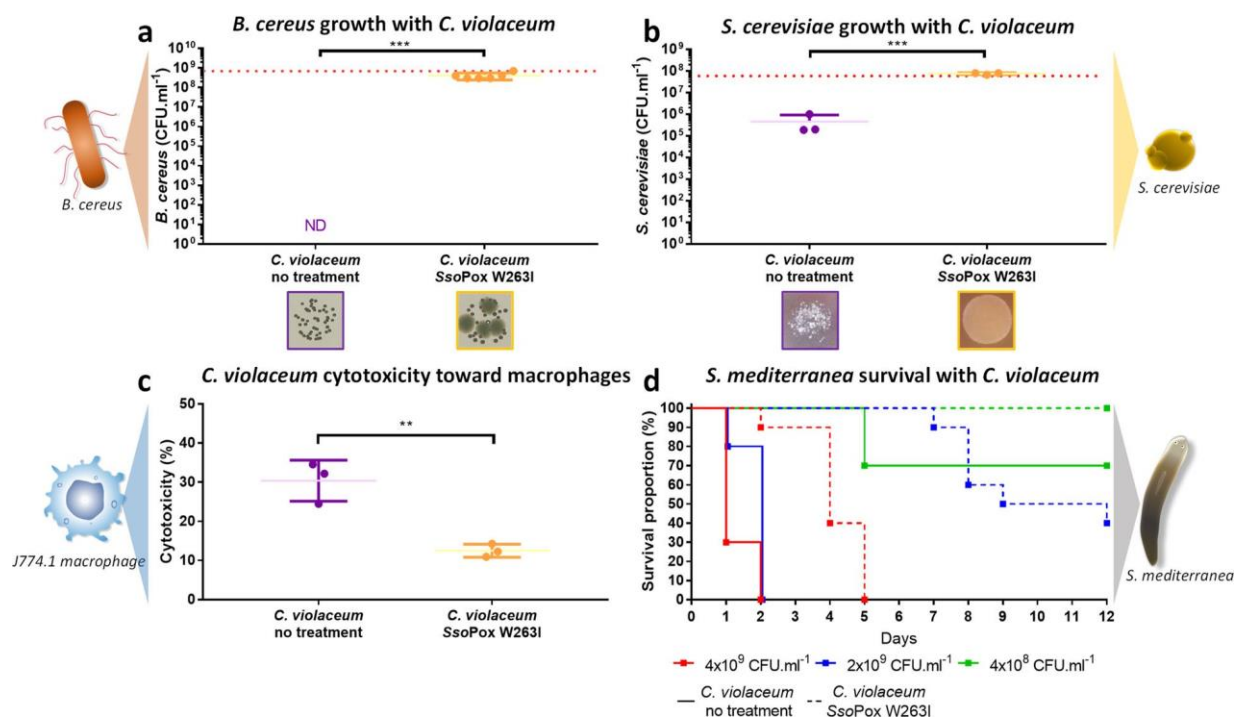


Figure V.10. : *C. violaceum* interaction with prokaryotic and eukaryotic organisms. a Mean bacterial concentration in CFU ml⁻¹ of *B. cereus* after 8 h of cocultures with *C. violaceum* treated with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow) and untreated cultures as negative controls (purple). Error bars represent the standard deviations of $n = 6$ experiments (three biological replicates $\times$ two technical replicates). The dotted red line represents the mean bacterial concentration of *B. cereus* monoculture. Representative pictures of dilution on LB-Agar plate (dilution factor at 10⁻⁶) of *B. cereus* cultures with treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow square) and untreated cultures as negative controls (purple square) are given. *** P values < 0.001 according to the Student's t test. ND not detected. b Mean yeast concentration in CFU ml⁻¹ of *S. cerevisiae* after 24 h growth on YPD-Agar infected by *C. violaceum* treated with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow) and untreated as negative controls (purple). Error bars represent the standard deviations of $n = 3$ biological replicates. The dotted red line represents the mean yeast concentration of *S. cerevisiae* on non-infected YPD-Agar. Representative pictures of dilution on YPD-Agar plate (dilution factor at 10⁻²) of *S. cerevisiae* growth on the plate infected by treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow square) and untreated cultures as negative controls (purple square) are given. *** P values < 0.001 according to Student's t test. ND not detected. c Cytotoxicity of *C. violaceum* toward J774.1 macrophages with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow) or untreated as negative controls (purple) during a 1.5 h infection at a MOI of 1. Error bars represent the standard deviations of $n = 3$ replicated experiments. ** P values < 0.01 according to Student's t test. d Planarian survival in the presence of *C. violaceum* treated with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (dotted line) and untreated cultures as negative controls (full line) at 4 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ (red), 2 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ (blue), 4 $\times$ 10⁸ CFU ml⁻¹ (green). Curves represent survival proportions of ten planarians. According to log-rank (Mantel-Cox) test comparing survival curves in treated and untreated conditions P values < 0.0001 for 4 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ and 2 $\times$ 10⁹ CFU ml⁻¹ conditions and P value = 0.0671 for 4 $\times$ 10⁸ CFU ml⁻¹ concentration.

3.7. SsoPox inhibits *C. violaceum* toxicity toward unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*

A competition model was developed using the yeast *S. cerevisiae* to evaluate the potential impact of QS on the interactions of CV 12472 with unicellular eukaryotic organisms (Figure V.10.b.). The experiment revealed that yeast growth was decreased on YPD- Agar inoculated with CV 12472. Treatment of CV 12472 with lactonase inhibited the toxicity of the bacterium toward the yeast and

growth increased by a 2.2 log₁₀-fold change to reach a similar level as growth on uninoculated YPD-Agar. These results showed that QS regulates the antifungal effect of CV 12472 and can be affected by AHL-targeting QQ. Different antifungal mechanisms could be involved such as violacein (Sasidharan et al. 2015) and cyanide production (Laville et al. 1998); both under QS regulation in CV 12472 and inhibited by SsoPox W263I. Anisomycin is also an antifungal metabolite, with known toxic activity against *S. cerevisiae* (Zheng et al. 2017). Its effect on yeast was tested to evaluate whether it could be responsible for the inhibition of growth caused by CV 12472. Interestingly, we observed that anisomycin induced the formation of small-sized colonies of *S. cerevisiae* while the number of colonies was not affected (Supplementary Figure S.V.5.). Such a morphological change was also observed in our *C. violaceum* vs *S. cerevisiae* competition assay. Small-colony variants have been previously reported in *S. cerevisiae* treated with anisomycin (Van Dyke et al. 2009). Therefore, the small-colony variants observed in *S. cerevisiae* in presence of CV 12472 might be imputable to anisomycin production, but cannot explain the yeast growth defect indicating that, besides anisomycin, at least another toxic compound might be involved in the competition between CV 12472 and *S. cerevisiae*. Interestingly, cell-free supernatants obtained from treated and untreated cultures of CV 12472 induced the formation of yeast small colonies but did not alter yeast growth, suggesting that growth inhibition might require direct contact between these microorganisms (Supplementary Figure S.V.5.).

3.8. SsoPox decreases *C. violaceum* toxicity in higher eukaryotic models: murine macrophages and planarians

C. violaceum is broadly found in water and soil microbiota in subtropical and tropical regions and has been recently identified as an environmental opportunistic pathogen infecting humans and animals (Batista and da Silva Neto 2017). This bacterium is thus known to be associated in rare, but frequently fatal, human infections underlining its high virulence under normal human body temperature (Chattopadhyay 2014; Durán and Menck 2001). To further probe the impact of SsoPox W263I on the virulence of CV 12472, a cytotoxicity model using macrophages was first developed (Figure V.10.c). The bacterial cytotoxicity at a multiplicity of infections (MOI) of 1, meaning a proportion of one bacterium for one macrophage, was assayed in J774.1 cells. Moderate cytotoxicity (30%) was observed in this condition, which was used to study the enzymatic effect. Interestingly, upon enzymatic exposure, the cytotoxicity decreased down to 12%, therefore suggesting a possible link between QS regulation and the observed cytotoxic effect. A similar inhibitory effect induced on the cytotoxicity of CV 12472 has previously been reported with guava leaf extract as the QS inhibitor in an infection model of HepG2 human liver carcinoma cells (Ghosh et al. 2014). No cytotoxic effect

was detected with supernatants of untreated or enzymatically treated CV 12472 cultures. These results indicated that cytotoxicity seemed independent from extracellular secretions, but rather implied some intracellular molecules or cellular mechanisms. We observed that SsoPox W263I reduced the production of CV_1744 protein (CV-III) (Figure V.4.c.), a fucophilic lectin, which resembles PA-III, a QS-regulated fucose-binding lectin of *P. aeruginosa*, known to be involved in bacterial adherence to host-cell in the initial steps of infections (Winzer et al. 2000; Zinger-Yosovich et al. 2006). This lectin could then be involved in the reduction of the cytotoxicity of CV 12472. As AHLs, and more particularly 3-oxo- C12-HSL, harbor an important toxic activity toward eukaryotic cells (A. S. Kumar et al. 2014), the degradation of these molecules induced by SsoPox W263I could also play a role in the reduction of the cytotoxic effect induced by CV 12472. The decrease of CV 12472 toxicity towards macrophages upon lactonase treatment suggested that QQ is a promising alternative approach to tackle human and animal infections by *C. violaceum*.

In *C. violaceum*, QS regulates the biosynthesis of toxic metabolites, including violacein, hydrogen cyanide, and anisomycin. To assess whether QS may contribute to *C. violaceum* competition with animals, we used an aquatic model organism, the freshwater flatworm *Schmidtea mediterranea*. In recent decades, planarians have emerged as relevant invertebrate models for toxicology and ecotoxicology studies and have been used to evaluate neurodegenerative diseases as well as the toxicity of environmental pollutants and neurotoxic chemicals (Hagstrom et al. 2015; Poirier et al. 2017, 2019, 2020). Moreover, planarians have been previously described as particularly resistant to bacterial infections by eliminating bacteria mainly through phagocytosis (Abnave et al. 2014). Here, we used lifespan assay to evaluate the toxicity of *C. violaceum* on *S. mediterranea*. Bacteria were first grown with or without lactonase and then incubated with planarians. Planarians were not able to eliminate the bacterial threat in either of these conditions as the bacterial concentrations remained equivalent to those of the worm-free control for 12 days (Supplementary Figure S.V.6.). We showed that *C. violaceum* rapidly kills planarians from a bacterial load of 4×10^9 CFU ml⁻¹ (Figure V.10.d.). Interestingly, lactonase-mediated quenching decreased bacterial toxicity and significantly enhanced worms' survival, leading to complete inhibition of mortality at 4×10^8 CFU ml⁻¹.

These results underscored that QS can provide *C. violaceum* important advantages for environmental interactions, such as better fitness when competing against animals as planarians. In previous studies, violacein has been described for its nematicide effect against *Caenorhabditis elegans* (Ballestriero et al. 2014; Swem et al. 2009) and anisomycin, a translation inhibitor in eukaryotes has been shown to affect wound healing in planarians (Wenemoser et al. 2012) but other factors might also be involved in toxicity towards planarians. Consistently, we showed that QS mediates the toxicity of *C. violaceum* in *S. mediterranea* and that enzymatic quenching can reduce the virulence of this bacterial strain toward

planarians. The toxic mechanisms produced by CV 12472 and killing planarians remain unknown but they probably differ from other toxic models that require bacterial ingestion since the bacterial load remains unchanged along the experiment and that cell-free supernatants also showed toxicity (Supplementary Figure S.V.7.).

4. Discussion

QS disruption driven by lactonase SsoPox W263I was previously shown to modulate microbial communities from soil and lake water samples thus affecting ecological behaviors including biofilm formation, colonization or biocorrosion. To further address the direct and indirect impacts of this enzyme on diverse bacteria able or not to produce or sense AHLs, we evaluated the molecular and phenotypic mechanisms involved in social interactions of CV 12472, a proteobacterium representative from natural environments.

The production of the main AHLs of CV 12472, namely C10-HSL and 3-OH-C10-HSL was first confirmed, along with C9-HSL, C11-HSL, 3-OH-C11-HSL, 3-oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL which had never been described before in this strain. All AHLs were present both in whole-cell extracts and cell-free supernatants. SsoPox W263I quenching effect was confirmed by the diminution of the production of these AHLs in treated samples and the detection of the hydrolyzed forms of some of them (C9-HS, C10-HS, C11-HS, and C12-HS, respectively).

Common QS-regulated traits, such as exoprotease production and biofilm formation, were shown to be inhibited by the enzymatic treatment. Moreover, SsoPox W263I also induced a decrease in the production of both hydrogen cyanide and violacein observed at proteomic, metabolomic, and phenotypic levels.

The biosynthesis of anisomycin was unexpectedly detected in CV 12472 (in whole-cell and cell-free supernatant extracts) and the presence of the corresponding biosynthetic gene cluster (only previously hypothesized) was confirmed. A downregulated impact of the QQ treatment was observed for one protein involved in anisomycin biosynthesis, as well as the decrease of the final metabolites of this biosynthetic pathway, showing that anisomycin production is under QS regulation in this strain.

Considering the broad impact of QS on the synthesis of toxic metabolites as well as the impact of enzymatic QQ (Supplementary Figure S.V.8.), the effect of the lactonase SsoPox W263I on *C. violaceum* social interactions was evaluated in prokaryotic and eukaryotic competition assays. Treatment of CV 12472 by the lactonase was found to drastically inhibit toxicity toward a Gram-positive bacterium, yeast, and higher eukaryotic organisms using in vitro and in vivo models. Competition models with *B. cereus* and *S. cerevisiae* revealed that treatment with the QQ agent in *C. violaceum* decreased the production of extracellular antimicrobial compounds. We found that CV 12472 toxic effect on *B. cereus* was mainly ascribable to violacein and that anisomycin affected the morphology of *S. cerevisiae*, while its sole action did not alter yeast growth.

Besides its impact on interactions with bacteria and yeast, lactonase treatment was found to decrease CV 12472 cytotoxicity toward J774.1 murine macrophages and reduce mortality in planarians. These

investigations confirmed the toxicity of CV 12472 in higher eukaryotic models and suggested that QS may be a relevant target to decrease *C. violaceum* toxicity towards higher eukaryotes.

This study draws a complete overview of the ability of lactonase-mediated QQ to disrupt bacterial competition toward other organisms. Under our experimental conditions, the effects of SsoPox W263I observed on CV 12472 cultures provide essential insights into the role of QS in interkingdom relations and pave the way for further investigations, particularly concerning the role of QQE on bacterial populations. Here, the results obtained by combining molecular analyses and simplistic competitions assays showed evidence that lactonase-mediated QS disruption may affect bacteria in both inter- and intra-kingdom interactions. Complex environments and interactions are hard to reproduce under laboratory conditions due to challenges in combining different organisms' growth requirements. To fully understand the role of QS in multispecies communities and dynamics, metagenomic data would need to be examined in light of metabolomic analyses to identify the molecular causes of microscopic changes and population dynamics.

5. Methods

5.1. Microbial strains and growth conditions

Experiments were conducted using *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Bacillus cereus* ATCC 1457, and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Bacteria were grown in Luria Bertani (LB) medium (10 g l⁻¹ NaCl, 10 g l⁻¹ tryptone, 5 g l⁻¹ yeast extract) at 37 °C and yeast were grown in Yeast extract–Peptone–Dextrose (YPD) medium (10 g l⁻¹ yeast extract, 20 g l⁻¹ peptone, 10 g l⁻¹ glucose) at 30 °C. For *C. violaceum*, bacteria were inoculated from a single colony and pre-cultivated for 6 h at 37 °C in LB medium with agitation at 350 rpm. Then, precultures were diluted by a 1 000 factor in LB medium in 12-well plates, and cultures were incubated at 37 °C under agitation at 350 rpm for 16 h. The enzyme was added, when indicated, at a final concentration of 0.5 mg ml⁻¹.

5.2. Protein production and purification

SsoPox W263I variant was used as QQ enzyme and productions were performed as follow (Hiblot et al. 2012, 2013a; Hraiech et al. 2014). Briefly, cells of *Escherichia coli* BL21 (DE3)- pGro7/GroEL (TaKaRa Bio, Shiga, Japan), carrying plasmid pET22b-SsoPox- W263I, were cultivated in ZYP-5052 medium complemented with 100 µg ml⁻¹ ampicillin and 34 µg ml⁻¹ chloramphenicol at 37 °C to a final OD 600 nm of 0.8–1. L-arabinose was added to induce the expression of chaperone proteins at a final concentration of 0.2% (w/v). Simultaneously, 0.2 mM of CoCl₂ was added, and the temperature was

reduced down to 23 °C. Cells were harvested by centrifugation ($4400 \times g$, 4 °C, 20 min) after 20 h of incubation. The pellet was then resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl, 0.25 mg ml⁻¹ lysozyme, 0.1 mM phenylmethyl- sulfonyl fluoride (PMSF), and 10 µg ml⁻¹ DNaseI) and stored at -80 °C for 16 h. Cells were thawed for 15 min at 37 °C and lysed by three steps of 30 s sonication (QSonica sonicator Q700, amplitude at 45). Centrifugation was used to remove cell debris ($21,000 \times g$, 4 °C, 20 min). The resulting extract was incubated for 30 min at 80 °C and centrifuged to remove the precipitate ($21,000 \times g$, 4 °C, 30 min). The enzyme was concentrated by overnight incubation at 4 °C in 75% ammonium sulfate. After resuspension in activity buffer (50 mM HEPES pH 8, 150 mM NaCl), ammonium sulfate was eliminated by desalting step (HiPrep 26/10 desalting, GE Healthcare, ÄKTA Avant, Chicago, IL, USA). The protein sample was concentrated using 30 kDa centricon, and then purified to homogeneity using a size-exclusion chromatography column (Hiload 16/600 Superdex™ 75 pg, GE Healthcare, ÄKTA Avant). Protein purity was checked by migration on 10% SDS-PAGE, and protein concentration was measured using a spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

5.3. Proteome extraction

After 16 h of culture in LB with or without enzyme, bacteria were collected. The samples were centrifuged 5 min at $11,000 \times g$, the supernatant was discarded, and the pellet was washed twice in phosphate-buffered saline solution (PBS). To prepare total protein samples, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in UTS buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 100 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 8.0, and protease inhibitors (Roche, Pleasanton, CA, USA, Complete, EDTA free)). The samples were sonicated three times for 1 min (QSonica Q700, amplitude at 45 with 30 s intermittence) and were then centrifuged at $13,000 \times g$ for 30 min at room temperature. In a second time, the supernatant was transferred in dialysis cassettes (Slide-A-lyser Dialysis Cassettes 2 K MWCO, Thermo Fisher Scientific) and placed in 2 l of Urea/Ambic buffer (1 M urea, 50 mM ammonium bicarbonate) for 4 h followed by one night in 2 l of fresh Urea/ Ambic buffer. The protein concentration in each sample was then determined using Bradford's assay. Samples containing 50 µg of proteins were prepared to a final volume of 45 µl using Urea/Ambic buffer. For disulfide bond reduction, 1 µl of DTT (0.5 M dithiothreitol in Urea/Ambic buffer) was added and the samples were incubated for 1 h at 30 °C. For alkylation, 2 µl of IAA (0.5 M iodoacetamide in Urea/Ambic buffer) was then added before a 1 h incubation in the dark. Proteins were then digested by adding 2 µl of trypsin for a ratio 1:25 (w:w), and the samples were incubated overnight at 37 °C. Finally, to remove detergents and clean the samples, Pierce detergent removal spin column (Pierce™, Thermo Fisher Scientific) and C18 spin

column (Pierce™) were used according to the manufacturer's recommendations. The result of this preparation was suspended in acetonitrile 70%. The solutions were evaporated and resolubilized in 50 µl of eluent (0.1% formic acid) to have 1 µg/1 µl solutions of peptides.

5.4. Label-free quantitative nano-LC-MS/MS proteomic analysis

Protein digests were first separated by ultraperformance liquid chromatography (UPLC) using the NanoAcquity UPLC System (Waters, Elstree, UK) connected to a Synapt G2Si Q-TOF ion mobility hybrid mass spectrometer (Waters). The chromatographic system was used in 1D configuration with an analytical column (ACQUITY UPLC M-Class peptide CSH C18 Column, 130 Å 1.7 µm, 75 µm × 100 mm, Waters) after a trapping column (ACQUITY UPLC M-Class Symmetry C18 Trap Column, 100 Å 5 µm 2 G V/M, 180 µm × 20 mm, Waters). Eluted peptides were then separated using a 100 min gradient (300 nl min⁻¹; 0.5 to 40 % acetonitrile–0.1% formic acid). Data- independent MS/MS analysis was performed with the ion mobility feature (HDMSe method). The parameters of the ion source were capillary voltage at 3 kV, sampling cone voltage at 40 V, ion source temperature at 90 °C, cone gas flow at 50 l h⁻¹. Transfer collision low energy was set to 5 V, trap collision low energy was set to 4 V. The high energy ramp was applied from 4 to 5 V for the trap collision and from 19 to 45 V for the transfer collision enabling fragmentation of the ions after ion mobility cell and before the time-of-flight (TOF) MS. The On-column sample load was 800 ng. Each sample was injected in duplicate. The files acquired were imported into Progenesis QI software v. 2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) for label-free quantification analysis. The data were automatically aligned and normalized. Processing parameters were 150 counts for the low energy threshold, 30 counts for the elevated energy threshold. The database used to identify peptides contains the protein sequences of *C. violaceum* ATCC 12472 (UniProt, 08/ 05/2018, 4397 sequences). Search tolerance parameters were as follows: peptide and fragment tolerance, 15 ppm, FDR < 1 %; minimum ion matching requirements were three fragments per peptide, seven fragments per protein, and two peptides per protein. The enzyme specificity was trypsin allowing one missed cleavage. The accepted modifications were carbamidomethyl of cysteine (fixed), oxidation of methionine (variable), carbamyl of lysine and N-terminal (variable), deamidation (variable) of asparagine and glutamine. The protein normalization was performed according to the relative quantitation using non-conflicting peptides. To determine the significance of changes between samples, a significant ANOVA (*P* value < 0.05) and a fold change superior to 1.5 were used as thresholds to define differently expressed proteins.

Functional annotation of the differentially expressed proteins was carried out using DAVID annotation tool (<https://david.ncifcrf.gov/>), the gene ontology (GO) database in the UniProt Knowledgebase (UniProtKB) and bibliography. Of note, as *C. violaceum* is known to be highly virulent at normal human body temperature, we chose to grow the bacterium at 37 °C in all our experiments. This must be considered when comparing our “omics” results with previously reported data mainly performed at 30 °C.

5.5. Metabolite extraction

In total, 25 ml of bacterial culture (triplicates) in LB with or without enzyme were extracted using 5 ml of ethyl acetate (LC-MS grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 30 min of sonication, the upper organic phase was collected and dried in vacuo. The resulting dried extracts were solubilized in methanol (LC-MS grade, Sigma-Aldrich), filtered (0.2 µm), dried under a nitrogen flow, and were then kept in nitrogen at −20 °C. For more details, see ref. (Favre et al. 2018). For supernatant extraction, 25 ml of bacterial cultures in LB were centrifuged, the recovered supernatant was filtered (0.22 µm) and extracted using 5 ml of ethyl acetate. The upper organic phase was collected and the same procedure was applied as for whole-culture extractions.

5.6. LC-ESI-MS and MS/MS data acquisition

Samples were prepared by solubilizing the dry extracts in 1 ml of LC-MS grade methanol. Six medium blanks were also prepared using the same protocol but without bacteria. Four quality control samples (QCs) were prepared by mixing an aliquot of all the samples. Samples and medium blanks were randomly injected, and a QC was injected every three samples. At the beginning of the injection sequence, two analytical blanks (only methanol) and a QC were injected before the samples.

Samples were analyzed by UPLC-ESI-QToF-MS in positive mode. The UPLC-MS instrumentation consisted of a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation (Thermo Fisher Scientific) chromatographic system coupled with a QToF Impact II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Mannheim, Germany). The separations were carried out on a reverse-phase column

(150 × 2.1 mm, 1.7 µm, Kinetex Phenyl-Hexyl; Phenomenex, Torrance, CA, USA) equipped with a pre-column (SecurityGuard cartridge, Phenomenex) at a temperature of 40 °C. The injection volume was 5 µl, and the flow rate was set at 0.5 ml min^{−1}. The autosampler temperature was set at 4 °C, and the injection volume was 5 µl. Mobile phases were: (A) water and (B) acetonitrile (Chromasolv; Sigma-Aldrich) containing each 0.1% (v/v) of formic acid (ultra grade; Fluka, Fischer Scientific). The elution

gradient started at 5% B, maintained for 2 min, then increased to 100% B (linear ramp) in 8 min, and maintained for 4 min; then back to 5% B (linear ramp) over 0.01 min and maintained 1.99 min, for a total run time of 16 min.

The capillary voltage of the MS spectrometer was set at 4500 V (positive mode), and the nebulizing parameters were set as follows: nebulizing gas (N₂) pressure at 0.4 bar, drying gas (N₂) flow at 4 l min⁻¹, 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 at half-maximum (FWHM, *m/z* = 200) and a frequency of 2 Hz. Tandem mass spectrometry analyses were performed thanks to 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 at the beginning of the sequence.

5.7. Metabolomic data processing and analysis

LC-MS raw data were converted into “.netCDF” files using DataAnalysis v.4.3 (Bruker, Mannheim, Germany) and processed with MZmine v. 2.53 (Pluskal et al. 2010). All steps and parameters used to obtain the final data matrix are listed in Supplementary Table 1. In a second time, the data were submitted to two filtering steps using an in-house script on R and final manual filtering. Filtering consisted in removing successively experimental and analytical bias according to signal/noise ratio (using blanks) and coefficient of variation (using QCs). For multivariate analyses, the resulting data matrix was log₁₀-transformed, mean-centered, and analyzed using MetaboAnalyst 4.5 online (Chong et al. 2018). Data were analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS-DA) discriminant analysis. From the PLS-DA, the most discriminating *m/z* features (VIPs) were selected according to their VIP score. This statistical model was evaluated using a permutation test and a cross-validation analysis of variance (MetaboAnalyst 4.5 online) The comparison of metabolites of interest between the two culture conditions was carried out using a *t* test (GraphPad Prism v. 7.04).

5.8. Feature annotation via molecular networking approach

LC-MS/MS raw data (samples and standards) were converted into “.mzXML” files using DataAnalysis. The Internet platform GNPS ([http:// gnps.ucsd.edu](http://gnps.ucsd.edu)) was used to create molecular networking of related compounds based on the similarity of their MS/MS fragmentation patterns (M. Wang et al. 2016b). Similar chemical structures share similar fragmentation pathways in mass spectrometry leading to identical fragments and losses (Nothias et al. 2017). The parameters used were:

Precursor Ion Mass Tolerance (Da): 0.02, Fragment Ion Mass Tolerance (Da): 0.02, Minimum Cosine Score: 0.62, Minimum Matched Fragment Ions: 4 and Network TopK: 10. Data were imported and treated offline (Cytoscape v 3.7.0). Two methods were used for the annotation of a specific m/z feature: (1) Searching the most probable molecular formula with DataAnalysis software with the “Smartformula” package, (2) Using online databases, such as PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), Lipidmaps (<http://www.lipidmaps.org>), CEU mass mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es>), Metlin (<https://metlin.scripps.edu>) (Tautenhahn, Cho, et al. 2012), or SIRIUS 4.4.17 (Dührkop et al. 2019). Finally, a careful analysis of the MS/MS fragmentation pattern in comparison with the literature data was performed to confirm the putative annotation.

5.9. Multi-omic data processing

Proteomic and metabolomic data matrices were processed by regularized Canonical Correlation Analysis (rCCA) (González et al. 2008; Leurgans et al. 1993; Vinod 1976) with the R package MixOmics following the protocol found on the website <http://mixomics.org/>. The shrinkage method was used to adjust the regularization parameters λ_1 and λ_2 . A cut-off value of 0.5 was chosen to create a molecular network with the function *write.graph()* under the format “.graphml”. The resulting network was exported and treated using Cytoscape v. 3.7.0.

5.10. Lactonase activity measurement

The activity was measured on C9-HSL, C10-HSL, C11-HSL, C12-HSL, and 3-OH-C10-HSL at ambient temperature using a colorimetric pH-based assay (Bergonzi et al. 2016). Briefly, the hydrolysis of the lactone ring leads to the acidification of the solution, which is followed by the absorbance modification of a pH indicator (cresol). For kinetic parameters, the degradation of lactones at different concentrations by each enzyme in a cresol-buffered solution (1.25 mM Bicine, 150 mM NaCl, 0.2 mM CoCl_2 , 0.25 mM cresol purple, 3.5% for C9-HSL, C11-HSL, and C12-HSL or a minimum of 1.5% DMSO for C10-HSL and 3-OH-C10-HSL, and pH 8.3) was followed in 200 μl at 577 nm using a plate reader (Synergy HT, BioTek., Winooski, VT, USA). For C9-HSL and C11-HSL, 10 mg ml^{-1} of SsoPox W263I were used, and 20 mg ml^{-1} for C10-HSL, C12-HSL, and 3-OH-C10-HSL. The activity of SsoPox W263I was not assayed on 3-OH-C11-HSL due to its commercial unavailability.

5.11. Analysis of quorum sensing-regulated factors

QS-regulated factor productions were determined in vitro after 16 h of culture at 37 °C with agitation (350 rpm) in the presence of 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I and without enzyme.

5.12. Biofilm formation

Biofilm was measured using crystal violet (Stepanovic et al. 2000). Planktonic cells were removed, and wells were washed once with PBS. After drying the plates at 37 °C until complete evaporation of PBS, crystal violet 0.5% was added, and following a wash with PBS, the remaining colorant was dissolved using ethanol 100%. Then, 200 µl were collected and absorbance was measured at 595 nm using a microplate reader (Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA).

5.13. Proteolytic activity

Cell-free culture supernatants were prepared by centrifugation (10 min, 12,000×*g*, room temperature). Protease activity was measured using azocasein (Sigma-Aldrich) (Chessa et al. 2000). Then 25 µl of cell-free supernatant was added to a mixed solution of 675 µl PBS solution pH 7 and 50 µl of azocasein (30 mg ml⁻¹ in water). Samples were incubated for 2 h at 37 °C, the reaction was then stopped by adding 125 µl of 20% (w/v) trichloroacetic acid. The samples were centrifuged (10 min, 10,000 × *g*, room temperature), and the absorbance of 200 µl of supernatant was measured at 366 nm using a plate reader (Synergy HT, BioTek).

5.14. Violacein production

Violacein was extracted from 500 µl of cell-free supernatant by adding 500 µl of ethyl acetate (Castillo-Juárez et al. 2013), the mixture was vortexed then centrifuged (5 min, 10,000 × *g*, room temperature), and 200 µl of the upper phase was collected. The absorbance was measured at 565 nm using a microplate reader (Synergy HT, BioTek).

To estimate the concentration of violacein in the supernatant, OD₅₆₅ values were compared to a standard curve made with pure violacein isolated from *C. violaceum* (Coger, Paris, France) resuspended in LB at a known concentration ranging from 1 to 40 µg ml⁻¹.

5.15. Hydrogen cyanide production

Extracellular cyanide production was measured by using methemoglobin (von Rohr et al. 2009). The formation of cyanomethemoglobin complex induces a shift in the maximum absorbance spectrum from 407 nm (free methemoglobin) to 424 nm (cyanomethemoglobin complex). Methemoglobin reagent was prepared by dissolving 85 mg of bovine hemoglobin in 12.5 ml of NaNO₂, then 12.5 ml of phosphate buffer 0.1 M were added to the methemoglobin reagent. In total, 50 µl of cell-free supernatants were diluted with 140 µl of Millipore water. The absorbance background of the samples was measured at 424 nm using a plate reader (Synergy HT, BioTek). Subsequently, 10 µl of methemoglobin reagent was added to give a final volume of 200 µl and let react for 30 min. Finally, the absorbance of the samples was measured at 424 nm. The absorbance background was then subtracted from the final measure.

To estimate the concentration of hydrogen cyanide in the supernatant, OD₄₂₄ values were compared to a standard curve realized with potassium cyanide (Sigma) resuspended in LB at a known concentration ranging from 0.5 to 8 µg ml⁻¹.

5.16. Competition assay with *B. cereus*

After 16 h culture in LB with or without enzyme for *C. violaceum* and an overnight preculture (16 h) in LB at 37 °C with agitation for *B. cereus*, bacteria were inoculated at 1/100 in LB medium. The cocultures were incubated at 37 °C under agitation at 350 rpm for 8 h. Then the samples were serially diluted and plated on an LB-Agar plate. Colony-forming units (CFUs) were counted after overnight incubation at 37 °C.

5.17. Bactericidal effect of *C. violaceum* supernatant against *B. cereus*

To evaluate the bactericidal effect of *C. violaceum* supernatant against *B. cereus*, supernatant from a 16 h culture in LB with or without enzyme of *C. violaceum* was collected by centrifugation and filtered at 0.22 µm. An overnight preculture of *B. cereus* was inoculated at 1/1000 corresponding to 3 × 10⁵ CFU ml⁻¹ in LB with 50% of *C. violaceum* supernatant. After an incubation of 8 h at 37 °C with agitation at 350 rpm, the culture was serially diluted and plated on LB-Agar plates. After a night at 37 °C, CFUs were counted.

5.18. Toxicity effect of hydrogen cyanide and violacein against *B. cereus*

To evaluate the toxic effect of hydrogen cyanide and violacein supernatant against *B. cereus*, KCN (Sigma-Aldrich) and violacein (Coger) were resuspended in LB at the required concentration. An overnight preculture of *B. cereus* was inoculated at 1/1000 (3×10^5 CFU ml⁻¹) in LB with 50% of KCN or violacein solution. After an incubation of 8 h at 37 °C with agitation at 350 rpm, the culture was serially diluted and plated on LB-Agar plates. After 16 h at 37 °C, CFUs were counted.

5.19. Antifungal activity of *C. violaceum* toward *S. cerevisiae* assay

To evaluate the toxic effect of *C. violaceum* on *S. cerevisiae* growth, 1.5 ml of a 16 h culture with or without enzyme of *C. violaceum* were collected and centrifuged for 5 min at $10,000 \times g$. Supernatants were discarded and pellets were washed with PBS buffer. After a centrifugation step ($10,000 \times g$, 5 min, room temperature), the pellets were resuspended in 1.5 ml of melted YPD-Agar (10 g l⁻¹ yeast extract, 20 g l⁻¹ peptone, 10 g l⁻¹ glucose, 1.5% agar) and poured in a 12-well plate. *S. cerevisiae* was inoculated from a single colony and pre-cultivated during 16 h at 30 °C in YPD medium with agitation at 350 rpm. In total, 10 µl of these cultures and tenfold serial dilutions were spotted onto *C. violaceum* inoculated YPD-Agar. After 16 h at 30°C, CFUs were counted.

5.20. Toxicity effect of *C. violaceum* supernatants and anisomycin against *S. cerevisiae*

To evaluate the bactericidal effect of *C. violaceum* cell-free supernatants against *S. cerevisiae*, supernatants from a 16 h culture in LB with and without enzyme of *C. violaceum* were collected by centrifugation and filtered at 0.22 µm. The supernatants were added at a final concentration of 50% (v/v) in YPD-Agar 1.5% at 56 °C and poured in a 12-well plate. In all, 10 µl of an overnight preculture of *S. cerevisiae* and tenfold serial dilutions were spotted on anisomycin-containing YPD-Agar. After 16 h growth at 30 °C, *S. cerevisiae* CFUs were counted.

5.21. Toxicity effect of anisomycin against *S. cerevisiae*

To evaluate the toxic effect of anisomycin against *S. cerevisiae*, anisomycin from *Streptomyces griseolus* (Sigma-Aldrich) was added in a concentration ranging from 50 nM to 500 µM in YPD-Agar 1.5% at 56 °C and poured in a 12-well plate. In total, 10 µl of an overnight preculture of *S. cerevisiae*

and tenfold serial dilutions were spotted on anisomycin-containing YPD-Agar. After 16 h at 30 °C, CFUs were counted.

5.22. LDH cytotoxicity assay toward J774.1 macrophages

J774.1 macrophages (murine macrophage) were grown in 75 cm² ventilated flask in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Gibco™ (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) Gibco™ (Thermo Fischer Scientific) and 1% penicillin/streptomycin Gibco™ (Thermo Fischer Scientific) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were transferred to a 50- ml tube and centrifuged at $750 \times g$ for 5 min at 4 °C. In a second time, cells were resuspended in RPMI with 10% FBS and centrifuged again to wash out any trace of antibiotics. Cells were seeded in a 96-well plate at 10^5 cells per well in 100 µl of RPMI with 10% FBS. Plates were incubated for 20 h at 37 °C with 5% CO₂. Cells of *C. violaceum* following 16 h of culture with and without enzyme were diluted in RPMI with 10% FBS and added to J774.1 cells; the different multiplicity of infection (MOI) of 1, 10, and 100 were tested and MOI of 1 was selected as MOI of 10 and 100 led to cytotoxic levels too high to be evaluated properly. In order to assess supernatant toxicity, 10 µl of supernatant of the bacterial culture was added to 10^5 J774.1 cells. After a centrifugation step (10 min, $500 \times g$, 4 °C) to bring bacteria in contact with macrophages, the plate was incubated for 1.5 h at 37°C with 5% CO₂. Supernatants were collected after centrifugation of (5 min, $200 \times g$, 4 °C). Cytotoxicity induced in J774.1 cells was quantitated by measuring the release of the cytosolic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium using CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fischer Scientific) according to the manufacturer recommendations. Maximum LDH release was measured with the lysis buffer provided by the kit, added 45 min before the end of the infection. Negative control was measured by adding PBS to non- infected macrophage cells.

5.23. Toxicity assay using planarians

Freshwater planarians belonging to the *Schmidtea mediterranea* species (asexual clonal line CIW4) were used for the experiment. The planarians were maintained in autoclaved water at 19 °C in the dark and fed twice a week with calf liver. The animals were starved for at least one week prior to the experiments. The water was changed every 2 days and did not contain antibiotics. Worms were manually selected to fall within a certain range of size, around 0.8–1 cm in length. Cells of *C. violaceum* from a 16-h culture with and without enzyme were washed twice in PBS and then resuspended at the

desired concentrations in autoclaved water. In all, 4 ml of the bacterial solution was transferred into a 12-well plate. Five planarians were added in each well and the plate was incubated at 19 °C in the dark. Survival was monitored over 12 days. Experiments were conducted in duplicate. To follow the evolution of bacterial concentration in the wells, samples of tap water were taken from worm-containing wells and control wells without worms over time. Then, the samples were serially diluted and plated on an LB-Agar plate. Colony-forming units (CFUs) were counted after 48 h incubation at room temperature.

5.24. Toxicity effect of *C. violaceum* supernatants against *S. mediterranea*

To evaluate the bactericidal effect of *C. violaceum* supernatants against *S. mediterranea* planarian, supernatants from a 16-h culture in LB with and without enzyme of *C. violaceum* were collected by centrifugation and filtered at 0.22 µm. Freshwater planarians belonging to the *Schmidtea mediterranea* species (asexual clonal line CIW4) were used for the experiment. The planarians were maintained in autoclaved water at 19 °C in the dark and fed twice a week with calf liver. The animals were starved for at least one week prior to the experiments. The water was changed every 2 days and did not contain antibiotics. Worms were manually selected to fall within a certain range of size, around 0.8–1 cm in length. Supernatants of *C. violaceum* from a 16 h culture with and without enzyme were resuspended at the desired concentrations in autoclaved water. In total, 4 ml of the supernatant solution was transferred into a 12- well plate. Five planarians were added in each well, and the plate was incubated at 19 °C in the dark. Survival was monitored over 12 days. Experiments were conducted in duplicate.

6. Acknowledgments

This work was financially supported by the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation, the University of Toulon (Ph.D. grant of N. Carriot), the Direction Générale de l'Armement (DGA) (Ph.D. grant of S. Mion), and Investissements d'avenir program (Méditerranée Infection 10-IAHU-03) of the French Agence Nationale de la Recherche (ANR). This work also received support from the ANR Astrid research program (RESSAC) from the DGA. The authors wish to thank Dr B. Paix (Toulon University, MAPIEM) for the helpful discussions concerning multi-omics analyses, Dr S. Greff (Aix-Marseille University, IMBE) for the acquisition of LC-MS data, Prof. J-L. Mège for providing macrophages, and P. Decloquement and S. Azza for the acquisition of proteomic data. LC-MS experiments were conducted on the regional platform MALLABAR funded by the Institute of

Ecology and Environment (INEE) of the French National Centre for Scientific Research (CNRS), the Total Foundation and the French Sud-PACA regional council.

7. Annexe Chapitre V

Supplementary information for

Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*

Sonia Mion^{1*}, Nathan Carriot^{3*}, Julien Lopez³, Laure Plener², Annick Ortalo-Magné³, Eric Chabrière¹, Gérald Culioli^{3,4}, David Daudé²

¹Aix Marseille University, Institut de Recherche pour le Développement, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Microbes Evolution Phylogeny and Infections, Institut Hospitalo-Universitaire-Méditerranée Infection, Marseille, France

²Gene&GreenTK, Marseille, France

³Université de Toulon, MAPIEM, EA 4323, Toulon, France

⁴Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale, UMR CNRS-IRD, Avignon Université, Aix-Marseille Université, Avignon, France

*These authors contributed equally to this work

Corresponding authors: david.daude@gene-greentk.com; gerald.culioli@univ-tln.fr; eric.chabriere@univ-amu.fr

Tableau S.V.1. : Proteins detected by proteomic analysis, raw data, fold change and functional classification

In black: proteins with a significant ANOVA (Pvalue < 0.05) and fold change superior to 1.5						
In blue: proteins with a significant ANOVA (Pvalue < 0.05) but a fold change inferior to 1.5						
In red: proteins with a non significant ANOVA (pvalue > 0.05)						
Infinity: fold change was not calculated as the protein was not detected in all samples of one of the two conditions						
SsoPox W263I						
Vs Negative control						
ID uniprot	Locus ID in CV 12472	Name in CV 12472	Anova	Fold change	log fold change	Higher in
P30967	CV_3180	phhA	0.85	1.40	-0.15	Negative Control
P60012	CV_3824	zapD	0.51	1.32	-0.12	Negative Control
P60091	CV_0984	prmA	0.00	1.39	-0.14	Negative Control
P60100	CV_4197	rplK	0.71	1.03	-0.01	Negative Control
Q7M7F1	CV_4188;CV_4200	tuf2	0.28	1.04	0.02	Sso Pox W263I
Q7M7G2	CV_1972	exbB1	0.00	2.55	-0.41	Negative Control
Q7MBD9	CV_3576	fabG2	0.38	1.10	0.04	Sso Pox W263I
Q7MBE0	CV_3414	fabG1	0.34	1.07	0.03	Sso Pox W263I
Q7MBF0	CV_2708	CV_2708	0.84	1.10	0.04	Sso Pox W263I
Q7MBF8	CV_1201	CV_1201	0.43	2.40	0.38	Sso Pox W263I
Q7MBF9	CV_0815	ptsH	0.39	1.01	0.00	Sso Pox W263I
Q7NPP3	CV_3421	CV_3421	0.07	1.42	0.15	Sso Pox W263I
Q7NPS9	CV_0875	CV_0875	0.35	1.79	-0.25	Negative Control
Q7NPT0	CV_0811	CV_0811	0.62	1.10	0.04	Sso Pox W263I
Q7NPU6	CV_4396	CV_4396	0.96	1.03	0.01	Sso Pox W263I
Q7NPV6	CV_4386	cyc	0.69	1.02	0.01	Sso Pox W263I
Q7NPW1	CV_4381	bioB	0.15	1.41	-0.15	Negative Control
Q7NPW9	CV_4373	CV_4373	0.33	1.13	0.05	Sso Pox W263I
Q7NPN8	CV_4364	CV_4364	0.39	1.08	-0.03	Negative Control
Q7NPY0	CV_4362	pqqL	0.85	1.04	0.02	Sso Pox W263I
Q7NPY5	CV_4357	mreB	0.16	1.05	0.02	Sso Pox W263I
Q7NPY6	CV_4356	gatC	0.30	1.37	0.14	Sso Pox W263I
Q7NPY7	CV_4355	gatA	0.78	1.07	0.03	Sso Pox W263I
Q7NPY8	CV_4354	gatB	0.32	1.00	0.00	Negative Control
Q7NQ01	CV_4341	ddlB	0.00	1.30	0.11	Sso Pox W263I
Q7NQ03	CV_4339	ftsA	0.49	1.10	0.04	Sso Pox W263I
Q7NQ04	CV_4338	ftsZ	0.49	1.05	0.02	Sso Pox W263I
Q7NQ09	CV_4333	CV_4333	0.39	1.12	0.05	Sso Pox W263I
Q7NQ13	CV_4329	CV_4329	0.03	1.15	0.06	Sso Pox W263I
Q7NQ18	CV_4324	CV_4324	0.69	1.01	-0.01	Negative Control
Q7NQ29	CV_4312	CV_4312	0.43	1.08	0.04	Sso Pox W263I
Q7NQ31	CV_4309	CV_4309	0.43	1.07	0.03	Sso Pox W263I
Q7NQ36	CV_4304	CV_4304	0.00	1.58	0.20	Sso Pox W263I
Q7NQ39	CV_4301	CV_4301	0.83	1.00	0.00	Negative Control
Q7NQ40	CV_4300	CV_4300	0.27	1.14	-0.06	Negative Control
Q7NQ51	CV_4289	proA	0.13	1.16	0.07	Sso Pox W263I
Q7NQ54	CV_4286	CV_4286	0.00	1.28	0.11	Sso Pox W263I
Q7NQ59	CV_4281;CV_1781	secA	0.63	1.08	0.03	Sso Pox W263I
Q7NQ61	CV_4279	dsbE	0.41	1.49	-0.17	Negative Control
Q7NQ64	CV_4276	CV_4276	0.80	1.05	-0.02	Negative Control
Q7NQ65	CV_4275	gshB	0.58	1.06	0.02	Sso Pox W263I
Q7NQ71	CV_4269	tonA	0.73	1.02	-0.01	Negative Control
Raw data all detected proteins			Fold change and classification			

Tableau S.V.2. : Metabolome analysis filtration criteria

[illegible]

Tableau S.V.3. : List of VIP metabolites and proposed identification

VIP N°	m/z	RT (min)	VIP score	Molecular formula	Mass error (ppm)	mσ ^a	MS/MS fragment ions (relative abundance in %)	Putative annotation	Heatmap	
									No enzyme	SsoPox W2631
1	240.0690	7.66	3,14	C ₁₁ H ₁₈ NO ₃ S ⁺	-0.2	7.6	192.0656 [C ₁₀ H ₁₈ NO ₃] ⁺ (7), 174.0544 [C ₁₀ H ₁₈ NO ₂] ⁺ (41), 146.0598 [C ₉ H ₁₆ NO] ⁺ (67), 120.0443 [C ₉ H ₁₆ O] ⁺ (100), 94.0652 [C ₈ H ₁₄ N] ⁺ (42)	Thiobutacin	-5,02	5,02
2	386.1137	7.73	2,97	C ₂₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ ⁺	-0.4	2.2	368.1026 [C ₂₂ H ₁₃ N ₃ O ₃] ⁺ (6), 350.0921 [C ₂₂ H ₁₂ N ₃ O ₂] ⁺ (50), 324.1123 [C ₂₁ H ₁₁ N ₃ O] ⁺ (100), 296.1167 [C ₂₀ H ₁₁ N ₃] ⁺ (4)	Chromopyrrollic acid	-4,74	4,74
3	478.2081	8.45	2,92	C ₂₅ H ₂₈ N ₅ O ₅ ⁺	-1.1	1.5	335.1497 [C ₂₄ H ₂₆ N ₅ O ₄] ⁺ (100), 268.0714 [C ₂₄ H ₂₆ N ₅ O ₃] ⁺ (62), 231.1242 [C ₂₃ H ₂₅ N ₅ O] ⁺ (6), 212.1280 [C ₂₂ H ₂₄ NO ₃] ⁺ (4), 116.0707 [C ₁₀ H ₁₀ NO ₂] ⁺ (16), 105.0335 [C ₇ H ₈ O] ⁺ (20), 89.0597 [C ₆ H ₈ O ₂] ⁺ (11), 59.0495 [C ₅ H ₇ O] ⁺ (10)	γ ^c	-4,66	4,66
4	270.1703	6.94	2,84	C ₁₄ H ₂₄ NO ₄ ⁺	-1.1	45.6	252.1608 [C ₁₄ H ₂₂ NO ₃] ⁺ (2), 169.1222 [C ₁₀ H ₁₇ O ₂] ⁺ (2), 102.0550 [C ₈ H ₁₄ NO ₂] ⁺ (11), 74.0601 [C ₇ H ₁₄ NO] ⁺ (3), 56.0494 [C ₅ H ₁₀ N] ⁺ (4)	3-oxo-C10-HSL	4,54	-4,54
5	272.1854	6.85	2,74	C ₁₄ H ₂₆ NO ₄ ⁺	1	3.7	254.1750 [C ₁₄ H ₂₄ NO ₃] ⁺ (In source fragmentation), 236.1639 [C ₁₄ H ₂₂ NO ₂] ⁺ (5), 153.1266 [C ₁₀ H ₁₇ O] ⁺ (40), 135.1166 [C ₁₀ H ₁₅] ⁺ (100), 102.0549 [C ₈ H ₁₄ NO ₂] ⁺ (84), 74.0598 [C ₇ H ₁₄ NO] ⁺ (16), 56.0494 [C ₅ H ₁₀ N] ⁺ (6)	3-OH-C10-HSL	4,37	-4,37
6	756.3386	10.64	2,69	C ₄₃ H ₅₀ NO ₁₁ ⁺	-1.0	6.1	450.1557 [C ₄₂ H ₄₈ NO ₁₀] ⁺ (24), 432.144 [C ₄₂ H ₄₆ NO ₉] ⁺ (19), 363.1952 [C ₄₂ H ₄₂ O ₈] ⁺ (30), 313.1068 [C ₄₁ H ₄₇ O ₈] ⁺ (38), 283.096 [C ₄₁ H ₄₅ O ₇] ⁺ (32), 248.0915 [C ₄₁ H ₄₄ NO ₄] ⁺ (53), 203.0707 [C ₄₂ H ₄₂ O ₃] ⁺ (82), 138.0551 [C ₇ H ₈ NO ₂] ⁺ (68), 111.0443 [C ₆ H ₇ O ₂] ⁺ (93), 89.0598 [C ₆ H ₆ O ₂] ⁺ (100)	γ ^d	4,29	-4,29
7	343.2837	10.35	2,56	C ₂₀ H ₃₈ O ₄ ⁺	1.6	4.6	325.2728 [C ₂₀ H ₃₆ O ₃] ⁺ (23), 251.2361 [C ₁₇ H ₃₁ O] ⁺ (38), 233.2254 [C ₁₇ H ₂₉] ⁺ (50)	Monoacylglycerol (C17:1)	-4,09	4,09
8	224.1286	1.04	2,50	C ₁₂ H ₁₈ NO ₃ ⁺	0.2	8.8	n.f. ^e	Deacetylanisomycin	3,99	-3,99
9	280.1544	5.86	2,50	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄ ⁺	0.7	-2.3	224.1276 [C ₁₂ H ₁₈ NO ₃] ⁺ (8), 206.1174 [C ₁₂ H ₁₆ NO ₂] ⁺ (36), 188.1067 [C ₁₂ H ₁₄ NO] ⁺ (8), 159.0807 [C ₁₁ H ₁₁ O] ⁺ (9), 121.0648 [C ₈ H ₉ O] ⁺ (100)	Anisomycin propionate derivative	3,99	-3,99
10	286.2012	7.38	2,40	C ₁₅ H ₂₈ NO ₄ ⁺	0.1	6.9	268.1907 [C ₁₅ H ₂₆ NO ₃] ⁺ (In source fragmentation), 250.1772 [C ₁₅ H ₂₄ NO ₂] ⁺ (3), 167.1418 [C ₁₁ H ₁₉ O] ⁺ (17), 149.1325 [C ₁₁ H ₁₇] ⁺ (69), 102.0549 [C ₈ H ₉ NO ₂] ⁺ (100), 74.0601 [C ₇ H ₈ NO] ⁺ (17), 56.0491 [C ₅ H ₁₀ N] ⁺ (3)	3-OH-C11-HSL	3,83	-3,83
11	292.1528	6.98	2,34	C ₁₆ H ₂₂ NO ₄ ⁺	5.3	16.2	n.f.	?	3,73	-3,73
12	596.2133	8.56	2,29	C ₃₁ H ₃₄ NO ₁₁ ⁺	-1.2	7.1	450.1557 [C ₃₀ H ₃₂ NO ₁₀] ⁺ (17), 432.144 [C ₃₀ H ₃₀ NO ₉] ⁺ (17), 363.1952 [C ₃₀ H ₂₆ O ₈] ⁺ (30), 313.1066 [C ₃₁ H ₃₀ O ₈] ⁺ (26), 283.096 [C ₃₁ H ₂₈ O ₇] ⁺ (51), 248.0915 [C ₃₁ H ₂₈ NO ₄] ⁺ (53), 203.0701 [C ₃₂ H ₃₂ O ₃] ⁺ (81), 138.0551 [C ₇ H ₈ NO ₂] ⁺ (68), 111.0443 [C ₆ H ₇ O ₂] ⁺ (93), 89.0598 [C ₆ H ₆ O ₂] ⁺ (100)	γ ^d	3,65	-3,65
13	318.2272	7.25	2,26	C ₁₆ H ₃₂ NO ₅ ⁺	1.0	5.4	n.f.	?	3,60	-3,60
14	266.1385	3.82	1,89	C ₁₄ H ₂₀ NO ₄ ⁺	0.6	4.7	224.1273 [C ₁₂ H ₁₈ NO ₃] ⁺ (4), 206.1175 [C ₁₂ H ₁₆ NO ₂] ⁺ (32), 188.1075 [C ₁₂ H ₁₄ NO] ⁺ (11), 159.0805 [C ₁₁ H ₁₁ O] ⁺ (7), 121.0647 [C ₈ H ₉ O] ⁺ (100)	Anisomycin ^f	3,02	-3,02
15	237.2212	10.07	1,85	C ₁₆ H ₂₉ O ⁺	0.2	1.7	n.f.	?	-2,96	2,96
16	408.2967	6.86	1,85	C ₂₀ H ₄₂ NO ₇ ⁺	-2.7	5.6	n.f.	?	2,96	-2,95
17	274.2014	8.12	1,83	C ₁₄ H ₂₈ NO ₄ ⁺	-0.3	4.8	256.1905 [C ₁₄ H ₂₆ NO ₃] ⁺ (6), 238.1822 [C ₁₄ H ₂₄ NO ₂] ⁺ (1), 155.1434 [C ₁₀ H ₁₉ O] ⁺ (6), 137.1326 [C ₁₀ H ₁₇] ⁺ (2), 120.0657 [C ₈ H ₉ NO ₂] ⁺ (100), 102.0551 [C ₈ H ₉ NO] ⁺ (28), 74.0602 [C ₇ H ₈ NO] ⁺ (85), 56.0492 [C ₅ H ₁₀ N] ⁺ (11)	C10-HS (Homoserine)	-2,91	2,91
18	298.2020	8.05	1,80	C ₁₆ H ₂₈ NO ₄ ⁺	-0.8	16.7	n.f.	3-oxo-C12-HSL	2,87	-2,87
19	457.1655	7.81	1,75	C ₂₈ H ₂₂ N ₄ O ₂ ⁺	1.0	4.6	427.1511 [C ₂₈ H ₁₉ N ₄ O] ⁺ (1), 328.108 [C ₂₈ H ₁₈ N ₄ O ₂] ⁺ (2), 213.0659 [C ₁₂ H ₆ N ₂ O ₂] ⁺ (1), 145.1217 [C ₈ H ₁₇ O ₂] ⁺ (2), 101.0595 [C ₈ H ₉ O ₂] ⁺ (16), 89.0598 [C ₆ H ₉ O ₂] ⁺ (13), 59.0493 [C ₅ H ₇ O] ⁺ (7)	?	2,79	-2,79
20	549.2707	6.56	1,74	C ₃₀ H ₃₇ N ₄ O ₆ ⁺	0.1	5.0	275.1387 [C ₂₈ H ₂₆ N ₄ O ₅] ⁺ (100), 247.1435 [C ₂₈ H ₂₄ N ₄ O ₄] ⁺ (2), 150.0914 [C ₉ H ₁₂ NO] ⁺ (7), 121.065 [C ₈ H ₉ O] ⁺ (6), 70.0651 [C ₆ H ₉ N] ⁺ (2)	?	2,78	-2,78
21	517.2202	8.29	1,52	C ₂₇ H ₂₉ N ₆ O ₅ ⁺	-1.7	11.8	374.1608 [C ₂₇ H ₂₆ N ₆ O ₄] ⁺ (100), 307.0819 [C ₂₆ H ₂₄ N ₆ O ₃] ⁺ (4), 275.1141 [C ₂₅ H ₂₂ N ₆ O ₂] ⁺ (4), 147.1009 [C ₇ H ₁₃ O ₂] ⁺ (2), 133.0857 [C ₆ H ₁₃ O ₂] ⁺ (4), 103.039 [C ₅ H ₁₁ O ₂] ⁺ (3), 89.0597 [C ₄ H ₉ O ₂] ⁺ (7), 59.0493 [C ₃ H ₇ O] ⁺ (4)	γ ^c	-2,40	2,40

^a Constructor statistical match factor (comparison of theoretical and experimental isotopic patterns). ^b n.d. : Not determined. ^c Vips n°4 and n°24 showed a similar MS/MS fragmentation pattern. ^d Vips n°8 and n°15 showed similar MS/MS fragment ions. ^e n.f. : Not fragmented. ^f Identification confirmed using a commercial standard.

Normalized scaled intensity	-6	-3	0	3	6
Color code	-6	-3	0	3	6

Tableau S.V.4. : Kinetic parameters of SsoPox W263I for C9-HSL, C10-HSL, C11-HSL, C12-HSL, 3-OH-C10-HSL, 3-oxo-C10-HSL and 3-oxo-C12-HSL

AHLs	C9-HSL	C10-HSL	C11-HSL	C12-HSL	3-OH-C10-HSL	3-oxo-C10-HSL	3-oxo-C12-HSL
k_{cat} ($10^{-1} s^{-1}$)	1.52 ± 0.07	0.90 ± 0.13	0.70 ± 0.12	ND	1.03 ± 0.04	6.00 ± 0.90	18.0 ± 0.5
K_M (μM)	347 ± 46	664 ± 208	1030 ± 340	ND	491 ± 48	1605 ± 443	17.8 ± 4.9
k_{cat}/K_M ($M^{-1}.s^{-1}$)	439 ± 154	135 ± 60	68 ± 35	ND	210 ± 83	374 ± 117	$(101 \pm 28) \times 10^3$
Results from	This study	This study	This study	This study	This study	(Hiblot et al. 2013b)	(Hiblot et al. 2013b)
ND: not detected							

Figure S.V.1 : LC-MS extracted ion chromatograms of supernatant and whole culture extracts of cultures of *C. violaceum* not treated with SsoPox. **(A)** Identification of HSL in whole culture and supernatant extracts. **(B)** Identification of anisomycin and violacein in supernatant extracts.

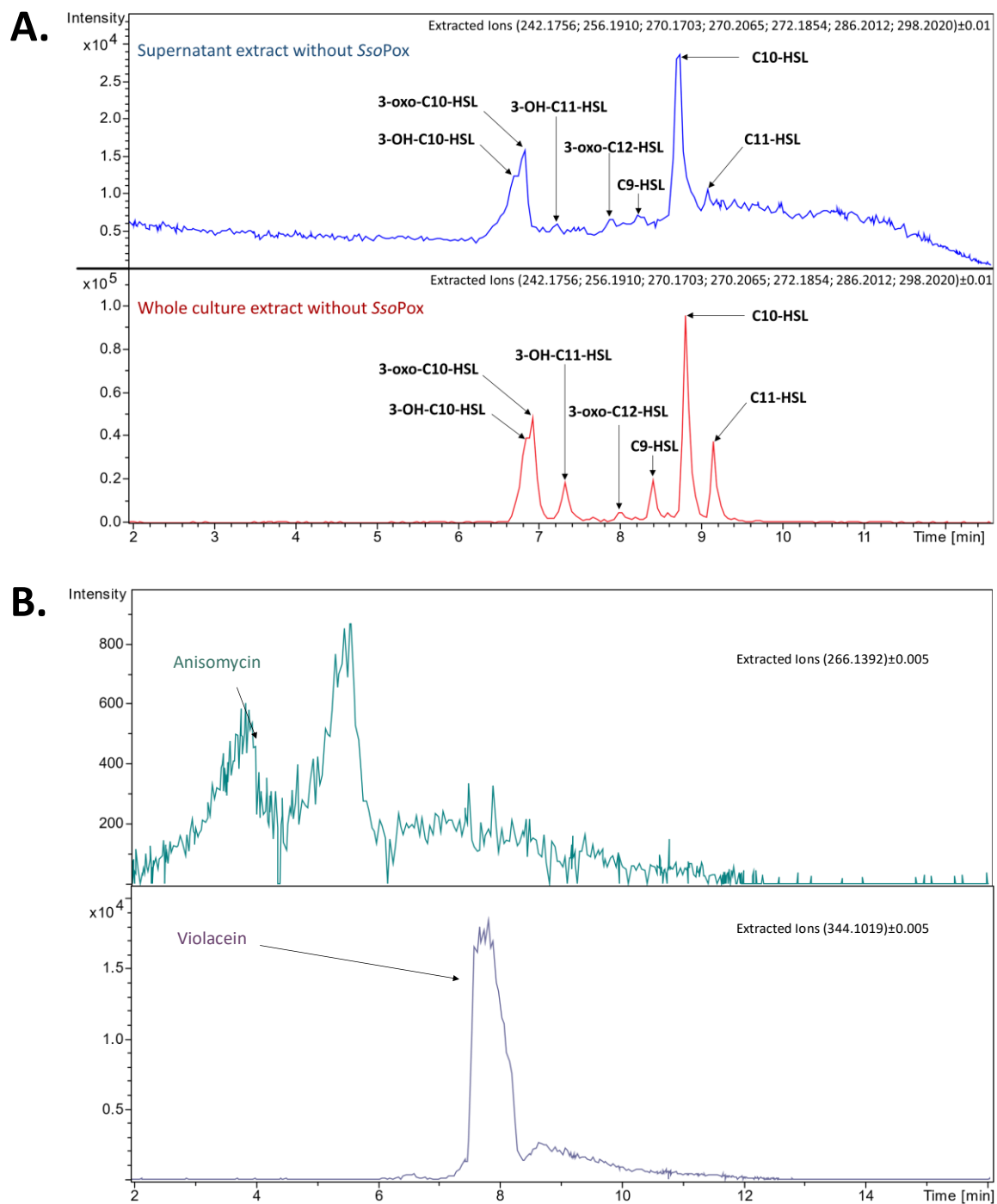


Figure S.V.2. : Impact of SsoPox W263I on violacein biosynthesis in *C. violaceum* - extended figure. **(A)** Organization of the violacein biosynthesis operon. Arrows indicate direction of transcription. **(B)** Representation of SsoPox W263I impact on violacein biosynthesis by CV 12472 untreated (purple) and treated cultures (yellow). Proteins (dashed line boxes) and metabolites (full line boxes) normalized scaled intensities (NSI) are represented as the mean and standard deviations (metabolomic: $n = 3$ biological replicates, proteomic: $n = 8$, 4 biological replicates $\times$ 2 technical replicates). * p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 , *** p -value < 0.001 according to Student's t -test. FC: fold change.

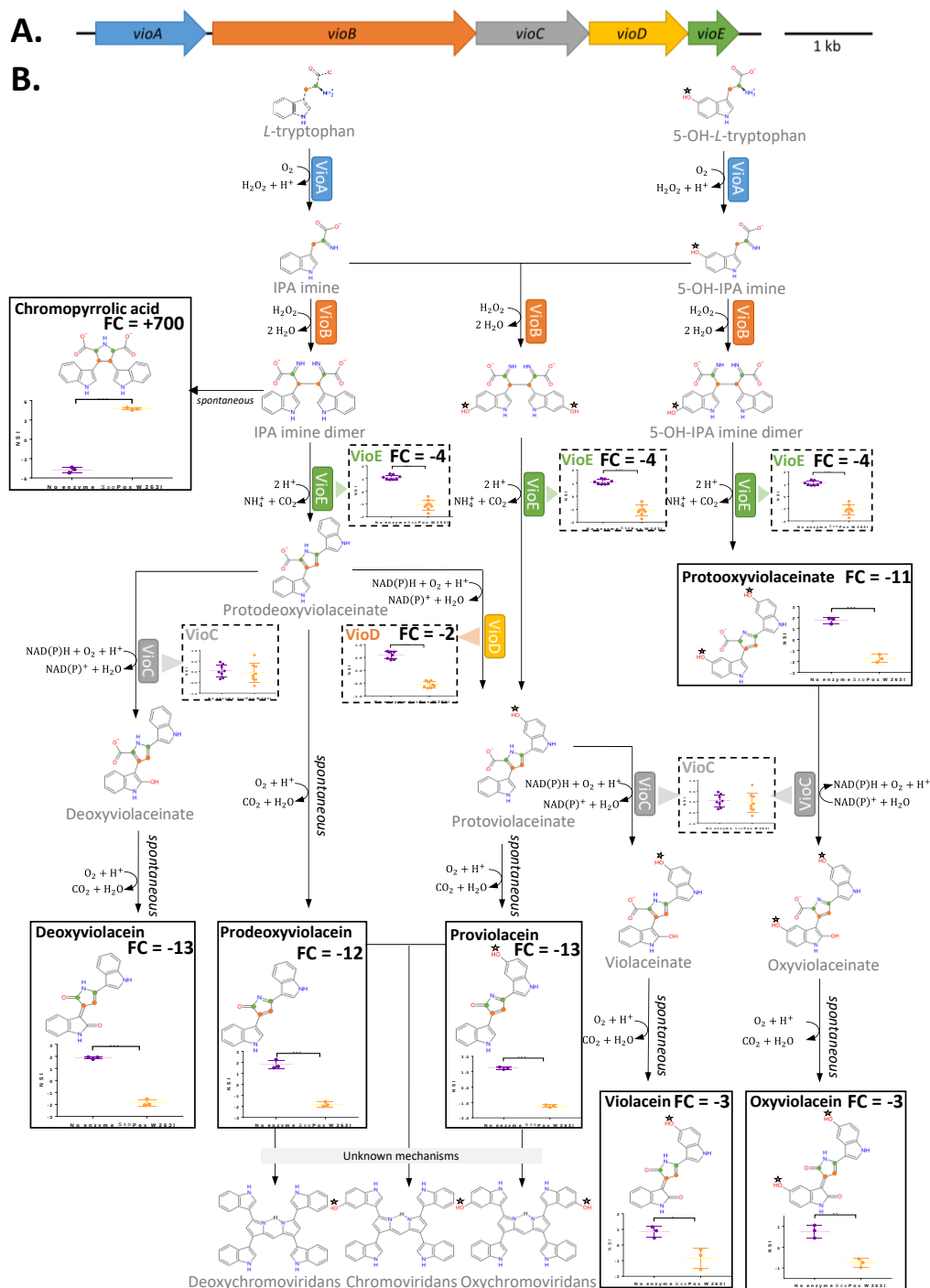


Figure S.V.3. : Identification of anisomycin biosynthesis gene cluster in *C. violaceum* ATCC 12472 and comparison with *Streptomyces hygrospinosus* ACCC40033. **(A)** Blast comparisons of proteins involved in anisomycin biosynthesis between *C. violaceum* and *S. hygrospinosus*. Genes written in green have been previously shown to be necessary for the full anisomycin biosynthesis from *L*-tyrosine in *S. hygrospinosus*; genes written in orange are those being involved in the glycosylation and deglycosylation steps of anisomycin and its intermediates; genes written in grey have not been shown as being involved in the anisomycin biosynthesis; aniF (blue) is involved in the anisomycin regulation and aniL (purple) codes for a transporter 1. **(B)** Comparison of *S. hygrospinosus* and *C. violaceum* gene cluster organizations. Full lines indicate sequence identities as revealed by Blast analyses and thickness of the lines represents E-values. The dashed line indicates a similar function without any sequence homology.

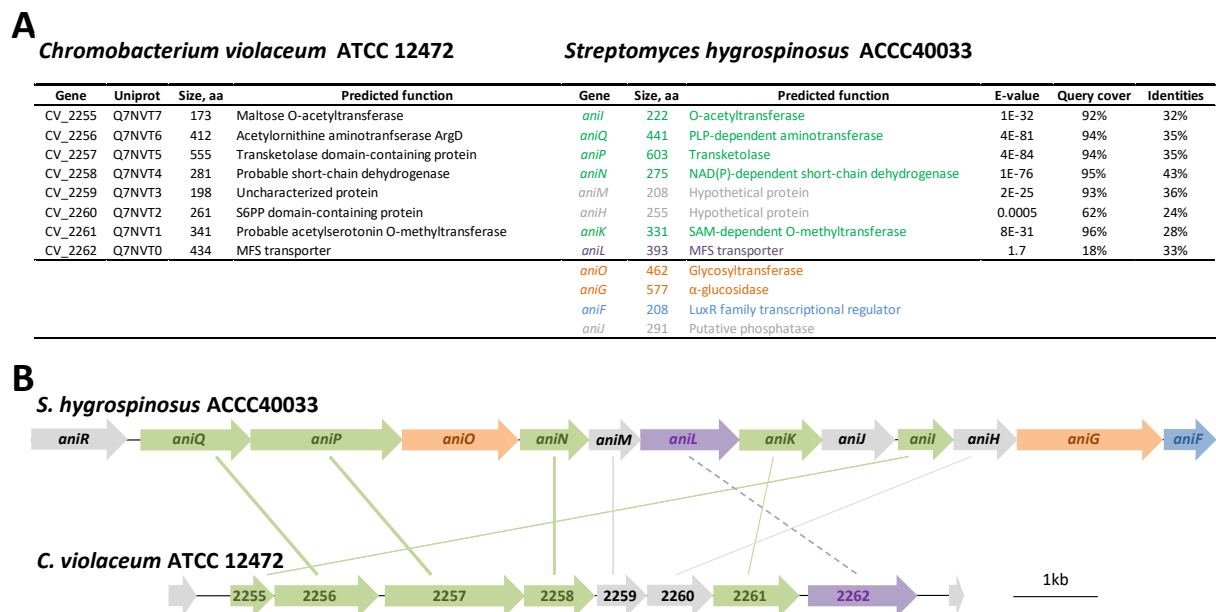


Figure S.V.4. : Effect of *C. violaceum* supernatant (A), violacein (B) and hydrogen cyanide (C) on the growth of *B. cereus*. Mean bacterial concentration in CFU.ml⁻¹ of *B. cereus* after 8 hours of culture in the presence of 50% of supernatant from treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow bar) or untreated cultures as negative controls (purple bar) (A) and in the presence of violacein (B) and hydrogen cyanide (C) in quantity equivalent to the one in 50% of supernatant from treated cultures of *C. violaceum* with 0.5 mg ml⁻¹ SsoPox W263I (yellow bar) or in untreated cultures (purple bar). Error bars represent the standard deviations of $n = 6$ experiments (3 biological replicates $\times$ 2 technical replicates) or $n = 3$ biological replicates, each represented by one point. ** p -values < 0.01 according to Student's t -test. ND: Not detected. Dotted red line represents the mean bacterial concentration of *B. cereus* with 50% of culture medium alone.

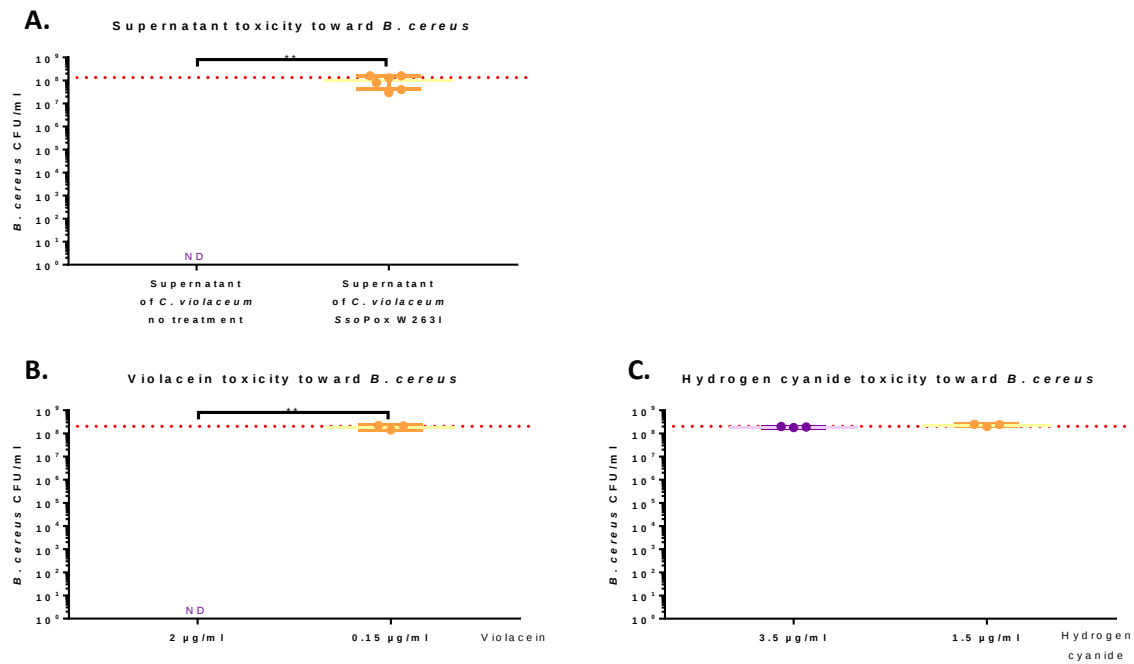


Figure S.V.5. : *C. violaceum* and anisomycin impact on colony size and growth of *S. cerevisiae*. **(A)** Representative pictures of colony formation of *S. cerevisiae* after 24 h at 30°C from left to right : on YPD-Agar infected by untreated *C. violaceum* (dilution factor at 10^{-2}), on YPD-Agar infected by *C. violaceum* treated with 0.5 mg.ml^{-1} SsoPox W263I (dilution factor at 10^{-4}), on YPD-Agar containing $500 \mu\text{M}$ of anisomycin (dilution factor at 10^{-4}), on YPD-Agar for control (dilution factor at 10^{-4}). Pictures are representative of $n = 3$ independent replicates. **(B)** Mean yeast concentration in CFU.ml^{-1} of *S. cerevisiae* after 24 hours growth on YPD-agar containing anisomycin at concentrations ranging from 50 nM to $500 \mu\text{M}$. Error bars represent the standard deviations of $n = 3$ biological replicates. Dotted red line represents the mean yeast concentration of *S. cerevisiae* on YPD-Agar only.

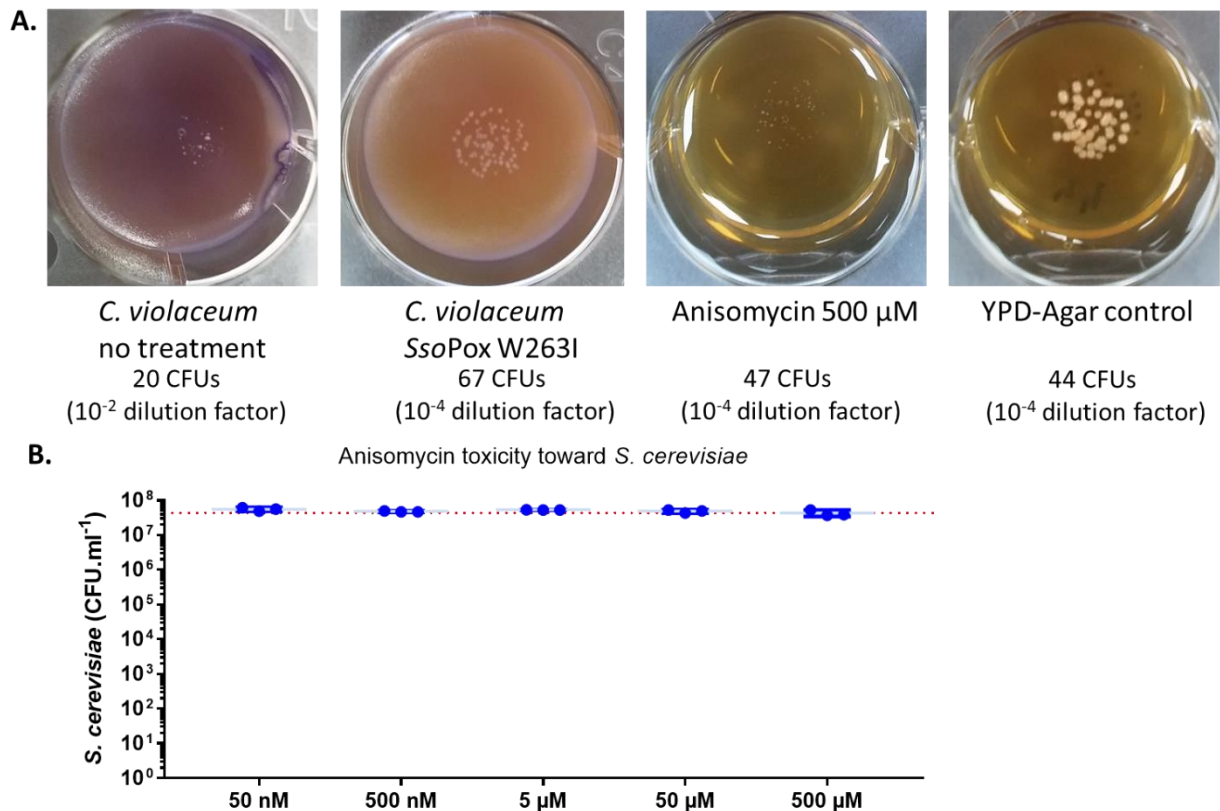


Figure S.V.6. : Evolution of bacterial concentration of *C. violaceum* with and without planarian over time. Bacterial concentration in CFU.ml⁻¹ of *C. violaceum* treated with 0.5 mg.ml⁻¹ SsoPox W263I (full line) and untreated cultures (dotted line) in well containing planarians (A) and well without worm (B).

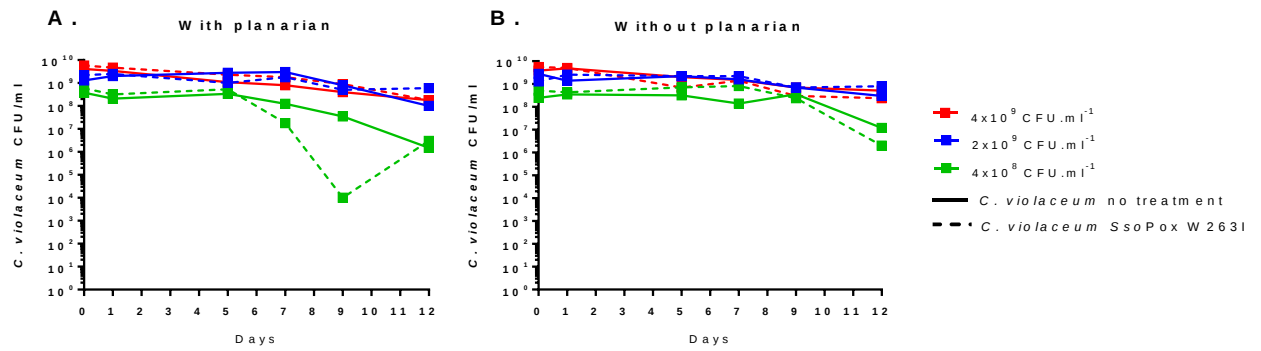
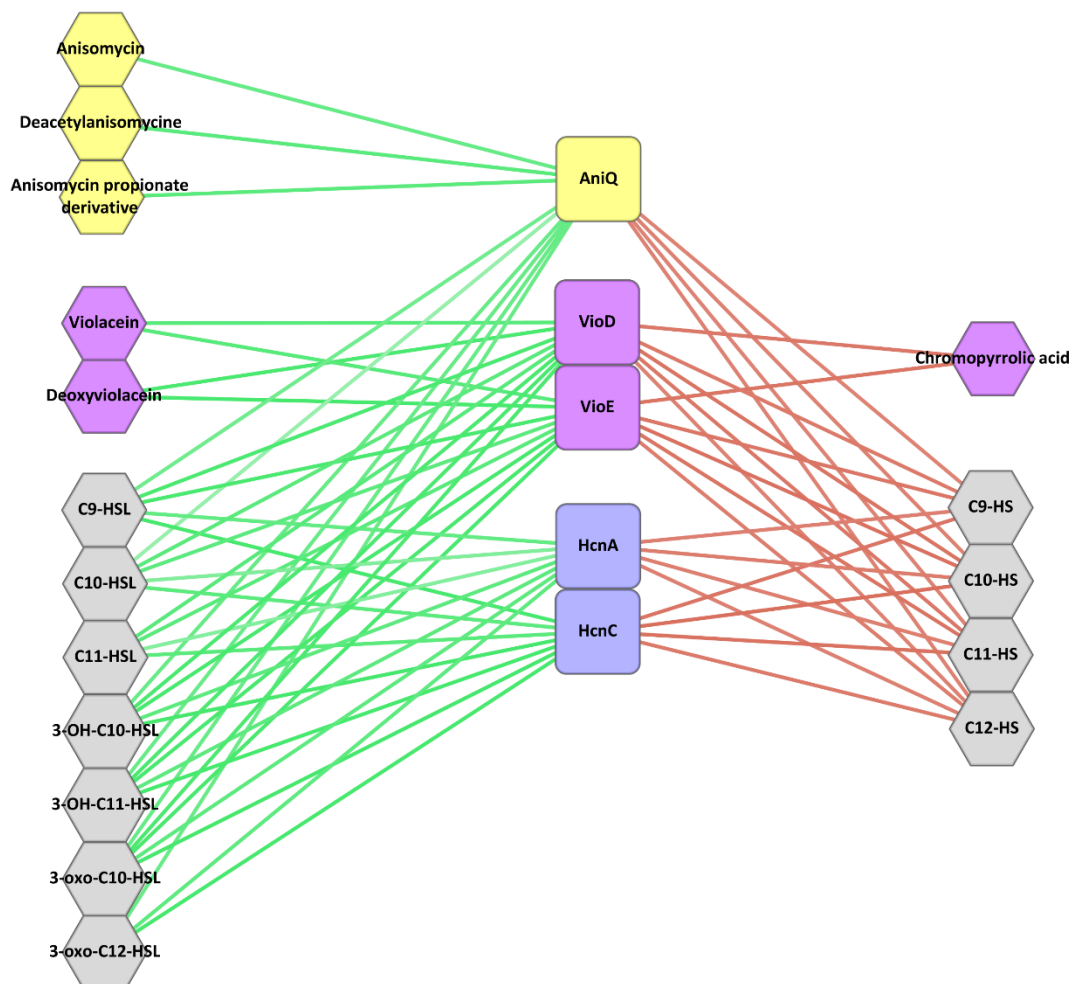


Figure S.V.7. : SsoPox impacts jointly the biosynthesis of toxic metabolites and the production of AHLs. Multi-omics correlation network between AHLs (grey), their hydrolyzed form HSs (grey) and molecules involved in anisomycin (yellow), violacein (purple) and hydrogen cyanide (blue) production.



CHAPITRE VI

Projet ROTOR : Etude du rôle de l'hydrodynamisme sur la colonisation de surfaces artificielles par des biofilms en milieu marin



A. Introduction

La colonisation biologique de toute surface immergée constitue une préoccupation constante pour les activités humaines en milieu marin. Ce phénomène, appelé *biofouling*, peut entraîner l'accélération de la corrosion des surfaces, la diminution des performances hydrodynamiques ainsi que des pertes économiques importantes (Salta et al. 2013; Schultz et al. 2011; Skovhus et al. 2017). Le *biofouling* qui se forme sur les infrastructures immergées est le fruit d'un processus complexe impliquant un large éventail de micro- et de macro-organismes (Chang et al. 2020; de Carvalho 2018; Yebra et al. 2004). Étant donné leur cinétique de formation rapide, l'apparition des biofilms représente l'étape initiale du *biofouling*, étape suivie par la colonisation de macro-organismes. Les biofilms sont formés par l'organisation de cellules bactériennes marines (mais également d'autres micro-organismes tels que des diatomées) en structures tridimensionnelles au sein d'une matrice constituée de substances polymériques extracellulaires (*Extracellular Polymeric Substances* ; EPS) produites par les microorganismes eux-mêmes (Haras 2005; Stoodley et al. 2002).

L'évolution de la structure des biofilms dépend de multiples facteurs tels que le type de surface colonisée (biotique/abiotique, propriétés physico-chimiques de surface...), le type de micro-organismes présents dans la colonne d'eau (bactéries, diatomées, microalgues, champignons, protozoaires...), ou encore les paramètres environnementaux (pH, température, turbidité, salinité...). Ces derniers sont notamment liés à la saisonnalité. Plus précisément, l'hydrodynamisme apparaît comme un des facteurs les plus structurants de la vie océanique et pourtant il n'a été que peu étudié comme paramètre influant sur la formation et la composition des biofilms. Il affecte les communautés présentes dans le biofilm, notamment les procaryotes, et limite fortement la densité cellulaire (Catão et al. 2019). De plus, un stress hydrodynamique entraîne une diminution de la quantité de biofilm, influence la quantité d'EPS formés et affecte l'architecture des biofilms (Chang et al. 2020; Polst et al. 2018; Romeu et al. 2021). D'un point de vue expérimental, des dispositifs rotatifs appliquant des forces de cisaillements ont déjà été décrits afin de tester l'influence de ces forces hydrodynamiques sur la formation de biofilms en laboratoire par la bactérie marine *Cobetia marina* (D'Souza et al. 2010). Mais pas d'autres études ont été réalisées pour répondre à cette question scientifique du fait de la complexité de leur mise en œuvre en milieu marin.

Dans ce contexte, l'originalité de notre étude est la mise en place d'un système permettant le développement de biofilms *in situ* avec des conditions hydrodynamiques variées et contrôlées. Différentes analyses de caractérisation biochimique et visuelle de ces biofilm ont été

effectuées : dosages des EPS (Khandeparker and Bhosle 2001; Mojica et al. 2007), analyse métabolomique non-ciblée (Favre et al. 2018), analyse IRTF-ATR (Quilès et al. 2010; Wang et al. 2013) et analyses microscopiques (Chang et al. 2020; Le Norcy et al. 2017). L'intérêt de ce panel d'analyses est que chacune apporte une information spécifique. En définitive, le but de cette étude a été de mettre en lumière la complémentarité des différentes méthodes utilisées afin de révéler l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation et la production métabolique de biofilms marins formés *in situ*.

B. Matériels & méthodes

1. Système hydrodynamique (rotor immergé)

Un rotor comportant 18 plaques en PVC préalablement sablées (25×5 cm) (Figure VI.1.A.) a été immergé dans la rade de Toulon ($43^{\circ}06'18.8''$ N; $5^{\circ}53'7.7''$ E ; site Ifremer de Brégaillon, mer Méditerranée, France) à chaque saison pendant un mois, de l'été 2020 au printemps 2021. L'immersion d'été a duré du 23/07/2020 au 26/08/2020, celle d'automne du 03/11/2020 au 03/12/2020, celle d'hiver du 01/02/2021 au 02/03/2021 et enfin celle de printemps du 01/04/2021 au 03/05/2021. Les plaques ont été fixées du centre du rotor vers la périphérie, engendrant un gradient de vitesse ressentie allant de 1 à 4 nœuds. Les plaques ont été découpées en quatre parties ; la partie la plus proche du centre de rotation a été soumise, en toute logique, à la vitesse la plus faible ($V_1 = 1$ nœud) tandis que celle périphérique a subi la vitesse la plus élevée ($V_4 = 4$ nœuds) (Figure VI.1.C.). Ce dispositif a permis d'étudier l'effet de l'hydrodynamisme sur la structure de biofilms formés dans un environnement marin semi-contrôlé. D'autres plaques en PVC, préalablement sablées, ont été fixées à un flotteur permettant ainsi d'étudier le développement de biofilms en mode statique ($V_0 = 0$ nœud) (Figure VI.1.B.).

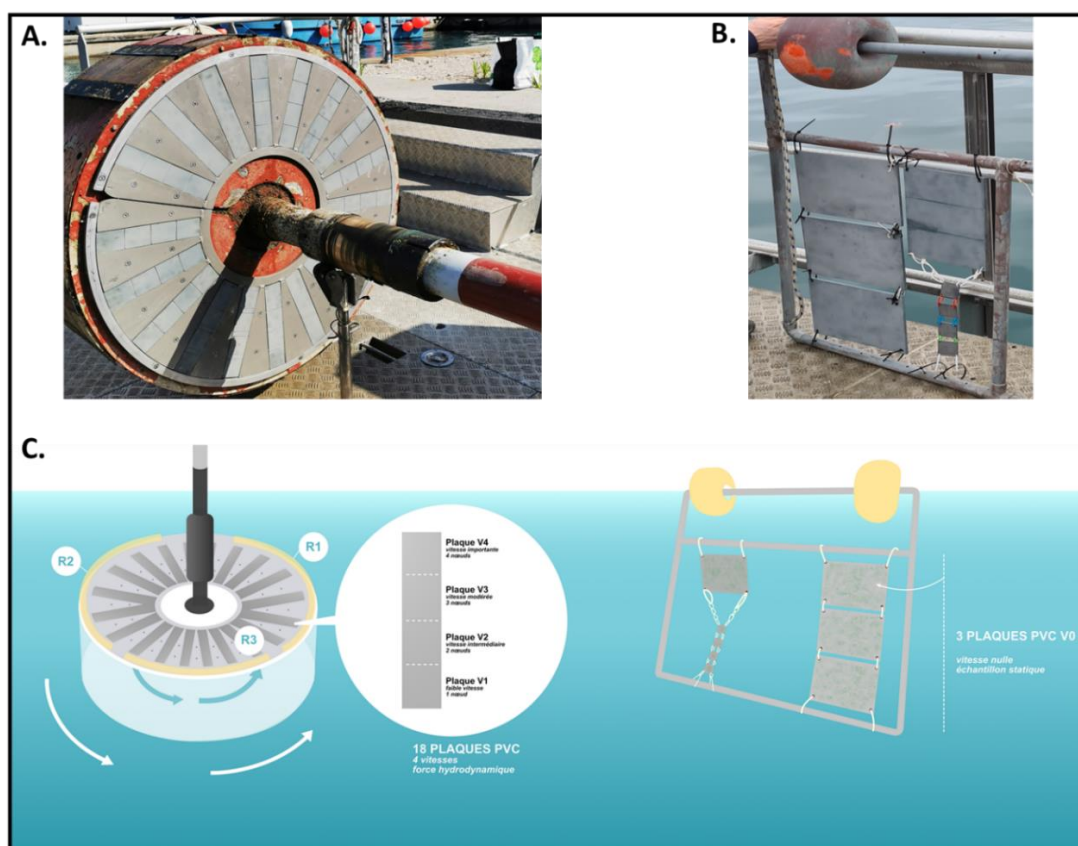


Figure VI.1. : Immersion des échantillons en modes statique et dynamique. **A)** Vue générale du rotor, **B)** Vue générale du système d'immersion statique, **C)** Schématisation globale des systèmes d'immersion et détails des plaques.

Concernant la surface accordée à chaque analyse pour l'étude en mode dynamique (rotor), trois plaques ont été destinées à l'analyse métabolomique (surface de $5 \times 6,25$ cm en triplicats pour chaque vitesse) et 12 plaques à l'analyse biochimique des EPS (12 fois une surface de $5 \times 6,25$ cm pour chaque vitesse). Comme pour les analyses par spectroscopie infrarouge (IR-TF), microscopie confocale et microscopie électronique à balayage, la quantité de matière biologique nécessaire reste modeste, seule une surface réduite (1×5 cm pour chaque vitesse et pour chaque type d'analyse) a été réservée au sein des trois plaques destinées à l'analyse par metabarcoding (surface de 5×5 cm en triplicats pour chaque vitesse) (Figure VI.2.A.).

Pour le mode statique (V_0), la répartition des plaques a été la suivante (Figure VI.2.B.) :

- 1 plaque de 45×15 cm (divisée en 3 pour chaque répliquat) pour les analyses métabolomiques,
- 3 plaques de 45×15 cm pour les dosages biochimiques des EPS,
- 1 plaque de 5×5 cm a été divisée en 3 pour les analyses de spectroscopie IR-TF, de microscopie confocale et de microscopie électronique à balayage,
- 3 plaques de 5×5 cm pour les analyses de metabarcoding.

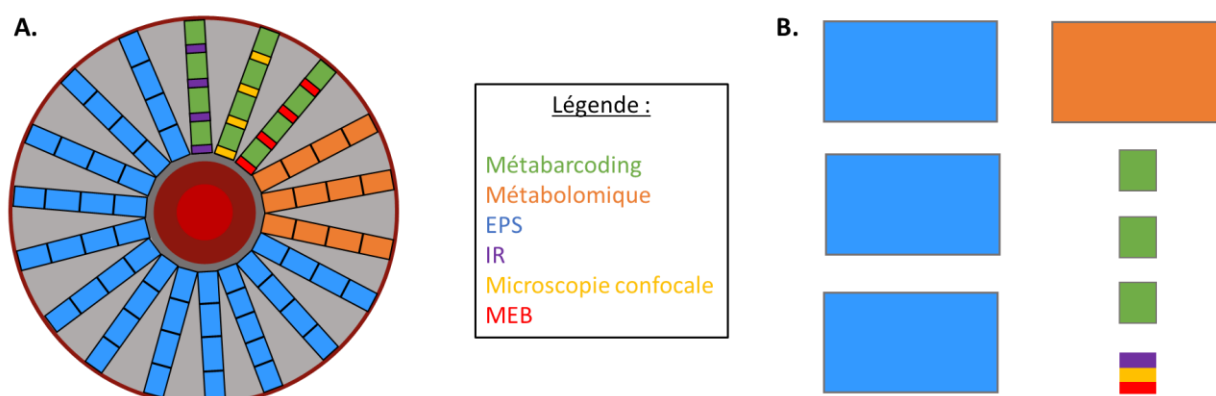


Figure VI.2. : Organisation des surfaces immergées en fonction de chaque type d'analyses prévues en mode : **A)** dynamique (rotor) et **B)** statique

2. Mesure des paramètres environnementaux

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer au niveau du site d'immersion des deux systèmes expérimentaux (statique et dynamique) ont été mesurées *in situ*. La température (°C), la salinité (g/L), le pH et l'oxygène dissous (saturation en %) ont été mesurés à l'aide d'une sonde multi-paramètres (Hydrolab® DS5X, Hatch Hydromet, Loveland, CO, USA). Ces mesures ont été effectuées à trois temps donnés pour chaque période d'immersion : 1) J_0 : au moment de l'immersion des plaques, 2) J_{15} : à la moitié de la période d'immersion, 3) J_{30} : lors de la récupération des échantillons. Les mesures ainsi obtenues ont été traitées grâce au logiciel GraphPad Prism (vers. 7.04).

3. Collecte et analyse des échantillons permettant la réalisation des différentes analyses de caractérisation

3.1. Dosages biochimiques des fractions contenant les EPS

Pour l'analyse biochimique des EPS, les échantillons de biofilms ont été directement récupérés par grattage dans un tube Falcon de 50 mL contenant 15 mL d'ASW (*Artificial sea water*) stérile. Lorsque toute la plaque a été grattée, la lame est rincée 2 fois avec 1 mL d'ASW stérile. Les différentes étapes d'extraction et de caractérisation des trois fractions (FC (Fraction colloïdale), FL (Fraction liée) et FR (Fraction résiduelle)) sont décrites dans le chapitre 2 (partie II.3).

3.2. Analyse métabolomique non ciblée par UHPLC-HRMS

En ce qui concerne cette analyse, les étapes de collecte, d'extraction et de *quenching* ont été décrites dans le chapitre 2 (partie II.2.1). Les échantillons ont été analysés par un système de chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplé à un spectromètre de masse à haute résolution (Cf. partie II.2.2). Les données ont ensuite été extraites et traitées via le logiciel MZmine 2 (vers. 2.53 ; les différents paramètres utilisés ont été répertoriés dans l'annexe x), filtrées et analysées statistiquement sous Metaboanalyst 5.0 (cf. partie II.2.3).

3.3. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion totale atténuée (IR-TF en mode ATR)

Le biofilm adhérent à la surface des plaques immergées a été gratté à l'aide d'une lame de scalpel en inox. La matière biologique récupérée a été immédiatement placée dans un vial de 8 mL contenant au préalable 4 mL de méthanol puis le vial est agité. Les échantillons ainsi traités ont été conservés au froid (4°C) jusqu'au retour au laboratoire. Le solvant a ensuite été évaporé à 35°C sous flux d'azote et la matière sèche résultante a été broyée en poudre fine et homogène à l'aide d'une spatule, puis stockée sous argon au froid (4°C) et à l'abri de la lumière. Les spectres IR ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre IR-TF (Thermo Scientific Nicolet, iS 50 ; Madison, WI, USA) en utilisant le mode Réflectance Totale Atténuée (*Attenuated total reflectance* ; ATR) avec un cristal en diamant. Les échantillons secs ont été déposés de manière uniforme à la surface en contact avec le diamant. Toutes les mesures ont été effectuées entre 400 et 4000 cm^{-1} avec une accumulation de 32 scans et une résolution de 4 cm^{-1} en mode absorbance. Toutes les mesures ont été effectuées en triplicats pour chaque échantillon. Les spectres obtenus ont été traités avec le logiciel OMNIC Spectra (vers. 9). Le bruit de fond a été mesuré avant chaque échantillon et soustrait du spectre de l'échantillon, puis la ligne de base a été corrigée grâce à la fonction « *Traitement, Correction ligne de base auto* ». Les données ont été converties au format « .csv », mises en forme (ligne : nombres d'onde ; colonne : échantillons) et enfin enregistrées au format « .txt ». La matrice ainsi générée a ensuite été traitée par le logiciel ChemFlow (Vers. 20.05) sous Galaxy (Afgan et al. 2018). Un prétraitement de Savitzky-Golay (*Derivative order* : 1 ; *Size of the window* : 7 ; *Degree of the polynom* : 2) a été réalisé et a été suivi d'une normalisation de type SNV (*Standard Normal Variate*). L'analyse en composante principale a ensuite été directement réalisée via ChemFlow.

3.4. Observations par microscopies

Les plaques recouvertes de biofilm ont été placées dans un bac contenant de l'eau de mer jusqu'à fixation de l'échantillon. Pour les deux techniques microscopiques utilisées (confocale et MEB), cette étape de fixation a été réalisée afin d'éviter toute détérioration de l'échantillon en vue des analyses ultérieures. Pour cela, les surfaces à analyser ont été rincées délicatement avec de l'ASW (35⁰/₀₀ de salinité) puis fixées par un traitement de 10 minutes avec du formaldéhyde dilué (3,8%) dans de l'ASW. Les échantillons ont ensuite été rincés deux fois avec un tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*, 8⁰/₀₀ de salinité) puis conservés dans ce même tampon à 4°C.

Les échantillons de biofilms formés *in situ* ont été directement observés par microscopie électronique à balayage (MEB) (JSM-6510 Series Scanning Electron Microscope ; Musashino, Akishima, Tokyo) après fixation. Concernant la microscopie confocale à balayage laser (MCBL), une étape de marquage à l'obscurité est indispensable avant toute observation. Pour cette analyse, un multimarquage comprenant quatre fluorophores a été réalisé : 1) Concanavaline A (50 mg/L, 30 minutes d'incubation), 2) CalcoFluor White (250 mg/L, 30 min d'incubation), 3) FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (1 g/L, 1h d'incubation), 4) SYTO61 (1 μ M, 30 min d'incubation). A l'issue de chaque marquage, 2 lavages au PBS ont été réalisés. Des informations relatives à ces fluorophores (molécules ciblées, longueurs d'onde d'excitation et d'émission) ont été répertoriées (Tableau VI.1.). Une fois l'échantillon traité, une lecture au microscope confocal (CLSM ; Zeiss LSM 710, Göttingen, Allemagne) a été effectuée par balayage laser. Cinq images par réplikat ont été obtenues et traitées grâce au logiciel ZEN 2 v3.0 (Blue edition ; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Allemagne).

Fluorophores	ConcanavalinA	CalcoFluor White	FITC	SYTO61
Cibles	D-mannose/D-glucose	Cellulose/Chitine	Protéines	ADN/ARN (Organismes)
λ Excitation (nm)	λ_{ex} 543 nm	λ_{ex} 400 nm	λ_{ex} 493 nm	λ_{ex} 620 nm
λ Emission (nm)	λ_{em} 573-600 nm	λ_{em} 430-480 nm	λ_{em} 523 nm	λ_{em} 651 nm

Tableau VI.1. : Informations relatives aux fluorophores utilisés pour l'analyse des biofilms par MCBL (d'après (Chen et al. 2007)).

C. Résultats & Discussion

1. Préambule : Paramètres environnementaux du site d'immersion et observations macroscopiques des biofilms formés *in situ*

1.1. Mesures des paramètres environnementaux au niveau du site d'immersion

La formation des biofilms étant étudiée à différents moments de l'année, les caractéristiques physico-chimiques de l'eau, et donc de l'environnement dans lequel vont se former ces biofilms, vont fluctuer (Figure VI.3).

Lors de ces expérimentations, le pH a varié avec une valeur moyenne minimale de 7,68 en hiver et une valeur maximale de 8,14 en été. On peut remarquer que le pH de l'eau de mer est légèrement plus basique, de manière significative, en été et en automne qu'en hiver et au printemps, ceci pouvant être dû aux précipitations (Singh et al. 2007). La salinité en mer Méditerranée est légèrement plus élevée que dans les océans, elle est comprise entre 38 et 41 g/L contre environ 35 g/L dans les océans Atlantique et Pacifique (Silva 2014). Nos mesures ont montré une salinité comprise entre 38 et 39 g/L et sont donc en accord avec ces données. Aucune différence significative de salinité n'a été observée entre les saisons.

La température a fluctué avec une valeur moyenne de 21,6°C en été contre 11,4°C en hiver. Les températures observées sont significativement supérieures en été par comparaison avec les autres saisons. Concernant les mesures d'oxygène dissous, les valeurs moyennes observées ont varié de 86% à 96% de saturation. Ces valeurs de saturation sont statistiquement moins élevées en automne par comparaison avec l'été et le printemps.

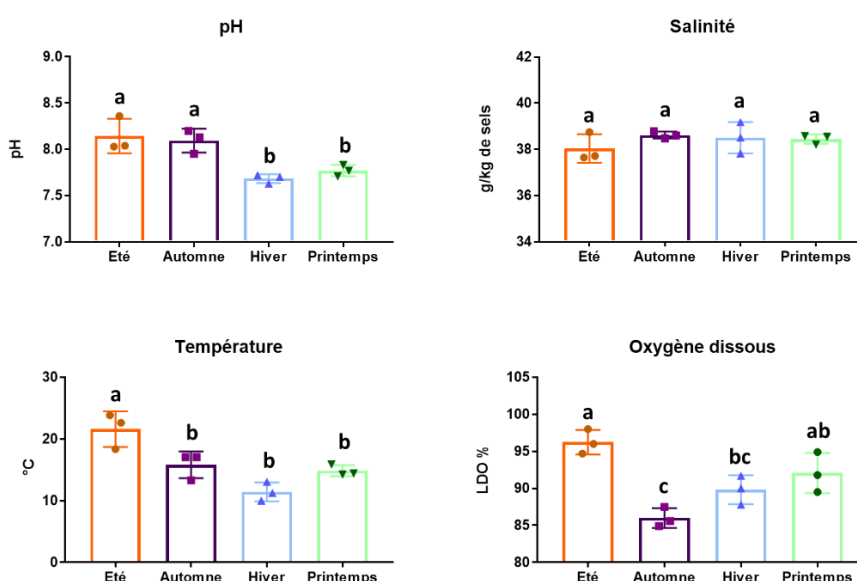


Figure VI.3. : Mesures physico-chimiques de l'eau de mer au niveau du site d'immersion (Rade de Toulon). Les indices « a », « b », « c » correspondent aux résultats des analyses des tests post hoc (test de HSD Tukey).

1.2. Observation macroscopique de la colonisation des plaques immergées

Après un mois d'immersion, les plaques ont été immédiatement placées sur du papier filtre et photographiées (Figure VI.4.). Les deux facteurs étudiés pour leur influence sur la colonisation de la surface abiotique ont été la saisonnalité, corrélée aux variables environnementales, et l'hydrodynamisme.

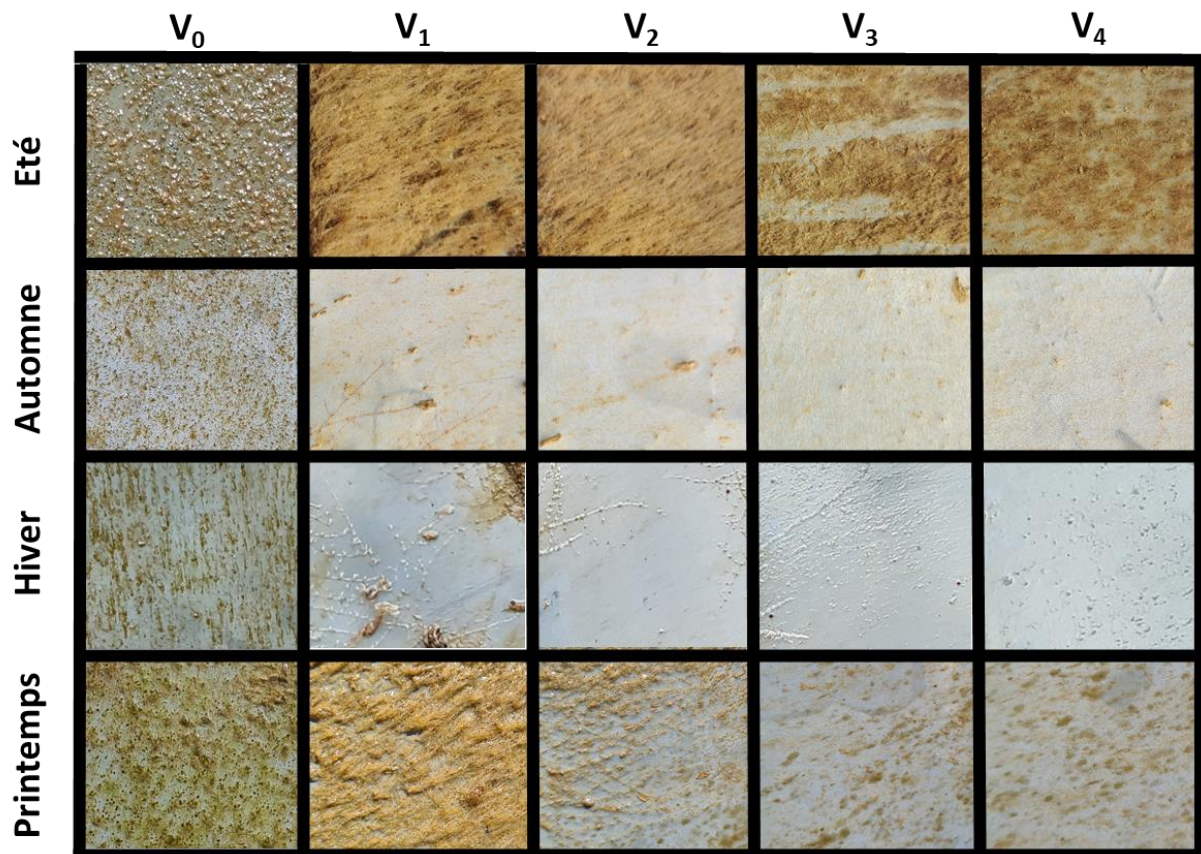


Figure VI.4. : Photographies de la colonisation biologique des plaques immergées en fonction de l'hydrodynamisme (V_0 : statique ; V_1 : 1 nœud ; V_2 : 2 nœuds ; V_3 : 3 nœuds ; V_4 : 4 nœuds) et de la saison d'immersion.

La saisonnalité a un effet visible sur le *biofouling* et ainsi une colonisation biologique plus importante est visible en été et au printemps par rapport à l'automne et l'hiver. Pour ces deux dernières saisons, une colonisation bien moins importante a été observée avec notamment très peu de *macrofouling*. Ceci peut être expliqué par la variation des communautés microbiennes dans la colonne d'eau entre les quatre saisons (Oberbeckmann et al. 2014; Sikder et al. 2020) lien avec la variation des paramètres environnementaux. Parmi ces ceux-ci, la température semble jouer un rôle prépondérant. Il a été démontré qu'une augmentation de la température (de 5 à 7°C) entraîne une forte augmentation de l'épaisseur et de la biomasse des biofilms (Chiu

et al. 2005; Rao 2010). La plus forte colonisation en été et au printemps peut également être due au fait que la reproduction de beaucoup d'organismes (larves d'invertébrés, algues) s'effectue durant ces deux saisons (Mathieson et al. 1976; Pearse et al. 1991).

L'hydrodynamisme a également un effet direct sur la colonisation observée à l'œil nu. En effet, un gradient de colonisation pour toutes les saisons est observé : plus l'hydrodynamisme est important (de V_1 à V_4) moins la surface immergée est colonisée. Des études précédentes délivrent le même constat, à savoir qu'un stress hydrodynamique perturbe la formation de biofilm. Ce stress affecte la composition des communautés procaryotes mais il limite également la densité cellulaire et, par conséquent, retarde la maturation du biofilm (Catão et al. 2019). De telles observations sont réalisées grâce à des outils de visualisation tels que la tomographie en cohérence optique (TCO) (Romeu et al. 2019) ou encore par l'emploi de techniques de microscopies (MCBL, MEB) (Chang et al. 2020).

Afin d'étudier l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation de biofilms marins, une caractérisation globale s'appuyant sur le déploiement de nombreuses techniques analytiques a été mise en place dans le cadre de cette étude. L'utilisation conjointe de techniques de microscopies, de dosages biochimiques colorimétriques, de techniques spectroscopiques et de la métabolomique vont pouvoir apporter une information à des niveaux moléculaires variés permettant de mieux appréhender l'effet global de l'hydrodynamisme sur la formation des biofilms. C'est durant les périodes printanières et estivales que la biomasse du biofilm est la plus importante, or certaines des analyses visées, notamment les dosages colorimétriques, nécessitent une biomasse suffisante. De plus, le gradient de colonisation est le plus marqué pour la période printanière. Ainsi, pour la suite de cette étude seuls les résultats des échantillons de biofilms formés au printemps seront détaillés.

2. Impact de l'hydrodynamisme sur la formation des biofilms marins au printemps

2.1. Techniques de microscopie

Après 30 jours d'immersion en milieu marin, l'observation des plaques immergées a révélé une colonisation observable à l'œil nu différente en fonction du gradient de vitesse appliquée. Deux techniques de microscopies (MCBL et MEB) permettent d'avoir une vision des biofilms formés, non pas à l'échelle de la molécule, mais des organismes.

Le microscope électronique à balayage à basse pression permet de visualiser des objets en relief, notamment des éléments hydratés, tels que les biofilms. Une capture d'image ($\times 100$) par vitesse

est présentée dans la figure x ci-dessous. Dans un premier temps, les observations au MEB ont montré que les plaques immergées ont été recouvertes par des micro et macro-organismes très diversifiés, et ce quelles que soient les conditions hydrodynamiques d'immersion. Le deuxième constat concerne la différence de colonisation entre les échantillons obtenus en mode statique ou soumis à un faible stress hydrodynamique (V_0 - V_2) (Figure VI.5.A., Figure VI.5.B., Figure VI.5.C.) et ceux exposés à une vitesse élevée (V_3 - V_4) (Figure VI.5.D., Figure VI.5.E.). Il apparaît que les échantillons V_0 , V_1 et V_2 sont plus colonisés, notamment par les macro-organismes présents et visualisables, que V_3 et V_4 . Néanmoins aucune analyse quantitative n'a été réalisée afin de vérifier ce constat. De plus, les images capturées ne représentent qu'une infime partie des surfaces immergées sur lesquelles les biofilms se sont développés. Une analyse avec un grossissement plus important est difficilement réalisable pour les échantillons V_0 - V_2 du fait de la colonisation par les macro-organismes. En revanche, une capture d'image huit fois plus zoomée que les précédentes, obtenue à partir de biofilms formés dans les conditions V_4 , a permis de visualiser la matrice d'exopolymères (flèche bleue) ainsi que la présence de nombreuses bactéries (flèche verte) et de diatomées (flèche rouge) (Figure VI.5.F.). La matrice d'exopolymères, composée de particules agrégées de forme irrégulières (Figure VI.5.F.), est comparable visuellement à celle de biofilms formés *in vitro* par des souches bactériennes isolées du milieu marin, *Pseudoalteromonas shioyasakiensis*, *Vibrio harveyi*, *Bacillus pumilus* ou encore *Planomicrobium* sp. (Dusane et al. 2010; Siddik and Satheesh 2019), ou de biofilms formés *in situ* (Xu et al. 2010).

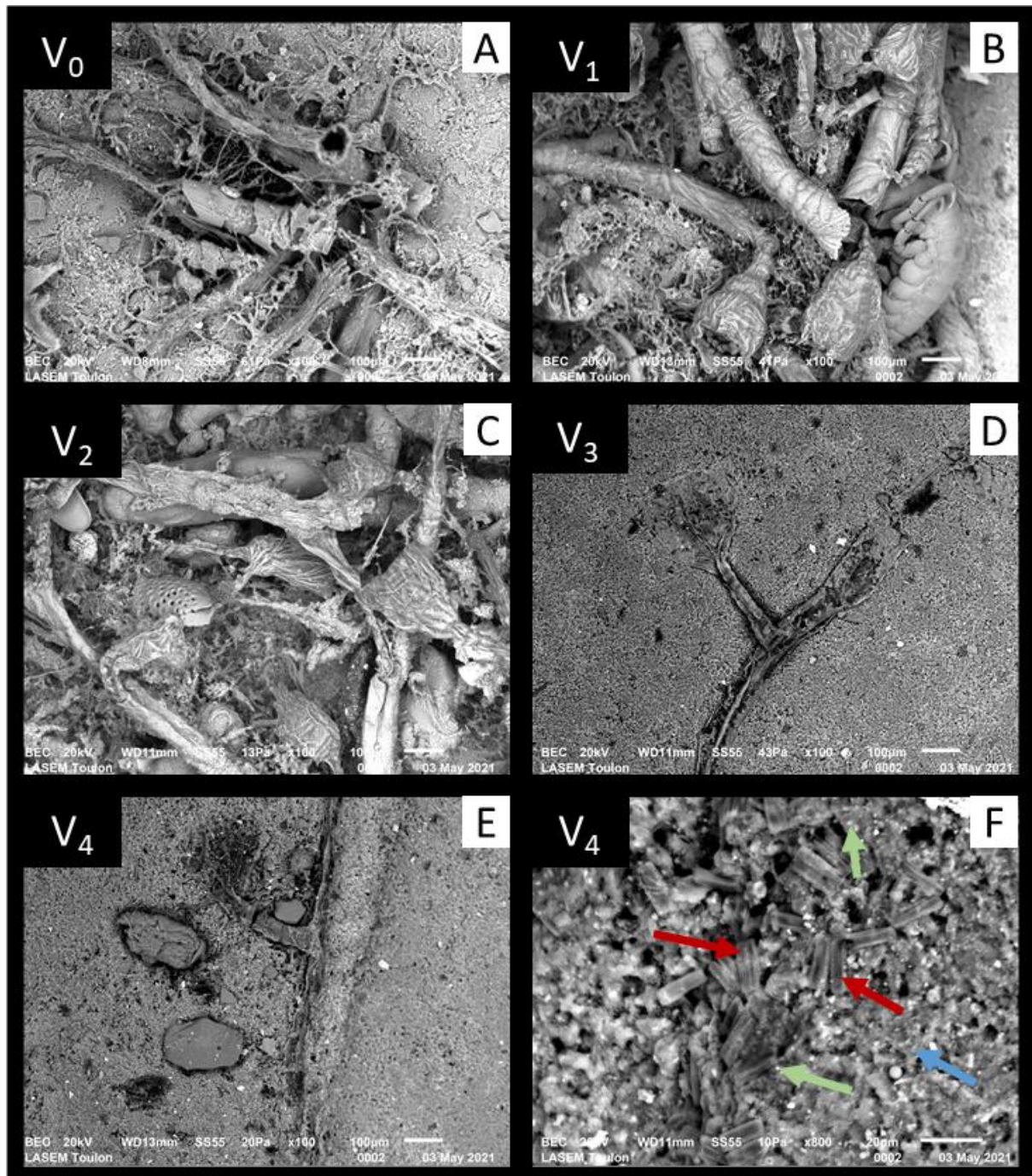


Figure VI.5. : Observations MEB de biofilms soumis à des conditions hydrodynamiques variées, formés à la surface d'une plaque immergée durant 30 jours (mer Méditerranée). A-E : grossissement $\times 100$, F : grossissement $\times 800$. Les flèches rouges indiquent des diatomées, les vertes indiquent des bactéries et la flèche bleue indique la matrice d'EPS.

La microscopie confocale à balayage laser (MCBL) permet une analyse tridimensionnelle des microorganismes, des EPS et de leur organisation. Elle a permis dans le cadre de cette étude de visualiser les structures multicellulaires natives à l'aide de marqueurs fluorescents spécifiques (Figure VI). Les protéines sont ainsi visualisées en vert (FITC, λ_{em} 523 nm), les polysaccharides

en orange (Concanavaline A, λ_{em} 573-600 nm) et l'ADN, donc les organismes, en rouge (SYTO61, λ_{em} 651 nm). Concernant les biofilms formés en mode statique (V_0) ou soumis à un faible stress hydrodynamique (V_1 et V_2), l'analyse par MEB a rapporté une colonisation par des macro-organismes. Le constat est le même avec la MCLB, l'image d'un échantillon soumis à la vitesse V_1 de figure VI.6.A. montre des grosses structures de macro-organismes. En revanche, les biofilms soumis à un fort stress hydrodynamique (V_3 et V_4) ont présenté moins de macro-colonisation en MEB rendant les images prises par la MCLB intéressantes pour la visualisation et l'organisation tridimensionnelle du biofilm, et notamment de la matrice des EPS. La figure VI.6.B., visualisant un échantillon de biofilm à V_3 , permet de visualiser l'organisation du biofilm. Des diatomées, également visualisées par MEB, forment des ovales composés de protéines (marquage vert) et d'ADN (marquage rouge). Ces microorganismes sont enchâssés dans une matrice majoritairement composée de polysaccharides (orange).

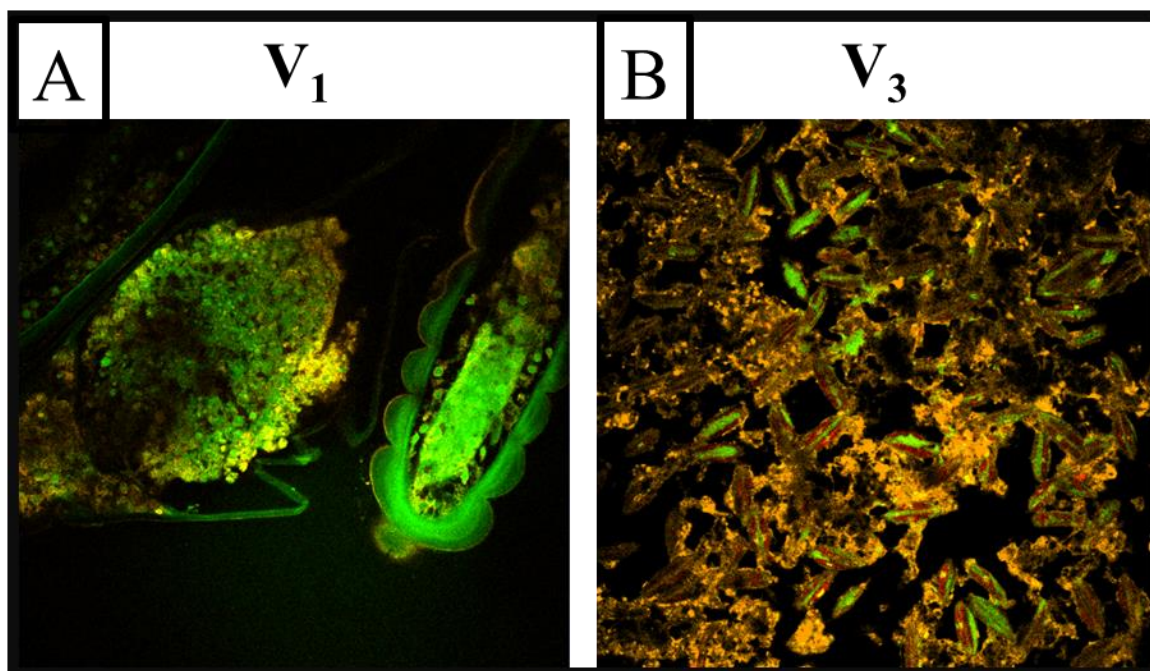


Figure VI.6. : Observation par MCLB des biofilms soumis à des conditions hydrodynamiques variées, formés à la surface d'une plaque immergée durant 30 jours (mer Méditerranée). **A :** Vitesse 1 ; **B :** Vitesse 3. En vert les protéines (FITC, λ 523), en orange les polysaccharides (Concanavaline A, λ 573-600) et en rouge l'ADN (SYTO61, λ 651).

2.2. Analyse biochimique des biofilms par dosages colorimétriques

La matrice qui permet d'assurer la protection, la cohésion et la stabilité du biofilm est composée d'une grande variété d'EPS (polysaccharides, protéines, lipides et acides nucléiques) (Flemming et al. 2016; Wingender et al. 1999). Des méthodes d'extraction appliquées à des

études de terrain (Pierre et al. 2010, 2012) ont montré la possibilité de séparer cette matrice en trois grandes fractions (figure VI.7.). Le choix d'une séparation de l'ensemble des constituants du biofilm (matriciels et cellulaires) a été réalisé sur la base de ces travaux mais en l'adaptant à nos nombreux échantillons (Chapitre II, Figure II.9.). Ce sont ainsi trois fractions par échantillon de biofilm qui ont été obtenues et analysées. La fraction colloïdale (FC) correspond aux EPS sécrétés faiblement liés, pouvant être utilisés comme source de nutriments par différents micro-organismes du biofilm (ex. : exsudats riches en glucose consommés par les bactéries hétérotrophes (Hofmann et al. 2009)). La fraction liée (FL) contient les EPS sécrétés mais demeurant liés sous forme de mucus entourant les cellules. Ces EPS sont souvent associés à l'adhésion et/ou à une fonction an tant que barrière de protection) (Flemming and Wingender 2010; More et al. 2014; Pierre et al. 2014). Cette fraction peut contenir des polymères intracellulaires du fait de la lyse potentielle de certaines cellules sous l'effet du protocole d'extraction (ultra-sons). La fraction résiduelle (FR) contient les cellules intactes ainsi que les débris cellulaires. A noter que les EPS microbiens peuvent être séparés en deux types principaux : faible poids moléculaire (LMW : *low molecular weight*) et haut poids moléculaire (HMW : *high molecular weight*) (Pierre et al. 2010, 2012). Dans notre étude, seuls les constituants de hauts poids moléculaires, précipités à l'éthanol et récupérés dans le culot de centrifugation, feront l'objet d'une analyse.

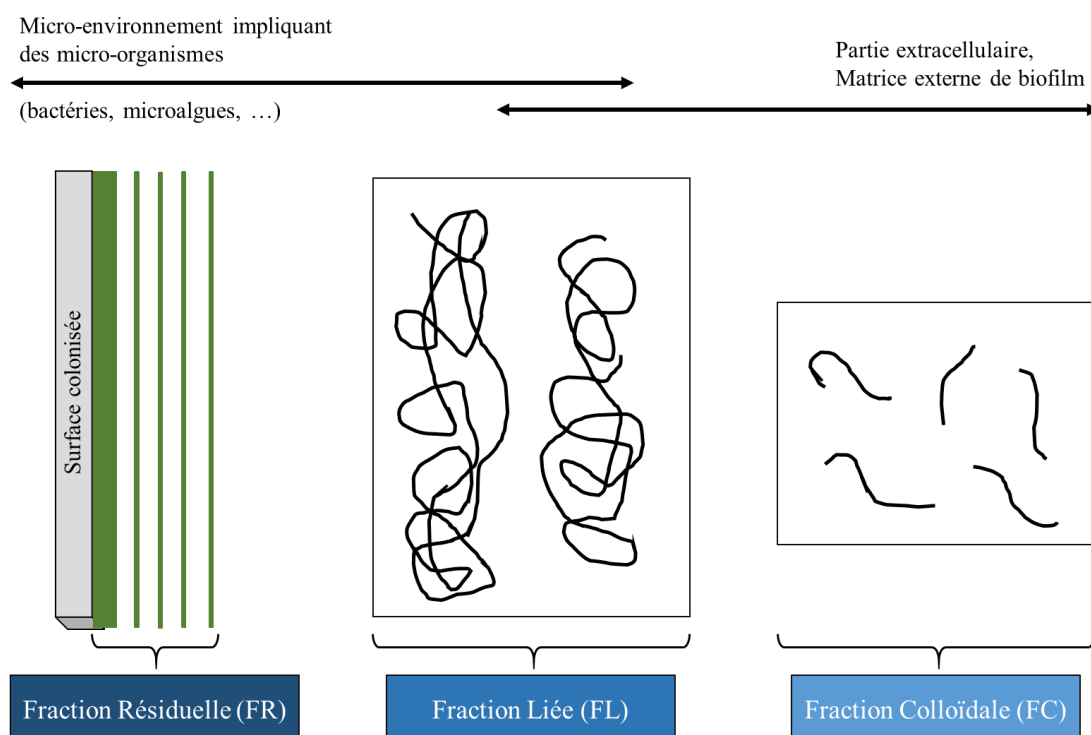


Figure VI.7. : Hypothèse de localisation des différentes fractions d'EPS collectées (inspiré de Pierre et al. 2014).

Les trois différentes fractions ont été obtenues avec le protocole d'extraction mis en place (Chapitre II, Figure II.9.). Après lyophilisation, les échantillons secs ont été pesés. Connaissant la surface de PVC colonisée, la masse de biofilm formé sur 1 cm² de surfaces (PVC) soumises à différentes vitesses peut être calculée (valeurs moyennes) : $V_0 = 13 \pm 1$ mg/cm² ; $V_1 = 36 \pm 4$ mg/cm² ; $V_2 = 12 \pm 4$ mg/cm² ; $V_3 = 4 \pm 1$ mg/cm² et $V_4 = 5 \pm 1$ mg/cm². La masse sèche des échantillons collectés varie en fonction du stress hydrodynamique appliqué, mais de façon non proportionnelle. En effet, la masse des échantillons soumis à la plus faible vitesse (V_1) est significativement supérieure à celle des autres échantillons, y compris ceux de biofilms statiques. Le passage d'une vitesse de 1 nœud (V_1) à 2 nœuds (V_2) réduit la masse du biofilm d'un facteur 3 et le passage d'une vitesse de 1 nœud à 3 ou 4 nœuds (V_3 et V_4) induit la formation d'un biofilm 6 à 9 fois moins conséquent en termes de masse sèche. Les plus faibles masses ont été répertoriées pour les échantillons soumis aux fortes vitesses (V_3 et V_4). Ces résultats sont en concordance avec les photographies des plaques observées (Figure VI.4.) où l'échantillon V_1 semble le plus colonisé. La séparation des 3 différentes fractions biochimiques a permis de connaître leur part dans la composition des échantillons ; les résultats obtenus sont regroupés et présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau VI.2.). La fraction résiduelle (FR) représente la majeure part des échantillons obtenus en mode statique ou soumis à faible stress hydrodynamique (V_0 , V_1 et V_2 avec plus de 74% de la masse totale de l'échantillon pour FR) alors que celle-ci ne représente respectivement que 40% et 50% de la masse totale des échantillons obtenus aux vitesses V_3 et V_4 . Une augmentation de la part de FL et de FC a donc été observée dans les échantillons soumis aux fortes vitesses.

Vitesse	%FR	%FL	%FC
V_0	74,5	6,9	18,7
V_1	88,1	4,6	7,3
V_2	75,1	10,4	14,6
V_3	40,1	25,8	34,1
V_4	50,2	22,8	27,0

Tableau VI.2. : Composition biochimique des échantillons de biofilms exprimée en pourcentages de FC (Fraction colloïdale), de FL (Fraction liée) et de FR (Fraction résiduelle) en fonction des différentes conditions hydrodynamiques (V_0 : Statique ; V_1 : 1 nœud ; V_2 : 2 nœuds ; V_3 : 3 nœuds ; V_4 : 4 nœuds)

Une tendance à la décroissance des différentes concentrations (mg/g_{échantillon}) en protéines (P), glucides (G) et acides uroniques (AU) est observée en fonction des conditions hydrodynamiques de plus en plus drastiques, c'est-à-dire de la vitesse V_1 à la vitesse V_4 . Seuls les glucides et les AU présents dans la FR montrent une tendance inverse. En prenant en compte maintenant les conditions statiques (V_0), les teneurs en glucides et en AU à V_0 sont supérieures à celles mesurées à V_1 sauf pour les glucides dans la FL. Néanmoins, cette tendance s'inverse pour les teneurs en protéines, celles-ci étant supérieures dans V_1 par rapport à V_0 (à l'exception des résidus où elle est semblable) (Figure VI.8.).

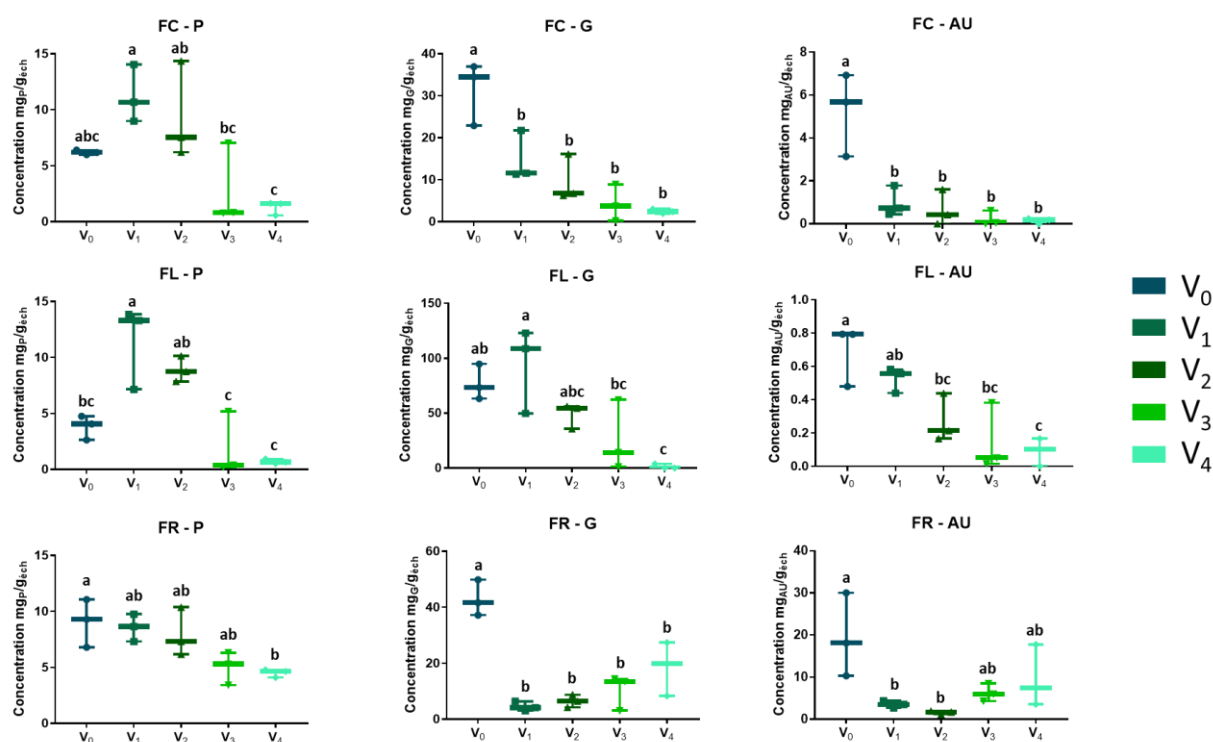


Figure VI.8. : Boxplots des teneurs en biomolécules dans les biofilms formés *in situ* [dosées par type (P : Protéines ; G : Glucides ; AU : Acides uroniques) et par fraction (FC : Fraction colloïdale ; FL : Fraction liée ; FR : Fraction résiduelle) selon les conditions hydrodynamiques. Les indices « a », « b », « c » correspondent aux résultats des analyses des tests post hoc (test de HSD Tukey).

Le *biplot* de l'ACP permet une visualisation de la disparité des différents groupes d'échantillons (V_0 - V_4), en fonction des EPS dosés (FL et FC), sur un plan en 2 dimensions (Figure VI.9.). En premier lieu, l'axe horizontal, représentant 68,7% de la variance totale, sépare les échantillons obtenus en mode dynamique entre eux. En effet, deux groupes se discriminent selon cet axe : les échantillons de biofilms formés à de faibles vitesses (V_1 - V_2) et ceux qui ont subi des vitesses plus importantes (V_3 - V_4). Ensuite, les échantillons obtenus à partir de biofilms formés sans contraintes hydrodynamiques (V_0) sont séparés des autres échantillons (V_1 à V_4) en fonction de

l'axe vertical (représentant 26,4% de la variance totale) de l'ACP. L'avantage de cette représentation réside dans le fait de bien visualiser quelles variables sont impliquées dans la discrimination des échantillons dans le plan. Globalement les échantillons de biofilms obtenus aux vitesses maximales (V_3 et V_4) sont caractérisés par des faibles teneurs pour l'ensemble des familles biochimiques analysées. Pour les autres échantillons, les teneurs en AU sont plus importantes dans les conditions V_0 , le même constat est effectué concernant les glucides pour la FC. Concernant les teneurs en protéines, celles-ci sont globalement maximales aux conditions V_1 et V_2 , que ce soit pour FC ou FL.

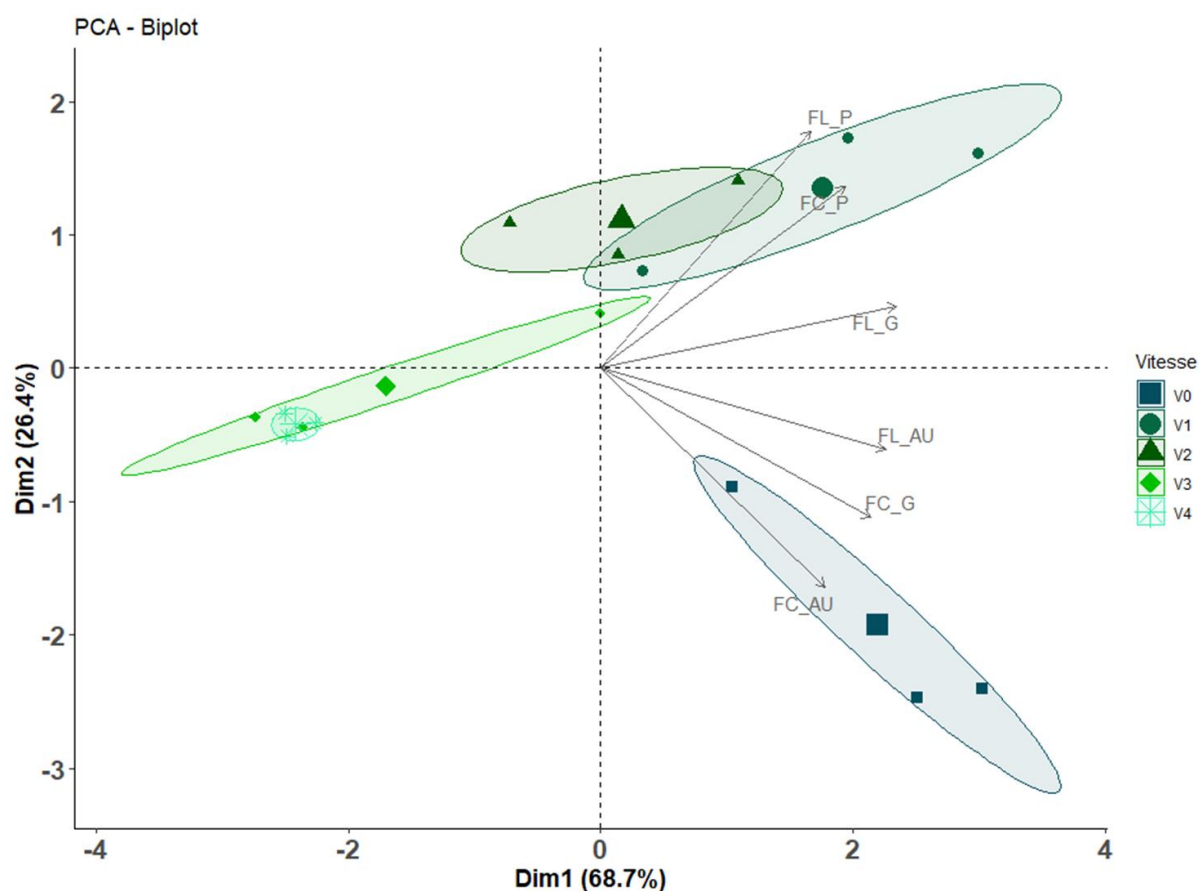


Figure VI.9. : ACP *biplot* selon les vitesses sur la FC (Fraction colloïdale) et la FL (Fraction liée).

Les proportions des constituants des EPS mesurés (protéines, glucides, acides uroniques) diminuent de V_0 à V_4 (Figure VI.10.). Les glucides totaux (incluant les AU) sont en proportion dominante par rapport aux protéines pour chaque condition (rapports G/P > 1). Parmi ces glucides, les acides uroniques représentent jusqu'à 45% pour la plus forte contrainte hydrodynamique (V_4) et des valeurs minimales de seulement 4% pour les échantillons soumis aux faibles vitesses (V_1 et V_2). Cette part d'AU dans les sucres a tendance à augmenter avec les vitesses les plus hautes. Leur charge négative au pH de l'eau de mer permet des interactions

ioniques, par l'intermédiaire de cations divalents, et peut donc favoriser la cohésion des polysaccharides les contenant au sein du biofilm (Flemming and Wingender 2010). Une augmentation de leur proportion dans les exopolysaccharides produits pourrait être liée aux contraintes hydrodynamiques imposées (Flemming 2011). Concernant les protéines, le ratio G/P s'étend de 2,4 à 8. Celui-ci est nettement plus important ($G/P = 7,94$) pour les échantillons de biofilms formés en statique (V_0) qu'en mode dynamique où il est compris entre 2,48 et 4,16. De plus, les échantillons soumis à un fort stress hydrodynamique (V_3 et V_4) possèdent un rapport G/P plus important que ceux soumis à de faibles vitesses (V_1 et V_2). Dans la bibliographie, la fonction de cohésion des biofilms est attribuée aussi bien aux exopolysaccharides qu'aux protéines, plus globalement à l'ensemble des constituants de la matrice ; et la proportion G/P dans les EPS extraits de biofilms varie d'un biofilm à l'autre avec une part des glucides toujours non négligeable (au moins 40% de polysaccharides parmi les EPS du biofilm ; (More et al. 2014)).

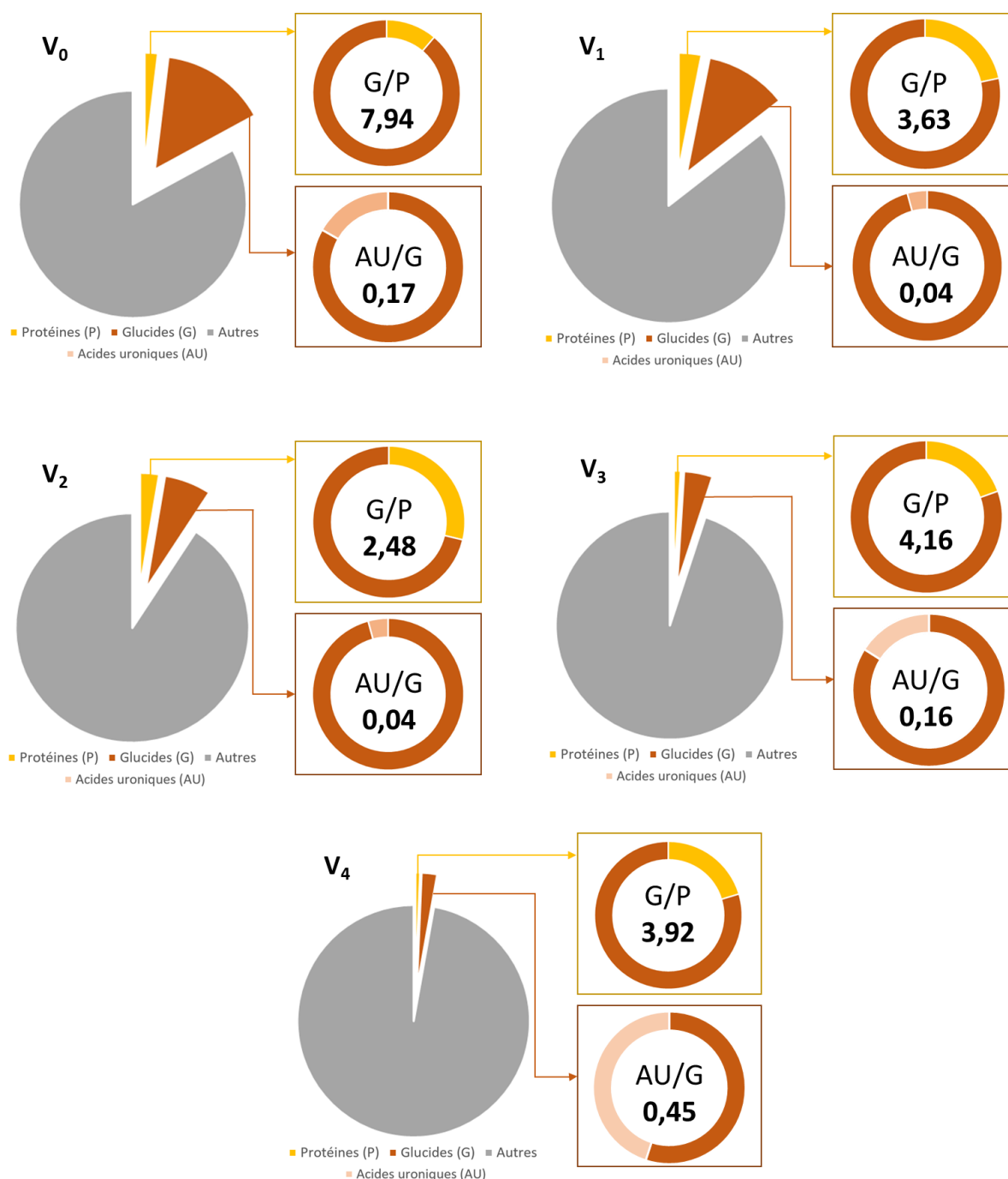


Figure VI.10. : Diagrammes circulaires représentant les proportions des différents EPS (AU/G : rapport acides uroniques sur glucides ; G/P : rapport glucides sur protéines) en fonction du stress hydrodynamique (V₀ : mode statique, V₁ : 1 nœud ; V₂ : 2 nœuds ; V₃ : 3 nœuds ; V₄ : 4 nœuds).

De façon générale, les contraintes hydrodynamiques aboutissent à une variation dans la quantité de biofilm formé, ainsi que d'EPS sécrétés. La composition qualitative des EPS est également impactée.

Parmi les EPS, les polysaccharides se trouvent très souvent prédominants (Flemming and Wingender 2001). Les différents dosages ont permis de mettre en avant la prépondérance des glucides dans les différentes fractions isolées, et ce pour l'ensemble des conditions

hydrodynamiques. Le ratio G/P reste largement supérieur à 1 quelle que soit la vitesse à laquelle sont soumis les biofilms ; ce ratio étant supérieur dans les échantillons obtenus en mode statique. Une étude similaire caractérisant les EPS a précédemment mis en évidence des ratios G/P supérieurs à 200 lors d'expériences statiques sur des biofilms complexes formés dans des systèmes de distribution d'eau potable et exposés à différentes contraintes de cisaillement (Fish et al. 2017). Les acides uroniques donnent des propriétés anioniques aux hétéropolysaccharides les contenant. Ils permettent l'association de cations divalents tels que le calcium ou le magnésium ; ces derniers venant renforcer la force de liaison (force d'attraction ionique) des EPS dans un biofilm mature (Vu et al. 2009). Pour les échantillons de biofilms prélevés sur le rotor, l'augmentation de la proportion d'acides uroniques est corrélée positivement à l'augmentation de la vitesse exercée. L'hypothèse d'un changement dans la composition des glucides, en réponse au stress hydrodynamique exercé, peut alors être envisagée. En privilégiant la production d'AU (notamment dans la FL), l'adhésion des cellules au substrat et la cohésion du biofilm est renforcée dans un environnement ionique tel que l'eau de mer. Enfin, plusieurs études affirment que l'hydrodynamisme favorise la production d'EPS (en particulier les polysaccharides) qui renforce l'adhésion des cellules au substrat (Decho 2000; Stoodley et al. 1999; Vu et al. 2009). En revanche, l'activité biologique du biofilm en serait diminuée et donc les biofilms formés plus fins (Celmer et al. 2008; Liu and Tay 2002; Wagner et al. 2009). Ceci est cohérent avec nos observations préalablement faites à l'œil nu ou au microscope (Figure VI.4., Figure VI.5. et Figure VI.6.). Des études récentes ont même pu montrer que la fraction liée dans la matrice d'EPS était capable de résister à de fortes contraintes de cisaillement (hydrodynamisme) (Derlon et al. 2008; Paul et al. 2012). Le constat inverse est fait pour les EPS colloïdaux se situant à la périphérie de la matrice et donc plus soumis à cette contrainte hydrodynamique.

2.3. Etude des biofilms par IRTF-ATR

L'analyse par IRTF en mode ATR des biofilms formés en fonction des différentes conditions hydrodynamiques a permis de révéler la présence de groupes fonctionnels caractéristiques en lien avec les résultats obtenus par les dosages biochimiques (Tableau I.V.). En effet, les bandes d'absorption entre 900 et 1200 cm^{-1} présentes sur les spectres de tous les biofilms sont caractéristiques de structures polysaccharidiques (vibrations d'élongation des liaisons C-O, $\nu_{\text{C-O}}$) (Figure VI.11.). De plus, dans cette plage caractéristique des polysaccharides, une bande

d'absorption à 1103 cm^{-1} (plage de 1000 à 1125 cm^{-1}) peut être attribuée à la présence d'AU. Une autre bande à environ 1400 cm^{-1} est caractéristique de la fonction COO^- et pourrait correspondre aux acides aminés. Des bandes d'intensité moyenne caractéristiques de la présence de protéines (vibrations d'élongation des liaisons C=O , $\nu_{\text{C=O}}$, et de déformation des liaisons N-H , $\delta_{\text{N-H}}$) sont observées entre 1500 et 1700 cm^{-1} et peuvent être associées à des fonctions amides primaires ($\nu_{\text{C=O}}$ couplé avec $\delta_{\text{N-H}}$: $1693\text{-}1627\text{ cm}^{-1}$) et secondaires ($\delta_{\text{N-H}}$ couplé avec $\nu_{\text{C-N}}$: $1568\text{-}1531\text{ cm}^{-1}$). D'autre part, plusieurs bandes d'absorption (vibrations d'élongation des liaisons C-H , ν_{CH_2} et ν_{CH_3}), caractéristiques de la présence de chaînes hydrocarbonées, sont observées entre 2800 et 3000 cm^{-1} pour chaque condition. La bande ν_{CH_2} est plus intense que la bande ν_{CH_3} dans tous les échantillons de biofilms, démontrant ainsi la présence de longues chaînes hydrocarbonées typiques d'acides gras et de leurs dérivés. Enfin, la large bande à 3400 cm^{-1} (plage $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$) correspond à des groupes hydroxyles (fonction -OH).

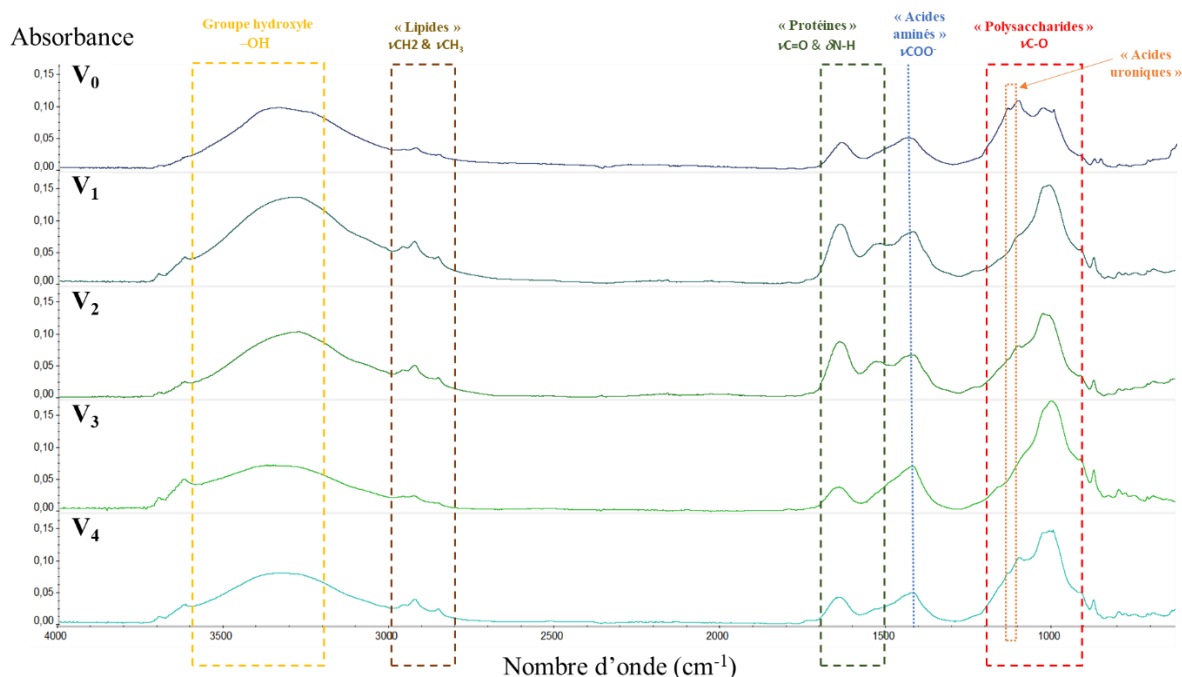


Figure VI.11. : Spectres IR-TF (mode ATR) des échantillons de biofilms formés *in situ*.

Les spectres IR des échantillons sont représentés sur la même échelle d'absorbance. La quantité et l'épaisseur de l'échantillon analysé n'étant pas contrôlée, la comparaison d'une bande d'absorption caractéristique entre les spectres IR de différents échantillons n'est pas pertinente. En revanche, la comparaison de rapports d'aires d'absorbance entre échantillons va apporter une plus-value dans la caractérisation des biofilms et permettre une comparaison avec les informations obtenues par les dosages colorimétriques (Tableau VI.3.). Les biomolécules étant

caractérisées par des plages de nombres d'onde (voir tableau chapitre 2), l'aire de cette plage sera prise en compte. Ces observations permettent de déterminer un ratio G/P plus faible pour les échantillons V_1 et V_2 (pour lesquels la bande caractéristique des amides primaires est plus importante) en comparaison avec les autres échantillons. Ce résultat est cohérent avec celui des dosages colorimétriques pour lesquels les échantillons V_0 , V_3 et V_4 présentaient un ratio G/P plus élevé également. Concernant le rapport AU/G, celui-ci est plus élevé pour les échantillons obtenus en mode statique (V_0). Parmi les échantillons soumis à un stress hydrodynamique, les échantillons V_4 présentent le ratio G/P le plus élevé, ce qui est également en accord avec les résultats des dosages colorimétriques. Les lipides (L) n'ont pas été étudiés par dosages colorimétriques, néanmoins des bandes caractéristiques de ces composés ont été identifiées sur les spectres infrarouges. Le rapport L/P est plus faible pour les biofilms formés en mode statique et est le plus important pour les échantillons V_3 et V_4 .

Vitesse	G/P	AU/G	L/P
V_0	7,596	0,026	0,195
V_1	3,469	0,009	0,238
V_2	3,565	0,013	0,205
V_3	8,600	0,009	0,421
V_4	8,466	0,015	0,392

Tableau VI.3. : Rapports d'aire des bandes d'absorbance observées par IR de certaines biomolécules (P : Protéines ; G : Glucides ; AU : Acides uroniques ; L : Lipides) entre échantillons de biofilms (V : Vitesse)

La transformation des spectres IR en matrice puis l'analyse de cette matrice via Chemflow permet de discriminer les cinq groupes de biofilms en fonction de leur signature infrarouge sur un espace bidimensionnel. Les prétraitements effectués ont permis de réduire le bruit et de corriger les lignes de base (Savitsky-Golay) ainsi que de réduire l'effet multiplicatif grâce à la normalisation de type SNV (*Standard Normal Variate*). Ces traitements ont permis de rendre les spectres IR comparables par une analyse en composantes principales (ACP) (Figure VI.12.). La représentation *score plot* résultante discrimine les échantillons soumis au facteur hydrodynamique, deux groupes sont séparés sur l'axe vertical représenté par la composante 1 (48% des variables) à savoir V_1 - V_2 (soumis à un faible stress hydrodynamique) et V_3 - V_4 (soumis à un fort stress hydrodynamique). La composante 2 représentant 21% de la variance

totale discrimine V_0 des autres échantillons. Cette ACP est en cohérence avec les résultats observés avec le dosage des EPS avec 3 groupes séparés : 1) statique (V_0) *versus* dynamique (V_1 - V_2 - V_3 - V_4) ;2) séparation du groupe « dynamique » en deux sous-groupes avec V_1 - V_2 *versus* V_3 - V_4 .

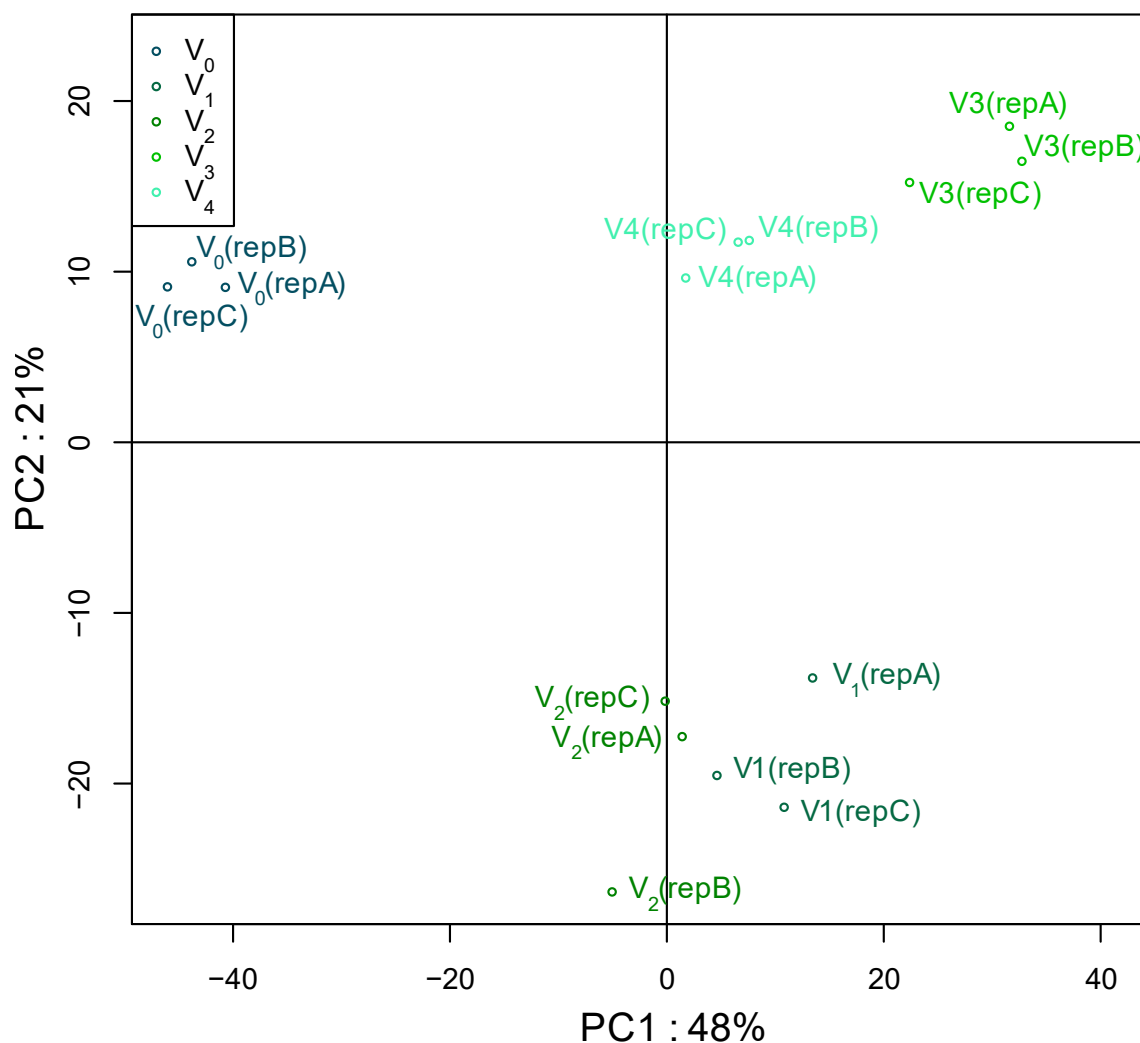


Figure VI.12. : Score plot de l'ACP obtenue à partir des données IR-TF des échantillons de biofilms formés *in situ* soumis aux différentes conditions hydrodynamiques (V : Vitesse ; V_0 : statique ; V_1 : 1 nœud ; V_2 : 2 nœuds ; V_3 : 3 nœuds ; V_4 : 4 nœuds ; rep : répliquat ; PC : composante principale).

La spectroscopie IR-TF constitue une technique de choix dans cette étude car sa mise en œuvre est très simple et permet d'étudier l'échantillon dans son ensemble. Grâce à cette méthode, il a été possible d'observer chaque échantillon dans sa globalité biochimique (protéines, glucides, acides uroniques, lipides, acides aminés) et de comparer aisément les cinq conditions hydrodynamiques testées.

2.4. Etude des biofilms par métabolomique non-ciblée (UHPLC-HRMS)

L'approche métabolomique LC-(+)-ESI-MS non ciblée, conçue pour étudier l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation de biofilms marins *in situ*, a conduit à une première matrice composée de 6409 variables (ions définis par leur rapport m/z) grâce au logiciel MZmine 2 (cf chap. 2 et annexe 1 de ce chapitre). Deux étapes de filtrations ont été appliquées (élimination des signaux observés dans les « blancs » et élimination des signaux instables) afin de faciliter la détection et la sélection des ions les plus pertinents. À la fin de ce traitement, 2712 variables ont été conservées dans la matrice de données finale. Le grand nombre de variables observées est lié à la grande diversité des microorganismes présents dans un biofilm complexe qui engendre un nombre de métabolites plus important qu'un biofilm cultivé en laboratoire avec une seule souche bactérienne. En effet, dans les chapitres précédents, une matrice de 406 variables a été obtenue pour un biofilm formé par une souche bactérienne (*Chromobacterium violaceum*) cultivée en milieu riche (Chapitre 5, (Mion et al. 2021)) et une matrice de seulement 62 variables a été obtenue pour un biofilm formé par la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* cultivée en milieu pauvre (Chapitre 4).

Les cinq groupes d'échantillons (V_0 , V_1 , V_2 , V_3 et V_4) ont été tout d'abord étudiés par le biais d'une analyse en composantes principales (ACP) (Figure VI.13.A.). L'ACP résultante montre deux distinctions claires entre les groupes d'échantillons. Premièrement, il est visible sur la composante 1 (38,7 % de la variance totale) que les échantillons obtenus à V_1 et à V_2 étaient discriminés de tous les autres échantillons. Cette visualisation permet déjà de montrer que les conditions hydrodynamiques ont un impact sur le métabolome de biofilms formés *in situ*. Dans un second temps, les échantillons obtenus en mode statique sont discriminés de ceux formés avec un stress hydrodynamique (V_0 vs V_1 - V_4) selon la deuxième composante (21,0% de la variance totale). En comparaison avec les ACP correspondant aux analyses par dosages colorimétrique (Figure VI.9.) et par IRTF-ATR (Figure VI.12.), la représentativité des deux axes est différente des deux autres techniques. Ici l'axe 2 représente plus de la moitié de l'axe 1 alors que pour les autres techniques l'axe 1 représente une variance plus de 2 fois supérieure. Même si ces représentations séparent les mêmes différents groupes V_0 , V_1 - V_2 et V_3 - V_4 , des différences sont à noter. L'axe 1 sépare les échantillons obtenus à V_1 et à V_2 des autres. Pour les analyses par dosages colorimétrique l'axe 1 sépare les échantillons obtenus à V_3 et à V_4 des autres et pour l'analyse par IRTF-ATR l'axe 1 sépare les échantillons statiques V_0 des autres.

Cette analyse en composante principale reste néanmoins en accord avec les celles réalisées avec les données des dosages colorimétriques et de l'analyse IRTF. Ces trois représentations,

caractérisant chacune les biofilms à différentes échelles, discriminent toutes trois groupes à savoir : 1) les biofilms formés en mode statique (V_0), 2) les biofilms soumis à un faible stress hydrodynamique (V_1 et V_2) et 3) les biofilms soumis à un fort stress hydrodynamique (V_3 et V_4).

Afin de trouver des chimiomarqueurs liés à la l'hydrodynamise, un modèle PLS-DA à cinq classes a été construit (une classe pour chaque condition hydrodynamique). Le graphique de score PLS-DA (Figure VI.13.B.) correspondant a montré une tendance similaire à celle observée pour l'ACP. Les échantillons obtenus en mode statique et les échantillons soumis à un stress hydrodynamique sont toujours discriminés par la composante 2 représentant 32,5% de la variance totale cette fois ci. Les échantillons soumis à un faible et un fort stress hydrodynamique (V_1 - V_2 vs V_3 - V_4) sont séparés par la composante 1 représentant 26,7% de la variance totale.

La qualité globale du modèle est prédite comme bonne grâce aux tests de validations croisées (*10-fold cross validation*) donnant des valeurs R^2 , Q^2 et Q^2/R^2 supérieures à 0,5 ($R^2 = 0,87$; $Q^2 = 0,73$ et $Q^2/R^2 = 0,84$). Un test de permutation ($n = 1000$, $p = 0,013$) a été effectué et a permis la validation du modèle (Triba et al. 2015). Il est également intéressant de construire un modèle PLS-DA à 3 classes (statique (V_0), faible hydrodynamisme (V_1 - V_2), fort hydrodynamisme V_3 - V_4) en regroupant les échantillons pour comparer statique/dynamique ou encore faible/fort hydrodynamisme. Ces deux modèles présentent néanmoins une p -value supérieure à 0,05 (test de permutation ; $n = 1000$) ne permettant pas de valider le modèle prédictif, ces PLS-DA sont présentées dans la figure S.VI.1.

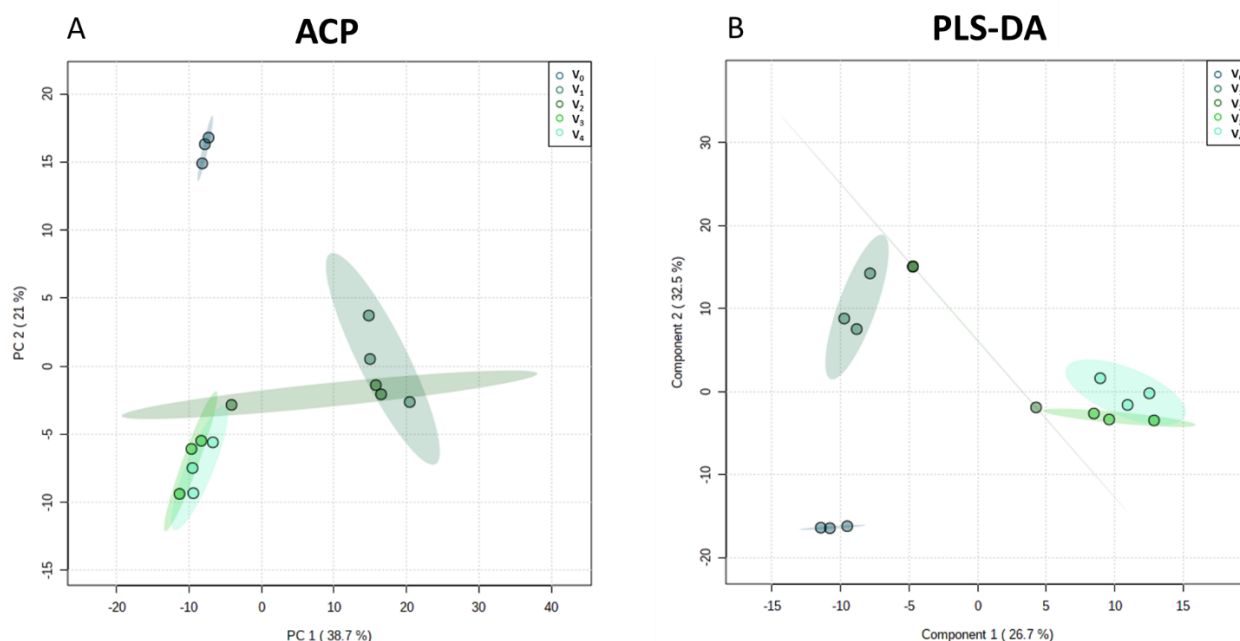


Figure VI.13. : Score plots de **A)** l'ACP et **B)** la PLS-DA obtenus à partir des données LC-(+)-ESI-MS d'échantillons de biofilms formés *in situ* soumis aux différentes conditions hydrodynamiques (V0 : statique ; V1 : 1 nœud ; V2 : 2 nœuds ; V3 : 3 nœuds ; V4 : 4 nœuds ; PC : composante principale).

L'étape suivante de cette étude consiste à identifier les métabolites caractéristiques des cinq conditions hydrodynamiques. Grâce au modèle prédictif PLS-DA, les métabolites les plus discriminants ont été sélectionnés au sein du métabolome à l'aide de leur valeur de *VIP score* (Tableau VI.5.). Le but de cette analyse n'est pas d'identifier le métabolome de manière globale des biofilms formés *in situ* mais d'annoter les métabolites les plus discriminants en fonction du stress hydrodynamique imposé.

Les dix métabolites possédant les valeurs de *VIP score* les plus élevées sont regroupés dans le tableau x. Parmi ces VIPs, huit ont été putativement identifiés grâce à la valeur de leur rapport *m/z*, leur temps de rétention et leurs spectres de fragmentation MS/MS. La recherche dans des bases de données spécialisées (GNPS, PubChem, HMDB, Metlin, Lipidmaps, CEU mass), grâce aux valeurs précises de leur rapport *m/z* (obtenues par le biais d'un spectromètre à haute résolution) a constitué une aide importante pour l'annotation de ces molécules. Quatre d'entre elles sont de plus en plus exprimées quand la vitesse augmente, il s'agit des VIPs n°4, n°6, n°7 et n°9. Deux d'entre eux correspondent à des acides gras ou à des dérivés à savoir un acide gras monoinsaturé (18:1) (VIP n°4, *m/z* 283,2663 ; $[C_{18}H_{34}O_2]^+$) et un aldéhyde gras polyinsaturé (18:2) (VIP n°6, *m/z* 265,2565 ; $[C_{18}H_{32}O]^+$). Le VIP n°7 (*m/z* 597,4892 ; $[C_{39}H_{65}O_4]^+$) n'est pas identifié putativement mais correspond à un métabolite d'une masse plus conséquente et

plus oxydé que les VIP n°4 et 6. Le VIP n°9 (m/z 419,2297 ; $[C_{21}H_{31}N_4O_5]^+$), quant à lui, n'est pas fragmenté.

D'autre part, quatre autres métabolites évoluent avec une tendance inverse (VIPs n°1, 2, 3 et 8), ils ont des teneurs de plus en plus faibles quand la vitesse augmente. Ils sont identifiés comme des métabolites ayant des valeurs m/z peu importantes (< 300), des temps de rétention faibles ($< 3,15$ minutes) et qui comportent un ou plusieurs atomes d'azote. Le VIP n°1 est annoté comme étant la 6-diméthyladénosine sur la base de sa formule brute (m/z 296,1386 ; $[C_{12}H_{17}N_5O_4]^+$) et grâce à sa fragmentation caractéristique montrant une rupture entre l'adénosine et le ribose (fragment à m/z 164,0955 ; $[C_7H_{10}N_5]^+$). Les VIP n°2, n°3 et n°8 sont respectivement identifiés comme la 1-phényléthylamine (m/z 122,0986 ; $[C_8H_{11}N]^+$), le 2-phénylacétamide (m/z 136,0778 ; $[C_8H_9NO]^+$) et la *N*-acétyl-2-phényléthylamine (m/z 164,1094 ; $[C_{10}H_{13}NO]^+$). La fragmentation de ces métabolites est donnée dans le tableau VI.4.

VIP	m/z	RT (min)	VIP score	Formule brute ^a	Erreur de masse (ppm)	$m\sigma^b$	Ions fragments MS/MS (abondance relative en %)	Annotation putative	VIPs				
									V ₀	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
1	296,1386	1,13	3,75	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄	-10,9	12,8	164.0955 [C ₇ H ₁₀ N ₅] ⁺ (100) ; 136.0627 [C ₅ H ₈ N ₃] ⁺ (6)	6-Diméthyladénosine	High	High	High	Low	Low
2	122,0986	0,97	3,22	C ₈ H ₁₁ N	-17,6	1,1	106.0749 [C ₇ H ₉ N] ⁺ (8) ; 105.0717 [C ₆ H ₇ N] ⁺ (100) ; 103.0558 [C ₄ H ₇] ⁺ (16)	1-Phényléthylamine	High	High	High	Low	Low
3	136,0778	3,11	3,06	C ₈ H ₉ NO	-15,8	0,8	91.0559 [C ₇ H ₇] ⁺ (100)	2-Phénylacétamide	High	High	High	Low	Low
4	283,2663	9,78	3,06	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-11,1	9,9	265.2564 [C ₁₇ H ₂₈ O] ⁺ (7) ; 247.246 [C ₁₆ H ₂₆] ⁺ (18) ; 69.0711 [C ₅ H ₈] ⁺ (100)	FA (18:1)	Low	Low	High	High	High
5	520,3436	8,27	3,01	—	—	—	nf	—	High	High	High	Low	Low
6	265,2565	9,74	2,99	C ₁₈ H ₃₀ O	-14,7	14,1	247.2455 [C ₁₇ H ₂₈] ⁺ (70) ; 247.246 [C ₁₆ H ₂₆] ⁺ (18) ; 95.0875 [C ₅ H ₈] ⁺ (100)	FAL (18:2)	Low	Low	High	High	High
7	597,4892	8,82	2,9	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	-2,4	34,2	311.2421 [C ₁₉ H ₂₈ O] ⁺ (19)	—	Low	Low	High	High	High
8	164,1094	6,3	2,87	C ₁₀ H ₁₃ NO	-14,7	7,8	247.2455 [C ₁₀ H ₁₃] ⁺ (70) ; 247.246 [C ₉ H ₁₁] ⁺ (18) ; 95.0875 [C ₅ H ₈] ⁺ (100)	N-Acetyl-2-phényléthylamine	High	High	High	Low	Low
9	419,2297	6,72	2,8	C ₂₁ H ₃₁ N ₄ O ₅	-1,9	44,5	nf	Trp Thr Ile	Low	Low	High	High	High
10	647,3791	8,39	2,79	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₀	-0,2	50,2	335.1857 [C ₁₉ H ₂₇ O] ⁺ (100)	—	High	High	High	Low	Low

^a All these metabolites were observed as protonated molecules [M+H]⁺. ^b Constructor statistical match factor (comparison of theoretical and experimental isotopic patterns). ^c VIP fragmented by targeted MS/MS analysis: FA : Fatty Acid, FAL : Fatty acid aldehyd, FAHFA : Fatty Acyl Esters of Hydroxy Fatty Acid

Tableau VI.4. : Liste des 10 métabolites possédant le VIP score le plus important ainsi que leur annotation putative.

Les acides gras et les lipides sont des molécules couramment retrouvées au sein du métabolome de biofilms (Fadhlaoui et al. 2020; Favre et al. 2017; Schnurr et al. 2019). Ces résultats indiquent une augmentation de la quantité de certains acides gras (et donc de certains lipides) lorsque que le stress hydrodynamique augmente. Ceci est en accord avec une précédente étude

qui montre que la matrice des biofilms de *P. fluorescens* présente un changement de composition de son métabolome lorsque cette souche bactérienne est cultivée dans des conditions d'agitation (80 tr/min) en comparaison à une culture statique, notamment une augmentation de la teneur en lipides (notamment de phospholipides) lorsque l'agitation augmente (Jara et al. 2021).

3. Complémentarité des méthodes utilisées

Dans la littérature, des combinaisons de multiples analyses ont été menées récemment afin de mieux caractériser les biofilms marins et les EPS. Ainsi, des analyses combinées par GC-MS, RMN (résonance magnétique nucléaire), IR-TF et MEB ont mis en évidence le rôle des EPS hydrosolubles dans la fixation des larves d'invertébrés sur des matériaux artificiels (Siddik and Satheesh 2019). D'autres combinaisons de techniques (méthodes colorimétriques, analyses IR-TF, GC-MS, RMN, HPGPC (*high-performance gel permeation chromatography*) et AFM (*Atomic force microscopy*)) ont été utilisées pour comparer la production d'EPS en mode planctonique et en mode biofilm par la souche marine *Pseudoalteromonas ulvae* (Brian-Jaisson et al. 2016).

La diversité des méthodologies mises en place dans notre étude a permis de mettre en lumière l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation du biofilm marin au niveau : visuel (microscopies), de la caractérisation de la matrice (dosage des EPS) et plus largement de la composition biochimique globale (IR-TF) et du métabolome (métabolomique non-ciblée par LC-MS). Le but premier de cette étude est de souligner la complémentarité des techniques en répondant à la question biologique suivante : « Quel est l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation de biofilm marin *in situ* ? ». Le bilan général est que l'hydrodynamisme affecte la production métabolique des biofilms marins formés *in situ*. Des études précédentes ont montré que l'hydrodynamisme engendrait des perturbations lors de la formation de biofilms comme le fait de retarder leur maturation (Chang et al. 2020; Romeu et al. 2019). Dans notre étude, l'hydrodynamisme a un impact sur le biofilm formé à tous les niveaux étudiés (visuel, composition de la matrice, composition biochimique globale, composition du métabolome).

Les trois analyses en composantes principales (Figure VI.9., Figure VI.12., Figure VI.13.) réalisées respectivement pour les études par dosages biochimiques, par IR-TF et par métabolomique donnent des tendances similaires. En effet, deux constats communs se dégagent de ces analyses :

1) Les biofilms formés en mode statique se différencient de ceux formés en présence d'un stress hydrodynamique (V_0 vs V_1 - V_4). Grâce aux dosages colorimétriques, il a été montré que les biofilms formés en mode statique ont une teneur en glucides plus importante. En effet, leur rapport G/P est environ deux fois plus important que celui des échantillons formés en mode dynamique. Grâce à la séparation des échantillons de biofilms en plusieurs fractions, il a été observé que le rapport FL/FC pour les AU était minimal en mode statique. L'analyse IR a montré que le ratio AU/G était plus élevé pour les biofilms formés en mode statique tandis que le ratio L/G était plus élevé dans les conditions dynamiques. L'analyse métabolomique a montré que certains métabolites, en l'occurrence de petites molécules azotées, sont plus présents en mode statique.

2) Les biofilms formés dans un contexte de faible hydrodynamisme (V_1 - V_2) se différencient de ceux formés avec un hydrodynamisme fort (V_3 - V_4). Ce deuxième constat est en accord avec l'observation des biofilms par MEB et MCBL qui a montré une nette différence entre les échantillons formés avec un faible hydrodynamisme (V_1 - V_2), fortement colonisés par des macro-organismes et ceux obtenus avec un hydrodynamisme plus important (V_3 - V_4), pour lesquels les macro-organismes ne sont que peu présents. Grâce aux dosages colorimétriques, il a pu être observé qu'un fort stress hydrodynamique (V_3 et V_4) correspondait à un rapport AU/G plus élevé ainsi qu'une teneur en protéines plus faible dans la FL que dans la FC. A l'inverse, dans les conditions V_1 et V_2 des teneurs en protéines similaires pour ces deux fractions ont été relevées. L'analyse IR montre un ratio G/P plus élevé pour les échantillons V_3 et V_4 et le même constat est observé par le biais des dosages colorimétriques. Une tendance inverse est relevée pour le rapport L/P dans l'analyse IR-TF. De plus, l'analyse métabolomique a montré que certains dérivés lipidiques (VIP n°4 et 6) étaient particulièrement plus exprimés dans des conditions de fort hydrodynamisme.

Les résultats obtenus par les dosages biochimiques et l'analyse IR sont particulièrement concordants. En effet, l'identification des bandes caractéristiques des protéines (Amine I : 1627 - 1693 cm^{-1} ; Amine II : 1531 – 1568 cm^{-1}) et des glucides (900 - 1200 cm^{-1}) sur les spectres IR donne une information sur les proportions de ces composés dans le biofilm total. Les dosages biochimiques, quant à eux, permettent une étude quantitative de ces composés dans les EPS et les résidus. Ces deux techniques conduisent à l'obtention d'un rapport G/P plus faible pour V_1 - V_2 que pour V_0 , V_3 et V_4 et montrent une proportion de protéines plus importante dans les biofilms soumis à un faible stress hydrodynamique (V_1 et V_2). En définitive, ces deux techniques permettent d'obtenir une information similaire sur la composition biochimique globale des biofilms étudiés.

Le lien entre les résultats obtenus par ces deux techniques et ceux issus de l'analyse métabolomique n'est pas direct mais témoigne d'une certaine complémentarité. En effet, la métabolomique va permettre l'étude des molécules de faibles masses moléculaires alors que les deux autres techniques vont se focaliser sur la caractérisation des molécules majoritaires des échantillons qui, dans le cadre de cette étude, sont notamment les macromolécules constituant la matrice des biofilms. L'association de ces différentes techniques conduit donc à l'étude d'un large panel de molécules.

4. Conclusion

L'originalité de cette approche a tout d'abord été méthodologique, avec la mise en place d'un large panel de techniques (microscopies, dosages colorimétriques, IR-TF, métabolomique) qui a permis la caractérisation multi-échelle de biofilms complexes. La deuxième originalité réside dans la question scientifique posée à savoir l'influence du facteur hydrodynamique sur des biofilms marins formés *in situ*. Peu d'études à ce sujet, d'autant plus sur des échantillons obtenus en *in situ*, ont été menées. En outre, le système hydrodynamique (rotor) utilisé lors de cette étude est tout à fait original et permet d'appliquer un gradient de vitesse contrôlé en milieu marin.

La mise en place et la complémentarité des méthodologies utilisées ont déterminé, dans un premier temps, une différence dans la composition biochimique des biofilms formés en présence et en absence de stress hydrodynamique. D'après cette étude, les biofilms formés en mode statique présentent un rapport G/P et AU/G plus important, un rapport L/P plus faible ainsi que des métabolites azotés de faible poids moléculaire spécifiques de cette condition. Une différence de composition a également été relevée entre les échantillons soumis à un faible et fort hydrodynamisme. En effet, l'augmentation du stress hydrodynamique engendre une diminution de la colonisation par les macro-organismes et de la masse du biofilm, des rapports G/P, L/P et AU/G plus élevés, et enfin une augmentation de la production de certains métabolites (ex. acides gras et dérivés).

Comme décrit sur la figure VI.2., une partie des échantillons a été conservé pour une analyse par metabarcoding qui est en cours de réalisation. Cette étude complémentaire va permettre de caractériser les communautés eucaryotes et procaryotes de ces mêmes échantillons. La variation de ces communautés en fonction du stress hydrodynamique donnera une information complémentaire à celles déjà obtenus dans le cadre de cette étude. Les variations de la

compositions biochimiques décrites précédemment pourrait être mis en lien avec le type de d'organismes présents.

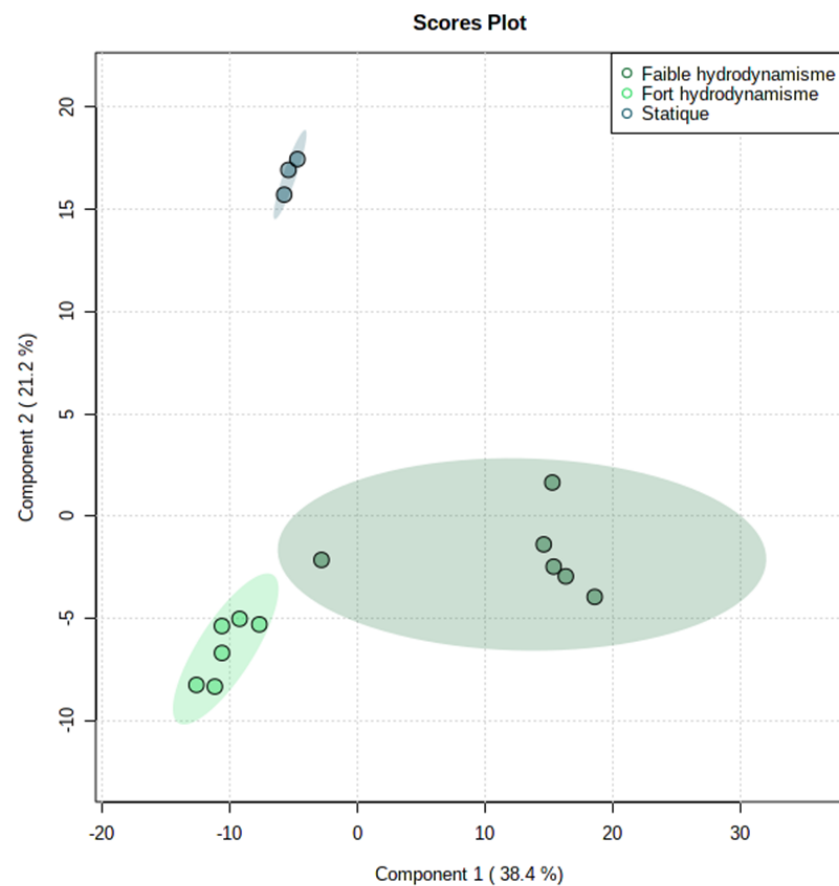
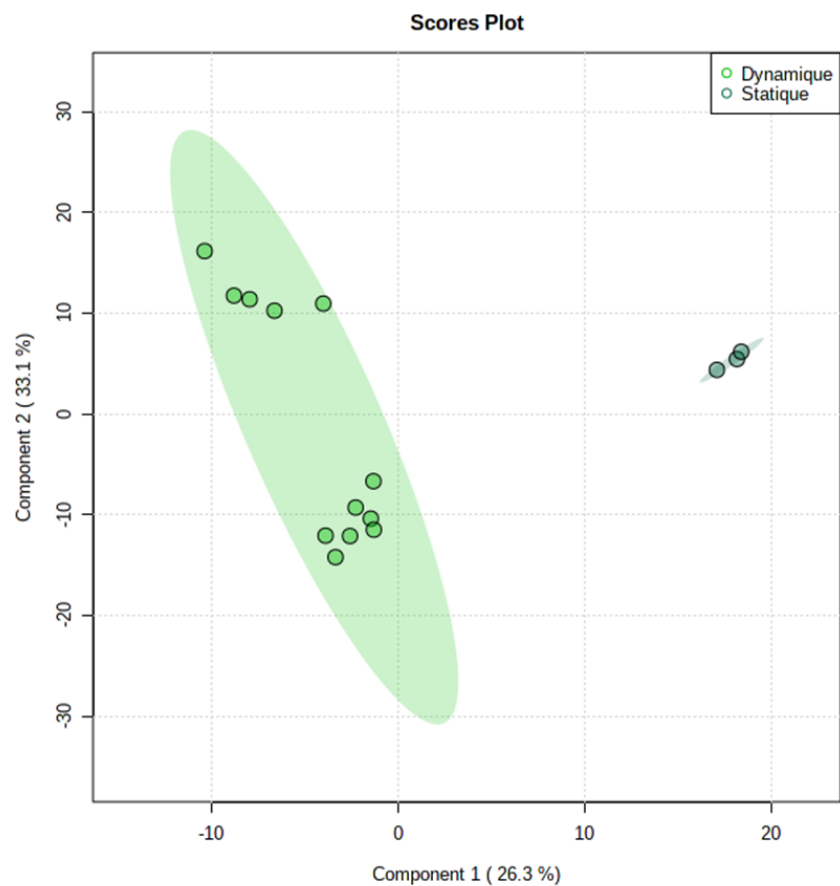
Cette étude a mis en lumière l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation du biofilm uniquement durant la saison printanière. Comme observé sur les photographies de la figure x, la saisonnalité a également un fort impact sur les changements observés visuellement au niveau des biofilms. Une des perspectives envisagée sera d'étudier l'ensemble des données disponibles (paramètres environnementaux, production biochimique et communautés présentes) obtenus à partir de biofilms immergés à chaque saison.

5. Annexes Chapitre VI

Tableau S.VI.1. : Tableau des critères de filtration de l'analyse du métabolome

Mzmine 2			Filtration sur R		
Mass detection	Mass detector	Centroid	Emimination des signaux observés dans les "blancs"	Rapport signal/Bruit	< 3
	Noise level	1.00E+03			
Chromatogram builder	Min group size in # of scans	3	Elimination des signaux instables	Coefficient de variation	> 50 %
	Group intensity threshold	1.00E+03			
	Min height	2.00E+03			
	m/z tolerance (absolute)	0,025			
chromatogram deconvolution	Algorithme	Baseline cut-off	Filtration manuelle		-12
	Min peak height	2.00E+03			
	Peak duration range (min)	0,01-0,5			
	baseline level	500			
Chromatogram deisotoped	m/z tolerance (absolute)	0,05	Analyse sous métaboanalyst		
	Retention time tolerance	0,25	Data filtering	Standard deviation (SD)	
	Maximum charge	2	Sample Normalisation	None	
	Representative isotope	Most intense	Data transformation	Log transformation	
Peak list aligned	m/z tolerance (absolute)	0.05	Data scaling	Mean centring	
	Retention time tolerance (min)	0.25	Validation du modèle	Pemutation	<0.01
	Weight for m/z	1		R2	0.87
	Weight for rt	1		Q2	0.69
Gap filled	Intensity tolerance	0,5	Annotation du métabolome (réseaux moléculaires)		
	m/z tolerance (absolute)	0,05	Précurseur ion mass tolerance	0.02	
	Retention time tolerance (min)	0,3	Fragment ion mass tolerance	0.02	
Duplicate peak filter	Filter mode	NEW AVERAGE	Min pairs Cos	0.7	
	m/z tolerance (absolute)	0,05	Minimum matched fragments ions	4	
	Retention time tolerance (min)	0,25			
Delimitation de la fenetre	m/z	100-1500			
	rt	0.5-20			

Figure S.VI.1 : *Score plots* PLS-DA obtenus à partir des données LC-(+)-ESI-MS d'échantillons de biofilms formés *in situ* comparant : A) modes statique (V_0) et dynamique (V_1 à V_4) et B) Modes statique (V_0), à faible (V_1 et V_2) et fort hydrodynamisme (V_3 et V_4)



CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES



Conclusion générale

Cette thèse pluridisciplinaire, à l'interface de la chimie, de la biochimie et de la microbiologie comportait deux objectifs principaux. Le premier était le développement de méthodologies permettant une approche multi-échelles pour la caractérisation des biofilms marins. En effet, la mise en place de ces méthodologies a permis de caractériser visuellement la structure et l'organisation de biofilms, d'étudier la composition (protéines, glucides, acides uroniques) des EPS constituant la matrice, et d'analyser la signature chimique globale ou encore le protéome et le métabolome de ces structures complexes. Le développement et l'utilisation de la métabolomique, ainsi que la mise en oeuvre des réseaux moléculaires (GNPS), a constitué une approche « phare » pour apporter des informations pertinentes permettant de répondre aux questions scientifiques posées. Néanmoins, d'autres techniques (microscopies, spectroscopies et approches complémentaires (protéomique) ont été utilisées et mises en lien avec les informations issues de l'étude métabolomique, et ce afin de participer à une meilleure compréhension de la formation de biofilms. Ces méthodologies mises en place, chacune donnant des informations différentes, ont apporté des éléments pour la caractérisation biochimique globale des biofilms étudiés. Le deuxième objectif était d'apporter une meilleure compréhension du comportement des biofilms sur la base de questions scientifiques spécifiques (impact de la concentration en phosphates, d'une enzyme agissant sur le QS, de l'hydrodynamisme). Les méthodologies utilisées ont d'abord été appliquées à des biofilms bactériens simples (monospécifiques) cultivés en laboratoire puis à des biofilms complexes formés *in situ*.

Le chapitre 3 retrace le développement d'une méthode d'annotation liant une approche phytochimique « classique » à une utilisation des réseaux moléculaires dans le cadre d'une analyse métabolomique. Cette approche récente a été optimisée dans cette étude avec l'utilisation de réseaux plus ou moins contraints. La variation de certains paramètres (*minimum cosine score*, *minimum matched fragment ion*, *network topK*) dans l'élaboration du réseau a permis le développement d'un workflow optimal permettant l'annotation la plus globale possible (regroupant le plus de métabolites) du métabolome d'un organisme non-modèle. Dans ce chapitre, la caractérisation phytochimique des extraits organiques de la macro-algue brune *T. atomaria* a été étudiée. La méthodologie développée en se basant sur cet organisme avait pour but d'être ensuite appliquée à la caractérisation de biofilms. Au terme de cette étude, 14

familles chimiques ont été identifiées au sein du métabolome de cette algue et plus de 200 métabolites ont finalement pu être annotés. Trois de ces familles sont composées de lipides originaux comportant une chaîne terpénique liée à une unité de glycérol, identifiées comme étant des monoacylgéranylgéranylglycérols et des di- et monoacylfarnésylglycérols. Une autre famille chimique, à savoir les acides monoacylglycérylfulvelliques décrits à ce jour uniquement chez l'algue brune *Sargassum fulvellum*, a été également identifiée dans le métabolome de *T. atomaria*. L'annotation d'une large part du métabolome de cet organisme non-modèle a été réalisée via l'optimisation des paramètres utilisés lors de la construction des réseaux moléculaires. Dans un premier temps, la stratégie a été de construire un réseau dit « restreint » comportant un nombre limité de clusters de taille réduite afin de ne visualiser que les métabolites présentant des données MS/MS très similaires. Ainsi, il a été possible de visualiser les similarités structurales entre les molécules regroupées au sein d'un même cluster et, en confrontant ces données expérimentales à celles issues de la littérature ou provenant de standards chimiques isolés dans le cadre de l'étude phytochimique, d'annoter la plupart des métabolites présents dans ces clusters. Dans un second temps, l'utilisation de paramètres moins restrictifs a permis le rattachement d'autres métabolites à des clusters bien identifiés et ainsi leur rapide annotation. Cette stratégie, développée ici pour l'algue brune *T. atomaria*, a été ensuite utilisée pour l'annotation du métabolome des biofilms dans les autres travaux décrits dans ce manuscrit. L'analyse par réseau moléculaire mise en place a permis la création d'une première base de données interne de plus de 200 métabolites identifiés dans le métabolome de *T. atomaria*. Certaines familles de molécules (DG, TG, Lyso-PC, PC), présentes dans cette première base de données interne, ont été retrouvées dans les biofilms étudiés par la suite. La constitution de cette base de données regroupant les métabolites de *T. atomaria* a permis de faciliter la caractérisation ultérieure du métabolome de biofilms. Celle-ci a également été utilisée dans une autre étude portant sur *T. atomaria* (Thèse de Benoit Paix). Dans le cadre de cette étude couplant métabolomique et metabarcoding, il a été montré que les variations intra-thalles du métabolome de surface de cette algue et celles de ses communautés bactériennes épiphytes étaient corrélées. Le protocole d'annotation a ainsi permis de montrer que les sommets des thalles correspondaient à des zones où les molécules de défense (sesquiterpènes) et les lipides impliqués dans la croissance algale (DGTA) étaient les plus exprimés. Ces travaux ont été validés par la publication « *A multi-omics analysis suggests links between the differentiated surface metabolome and epiphytic microbiota along the thallus of a Mediterranean seaweed holobiont* » (Paix et al. 2020).

Dans le chapitre 4 de ce manuscrit, cette méthode d'annotation a été appliquée afin d'étudier l'effet de la teneur en phosphates dans le milieu de culture sur des biofilms formés *in vitro* par la bactérie marine *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. Dans ce contexte, une analyse métabolomique non ciblée par LC-MS s'est avérée être une technique de choix pour évaluer l'impact de ce paramètre de culture sur la production métabolique de cette souche bactérienne. Le but des travaux entrepris était également de mettre en place une caractérisation plus globale des biofilms. Pour cela, plusieurs méthodes analytiques ont été mises en place permettant de déterminer la composition biochimique globale (dosages colorimétriques des protéines, glucides, acides uroniques), la biomasse (marquage au cristal violet) ou encore la viabilité et la structure (microscopie confocale) des biofilms formés. L'analyse métabolomique a montré une évolution du métabolome de *P. lipolytica* TC8 en fonction des teneurs en phosphates et 53 métabolites appartenant à huit familles chimiques distinctes ont été putativement annotés grâce à la méthodologie développée dans le chapitre 3. Les résultats obtenus montrent que des aminolipides (ornithine lipides) sont observés en proportions croissantes lorsque la concentration en phosphate diminue, alors que la tendance inverse est observée pour certains phospholipides [phosphatidyléthanolamines (PE) oxydés]. Cette étude métabolomique indique que *P. lipolytica* TC8 est capable d'adapter sa production en lipides membranaires en fonction de la concentration en phosphates du milieu de culture. Les autres méthodologies analytiques appliquées ont montré que la biomasse, la teneur en glucides ainsi que les structures tridimensionnelles des biofilms obtenus avaient tendance à diminuer en même temps que la teneur en phosphates. D'un point de vue méthodologique, le but ici a été de mettre en relation différentes techniques de caractérisation permettant d'évaluer différentes caractéristiques, et ce afin de déterminer l'impact d'une carence en phosphates sur la formation d'un biofilm bactérien.

Les méthodologies développées dans ces deux chapitres (principalement liées à la métabolomique et l'utilisation des réseaux moléculaires) ont été ensuite appliquées à d'autres travaux et projets de recherche.

Le chapitre 5 de ce manuscrit décrit la mise en place d'une approche multi-omiques, combinant métabolomique et protéomique, pour l'étude d'un biofilm à différents niveaux biochimiques afin de mieux comprendre les mécanismes de production de métabolites d'intérêt. Ces travaux se sont inscrits dans le cadre du projet de recherche RESSAC « *Enzymatic Coatings Inhibiting Fouling and Corrosion* » financé par l'ANR Astrid et impliquant deux laboratoires : le laboratoire MAPIEM et le laboratoire MEPHI-IHU (Méditerranée Infection d'Aix-Marseille

Université). Cette collaboration avec le laboratoire MEPHI-IHU, plus précisément l'équipe de la start-up Gene & GreenTK, a permis de mettre en commun différentes expertises afin d'étudier l'action inhibitrice du QS de la lactonase SsoPox-W263I vis-à-vis de la bactérie-modèle *Chromobacterium violaceum* ATTC 12472. Cette souche est un biosenseur connu pour produire spécifiquement un pigment violet (la violacéine) sous le contrôle de molécules de communication impliquées dans le QS (AHLs). L'utilisation de la protéomique a mis en évidence des voies de biosynthèse impactées par le QS. La métabolomique a conduit, d'une part, à mettre en évidence le potentiel de *quorum quenching* (QQ) de la lactonase - avec une diminution de la production des AHLs dans les échantillons traités et détection de leur forme hydrolysée - et, d'autre part, de montrer l'impact du QQ sur la biosynthèse de molécules impliquées dans les interactions inter-domaines (antibiotiques tels que la violacéine ou l'anisomycine). L'approche multi-omiques a ensuite permis la corrélation de ces deux sources d'informations (protéome/métabolome) via l'élaboration de réseaux multi-omiques (package MixOmics sous R) facilitant l'identification de protéines en lien avec des métabolites d'intérêt. L'analyse multi-omiques a démontré l'action inhibitrice du QS de la lactonase SsoPox-W263I sur *C. violaceum* ATTC 12472 induisant des modifications majeures de sa production biosynthétique et impactant ainsi ses interactions avec un large panel d'autres organismes.

Dans les deux chapitres présentés ci-dessus (4 et 5), diverses techniques analytiques ont été développées et appliquées à l'étude de biofilms formés *in vitro* (techniques omiques, analyse multi-omiques, dosages colorimétriques, microscopies). Toutes ces techniques ont démontré qu'elles pouvaient apporter une information différentes, plus ou moins spécifique, dans le cadre de la caractérisation de biofilms monosouches. La caractérisation de biofilms complexes, formés *in situ*, à l'aide des méthodologies développées dans les parties précédentes, constitue le chapitre 6 de cette thèse. L'environnement dans lequel se forment ces biofilms n'étant pas contrôlé, ce type d'étude a nécessité la mesure régulière de paramètres environnementaux pouvant impacter leur nature. Dans ce chapitre, le panel analytique permettant l'étude de biofilms a été enrichi par des techniques telles que la microscopie électronique à balayage (MEB) à basse pression ou encore la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode ATR. Plus précisément, les travaux réalisés avaient pour but de mettre en lumière la complémentarité de ces différentes méthodes analytiques afin de révéler l'impact de l'hydrodynamisme sur des biofilms marins formés *in situ*. L'analyse de surfaces immergées dans la rade de Toulon en modes statique et dynamique a montré l'influence du facteur hydrodynamique ; ce dernier entraînant une perturbation dans la formation du biofilm et

retardant sa maturation. Les dosages des EPS, les analyses par IR-TF en mode ATR et par métabolomique non-ciblée donnent des tendances similaires. En effet, les biofilms formés en mode statique se différencient nettement de ceux formés en présence d'un stress hydrodynamique. Parmi ces derniers, les biofilms formés avec un hydrodynamisme faible sont différenciés de ceux formés avec un hydrodynamisme fort. L'originalité de cette approche a été l'application d'un large panel de techniques (microscopies, dosages colorimétriques, IR-TF, métabolomique) pour une caractérisation multi-échelles (visualisation ; composition en EPS présents dans la matrice : protéines, glucides, acides uroniques ; signature chimique globale ; métabolome) d'un biofilm complexe formé *in situ*. De plus, l'utilisation du système rotor destiné à l'étude de l'effet de l'hydrodynamisme sur le biofilm a permis de tirer plusieurs conclusions. En effet, les biofilms formés en statique présentent un rapport G/P et AU/G plus important, un rapport L/P plus faible ainsi que des métabolites azotés de faible masse moléculaire spécifiques de cette condition. Pour les biofilms développés sur le rotor, l'augmentation du stress hydrodynamique engendre une diminution de la colonisation par les macro-organismes et de la masse du biofilm, un rapport G/P, L/P et AU/G plus élevé, une augmentation de la production de certains métabolites tels que des acides gras et dérivés.

La caractérisation multi-échelles d'un biofilm complexe formé en milieu marin est difficile à mettre en place du fait de l'échantillonnage sur le terrain, de la diversité de sa composition à toutes les échelles du vivant ou encore du nombre important de paramètres environnementaux à prendre en compte. Le workflow analytique adopté pendant cette thèse a été complexifié au fur et à mesure en combinant de plus en plus de méthodologies. En effet, les différentes techniques utilisées ont, dans un premier temps, été développées étape par étape afin de tester leur pertinence, leur apport dans la caractérisation des biofilms et notre capacité à les mettre en place. De plus, ces techniques ont été testées en premier lieu sur un macro-organisme marin puis sur des biofilms monospécifiques cultivés en laboratoire avant d'être appliquées à des biofilms formés *in situ* ou à d'autres projets de recherches. L'objectif principal de ces travaux était de développer et de tester différentes analyses permettant la caractérisation de biofilm, et notamment de biofilms formés en milieu marin. Le tableau VII.1 décrit l'intérêt de chaque analyse, mais permet également d'afficher à quelle échelle le biofilm est caractérisé (allant de l'étude du biofilm dans sa globalité à l'étude de la variation de production d'une molécule). D'autres paramètres sont également répertoriés pour chaque analyse, à savoir la précision (pour l'étude des variations dans un biofilm), le coût, la rapidité et la difficulté de mise en place de chaque technique. A noter que l'évaluation de ces paramètres a été effectuée en fonction de

l'expérience acquise durant ces trois années de thèse et correspondant aux moyens techniques, humains et financiers du laboratoire MAPIEM. Néanmoins, grâce au recul acquis durant ce doctorat, ce tableau a pour but de répertorier les éléments permettant un choix judicieux d'une ou plusieurs techniques en fonction de l'analyse à effectuer et de la question biologique posée pour l'étude d'un biofilm.

Le second objectif découle de l'utilisation de ce large panel de techniques pour l'étude des biofilms. Cela a permis de répondre à des questions scientifiques comme l'impact des nutriments (phosphates), d'une enzyme (*quorum sensing*) ou d'un paramètre tel que l'hydrodynamisme sur la nature de biofilms formés. Un récapitulatif des principaux résultats obtenus au cours de cette thèse est donné au niveau du tableau VII.2.

Analyse développée	Intérêt de l'analyse	Dimension étudiée dans le biofilm	Information fournit pour l'étude d'un biofilm	Coût de l'analyse (hors équipement)	Difficulté de mise en place	Difficulté du traitement des données
Métabolomique	Etude des variations des métabolites au sein du biofilm	Métabolome	+++	+++	+++	+++
Protéomique	Etude des variations des protéines au sein du biofilm	Protéome	+++	+++	+++	+++
Multi-omiques	Etude des voies de biosynthèse et de l'ensemble du phénotype du biofilm (protéome, métabolome)	Multi-échelles (du génome au métabolome)	++++	++++	++++	++++
Dosage colorimétrique au cristal violet	Quantification du biofilm	Intégralité du biofilm	+	+	+	+
Dosage colorimétrique des EPS	Quantification des éléments composant les différents types d'EPS	Matrice du biofilm (protéines, glucides, acides uroniques)	++	+	+	+
Spectroscopie Infrarouge (FTIR-ATR)	Etude des fonctions chimiques des constituants présents dans le biofilm	Signature des molécules présentes dans le biofilm	+	++	++	+
Microscopie confocale	Visualisation du biofilm. Visualisation des protéines, glucides, ADN.	Intégralité du biofilm Matrice du biofilm	++	+++	+++	++
Microscopie électronique à balayage (MEB)	Visualisation du biofilm (bactéries, diatomées, matrice, micro et macro <i>fouling</i>)	Intégralité du biofilm	+++	+++	+++	++

Tableau VII.1. : Tableau récapitulatif des analyses développées pour la caractérisation de biofilms

Chapitre	Question scientifique	Facteur influençant la formation du biofilm	Principaux résultats obtenus
3	Quelle est la composition élargie du métabolome de la macro-algue brune <i>Taonia atomaria</i> ?	–	Annotation de plus de 200 métabolites répartis dans 14 familles chimiques dont 3 familles de lipides originaux : - Monoacylgéranylgéranylglycérols - Di- et Monoacylfarnésylglycérols - Acides monoacylglycérylfulvelliques
4	Quel est l'impact global de la teneur en phosphate sur des biofilms formés <i>in vitro</i> par une bactérie marine modèle ?	Nutriment (Phosphate)	La carence en phosphate dans le milieu de culture entraîne : - Une diminution de la quantité de biofilm - Une diminution des amas bactériens observables - Une diminution du taux de phospholipides oxydés - Une augmentation du taux d'aminolipides (<i>ornithine lipids</i>)
5	Quel est l'impact de l'enzyme <i>SsoPox</i> sur les productions métabolique et protéomique de <i>C. violaceum</i> ?	<i>Quorum sensing</i> (enzyme <i>SsoPox</i> : lactonase)	La lactonase <i>SsoPox</i> sur <i>C. violaceum</i> induit des modifications majeures du métabolome et mineures de son protéome à savoir : - Une action inhibitrice du <i>quorum sensing</i> - Une diminution de la production des AHLs observées - Une détection des formes hydrolysées des AHLs (C9-HS, C10-HS, C11-HS et C12-HS) oxydées - Une modification de la biosynthèse de la violacéine
6	Quel est l'impact de l'hydrodynamisme sur la formation de biofilm marin <i>in situ</i> ?	Hydrodynamisme	L'impact d'un stress hydrodynamique sur la formation d'un biofilm <i>in situ</i> (Mer Méditerranée) engendre : - Une diminution de la formation de macro-fouling - Une diminution de la quantité de protéines dans le biofilm - Une augmentation de la quantité en lipides dans le biofilm - Une modification du métabolome en fonction du stress appliqué

Tableau VII.2. : Tableau récapitulatif des principaux résultats décrits durant cette thèse concernant la caractérisation de biofilms

Perspectives

A l'issue de ces travaux de thèse, portant à la fois sur le développement de méthodologies d'analyse pour la caractérisation des biofilms et à la fois sur la caractérisation approfondie des biofilms marins en fonction de la variation d'un facteur, plusieurs autres études sont envisageables. A la lumière des résultats obtenus, deux axes de perspectives s'inscrivent dans la continuité directe de ces travaux de thèse : le développement de nouvelles méthodologies et l'étude d'autres facteurs influençant la formation de biofilms en milieu marin.

1. Amélioration et développement de méthodologies permettant la caractérisation d'un biofilm

La première perspective consistera à l'amélioration des techniques mises en place et au développement de nouvelles méthodologies permettant la caractérisation des biofilms. L'amélioration de la technique phare de cette thèse, la métabolomique, semble être la première des perspectives. L'annotation de molécules supplémentaires (et de biomarqueurs) au sein du métabolome étudié servira à étendre la discussion au sein des différentes études. L'annotation des métabolites a été réalisée par l'analyse des spectres MS/MS et par la création de réseaux moléculaires via la plateforme GNPS. La création de réseaux moléculaires peut également être effectuée par d'autres logiciels comme MetGem (Olivon et al. 2018) permettant une autre visualisation basée sur le t-SNE. Cette visualisation préserve les interactions entre les groupes de spectres liés, sans lien ni clusters, permettant d'identifier la similarité ou non d'un métabolite avec tous les autres et potentiellement permettre, en synergie avec GNPS, une meilleure annotation du métabolome. Les nombreux métabolites annotés au cours de ces travaux de thèse l'ont été, pour la majorité, de manière putative. Une des perspectives méthodologiques serait de purifier les biomarqueurs majeurs afin de caractériser leur structure chimique par RMN (1D et 2D). Pour finir avec les perspectives concernant la métabolomique, l'amélioration de la couverture du métabolome pourrait être effectuée grâce à l'utilisation, en LC-MS, d'autres types de phases stationnaires permettant la séparation et l'étude d'un autre panel de composés. L'utilisation de phases stationnaires de type HILIC (chromatographie d'interaction hydrophile) permettrait de séparer les composés à forte polarité, et ainsi d'identifier d'autres biomarqueurs plus polaires. Concernant l'identification des EPS, permettant notamment de caractériser la matrice, la mise en place d'un dosage colorimétrique des lipides, adapté aux biofilms, serait

d'une grande utilité. Ce dosage, déjà décrit dans la littérature (Cheng et al. 2011), permettrait de quantifier le taux de lipides et de corréler les résultats obtenus avec les données de métabolomique et celles obtenues par IRTF-ATR. D'autres techniques pourraient être mises en place afin de participer à la caractérisation du biofilm. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ainsi que l'étude par pyrolyse GC-MS des polymères de la matrice apporteraient une caractérisation complémentaire. La CPG couplé à la spectrométrie de masse permettrait, après hydrolyse, de déterminer la composition exacte en monosaccharides des constituants glucidiques des EPS. La spectroscopie Raman apporterait, elle aussi, une plus-value dans la caractérisation des biofilms en détectant les processus de diffusion et de distribution de certaines molécules dans la structure du biofilm et serait complémentaire de l'IR pour la signature chimique globale du biofilm. Le metabarcoding étant une technique permettant l'identification des espèces présentes dans un échantillon, son utilisation serait précieuse pour les études *in situ* afin de mettre en relation les caractéristiques du biofilm formé avec l'étendue et la nature des microorganismes présents. Le metabarcoding et la métabolomique ont été utilisés pour explorer la composition taxonomique et la diversité fonctionnelle des communautés. Le couplage de ces deux techniques a permis d'identifier certains schémas associatifs entre profils métabolomiques et taxons spécifiques et plus globalement le décryptage de changements de la communauté de biosalissure eucaryote marine (Briand et al. 2018). Dans un futur proche, les échantillons de biofilms récoltés dans le cadre du projet Rotor (Chapitre VI) vont être analysés par metabarcoding et apporteront une plus-value à cette étude. En effet, l'approche de metabarcoding constitue une méthode de métagénomique ciblée, par séquençage d'un marqueur génétique, permettant la caractérisation taxonomique et structurale de l'ensemble de la communauté étudiée. L'utilisation des techniques omiques et leurs couplages (multi-omiques) ont montré une grande utilité pour une caractérisation multi-échelles. Le couplage de ces approches -omiques intimement liées permettent de reconstituer l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués, par exemple, dans les réponses d'un biofilm à des variations de son environnement. Néanmoins la génomique n'a pas encore été associée aux techniques utilisées à savoir la protéomique et la métabolomique. Son utilisation est prévue dans un projet en cours (C-OMICS), présenté en dernière partie des perspectives.

2. Etude d'autres facteurs pouvant influencer la formation de biofilm

Au cours de ces travaux de thèse, plusieurs facteurs influençant la formation et les caractéristiques du biofilm ont été étudiés, à savoir l'influence : des nutriments (phosphate), de l'hydrodynamisme (statique/dynamique) et d'une enzyme (lactonase *SsoPox*) agissant sur le *quorum sensing*. En premier lieu, une perspective pourrait être de tester l'impact de ces 3 facteurs sur d'autres souches bactériennes ou sur des biofilms complexes afin de compléter et de comparer les données produites avec les résultats obtenus. Concernant l'influence des nutriments, seul l'impact de la carence en phosphate a été étudié. L'impact de la carence en d'autres nutriments pourrait être testé, comme par exemple le carbone, l'azote et le soufre ou encore d'autres éléments jouant un rôle crucial dans le métabolisme bactérien (sodium, potassium, magnésium).

Etudier l'impact de certaines conditions physico-chimiques sur la croissance de biofilms pourrait également apporter des informations pour mieux comprendre le fonctionnement du biofilm et potentiellement son adaptation dans un environnement changeant. Il serait ainsi possible de tester l'effet de la disponibilité en oxygène, de la température, du pH ou encore de la pression osmotique.

Le type de surface colonisée a un impact non négligeable sur la nature du biofilm formé. L'une des thématiques du laboratoire MAPIEM étant la création de surfaces *antifouling* (type de revêtement, texturation...etc), tester les revêtements développés pour connaître l'impact des surfaces conçues a un réel intérêt dans la thématique globale du laboratoire. Pour aller plus loin dans cette réflexion, la caractérisation précise et globale des biofilms formés permettrait de « connaître son ennemi (le biofilm) pour mieux le combattre » et permettre une meilleure adaptation des surfaces visant à lutter contre le *fouling* en milieu marin.

L'étude des variables spatiales et temporelles en milieu marin pourrait également être un sujet d'étude pour décrire ce phénomène de colonisation à différentes profondeurs ou à différents endroits du globe. En milieu côtier, et notamment dans les ports, l'influence de la pollution multichimique (Cu, Mn, Zn, ...) peut impacter la formation des biofilms. L'influence de cette pollution par les métaux lourds est en cours d'étude dans le cadre du projet COMICS présenté brièvement dans la dernière partie des perspectives.

Dans un contexte plus large et actuel, on peut imaginer l'application de ces méthodes pour mieux comprendre l'influence du réchauffement climatique sur les biofilms mais également sur d'autres organismes.

3. Projet C-OMICS EAU

Ce projet **C-OMICS EAU** (Couplage d'approches méta-**OMICS** pour l'étude approfondie de réponses microbiennes de l'**EAU** de mer aux perturbations d'origine anthropique en milieu marin côtier), en collaboration avec le laboratoire MIO, est en cours et se situe dans la continuité de ces travaux de thèse. Ce projet, prévu initialement pour faire partie intégrante de ces travaux de thèse, a vu son calendrier décalé de plusieurs mois en raison de la crise sanitaire liée au COVID-19.

Les conséquences des activités anthropiques sur les écosystèmes marins, tout comme, à l'inverse, les limitations induites par des phénomènes naturels sur ces activités, et plus particulièrement celles liées au développement du *fouling* sur les navires et les constructions marines, constituent des préoccupations territoriales majeures dans la rade de Toulon. En effet, cet environnement accueille plusieurs ports de plaisance, la plus grande base navale militaire de France et diverses autres activités économiques. Depuis plus de 10 ans, les laboratoires MIO et MAPIEM de l'Université de Toulon (UTLN) apportent leur concours aux gestionnaires et décisionnaires afin d'identifier les contaminations chimiques, tracer leurs sources, et évaluer leurs impacts réels sur le vivant.

Trois sites représentant trois zones contrastées au niveau de la pollution chimique ont été sélectionnés. Les trois sites choisis représentent respectivement (i) une zone de référence sous faible pression anthropique (Cannier), (ii) une zone sous très forte influence anthropique (Suffren) et (iii) une zone intermédiaire (Lazaret) (Figure VII.1.). Si les biofilms peuvent être exposés en quelques jours, selon la courantologie du site, à des masses d'eau de qualités variables, les sédiments représentent un compartiment beaucoup plus stable à l'échelle temporelle (stabilité de plusieurs mois voire de plusieurs années). La comparaison, via des approches multi-omiques, de ces deux compartiments microbiens devrait permettre de mettre en évidence différentes voies d'adaptation aux multiples pressions anthropiques qu'ils subissent.

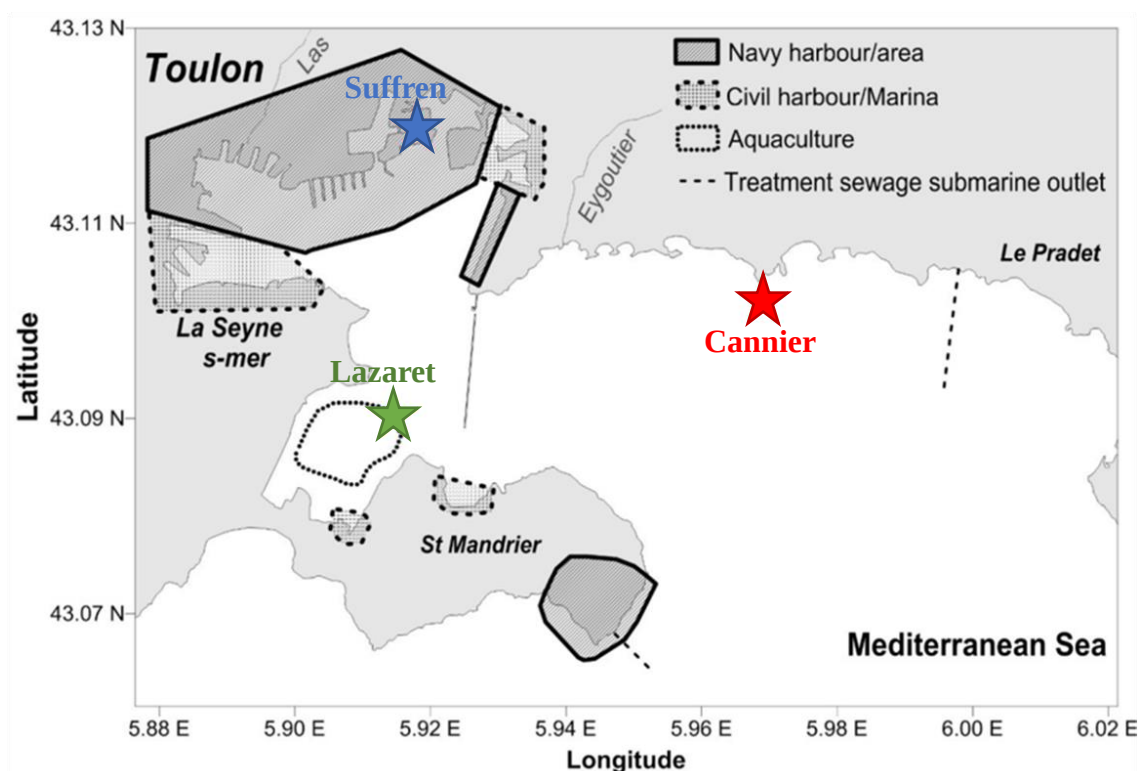


Figure VII.1. : Sites d'échantillonnage pour le projet C-OMICS EAU dans la rade de Toulon (mer Méditerranée, France).

Le projet C-OMICS a donc pour ambition de coupler l'ensemble des approches « omiques » à l'échelle « méta » (métabolomique, métabolomique mais également métagénomique), et ce afin d'étudier les communautés microbiennes naturelles et leur production métabolique dans des échantillons issus de la rade de Toulon. Ces analyses omiques vont être complétées par des analyses précédemment mises en place comme les différents dosages colorimétriques ou encore les analyses par spectroscopie IR-TF. On peut définir ce projet par deux grands objectifs : 1) Comprendre les différences de variations spatiales de diversité entre les compartiments benthiques (sédiments), biofilms et planctoniques. 2) Identifier et hiérarchiser les facteurs de contrôle principaux de la diversité et du fonctionnement microbien planctonique dans la rade de Toulon.

Tous les échantillons (biofilms, sédiments, colonne d'eau) ont été récupérés et traités, mais la plupart des analyses prévues sont en cours ou pas encore effectuées. Néanmoins, les premiers résultats concernant l'analyse métabolomique vont être présentés très succinctement ici. A la suite de l'analyse LC-(+)-ESI-MS non ciblée puis l'utilisation du logiciel MZmine et des

différentes filtrations, une matrice de 1610 variables m/z a été obtenue. Cette matrice a permis de générer une ACP (Figure VII.2.A.) et une PLS-DA (Figure VII.2.B.) permettant une bonne séparation, toutes les deux, des trois groupes d'échantillons (biofilms, eau, sédiments).

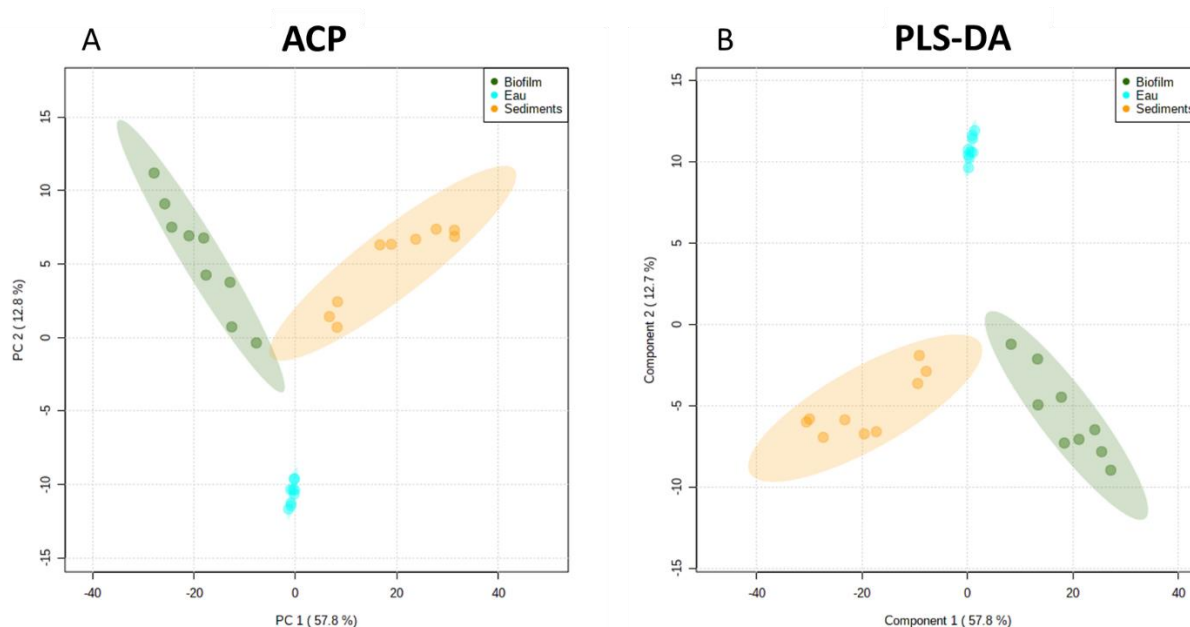


Figure VII.2. : Score plots de **A)** ACP et **B)** PLS-DA obtenus à partir des données LC-MS d'échantillons formés *in situ* aux 3 différents sites de prélèvements

Par la suite, la création d'un réseau via GNPS a permis l'identification d'une soixantaine de molécules réparties dans plusieurs familles de molécules (lipides, peptides). La plupart des molécules identifiées sont présentes au sein des biofilms, la base de données interne au laboratoire enrichie au fur et à mesure de la thèse a permis l'annotation rapide de métabolites présents dans les biofilms. A noter également que chaque cluster regroupe des métabolites présents essentiellement dans un des trois types d'échantillons (Figure VII.3.).

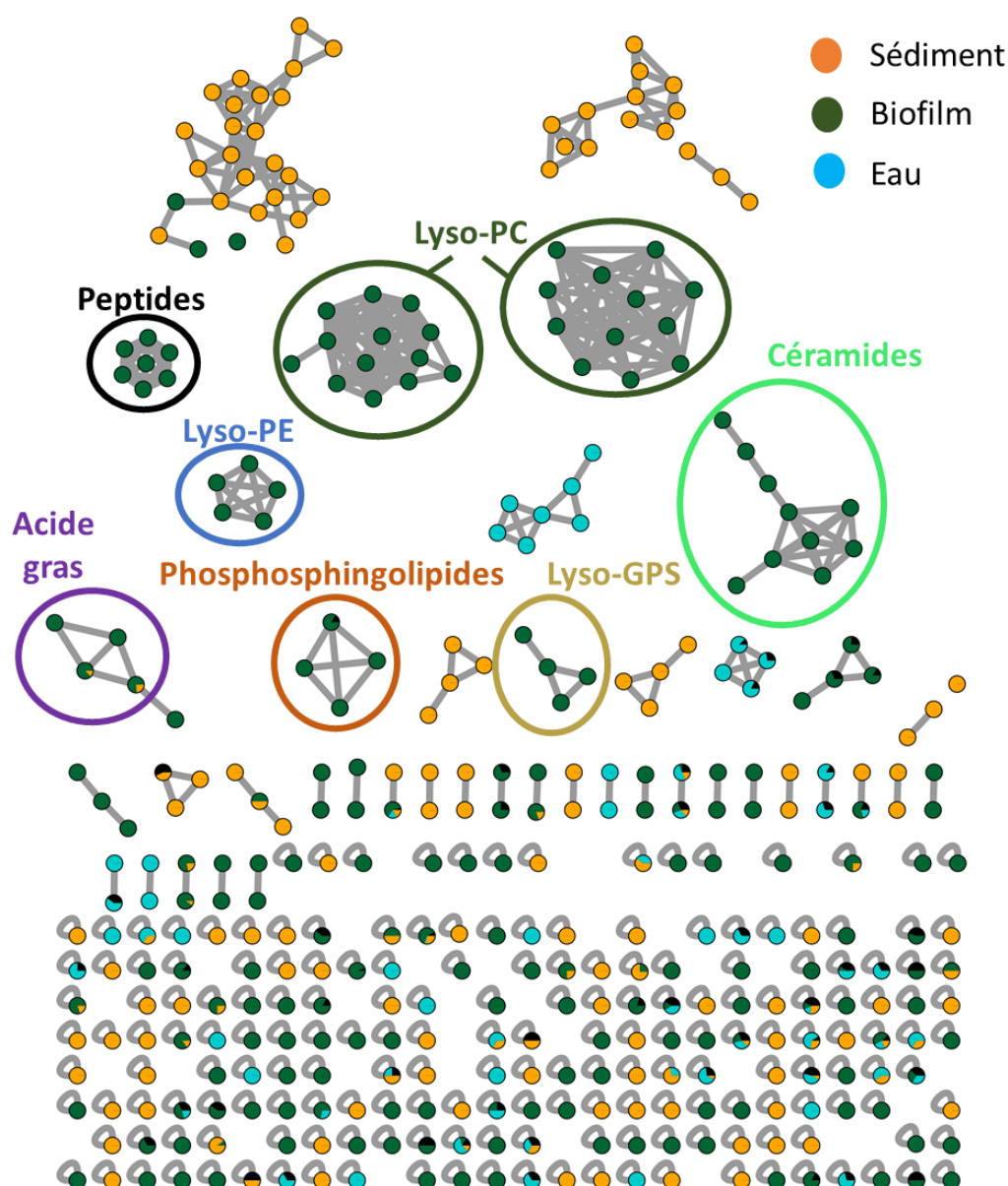


Figure VII.3. : Réseau moléculaire réalisé sur la plateforme GNPS regroupant les métabolites présents dans les trois types d'échantillons (biofilms, sédiments, eau). (PE : Phosphatidyléthanolamine ; PC : Phosphatidylcholine ; GPS : glycéro-phosphoserine)

Dans la continuité des travaux de thèse réalisés, une question serait d'évaluer l'influence de l'environnement, donc des trois sites, sur la formation de biofilms marins *in situ* d'un point de vue du métabolome. Pour cela une ACP (Figure VII.4.A.) et une PLS-DA (Figure VII.4.B.) sont générées afin de discriminer les échantillons de biofilms en fonction du site. Les trois groupes d'échantillons ne sont pas séparés sur l'ACP mais on obtient une bonne séparation entre les groupes grâce à une analyse supervisée (PLS-DA). En effet, les échantillons formés sur le site de Suffren sont séparés des autres sur la composante 1 et les échantillons de Cannier et du Lazaret sont séparés sur la composante 2. Les 15 variables les plus discriminantes entre

ces trois groupes (VIPs) sont répertoriées dans le tableau VII.3. Parmi ces VIPs, les lipides sont fortement présents sur les sites de Cannier et du Lazaret en comparaison avec le site de Suffren.

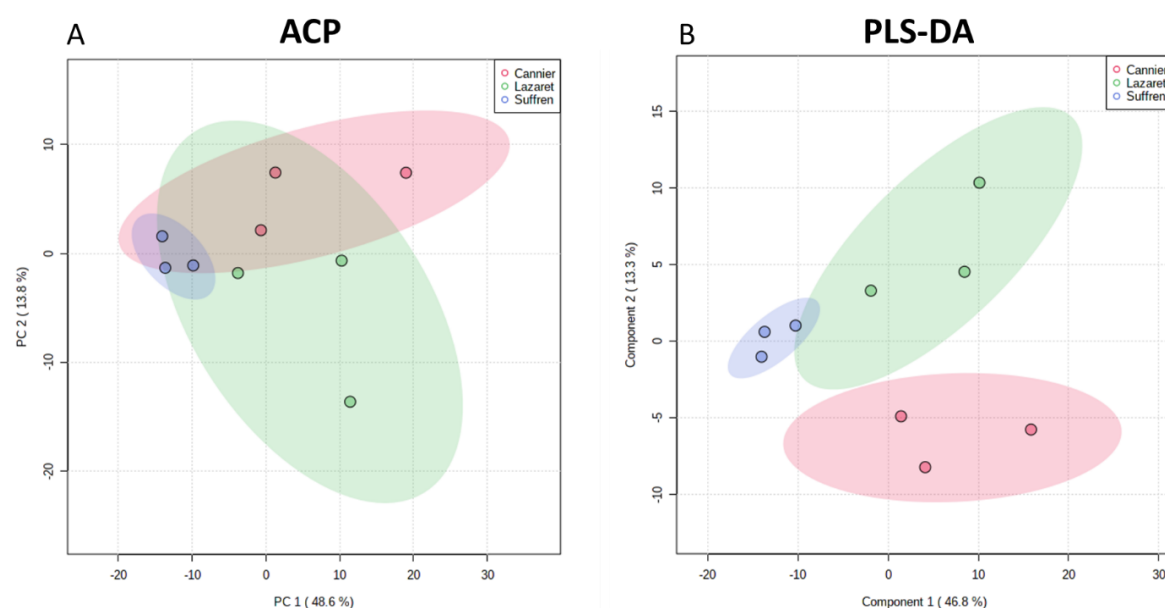


Figure VII.4. : Score plots de A) ACP et B) PLS-DA obtenus à partir des données LC-MS d'échantillons formés *in situ* aux 3 différents sites de prélèvements

Les premiers résultats obtenus grâce à l'analyse métabolomique montrent dans un premier temps une différence au niveau du type d'échantillons mais également une réelle différence entre les biofilms formés sur les différents sites. Pour conclure sur ce projet en cours, la perspective la plus importante, d'un point de vue méthodologique, est l'exploitation des données de métabolomique et de métaprotéomique afin de réaliser une analyse multi-omiques liant trois jeux de données omiques au niveau des biofilms formés *in situ*.

Conclusion générale & Perspectives

VIP N°	m/z	RT (min)	Score VIP	Formule moléculaire	Ions fragments MS/MS (abondance relative en %)	Annotation putative	Heatmap		
							Can	Laz	Suf
1	508,376	9,87	3,53	C ₂₈ H ₅₂ NO ₈ P ⁺	184,0733 [C ₃ H ₁₂ NO ₂ P] (14) ; 104,1071 [C ₃ H ₁₂ NO] (100) ; 86,0965 [C ₃ H ₁₂ N] (7)	Lyso-PC(P-18:0)			
2	615,4864	11,04	3,513	C ₃₄ H ₆₈ N ₂ O ₃ P ⁺	490,4620 [C ₂₃ H ₄₀ NO ₂] (100) ; 472,4515 [C ₂₃ H ₃₈ NO] (65) ; 280,2639 [C ₁₈ H ₃₄ NO] (1) ; 262,2530 [C ₁₈ H ₃₂ N] (58) ; 126,0317 [C ₃ H ₆ NO ₂ P] (4)	Phosphosphingolipid (d14:1/18:1)			
3	336,2537	7,61	3,27	C ₂₀ H ₃₂ NO ₃ ⁺	nf.				
4	508,4725	11,83	3,26	C ₃₂ H ₆₂ NO ₃ ⁺	228,2323 [C ₁₄ H ₃₀ NO] (3) ; 280,2633 [C ₁₈ H ₃₄ NO] (23) ; 262,2528 [C ₁₈ H ₃₂ N] (100) ; 250,2528 [C ₁₇ H ₃₂ N] (9)	Cer(d18:2/14:0)			
5	510,3918	10,39	3,04	C ₂₈ H ₅₂ NO ₈ P ⁺	240,0994 [C ₉ H ₁₈ NO ₂ P] (1) ; 184,0732 [C ₃ H ₁₂ NO ₂ P] (14) ; 104,1071 [C ₃ H ₁₂ NO] (100) ; 86,0965 [C ₃ H ₁₂ N] (7)	Lyso-PC(O-18:0)			
6	490,4617	11,83	2,99	C ₃₄ H ₆₈ NO ₂ ⁺	228,2322 [C ₁₄ H ₃₀ NO] (3) ; 280,2633 [C ₁₈ H ₃₄ NO] (20) ; 262,2531 [C ₁₈ H ₃₂ N] (100) ; 250,2531 [C ₁₇ H ₃₂ N] (8)	Cer(d18:2/14:0)-H ₂ O			
7	278,2479	7,84	2,8	C ₁₈ H ₃₂ NO ⁺	260,2372 [C ₁₈ H ₃₀ N] (100) ; 203,1797 [C ₁₀ H ₂₁] (3) ; 150,1278 [C ₁₀ H ₁₈ N] (7) ; 133,1011 [C ₁₀ H ₁₃] (5) ; 93,0699 [C ₇ H ₉] (9)	Obscuraminol A			
8	454,3289	9,13	2,71	C ₂₂ H ₄₀ NO ₈ P ⁺	184,0731 [C ₃ H ₁₂ NO ₂ P] (13) ; 104,1071 [C ₃ H ₁₂ NO] (100) ; 86,0965 [C ₅ H ₁₂ N] (10)	Lyso-PC(O-14:0)			
9	458,3825	9,15	2,68	C ₂₈ H ₅₂ NO ₅ ⁺	nf.				
10	496,3398	9,52	2,67	C ₂₄ H ₄₂ NO ₇ P ⁺	313,2732 [C ₁₀ H ₁₇ O ₃] (5) ; 258,1099 [C ₈ H ₁₅ NO ₄ P] (4) ; 184,0732 [C ₃ H ₁₂ NO ₂ P] (90) ; 104,1071 [C ₃ H ₁₂ NO] (100) ; 86,0965 [C ₃ H ₁₂ N] (11)	Lyso-PC(16:0)			
11	398,3992	10	2,6	C ₂₃ H ₃₂ NO ₂ ⁺	nf.				
12	552,4024	10,21	2,6	C ₂₈ H ₅₀ NO ₈ P ⁺	369,337 [C ₂₁ H ₄₀ O ₃] (1) ; 258,1103 [C ₈ H ₁₅ NO ₄ P] (4) ; 184,0733 [C ₃ H ₁₂ NO ₂ P] (100) ; 104,1072 [C ₃ H ₁₂ NO] (61) ; 86,0965 [C ₅ H ₁₂ N] (5)	Lyso-PC(20:0)			
13	547,2694	11,8	2,56	C ₁₃ H ₂₀ O ₇ ⁺	nf.				
14	526,3135	10,39	2,56	C ₂₄ H ₄₀ NO ₉ P ⁺	341,3048 [C ₂₁ H ₄₄ O ₃] (100) ; 267,2685 [C ₁₈ H ₃₀ O] (5) ; 155,0103 [C ₃ H ₆ O ₂ P] (14) ; 106,0501 [C ₃ H ₆ NO ₂] (15) ; 88,0394 [C ₃ H ₆ NO ₂] (39)	Lyso-PS(18:0)			
15	506,457	11,65	2,52	C ₃₂ H ₆₀ NO ₃ ⁺	228,2323 [C ₁₄ H ₃₀ NO] (16) ; 278,2481 [C ₁₈ H ₃₂ NO] (21) ; 260,2373 [C ₁₈ H ₃₀ N] (100) ; 248,2371 [C ₁₇ H ₃₀ N] (3)	Cer(d18:3/14:0)			

Tableau VII.3. : Liste des 15 métabolites possédant le VIP score le plus important ainsi qu'une proposition de leur identification et une heatmap (rouge : fortement présent ; orange : moyennement présent ; bleu : peu présent)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abatis, D., Vagias, C., Galanakis, D., Norris, J. N., Moreau, D., Roussakis, C., & Roussis, V. (2005). Atomarianones A and B: two cytotoxic meroditerpenes from the brown alga *Taonia atomaria*. *Tetrahedron Letters*, 46(49), 8525–8529. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.10.007>
- Abida, W., Cyrt, J., Heller, G., Prandi, D., Armenia, J., Coleman, I., et al. (2019). Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(23), 11428–11436. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902651116>
- Abnave, P., Mottola, G., Gimenez, G., Boucherit, N., Trouplin, V., Torre, C., et al. (2014). Screening in planarians identifies MORN2 as a key component in LC3-associated phagocytosis and resistance to bacterial infection. *Cell Host & Microbe*, 16(3), 338–350. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.08.002>
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., et al. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), 537–544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., San Martín-Úriz, P., & Amils, R. (2008). Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 1079–1088. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1390-9>
- Alcover, C. F., Bernadat, G., Kabran, F. A., Le Pogam, P., Leblanc, K., Fox Ramos, A. E., et al. (2020). Molecular Networking Reveals Serpentinine-Related Bisindole Alkaloids from *Picralima nitida*, a Previously Well-Investigated Species. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1207–1216. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01247>
- Alghamdi, S., & Cordova, R. A. Q. (2019). The impact of biofouling on marine environment : a qualitative review of the current antifouling technologies. *World Maritime University Dissertations*. https://commons.wmu.se/all_dissertations/1201
- Allan, V. J. M., Callow, M. E., Macaskie, L. E., & Paterson-Beedle, M. (2002). Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 1), 277–288. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-277>
- Allard, P.-M., Genta-Jouve, G., & Wolfender, J.-L. (2017). Deep metabolome annotation in natural products research: towards a virtuous cycle in metabolite identification. *Current Opinion in Chemical Biology*, 36, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.12.022>
- Almeida, E., Diamantino, T. C., & de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59(1), 2–20. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2007.01.017>
- Alzieu, C. L., Sanjuan, J., Deltreil, J. P., & Borel, M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin*, 17(11), 494–498. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(86\)90636-3](https://doi.org/10.1016/0025-326X(86)90636-3)
- Alzieu, C., Thibaud, Y., Heral, M., & Boutier, B. (1980). Evaluation des Risques dus a l'emploi des Peintures Anti-Salissures Dansales Zones Conchylicoles. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 44(4), 305–348. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1905/>. Accessed 16 June 2018
- Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S., & Mayol, L. (1977). (-)-(R)-1-O-Geranylgeranylglycerol from the brown alga *Dilophus fasciola*. *Experientia*, 33(8), 989–990. <https://doi.org/10.1007/BF01945922>
- Amico, V., Oriente, G., Piattelli, M., Tringali, C., Fattorusso, E., Magno, S., & Mayol, L. (1979). Sesquiterpenes based on the cadalane skeleton from the brown alga *Dilophus fasciola*. *Experientia*, 35(4), 450–451. <https://doi.org/10.1007/BF01922698>

- Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, N., et al. (2012). The Magnitude of Global Marine Species Diversity. *Current Biology*, 22(23), 2189–2202. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.036>
- Areche, C., San-Martín, A., Rovirosa, J., Muñoz, M. A., Hernández-Barragán, A., Bucio, M. A., & Joseph-Nathan, P. (2010). Stereostructure Reassignment and Absolute Configuration of Isoepitaondiol, a Meroditerpenoid from *Stypopodium flabelliforme*. *Journal of Natural Products*, 73(1), 79–82. <https://doi.org/10.1021/np900553p>
- Aron, A. T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L.-F., Nothias-Esposito, M., Bouslimani, A., et al. (2020). Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols*, 15(6), 1954–1991. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>
- Aruldass, C. A., Masalamany, S. R. L., Venil, C. K., & Ahmad, W. A. (2018). Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against Staphylococcus aureus and methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(6), 5164–5180. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8855-2>
- August, P. R., Grossman, T. H., Minor, C., Draper, M. P., MacNeil, I. A., Pemberton, J. M., et al. (2000). Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2(4), 513–519.
- Ayé, A., Bonnin-Jusserand, M., Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Culioli, G., Koffi Nevry, R., et al. (2015). Modulation of violacein production and phenotypes associated with biofilm by exogenous quorum sensing N-acylhomoserine lactones in the marine bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* TC14. *Microbiology*, 161(10), 2039–2051. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000147>
- Baidoo, E. E. K., & Teixeira Benites, V. (2019). Mass Spectrometry-Based Microbial Metabolomics: Techniques, Analysis, and Applications. *Microbial Metabolomics: Methods and Protocols*, 11–16. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8757-3_2
- Balakrishnan, D., Kandasamy, D., & Nithyanand, P. (2014). A review on Antioxidant activity of marine organisms. *International Journal of ChemTech Research*, 6, 974–4290.
- Balibar, C. J., & Walsh, C. T. (2006). In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from *Chromobacterium violaceum*. *Biochemistry*, 45(51), 15444–15457. <https://doi.org/10.1021/bi061998z>
- Ballestriero, F., Daim, M., Penesyan, A., Nappi, J., Schleheck, D., Bazzicalupo, P., et al. (2014). Antinematode Activity of Violacein and the Role of the Insulin/IGF-1 Pathway in Controlling Violacein Sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE*, 9(10), e109201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109201>
- Barbier Saint-Hilaire, P. B. S. (2019). *Utilisation de la métabolomique pour l'étude de l'encéphalopathie hépatique et développement de nouvelles approches pour l'acquisition de données par spectrométrie de masse* (phdthesis). Université Paris-Saclay. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02435982>
- Barbosa, L. C., Goulart, C. L., Avellar, M. M., Bisch, P. M., & von Kruger, W. M. A. Y. 2018. (2018). Accumulation of ornithine lipids in *Vibrio cholerae* under phosphate deprivation is dependent on VC0489 (OlsF) and PhoBR system. *Microbiology*, 164(3), 395–399. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000607>
- Barraud, N., Moscoso, J. A., Ghigo, J.-M., & Filloux, A. (2014). Methods for Studying Biofilm Dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas Methods and Protocols*, 643–651. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_49
- Batista, J. H., & da Silva Neto, J. F. (2017). *Chromobacterium violaceum* Pathogenicity: Updates and Insights from Genome Sequencing of Novel Chromobacterium Species. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02213>

- Battin, T. J., Besemer, K., Bengtsson, M. M., Romani, A. M., & Packmann, A. I. (2016). The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 251–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>
- Battin, T. J., Wille, A., Sattler, B., & Psenner, R. (2001). Phylogenetic and Functional Heterogeneity of Sediment Biofilms along Environmental Gradients in a Glacial Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 799–807. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.799-807.2001>
- Bauermeister, A., Pereira, F., Grilo, I. R., Godinho, C. C., Paulino, M., Almeida, V., et al. (2019). Intra-clade metabolomic profiling of MAR4 *Streptomyces* from the Macaronesia Atlantic region reveals a source of anti-biofilm metabolites. *Environmental Microbiology*, 21(3), 1099–1112. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14529>
- Beale, D. J., Karpe, A. V., & Ahmed, W. (2016). Beyond Metabolomics: A Review of Multi-Omics-Based Approaches. In D. J. Beale, K. A. Kouremenos, & E. A. Palombo (Eds.), *Microbial Metabolomics: Applications in Clinical, Environmental, and Industrial Microbiology*, 289–312. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46326-1_10
- Belando, M. D., Marín, A., Aboal, M., García-Fernández, A. J., & Marín-Guirao, L. (2017). Combined in situ effects of metals and nutrients on marine biofilms: Shifts in the diatom assemblage structure and biological traits. *Science of The Total Environment*, 574, 381–389. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.197>
- Bellou, N., Papathanassiou, E., Dobretsov, S., Lykousis, V., & Colijn, F. (2012). The effect of substratum type, orientation and depth on the development of bacterial deep-sea biofilm communities grown on artificial substrata deployed in the Eastern Mediterranean. *Biofouling*, 28(2), 199–213. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.662675>
- Benning, C., Huang, Z. H., & Gage, D. A. (1995). Accumulation of a Novel Glycolipid and a Betaine Lipid in Cells of *Rhodobacter sphaeroides* Grown under Phosphate Limitation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 317(1), 103–111. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1141>
- Bergonzi, C., Schwab, M., & Elias, M. (2016). The quorum-quenching lactonase from *Geobacillus caldxylosilyticus*: purification, characterization, crystallization and crystallographic analysis. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications*, 72(Pt 9), 681–686. <https://doi.org/10.1107/S2053230X16011821>
- Bergonzi, C., Schwab, M., Naik, T., Daudé, D., Chabrière, E., & Elias, M. (2018). Structural and Biochemical Characterization of AaL, a Quorum Quenching Lactonase with Unusual Kinetic Properties. *Scientific Reports*, 8(1), 11262. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28988-5>
- Bergonzi, C., Schwab, M., Naik, T., & Elias, M. (2019). The structural determinants accounting for the broad substrate specificity of the quorum quenching lactonase GcL. *ChemBioChem*, 20(14), 1848–1855. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900024>
- Bidanel, J. P., Boichard, D., & Chevalet, C. (2008). De la génétique à la génomique. *INRAE Productions Animales*, 21(1), 15–32. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2008.21.1.3372>
- Birchenough, A. C., Barnes, N., Evans, S. M., Hinz, H., Krönke, I., & Moss, C. (2002). A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods. *Marine Pollution Bulletin*, 44(6), 534–543. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(01\)00275-2](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(01)00275-2)
- Bitter, T., & Muir, H. M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4(4), 330–334. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(62\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90095-7)
- Blosser, R. S., & Gray, K. M. (2000). Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of Microbiological Methods*, 40(1), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00136-0)
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1)

- Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(3), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s002039900127>
- Bouslimani, A., Sanchez, L. M., Garg, N., & Dorrestein, P. C. (2014). Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Natural Product Reports*, 31(6), 718–729. <https://doi.org/10.1039/C4NP00044G>
- Bowman, J. P. (2007). Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *pseudoalteromonas*. *Marine Drugs*, 5(4), 220–241. <https://doi.org/10.3390/md504220>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brading, M. G., Boyle, J., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Biofilm formation in laminar flow using *Pseudomonas fluorescens* EX101. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4), 297–304. <https://doi.org/10.1007/BF01569983>
- Bramhachari, P. V., & Dubey, S. K. (2006). Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. *Letters in Applied Microbiology*, 43(5), 571–577. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01967.x>
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular Microbiology*, 59(4), 1229–1238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05020.x>
- Brazilian National Genome Project Consortium. (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11660–11665. <https://doi.org/10.1073/pnas.1832124100>
- Bressy, C., & Lejars, M. (2014). Marine Fouling : An Overview. *Journal of Ocean Technology*, 9, 19–28.
- Briand, J.-F., Barani, A., Garnier, C., Réhel, K., Urvois, F., LePoupon, C., et al. (2017). Spatio-temporal variations of marine biofilm communities colonizing artificial substrata including antifouling coatings in contrasted french coastal environments. *Microbial Ecology*, 74(3), 585–598. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0966-2>
- Briand, J.-F., Djeridi, I., Jamet, D., Coupé, S., Bressy, C., Molmeret, M., et al. (2012). Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites. *Biofouling*, 28(5), 453–463. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.688957>
- Briand, J.-F., Pochon, X., Wood, S. A., Bressy, C., Garnier, C., Réhel, K., et al. (2018). Metabarcoding and metabolomics offer complementarity in deciphering marine eukaryotic biofouling community shifts. *Biofouling*, 34(6), 657–672. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1480757>
- Brian-Jaisson, F. (2014). *Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines* (These de doctorat). Toulon. Retrieved from <https://www.theses.fr/2014TOUL0003>
- Brian-Jaisson, F., Molmeret, M., Fahs, A., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Blache, Y., et al. (2016). Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances produced by the marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ulvae* strain TC14. *Biofouling*, 32(5), 547–560. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1164845>
- Brian-Jaisson, F., Ortalo-Magné, A., Guentas-Dombrowsky, L., Armougom, F., Blache, Y., & Molmeret, M. (2014). Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. *Microbial Ecology*, 68(1), 94–110. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0342-9>

- Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., & Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods*, 82(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.006>
- Broadhurst, D., Goodacre, R., Reinke, S. N., Kuligowski, J., Wilson, I. D., Lewis, M. R., & Dunn, W. B. (2018). Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*, 14(6), 72. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1367-3>
- Buedenbender, L., Astone, F. A., & Tasdemir, D. (2020). Bioactive molecular networking for mapping the antimicrobial constituents of the baltic brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Drugs*, 18(6), 311. <https://doi.org/10.3390/md18060311>
- Bunet, R. (2020). Biofouling et antifouling biologique (pp. 293–312).
- Caccamo, M. T., Gugliandolo, C., Zammuto, V., & Magazù, S. (2020). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.163>
- Callow, M. E. (1986). Chapter 1 A world-wide survey of slime formation on anti-fouling paints. In L. V. Evans & K. D. Hoagland (Eds.), *Studies in Environmental Science* (Vol. 28, pp. 1–20). [https://doi.org/10.1016/S0166-1116\(08\)72167-8](https://doi.org/10.1016/S0166-1116(08)72167-8)
- Camps, M., Briand, J.-F., Guentas-Dombrowsky, L., Culioli, G., Bazire, A., & Blache, Y. (2011). Antifouling activity of commercial biocides vs. natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. *Marine Pollution Bulletin*, 62(5), 1032–1040. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.031>
- Canelas, A. B., ten Pierick, A., Ras, C., Seifar, R. M., van Dam, J. C., van Gulik, W. M., & Heijnen, J. J. (2009). Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Analytical Chemistry*, 81(17), 7379–7389. <https://doi.org/10.1021/ac900999t>
- Carepo, M. S. P., Azevedo, J. S. N. de, Porto, J. I. R., Bentes-Sousa, A. R., Batista, J. da S., Silva, A. L. C. da, & Schneider, M. P. C. (2004). Identification of *Chromobacterium violaceum* genes with potential biotechnological application in environmental detoxification. <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/15015>.
- Carini, P., Van Mooy, B. A. S., Thrash, J. C., White, A., Zhao, Y., Campbell, E. O., et al. (2015). SAR11 lipid renovation in response to phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(25), 7767–7772.
- Carriot, N., Paix, B., Greff, S., Viguier, B., Briand, J.-F., & Culioli, G. (2021). Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemical approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms - The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*. *Talanta*, 225, 121925. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121925>
- Carvalho, D. (2018). Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. *Frontiers in Marine Science*, 0. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>
- Castillo-Juárez, I., García-Contreras, R., Velázquez-Guadarrama, N., Soto-Hernández, M., & Martínez-Vázquez, M. (2013). Amphipterygium adstringens anacardic acid mixture inhibits quorum sensing-controlled virulence factors of *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Medical Research*, 44(7), 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.10.004>
- Catão, E. C. P., Pollet, T., Misson, B., Garnier, C., Ghiglione, J.-F., Barry-Martinet, R., et al. (2019). Shear stress as a major driver of marine biofilm communities in the NW Mediterranean Sea. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1768. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01768>
- Celmer, D., Oleszkiewicz, J. A., & Cicek, N. (2008). Impact of shear force on the biofilm structure and performance of a membrane biofilm reactor for tertiary hydrogen-driven denitrification of municipal wastewater. *Water Research*, 42(12), 3057–3065. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.031>

- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J. C., Yu, X., et al. (2017). Neural circuit-specialized astrocytes: transcriptomic, proteomic, morphological, and functional evidence. *Neuron*, 95(3), 531-549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>
- Chaleckis, R., Meister, I., Zhang, P., & Wheelock, C. E. (2019). Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–MS-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 55, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.010>
- Chandramouli, K. H., Dash, S., Zhang, Y., Ravasi, T., & Qian, P.-Y. (2013). Proteomic and metabolomic profiles of marine *Vibrio* sp. 010 in response to an antifoulant challenge. *Biofouling*, 29(7), 789–802. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.805209>
- Chang, H.-Y., Colby, S. M., Du, X., Gomez, J. D., Helf, M. J., Kechris, K., et al. (2021). A Practical Guide to Metabolomics Software Development. *Analytical Chemistry*, 93(4), 1912–1923. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03581>
- Chang, J., He, X., Bai, X., & Yuan, C. (2020). The impact of hydrodynamic shear force on adhesion morphology and biofilm conformation of *Bacillus* sp. *Ocean Engineering*, 197, 106860. <https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2019.106860>
- Characklis, W. G., & Wilderer, P. A. (1989). *Structure and Function of Biofilms*.
- Chattopadhyay, M. K. (2014). Use of antibiotics as feed additives: a burning question. *Frontiers in Microbiology*, 5, 334. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00334>
- Chavez-Dozal, A., Soto, W., & Nishiguchi, M. K. (2021). Identification of a transcriptomic network underlying the wrinkly and smooth phenotypes of *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 203(3). <https://doi.org/10.1128/JB.00259-20>
- Chen, M. Y., Lee, D. J., & Tay, J. H. (2007). Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1463–1469. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0617-x>
- Chen, M., Zhang, M., Borlak, J., & Tong, W. (2012). A Decade of Toxicogenomic Research and Its Contribution to Toxicological Science. *Toxicological Sciences*, 130(2), 217–228. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs223>
- Chen, Y.-P., Zhang, P., Guo, J.-S., Fang, F., Gao, X., & Li, C. (2013). Functional groups characteristics of EPS in biofilm growing on different carriers. *Chemosphere*, 92(6), 633–638. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.059>
- Cheng, W.-J., Zhou, J.-W., Zhang, P.-P., Luo, H.-Z., Tang, S., Li, J.-J., et al. (2020). Quorum sensing inhibition and tobramycin acceleration in *Chromobacterium violaceum* by two natural cinnamic acid derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 5025–5037. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10593-0>
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y., & VanderGheynst, J. S. (2011). Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. *Lipids*, 46(1), 95–103. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3494-0>
- Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., & Thomson, B. A. (2001). An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36(8), 849–865. <https://doi.org/10.1002/jms.207>
- Chessa, J. P., Petrescu, I., Bentahir, M., Van Beeumen, J., & Gerday, C. (2000). Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolated from a psychrophilic *Pseudomonas* species. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1479(1–2), 265–274. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00018-2](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00018-2)
- Chiu, J. M. Y., Thiagarajan, V., Tsoi, M. M. Y., & Qian, P. Y. (2005). Qualitative and quantitative changes in marine biofilms as a function of temperature and salinity in summer and winter. *Biofilms*, 2(3), 183–195. <https://doi.org/10.1017/S147905050500195X>

- Choi, S. Y., Lim, S., Cho, G., Kwon, J., Mun, W., Im, H., & Mitchell, R. J. (2020). *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. *Environmental Microbiology*, 22(2), 705–713. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14888>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., et al. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486–W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>
- Chong, J., Wishart, D. S., & Xia, J. (2019). Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 68(1), e86. <https://doi.org/10.1002/cpbi.86>
- Coclet, C. (2019). *Impacts de la contamination multiple en éléments traces métalliques sur les communautés microbiennes dans un environnement côtier fortement anthropisé : la rade de Toulon* (phdthesis). Université de Toulon. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02494822>
- Coclet, C., Garnier, C., D’Onofrio, S., Durrieu, G., Pasero, E., Le Poupon, C., et al. (2021). Trace metal contamination impacts predicted functions more than structure of marine prokaryotic biofilm communities in an anthropized coastal area. *Frontiers in Microbiology*, 12, 292. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.589948>
- Compere, C. (1999). Biofilms en milieu marin. *Techniques sciences méthodes*, (11), 48–54. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1698/>.
- Costello, M. J., Bouchet, P., Boxshall, G., Fauchald, K., Gordon, D., Hoeksema, B. W., et al. (2013). Global coordination and standardisation in marine biodiversity through the world register of marine species (WoRMS) and related databases. *PLOS ONE*, 8(1), e51629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051629>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Costerton, J. William, Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Courant, F., Antignac, J.-P., Dervilly-Pinel, G., & Bizec, B. L. (2014). Basics of mass spectrometry based metabolomics. *Proteomics*, 14(21–22), 2369–2388. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400255>
- Cristobal, M. S., Sanchez, M.-P., Mercat, M.-J., Rohart, F., Liaubet, L., Tribout, T., et al. (2014). Des profils métabolomiques pour faire de la prédiction de phénotypes chez le porc en croissance.
- Crüsemann, M., O’Neill, E. C., Larson, C. B., Melnik, A. V., Floros, D. J., da Silva, R. R., et al. (2017). Prioritizing natural product diversity in a collection of 146 bacterial strains based on growth and extraction protocols. *Journal of Natural Products*, 80(3), 588–597. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00722>
- Czaczyk, & Myszk. (2007). Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and Its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(6), 799–806. <http://www.pjoes.com/Biosynthesis-of-Extracellular-Polymeric-Substances-r-n-EPS-and-Its-Role-in-Microbial,88051,0,2.html>.
- da Costa, E., Azevedo, V., Melo, T., Rego, A. M., V Evtuguin, D., Domingues, P., et al. (2018). High-resolution lipidomics of the early life stages of the red seaweed *Porphyra dioica*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010187>
- da Silva, R. R., Dorrestein, P. C., & Quinn, R. A. (2015). Illuminating the dark matter in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), 12549–12550. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516878112>

- Dahlbäck, B., Hermansson, M., Kjelleberg, S., & Norkrans, B. (1981). The hydrophobicity of bacteria — An important factor in their initial adhesion at the air-water interface. *Archives of Microbiology*, 128(3), 267–270. <https://doi.org/10.1007/BF00422527>
- Dahms, H. U., & Dobretsov, S. (2017). Antifouling compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 15(9), 265. <https://doi.org/10.3390/md15090265>
- Dang, H., Li, T., Chen, M., & Huang, G. (2008). Cross-ocean distribution of rhodobacterales bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 52–60. <https://doi.org/10.1128/AEM.01400-07>
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2000). Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 467–475. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.467-475.2000>
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2002). Seasonal dynamics of particle-associated and free-living marine Proteobacteria in a salt marsh tidal creek as determined using fluorescence in situ hybridization. *Environmental Microbiology*, 4(5), 287–295. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00295.x>
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 91–138. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00037-15>
- Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., & Das, S. (2013). Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 561–571. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4584-0>
- de Carvalho, C. C. C. R. (2007). Biofilms: recent developments on an old battle. *Recent Patents on Biotechnology*, 1(1), 49–57. <https://doi.org/10.2174/187220807779813965>
- de Carvalho, C. C. C. R. (2018). Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers in Marine Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00126>
- de Carvalho, C. C. C. R., & Fernandes, P. (2010). Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs*, 8(3), 705–727. <https://doi.org/10.3390/md8030705>
- de Koning, W., & van Dam, K. (1992). A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 204(1), 118–123.
- De Rosa, S., De Giulio, A., Iodice, C., & Zavodink, N. (1994). Sesquiterpenes from the brown alga *Taonia atomaria*. *Phytochemistry*, 37(5), 1327–1330. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90407-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90407-2)
- De Tender, C., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Vangeyte, J., Cattrijsse, A., et al. (2017). Temporal dynamics of bacterial and fungal colonization on plastic debris in the North sea. *Environmental Science & Technology*, 51(13), 7350–7360. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00697>
- Decho, A. W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20(10), 1257–1273. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(00\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(00)00022-4)
- Decho, A. W., Frey, R. L., & Ferry, J. L. (2011). Chemical challenges to bacterial AHL signaling in the environment. *Chemical Reviews*, 111(1), 86–99. <https://doi.org/10.1021/cr100311q>
- Decho, A. W., & Gutierrez, T. (2017). Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00922>
- DeFeo, E. M., Wu, C.-L., McDougal, W. S., & Cheng, L. L. (2011). A decade in prostate cancer: from NMR to metabolomics. *Nature Reviews Urology*, 8(6), 301–311. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.53>
- Delille, A. (2018). *Etude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de Pseudomonas fluorescens et de sa réponse aux variations de la quantité*

de carbone organique dissous : application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution (phdthesis). Université Henri Poincaré - Nancy 1. Retrieved from <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748269>

- Delille, A., Quilès, F., & Humbert, F. (2007). In Situ monitoring of the nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5782–5788. <https://doi.org/10.1128/AEM.00838-07>
- Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U., & Wingender, J. (2007). Chemical and physical methods for characterisation of biofilms. *Microchimica Acta*, 158(1), 1–27. <https://doi.org/10.1007/s00604-006-0688-5>
- Der Agopian, R. G., Fabi, J. P., & Cordenunsi-Lysenko, B. R. (2020). Metabolome and proteome of ethylene-treated papayas reveal different pathways to volatile compounds biosynthesis. *Food Research International*, 131, 108975. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108975>
- Derlon, N., Massé, A., Escudié, R., Bernet, N., & Paul, E. (2008). Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Research*, 42(8), 2102–2110. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.016>
- Derraik, J. G. B. (2002). The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 842–852. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00220-5)
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M. N., Tompkins, R. G., & Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5), 1339–1344. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307694100>
- Dharmaraj, D., Krishnamoorthy, M., Rajendran, K., Karuppiiah, K., Jeyaraman, R., & Ethiraj, K. (2021). Protein leakage induced marine antibiofouling activity of biosynthesized zinc oxide nanoparticles. *Journal of Cluster Science*, 32(3), 643–650. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01827-2>
- Diercks, H., Semeniuk, A., Gisch, N., Moll, H., Duda, K. A., & Hölzl, G. (2015). Accumulation of novel glycolipids and ornithine lipids in mesorhizobium loti under phosphate deprivation. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 497–509. <https://doi.org/10.1128/JB.02004-14>
- Ding, C. Y. G., Pang, L. M., Liang, Z.-X., Goh, K. K. K., Glukhov, E., Gerwick, W. H., & Tan, L. T. (2018). MS/MS-based molecular networking approach for the detection of aplysiatoxin-related compounds in Environmental Marine Cyanobacteria. *Marine Drugs*, 16(12). <https://doi.org/10.3390/md16120505>
- Dittami, S. M., Eveillard, D., & Tonon, T. (2014). A metabolic approach to study algal–bacterial interactions in changing environments. *Molecular Ecology*, 23(7), 1656–1660. <https://doi.org/10.1111/mec.12670>
- Dobretsov, S., Abed, R. M. M., & Voolstra, C. R. (2013). The effect of surface colour on the formation of marine micro and macrofouling communities. *Biofouling*, 29(6), 617–627. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.784279>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Douarche, C., Bailleux, V., Even, C., Allain, J.-M., Regeard, C., & Raspaud, É. (2018). La mécanique des biofilms à la surface de liquides. *Reflets de la physique*, (56), 20–24. <https://doi.org/10.1051/refdp/201856020>
- Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 18(8), 499–499. <https://doi.org/10.1021/i560156a015>
- D'Souza, F., Bruin, A., Biersteker, R., Donnelly, G., Klijnstra, J., Rentrop, C., & Willemsen, P. (2010). Bacterial assay for the rapid assessment of antifouling and fouling release properties of coatings and

- materials. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 363–370. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0681-1>
- Dubois, Michel., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, Fred. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., et al. (2019). SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature Methods*, 16(4), 299–302. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0344-8>
- Duncan, K. R., Crüsemann, M., Lechner, A., Sarkar, A., Li, J., Ziemert, N., et al. (2015). Molecular networking and pattern-based genome mining improves discovery of biosynthetic gene clusters and their products from *salinispora* species. *Chemistry & Biology*, 22(4), 460–471. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.03.010>
- Dunn, W. B., Erban, A., Weber, R. J. M., Creek, D. J., Brown, M., Breitling, R., et al. (2013). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 9(1), 44–66. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0434-4>
- Duportet, X., Aggio, R. B. M., Carneiro, S., & Villas-Bôas, S. G. (2012). The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics*, 8(3), 410–421. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0324-1>
- Durán, N., Justo, G. Z., Durán, M., Brocchi, M., Cordi, L., Tasic, L., et al. (2016). Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. *Biotechnology Advances*, 34(5), 1030–1045. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>
- Durán, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., & Martins, D. (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 3, 127–133. <https://eurekamag.com/research/034/206/034206627.php>
- Durán, N., & Menck, C. F. M. (2001). *Chromobacterium violaceum*: A review of pharmacological and industrial perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 27(3), 201–222. <https://doi.org/10.1080/20014091096747>
- Dürr, S., & Thomason, J. C. (2009). *Biofouling*. John Wiley & Sons.
- Dusane, D. H., Nancharaiyah, Y. V., Zinjarde, S. S., & Venugopalan, V. P. (2010). Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.013>
- Dyrman, S. T., Ammerman, J. W., & Van Mooy, B. A. S. (2007). Microbes and the marine phosphorus cycle. *Oceanography*, 20(2), 110–116. <https://www.jstor.org/stable/24860049>
- Eichhorn, P., Pérez, S., & Barceló, D. (2012). Chapter 5 - Time-of-flight mass spectrometry versus orbitrap-based mass spectrometry for the screening and identification of drugs and metabolites: Is there a winner?, *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 58, pp. 217–272). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53810-9.00009-2>
- Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Mandrich, L., Porzio, E., Moniot, S., et al. (2008). Structural basis for natural lactonase and promiscuous phosphotriesterase activities. *Journal of Molecular Biology*, 379(5), 1017–1028. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.022>
- Euzen, A., Gaill, Françoise, Lacroix, D., & Cury, O. (2017). *The Ocean revealed*.
- Evans, K. C., Benomar, S., Camuy-Vélez, L. A., Nasser, E. B., Wang, X., Neuenswander, B., & Chandler, J. R. (2018). Quorum-sensing control of antibiotic resistance stabilizes cooperation in *Chromobacterium violaceum*. *The ISME Journal*, 12(5), 1263–1272. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0047-7>

- Fadhlaoui, M., Laderriere, V., Lavoie, I., & Fortin, C. (2020). Influence of temperature and nickel on algal biofilm fatty acid composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(8), 1566–1577. <https://doi.org/10.1002/etc.4741>
- Fattorusso, E., Magno, S., Mayol, L., Santacroce, C., Sica, D., Amico, V., et al. (1976). Dictyol A and B, two novel diterpene alcohols from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 0(14), 575–576. <https://doi.org/10.1039/C39760000575>
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Greff, S., Pérez, T., Thomas, O. P., Martin, J.-C., & Culioli, G. (2017). Discrimination of four marine biofilm-forming bacteria by LC-MS metabolomics and influence of culture parameters. *Journal of Proteome Research*, 16(5), 1962–1975. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b01027>
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Kerloch, L., Pichereaux, C., Misson, B., Briand, J.-F., et al. (2019). Metabolomic and proteomic changes induced by growth inhibitory concentrations of copper in the biofilm-forming marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica*. *Metallomics*, 11(11), 1887–1899. <https://doi.org/10.1039/c9mt00184k>
- Favre, L., Ortalo-Magné, A., Pichereaux, C., Gargaros, A., Burlet-Schiltz, O., Cotellet, V., & Culioli, G. (2018). Metabolome and proteome changes between biofilm and planktonic phenotypes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas lipolytica* TC8. *Biofouling*, 34(2), 132–148. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1413551>
- Federle, M. J., & Bassler, B. L. (2003). Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1291–1299. <https://doi.org/10.1172/JCI20195>
- Felz, S., Vermeulen, P., van Loosdrecht, M. C. M., & Lin, Y. M. (2019). Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*, 157, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.03.068>
- Fernandes, J. A., Santos, L., Vance, T., Fileman, T., Smith, D., Bishop, J. D. D., et al. (2016). Costs and benefits to European shipping of ballast-water and hull-fouling treatment: Impacts of native and non-indigenous species. *Marine Policy*, 64, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2015.11.015>
- Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm : mise en place et organisation d’une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences*, 19(1), 77–83. <https://www.erudit.org/en/journals/ms/2003-v19-n1-ms468/000760ar/>
- Fish, K., Osborn, A. M., & Boxall, J. B. (2017). Biofilm structures (EPS and bacterial communities) in drinking water distribution systems are conditioned by hydraulics and influence discoloration. *Science of The Total Environment*, 593–594, 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.176>
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., & de Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling*, 28(7), 649–669. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.700478>
- Flemming, H. C. (1997). Reverse osmosis membrane biofouling. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 14(4), 382–391. [https://doi.org/10.1016/S0894-1777\(96\)00140-9](https://doi.org/10.1016/S0894-1777(96)00140-9)
- Flemming, H. C. (2011). The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- Flemming, H. C. (2016). EPS—Then and now. *Microorganisms*, 4(4), 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>
- Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: The “house of biofilm cells.” *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, Hans-Curt, & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Flemming, H. C. (2002). Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 629–640. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1066-9>
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology*, 43(6), 9–16. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0328>
- Fox Ramos, A. E., Pavesi, C., Litaudon, M., Dumontet, V., Poupon, E., Champy, P., et al. (2019). CANPA: Computer-Assisted Natural Products Anticipation. *Analytical Chemistry*, 91(17), 11247–11252. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02216>
- Frumin, G. T. (2013). Total phosphorus distribution over the Baltic Sea sub-regions. *Russian Journal of General Chemistry*, 83(13), 2647–2650. <https://doi.org/10.1134/S1070363213130094>
- Füller, J. J., Röpke, R., Krausze, J., Rennhack, K. E., Daniel, N. P., Blankenfeldt, W., et al. (2016). Biosynthesis of violacein, structure and function of l-tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(38), 20068–20084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741561>
- Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S., Welch, M., & Spring, D. R. (2012). Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology*, 20(9), 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.06.003>
- Gao, F., McDaniel, J., Chen, E. Y., Rockwell, H., Lynes, M. D., Tseng, Y.-H., et al. (2016). Monoacylglycerol analysis using MS/MSALL quadruple time of flight mass spectrometry. *Metabolites*, 6(3), 25. <https://doi.org/10.3390/metabo6030025>
- Gauthier, G., Gauthier, M., & Cristen, R. Y. 1995. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* *gen. nov.*, and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 755–761. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-755>
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., & Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2743–2747. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.7.2743-2747.1998>
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I. M., & Sohlenkamp, C. (2010). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Progress in Lipid Research*, 49(1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.002>
- Gerwick, W. H., & Fenical, W. (1981). Ichthyotoxic and cytotoxic metabolites of the tropical brown alga *Stypopodium zonale* (Lamouroux) Papenfuss. *The Journal of Organic Chemistry*, 46(1), 22–27. <https://doi.org/10.1021/jo00314a005>
- Ghosh, Ranjan, Barman, S., & Mandal, N. C. (2019). Phosphate deficiency induced biofilm formation of *Burkholderia* on insoluble phosphate granules plays a pivotal role for maximum release of soluble phosphate. *Scientific Reports*, 9(1), 5477. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41726-9>
- Ghosh, Runu, Tiwary, B. K., Kumar, A., & Chakraborty, R. (2014). Guava leaf extract inhibits quorum-sensing and *Chromobacterium violaceum* induced lysis of human hepatoma cells: Whole transcriptome analysis reveals differential gene expression. *PLOS ONE*, 9(9), e107703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107703>
- Giacomoni, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., et al. (2015). Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*, 31(9), 1493–1495. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813>

- Gil, B., Ferrándiz, M. L., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Ubeda, A., Roviroso, J., et al. (1995). Inhibition of inflammatory responses by epitaondiol and other marine natural products. *Life Sciences*, 57(2), PL25-30. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00260-d](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00260-d)
- Gil-de-la-Fuente, A., Godzien, J., Saugar, S., Garcia-Carmona, R., Badran, H., Wishart, D. S., et al. (2019). CEU Mass Mediator 3.0: A metabolite annotation tool. *Journal of Proteome Research*, 18(2), 797–802. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00720>
- Girard, L., Blanchet, E., Stien, D., Baudart, J., Suzuki, M., & Lami, R. (2019). Evidence of a Large diversity of *N*-acyl-homoserine lactones in symbiotic *Vibrio fischeri* strains associated with the squid *Euprymna scolopes*. *Microbes and Environments, advpub*. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18145>
- Godfrin, M. P., Sihlabela, M., Bose, A., & Tripathi, A. (2018). Behavior of marine bacteria in clean environment and oil spill conditions. *Langmuir*, 34(30), 9047–9053. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01319>
- Godzien, J., Ciborowski, M., Martínez-Alcázar, M. P., Samczuk, P., Kretowski, A., & Barbas, C. (2015). Rapid and reliable identification of phospholipids for untargeted metabolomics with LC–ESI–QTOF–MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 14(8), 3204–3216. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00169>
- González, A. G., Darias, J., Martín, J. D., & Norte, M. (1974). Atomaric acid, a new component from *Taonia atomaria*. *Tetrahedron Letters*, 15(45), 3951–3954. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)92054-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)92054-4)
- González, A. G., Darias, J., Martin, J. D., & Pascual, C. (1973). Marine natural products of the atlantic zone—V: The structure and chemistry of taondiol and related compounds. *Tetrahedron*, 29(11), 1605–1609. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)83404-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)83404-9)
- González, I., Dejean, S., Martin, P. G. P., & Baccini, A. (2008). CCA: An R package to extend canonical correlation analysis. *Journal of Statistical Software*, 23(12), 1. <https://doi.org/10.18637/jss.v023.i12>
- Gopalakrishnan, S., Dash, S., & Maranas, C. (2020). K-FIT: An accelerated kinetic parameterization algorithm using steady-state fluxomic data. *Metabolic Engineering*, 61, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.03.001>
- Gram, L., Grossart, H.-P., Schlingloff, A., & Kjørboe, T. (2002). Possible quorum sensing in marine snow bacteria: Production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 4111–4116. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.4111-4116.2002>
- Grasland, B., Mitalane, J., Briandet, R., Quemener, E., Meylheuc, T., Linossier, I., et al. (2003). Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling*, 19(5), 307–313. <https://doi.org/10.1080/0892701031000121041>
- Grim, C. M., Luu, G. T., & Sanchez, L. M. (2019). Staring into the void: demystifying microbial metabolomics. *FEMS Microbiology Letters*, 366(11). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz135>
- Grimaud, R., Ghiglione, J.-F., Cagnon, C., Lauga, B., Vaysse, P.-J., Rodriguez-Blanco, A., et al. (2012). Genome sequence of the marine bacterium *marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, which forms biofilms on hydrophobic organic compounds. *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3539–3540. <https://doi.org/10.1128/JB.00500-12>
- Guendouze, A., Plener, L., Bzdrenga, J., Jacquet, P., Rémy, B., Elias, M., et al. (2017). Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors. *Frontiers in Microbiology*, 8, 227. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00227>
- Guillonneau, R., Baraquet, C., Bazire, A., & Molmeret, M. (2018). Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1960. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01960>

- Hagstrom, D., Cochet-Escartin, O., Zhang, S., Khuu, C., & Collins, E.-M. S. (2015). Freshwater planarians as an alternative animal model for neurotoxicology. *Toxicological Sciences*, 147(1), 270–285. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv129>
- Haney, E. F., Trimble, M. J., Cheng, J. T., Vallé, Q., & Hancock, R. E. W. (2018). Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules*, 8(2), 29. <https://doi.org/10.3390/biom8020029>
- Haras, D. (2005). Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*, 93, s.27-s.41. <https://doi.org/10.1051/mattech:2006003>
- Hay, M. E. (2009). Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 1, 193–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163708>
- Hede, N., & Khandeparker, L. (2020). Extracellular polymeric substances mediate the coaggregation of aquatic biofilm-forming bacteria. *Hydrobiologia*, 847(20), 4249–4272. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04411-x>
- Henseler, J., Ringle, C. M., & Sinkovics, R. R. (2009). The use of partial least squares path modeling in international marketing. *New Challenges to International Marketing* (Vol. 20, pp. 277–319). [https://doi.org/10.1108/S1474-7979\(2009\)0000020014](https://doi.org/10.1108/S1474-7979(2009)0000020014)
- Hermier, D., & Mariotti, F. (2018). Importance du métabolisme des protéines et des acides aminés dans la prévention et la prise en charge du syndrome métabolique. Modulation par les acides gras n-3. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 53(5), 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2018.06.002>
- Hiblot, J., Gotthard, G., Chabriere, E., & Elias, M. (2012). Characterisation of the organophosphate hydrolase catalytic activity of SsoPox. *Scientific Reports*, 2(1), 779. <https://doi.org/10.1038/srep00779>
- Hiblot, J., Gotthard, G., Elias, M., & Chabriere, E. (2013). Differential active site loop conformations mediate promiscuous activities in the lactonase SsoPox. *PLOS ONE*, 8(9), e75272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075272>
- Higgins, M. J., & Novak, J. T. (1997). Characterization of exocellular protein and Its role in bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering*, 123(5), 479–485. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1997\)123:5\(479\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1997)123:5(479))
- Hirano, S., Asamizu, S., Onaka, H., Shiro, Y., & Nagano, S. (2008). Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6459–6466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708109200>
- Hofmann, T., Hanlon, A. R. M., Taylor, J. D., Ball, A. S., Osborn, A. M., & Underwood, G. J. C. (2009). Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Marine Ecology Progress Series*, 379, 45–58. <https://doi.org/10.3354/meps07875>
- Holčápek, M., Liebisch, G., & Ekroos, K. (2018). Lipidomic analysis. *Analytical Chemistry*, 90(7), 4249–4257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395>
- Hong, K.-W., Koh, C.-L., Sam, C.-K., Yin, W.-F., & Chan, K.-G. (2012). Complete genome sequence of *Burkholderia* sp. strain GG4, a Betaproteobacterium that reduces 3-Oxo-N-acylhomoserine lactones and produces Different N-acylhomoserine lactones. *Journal of Bacteriology*, 194(22), 6317–6317. <https://doi.org/10.1128/JB.01578-12>
- Hope, C. K., & Bott, T. R. (2004). Laboratory modelling of manganese biofiltration using biofilms of *Leptothrix discophora*. *Water Research*, 38(7), 1853–1861. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.031>
- Hoshino, T. (2011). Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(6), 1463–1475. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3468-z>

- Hosoya, Y., Kameyama, T., Naganawa, H., Okami, Y., & Takeuchi, T. (1993). Anisomycin and new congeners active against human tumor cell lines. *The Journal of Antibiotics*, 46(8), 1300–1302. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1300>
- Hounoum, B., Blasco, H., Emond, P., & Mavel, S. (2016). Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry-based cell metabolomics: Experimental design, recommendations, and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.003>
- Hraiech, S., Hiblot, J., Lafleur, J., Lepidi, H., Papazian, L., Rolain, J.-M., et al. (2014). Inhaled lactonase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and mortality in rat pneumonia. *PloS One*, 9(10), e107125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107125>
- Hsu, F.-F. (2016). Complete structural characterization of ceramides as [M–H][–] ions by multiple-stage linear ion trap mass spectrometry. *Biochimie*, 130, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.07.012>
- Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., Wen, B., Gitai, Z., & Wingreen, N. S. (2008). Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19282–19287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805309105>
- Huang, S., Bergonzi, C., Schwab, M., Elias, M., & Hicks, R. E. (2019). Evaluation of biological and enzymatic quorum quencher coating additives to reduce biocorrosion of steel. *PLOS ONE*, 14(5), e0217059. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217059>
- Humbert, F., & Quilès, F. (2011). In-situ study of early stages of biofilm formation under different environmental stresses by ATR-FTIR spectroscopy.
- Ibrahim. (2002). Fouling in heat exchangers. In *MATLAB - A Fundamental Tool for Scientific Computing and Engineering Applications* (Vol. 3).
- Inbakandan, D., Kumar, C., Abraham, L. S., Kirubakaran, R., Venkatesan, R., & Khan, S. A. (2013). Silver nanoparticles with anti microfouling effect: a study against marine biofilm forming bacteria. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 111, 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.048>
- Isaac, G., Jeannotte, R., Esch, S. W., & Welti, R. (2007). New mass-spectrometry-based strategies for lipids. *Genetic Engineering*, 28, 129–157. https://doi.org/10.1007/978-0-387-34504-8_8
- Jahn, A., Griebel, T., & Nielsen, P. H. (1999). Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling*, 14(1), 49–57. <https://doi.org/10.1080/08927019909378396>
- Jamal, D. (2015). *Influence de stress environnementaux sur les propriétés physicochimiques de jeunes biofilms en cours de formation : Etude par spectroscopies vibrationnelles infrarouge-Raman et de force AFM*.
- Jara, J., Alarcón, F., Monnappa, A. K., Santos, J. I., Bianco, V., Nie, P., et al. (2021). Self-adaptation of *Pseudomonas fluorescens* biofilms to hydrodynamic stress. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3460. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.588884>
- Jerković, I., Kranjac, M., Marijanović, Z., Roje, M., & Jokić, S. (2019). Chemical diversity of headspace and volatile oil composition of two brown algae (*Taonia atomaria* and *Padina pavonica*) from the Adriatic sea. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030495>
- Johnson, C. H., Ivanisevic, J., & Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(7), 451–459. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- Jouault, A. (2019). *Altérocine : une protéine antibiofilm sécrétée par la bactérie marine Pseudoalteromonas sp. 3J6* (These de doctorat). Lorient. Retrieved from <https://www.theses.fr/2019LORIS588>

- Kalia, V. C., Kumar, P., Pandian, S. T. K., & Sharma, P. (2015). Biofouling control by quorum quenching. *Springer Handbook of Marine Biotechnology*, 431–440. https://doi.org/10.1007/978-3-642-53971-8_15
- Kanavillil, N., Balika, D., & Kurissery, S. (2015). Edge effect: a catalyst of spatial heterogeneity in natural biofilms. *Hydrobiologia*, 744(1), 77–90. <https://doi.org/10.1007/s10750-014-2058-3>
- Karl, D. M. (2014). Microbially mediated transformations of phosphorus in the sea: New views of an old cycle. *Annual Review of Marine Science*, 6(1), 279–337. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135046>
- Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., & Biggs, C. A. (2011). “Biofilmology”: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1869–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3293-4>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Katajamaa, M., Miettinen, J., & Orešič, M. (2006). MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics*, 22(5), 634–636. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk039>
- Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2013). Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.010>
- Kavita, K., Singh, V. K., Mishra, A., & Jha, B. (2014). Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. *Carbohydrate Polymers*, 101, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.099>
- Keleştemur, S., Avci, E., & Çulha, M. (2018). Raman and surface-enhanced Raman scattering for biofilm characterization. *Chemosensors*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.3390/chemosensors6010005>
- Khandeparker, R. D., & Bhosle, N. B. (2001). Extracellular polymeric substances of the marine fouling diatom amphora rostrata Wm.Sm. *Biofouling*, 17(2), 117–127. <https://doi.org/10.1080/08927010109378471>
- Kim, S., Lee, D. Y., Wohlgemuth, G., Park, H. S., Fiehn, O., & Kim, K. H. (2013). Evaluation and optimization of metabolome sample preparation methods for *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Chemistry*, 85(4), 2169–2176. <https://doi.org/10.1021/ac302881e>
- Kind, T., & Fiehn, O. (2006). Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC bioinformatics*, 7, 234. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-234>
- Kind, T., Meissen, J. K., Yang, D., Nocito, F., Vaniya, A., Cheng, Y.-S., et al. (2012). Qualitative analysis of algal secretions with multiple mass spectrometric platforms. *Journal of Chromatography A*, 1244, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.074>
- Kirschner, C. M., & Brennan, A. B. (2012). Bio-inspired antifouling strategies. *Annual Review of Materials Research*, 42(1), 211–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070511-155012>
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Reis, C. R., Muntendam, R., Bokhove, M., Melillo, E., et al. (2014). Reducing virulence of the human pathogen *Burkholderia* by altering the substrate specificity of the quorum-quenching acylase PvdQ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1568–1573. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311263111>
- Kragh, K. N., Alhede, M., Kvich, L., & Bjarnsholt, T. (2019). Into the well—A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, 1, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100006>

- Kuhlisch, C., & Pohnert, G. (2015). Metabolomics in chemical ecology. *Natural Product Reports*, 32(7), 937–955. <https://doi.org/10.1039/C5NP00003C>
- Kumar, A. S., Bryan, J. N., & Kumar, S. R. (2014). Bacterial quorum sensing molecule N-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone causes direct cytotoxicity and reduced cell motility in human pancreatic carcinoma cells. *PLOS ONE*, 9(9), e106480. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106480>
- Kumar, M. R. (2012). *Chromobacterium violaceum*: A rare bacterium isolated from a wound over the scalp. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2(1), 70–72. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.96814>
- Kusumi, T., Ishitsuka, M., Iwashita, T., Naoki, H., Konno, T., & Kakisawa, H. (1981). A novel type of glycerides bearing a methacrylic acid moiety from the brown alga, *sargassum fulvellum*. *Chemistry Letters*, 10(10), 1393–1396. <https://doi.org/10.1246/cl.1981.1393>
- La Barre, S. L., & Haras, D. (2007). Rencontres avec les bactéries marines. *Journal de la Société de Biologie*, 201(3), 281–289. <https://doi.org/10.1051/jbio:2007039>
- Lane, A., & Willemsen, P. (2004). Collaborative effort looks into biofouling. *Fish Farm. Int.* 34–35.
- Lau, S. C. K., Thiyagarajan, V., Cheung, S. C. K., & Qian, P.-Y. (2005). Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. *Aquatic Microbial Ecology*, 38(1), 41–51. <https://doi.org/10.3354/ame038041>
- Laville, J., Blumer, C., Von Schroetter, C., Gaia, V., Défago, G., Keel, C., & Haas, D. (1998). Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of Bacteriology*, 180(12), 3187–3196. <https://doi.org/10.1128/JB.180.12.3187-3196.1998>
- Lawes, J. C., Neilan, B. A., Brown, M. V., Clark, G. F., & Johnston, E. L. (2016). Elevated nutrients change bacterial community composition and connectivity: high throughput sequencing of young marine biofilms. *Biofouling*, 32(1), 57–69. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1126581>
- Lays, C. (2015). *ARN régulateurs de Staphylococcus aureus : Rôle de RsaA dans la formation du biofilm et de la capsule, niveaux d'expression des ARN dans les prélèvements cliniques* (phdthesis). Université Claude Bernard - Lyon I. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01127449>
- Lazzari, P., Solidoro, C., Salon, S., & Bolzon, G. (2016). Spatial variability of phosphate and nitrate in the Mediterranean sea: A modeling approach. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 108, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2015.12.006>
- Le Norcy, T., Niemann, H., Proksch, P., Linossier, I., Vallée-Réhel, K., Hellio, C., & Faÿ, F. (2017). Anti-biofilm effect of biodegradable coatings based on hemibastadin derivative in marine environment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1520. <https://doi.org/10.3390/ijms18071520>
- Leclerc, J.-C., Viard, F., González Sepúlveda, E., Díaz, C., Neira Hinojosa, J., Pérez Araneda, K., et al. (2018). Non-indigenous species contribute equally to biofouling communities in international vs local ports in the Biobío region, Chile. *Biofouling*, 34(7), 784–799. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1502276>
- Lee, H.-W., Koh, Y. M., Kim, J., Lee, J.-C., Lee, Y.-C., Seol, S.-Y., et al. (2008). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1), 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x>
- Lee, O. O., Wang, Y., Tian, R., Zhang, W., Shek, C. S., Bougouffa, S., et al. (2014). In situ environment rather than substrate type dictates microbial community structure of biofilms in a cold seep system. *Scientific Reports*, 4(1), 3587. <https://doi.org/10.1038/srep03587>

- Lee, Y.-K., Kwon, K.-K., Cho, K.-H., Kim, H.-W., Park, J.-H., & Lee, H.-K. (2003). Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *Journal of Microbiology*, 41(3), 183–188. <https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200311921904623.page>.
- Legal, J. M., Manfait, M., & Theophanides, T. (1991). Applications of FTIR spectroscopy in structural studies of cells and bacteria. *Journal of Molecular Structure*, 242, 397–407. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(91\)87150-G](https://doi.org/10.1016/0022-2860(91)87150-G)
- Lehtola, M. J., Miettinen, I. T., & Martikainen, P. J. (2002). Biofilm formation in drinking water affected by low concentrations of phosphorus. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(6), 494–499. <https://doi.org/10.1139/w02-048>
- Leurgans, S. E., Moyeed, R. A., & Silverman, B. W. (1993). Canonical correlation analysis when the data are curves. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 55(3), 725–740. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1993.tb01936.x>
- LeVatte, M., Keshteli, A. H., Zarei, P., & Wishart, D. S. (2021). Applications of metabolomics to precision nutrition. *Lifestyle Genomics*, 1–9. <https://doi.org/10.1159/000518489>
- Lewenza, S., Falsafi, R., Bains, M., Rohs, P., Stupak, J., Sprott, G. D., & Hancock, R. E. W. (2011). The *olsA* gene mediates the synthesis of an ornithine lipid in *Pseudomonas aeruginosa* during growth under phosphate-limiting conditions, but is not involved in antimicrobial peptide susceptibility. *FEMS microbiology letters*, 320(2), 95–102. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02295.x>
- Li, R., Xu, J., Li, X., Shi, Z., & Harrison, P. J. (2017). Spatiotemporal variability in phosphorus species in the pearl river estuary: Influence of the river discharge. *Scientific Reports*, 7(1), 13649. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13924-w>
- Li, X., Jiang, J., Chen, Z., & Jackson, A. (2021). Transcriptomic, proteomic and metabolomic analysis of flavonoid biosynthesis during fruit maturation in *Rubus chingii* Hu. *Frontiers in Plant Science*, 12, 706667. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.706667>
- Li, Y., He, N., Luo, M., Hong, B., & Xie, Y. (2020). Application of untargeted tandem mass spectrometry with molecular networking for detection of enniatins and beauvericins from complex samples. *Journal of Chromatography A*, 1634, 461626. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461626>
- Lima, D. C., Duarte, F. T., Medeiros, V. K. S., Carvalho, P. C., Nogueira, F. C. S., Araujo, G. D. T., et al. (2016). GeLC-MS-based proteomics of *Chromobacterium violaceum*: comparison of proteome changes elicited by hydrogen peroxide. *Scientific Reports*, 6(1), 28174. <https://doi.org/10.1038/srep28174>
- Little, B., & Ray, R. (2002). A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corrosion*, 58(5), 424–428. <https://doi.org/10.5006/1.3277632>
- Liu, J., Fu, K., Wu, C., Qin, K., Li, F., & Zhou, L. (2018). “In-Group” Communication in marine vibrio: A review of N-acyl homoserine lactones-driven quorum sensing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 139. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00139>
- Liu, & Tay. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36(7), 1653–1665. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00379-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00379-7)
- Lochet, F., & Leveau, M. (1990). Transfers between a eutrophic ecosystem, the river Rhône, and an oligotrophic ecosystem, the north-western Mediterranean Sea. *Hydrobiologia*, 207(1), 95–103. <https://doi.org/10.1007/BF00041445>
- Lopalco, P., Angelini, R., Lobasso, S., Köcher, S., Thompson, M., Müller, V., & Corcelli, A. (2013). Adjusting membrane lipids under salt stress: the case of the moderate halophilic organism *Halobacillus halophilus*. *Environmental Microbiology*, 15(4), 1078–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02870.x>

- Lopez-Maestre, H., Carnelossi, E. A. G., Lacroix, V., Burlet, N., Mugat, B., Chambeyron, S., et al. (2017). Identification of misexpressed genetic elements in hybrids between *Drosophila*-related species. *Scientific Reports*, 7(1), 40618. <https://doi.org/10.1038/srep40618>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology*, 13(5), e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Macintyre, L., Zhang, T., Viegelmann, C., Martinez, I. J., Cheng, C., Dowdells, C., et al. (2014). Metabolomic tools for secondary metabolite discovery from marine microbial symbionts. *Marine Drugs*, 12(6), 3416–3448. <https://doi.org/10.3390/md12063416>
- Mahan, K., Martinmaki, R., Larus, I., Sikdar, R., Dunitz, J., & Elias, M. (2020). Effects of signal disruption depends on the substrate preference of the lactonase. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03003>
- Majzoub, M. E., McElroy, K., Maczka, M., Schulz, S., Thomas, T., & Egan, S. (2021). Genomic evolution of the marine bacterium *Phaeobacter inhibens* during biofilm growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(19), e00769-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00769-21>
- Mårdén, P., Tunlid, A., Malmcrona-Friberg, K., Odham, G., & Kjelleberg, S. (1985). Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Archives of Microbiology*, 142(4), 326–332. <https://doi.org/10.1007/BF00491898>
- Mathieson, A. C., Shipman, J. W., O'shea, J. R., & Hasevlat, R. C. (1976). Seasonal growth and reproduction of estuarine fucoid algae in New England. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 25(3), 273–284. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(76\)90129-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90129-5)
- Matz, C., Webb, J. S., Schupp, P. J., Phang, S. Y., Penesyan, A., Egan, S., et al. (2008). Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PloS One*, 3(7), e2744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002744>
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., et al. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology*, 143(12), 3703–3711. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-12-3703>
- McKey, D. (1979). The distribution of secondary compounds within plants. *Herbivores-their interaction with secondary plant metabolites*, 55–134. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10012096248/>. Accessed 18 July 2020
- Michaels, A. F., Olson, D., Sarmiento, J. L., Ammerman, J. W., Fanning, K., Jahnke, R., et al. (1996). Inputs, losses and transformations of nitrogen and phosphorus in the pelagic North Atlantic Ocean. *Biogeochemistry*, 35(1), 181–226. <https://doi.org/10.1007/BF02179827>
- Millán-Aguiñaga, N., Soldatou, S., Brozio, S., Munnoch, J. T., Howe, J., Hoskisson, P. A., & Duncan, K. R. Y. (2019). Awakening ancient polar Actinobacteria: diversity, evolution and specialized metabolite potential. *Microbiology*, 165(11), 1169–1180. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000845>
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 165–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- Mion, S., Carriot, N., Lopez, J., Plener, L., Ortalo-Magné, A., Chabrière, E., et al. (2021). Disrupting quorum sensing alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00211-w>
- Mion, S., Plener, L., Rémy, B., Daudé, D., & Chabrière, É. (2019). Lactonase SsoPox modulates CRISPR-Cas expression in gram-negative proteobacteria using AHL-based quorum sensing systems. *Research in Microbiology*, 170(6), 296–299. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.06.004>

- Mojica, K., Elsey, D., & Cooney, M. J. (2007). Quantitative analysis of biofilm EPS uronic acid content. *Journal of Microbiological Methods*, 71(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.07.010>
- Monte, A. A., Brocker, C., Nebert, D. W., Gonzalez, F. J., Thompson, D. C., & Vasilidou, V. (2014). Improved drug therapy: triangulating phenomics with genomics and metabolomics. *Human Genomics*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40246-014-0016-9>
- Moore, E. K., Hopmans, E. C., Rijpstra, W. I. C., Villanueva, L., & Damsté, J. S. S. (2016). Elucidation and identification of amino acid containing membrane lipids using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(6), 739–750. <https://doi.org/10.1002/rcm.7503>
- More, T. T., Yadav, J. S. S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*, 144, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.010>
- Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2014). Meta’omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology*, 146(6), 1437–1448.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.049>
- Morohoshi, T., FUKAMACHI, K., KATO, M., KATO, N., & IKEDA, T. (2010). Regulation of the violacein biosynthetic gene cluster by acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(10), 2116–2119. <https://doi.org/10.1271/bbb.100385>
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N., & Ikeda, T. (2008). N-Acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS Microbiology Letters*, 279(1), 124–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.01016.x>
- Moura-Alves, P., Puyskens, A., Stinn, A., Klemm, M., Gühlich-Bornhof, U., Dorhoi, A., et al. (2019). Host monitoring of quorum sensing during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Science*, 366(6472), eaaw1629. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1629>
- Murphy, R. C., & Axelsen, P. H. (2011). Mass spectrometric analysis of long-chain lipids. *Mass Spectrometry Reviews*, 30(4), 579–599. <https://doi.org/10.1002/mas.20284>
- Murzin, A. G., Brenner, S. E., Hubbard, T., & Chothia, C. (1995). SCOP: A structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology*, 247(4), 536–540. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80134-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80134-2)
- Nahas, R., Abatis, D., Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Vagias, C., & Roussis, V. (2007). Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. *Food Chemistry*, 102(3), 577–581. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.036>
- Naumann, D., Helm, D., & Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature*, 351(6321), 81–82. <https://doi.org/10.1038/351081a0>
- Nellemann, C., & Corcoran, E. (2009). *Blue Carbon: The Role of Healthy Oceans in Binding Carbon : a Rapid Response Assessment*. UNEP/Earthprint.
- Nichols, C. M., Lardiére, S. G., Bowman, J. P., Nichols, P. D., A.E. Gibson, J., & Guézennec, J. (2005). Chemical characterization of exopolysaccharides from antarctic marine bacteria. *Microbial Ecology*, 49(4), 578–589. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0093-8>
- Nicholson, J. K., Lindon, J. C., & Holmes, E. (1999). “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 29(11), 1181–1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Nie, J., Yang, J., Wei, Y., & Wei, X. (2020). The role of oxidized phospholipids in the development of disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 76, 100909. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100909>
- Nothias, L.-F., Boutet-Mercey, S., Cachet, X., De La Torre, E., Laboureur, L., Gallard, J.-F., et al. (2017). Environmentally Friendly Procedure Based on Supercritical Fluid Chromatography and

- Tandem Mass Spectrometry Molecular Networking for the Discovery of Potent Antiviral Compounds from *Euphorbia semiperfoliata*. *Journal of Natural Products*, 80(10), 2620–2629. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00113>
- Nothias, L.-F., Esposito, M., Costa, J., Paolini, J., Touboul, D., & Litaudon, M. (2015). Molecular networks, a bioinformatic tool for tandem mass spectrometry data interpretation. *Spectra Analyse*, 307, 73–78. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01254171>. Accessed 18 April 2018
- Nothias, L.-F., Nothias-Esposito, M., da Silva, R., Wang, M., Protsyuk, I., Zhang, Z., et al. (2018). Bioactivity-based molecular networking for the discovery of drug leads in natural product bioassay-guided fractionation. *Journal of Natural Products*, 81(4), 758–767. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00737>
- Nweke, C. O., & Okpokwasili, G. C. (2003). Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil *Staphylococcus* species. *African Journal of Biotechnology*, 2(9), 293–295. <https://doi.org/10.4314/ajb.v2i9.14839>
- Nwodo, U. U., & Okoh, A. I. (2013). Characterization and flocculation properties of biopolymeric flocculant (glycosaminoglycan) produced by *Cellulomonas* sp. Okoh. *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1325–1337. <https://doi.org/10.1111/jam.12095>
- Oberbeckmann, S., Loeder, M. G. J., Gerdt, G., & Osborn, A. M. (2014). Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(2), 478–492. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12409>
- Offret, C., Desriac, F., Le Chevalier, P., Mounier, J., Jégou, C., & Fleury, Y. (2016). Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. *Marine Drugs*, 14(7), 129. <https://doi.org/10.3390/md14070129>
- Okami, Y. (1986). Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microbial Ecology*, 12(1), 65–78. <https://doi.org/10.1007/BF02153223>
- Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B., & Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 373–378. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01214-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01214-1)
- Olivon, F., Allard, P.-M., Koval, A., Righi, D., Genta-Jouve, G., Neyts, J., et al. (2017). Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks. *ACS Chemical Biology*, 12(10), 2644–2651. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00413>
- Olivon, F., Elie, N., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., & Touboul, D. (2018). MetGem software for the generation of molecular networks based on the t-SNE algorithm. *Analytical Chemistry*, 90(23), 13900–13908. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03099>
- Ostling, J., Goodman, A., & Kjelleberg, S. (1991). Behaviour of IncP-1 plasmids and a miniMu transposon in a marine *Vibrio* sp.: isolation of starvation inducible lac operon fusions. *FEMS Microbiology Letters*, 86(1), 83–93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04797.x>
- Othmani, A. (2014). *Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne Taonia atomaria et la communauté bactérienne associée à sa surface* (phdthesis). Université de Toulon. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01017437/document>
- Othmani, A., Briand, J.-F., Ayé, M., Molmeret, M., & Culioli, G. (2016). Surface metabolites of the brown alga *Taonia atomaria* have the ability to regulate epibiosis. *Biofouling*, 32(7), 801–813. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1198954>
- Othmani, A., Bunet, R., Bonnefont, J.-L., Briand, J.-F., & Culioli, G. (2016). Settlement inhibition of marine biofilm bacteria and barnacle larvae by compounds isolated from the Mediterranean brown alga *Taonia atomaria*. *Journal of Applied Phycology*, 28(3), 1975–1986. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0668-4>
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>

- Paix, B. (2020). Etude des dynamiques spatio-temporelles des interactions entre le microbiote et le métabolome de surface de la macroalgue *Taonia atomaria* par une approche multi-omiques. Toulon. Retrieved from <http://www.theses.fr/2020TOUL0012>
- Paix, B., Carriot, N., Barry-Martin, R., Greff, S., Misson, B., Briand, J.-F., & Culioli, G. (2020). A multi-omics analysis suggests links between the differentiated surface metabolome and epiphytic microbiota along the Thallus of a mediterranean seaweed holobiont. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00494>
- Paix, B., Othmani, A., Debroas, D., Culioli, G., & Briand, J.-F. (2019). Temporal covariation of epibacterial community and surface metabolome in the Mediterranean seaweed holobiont *Taonia atomaria*. *Environmental Microbiology*, 21(9), 3346–3363. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14617>
- Palmgren, R., & Nielsen, P. H. (1996). Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures. *Water Science and Technology*, 34(5), 233–240. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00650-6](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00650-6)
- Paluch, E., Rewak-Soroczyńska, J., Jędrusik, I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1871–1881. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10349-w>
- Palumbi, S. R., Sandifer, P. A., Allan, J. D., Beck, M. W., Fautin, D. G., Fogarty, M. J., et al. (2009). Managing for ocean biodiversity to sustain marine ecosystem services. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(4), 204–211. <https://doi.org/10.1890/070135>
- Pan, X., Liu, J., Zhang, D., Chen, X., Li, L., Song, W., & Yang, J. (2010). A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using threedimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water SA*, 36(1). <https://doi.org/10.4314/wsa.v36i1.50914>
- Pang, T. (2002). The Impact of genomics on global health. *American Journal of Public Health*, 92(7), 1077–1079. <https://doi.org/10.2105/AJPH.92.7.1077>
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., Barrette, M., et al. (2021). MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W388–W396. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab382>
- Pantarella, F., Berlutti, F., Passariello, C., Sarli, S., Morea, C., & Schippa, S. (2007). Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4), 992–999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x>
- Parikh, S. J., & Chorover, J. (2006). ATR-FTIR spectroscopy reveals bond formation during bacterial adhesion to iron oxide. *Langmuir*, 22(20), 8492–8500. <https://doi.org/10.1021/la061359p>
- Patejko, M., Jacyna, J., & Markuszewski, M. J. (2017). Sample preparation procedures utilized in microbial metabolomics: An overview. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1043, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.029>
- Patrauchan, M. A., Sarkisova, S., Sauer, K., & Franklin, M. J. Y. 2005. (2005). Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp. *Microbiology*, 151(9), 2885–2897. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28041-0>
- Patti, G. J. (2011). Separation strategies for untargeted metabolomics. *Journal of Separation Science*, 34(24), 3460–3469. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100532>
- Patti, G. J., Tautenhahn, R., & Siuzdak, G. (2012). Meta-analysis of untargeted metabolomic data from multiple profiling experiments. *Nature Protocols*, 7(3), 508–516. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.454>
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263–269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>

- Paul, E., Ochoa, J. C., Pechaud, Y., Liu, Y., & Liné, A. (2012). Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Research*, 46(17), 5499–5508. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.029>
- Paul, V. J., Freeman, C. J., & Agarwal, V. (2019). Chemical ecology of marine sponges: New opportunities through “-Omics.” *Integrative and Comparative Biology*, 59(4), 765–776. <https://doi.org/10.1093/icb/icz014>
- Paula, J. C. D., Vallim, M. A., & Teixeira, V. L. (2011). What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from *Dictyotaceae* (Phaeophyceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(2), 216–228. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000079>
- Pearse, J. S., McClintock, J. B., & Bosch, I. (1991). Reproduction of antarctic benthic marine invertebrates: Tempos, modes, and timing1. *American Zoologist*, 31(1), 65–80. <https://doi.org/10.1093/icb/31.1.65>
- Pellegrini, M., Valls, R., & Pellegrini, L. (1997). Chimiotaxonomie et marqueurs chimiques dans les algues brunes.
- Pierre, G., Zhao, J.-M., Orvain, F., Dupuy, C., Klein, G. L., Graber, M., & Maugard, T. (2014). Seasonal dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) in surface sediments of a diatom-dominated intertidal mudflat (Marennes–Oléron, France). <https://doi.org/10.1016/J.SEARES.2013.07.018>
- Pierre, Guillaume, Graber, M., Orvain, F., Dupuy, C., & Maugard, T. (2010). Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(5), 917–923. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.09.014>
- Pierre, Guillaume, Graber, M., Rafiliposon, B. A., Dupuy, C., Orvain, F., De Crignis, M., & Maugard, T. (2012). Biochemical composition and changes of extracellular polysaccharides (ECPS) produced during microphytobenthic biofilm development (Marennes–Oléron, France). *Microbial Ecology*, 63(1), 157–169. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9959-8>
- Pinhassi, J., Gómez-Consarnau, L., Alonso-Sáez, L., Sala, M. M., Vidal, M., Pedrós-Alió, C., & Gasol, J. M. (2006). Seasonal changes in bacterioplankton nutrient limitation and their effects on bacterial community composition in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 44(3), 241–252. <https://doi.org/10.3354/ame044241>
- Pink, J., Smith-Palmer, T., Chisholm, D., Beveridge, T. J., & Pink, D. A. (2005). An FTIR study of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm development: interpretation of ATR–FTIR data in the 1500–1180 cm^{−1} region. *Biofilms*, 2(3), 165–175. <https://doi.org/10.1017/S1479050505001936>
- Pinnell, L. J., & Turner, J. W. (2020). Temporal changes in water temperature and salinity drive the formation of a reversible plastic-specific microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(12). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa230>
- Pinu, F. R., Villas-Boas, S. G., & Aggio, R. (2017). Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: Quenching and Extraction protocols. *Metabolites*, 7(4), 53. <https://doi.org/10.3390/metabo7040053>
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., & Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-395>
- Pochon, X., Zaiko, A., Hopkins, G. A., Banks, J. C., & Wood, S. A. (2015). Early detection of eukaryotic communities from marine biofilm using high-throughput sequencing: an assessment of different sampling devices. *Biofouling*, 31(3), 241–251. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1028923>
- Poirier, L., Brun, L., Jacquet, P., Lepolard, C., Armstrong, N., Torre, C., et al. (2017). Enzymatic degradation of organophosphorus insecticides decreases toxicity in planarians and enhances survival. *Scientific Reports*, 7(1), 15194. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15209-8>

- Poirier, L., Ghigo, É., Daudé, D., & Chabrière, É. (2019). Modèles alternatifs (6) - La planaire, un modèle animal original pour la toxicologie. *médecine/sciences*, 35(6–7), 544–548. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019110>
- Poirier, L., Plener, L., Daudé, D., & Chabrière, E. (2020). Enzymatic decontamination of paraoxon-ethyl limits long-term effects in planarians. *Scientific Reports*, 10(1), 3843. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60846-1>
- Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*, 8(6), 1779–1802. <https://doi.org/10.3390/md8061779>
- Pollet, M., Gosselin, L., Dallaire, J., & Mathieu-Potvin, F. (2018). Optimization of geothermal power plant design for evolving operating conditions. *Applied Thermal Engineering*, 134, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2018.01.030>
- Polst, B. H., Anlanger, C., Risse-Buhl, U., Larras, F., Hein, T., Weitere, M., & Schmitt-Jansen, M. (2018). Hydrodynamics alter the tolerance of autotrophic biofilm communities toward herbicides. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2884. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02884>
- Popendorf, K. J., Fredricks, H. F., & Mooy, B. A. S. V. (2013). Molecular ion-independent quantification of Polar glycerolipid classes in marine plankton using triple quadrupole MS. *Lipids*, 48(2), 185–195. <https://doi.org/10.1007/s11745-012-3748-0>
- Poupard, M., Symonds, H., Spong, P., & Glotin, H. (2021). Intra-group orca call rate modulation estimation using compact four hydrophones array. *Frontiers in Marine Science*, 8, 1383. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.681036>
- Poxon, T. L., & Darby, J. L. (1997). Extracellular polyanions in digested sludge: Measurement and relationship to sludge dewaterability. *Water Research*, 31(4), 749–758. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00319-3)
- Purves, K., Macintyre, L., Brennan, D., Hreggviðsson, G. Ó., Kuttner, E., Ásgeirsdóttir, M. E., et al. (2016). Using molecular networking for microbial secondary metabolite bioprospecting. *Metabolites*, 6(1), 2. <https://doi.org/10.3390/metabo6010002>
- Qian, P.-Y., Lau, S. C. K., Dahms, H.-U., Dobretsov, S., & Harder, T. (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology*, 9(4), 399–410. https://www.academia.edu/25292661/Marine_Biofilms_as_Mediators_of_Colonization_by_Marine_Macroorganisms_Implications_for_Antifouling_and_Aquaculture
- Quilès, F., Humbert, F., & Delille, A. (2010). Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(2), 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.11.026>
- Raamsdonk, L. M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M. C., et al. (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Biotechnology*, 19(1), 45–50. <https://doi.org/10.1038/83496>
- Railkin. (2003). Marine biofouling: Colonization processes and defenses. *CRC Press*. <https://www.crcpress.com/Marine-Biofouling-Colonization-Processes-and-Defenses/Railkin/p/book/9780849314193>
- Ramos, A. E. F., Evanno, L., Poupon, E., Champy, P., & Beniddir, M. A. (2019). Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. *Natural Product Reports*, 36(7), 960–980. <https://doi.org/10.1039/C9NP00006B>
- Rao, T. S. (2010). Comparative effect of temperature on biofilm formation in natural and modified marine environment. *Aquatic Ecology*, 44(2), 463–478. <https://doi.org/10.1007/s10452-009-9304-1>

- Rasmussen, B. B., Nielsen, K. F., Machado, H., Melchiorson, J., Gram, L., & Sonnenschein, E. C. (2014). Global and phylogenetic distribution of quorum sensing signals, acyl homoserine lactones, in the family of *Vibrionaceae*. *Marine Drugs*, 12(11), 5527–5546. <https://doi.org/10.3390/md12115527>
- Rehman, Z. U., & Leiknes, T. (2018). Quorum-quenching bacteria isolated from red sea sediments reduce biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01354>
- Rémy, B., Mion, S., Plener, L., Elias, M., Chabrière, E., & Daudé, D. (2018). Interference in bacterial quorum sensing: A biopharmaceutical perspective. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 203. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00203>
- Ren, Y.-M., Zhou, S.-Z., Zhang, T., Qian, M., Zhang, R., Yao, S., et al. (2020). Targeted isolation of two disesquiterpenoid macrocephadiolides A and B from *Ainsliaea macrocephala* using a molecular networking-based dereplication strategy. *Organic Chemistry Frontiers*, 7(12), 1481–1489. <https://doi.org/10.1039/D0QO00030B>
- Richards, J. J., & Melander, C. (2009). Controlling bacterial biofilms. *ChemBioChem*, 10(14), 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900317>
- Rijavec, T., & Lapanje, A. (2016). Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01785>
- Rimington, C. (1931). The carbohydrate complex of the serum proteins. *Biochemical Journal*, 25(4), 1062–1071. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1260731/>
- Rinaudi, L., Fujishige, N. A., Hirsch, A. M., Banchio, E., Zorreguieta, A., & Giordano, W. (2006). Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 157(9), 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.06.002>
- Ringnér, M. (2008). What is principal component analysis? *Nature Biotechnology*, 26(3), 303–304. <https://doi.org/10.1038/nbt0308-303>
- Ritter, A., Com, E., Bazire, A., Goncalves, M. D. S., Delage, L., Le Pennec, G., et al. (2012). Proteomic studies highlight outer-membrane proteins related to biofilm development in the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. D41. *Proteomics*, 12(21), 3180–3192. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100644>
- Roche, S. A., & Leblond, J. D. (2010). Betaine lipids in chlorarachniophytes. *Phycological Research*, 58(4), 298–305. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2010.00590.x>
- Rodrigues, S., Paillard, C., Van Dillen, S., Tahrioui, A., Berjeaud, J.-M., Dufour, A., & Bazire, A. (2018). Relation between biofilm and virulence in *Vibrio tapetis*: A transcriptomic study. *Pathogens*, 7(4), 92. <https://doi.org/10.3390/pathogens7040092>
- Romeu, M. J., Domínguez-Pérez, D., Almeida, D., Morais, J., Araújo, M. J., Osório, H., et al. (2021). Quantitative proteomic analysis of marine biofilms formed by *filamentous cyanobacterium*. *Environmental Research*, 201, 111566. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111566>
- Romeu, Maria J., Alves, P., Morais, J., Miranda, J. M., de Jong, E. D., Sjollem, J., et al. (2019). Biofilm formation behaviour of marine *filamentous cyanobacterial* strains in controlled hydrodynamic conditions. *Environmental Microbiology*, 21(11), 4411–4424. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14807>
- Röst, H. L., Sachsenberg, T., Aiche, S., Bielow, C., Weissner, H., Aicheler, F., et al. (2016). OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. *Nature Methods*, 13(9), 741–748. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3959>
- Roux, A., Lison, D., Junot, C., & Heilier, J.-F. (2011). Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, 44(1), 119–135. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.08.016>

- Rovirosa, J., Sepulveda, M., Quezada, E., & San-Martin, A. (1992). Isoepitaondiol, a diterpenoid of *Stypopodium flabelliforme* and the insecticidal activity of stypotriol, epitaondiol and derivatives. *Phytochemistry*, 31(8), 2679–2681. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83610-B](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83610-B)
- Ruhaak, L. R., Xu, G., Li, Q., Goonatilake, E., & Lebrilla, C. B. (2018). Mass spectrometry approaches to glycomic and glycoproteomic analyses. *Chemical Reviews*, 118(17), 7886–7930. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00732>
- Sabry, O. M. M., Andrews, S., McPhail, K. L., Goeger, D. E., Yokochi, A., LePage, K. T., et al. (2005). Neurotoxic meroditerpenoids from the tropical marine brown alga *Stypopodium flabelliforme*. *Journal of Natural Products*, 68(7), 1022–1030. <https://doi.org/10.1021/np050051f>
- Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., & Briand, J.-F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 15(11), 2879–2893. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12186>
- Samburova, V., Lemos, M. S., Hiibel, S., Kent Hoekman, S., Cushman, J. C., & Zielinska, B. (2013). Analysis of triacylglycerols and free fatty acids in algae using ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2138-3>
- Sánchez, C., Braña, A. F., Méndez, C., & Salas, J. A. (2006). Reevaluation of the violacein biosynthetic pathway and its relationship to indolocarbazole biosynthesis. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 7(8), 1231–1240. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600029>
- Sandoval-Calderón, M., Nguyen, D. D., Kapon, C. A., Herron, P., Dorrestein, P. C., & Sohlenkamp, C. (2015). Plasticity of streptomyces coelicolor membrane composition under different growth conditions and during development. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01465>
- Sanli, K., Bengtsson-Palme, J., Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Alm Rosenblad, M., Blanck, H., & Eriksson, K. M. (2015). Metagenomic sequencing of marine periphyton: taxonomic and functional insights into biofilm communities. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1192. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01192>
- Sardans, J., Peñuelas, J., & Rivas-Ubach, A. (2011). Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*, 21(4), 191–225. <https://doi.org/10.1007/s00049-011-0083-5>
- Sasidharan, A., Sasidharan, N. K., Amma, D. B. N. S., Vasu, R. K., Nataraja, A. V., & Bhaskaran, K. (2015). Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium sp.* NIIST (MTCC 5522). *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 53(10), 694–701. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5173-6>
- Saurav, K., Macho, M., Kust, A., Delawská, K., Hájek, J., & Hrouzek, P. (2019). Antimicrobial activity and bioactive profiling of heterocytous cyanobacterial strains using MS/MS-based molecular networking. *Folia Microbiologica*, 64(5), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00737-9>
- Scheubert, K., Hufsky, F., Petras, D., Wang, M., Nothias, L.-F., Dührkop, K., et al. (2017). Significance estimation for large scale metabolomics annotations by spectral matching. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01318-5>
- Schmitt, J., Nivens, D., White, D. C., & Flemming, H.-C. (1995). Changes of biofilm properties in response to sorbed substances - an FTIR-ATR study. *Water Science and Technology*, 32(8), 149–155. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00019-4](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00019-4)
- Schnurr, P. J., Drever, M. C., Kling, H. J., Elner, R. W., & Arts, M. T. (2019). Seasonal changes in fatty acid composition of estuarine intertidal biofilm: Implications for western sandpiper migration. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 224, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.04.047>

- Schorn, M. A., Verhoeven, S., Ridder, L., Huber, F., Acharya, D. D., Aksenov, A. A., et al. (2021). A community resource for paired genomic and metabolomic data mining. *Nature Chemical Biology*, 17(4), 363–368. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-00724-z>
- Schultz, M. P., Bendick, J. A., Holm, E. R., & Hertel, W. M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, 27(1), 87–98. <https://doi.org/10.1080/08927014.2010.542809>
- Schuster, M., Sexton, D. J., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annual Review of Microbiology*, 67, 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155635>
- Schwab, M., Bergonzi, C., Sakkos, J., Staley, C., Zhang, Q., Sadowsky, M. J., et al. (2019). Signal disruption leads to changes in bacterial community population. *Frontiers in Microbiology*, 10, 611. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00611>
- Sebastián, M., & Gasol, J. M. (2013). Heterogeneity in the nutrient limitation of different bacterioplankton groups in the Eastern Mediterranean Sea. *The ISME Journal*, 7(8), 1665–1668. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.42>
- Sebastián, M., Smith, A. F., González, J. M., Fredricks, H. F., Van Mooy, B., Koblížek, M., et al. (2016). Lipid remodelling is a widespread strategy in marine heterotrophic bacteria upon phosphorus deficiency. *The ISME Journal*, 10(4), 968–978. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.172>
- Seyedsayamdost, M. R., Chandler, J. R., Blodgett, J. A. V., Lima, P. S., Duerkop, B. A., Oinuma, K.-I., et al. (2010). Quorum-sensing-regulated bactobolin production by *Burkholderia thailandensis* E264. *Organic Letters*, 12(4), 716–719. <https://doi.org/10.1021/ol902751x>
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., & Li, X.-Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>
- Short, S. M., van Tol, S., MacLeod, H. J., & Dimopoulos, G. (2018). Hydrogen cyanide produced by the soil bacterium *Chromobacterium* sp. Panama contributes to mortality in *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Scientific Reports*, 8(1), 8358. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26680-2>
- Siddik, A., & Satheesh, S. (2019). Characterization and assessment of barnacle larval settlement-inducing activity of extracellular polymeric substances isolated from marine biofilm bacteria. *Scientific Reports*, 9(1), 17849. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54294-9>
- Siegert, W. (1999). Biofilme: die unbekannte Kontaminationsquelle. *Biofilme: die unbekannte Kontaminationsquelle*, 105(5), 8–9.
- Sikder, M. N. A., Xu, G., & Xu, H. (2020). Seasonal variability in taxonomic breadth of biofilm-dwelling ciliates in colonization surveys for marine bioassessment. *Marine Pollution Bulletin*, 151, 110828. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110828>
- Silva, G. J. F. (2014). Study of genetic gradients among populations of Atlantic anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) located along marine ecotones. <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/6817>
- Singh, A. Kr., Mondal, G. C., Kumar, S., Singh, K. K., Kamal, K. P., & Sinha, A. (2007). Precipitation chemistry and occurrence of acid rain over dhanbad, coal city of India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 125(1), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9243-4>
- Skovhus, T. L., Enning, D., & Lee, J. S. (2017). *Microbiologically Influenced Corrosion in the Upstream Oil and Gas Industry*. CRC Press.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

- Soares, A. R., Teixeira, V. L., Pereira, R., & Villça, R. C. (2003). Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00116-9)
- Sobin, B. A., & Tanner, F. W. (1954). ANISOMYCIN, 1 A NEW ANTI-PROTOZOAN ANTIBIOTIC. *Journal of the American Chemical Society*, 76(15), 4053–4053. <https://doi.org/10.1021/ja01644a076>
- Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M., & Nishioka, T. (2003). Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 2(5), 488–494. <https://doi.org/10.1021/pr034020m>
- Sohlenkamp, C. (2019). Ornithine lipids and other amino acid-containing acyloxyacyl lipids. In O. Geiger (Ed.), *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, 109–122. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_13
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2015). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133–159. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- Stauff, D. L., & Bassler, B. L. (2011). Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. *Journal of Bacteriology*, 193(15), 3871–3878. <https://doi.org/10.1128/JB.05125-11>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Stickler, D. J., Morris, N. S., McLean, R. J. C., & Fuqua, C. (1998). Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3486–3490. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3486-3490.1998>
- Stocker, R. (2012). Marine microbes see a sea of gradients. *Science*, 338(6107), 628–633. <https://doi.org/10.1126/science.1208929>
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D., & Lappin-Scott, H. M. (1999). Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1), 83–92.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Suárez-García, S., Arola, L., Pascual-Serrano, A., Arola-Arnal, A., Aragonès, G., Bladé, C., & Suárez, M. (2017). Development and validation of a UHPLC-ESI-MS/MS method for the simultaneous quantification of mammal lysophosphatidylcholines and lysophosphatidylethanolamines in serum. *Journal of Chromatography B*, 1055–1056, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.028>
- Sutherland, I. W. Y. 2001. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Swem, L. R., Swem, D. L., O’Loughlin, C. T., Gatmaitan, R., Zhao, B., Ulrich, S. M., & Bassler, B. L. (2009). A quorum-sensing antagonist targets both membrane-bound and cytoplasmic receptors and controls bacterial pathogenicity. *Molecular Cell*, 35(2), 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.05.029>
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., & Westerhuis, J. A. (2012). Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics*, 8(1), 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0330-3>
- Tautenhahn, R., Cho, K., Uritboonthai, W., Zhu, Z., Patti, G. J., & Siuzdak, G. (2012). An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nature Biotechnology*, 30, 826–828. <https://doi.org/10.1038/nbt.2348>

- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., & Siuzdak, G. (2012). XCMS Online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Analytical Chemistry*, 84(11), 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/ac300698c>
- Theodoridis, G. A., Gika, H., & Wilson, I. (2013). LC-MS-Based Nontargeted Metabolomics. In *Metabolomics in Practice Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data*, 93–116.
- Timmermans, M. L., Picott, K. J., Ucciferri, L., & Ross, A. C. (2019). Culturing marine bacteria from the genus *Pseudoalteromonas* on a cotton scaffold alters secondary metabolite production. *MicrobiologyOpen*, 8(5), e00724. <https://doi.org/10.1002/mbo3.724>
- Triba, M. N., Le Moyec, L., Amathieu, R., Goossens, C., Bouchemal, N., Nahon, P., et al. (2015). PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *Molecular bioSystems*, 11(1), 13–19. <https://doi.org/10.1039/c4mb00414k>
- Tringali, C., Piattelli, M., & Spatafora, C. (1995). Sesquiterpenes and geranylgeranylglycerol from the brown algae *Taonia lacheana* and *Taonia atomaria* f. ciliata: their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, 40(3), 827–831. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00357-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00357-D)
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., et al. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, 12(6), 523–526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Tucker, K. L., Smith, C. E., Lai, C.-Q., & Ordovas, J. M. (2013). Quantifying diet for nutrigenomic studies. *Annual Review of Nutrition*, 33(1), 349–371. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145203>
- Tyurina, Y. Y., St Croix, C. M., Watkins, S. C., Watson, A. M., Epperly, M. W., Anthony-muthu, T. S., et al. (2019). Redox (phospho)lipidomics of signaling in inflammation and programmed cell death. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(1), 57–81. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR0119-004RR>
- Tziveleka, L.-A., Abatis, D., Paulus, K., Bauer, R., Vagias, C., & Roussis, V. (2005). Marine polyprenylated hydroquinones, quinones, and chromenols with inhibitory effects on leukotriene formation. *Chemistry & Biodiversity*, 2(7), 901–909. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590066>
- Uher, E., Compère, C., Combe, M., Mazeas, F., & Gourlay-Francé, C. (2017). In situ measurement with diffusive gradients in thin films: effect of biofouling in freshwater. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13797–13807. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8972-y>
- Valdés, A., Simó, C., Ibáñez, C., & García-Cañas, V. (2013). Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.023>
- Van Dyke, N., Pickering, B. F., & Van Dyke, M. W. (2009). Stm1p alters the ribosome association of eukaryotic elongation factor 3 and affects translation elongation. *Nucleic Acids Research*, 37(18), 6116–6125. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp645>
- van Gulik, W. M., Canelas, A. B., Seifar, R. M., & Heijnen, J. J. (2013). The sampling and sample preparation problem in microbial metabolomics. In *Metabolomics in Practice Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data*, 1–19.
- Van Mooy, B. A. S., Fredricks, H. F., Pedler, B. E., Dyhrman, S. T., Karl, D. M., Koblížek, M., et al. (2009). Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity. *Nature*, 458(7234), 69–72. <https://doi.org/10.1038/nature07659>
- Van Wambeke, F., Christaki, U., Giannakourou, A., Moutin, T., & Souvemerzoglou, K. (2002). Longitudinal and vertical trends of bacterial limitation by phosphorus and carbon in the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*, 43(1), 119–133. <https://doi.org/10.1007/s00248-001-0038-4>
- Vaniya, A., & Fiehn, O. (2015). Using fragmentation trees and mass spectral trees for identifying unknown compounds in metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.002>

- Védie, E., Brisset, H., Briand, J.-F., & Bressy, C. (2021). Bioinspiration and microtopography as nontoxic strategies for marine bioadhesion control. *Advanced Materials Interfaces*, 8(20), 2100994. <https://doi.org/10.1002/admi.202100994>
- Vences-Guzmán, M. Á., Geiger, O., & Sohlenkamp, C. (2012). Ornithine lipids and their structural modifications: from A to E and beyond. *FEMS microbiology letters*, 335(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02623.x>
- Villeneuve, A., Bouchez, A., & Montuelle, B. (2011). In-situ interactions between the effects of season, current velocity and pollution on a river biofilm. *Freshwater Biology*, 56(11), 2245–2259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02649.x>
- Vinod, H. D. (1976). Canonical ridge and econometrics of joint production. *Journal of Econometrics*, 4(2), 147–166. [https://doi.org/10.1016/0304-4076\(76\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0304-4076(76)90010-5)
- Violaki, K., Bourrin, F., Aubert, D., Kouvarakis, G., Delsaut, N., & Mihalopoulos, N. (2018). Organic phosphorus in atmospheric deposition over the Mediterranean Sea: An important missing piece of the phosphorus cycle. *Progress in Oceanography*, 163, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.07.009>
- von Rohr, M., Furrer, G., & Brandl, H. (2009). Effect of iron and phosphate on bacterial cyanide formation determined by methemoglobin in two-dimensional gradient microcultivations. *Journal of Microbiological Methods*, 79(1), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.08.008>
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(7), 2535–2554. <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>
- Wagner, M., Ivleva, N. P., Haisch, C., Niessner, R., & Horn, H. (2009). Combined use of confocal laser scanning microscopy (CLSM) and Raman microscopy (RM): Investigations on EPS – Matrix. *Water Research*, 43(1), 63–76. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.034>
- Wang, C., He, L., Li, D.-W., Bruschweiler-Li, L., Marshall, A. G., & Bruschweiler, R. (2017). Accurate identification of unknown and known metabolic mixture components by combining 3D NMR with fourier transform Ion cyclotron resonance tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 16(10), 3774–3786. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00457>
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., & Zhou, G. (2013). In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.005>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- Wang, Y., Feng, L., Lu, H., Zhu, J., Kumar, V., & Liu, X. (2021). Transcriptomic analysis of the food spoilers *Pseudomonas fluorescens* reveals the antibiofilm of carvacrol by interference with intracellular signaling processes. *Food Control*, 127, 108115. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108115>
- Want, E. J., Nordström, A., Morita, H., & Siuzdak, G. (2007). From exogenous to endogenous: The inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 459–468. <https://doi.org/10.1021/pr060505>
- Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., et al. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16(7), 1090–1094. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601185>
- Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm, City of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2675–2679. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>

- Watrous, J., Roach, P., Alexandrov, T., Heath, B. S., Yang, J. Y., Kersten, R. D., et al. (2012). Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), E1743–E1752. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203689109>
- Wenemoser, D., Lapan, S. W., Wilkinson, A. W., Bell, G. W., & Reddien, P. W. (2012). A molecular wound response program associated with regeneration initiation in planarians. *Genes & Development*, 26(9), 988–1002. <https://doi.org/10.1101/gad.187377.112>
- Wessels, M., König, G. M., & Wright, A. D. (1999). A new tyrosine kinase inhibitor from the marine brown alga *Stypopodium zonale*. *Journal of Natural Products*, 62(6), 927–930. <https://doi.org/10.1021/np990010h>
- Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, 551(7680), 313–320. <https://doi.org/10.1038/nature24624>
- Wilkins, M. R., Sanchez, J.-C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>
- Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S., Broadhurst, D., Jarvis, R., Stephens, G. M., & Goodacre, R. (2008). Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Analytical Chemistry*, 80(8), 2939–2948. <https://doi.org/10.1021/ac7023409>
- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H.-C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances?, *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_1
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Camara, M., & Williams, P. (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *Journal of Bacteriology*, 182(22), 6401–6411. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6401-6411.2000>
- Witt, V., Wild, C., & Uthicke, S. (2011). Effect of substrate type on bacterial community composition in biofilms from the Great Barrier Reef. *FEMS Microbiology Letters*, 323(2), 188–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02374.x>
- Wood, G. C., Chu, X., Argyropoulos, G., Benotti, P., Rolston, D., Mirshahi, T., et al. (2017). A multi-component classifier for nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) based on genomic, proteomic, and phenomic data domains. *Scientific Reports*, 7(1), 43238. <https://doi.org/10.1038/srep43238>
- Wright, R. J., Bosch, R., Langille, M. G. I., Gibson, M. I., & Christie-Oleza, J. A. (2021). A multi-OMIC characterisation of biodegradation and microbial community succession within the PET plastisphere. *Microbiome*, 9(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01054-5>
- Wu, H. C., Dachet, F., Ghoddoussi, F., Bagla, S., Fuerst, D., Stanley, J. A., et al. (2017). Altered metabolomic-genomic signature: A potential noninvasive biomarker of epilepsy. *Epilepsia*, 58(9), 1626–1636. <https://doi.org/10.1111/epi.13848>
- Wu, Z., Wu, Y., Huang, Y., He, J., Su, P., & Feng, D. (2021). Insights into the planktonic to sessile transition in a marine biofilm-forming *Pseudoalteromonas* isolate using comparative proteomic analysis. *Aquatic Microbial Ecology*, 86, 69–84. <https://doi.org/10.3354/ame01959>
- Xu, X.-W., Wu, Y.-H., Wang, C.-S., Gao, X.-H., Wang, X.-G., & Wu, M. (2010). (2010). *Pseudoalteromonas lipolytica* sp. nov., isolated from the Yangtze River estuary. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2176–2181. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017673-0>
- Yang, J. Y., Sanchez, L. M., Rath, C. M., Liu, X., Boudreau, P. D., Bruns, N., et al. (2013). Molecular networking as a dereplication strategy. *Journal of natural products*, 76(9), 1686–1699. <https://doi.org/10.1021/np400413s>

- Yang, L. H., Xiong, H., Lee, O., Qi, S.-H., & Qian, P. (2007). Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. *Letters in applied microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02125.x>
- Yaniv, K., Golberg, K., Kramarsky-Winter, E., Marks, R., Pushkarev, A., Béjà, O., & Kushmaro, A. (2017). Functional marine metagenomic screening for anti-quorum sensing and anti-biofilm activity. *Biofouling*, 33(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1253684>
- Yates, J. R., Ruse, C. I., & Nakorchevsky, A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11(1), 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934>
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2), 75–104. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>
- Yu, G.-H., He, P.-J., & Shao, L.-M. (2009). Characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) fractions from excess sludges and their effects on bioflocculability. *Bioresource Technology*, 100(13), 3193–3198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.009>
- Yu, R., Hou, C., Liu, A., Peng, T., Xia, M., Wu, X., et al. (2018). Extracellular DNA enhances the adsorption of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* strain ST on chalcopyrite surface. *Hydrometallurgy*, 176, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.01.018>
- Zaccaria, A. (2013). *Nouvelles stratégies pour l'analyse protéomique du tissu cérébral et des fluides biologiques dans la maladie de Parkinson* (phdthesis). Université de Grenoble. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00820156>
- Zamboni, N., Saghatelian, A., & Patti, G. J. (2015). Defining the metabolome: Size, flux, and regulation. *Molecular Cell*, 58(4), 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.021>
- Zhang, D., Pan, X., Mostofa, K. M. G., Chen, X., Mu, G., Wu, F., et al. (2010). Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: An application of fluorescence spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.011>
- Zhang, Q., Zheng, X., Wang, Y., Yu, J., Zhang, Z., Dele-Osibanjo, T., et al. (2018). Comprehensive optimization of the metabolomic methodology for metabolite profiling of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9095-1>
- Zhang, W., Ding, W., Li, Y.-X., Tam, C., Bougouffa, S., Wang, R., et al. (2019). Marine biofilms constitute a bank of hidden microbial diversity and functional potential. *Nature Communications*, 10(1), 517. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08463-z>
- Zhang, Xi, Ferguson-Miller, S. M., & Reid, G. E. (2009). Characterization of ornithine and glutamine lipids extracted from cell membranes of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(2), 198–212. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.08.017>
- Zhang, Xiaoqi, & Bishop, P. L. (2003). Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*, 50(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3)
- Zhang, Xuan, & Chen, H. (2012). Metabolomics: Concept, methods and potential prospect in marine biology. *Chinese Science Bulletin*, 57(25), 3253–3261. <https://doi.org/10.1007/s11434-012-5237-5>
- Zhang, Y., Pei, G., Chen, L., & Zhang, W. (2016). Metabolic dynamics of *Desulfovibrio vulgaris* biofilm grown on a steel surface. *Biofouling*, 32(7), 725–736. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1193166>
- Zheng, X., Cheng, Q., Yao, F., Wang, X., Kong, L., Cao, B., et al. (2017). Biosynthesis of the pyrrolidine protein synthesis inhibitor anisomycin involves novel gene ensemble and cryptic biosynthetic steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(16), 4135–4140. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701361114>

Zinger-Yosovich, K., Sudakevitz, D., Imberty, A., Garber, N. C., & Gilboa-Garber, N. (2006). Production and properties of the native *Chromobacterium violaceum* fucose-binding lectin (CV-IIL) compared to homologous lectins of *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IIL) and *Ralstonia solanacearum* (RS-IIL). *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 2), 457–463. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28500-0>

Nathan CARRIOT

Laboratoire MAPIEM, Université de Toulon

Caractérisation de la production métabolique biofilms marins. Vers une application à l'étude de biofilms complexes formés *in situ*.

Le phénomène de *biofouling* est un processus naturel qui impacte toutes les surfaces immergées en milieu marin engendrant des problèmes économiques et écologiques majeurs à l'échelle planétaire. Il est notamment induit par la formation de biofilms marins correspondant à la colonisation des surfaces immergées par des bactéries s'organisant en communautés en s'entourant d'une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS). L'objectif de ce travail est l'utilisation et le développement de méthodologies permettant l'étude et la compréhension de l'étape précurseur de ce phénomène. La corrélation des données récoltées à partir des méthodes appliquées (métabolomique et réseau moléculaire, protéomique, dosages colorimétriques, microscopies, spectroscopies) permet une approche multi-échelles pour la caractérisation des biofilms. Ces développements visent, en premier lieu, à caractériser la production biochimique globale de biofilms *in vitro* pour ensuite analyser des biofilms naturels formés *in situ*. L'utilisation de ce large panel de techniques a permis de répondre à certaines questions scientifiques comme l'impact des nutriments (phosphates), d'une enzyme (*quorum sensing*) ou de l'hydrodynamisme sur la nature de biofilms formés.

Mots-clés : Métabolomique ; réseaux moléculaires ; analyse multi-omiques ; biofilms marins, EPS

Characterization of the metabolic production of marine biofilms. Towards an application to the study of complex biofilms *in situ*.

The phenomenon of biofouling is a natural process that impacts all the surfaces submerged in the marine environment, generating major economic and ecological problems on a global scale. It is induced by the formation of marine biofilms corresponding to the colonization of submerged surfaces by bacteria organizing in communities by surrounding themselves with a matrix of extracellular polymeric substances (EPS). The objective of this work is the use and development of methodologies to study and understand the precursor stage of this phenomenon. The correlation of the data collected from the applied methods (metabolomics and molecular network, proteomics, colorimetric assays, microscopies, spectroscopy) allows a multi-scale approach for the characterization of biofilms. These developments aim, first of all, to characterize the overall biochemical production of *in vitro* biofilms and then analyse natural biofilms formed *in situ*. The use of this wide range of techniques has made it possible to answer certain scientific questions such as the impact of nutrients (phosphates), an enzyme (quorum sensing) or hydrodynamics on the nature of formed biofilms.

Keywords: Metabolomics; molecular networks; multi-omic analysis; marine biofilms, EPS