

Offre de thèse

Caractérisation de la production métabolique et des propriétés physico-chimiques de biofilms marins

Vers une application à l'étude de biofilms complexes sur des surfaces antifouling

Etablissement d'inscription : Université de Toulon, Avenue de l'Université, 83130 La Garde, France

Ecole doctorale : ED 548 « Mer et Sciences » (<http://ed548.univ-tln.fr/>)

Unité de rattachement : Laboratoire MAPIEM (EA 4323) (<http://mapiem.univ-tln.fr/>)
Directeur : Pr Jean-François CHAILAN

Encadrement : Gérald CULIOLI (Directeur) & Annick ORTALO-MAGNE (Co-encadrante)

Type de financement : Contrat doctoral ministériel (3 ans)

Date de début de thèse : Automne 2018

Dossier de candidature : Le dossier nécessite **obligatoirement** une lettre de motivation, un CV et le relevé de notes du 1^{er} semestre du M2.
Les relevés de notes, les classements de M1 et de M2, ainsi que l'appui par deux référents sont fortement conseillés.
Les dossiers sont à envoyer à Gérald CULIOLI (culioli@univ-tln.fr).

Date limite de candidature : 15 juin 2018

Sélection : Les candidats retenus seront auditionnés par l'école doctorale la semaine du 2 au 6 juillet 2018.

Profil recherché : Diplôme d'ingénieur ou M2 orienté en biochimie ou en chimie analytique.
Des connaissances en métabolomique, chimiométrie et/ou microbiologie seraient un plus.
Capacité de synthèse et de rédaction.
Maîtrise de l'anglais (parlé et écrit).

Présentation détaillée du projet de thèse :

Contexte scientifique

Le phénomène de **biofouling** (*litt.* biosalissures) est un processus naturel qui impacte toutes les surfaces immergées en milieu marin, qu'elles soient naturelles ou artificielles (Flemming 2009). Il correspond à la colonisation de ces surfaces par une large gamme d'organismes marins impliquant non seulement des microorganismes (bactéries, microalgues...) mais également des macrocolonisateurs, tels que des algues ou des invertébrés (bryozoaires, crustacés...). Du fait des frais économiques que le *biofouling* engendre par la détérioration et l'obligation de maintenance des infrastructures marines, il constitue un problème majeur à l'échelle planétaire (Yebera *et al.* 2004; Schultz *et al.* 2011).

Le *biofouling* est formé par une succession d'étapes plus ou moins indépendantes les unes des autres mais il est généralement initié, dès les premières heures d'immersion, par la fixation de bactéries sur le substrat. Ces dernières s'organisent ensuite en agrégats nommés **biofilms marins** qui constituent des éléments-clés de la colonisation (Dang & Lovell 2016).

Ils forment des édifices tridimensionnels complexes et sont composés majoritairement de bactéries et de diatomées insérées dans une matrice de **substances polymériques extracellulaires (EPS)** sécrétées par les microorganismes eux-mêmes. La matrice polymérique est donc caractéristique des communautés microbiennes adhérentes dont elle assure la cohésion et l'environnement fonctionnel. Les EPS sont principalement de nature polysaccharidique et protéique. Ces biopolymères aux diverses propriétés servent aux microorganismes de couche de protection en englobant les cellules et en jouant ainsi un rôle de barrière physique et chimique (Flemming *et al.* 2016). Dans le milieu marin, où les éléments nécessaires à la croissance microbienne sont très dilués, les EPS peuvent aussi avoir un rôle de réserve nutritionnelle directe, leurs produits de dégradation servant de nutriments, ou indirecte par la rétention de solutés nutritifs. Du fait de la diversité de leurs structures chimiques et de leurs propriétés physico-chimiques, l'étude approfondie des EPS constitue une gageure expérimentale nécessitant l'utilisation combinée d'un large panel de techniques d'analyse (chromatographies, microscopies, spectroscopies...).

Dans la composition des biofilms, il est possible de distinguer un autre groupe de molécules formant le **métabolome** (défini comme l'ensemble des molécules de masse moléculaire inférieure à 1500 Da) exprimé par les microorganismes au sein de la matrice. Ces substances peuvent non seulement refléter directement l'état physiologique des cellules microbiennes, mais elles ont également la capacité de mettre en relief la communication chimique intervenant entre ces cellules au sein du biofilm. L'étude de cette composante moléculaire peut être menée de façon globale via une approche de métabolomique, la plus récente des techniques dites « omiques ». Les données obtenues lors d'analyses métabolomiques sont d'une grande utilité dans une large gamme d'applications ayant toutes pour but ultime de comprendre les causes et/ou les effets de processus biologiques dans un organisme (Johnson *et al.* 2016).

Si ces informations concernant la composition biochimique de la matrice constituent un point de départ pour la compréhension de la formation et de la résistance induite par les biofilms marins, la détermination des **propriétés physico-chimiques et mécaniques de la matrice** telles que la viscosité, le ralentissement de la diffusion ou la sorption de différentes entités chimiques, s'affichent de plus en plus comme une nécessité afin de déterminer les fonctions exactes des biomolécules produites par les bactéries au sein des biofilms (Decho *et al.* 2017).

Au niveau de la lutte *antifouling*, de telles connaissances sont primordiales car, en modifiant les propriétés physico-chimiques des surfaces colonisées et en favorisant ou inhibant la colonisation ultérieure par d'autres organismes marins (algues, invertébrés...), les biofilms marins jouent un rôle clé dans le phénomène général de *biofouling* (Qian *et al.* 2007).

Le but de cette thèse sera de poursuivre les développements méthodologiques initiés récemment au laboratoire (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), et de caractériser dans un premier temps la production métabolique globale (analyses combinées des métabolites et des EPS) de biofilms formés *in vitro* par des souches-modèles de bactéries marines issues de la souchothèque du laboratoire MAPIEM (TC : Toulon Collection). A ces données seront corrélées celles issues de l'étude des propriétés physico-chimiques et mécaniques de ces mêmes biofilms. Pour cela des analyses statistiques permettant la fusion de jeux de données variés seront appliquées (ex. : approches multi-blocs). L'originalité des études envisagées dans ce projet de thèse réside dans les corrélations qui pourront être réalisées d'une part, entre la composante matricielle (EPS) des biofilms et leur production en métabolites, et d'autre part, entre la composition biochimique des biofilms (EPS et métabolites) et leurs propriétés macroscopiques (physico-chimiques et mécaniques). Les méthodologies ainsi développées pourront ensuite être appliquées à des systèmes plus complexes, à savoir des biofilms formés *in situ* après immersion de différents types de revêtements *antifouling*.

La problématique développée dans la cadre de cette thèse de doctorat est entièrement intégrée au projet quinquennal du laboratoire MAPIEM dans le volet correspondant à la caractérisation multi-échelles de biofilms formés *in vitro* et *in situ* (<http://mapiem.univ-tln.fr/Microbial-Chemical-Ecology-of-marine-Biofilms-MCEB.html>). Globalement, par leur sujet d'étude (biofilms marins, *biofouling*, lutte *antifouling*) et leur caractère pluridisciplinaire (chimie/biologie), les travaux envisagés s'insèrent totalement dans les thématiques du pôle Mer, Environnement et Développement Durable (MEDD) de l'Université de Toulon ainsi que dans celles du GDR n°3658 « *Médiation chimique dans l'environnement- Ecologie Chimique* » auquel émerge le laboratoire MAPIEM. En outre, les protocoles et méthodologies développées durant cette thèse pourront être appliqués à des échantillons de biofilms provenant de programmes de recherche venant de débiter (RESSAC : financement DGA 2018-2020) ou en cours de soumission (projet ARC, Australie).

Organisation des travaux de thèse :

A - Etude de **biofilms formés *in vitro*** à partir de souches-modèles de bactéries marines :

- 1 - Développement de protocoles analytiques spécifiquement dédiés au **profilage biochimique de la matrice de biofilms bactériens** :
 - a) Optimisation de protocoles d'**échantillonnages de biofilms**,
 - b) Développement de méthodologies variées de **profilage des EPS** (dosages, protéomique, HPSEC, spectroscopies, microscopies ...),
 - c) Etude de la **variabilité de la composition matricielle** en fonction de différents paramètres de culture (milieu, type de surface, présence d'un biocide ...),
 - d) Utilisation de méthodes de traitement statistique adaptées aux différents types de données issues des **signatures matricielles** des biofilms.

- 2 - Recherche de **biomarqueurs de biofilms** par métabolomique non-ciblée :
 - a) Mise en œuvre du **profilage métabolique** (principalement par LC-MS et GC-MS) de biofilms,
 - b) Recherche de biomarqueurs par comparaison de l'expression métabolique de ces biofilms en fonction de différents paramètres de culture.
 - c) Identification de ces marqueurs chimiques
- 3 - Caractérisation des **propriétés physico-chimiques et mécaniques de biofilms** issus de de cultures *in vitro* (AFM, rhéométrie ...).
- 4 - Utilisation de méthodes statistiques dédiées à l'établissement de **signatures biochimiques globales** (EPS et métabolome) des biofilms-modèles et à la corrélation de ces données avec leurs propriétés macroscopiques.

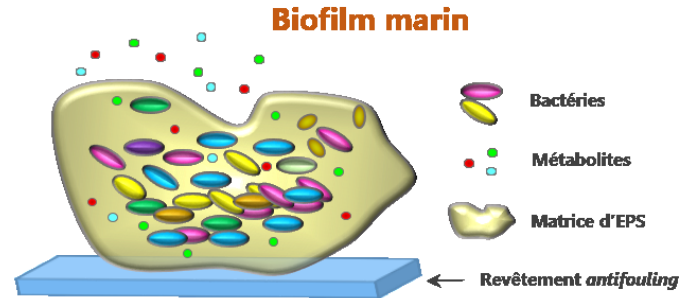
B- Application des méthodologies développées en A) à la caractérisation de **biofilms naturels complexes** formés *in situ* sur différents types de revêtements *antifouling*.

Références bibliographiques :

- Brian-Jaisson F., Molmeret M., Fahs A., Guentas-Dombrowsky L., Culioli G., Blache Y., Cérantola S., Ortalo-Magné A. (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.
- Dang H., Lovell C. R. (2016). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80(1): 91-138.
- Decho A. W., Gutierrez T. (2017). Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Front. Microbiol.* 8(922).
- Favre L., Ortalo-Magné A., Pichereaux C., Gargaros A., Burlet-Schiltz O., Cotelle 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.
- Favre L., Ortalo-Magné A., Greff S., Pérez T., Thomas O. P., Martin J.-C., Culioli G. (2018) Discrimination of four marine biofilm-forming bacteria by LC-MS metabolomics and influence of culture parameters. *J. Proteom. Res.* 16(5): 1962-1975.
- Flemming H.-C. (2009). Why microorganisms live in biofilms and the problem of biofouling. In *Marine and Industrial Biofouling* (Flemming, H.-C., Murthy P. S., Venkatesan R. & Cooksey K., editors), 3-12. Springer, Berlin.
- Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A., Kjelleberg S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(9): 563-575.
- Johnson C. H., Ivanisevic J., Siuzdak G. (2016). Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17(7): 451-459.
- Qian P. Y., Lau S. C., Dahms H. U., Dobretsov S., Harder T. (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Mar Biotechnol.* 9:399-410.
- Schultz M. P., Bendick J. A., Holm E. R., Hertel W. M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling.* 27: 87-98.
- Yebra D. M., Kiil S., Dam-Johansen K. (2004). Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat.* 50: 75-104.

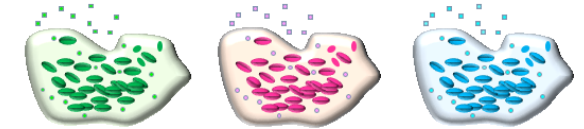
Schéma récapitulatif du projet de thèse

Objectif
Meilleure compréhension de la formation des biofilms marins et du *biofouling*



① Sélection de souches modèles de bactéries marines issues de biofilms naturels

Caractérisation de la production métabolique et des propriétés physico-chimiques de biofilms marins



② Développement d'une approche pluridisciplinaire dédiée à la caractérisation des biofilms

③ Application à l'étude de biofilms naturels formés *in situ* sur des revêtements antifouling

