

THÈSE

UNIVERSITÉ DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

École doctorale : Sciences exactes et leurs applications (ED 211)

Présentée et soutenue le 11 décembre 2018

par **Claudie BARNIER**

pour obtenir le grade de docteur
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

Spécialité :

**Physiologie & Biologie des Organismes -
Populations - Interactions**

**Biodiversité et fonctionnalité des biofilms oléolytiques
en milieu marin**

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- Maëlle MOLMERET Professeure / Université de Toulon
- Guillermina HERNANDEZ-RAQUET Directrice de recherche / Université de Toulouse

EXAMINATEUR

- Raphaël LAMI Maître de Conférences / Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

DIRECTEURS

- Régis GRIMAUD Professeur / Université de Pau et des Pays de l'Adour
- Laurent URIOS Ingénieur de recherche / Université de Pau et des Pays de l'Adour



REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire IPREM (Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux), UMR 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour. Je remercie son directeur Ryszard Lobinski pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapportrices, Madame Maëlle Molmeret et Madame Guillermina Hernandez Raquet pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie également Raphaël Lami de participer à mon jury de thèse.

Je remercie mes directeurs de thèse, Régis Grimaud et Laurent Urios, pour leur grande implication. J'ai vraiment apprécié la franchise de nos rapports durant ces trois années. Je garderai en mémoire vos sens de l'humour bien à vous, ainsi que votre ouverture d'esprit lors de nos débats enflammés. Sur ces trois ans j'ai pu me sentir libre de mener cette thèse à mon idée tout en me sentant solidement encadrée. Merci pour votre patience et votre disponibilité, et ce, particulièrement en cette rude fin de thèse. Je garderai une pensée pour vous les mains dans la pâte à cookies ! Merci également à Pierre, dont l'œil avisé n'était jamais bien loin des grandes réflexions.

Un grand merci à Florence Hakil, devenue incontournable au labo. Impossible de se passer de tes conseils. Merci infiniment pour ta disponibilité, tes gros coups de main et ton précieux soutien. Tu devrais porter une cape au labo !

Je suis également extrêmement reconnaissante à François Rigal pour avoir régulièrement pris le temps de discuter avec nous des analyses stats que nous pouvions utiliser pour faire parler nos données. Et également un grand merci pour le coup de main de la dernière ligne droite.

Merci également à toute l'équipe de Banyuls et en particulier à Raphaël Lami pour son accueil. Merci à Philippe Lebaron de nous avoir donné l'accès à la collection MOLA. Laurent, je te remercie pour ta disponibilité malgré ton emploi du temps de ministre. Sans toi ce criblage n'aurait certainement pas été possible. Steph, Léa, Elo, Elisa merci pour les pauses déjeuner, les pauses clopes et merci d'avoir rendu les soirées banyulencques moins solitaires.

Bien entendu je remercie chaleureusement mes compagnons de galère d'hier et d'aujourd'hui pour leur soutien, les grandes discussions scientifiques (ou pas), les repas de midi, les soirées. Grâce à vous Pau est devenue moins terrible... Dans le désordre merci Manu, Joyce, Elise, Marine, Manon, Boussad, Sara, Etienne, Cyril, Eliz, Théo, Mathilde, Zeina, Sandrine, Vaness, Eva, Emna. Je pense également aux copines de Gif-sur-Yvette qui ont participé à ma formation quand je n'étais qu'une stagiaire de M2 un peu gauche et angoissée, Paupau, Almu, merci !

Parmi les palois je n'oublie pas non plus le sourire et la bienveillance de Maryse et Elizabeth. Je remercie également Claire, Anne et Marion pour leur disponibilité et tous les petits conseils et services rendus.

Merci à Elodie, Fanny, Marion et Izaline, les stagiaires qui ont participé à faire avancer ce projet de thèse. Vous encadrer m'a beaucoup appris.

Je remercie toutes les personnes croisées au cours de ces dernières années d'études qui m'ont donné envie d'en être. Je pense particulièrement à Florence Wisniewsky, Denis Faure et Yves Dessaux.

Je remercie mon Papa qui m'a inspiré le goût du savoir et qui a toujours su cultiver ma curiosité. Merci de m'avoir toujours laissée faire mes choix comme je l'entendais. Je pense également plus largement à ma famille, les taties, les tontons, les couz', merci pour votre bonne humeur et votre soutien ! Et puis il y a la famille de cœur qui m'a également tant apporté, Natacha, Zaza, et ma roomie Sophie. Merci à tous les copains de Lyon, de Paris et d'ailleurs. Je ne peux pas citer toutes les personnes que j'aime et qui sont tous les petits soleils de ma vie mais je vous porte dans mon cœur et je n'oublie pas ce que je vous dois !

Enfin je souhaite exprimer ma gratitude aux personnes qui ne sont plus là pour lire ces lignes. À ma Maman qui m'a donné l'envie d'y croire toujours et de ne jamais baisser les bras. À ma Mamie, dans le regard de laquelle j'ai toujours eu le sentiment d'être exceptionnelle. C'est à ton amour inconditionnel et à la confiance que tu avais en moi que je me raccroche quand plus rien ne va. J'espère vous rendre fières de là où vous vous trouvez.

Merci à tous.



SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	2
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	6
CHAPITRE I :.....	8
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
1. DÉGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE PARTICULAIRE EN MILIEU MARIN	9
1.1. CYCLE DU CARBONE EN MILIEU MARIN.....	9
1.2. COMPOSITION DE LA MATIÈRE ORGANIQUE PARTICULAIRE ET ORIGINE DU POC.....	11
1.2.1. Les composés organiques hydrophobes en milieu marin.....	11
1.2.1.1. Les lipides.....	11
1.2.1.2. Les hydrocarbures.....	12
1.2.2. Propriétés des COH.....	14
1.2.3. Concept de biodisponibilité, le cas des COH.....	14
1.3. BIODÉGRADATION DU POC ET EN PARTICULIER DES COH.....	16
1.3.1. Assimilation des COH.....	16
1.3.2. Métabolisme des hydrocarbures.....	16
1.3.3. Assimilation des lipides.....	19
1.3.4. Les biofilms oléolytiques comme stratégie bactérienne d'assimilation des COH.....	20
2. LES BIOFILMS SUR SURFACE NUTRITIVE - BIOFILM LYTIQUE	21
2.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES BIOFILMS	21
2.1.1. Les adhésines, appendices de la colonisation d'une particule	22
2.1.2. Régulation de la formation d'un biofilm.....	24
2.1.3. Systèmes de transduction du signal à deux composants	24
2.1.3.1. La voie du di-guanosine monophosphate cyclique (diGMPc).....	24
2.1.3.2. Le chimiotactisme	25
2.1.3.3. Le <i>quorum-sensing</i>	25
2.2. ÉCOLOGIE DES BIOFILMS	25
2.3. BIOFILMS SUR SURFACE NUTRITIVE EN MILIEU MARIN.....	26
2.4. MÉCANISMES D'ADHÉSION AUX COH	26
3. COMPORTEMENTS SOCIAUX AU SEIN DES BIOFILMS	27
3.1. LES COMPORTEMENTS SOCIAUX	28
3.1.1. Mutualisme / coopération.....	28
3.1.2. Cheating = triche.....	30
3.1.3. Communication / <i>quorum-sensing</i>	31
3.1.4. Compétition	32
3.2. LES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES : UN ENVIRONNEMENT FAVORABLE À L'ÉTABLISSEMENT DE COMPORTEMENTS SOCIAUX.....	34

CHAPITRE II : 36**MATÉRIEL ET MÉTHODES 36**

1. CULTURE DES SOUCHES BACTÉRIENNES.....	37
1.1. SOUCHES CRIBLÉES ISSUES DE COLLECTIONS.....	37
1.2. SOUCHES ISOLÉES PAR ENRICHISSEMENT SUR COH.....	37
2. CONDITIONS DE CULTURE DES SOUCHES BACTÉRIENNES.....	39
3. DÉTERMINATION DE LA GAMME DE SUBSTRATS SOLUBLES.....	41
4. ÉTUDE DES CAPACITÉS D'ADHÉSION ET DE FORMATION DE BIOFILM.....	41
4.1. CRIBLAGE DES BIOFILMS.....	41
4.1.1. Biofilms sur COH solides.....	41
4.1.1.1. Préparation des plaques 24 puits.....	41
4.1.1.2. Cultures bactériennes et inoculation des plaques 24 puits.....	41
4.1.1.3. Révélation des biofilms au cristal violet.....	42
4.1.1.4. Quantification de la biomasse adhéree.....	42
4.1.2. Biofilms sur interfaces inertes.....	43
4.2. ÉTUDE DE L'ADHÉSION EN MICROSCOPIE CONFOCALE À ÉPIFLUORESCENCE.....	43
4.3. ÉVALUATION DU CARACTÈRE HYDROPHOBE DES SURFACES UTILISÉES DANS CETTE ÉTUDE.....	44
4.4. QUANTIFICATION DE LA DÉGRADATION DES COH PAR LES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES.....	44
4.4.1. Culture des souches.....	44
4.4.2. Chromatographie en couche mince (CCM).....	45
5. MESURE DE L'ACTIVITÉ LIPASE DANS DES CULTURES SUR HEXADÉCANE ET TRIOLÉINE.....	45
6. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE SIGNAUX QUORUM-SENSING.....	46
7. ANALYSES BIO-INFORMATIQUES ET BIO-STATISTIQUES.....	47
8. MATÉRIEL ET MÉTHODES SPÉCIFIQUES À LA CARACTÉRISATION DE LA SOUCHE MOLA 401.....	48
8.1. LA SOUCHE MOLA 401 ET SES PROCHES PARENTES.....	48
8.2. TESTS PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES.....	48
8.3. CROISSANCE ET QUANTIFICATION DES BIOFILMS.....	49
8.3.1. Biofilms sur polystyrène.....	49
8.3.2. Biofilms sur COH.....	49
8.4. DÉTECTION DE LA PRODUCTION D'AHLS.....	49
8.5. ANALYSES GÉNOMIQUES.....	50
8.6. ANALYSES STATISTIQUES.....	51

CHAPITRE III : 53**BIODIVERSITÉ DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES 53**

1. INTRODUCTION DU CHAPITRE.....	54
2. BIODIVERSITÉ DES SOUCHES CAPABLES DE FORMER UN BIOFILM OLÉOLYTIQUE.....	55
2.1. L'ENRICHISSEMENT SUR COH PERMET L'ISOLEMENT DE SOUCHES APPARTENANT À DES GENRES TYPIQUES DES BACTÉRIES HYDROCARBONOCLASTES.....	55
2.2. LES SOUCHES CAPABLES DE FORMER UN BIOFILM OLÉOLYTIQUE COUVRENT UNE GRANDE DIVERSITÉ TAXONOMIQUE.....	57
2.3. DÉGRADATION DES COH PAR LES SOUCHES FORMANT DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES.....	62
2.4. ÉTABLISSEMENT DE GROUPES PHÉNOTYPIQUES SELON LES CAPACITÉS DES SOUCHES À FORMER UN BIOFILM OLÉOLYTIQUE.....	63
3. CONCLUSION DU CHAPITRE.....	66

CHAPITRE IV :	68
ÉTUDE FONCTIONNELLE DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES	68
1. INTRODUCTION DU CHAPITRE	69
2. ÉTUDE FONCTIONNELLE DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES	70
2.1. ÉTUDE DE LA GAMME DE SUBSTRATS SOLUBLES ET POLYMÉRIQUES ASSIMILABLES PAR UN SOUS-ÉCHANTILLONNAGE DE SOUCHES ISSUES DU CRIBLAGE	70
2.2. CORRÉLATION ENTRE LA CAPACITÉ À FORMER UN BIOFILM SUR ALCANE ET SUR LIPIDE	73
2.3. MESURE DE L'ACTIVITÉ LIPASE DANS LES CULTURES DE SOUCHES OLÉOLYTIQUES	73
2.4. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ À FORMER UN BIOFILM OLÉOLYTIQUE SUR UNE SURFACE INERTE HYDROPHOBE OU HYDROPHILE	75
2.5. MESURE DE L'ADHÉSION DES SOUCHES SUR COH ET SURFACES INERTES	77
2.6. ÉTUDE DU POTENTIEL FONCTIONNEL COMMUN AUX SOUCHES CAPABLES DE FORMER UN BIOFILM OLÉOLYTIQUE : ANALYSE DES COG	78
3. CONCLUSION DU CHAPITRE	84
CHAPITRE V :	86
COMPORTEMENTS SOCIAUX AU SEIN DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES	86
1. INTRODUCTION DU CHAPITRE	87
2. ÉTUDE DE COMPORTEMENTS SOCIAUX	88
2.1. RECHERCHE DE SYSTÈMES <i>QUORUM-SENSING</i> ASSOCIÉS AUX BIOFILM OLÉOLYTIQUES	88
2.2. ÉTUDE DES COMPORTEMENTS COMPÉTITIFS OU SYNERGIQUES POUVANT S'ÉTABLIR ENTRE 2 SOUCHES AU SEIN D'UN BIOFILM OLÉOLYTIQUE	89
3. CONCLUSION DU CHAPITRE	93
CHAPITRE VI :	95
<i>PALLERONIA RUFA MOLA 401^T</i>, SOUCHE OLÉOLYTIQUE	95
1. INTRODUCTION DU CHAPITRE	96
2. DESCRIPTION DE <i>PALLERONIA RUFA</i> SP. NOV., UN NOUVEAU MEMBRE DES <i>RHODOBACTERACEAE</i>	97
3. ÉTUDES DES CAPACITÉS OLÉOLYTIQUES DE <i>MOLA 401^T</i> ET DE SES PLUS PROCHES PARENTES	111
4. ÉTUDE DE LA DÉTECTION DE LA PRODUCTION <i>QUORUM-SENSING</i> EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE	113
5. CONCLUSION DU CHAPITRE	115
CONCLUSION GÉNÉRALE	117
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
ANNEXES	143

LISTE DES ABRÉVIATIONS

POM : *Particulate Organic Matter* – Matière organique particulaire
POC : *Particulate Organic Carbon* - Carbone organique particulaire
DOM : *Dissolved Organic Matter* - Matière organique dissoute
DOC : *Dissolved Organic Carbon* - Carbone organique dissous
RDOM / RDOC : *Refractory DOM / Refractory DOC*
HC : Hydrocarbure
AG : Acide Gras
TG : Triglycéride
QS : *quorum-sensing*
AHL : Acyl-homosérine lactone
AI-1 / AI-2 : Autoinducteur de type 1 / Autoinducteur de type 2
COH : Composé Organique Hydrophobe
HC(O)B : Hydrocarbonoclastic (Obligate) bacteria – Bactérie hydrocarbonoclaste (obligatoire)
MB : Marine Broth
MBmin : Marine Broth minimum
EMS : Eau de Mer Synthétique
GALP : mélange de Glucose, Acétate, Lactate, Pyruvate
Gpe : groupe
POCP : *Percentage Of Conserved Proteins*
AAI : *Amino acid identity*
ANI : *Average nucleotide identity*
COG : Cluster of Orthologous Group of proteins
NAPL : Phase liquide non aqueuse
DO : Densité optique
Tris : trishydroxyméthylaminométhane
NADH/NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
rpm : rotations par minute
v/v : volume à volume
m/v : masse à volume

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I-1 : Modèle du continuum « taille – réactivité » (adapté de Benner & Amon [20])	10
Figure I-2 : Principaux processus impliqués dans le cycle du carbone en milieu marin (d'après Jiao <i>et al.</i> [65]).....	10
Figure I- 3 Représentation schématique des estimations en pourcentage des apports totaux des sources d'hydrocarbures dans les océans.....	12
Tableau I-1 : Diversité des principaux COH détectés en milieu marin (en gras les classes de COH spécifiquement étudiées au cours de cette thèse).....	13
Figure I-3 : Processus de biodégradation des HOC et le concept de biodisponibilité (D'après Mounier [93]).....	15
Figure I-4 : Voie de dégradation des alcanes chez <i>P. putida</i> GPo1, rôle et localisation cellulaire des protéines Alk (adapté de Grant <i>et al.</i> [52] ; vanBeilen <i>et al.</i> [19] ; Witholt <i>et al.</i> [268]).....	18
Figure I-5 : Aperçu de la gamme des alcanes pris en charge par les alcanes hydroxylases (d'après van Beilen et Funhoff [23]).....	19
Figure I-6 : Voie de dégradation des acides gras à longue chaîne (d'après Jimenez-Diaz <i>et al.</i> [66]).....	20
Figure I-7 : <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17 forme des biofilms sur HC et lipides [74,94]	21
Figure I-8 : Biofilm, de l'adhésion au détachement des cellules (adapté de Koo <i>et al.</i> [134]).....	23
Tableau I-2 : Exemples de bien publics potentiellement retrouvés dans une population adhérente à une surface nutritive (d'après West <i>et al.</i> [147]).....	29
Figure I-9 : Solubilisation du POC par le biofilm lytique en DOC assimilable.....	30
Figure I-10 : Schématisation de la colonisation et de l'assimilation du POC régulée par les interactions environnementales et cellulaires.....	33

CHAPITRE II : MATERIEL ET MÉTHODES

Figure II-1 : Localisation des échantillonnages effectués dans la lagune de Bizerte.....	38
Figure II-2 : Tracé de l'expédition « FACEiT » en mer du Nord.....	39
Tableau II-1 : Milieux pour la culture des souches issues de collections internationales (hors MOLA) ou de don.....	40
Tableau II-2 : Exemple de valeurs de quantification après coloration au cristal violet de puits ne contenant que du milieu minimum.....	43
Figure II-3 : Fonctionnement général de systèmes biosenseurs d'AI (d'après Rai <i>et al.</i> [194])... 46	46
Tableau II-3 : Biosenseurs des autoinducteurs du <i>quorum-sensing</i>	47
Tableau II-4 : Description détaillée des analyses statistiques réalisées.....	48

CHAPITRE III : BIODIVERSITÉ DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES

Tableau III-1 : Informations relatives aux souches isolées par enrichissement sur COH : taxonomie, échantillonnage, isolement, capacité à former un biofilm sur paraffine (P) ou tristéarine (T).....	55
Figure III-1 : Comparaison de la diversité taxonomique (au rang du phylum) de la sélection réalisée parmi les collections bactériennes et celle décrite par Zinger <i>et al.</i> [272].....	59

Figure III-2 : Habitats des souches sélectionnées pour le 1 ^{er} criblage (a) et pour le 2 nd criblage (b).....	59
Figure III-3 : Zones géographiques (représentées par des étoiles rouges) où ont été échantillonnées les souches sélectionnées lors du 1 ^{er} et du 2 nd criblage. Le détail pour chaque souche est donné en annexe 1.....	60
Figure III-4 : Position taxonomique des souches capables de former un biofilm oléolytique sur (A) : paraffine et tristéarine après 4 jours d'incubation et (B) : paraffine, tristéarine, acide palmitique et hexadécyl palmitate après 4 ou 13 jours d'incubation.....	61
Figure III-5 : Dégradation de la paraffine, de la tristéarine, de l'acide palmitique et de l'hexadécyl palmitate par un sous-échantillonnage de souches étudiées dans ce criblage.....	62
Figure III-6 : Classification des souches criblées pour leur capacité à former un biofilm oléolytique (heatmap réalisée à partir d'une classification hierarchique ascendante ordonnée avec la méthode Ward).....	64

CHAPITRE IV : ÉTUDE FONCTIONNELLE DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES

Tableau IV- 1 : Gamme de substrats hydrosolubles et polymériques assimilables comme seule source de carbone par une sous-sélection de souches représentant les différents groupes phénotypiques (Gpe) définis par classification des résultats de criblage.....	71
Figure IV-1 : Corrélation entre la capacité des souches à former un biofilm sur paraffine et sur l'un des 3 lipides (tristéarine, acide palitique et hexadécyl palmitate).....	74
Figure IV-2 : Concentration d'activité lipase en micromole/seconde/L.....	75
Figure IV-3 : Moyennes des angles de contact avec le milieu de culture mesurés sur une lame en verre, le polystyrène des plaques 24 puits utilisées pour les cultures de biofilm, la paraffine (P), la tristéarine (T), l'acide palmitique (AP) et l'hexadécyl palmitate (HP).	76
Figure IV-4 : Quantification des biofilms formés sur COH, polystyrène et verre des souches représentant les groupes phénotypiques 1 à 8 définis ci-dessus.....	77
Figure IV-5 : Aire moyenne couverte par les cellules adhérentes sur lame de paraffine, tristéarine, polystyrène et verre évaluée par observation microscopique des cellules colorées à l'acridine orange après 3 h d'adhésion.	78
Tableau IV- 2 : Coefficients de Spearman calculés sur les valeurs de biofilm en fonction de l'adhésion sur paraffine, tristéarine, polystyrène et verre.....	Erreur ! Signet non défini.
Tableau IV-3 : Abondance des COG affiliés aux fonctions (a) (b) (c) NADPH oxydo-réductase (COG : 2070, 0543, 2904), Rubredoxine (COG1773), Acyl-CoA binding protein (COG4281), du métabolisme des lipides (COG : 1398, 5380, 3540, 1075) et (c) de production du système de sécrétion de type VI (COG : 3501, 4104, 3521, 3455, 3518, 3519, 3520, 3522, 3523, 3516, 3157, 3517, 3456).....	80

CHAPITRE V : COMPORTEMENTS SOCIAUX AU SEIN DES BIOFILMS OLÉOLYTIQUES

Tableau V-1 : Combinaisons des souches étudiées en biofilm mix (P : Paraffine ; T : Tristéarine ; AP : Acide palmitique ; HP : hexadécyl palmitate. Les pentes ont été calculées avec un $r^2 > 0,9$).	89
Figure V-1 : Quantification des biofilms oléolytiques mix et individuels correspondant aux 10 couples testés pour l'étude des comportements sociaux sur paraffine, tristéarine, acide palmitique et hexadécyl palmitate.	92

CHAPITRE VI : *PALLERONIA RUFA* MOLA 401^T, SOUCHE OLÉOLYTIQUE

Tableau VI-1 : Comparaison des caractéristiques de la souche MOLA 401 ^T avec ses plus proches parentes.....	98
Tableau VI-2 Comparaison des profils d'utilisation de substrats et des activités enzymatiques entre la souche MOLA 401 ^T et ses plus proches parentes.....	99
Tableau VI-3. Composition en acides gras de la souche MOLA 401 ^T et de ses plus proches parentes.....	100
Tableau VI-4 : Production d'AHLs par la souche MOLA 401 ^T et ses plus proches parentes.	102
Figure VI-1 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S montrant le positionnement de la souche MOLA 401 ^T et de ses plus proches parentes.....	103
Figure VI-1 : Arbre phylogénétique base sur les sequences de <i>gyrB</i> montrant la position de MOLA 401 ^T et ses plus proches parentes.....	104
Figure VI-2 : Arbre phylogénétique base sur les sequences de core-gènes montrant la position de MOLA 401 ^T et ses plus proches parentes.....	105
Figure VI-3 : Quantité de biofilm produite sur polystyrene (Abs _{595 nm}).....	106
Figure VI-4 : Distribution de la comparaison des génomes de MOLA 401 ^T et de ses plus proches parentes (> 95 % d'identité des séquences des gènes de l'ARNr 16S) en fonction des valeurs AAI et POCP.....	107
Figure VI-6 : Quantité de biofilm produite par MOLA 401 ^T et ses plus proches parentes sur paraffine, tristéarine, tripalmitine, acide palmitique, hexadécyl palmitate, monopalmitine, monolaurine et hexadécanol.	112
Figure VI-7 : Cinétique de croissance de MOLA 401 ^T cultivée en MB ou en MBmin+GALP dans un Erlenmeyer ou en plaque 24 puits.	113
Figure VI-8 : Niveaux de fluorescence émis par <i>Pseudomonas putida</i> F117, biosenseur détectant les AHLs à longues chaînes, en présence des surnageants de MOLA 401 ^T cultivée en MB ou en MBmin+GALP dans un Erlenmeyer ou en plaque 24 puits.	114

Introduction générale

Les connaissances sur la dégradation de la matière organique particulaire s'inscrivent dans la compréhension du cycle géochimique du carbone en milieu marin. En effet, le carbone organique particulaire (POC) correspond à 25 % du carbone océanique total. D'origine naturelle et anthropique, il est principalement issu des produits de décomposition des organismes marins et de leurs fèces. Ces particules sont majoritairement constituées de polymères agrégés tels que des protéines, des polysaccharides et des composés organiques hydrophobes (COH). Parmi ces derniers, les hydrocarbures (HC) ont été largement étudiés du fait de leurs impacts environnementaux et sociétaux lors d'épisodes de pollution. Mais la part la plus importante des COH que représentent les lipides a, quant à elle, été très peu étudiée. Pourtant, la dégradation de cette classe de molécules, constituant majeur des membranes cellulaires et important réservoir énergétique, doit nécessairement être importante dans le recyclage du carbone en milieu marin. Des études menées sur les bactéries dégradant les HC, et plus particulièrement celles réalisées sur *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, la souche modèle de notre laboratoire, ont montré que certaines souches hydrocarbonoclastes sont non seulement capables de dégrader les HC, mais aussi les lipides. La singularité de la dégradation des COH réside dans leur hydrophobicité qui demande aux bactéries de développer des mécanismes particuliers rendant ces composés plus facilement accessibles. La formation d'un biofilm à l'interface eau / hydrocarbure a souvent été observée parmi ces mécanismes. *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 fait partie des souches formant un biofilm à la surface des hydrocarbures pour en faciliter leur assimilation. Chez cette souche, la formation de biofilm a également été observée pour l'assimilation des lipides. Ceci a permis d'introduire la notion de biofilm oléolytique : des biofilms se formant sur une surface nutritive hydrophobe (COH) et facilitant son assimilation. Ces biofilms constituent ainsi un environnement propice à la croissance, au maintien et à l'interaction des populations bactériennes dans un milieu marin extrêmement dilué et dynamique. L'état de l'art sur l'ensemble de ces notions est présenté dans le Chapitre 1.

Ainsi, ma thèse a visé à étendre nos connaissances sur la physiologie et l'écologie des biofilms oléolytiques en milieu marin. Pour cela, il nous a semblé primordial de commencer nos travaux par l'étude de la biodiversité des souches marines capables de former un biofilm oléolytique afin de i) déterminer si celle-ci se limite à la diversité décrite pour les bactéries hydrocarbonoclastes (HCB), et ii) déterminer s'il existe un profil spécifique de dégradation chez ces souches. Afin de répondre à ces questions, nous avons réalisé un important effort de criblage sur plus de 200 souches marines pour déterminer leur capacité à former un biofilm oléolytique sur hydrocarbure et lipides (chapitre 3). Ce criblage nous a apporté un ensemble de données nécessaires pour orienter une étude approfondie des biofilms oléolytiques. Ainsi, une caractérisation fonctionnelle des biofilms oléolytiques a pu être entamée et les premiers résultats sont présentés dans le chapitre 4. Les biofilms sont souvent considérés comme un environnement à part entière dans lequel interagissent de nombreuses populations bactériennes. Néanmoins, les interactions sociales pouvant impliquer des souches hydrocarbonoclastes ont été très peu étudiées et, a fortiori, les comportements sociaux s'établissant dans les biofilms oléolytiques restaient un domaine jusqu'alors inexploré. Pourtant, il a été démontré que ce type de comportement dans les biofilms modulait la structure des populations et pouvait ainsi avoir des conséquences sur le rôle fonctionnel du biofilm. Dans notre cas, ces interactions pourraient avoir une influence sur la dégradation des COH et plus largement sur la dégradation du carbone en milieu marin. Une expérimentation visant à appréhender les potentiels comportements sociaux s'établissant au sein des biofilms oléolytiques a donc été menée (chapitre 5). Enfin, nos travaux nous ont mené à caractériser une souche oléolytique étudiée pour sa diversité originale de signaux de communication cellulaire (*quorum-sensing*) (chapitre 6).

CHAPITRE I :
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Dégradation du carbone organique particulaire en milieu marin

1.1. Cycle du carbone en milieu marin

Les océans occupent 71 % de la surface de la Terre. La part du carbone inorganique dans l'eau de mer est 6 fois plus importante que dans l'atmosphère. Le CO₂ est notamment transformé en matière organique (carbone organique) via la photosynthèse par le phytoplancton à la surface des océans dans la zone euphotique. La moitié de la production primaire globale de carbone organique sur Terre à lieu dans le milieu marin [81,142], soit environ 50 milliards de tonnes de carbone par an. Dans les écosystèmes marins, le turnover du carbone organique est rapide : seul 1 % du carbone total s'accumule dans les organismes vivants marins, contrairement à ce que l'on peut observer dans le cycle du carbone terrestre [126]. En effet, 80 à 90 % du carbone organique est rapidement respiré et fournit une importante source d'énergie à la production hétérotrophique dans les couches de surface. La part non respirée est transportée plus profondément dans les océans. Ces mécanismes de production et d'export du carbone organique correspondent à ce que l'on appelle la « pompe biologique » qui transporte le carbone de la surface aux profondeurs océaniques [63].

La majeure partie du carbone organique marin correspond donc au produit de la photosynthèse, aux consommateurs de phytoplancton, ainsi qu'aux déjections, détritus et produits de la décomposition de ces organismes. Pour une plus faible part, le carbone organique marin est d'origine terrestre, anthropique ou naturelle. Il est constitué d'une très grande variété de composés présents sous différentes formes physiques : particulaire, dissoute, agrégée. Il va subir diverses transformations le long de la colonne d'eau, notamment une assimilation et une minéralisation par des microorganismes hétérotrophes.

Près du quart du carbone organique total des océans est sous forme particulaire (POC) suivant un continuum de tailles allant de quelques millimètres au nanomètre [243]. Les flux de composés organiques spécifiques diminuent avec la profondeur en raison de la dissolution, de la désagrégation et de la consommation hétérotrophique opérée par le zooplancton et les bactéries [143]. Le POC est dégradé en plus petites particules ou en carbone organique dissout (DOC). Il a été démontré qu'une petite partie du DOC est labile et rapidement reminéralisée (de quelques minutes à plusieurs semaines) par les bactéries hétérotrophes. Il y a également une fraction du DOC semi-labile, qui est transportée dans les profondeurs avant d'être également reminéralisée par des bactéries hétérotrophes. Mais la plus importante fraction du DOC, située dans les profondeurs, est réfractaire, non minéralisée, avec un âge estimé en moyenne à 5000 ans [63]. Benner et Amon [28] ont proposé un modèle de continuum « taille – réactivité » de la matière organique le long de la colonne d'eau (figure I-1). Ce modèle repose sur les observations suivantes : 1) les particules de matière organique de grande taille ont une meilleure biodisponibilité et sont plus rapidement reminéralisées par les microorganismes que celles de petites tailles, 2) la complexité chimique et l'âge de la matière organique augmentent avec la diminution de la taille des particules. Ce modèle a été conforté par l'étude de Walker et ses collaborateurs [251].

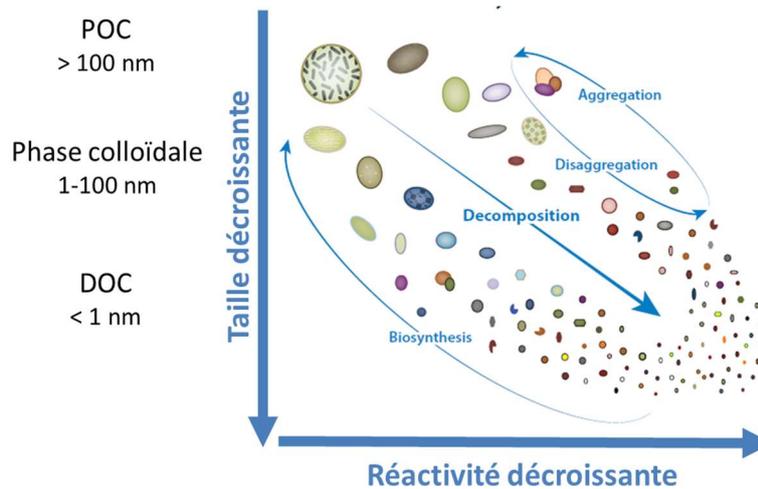


Figure I-1 : Modèle du continuum « taille – réactivité » (adapté de Benner & Amon [20])

Ce modèle présente la relation qui lie la taille et la réactivité de la matière organique marine. La complexité chimique de la matière organique augmente avec sa décomposition et sa réactivité biologique diminue alors que la mesure de l'âge radiocarbone augmente. La biosynthèse opérée par les microorganismes hétérotrophes et mixotrophes transforme et reconditionne le carbone organique en particules de plus grandes tailles. L'effet net des processus d'agrégation et de désagrégation sur la taille, la réactivité et la composition de la matière organique, n'est pas encore bien compris.

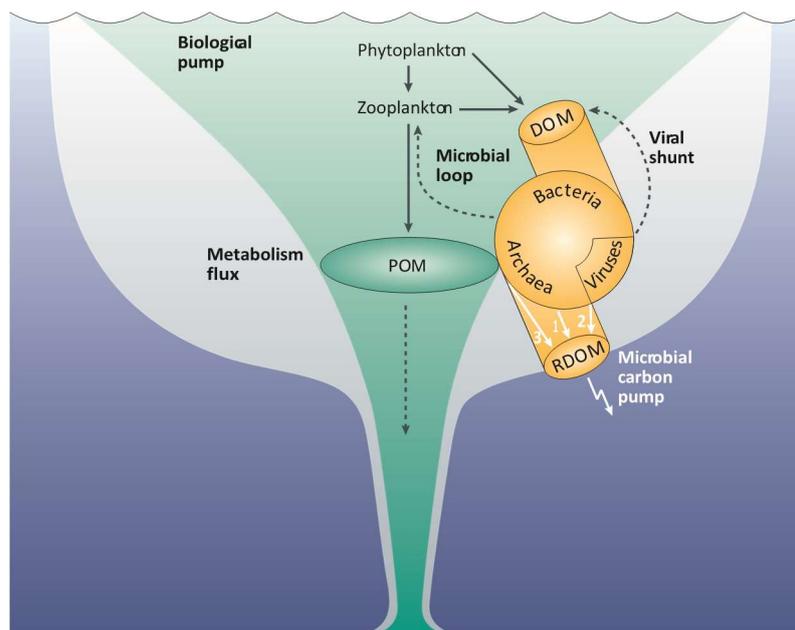


Figure I-2 : Principaux processus impliqués dans le cycle du carbone en milieu marin (d'après Jiao *et al.* [65]).

La pompe biologique (biological pump) est un processus par lequel le CO_2 est fixé à la surface des océans par les producteurs primaires et transporté dans les profondeurs sous forme de particules biogéniques (POM : matière organique particulaire) ou sous forme de matière organique dissoute (DOM). La boucle microbienne (microbial loop) correspond à l'assimilation de la matière organique dissoute par les bactéries et les archées. Ces dernières sont consommées par les protistes qui sont eux-mêmes consommés par des métazoaires (non montrés sur cette figure). Le shunt viral reflète le contrôle de la population microbienne via la lyse virale. La matière organique dissoute réfractaire (RDOM) est en partie produite lors de la dégradation de la POM par les microorganismes. Jiao et ses collaborateurs proposent le terme de pompe microbienne du carbone (microbial carbon pump). La RDOM peut persister pendant des millénaires au fond des océans et constitue un réservoir de stockage du carbone. Trois voies ont été identifiées dans la pompe microbienne du carbone 1) l'exsudation directe des cellules microbiennes lors de la production et de la prolifération, 2) la lyse virale des cellules microbiennes libérant des morceaux de paroi cellulaire et des macromolécules associées à la surface des cellules, 3) le produit de la dégradation de la POM. La zone grise indique le flux métabolique total du carbone dans la colonne d'eau.

La minéralisation du carbone organique marin concerne donc essentiellement la fraction particulaire de la matière organique. La dissolution du POC génère une part labile assimilée par les bactéries ainsi qu'une part non assimilée se complexifiant chimiquement en coulant vers les profondeurs, le DOC réfractaire non minéralisé (figure I-2).

1.2. Composition de la matière organique particulaire et origine du POC

La matière organique particulaire est essentiellement composée d'une combinaison de boulettes fécales issues du zooplancton et des poissons, d'agrégats organiques appelés « neige marine » et de phyto-détritus issus du phytoplancton [239]. Biochimiquement, il s'agit d'un assemblage de protéines, de lipides, de polysaccharides et de métabolites issus des organismes vivants et du produit de leur décomposition. Des hydrocarbures (HC) et des xénobiotiques (PCB, pesticides, solvants chlorés entre autres) peuvent également la composer [64].

Dans le cadre de cette thèse nous allons nous intéresser aux composés organiques hydrophobes (COH) ubiquitaires dans les écosystèmes et constituants majeurs du POC. Nous focaliserons notre étude sur les lipides et les hydrocarbures qui sont les deux familles les plus représentatives des COH en milieu marin.

1.2.1. Les composés organiques hydrophobes en milieu marin

1.2.1.1. Les lipides

Les lipides fournissent la source d'énergie la plus dense dans l'écosystème marin [183] et ils représentent également une source de vitamines. Ils sont essentiels pour la formation des membranes cellulaires et peuvent agir comme hormones, messagers intra- et intercellulaires ou antioxydants [144]. Ils sont largement distribués dans les environnements terrestres et marins. Présents dans le règne animal et végétal ainsi que chez les microorganismes, ils sont principalement constitués d'acides gras (AG), souvent estérifiés à des alcools comme le glycérol, formant des triglycérides (TG) et des phospholipides (PL). Les acides gras sont des molécules amphiphiles composées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. C'est le groupement carboxyle qui est hydrophile, alors que la chaîne aliphatique est hydrophobe : plus sa longueur augmente, plus l'AG est hydrophobe et son point de fusion augmente. En milieu marin, les lipides représentent 3 à 20 % du carbone biogénique. Une grande diversité de lipides est retrouvée dans ces environnements (tableau I-1). Par exemple, le zoo- et le phytoplancton produisent des TG, des cires et des PL [36,144,184]. À la mort de ces organismes, les lipides sont libérés dans la colonne d'eau et sont ainsi disponibles pour les microorganismes. De plus, les lipides en milieu marin peuvent avoir une origine anthropique. En effet, une part des eaux usées issues des habitations, des activités de restauration et des industries agroalimentaires, est fortement chargée en matière organique lipidique (jusqu'à 25 % de la matière organique totale rejetée [192]). Selon l'efficacité des stations de traitement des eaux usées, une part variable des lipides est rejetée dans les océans.

L'acide palmitique a été identifié comme l'acide gras prédominant chez les bactéries marines, les cyanobactéries, les algues et le krill. C'est également l'acide gras principalement retrouvé dans l'écume marine, dans la microcouche de surface des océans et dans les eaux usées [184].

1.2.1.2. Les hydrocarbures

Les hydrocarbures (HC) sont des composés organiques qui ne comportent que des atomes de carbone et d'hydrogène. Les hydrocarbures en milieu marin sont à 53 % d'origine anthropique (figure I-3), provenant de fuites et de nappes produites lors de l'extraction, du transport, du raffinage, du stockage et de l'utilisation du pétrole, et à 47 % d'origine naturelle, provenant notamment du suintement de failles de formations géologiques pétrolifères [4]. Une autre partie des hydrocarbures naturels est produite par les plantes, les animaux et les microorganismes (tableau I-1). En effet, la production d'hydrocarbures par les organismes marins correspond à 1 % de leur contenu en composés aliphatiques. Ce chiffre peut atteindre 10 % chez les micro-algues. La majorité des *n*-alcane dans les bactéries et le phytoplancton correspond à une gamme qui se situe entre $C_{15:0}$ et $C_{21:0}$ [184]. Différentes classes d'hydrocarbures sont retrouvées en milieu marin : les HC saturés, insaturés, aromatiques, ramifiés ou non. Les alcanes sont les plus abondants, ils correspondent à 20 % des hydrocarbures marins [90].

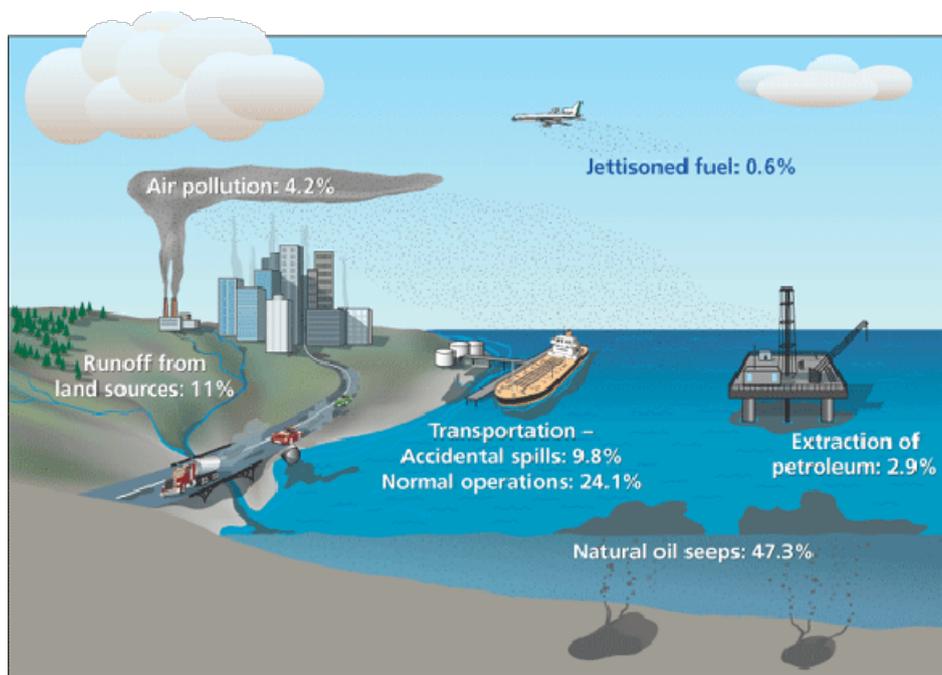


Figure I- 3 Représentation schématique des estimations en pourcentage des apports totaux des sources d'hydrocarbures dans les océans

Un million et demi de mètres cubes d'hydrocarbures d'origine naturelle ou humaine affluent dans les océans et les zones côtières chaque année. Sur cette figure sont représentées les valeurs approximatives de chaque source. La part des intrants peut varier significativement selon la zone considérée. <http://www.whoi.edu/oceanus/feature/mixing-oil-and-water>

Tableau I-1 : Diversité des principaux COH détectés en milieu marin (en gras les classes de COH spécifiquement étudiées au cours de cette thèse).

COH	Origines	Informations quantitatives disponibles	Informations complémentaires	Réf.
Hydrocarbures	HC particulaire = essentiellement issus du phytoplancton et dans une bien moindre mesure du zooplancton. HC = indicateur de pollution.	1 à 50 µg.L ⁻¹ (particulaire + dissous). Jusqu'à 3 % du poids sec chez le zooplancton.		[145] [213] [184] [91] [89]
Lipides de réserve : - Cires (WE) - Esters de stérol (SE) - Triglycérides (TG)	WE et SE = réserves énergétiques des organismes aquatiques. TG = réserve lipidique chez les eucaryotes (animaux marins, phytoplancton...), synthétisé en faible quantité par le zooplancton, rare chez les bactéries.	Les cires représentent 1/3 du poids sec des copépodes (92 % de leurs lipides totaux)	Les cires sont essentiellement composées d'acides gras en C _{14:0} et C _{16:0} . Certaines souches d'actinomycètes se démarquent du règne bactérien par leur capacité à accumuler les TG.	[146] [184] [9] [13]
Les lipides simples et intermédiaires : - Acide gras (AG) - Alcools gras - Monoacylglycérol - Diacylglycérol	Présents chez l'ensemble des organismes marins. Généralement issus du métabolisme des lipides (WE, TG, SE, PL, GL, pigments chlorophylliens). Constituants mineurs des cellules.	AG libres = 5 à 25 % des lipides totaux des phyto- et zooplancton		[184] [248] [249]
Stérols	Constituants des membranes. Largement distribués parmi les micro-algues.		Résistants à la biodégradation, stables chimiquement.	[247]
Phospholipides (PL)	Composants membranaires les plus abondants.	De l'ordre du µg.L ⁻¹ .		[184]
Lipides chloroplastiques : - Glycolipides (GL) - Pigments chlorophylliens - Pigments accessoires	Phytoplancton.			[184]

1.2.2. Propriétés des COH

Les COH ont pour particularité leur hydrophobicité liée à leur nature apolaire. Ils ne peuvent pas former de liaison hydrogène avec l'eau et leur solubilité dans l'eau est ainsi très limitée. A contrario, ils auront une forte affinité pour les milieux ou les surfaces apolaires. Ils pourront également s'associer entre eux et, s'ils sont présents en grande quantité dans l'eau, se rassembler en gouttelettes, créant ainsi une phase liquide non aqueuse (NAPL) [69,105]. Le coefficient de partage entre l'octanol et l'eau permet de déterminer le degré d'hydrophobicité d'un composant. L'octanol a été choisi pour mimer la phase lipophile. Ainsi, $\log K_{ow}$, qui correspond au $\log (C_{oct}/C_{eau})$ où C_{oct} est la concentration du composé dans l'octanol et C_{eau} sa concentration dans l'eau, permet une estimation de l'hydrophobicité. Un composé est dit hydrophobe si son $\log K_{ow} > 1$. Plus la valeur du coefficient est élevée et plus le composé est hydrophobe. L'hydrophobicité d'un composé est une composante importante à prendre en compte, car dans les environnements naturels, ce caractère définira si les composés concernés seront plutôt dissous dans la phase aqueuse, agrégés entre eux ou adsorbés sur une surface (particule). Les molécules les plus hydrophobes seront retrouvées en grande partie adsorbées ou dans la NAPL. La faible solubilité des COH contraint ainsi leur biodisponibilité.

1.2.3. Concept de biodisponibilité, le cas des COH

La biodisponibilité est souvent le facteur limitant le taux global de dégradation des composés hydrophobes [52]. Semple *et al.* [217] définissent un composé biodisponible comme capable de traverser la membrane cellulaire (de façon active, par diffusion, par advection) d'un organisme depuis le milieu dans lequel se trouve l'organisme à un temps donné. Pour être assimilé par les bactéries, un composé doit donc être transféré vers la surface cellulaire [2]. La biodisponibilité dépend de la facilité des bactéries à accéder au substrat dans un habitat donné. Ceci dépendra de l'état physique du substrat (dissous, adsorbé ou dans des phases séparées), de ces caractéristiques physicochimiques (hydrophobicité, diffusivité effective, etc.) et de sa distribution spatiale par rapport aux cellules métaboliquement actives [106,121,124]. Les bactéries sont généralement entourées d'eau et leur interaction avec les COH est donc dépendante de la phase aqueuse. Par conséquent, chaque fois que les microorganismes interagissent avec les COH, leur hydrophobicité joue un rôle central dans la mesure où elle détermine en grande partie la manière dont ils se répartissent en différentes phases et dont ils sont transférés vers la surface des cellules [106].

À la notion de biodisponibilité est associée celle de bioaccessibilité. La bioaccessibilité correspond à une biodisponibilité potentielle d'un composé pouvant devenir biodisponible par dissolution, désorption, diffusion, etc. La fraction bioaccessible comprend la masse chimique pouvant atteindre les cellules (ou inversement) dans un délai prédéfini. La concentration en COH à laquelle la bactérie est exposée et le taux d'entrée du COH dans l'organisme sont donc contrôlés par des cinétiques biologiques et une notion de transfert de masse. La biodisponibilité d'un COH est donc fonction de son taux transfert de masse vers la cellule et de son taux d'assimilation (figure I-4). Le transfert de masse dépend de la distance qui sépare la cellule de son substrat, de la capacité de désorption et de dissolution du COH ainsi que de sa diffusion au travers de la couche limite de la particule. La couche limite correspond à la couche d'eau stagnante entourant les particules organiques et les cellules bactériennes [106].

La diffusion des COH, régit par la première loi de Fick, est limitée par la distance séparant la bactérie de l'interface eau-COH, le gradient de concentration de la molécule et de son coefficient de diffusion. La dissolution ou la désorption du COH de la phase non dissoute dans la couche limite et sa diffusion au travers de la couche limite génèrent un gradient de concentration. Plus la couche limite de la particule est fine et plus le flux de COH est élevé. L'épaisseur de la couche limite est dépendante de la

taille et de la forme de la particule qu'elle entoure ainsi que de l'agitation du milieu. En dehors de la couche limite, les molécules hydrophobes se répartissent uniformément du fait des mouvements de convection du milieu [121]. Le COH diffuse au travers de la couche limite de la bactérie. S'en suit la mise en place de mécanismes d'assimilation (transport actif ou passif à travers la membrane cellulaire et prise en charge des composés par la voie métabolique adéquate). Le taux de transfert dépend d'une grande variété de facteurs. Le taux de transport membranaire peut être influencé par des conditions chimiques externes (pH, la force ionique, la présence de tensioactifs, etc.) qui modifient les caractéristiques de perméabilité de la membrane, ainsi que des facteurs biologiques tels que le conditionnement et l'adaptation, susceptibles de réguler l'efficacité et l'abondance des fonctions de transporteur à l'intérieur de la membrane [136].

Ainsi, la biodisponibilité est un processus à l'interface entre une dynamique biologique et des contraintes physico-chimiques. Un composé sera dit biodisponible si son taux de transfert de masse est supérieur à son taux d'assimilation[106]. Certaines bactéries sont capables d'augmenter la faible biodisponibilité des COH en agissant sur le taux de transfert de masse via la production de bio-surfactant ou la formation de biofilm [95,107,123].

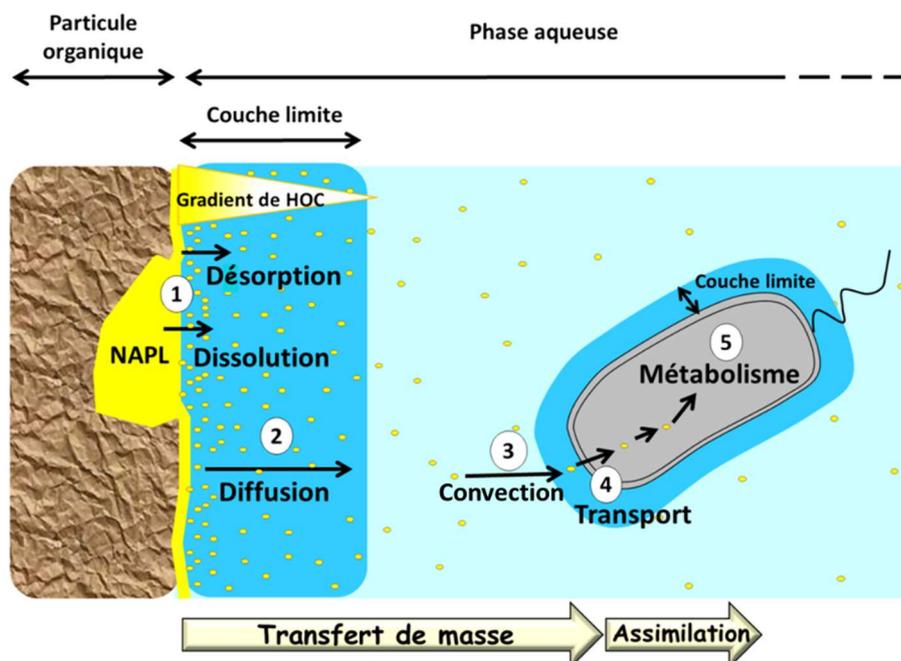


Figure I-3 : Processus de biodégradation des HOC et le concept de biodisponibilité (D'après Mounier [93])

1) Désorption et/ou dissolution du HOC adsorbé sur une particule organique ou dissous dans une NAPL.
 2) Diffusion à travers la couche limite entourant la particule. 3) Transport par convection dans le milieu aqueux et diffusion à travers la couche limite entourant la bactérie. 4) Capture et transport à travers les enveloppes cellulaires. 5) Métabolisme. Les étapes 1 à 4 correspondent au transfert de masse du HOC vers la cellule et les étapes 5 et 6 à l'assimilation du HOC par la bactérie.

1.3. Biodégradation du POC et en particulier des COH

Les bactéries ne peuvent assimiler que des composés solubles de faible poids moléculaires (< 600 Da) [258]. Ainsi, la minéralisation du POC est contrainte par la taille des composés, leur dissolution et leur transport dans la phase aqueuse. Les polysaccharides, les protéines et certains lipides (tels que les TG), du fait de leur taille importante, ne peuvent être disponibles qu'après transformation en mono- ou oligomère via l'action d'enzymes extracellulaires sécrétées et libérées dans l'environnement ou ancrées à la surface cellulaire [11,96]. Le clivage de ces substrats par les enzymes extracellulaires permet de réduire leur taille et d'augmenter leur solubilité dans l'eau. Il existe une grande variété d'enzymes extracellulaires : oxydo-réductases et hydrolases telles que les peptidases, lipases ou encore glycoside hydrolases [11]. L'assimilation des COH et en particulier des HC est facilitée par la production de facteurs de solubilisation tels que les biosurfactants sécrétés par les bactéries qui les utilisent [1].

1.3.1. Assimilation des COH

Les COH en milieu marin sont dégradés par les microorganismes et plus particulièrement les bactéries qui les utilisent comme source de carbone. Ces bactéries prennent ainsi part au recyclage des COH et plus largement au cycle global du carbone. De plus, certains COH sont considérés comme des polluants et toxiques majeurs en milieu marin (hydrocarbures). Leur biodégradation est donc un processus majeur dans la bioremédiation de milieux marins pollués. C'est notamment pour cette raison que de nombreuses études ont été menées pour identifier les voies cataboliques et les stratégies impliquées dans la biodégradation des COH.

1.3.2. Métabolisme des hydrocarbures

Parmi les bactéries hétérotrophes dégradant les COH en milieu marin, certaines espèces ont particulièrement éveillé l'attention parce qu'elles devenaient dominantes à la suite d'un événement de pollution aux hydrocarbures. Ces bactéries désignées sous le terme de bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) sont capables de dégrader des hydrocarbures à chaîne aliphatique ou des composés aromatiques [157,270]. Les HCB appartiennent à un nombre restreint de genres. Les plus fréquemment cités et isolés sont : *Marinobacter*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira*, *Thalassolituus* et *Alcanivorax*. Ces bactéries sont décrites comme des spécialistes de la dégradation des hydrocarbures [110], et parfois même comme obligatoires, c'est-à-dire que les seules sources de carbone qu'elles peuvent assimiler sont limitées aux hydrocarbures [270]. Dans les environnements marins non pollués, les bactéries hydrocarbonoclastes sont présentes en très faible abondance mais ces populations peuvent très rapidement augmenter au contact d'une forte concentration en HC [110,124,131].

Parce que les alcanes composent majoritairement le pétrole, mais qu'ils sont également produits par des organismes vivants, nous nous intéresserons plus particulièrement à la dégradation aérobie des alcanes dans le cadre de cette thèse. Nous ne décrivons donc pas les mécanismes anaérobies.

Voie d'assimilation des alcanes en aérobiose :

Du fait de leur stabilité, les hydrocarbures doivent être activés par les bactéries afin d'être assimilés [264]. La biodégradation aérobie débute par une oxydation permettant l'activation de ces composés. L'oxygène est également l'accepteur terminal d'électrons.

Ces métabolismes mettent en œuvre des mono- ou des dioxygénases qui attaquent les molécules par addition d'oxygène (figure I-5). L'alcool gras formé est à son tour oxydé par des déshydrogénases et donne un aldéhyde puis un acide gras [173,207]. Les gènes du métabolisme des alcanes ont été particulièrement bien étudiés chez *Pseudomonas putida* GPo1 (également connu comme *P. oleovorans* GPo1) [18,22,25,26,48,72–74,132,268]. Ils sont organisés en 2 opérons *alkBFGHJKL* et *alkST* codant pour les protéines impliquées dans le passage de l'alcane à travers la membrane externe via AlkL et la conversion des *n*-alcanes en AG via un système alcane hydroxylase (AlkB), d'alcool et d'aldéhyde déshydrogénases (AlkJ et AlkH respectivement) et d'une acyl-CoA synthase (AlkK). L'expression de l'opéron *alkBFGHJKL* est régulée positivement par le régulateur transcriptionnel AlkS. Les deux opérons sont séparés par un fragment d'ADN dans lequel on trouve entre autres le gène *alkN* codant pour une protéine acceptrice du groupement méthyle, probablement impliqué dans le chimiotactisme. La figure I-5 résume les éléments impliqués dans cette voie métabolique. AlkL forme un pore hydrophobe permettant le passage des alcanes à travers la membrane externe (son domaine extracellulaire a une affinité particulière pour les molécules hydrophobes). En effet, la couche lipopolysaccharidique forme une barrière imperméable à la diffusion des alcanes > C₁₂. La plupart de ces gènes sont conservés et très largement retrouvés dans les génomes des souches capables d'assimiler les alcanes. En effet, l'alcane monooxygénase (AlkB) est le système d'alcanes hydroxylases le plus communément retrouvé [224,225]. Les alcanes hydroxylases de type AlkB sont en général impliquées dans la dégradation d'une gamme de *n*-alcanes comprise entre C₁₀ et C₁₆, mais chez certains *Actinomycètes* la gamme peut s'étendre au-delà de C₃₂ quand l'enzyme est fusionnée à la rubredoxine [23,150,175]. Chez *Acinetobacter* sp. ADP1, c'est l'alcane monooxygénase AlkM, codée par le gène *alkM*, qui est impliquée dans la première étape d'oxydation des alcanes [196]. Son expression est induite par une large gamme d'alcanes (C₇ à C₁₈). Deux paralogues d'*alkM* ont été décrits chez *Acinetobacter* sp. M-1, *alkMa* et *alkMb*. Le gène *alkMa* est induit en présence d'alcanes à très longue chaîne (> C₂₂) alors que *alkMb* est préférentiellement induit par des alcanes de plus courte chaîne (C₁₆ à C₂₂). La dégradation des alcanes de plus faible poids moléculaire est réalisée par des méthane monooxygénases solubles ou particulières (sMMO et pMMO respectivement) ainsi que par des butane et propane monooxygénases (BMO et PMO respectivement). Ces enzymes sont capables de prendre en charge des alcanes jusqu'à C₈, des alcanes cycliques ou ramifiés et certains aromatiques. Parmi les enzymes dégradant les alcanes de plus haut poids moléculaire se trouve des hydroxylases particulières composées d'un groupement hème : la famille des cytochromes P450 CYP153 [23,24,131,175]. La gamme d'alcanes pris en charge par ces enzymes est représentée dans la figure I-6.

AlkL appartient à la même famille qu'OmpW. OmpW a été décrit comme tenant des rôles très divers chez de nombreuses bactéries Gram-négatives. L'étude menée chez *E. coli* par Hong *et al.* [116] a révélé une structure en tonneau composée de 8 brins β, d'un canal hydrophobe reliant le milieu extracellulaire au périplasma et d'une ouverture latérale dans la paroi du tonneau. Les données sur la structure d'OmpW associées à son homologie avec AlkL renforcent l'idée que cette protéine peut être impliquée dans le transport de molécules hydrophobes telles que les alcanes. De plus, cette fonction a été observée pour OprG, une protéine de la famille OmpW [237].

AlkL était jusqu'alors la seule protéine de la membrane extracellulaire pour laquelle le rôle dans le transport des alcanes avait été démontré [55,93,125,176]. En effet, l'entrée des alcanes dans la cellule est très peu documentée.

Mais cette année, Mounier et ses collaborateurs [168] ont publié une étude sur deux nouvelles protéines également impliquées dans le transport des alcanes à travers la membrane chez *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 : AupA et AupB. Les gènes *aupA* et *aupB* sont organisés en opéron. Ils ont été détectés dans 76 génomes bactériens et semblent bien conservés parmi les HCB. De plus, AupA partage 21,1 % d'identité et 53,9 % de similarité avec le transporteur d'acide gras à longue chaîne FadL. AupA est une protéine de la membrane externe alors que AupB est une protéine de la membrane interne. Ces deux protéines sont capables d'interagir physiquement l'une avec l'autre. Une mutation dans l'un ou/et l'autre de ces gènes impacte la croissance de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 sur paraffine et sur *n*-hexadécane (alcanes linéaires respectivement solide et liquide dans les conditions de culture de la souche) alors que la croissance sur d'autres types de COH (alcool gras, cire, AG, TG) n'est pas affectée. La croissance des mutants *aup* sur de l'hexadécane solubilisé en micelle dans du Brij 58 est, elle, complètement abolie et les cellules mutées présentent une incapacité à se lier à l'hexadécane ainsi solubilisé. Ceci tend à indiquer l'implication de ces deux protéines dans l'assimilation des alcanes solubilisés en micelles.

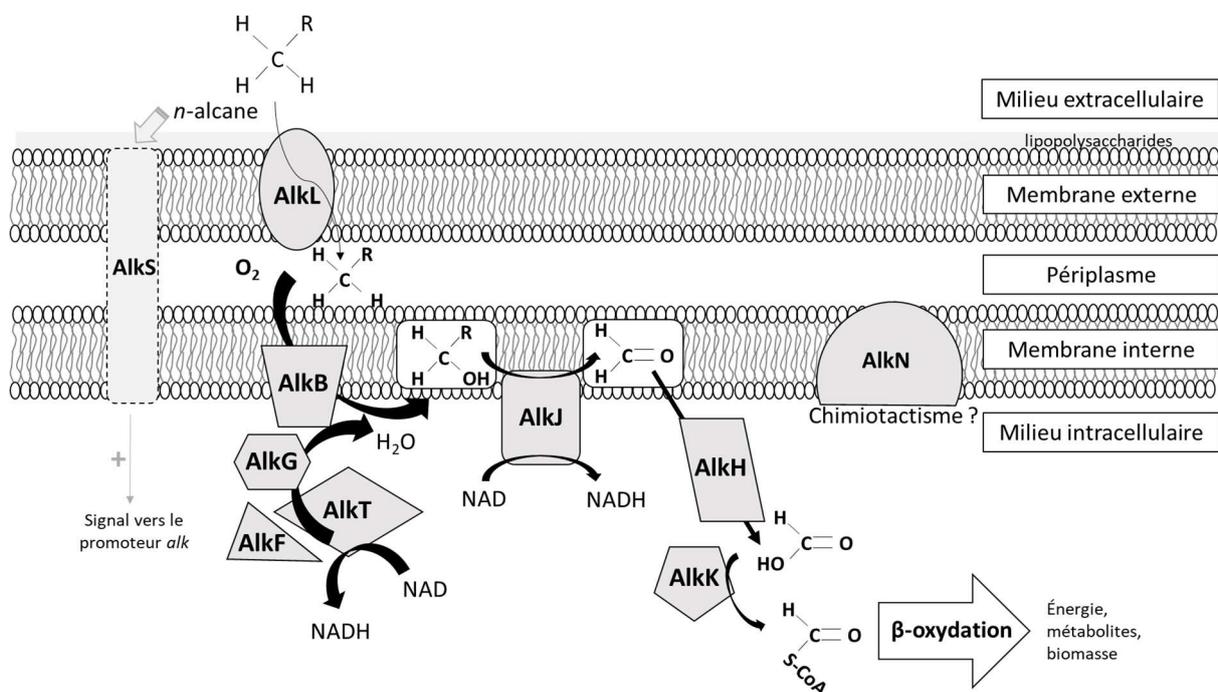


Figure I-4 : Voie de dégradation des alcanes chez *P. putida* GPO1, rôle et localisation cellulaire des protéines Alk (adapté de Grant *et al.* [52] ; vanBeilen *et al.* [19] ; Witholt *et al.* [268]).

L'opéron *alkBFGHJKL* code pour une alcane hydroxylase (AlkB), deux rubredoxines (AlkF et AlkG), un alcool et une aldéhyde déshydrogénase (AlkJ et AlkH, respectivement), une acyl-CoA synthase (AlkK). Le locus *alkST* code pour le troisième composant du système alcane hydroxylase, la rubredoxine réductase (AlkT) ainsi que pour AlkS qui régule positivement l'expression des clusters *alkBFGHJKL* et *alkST*. AlkN est un transducteur chimiotactique putatif des alcanes.

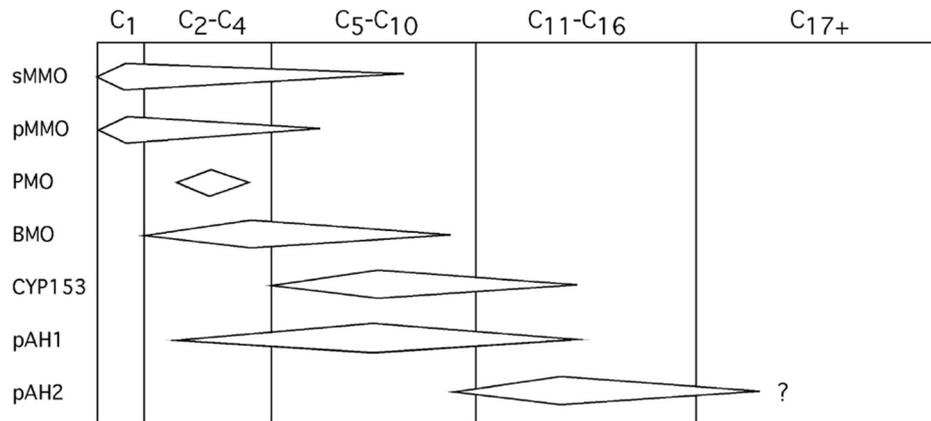


Figure I-5 : Aperçu de la gamme des alcanes pris en charge par les alcanes hydroxylases (d'après van Beilen et Funhoff [23]).

sMMO, pMMO, PMO et BMO pour méthane soluble (sM), méthane particulaire (pM), propane (P) et butane (B) monooxygénases (MO) respectivement. CYP153 : famille des alcanes hydroxylases à cytochrome P450. pAHs : alcanes hydroxylases particulières parmi lesquelles on peut distinguer les pAH1 dégradant des alcanes de C₃ à C₁₆ et les pAH2 dégradant plus spécifiquement des alcanes de plus grande taille (> C₁₀).

1.3.3. Assimilation des lipides

Jusqu'ici les lipides ont essentiellement été étudiés pour leur capacité de biomarqueurs de la matière organique en milieu marin. Quelques études ont été menées sur des *Vibrio* tel que *Vibrio choleraea* qui utilise les lipides comme seule source de carbone [189], mais les mécanismes de dégradation des lipides ainsi que la diversité des bactéries lipolytiques restent des sujets à explorer.

La biodégradation des lipides fait intervenir des enzymes hydrolytiques extracellulaires, les lipases, qui catalysent l'hydrolyse des triacylglycérols (TG) en acide gras (AG) et en glycérol, mais qui pour certaines possèdent aussi des activités phospholipase, cholestérol estérase, etc. [231]. Les produits résultant de l'hydrolyse extracellulaire sont ensuite oxydés dans la cellule. Le glycérol est pris en charge par la glycolyse et les acides gras saturés ou insaturés peuvent subir des processus de biosynthèse ou être dégradés. La voie de dégradation des lipides a essentiellement été décrite chez *E. coli* [66], elle est codée par le régulon *fad*. Alors que les acides gras à longue chaîne (LCFA > C₁₁) nécessitent un transport facilité par la protéine de la membrane externe FadL, les acides gras à petites et moyennes chaînes diffusent librement à travers la membrane ou sont pris en charge par des mécanismes encore méconnus. Rodríguez-Moyá et Gonzalez [205] ont récemment proposé que leur transport pouvait être médié par la porine OmpF. Le transport des acides gras jusqu'à l'intérieur de la cellule est étroitement lié à l'activation des acides gras qui implique la formation d'un acyl-CoA ester via un processus appelé estérification vectorielle [119]. L'acide gras ainsi activé est ensuite dégradé séquentiellement via la β -oxydation (figure I-7).

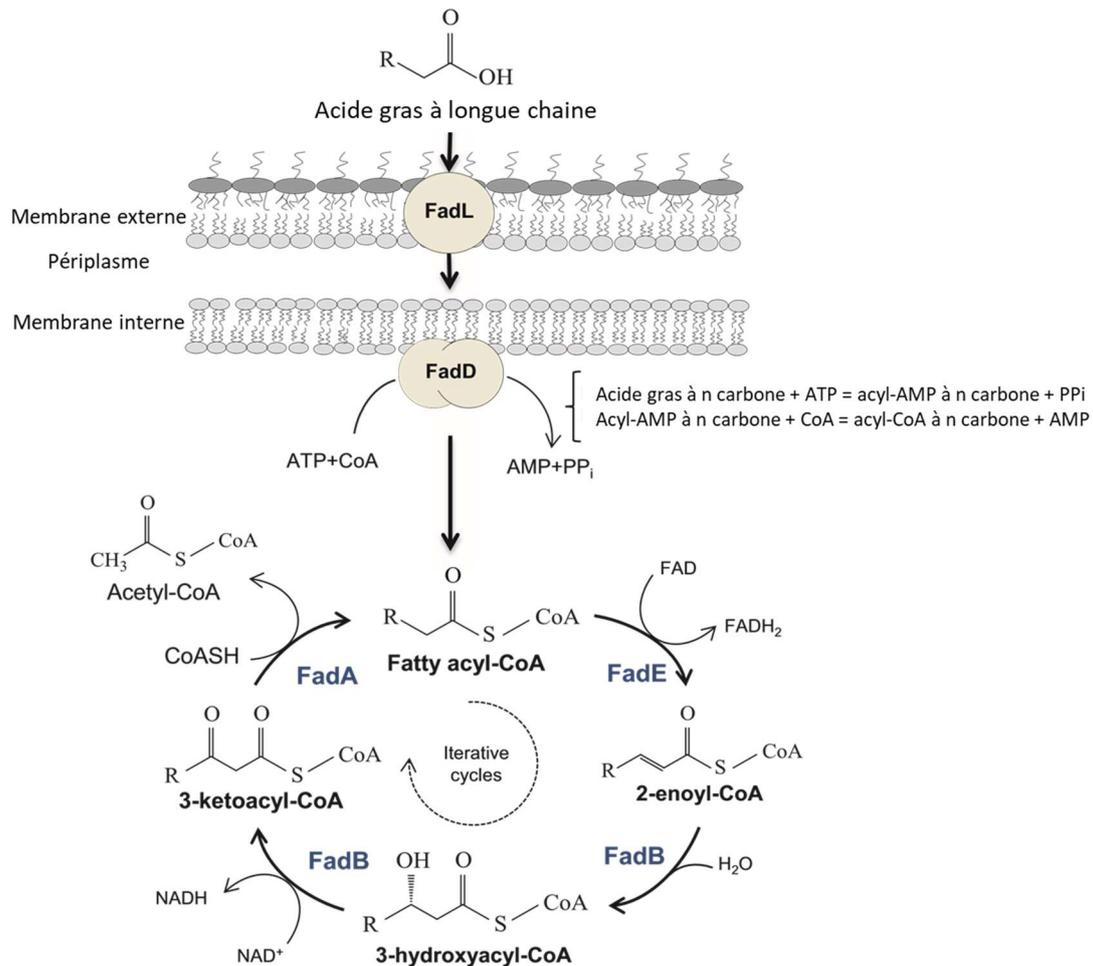


Figure I-6 : Voie de dégradation des acides gras à longue chaîne (d'après Jimenez-Diaz *et al.* [66]).

Les LCFA sont transportés dans la membrane externe via FadL. Ils sont ensuite activés en acyl-CoA par une acyl-CoA synthase (FadD). Les acyl-CoA ainsi formés induisent l'expression des enzymes de la β -oxydation. Le cycle de β -oxydation se divise en 4 étapes réalisées par les enzymes FadE (acyl-Coa déhydrogénase), FadB (enoyl-CoA hydratase) et FadA (β -cétothiolase). L'acide gras est raccourci de 2 carbones à chaque cycle.

1.3.4. Les biofilms oléolytiques comme stratégie bactérienne d'assimilation des COH

Comme décrit ci-dessus, les bactéries hétérotrophes capables de dégrader les COH doivent mettre en œuvre diverses stratégies afin d'accéder à ces composés et les rendre biodisponibles. Il s'agit notamment d'augmenter le transfert de masse des COH par la production de biosurfactant, mais ceci peut également être via l'adhésion et/ou la formation de biofilm sur le substrat [123]. Ces biofilms souvent observés sur une surface nutritive (HC) sont dits lytiques car ils s'établissent sur une surface qui est également un substrat assimilable par les bactéries la colonisant [95].

Cas de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 : introduction de la notion de biofilm oléolytique

La capacité à former des biofilms sur HC a été décrite chez certaines souches hydrocarbonoclastes telles que *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. Les travaux menés au laboratoire sur *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 ont montré sa capacité à former des biofilms sur une grande variété de COH [167] tels que l'eicosane, le dotriacontane et la paraffine (alcanes) mais aussi l'acide palmitique (acide gras), la tripalmitine et la tristéarine (triglycérides), l'héxadécane (alcool gras) et le palmitate de cétyle (ester d'acide gras) (figure I-8). Les notions de bactéries oléolytiques (des bactéries catabolisant une variété de composés organiques hydrophobes) et de biofilm oléolytique (cf. ci-dessous) ont ainsi été introduites.

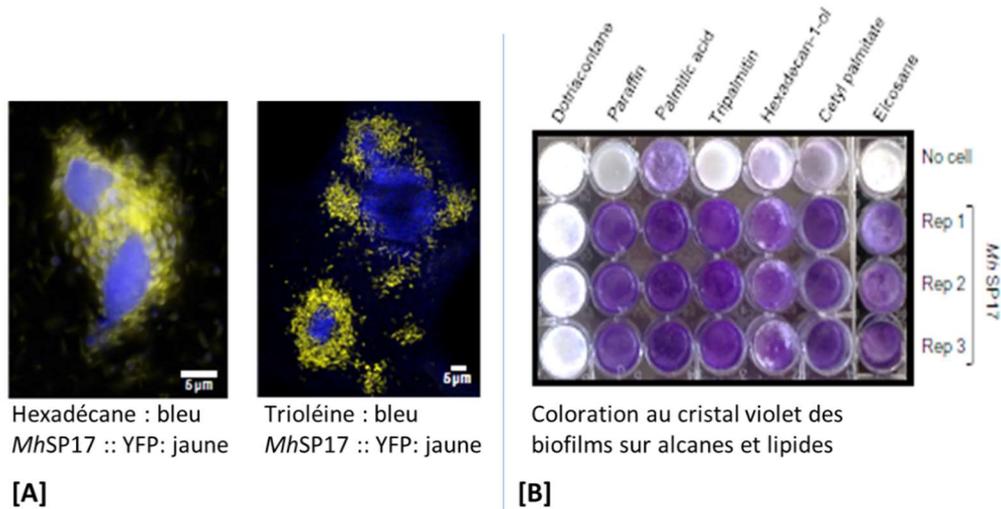


Figure I-7 : *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 forme des biofilms sur HC et lipides [74,94]

[A] Observation en microscopie confocale de biofilms de *M. hydrocarbonoclaste* SP17 (MhSP17) marquée à l'YFP sur héxadécane (HC) ou trioléine (TG). [B] Coloration au cristal violet des biofilms formés sur alcanes et lipides par MhSP17 (les substrats présentés sont solides à la température de culture de la souche).

2. Les biofilms sur surface nutritive - Biofilm lytique

2.1. Généralités sur les biofilms

Le biofilm est une communauté de microorganismes (une ou plusieurs espèces) fixée à une surface (solide ou liquide – biotique ou non) et maintenue par une matrice extracellulaire adhésive et protectrice constituée de polymères complexes produits par les microorganismes le composant [230]. Il est généralement admis que dans l'environnement, la plupart des cellules bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension (forme libre, cellule planctonique), mais plutôt en biofilm [57])

Étapes de formation du biofilm :

Premièrement, la cellule doit atteindre une surface et créer un contact temporaire : c'est l'adhésion réversible. Elle devient irréversible via une modification des propriétés de surface de la bactérie et une synthèse de structures adhésives telles que les adhésines [103,135,186]. Cet attachement est suivi de la synthèse d'une matrice d'exopolymères et de l'inhibition des fonctions de mobilité [166]. S'en suit une multiplication cellulaire menant à la formation de micro- puis de macrocolonies arborant une architecture tridimensionnelle : c'est le biofilm mature. Le biofilm se développe jusqu'au détachement et à la dispersion des cellules [103,229,257] (figure I-9). Les cellules détachées perdent rapidement leur phénotype de cellules adhérentes mais n'ont pas non plus le même phénotype que des cellules

planctoniques : elles expriment un protéome bien spécifique [51,187,242]. Ces cellules détachées seraient métaboliquement plus actives [98,187]. Vaysse et ses collaborateurs [242] ont remarqué que les cellules détachées de *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 d'un biofilm sur hexadécane avaient une affinité plus importante pour ce substrat et pouvaient y initier la formation d'un nouveau biofilm plus rapidement que des cellules planctoniques. La présence simultanée de cellules individuelles ou d'agrégats parmi les populations détachées serait déterminante dans le processus d'une nouvelle colonisation. Alors que des cellules seules dispersées pourraient rapidement échapper à un environnement inhospitalier, elles sont néanmoins plus sensibles aux stress antibactériens. À l'opposé, les cellules se détachant sous forme d'agrégat ont peu de contrôle sur leur trajectoire, mais ont l'avantage d'être protégées par la matrice extracellulaire qui les maintient ensemble. Elles présentent aussi une capacité à passer plus rapidement à un mode de vie sessile que les cellules seules [138].

2.1.1. Les adhésines, appendices de la colonisation d'une particule

Les mécanismes moléculaires qui régulent la formation des biofilms varient considérablement en fonction des espèces bactériennes, mais également entre souches d'une même espèce. En effet, différents microorganismes peuvent utiliser différents mécanismes d'adhésion à la surface, couramment associés à différents systèmes de sécrétions. Le « sécrétome » des microorganismes définit son potentiel de colonisation sur diverses surfaces. Les composants de surface des cellules sont plus ou moins spécifiques de la surface. Ceux impliqués dans l'attachement spécifique peuvent reconnaître une surface aux propriétés physicochimiques ou biotiques particulières et ceci peut jouer un rôle dans la régulation de l'expression et l'efficacité de ces composés d'adhérence à la surface. Ainsi, certaines caractéristiques structurelles sont fréquemment retrouvées au sein des biofilms alors que d'autres sont propres à certaines souches [59,151,166]. Les molécules (en général des protéines) impliquées dans l'adhésion des cellules à une surface ou entre cellules sont regroupées sous le terme d'adhésines : flagelle, fimbriae, pilis, curlis et holdfast. Des éléments de la matrice extracellulaire tels que les exopolymères ou l'ADN libre peuvent également en faire partie. Ces adhésines sont particulièrement impliquées dans la phase d'adhésion réversible des cellules [59]. L'engagement dans un mode de croissance sessile survient à la suite de l'adhésion irréversible. Cependant, toutes les bactéries adhérant à une surface ne s'engageront pas nécessairement dans le développement d'un biofilm [47].

Les mécanismes d'adhésion spécifiques aux COH seront développés dans la partie II-d de cette introduction.

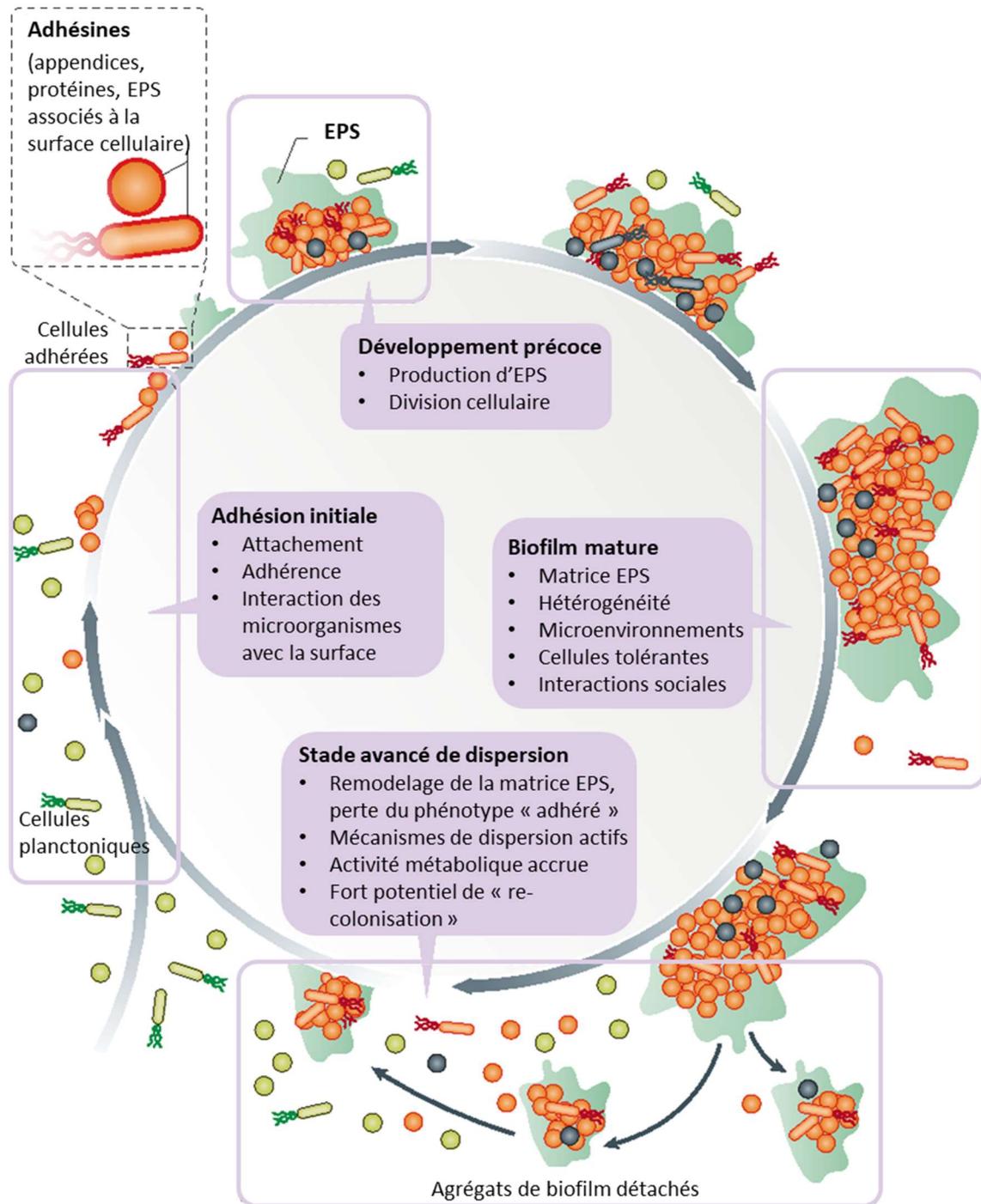


Figure I-8 : Biofilm, de l'adhésion au détachement des cellules (adapté de Koo *et al.* [134])

La formation du biofilm débute par l'adhésion à la surface via des adhésines associées à la surface cellulaire suivie par le développement de microcolonies, puis de macrocolonies, qui forment ensuite le biofilm mature. Quand le biofilm atteint un stade avancé de développement, des cellules et agrégats cellulaires se détachent et se dispersent. L'attachement initial des cellules est souvent faible et nécessite la mise en place de mécanismes permettant une transition vers une association au support plus stable. Dans la macrocolonie, les cellules sont liées par la matrice extracellulaire qui est formée de polymères (polysaccharides, protéines, ADN) et de cellules mortes, entre autres.

2.1.2. Régulation de la formation d'un biofilm

La colonisation d'une surface par les bactéries est liée à la perception de certains paramètres environnementaux qui induisent le passage d'un mode de vie planctonique à sessile. Les signaux environnementaux contrôlant cette transition sont très divers selon les organismes : disponibilité en nutriments, O₂, pH, potentiel redox, osmolarité, etc. [59,62,186]. Par exemple, des sources de carbone et d'énergie appropriées ou des produits métaboliques (monosaccharides, acétate, indole, etc) peuvent servir d'indicateurs de conditions favorables à la croissance [186]. Ces signaux vont induire l'activation de mécanismes d'adhésion et de formation du biofilm via diverses cascades de signalisation.

2.1.3. Systèmes de transduction du signal à deux composants

Les systèmes de transduction à 2 composants (TCTS) sont très répandus chez les bactéries (retrouvés dans 95 % des génomes bactériens) [59]. Les bactéries utilisent de tels systèmes pour percevoir et répondre aux modifications de leur environnement. Un TCTS type est composé de 2 protéines : une histidine kinase (HK), senseur percevant le signal, et un régulateur-réponse (RR) connexe. La perception du signal induit l'autophosphorylation de l'HK, le phosphate est ensuite transféré au RR qui va moduler l'expression de gènes tels que des gènes impliqués dans la formation de biofilm. Les protéines RR sont en général composées d'un domaine CheY-like receveur conservé en N-terminal fonctionnant soit comme un module autonome, soit associé à un domaine C-terminal de liaison à l'ADN, l'ARN ou à une protéine [246]. Les études menées sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et de nombreux *Vibrio* ont confirmé l'implication des TCTS dans différentes étapes de la formation de biofilms [59]. Les TCTS régulent notamment le passage d'un mode de vie planctonique à un mode de vie sessile via la régulation de la production d'appendices extracellulaires de types pili et d'exopolysaccharides [59,160]. Comme le souligne Mikkelsen et ses collaborateurs [160] concernant *P. aeruginosa*, il a été démontré que la formation de biofilms impliquait de nombreux et complexes réseaux de régulation. Outre les TCTS, une multitude d'autres éléments sont impliqués tels que le *quorum-sensing* ou la voie de signalisation du di-guanosine monophosphate cyclique, entre autres.

2.1.3.1. La voie du di-guanosine monophosphate cyclique (diGMPc)

Tout comme les TCTS, la voie de signalisation impliquant le diGMPc apparaît être largement conservée. Cette molécule est importante pour la régulation de la formation de biofilm, l'adhésion, la mobilité, la virulence et la morphogénèse cellulaire chez de nombreuses espèces bactériennes [37]. Le diGMPc est synthétisé à partir de 2 molécules de GTP par les diguanylate cyclases (DGC) qui possèdent le très conservé domaine GGDEF. Les phosphodiesterases (PDE) contenant le domaine EAL ou HD-GYP dégradent le diGMPc en 5'-phosphoguanlyl-(3'-5')-guanosine ou en guanosine monophosphate, respectivement. De nombreuses protéines présentent l'activité DGC ou PDE [37]. Les domaines GGDEF et EAL apparaissent souvent dans des protéines multi-domaines combinés à divers domaines de régulation communs (domaines PAS, HAMP, GAF, etc.) parmi les protéines de signalisation bactériennes [86]. Ces domaines, en réponse aux signaux environnementaux, induisent la synthèse ou la dégradation du diGMPc [37]. L'implication de la voie de signalisation du diGMPc dans le processus d'adhésion, de formation et de dispersion du biofilm a été étudiée chez de nombreuses espèces. Par exemple, le diGMPc régule la motilité due au flagelle chez *E. coli* [185] et *Salmonella enterica* [208], la production du pili de type IV (organelle de motilité et d'adhésion) chez *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *Caulobacter crescentus* et *Clostridium difficile* [118].

L'implication du diGMPc a été montré dans la régulation de la production d'adhésines (LapA, pilis, fimbriae, exopolysaccharides). LapA, une adhésine de surface produite par des souches de *P. putida* et *P. fluorescens*, permet l'adhésion irréversible et l'interaction entre cellules [208].

2.1.3.2. Le chimiotactisme

Le chimiotactisme coordonne la perception, la signalisation et la motilité chez les bactéries en réponse à des attractants ou des répulsifs chimiques. Le chimiotactisme est fréquemment proposé comme facilitant l'attachement bactérien à une surface [59]. Il s'inscrit dans les voies de signalisation à deux composants ainsi que dans celle du diGMPc. Par exemple, le fonctionnement du flagelle est induit par des signaux chimiotactiques. Chez *E. coli*, la protéine qui délivre le signal chimiotactique au flagelle est le régulateur CheY phosphorylé en présence du signal. Celui-ci se lie à la sous-unité FliM du moteur flagellaire et l'active. YcgR, l'effecteur du diGMPc, se lie à FliM ainsi qu'à une autre sous-unité du moteur flagellaire, FliG, pour inhiber le fonctionnement du flagelle. L'activité de YcgR est régulée positivement par une concentration importante en diGMPc [118,208].

2.1.3.3. Le quorum-sensing

Les signaux peuvent également être produits et sécrétés par la communauté bactérienne elle-même. Dans ce cas, les molécules signal sont appelées « auto-inducteurs ». Les auto-inducteurs (AIs) s'accumulent de manière extracellulaire et la concentration d'AIs peut être corrélée à la densité de population. À des concentrations élevées, les AIs déclenchent des cascades de transduction de signaux qui entraînent des réponses multicellulaires dans la population bactérienne. Ce mécanisme de communication cellule-cellule chez les bactéries, appelé *quorum-sensing* (QS), contrôle un grand nombre de processus de développement incluant la formation de biofilms [45,151]. L'implication du QS dans la formation de biofilms est observée parmi les espèces de *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, les espèces appartenant à ces genres étant particulièrement bien étudiées du fait de l'implication du QS et des biofilms dans leurs mécanismes de pathogénicité. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, le QS régule notamment l'expression des gènes impliqués dans la production des exopolysaccharides Pel et Psl ainsi que celle de rhamnolipides [39,211,216]. Le QS peut être impliqué dans la régulation du biofilm à différentes étapes de son développement. Des trois systèmes QS de *V. fischeri*, deux sont impliqués dans le développement du biofilm et un seul régule les étapes initiales de l'adhésion [164,244]. Nous rentrerons plus en détail dans le fonctionnement du *quorum-sensing* dans la 3^e partie de cette introduction.

Bien souvent ces voies de signalisation (TCST, diGMPc, QS, chimiotactisme) sont intriquées au sein d'un même organisme. Ces voies sont très complexes, activées ou inhibées par différents types de signaux et leur activité dépend du stade de développement du biofilm [154,227,233,241,256].

2.2. Écologie des biofilms

Dans les environnements aquatiques, bien que la vaste majorité des organismes soit libre, les particules de matière organique qui coulent (neige marine) ou en suspension abritent des densités microbiennes 2 à 5 fois plus élevées que l'eau environnante. Les bactéries adhérentes à la matière organique particulaire sont essentielles à sa dégradation et au recyclage du carbone et de l'azote qui en découle. De plus, les bactéries attachées, les substances extracellulaires polymériques et les débris produits sont autant de sources de carbone et d'azote pour les organismes brouteurs [122]. Les milieux aquatiques représentent des environnements dans lesquels la croissance est souvent limitée par l'accès aux nutriments ainsi que par les conditions ambiantes extrêmement dynamiques et parfois délétères [59]. Le fait que les environnements marins soient des milieux très dilués pourrait

ainsi favoriser la formation des biofilms lytiques. En effet, la formation d'un biofilm permet de mettre en contact les bactéries avec leur substrat. De plus, la matrice extracellulaire des biofilms favorise l'action des enzymes extracellulaires nécessaires à l'hydrolyse des substances nutritives polymériques en favorisant la maintenance de leur intégrité structurale et en limitant leur dispersion en dehors du biofilm [54,59,82,135].

En milieu marin, ce sont presque exclusivement la chitine, les HC et le plastique qui ont été étudiés comme surfaces nutritives dégradées via la formation de biofilms. La chitine constitue une part importante du carbone et de l'azote particulaire. Sa dégradation représente une étape critique dans le recyclage de ces éléments. Il a été montré qu'elle tient une place importante dans la majorité des écosystèmes [21]. L'intérêt suscité par la biodégradation de la chitine s'explique aussi par le fait qu'elle joue un rôle déterminant pour la survie de pathogènes chitinolytiques, principalement des souches de *Vibrio* [154,190,266,271]. Les biofilms lytiques sur hydrocarbures et plastiques sont également très largement documentés, notamment en raison de l'enjeu environnemental [1,167,219,220,265]. Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à la colonisation et à la dégradation de deux des principaux composants de la matière organique particulaire que sont les protéines et les lipides.

2.3. Biofilms sur surface nutritive en milieu marin

La capacité de formation de biofilms des bactéries dégradant les COH a déjà été démontrée, en particulier sur les HC. Le fait que le COH soit alors le support et le substrat distingue ces biofilms de ceux habituellement décrits. Cela suggère que la surface nutritive exerce un contrôle sur le déterminisme et le développement du biofilm. Cette propriété associée à la capacité de ces biofilms à surmonter la faible accessibilité des substrats hydrophobes font de la formation de biofilms sur COH un processus critique dans la biodégradation des contaminants hydrophobes. Ainsi les biofilms oléolytiques représentent un point de vue original sur la biologie des biofilms [95].

Des différences de dégradation et de croissance entre populations attachées et populations planctoniques ont été rapportées pour la dégradation des HC. La nécessité d'adhérer à l'HC pour faciliter son assimilation dépend de sa solubilité dans l'eau. Par exemple, l'assimilation du pyrène dissous dans l'heptaméthylnonane par *Rhodococcus* sp. dans un réacteur à 2 phases est réalisée à la fois par les cellules adsorbées à l'interface HC-eau et par les cellules planctoniques de la phase aqueuse [34]. En revanche, une assimilation strictement interfaciale est observée avec l'hexadécane, très faiblement soluble dans l'eau, comme substrat [35]. La même observation a été faite pour l'assimilation de l'hexadécane par *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, suggérant que l'assimilation des alcanes n'est possible que si les cellules sont à proximité immédiate de l'interface [130].

La réduction du taux de minéralisation du naphthalène observé par Ortega-Calvo et Alexander [178], de concert avec l'inhibition de l'adhésion à l'interface HC-eau, soutient la nécessité d'adhésion pour une assimilation efficace de substrats faiblement solubles dans l'eau. Mais c'est l'étude d'un mutant d'*Acinetobacter calcoacticus* RAG-1 déficient pour l'adhésion [210], ayant simultanément perdu sa capacité à dégrader les HC, qui a fourni les arguments décisifs supportant l'adhésion comme essentielle dans la dégradation des HC.

2.4. Mécanismes d'adhésion aux COH

Les alcanes représentent une source de carbone et d'énergie pour de nombreuses bactéries et il a été montré qu'ils pouvaient avoir une fonction de chimio-attractant pour certaines d'entre elles

[141,148]. Par exemple, l'hexadécane pourrait être un facteur chimiotactique pour *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Dans le génome de PAO1, le gène *tlpS* situé en aval du gène *alkB1* a une fonction prédite de protéine chimiotactique acceptrice de méthyle (MCP) [252]. De même, le gène *alkN* chez *P. putida* GPO1 est également prédit pour coder une MCP et pourrait être impliqué dans le chimiotactisme des alcanes [27]. Le séquençage et l'analyse du génome d'*Alcanivorax dieselolei* B5 a conduit Lai *et al.* [140] à proposer une voie de chimiotactisme pour les alcanes avec 8 protéines cytoplasmiques qui seraient impliquées dans la transmission de signaux issus de MCP au moteur du flagelle [252]. Cependant, ces fonctions de chimiotactisme envers les alcanes restent à démontrer expérimentalement.

Contrairement aux biofilms formés sur chitine [78,190], l'identification d'adhésines ou de liaisons aux récepteurs spécifiques des hydrocarbures ou des lipides n'a pas été rapportée chez les bactéries oléolytiques. L'adhésion aux hydrocarbures repose sur les propriétés de surface des cellules telles que l'hydrophobicité, la charge, la rugosité et les appendices extracellulaires. Les molécules de surface responsables de ces propriétés sont les lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif, les acides mycoliques chez les bactéries à Gram positif ainsi que le glycocalyx, qui est un complexe de polysaccharides et de protéines [1,7,16,17,219,262]. Bien que l'adhésion aux hydrocarbures ne semble pas dépendre de la reconnaissance des structures moléculaires, la formation d'un biofilm chez de nombreuses bactéries est liée à une préférence ou une spécificité pour la surface des hydrocarbures métabolisables ou pour des lipides [120,130,204]. De plus, l'analyse par microarray des biofilms produit par *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 a révélé que la formation de biofilms sur hexadécane ou sur trioléine impliquait des réponses génétiques distinctes, indiquant que *M. hydrocarbonoclasticus* adapte sa physiologie au composé constituant l'interface nutritive [167].

Pour tous les types de biofilms, y compris les biofilms oléolytiques, les pili sont des organites qui participent à l'adhésion. Par exemple, sur les COH, un mutant d'*Acinetobacter venetianus* RAG-1 dénué de pili a montré une incapacité à adhérer et à croître sur des hydrocarbures [209]. La production d'exopolymères (EPS) observée chez les bactéries se développant à la surface des hydrocarbures [16,262] suggère un rôle général de l'EPS dans l'adhésion aux surfaces nutritives ou entre les cellules, bien que d'autres études soient nécessaires à l'élucidation de cette fonction. La contribution de ces différents mécanismes d'adhésion se traduit par la fixation sélective des cellules sur la surface nutritive. Les bactéries qui s'attachent à des substrats non dissous ont la capacité d'activer des gènes métaboliques et de changer rapidement de physiologie afin de rendre le substrat disponible. De nombreuses souches poussant sur les hydrocarbures modifient leurs propriétés de surface. Les cellules de *Mycobacterium* sp. LB501T cultivées sur l'antracène sont significativement plus hydrophobes et chargées négativement que les cellules cultivées avec du glucose [263]. De même, les cellules d'*Acinetobacter venetianus* VE-C3 et de *Rhodococcus* sp. Q15 deviennent plus hydrophobes lorsqu'elles sont exposées aux alcanes [16,262]. L'adhérence aux hydrocarbures peut également varier selon la phase de croissance. Les cellules de *Gordonia* sp. en phase de croissance précoce augmentent leur adhérence aux hydrocarbures tandis que les cellules en phase de croissance avancée se détachent [84].

3. Comportements sociaux au sein des biofilms

Outre la facilitation de l'accès aux nutriments, les biofilms formés sur la matière organique particulière en milieu marin favorisent également les interactions cellulaires. Les biofilms, du fait de la complexité de leur structure, de leur forte densité cellulaire (10^8 à 10^{11} cellules.g⁻¹ de poids sec) et composés de plusieurs espèces [82], présentent un environnement idéal pour l'apparition de comportements sociaux tels que des comportements collectifs contrôlés par les systèmes de *quorum-sensing*, la

coopération ou encore la compétition [62,103,186,229,257]. Les études menées sur les biofilms sont bien souvent réalisées sur des biofilms mono-spécifiques alors que les biofilms environnementaux sont composés de plusieurs espèces microbiennes [82,122,197,199]. Ces populations peuvent interagir entre elles à différents stades de développement du biofilm [59].

Outre les mécanismes d'adhésion des microorganismes décrits ci-dessus, il existe un mécanisme de recrutement de colonisateurs secondaires par les colonisateurs primaires : la co-agrégation. Ce processus est central pour l'établissement de communautés de biofilms multi-espèces [202]. Les partenaires ainsi recrutés peuvent interagir, communiquer, coopérer. La co-agrégation influant sur la formation des biofilms en milieu marin n'est pas documentée. Néanmoins, elle a été observée en eau douce et en station d'épuration [59]. McCormick *et al.* [158] estiment que la co-agrégation microbienne associée aux particules marines pourrait participer à l'établissement d'une chaîne parcimonieuse, augmentant le potentiel énergétique des métabolites de ces « îlots » riches en ressources dans un environnement globalement oligotrophe.

3.1. Les comportements sociaux

D'après West *et al.* [260], un comportement est social s'il présente des conséquences pour la fitness (succès reproducteur) à la fois de « l'acteur » et du « receveur ». Un comportement mutualiste augmente la fitness de l'acteur et du receveur alors qu'un comportement égoïste apportera une perte au receveur. Un comportement qui induit une perte de fitness pour l'acteur est défini comme altruiste si le receveur en bénéficie et malveillant si le receveur en souffre. Ces comportements sociaux sont favorisés par l'environnement : la lutte pour une ressource nutritive, la lutte pour un habitat, la promiscuité apportée par une niche écologique, etc. Leur apparition s'explique par des théories évolutives que l'on peut généralement classer en deux catégories : le gain direct ou indirect de fitness [88,260]. L'organisation des biofilms bactériens permettent aux organismes d'interagir en proximité immédiate, ce qui favorise l'échange de métabolites, de molécules signal, de matériel génétique et de composés de défense. De plus, l'hétérogénéité des biofilms en terme de diversité physiologique des cellules et de gradients chimiques fournit des opportunités de coopération ou de compétition [82].

3.1.1. Mutualisme / coopération

Afin de comprendre la notion de coopération entre microorganismes, il est nécessaire de définir la notion de bien public (« public good »). Un bien public pour les bactéries peut être défini comme une ressource sécrétée en dehors de la cellule et qui bénéficie à l'individu producteur mais aussi à ses proches voisins. La production de cette ressource a nécessairement un coût pour la cellule qui la produit [83,180,260]. Par rapport aux bactéries non adhérentes assimilant le DOC, les bactéries adhérentes au POC doivent payer le coût de la synthèse des facteurs d'adhésion, des systèmes de sécrétion et la sécrétion des facteurs de solubilisation [82]. Ainsi, ces facteurs sécrétés (tableau I-2) sont des biens publics puisqu'eux ou le produit de leur activité est disponible pour les autres microorganismes avoisinants.

Tableau I-2 : Exemples de bien publics potentiellement retrouvés dans une population adhérente à une surface nutritive (d'après West *et al.* [147]).

	Nature du bien public	Fonction du bien public
Adhésion, formation et composition du biofilm	EPS (polymères d'adhésion, alginate, rhamnolipides)	Participe, à l'adhésion à la surface et à la cohésion entre cellules. Les rhamnolipides sont impliqués dans le détachement du biofilm.
	ADN extracellulaire	Composant structural des biofilms impliqué dans l'adhésion
	Vésicules membranaires	Composant les biofilms, transporteurs de signaux intercellulaires
	Biosurfactants	Facilite l'accès aux surfaces hydrophobes. Les rhamnolipides composent la matrice extracellulaire et facilitent le mouvement sur les surfaces.
Assimilation de la matière organique et de nutriments	Enzymes hydrolytiques	Protéines extracellulaires de digestion
	Sidérophores	Molécules capturant le fer
Défense et compétition	β -lactamase	Résistance aux antibiotiques
	Antibiotiques	Compétition
	Rhamnolipides	Intervient dans des mécanismes de défense contre les protozoaires
	Répulsifs microbiens	Repoussent les compétiteurs
	Facteurs anti-protozoaires	Mécanisme de défense contre les organismes brouteurs
Communication cellulaire	Signaux du QS	Communication intra et interspécifique. Régule l'expression d'un grand nombre de gènes (impliqués par exemple dans la formation et le détachement du biofilm, les mécanismes de défense, etc.)

Au sein de biofilms lytiques, des comportements coopératifs ont été recensés, par exemple sur la chitine où l'utilisation de produits de dégradation de la chitine par des bactéries non chitinolytiques a été observée [20]. Chez *Pseudoalteromonas* sp. S91 qui développe un biofilm à la surface de la chitine, seule une fraction de la population exprime le gène de la chitinase, ceci suggère que cette sous-population pourrait générer un surplus de produits de dégradation de la chitine profitable à ses plus proches voisins qui ne présentent pas d'activité chitinase [20]. La même souche présente le même type de comportement avec une souche d'une espèce différente, *Vibrio* sp. S141 au sein d'un biofilm chitinolytique mixte [79].

Au-delà du cross feeding qui a lieu au sein des biofilms, l'excès de substrat produit lors de la solubilisation peut créer un efflux en dehors du biofilm et être accessible aux cellules planctoniques avoisinantes. La modélisation mathématique prédit que l'établissement d'un biofilm multicouches implique une production de substrat plus importante par la fraction de la population cellulaire qui est au plus proche de surface de la particule par rapport à sa consommation. Cette surproduction de substrat soluble diffuse dans le biofilm et permet d'alimenter les fractions de la population plus distantes de la surface de la particule [245,253,254]. L'efflux de substrat a été observée dans des biofilms cellulolytiques (dégradant la cellulose), confirmant les prédictions du modèle [152,253]. L'excès de substrat solubilisé et sont efflux en dehors du biofilm ont une grande importance écologique car ils peuvent donner lieu un cross-feeding entre communautés bactériennes. Dans les

environnements pélagiques marins, les colonisateurs de la neige marine produisent plus de carbone organique soluble qu'ils n'en consomment, laissant derrière la particule descendante un panache de DOC (figure I-10 et I-11) qui peut être utilisé par les bactéries planctoniques environnantes [14,15,129,223,228].

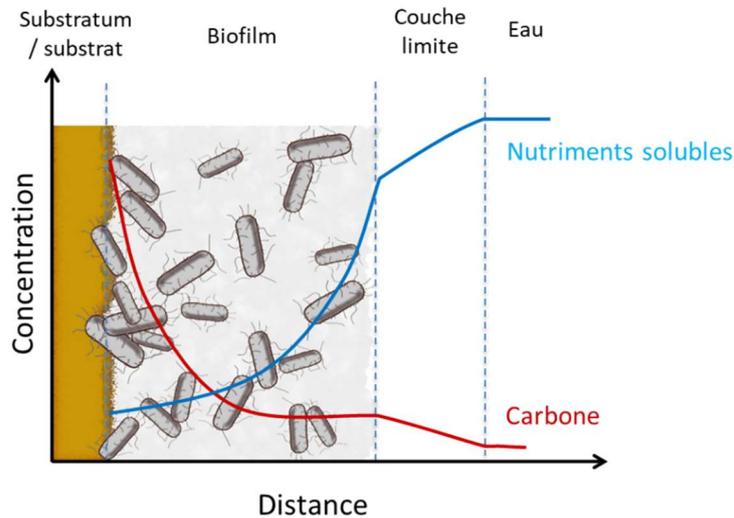


Figure I-9 : Solubilisation du POC par le biofilm lytique en DOC assimilable
La production de DOC non assimilée par les bactéries adhérentes diffuse en dehors du biofilm.

3.1.2. Cheating = triche

La coopération, basée sur le partage de biens publics, est vulnérable aux tricheurs, qui sont des cellules ne produisant pas le bien public mais bénéficiant de ceux produits par les autres. Les tricheurs sont des individus qui ne coopèrent pas (ou coopèrent moins que les autres) et qui peuvent potentiellement tirer bénéfice de la coopération des autres [260]. Ces cellules ne paient pas le coût engendré par la production du bien public, ce qui leur apporte un réel avantage de fitness par rapport aux coopérateurs à qui ils font concurrence. Ainsi les tricheurs peuvent mener à la perte du caractère coopératif par épuisement du bien public [88,179,259].

Dans les communautés naturelles, l'apparition de tricheurs paraît inévitable. En effet ce type de trait peut apparaître par mutation de cellules coopératrices ou se manifester comme d'autres espèces parmi la diversité de la communauté. Le bénéfice net issu de l'assimilation du POC ne peut être atteint que si les tricheurs sont contenus dans leur expansion ou spatialement mis de côté. Les mécanismes qui stabilisent les interactions entre coopérateurs et tricheurs ont été découverts par des études théoriques et expérimentales [40,170,179]. La structuration spatiale et la densité cellulaire ont été reconnues comme critiques pour la protection contre l'exploitation par les tricheurs pendant l'assimilation des composés polymériques via la digestion extracellulaire. Des simulations numériques ont indiqué qu'un faible taux de diffusion des biens publics induisait une structuration spatiale qui bénéficiait aux coopérateurs alors qu'un fort taux de diffusion favorise la triche [4,5,83,245]. Ces résultats théoriques ont été soutenus par des études empiriques. Allison *et al.* [6] ont observé qu'une communauté se nourrissant de caséine, composée de producteurs d'exoprotéase et de mutants non protéolytiques, est capable de réguler ses tricheurs dans des conditions bien structurées sur gélose alors qu'en milieu liquide les tricheurs sont en mesure de prendre le dessus dans la population. Dans le biofilm chitinolytique de *V. cholerae* N16961, l'exploitation par les mutants non producteurs de chitinase est évitée par la sécrétion d'une épaisse matrice qui confine les producteurs et leurs biens publics ensemble en réduisant la diffusion de produits solubles de la digestion de la chitine en dehors du biofilm [68]. À forte densité cellulaire, les biens publics sont utilisés beaucoup plus efficacement à mesure que les avantages augmentent avec leur concentration [61,111]. De plus, à densité de

coopérateurs élevée, une plus grande proportion de biens publics est utilisée par les coopérateurs au détriment des tricheurs [12]. Enfin, l'avantage apporté par une densité cellulaire élevée et un environnement structuré pour l'assimilation de substrats polymériques est illustré par des expériences montrant qu'une bactérie sécrétant une exoprotéase était incapable d'utiliser la caséine comme substrat lorsqu'elle se trouvait à l'état planctonique alors que les cellules liées à une membrane flottant dans un milieu contenant de la caséine pouvaient croître et former des colonies sur la membrane [174].

Tout type d'exoproduit (exoenzymes, biosurfactants, siderophores, etc.) représente un bien public d'intérêt exploitable par les tricheurs. Les signaux *quorum-sensing*, sécrétés dans le milieu extracellulaire sont également des biens publics et de ce fait n'échappent pas non plus aux tricheurs [58,232,259].

3.1.3. Communication / quorum-sensing

Les dogmes en microbiologie ont été bouleversés par la découverte du *quorum-sensing* (QS). En effet, il était supposé que la capacité de communiquer entre individus était réservée aux organismes supérieurs ou à des bactéries spécifiques telles que les bactéries formant des corps fructifères [85]. Cependant, dans les années 1990, le fait que certaines populations bactériennes agissent de concert en émettant et détectant de petites molécules diffusibles appelées autoinducteurs (AIs), dont la concentration est cruciale pour un comportement coordonné, a été unanimement admis. Ce phénomène, appelé *quorum-sensing*, permet aux populations bactériennes d'évaluer leur taille et d'exprimer certains gènes en fonction de la densité cellulaire (c'est-à-dire quand le *quorum* est atteint) [38].

La concentration en AIs dans le milieu ambiant dépend de la densité des cellules les produisant et des propriétés de transfert de masse du milieu. Les systèmes QS permettent ainsi aux bactéries de détecter et répondre à la densité de population et la structuration du milieu [188].

Les autoinducteurs sont de différentes natures : N-acyl-homosérine lactones (AHLs), peptides, etc. Les AHLs sont plus communément retrouvées chez les bactéries à Gram négatif alors que les peptides sont plus fréquents chez les bactéries à Gram positif [85].

Les AHL sont produits par une AHL synthase (LuxI) codée par le gène *luxI* en référence au système Lux du QS de *V. fischeri*, modèle historique du QS. Une liaison amide est créée, par Lux I, entre une S-adénylméthionine (SAM) et le résidu acyl apporté par l'Acyl Carrier Protein (ACP). L'AHL ainsi produite, à concentration suffisante, est perçue par le régulateur transcriptionnel de la famille LuxR. Ce facteur transcriptionnel présente un domaine de liaison aux AHL et un domaine de liaison à l'ADN. Les régulateurs LuxR fonctionnent sous forme de multimères. Les complexes LuxR-AHL se lient à une séquence d'ADN particulière située en amont des gènes cibles : la boîte type *lux*. Chez les bactéries à Gram positif, les AIs sont souvent des oligopeptides synthétisés sous la forme d'un peptide précurseur plus long qui subit diverses modifications jusqu'à sa sécrétion. Les peptides signaux sont reconnus par des récepteurs faisant partie de systèmes à deux composants. La transduction du signal est réalisée via une cascade de phosphorylations [19,108]. Il existe également un système QS, retrouvé à la fois chez des bactéries à Gram négatif et chez des bactéries à Gram positif. Ce système QS utilise l'AI de type 2 (AI-2), qui est reconnu par un système à deux composants. Les AHLs et peptides signaux sont principalement impliqués dans la communication intra-spécifique alors que les AI-2 seraient plus spécifiques des communications interspécifiques [80,165].

Du fait de leur sécrétion en dehors de la cellule et de leur nature diffusible, les AIs constituent des biens publics. Et, chez de nombreuses bactéries, la production de bien public, tels que les exoenzymes, est sous le contrôle de système *quorum-sensing*. La présence d'AHLs a été détectée dans des échantillons de neige marine et l'ajout d'AHLs exogènes dans ces échantillons augmentaient l'activité d'enzymes hydrolytiques (aminopeptidases, lipases et phosphatases extracellulaires)

[114,117]. Ces observations suggèrent que les bactéries impliquées dans la dégradation du POC dans l'eau de mer utilisent le QS pour réguler la production d'exoenzymes de façon à optimiser les bénéfices des biofilms colonisant la surface du POC grâce à une densité cellulaire élevée et une structuration spatiale. Les systèmes QS peuvent être régulés ou perturbés par des mécanismes de *quorum quenching*. Le *quorum quenching* (QQ) décrit le principe d'interférence du QS et correspond à différents mécanismes [31,92,112,195] : inhibition de la production du signal, destruction des Als dans le milieu [49], inhibition de la perception des Als. Ces mécanismes sont présents chez les bactéries présentant un système QS, chez des bactéries pour lesquelles aucun système QS n'est connu et chez des eucaryotes (plantes, algues, mammifères) [49,112,171,195]. Le QQ peut participer à des fonctions de compétition [112].

Ces études sur les comportements sociaux s'établissant lors de l'assimilation du POC indiquent qu'au-delà d'un simple mécanisme d'accès aux POC, l'établissement d'un biofilm apporte une structure spatiale et une forte concentration cellulaire limitant l'exploitation des ressources par les tricheurs et permettant l'acquisition de bénéfices nets de l'assimilation du POC.

3.1.4. Compétition

La compétition se réfère au processus par lequel un individu diminue la survie ou la reproduction des autres. En écologie, deux types de compétition sont distingués : l'exploitation et l'interférence. L'exploitation est une compétition indirecte qui a lieu quand un organisme consomme la ressource d'un autre. Elle est observée dans des communautés microbiennes denses telles que les biofilms dans lesquels la limitation nutritive est commune [56,88]. *E. coli* et *Streptomyces cerevisiae* ont la capacité de changer de métabolisme de la fermentation à la respiration en présence d'oxygène, générant ainsi un fort taux de croissance mais avec un faible rendement leur permettant d'absorber les nutriments plus rapidement que leur compétiteur [88]. Le cheating peut également être perçu comme une forme de compétition d'exploitation. La conquête d'une surface (nutritive ou non) s'intègre également dans ce type de compétition. Cela peut être en colonisant plus rapidement une surface pour empêcher l'autre de s'y installer, ou le repousser via l'utilisation de rhamnolipides, d'adhésines ou encore de polysaccharides extracellulaires [113,250]. Par exemple, *E. coli* inhibe la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* via la production de surfactants et d'exopolysaccharides [200]. De même, *P. aeruginosa* colonise rapidement une surface et la recouvre de façon à empêcher la formation du biofilm d'*Agrobacterium tumefaciens* [88]. La compétition pour une surface peut aussi consister à étouffer et affamer le compétiteur déjà présent afin de prendre sa place [88,199,215].

L'interférence est une forme beaucoup plus directe de compétition. La production d'antimicrobiens tels que les bactériocines, les antibiotiques, les mécanismes de *quorum quenching*, sont des exemples d'interférence. La production de systèmes de sécrétion de type VI par lesquels les cellules injectent des toxines ou d'autres molécules induisant la lyse de la cellule victime fait également partie des formes de compétition directe [56,88].

Plus de 50 % des isolats bactériens marins se sont avérés antagonistes envers d'autres bactéries, et ceci est encore plus marqué chez les bactéries marines associées à une particule que chez les bactéries marines libres [14,97]. Parmi les substances antimicrobiennes retrouvées dans le POC, on peut citer le tropodithietic acide (TDA), l'indigoidine, ainsi que des antibiotiques principalement utilisés dans le groupe des *Roseobacter*. La production de TDA et d'indigoidine peut être régulée par QS, et leur production apporte un avantage compétitif à la colonisation des surfaces. Dans le groupe des *Roseobacter*, la production d'antibiotiques est 10 fois plus élevée chez les bactéries adhérentes que chez les bactéries libres dans la colonne d'eau. Dernièrement, il a été montré que plus d'un quart des *Gammaproteobacteria* possédaient des systèmes de sécrétion de type VI impliqués dans la prédation entre bactéries voisines. Ces systèmes sont également retrouvés affiliés aux *Bacteroidetes* dans des métagénomiques marins. Ces mécanismes pourraient apporter une explication à la succession microbienne observée parmi les colonisateurs des POC. En effet, il a été montré que ce sont principalement les *Alphaproteobacteria*, et en particulier les *Rhodobacterales*, qui colonisent en

premier les surfaces en milieu marin [60,221], ceci du fait de leur capacité spécifique à y adhérer. Les *Gammaproteobacteria* et *Bacteroidetes* pourraient ensuite leur succéder via l'utilisation de système de sécrétion de type VI [59].

Un résumé des interactions pouvant avoir lieu au sein d'une particule de POC est présenté sur la figure I-11.

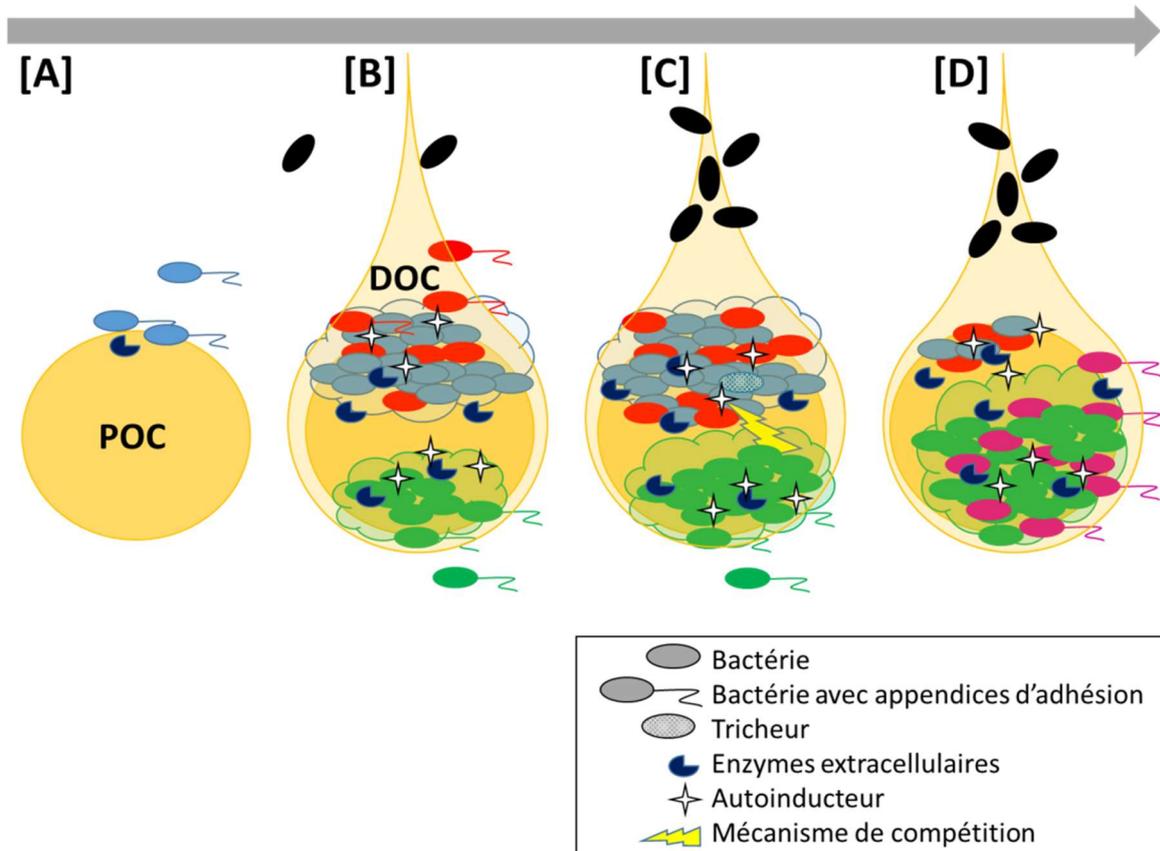


Figure I-10 : Schématisation de la colonisation et de l'assimilation du POC régulée par les interactions environnementales et cellulaires

[A] les primo-colonisateurs (bleu) perçoivent la présence de carbone et nagent jusqu'à la particule pour y adhérer. La production d'enzymes extracellulaires permet d'alimenter la multiplication cellulaire et la formation de micro-colonies. [B] Les cellules entrent dans une phase d'adhésion irréversible. D'autres bactéries viennent coloniser la particule (vert) et les primo-colonisateurs recrutent des colonisateurs secondaires (rouge) utilisant les métabolites produits par les primo-colonisateurs. [C] La production d'enzymes extracellulaires, activée par des signaux du QS, produit une quantité de carbone soluble plus importante que ce qui est consommé par les colonisateurs, bénéficiant ainsi aux tricheurs mais également aux bactéries planctoniques environnantes qui profitent du panache de carbone soluble que laisse dans son sillage la particule en cours de dégradation. La triche est néanmoins limitée par la forte densité cellulaire et la structuration du biofilm. [C] / [D] la population verte provoque le détachement et la lyse des populations bleu et rouge par compétition pour l'accès à la ressource et recrute de nouveaux colonisateurs secondaires (violet) capables de métaboliser le produit de son hydrolyse.

3.2. Les biofilms oléolytiques : un environnement favorable à l'établissement de comportements sociaux

McGenity et *al.* [159] recensent quelques comportements sociaux observés lors de la dégradation des hydrocarbures tels que l'établissement de consortiums bactériens composés de plusieurs espèces permettant de métaboliser complètement un substrat (succession de métabolismes). Ils proposent comme exemple la dégradation des PAH qui ne sont pas complètement oxydés en CO₂ et H₂O par un seul organisme. Cet épimétabolome peut être avantageux comme source de carbone et d'énergie pour de nombreux autres organismes voisins. Ils donnent également l'exemple de la compétition observée entre une souche d'*Alcanivorax* sp. et une souche de *Thalassolituus oleivorans* : en culture sur alcanes, *Thalassolituus* devance *Alcanivorax*.

Tout reste à faire en termes d'étude des comportements sociaux au sein des biofilms oléolytiques. Bien que certains travaux se soient intéressés aux capacités de dégradation des HC par des consortia bactériens dans le but d'optimiser la dégradation de certains composés, très peu d'équipes se sont penchées sur l'environnement spécifique apporté par le biofilm dans le cadre d'interactions lors de la dégradation des COH. Néanmoins, il nous semble évident que les biofilms oléolytiques peuvent être le théâtre des comportements cités ci-dessus. En effet, les lipases, les biosurfactants et certaines adhésines constituent des biens publics pouvant induire coopération et triche, et la conquête de la surface pourrait engendrer des comportements compétitifs.

Il semble évident que de nombreux éléments manquent afin de nous permettre de mieux qualifier les biofilms oléolytiques. Accéder à une meilleure estimation de la diversité des souches capables de former un biofilm sur COH semble primordial. En effet, jusqu'ici la diversité recensée sur COH est biaisée par un grand intérêt suscité par les bactéries hydrocarbonoclastes contre une faible quantité de données générées sur l'assimilation des lipides en milieu marin. La diversité des bactéries assimilant les COH est-elle compartimentée selon une spécificité d'assimilation de certains substrats en particulier, comme Yakimov et ses collaborateurs [270] le proposent avec la notion de bactéries hydrocarbonoclastes obligatoires, ou les bactéries hydrocarbonoclastes sont-elles généralement capables de dégrader les lipides comme cela a été montré pour *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 classée alors comme hydrocarbonoclaste versatile ? A contrario, les souches capables de dégrader les lipides sont-elles capables d'assimiler les HC ? Si la diversité des biofilms oléolytiques montre une capacité d'assimilation des HC associée à une capacité d'assimilation des lipides et vice versa, quels pourraient être les liens fonctionnels liant les capacités d'assimilation de ces deux types de COH ? Comment ces souches peuvent-elles interagir au sein d'un biofilm mixte ?

Ce sont autant de questions auxquelles nous allons tenter de répondre afin d'enrichir nos connaissances sur une catégorie de biofilms n'ayant jusqu'ici suscités que peu d'intérêt malgré l'importance que la dégradation du POC, et en particulier des COH (représentants une part majeure du carbone des océans), ont dans le recyclage de la matière organique en milieu marin.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Culture des souches bactériennes

1.1. Souches criblées issues de collections

Cent-quatre-vingt-dix-huit souches d'origine marine issues de diverses collections (MOLA, DSMZ, LMG, NCIMB, NBRC) et de dons ont été choisies pour déterminer la biodiversité des souches capables de former un biofilm oléolytique (annexe 1).

1.2. Souches isolées par enrichissement sur COH

Trente-huit souches ont été isolées, lors de précédentes études menées au laboratoire, pour leur capacité à former des biofilms oléolytiques sur divers substrats hydrophobes : hexadécane (alcane linéaire en C₁₆), paraffine (ensemble d'alcane linéaires essentiellement > C₂₀), tripalmitine (TG), trioléine (TG) et hexadécyl palmitate (cires). Les prélèvements pour ces isolements ont été effectués en mer du Nord par Régis Grimaud et au niveau de la lagune de Bizerte en Tunisie (figure II-1) par Habiba Ennouri. Les souches de mer du Nord ont été isolées lors de la campagne FACEiT. Elles proviennent d'une nappe de pétrole (station 23) ou d'un mésocosme contenant 1 m³ d'eau de mer et 2 L de pétrole brut (arabian light) incubé pendant 7 jours d'enrichissement. Les échantillons et l'eau de mer utilisés pour le mésocosme ont été prélevés au niveau du Dogger Bank* (figure II-2). Ces souches ont été identifiées via le séquençage du gène de l'ARNr 16S à l'aide des amorces 8F et 1492R [240].

*Dogger Bank : https://fr.wikipedia.org/wiki/Dogger_Bank

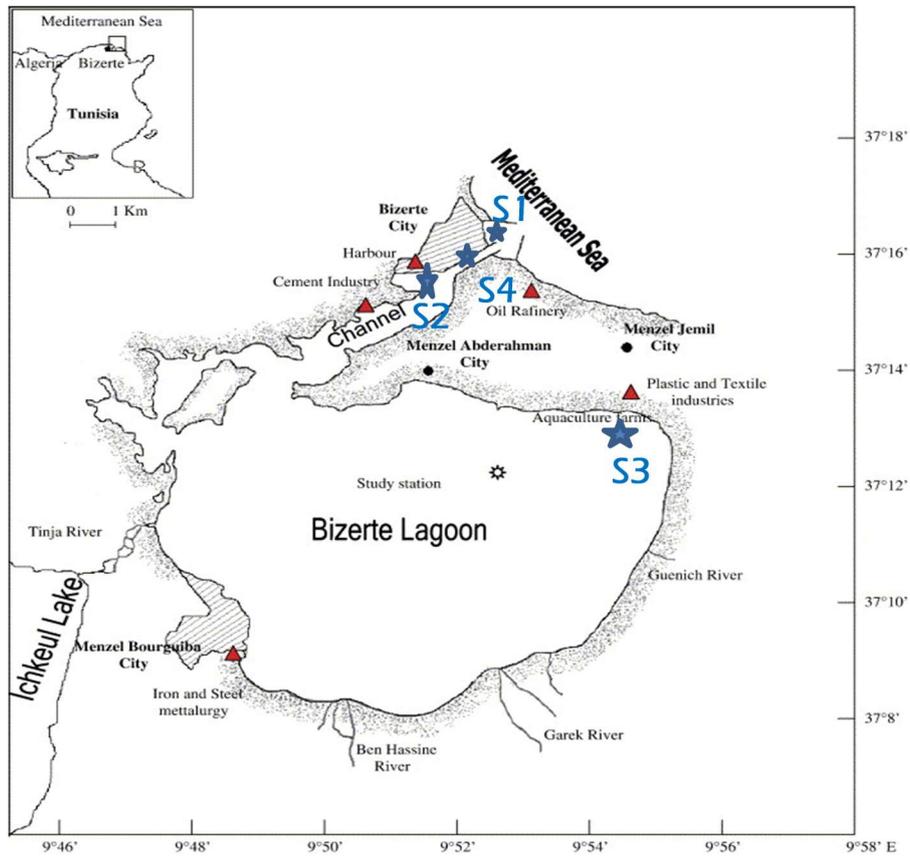


Figure II-1 : Localisation des échantillonnages effectués dans la lagune de Bizerte

L'échantillonnage a été effectué au niveau de 4 stations (étoiles bleues) :

Station S1 : au niveau de la baie (station la plus proche de la mer). Deux prélèvements ont été effectués : l'un en surface et l'autre à 20 m de profondeur.

Station S2 : au milieu du canal, à 50 cm et 5 m de profondeur.

Station S3 : station Menzel Jemil, en surface et en présence d'une efflorescence phytoplanctonique.

Station S4 : sur les bords du canal, en surface.

Les triangles rouges indiquent les usines proches des lieux d'échantillonnage.

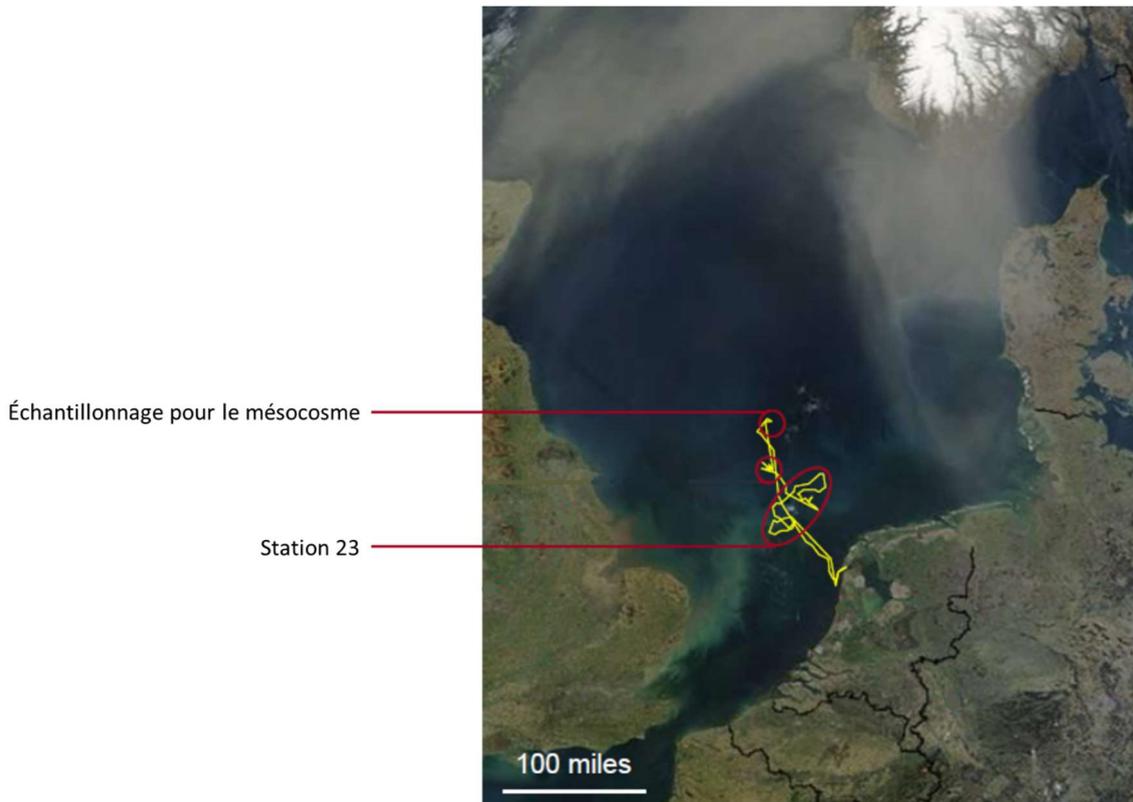


Figure II-2 : Tracé de l'expédition « FACEiT » en mer du Nord.

Seuls les points correspondant aux échantillonnages concernant cette étude sont indiqués (document issu de *Faceit cruise report*).

2. Conditions de culture des souches bactériennes

Les souches issues de la collection MOLA (Laboratoire Arago, UPMC, Banyuls-sur-Mer) ont été cultivées en Marine Broth 2216 (MB, Difco). Les souches issues de mer du Nord ou de la lagune de Bizerte ont été cultivées en eau de mer synthétique (EMS) supplémenté en GALP (glucose, acétate, lactate, pyruvate). Les autres souches ont été cultivées dans les milieux présentés dans le tableau II-1. Les milieux de culture utilisés ont été préparés comme suit :

- EMS : NaCl 0,2 M, KCl 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,8, NH₄Cl 56 mM, K₂HPO₄ 427 μM, FeSO₄ 8 μM, MgSO₄ 65 mM et CaCl₂ 13 mM,
- mélange de glucose, acétate, lactate et pyruvate (GALP) à 20 mM concentration finale pour chaque composé,
- MB ou MB supplémenté en pyruvate (10 g.L⁻¹) ou en NaCl (30 g.L⁻¹),
- milieux dont la composition est donnée par la DSMZ : DSM 381, DSM 1238, DSM 92 et DSM 1009,
- DSMZ 1238min : se référer à la composition donnée par la DSMZ du milieu 1238, à laquelle la peptone et le glucose ont été supprimés, et l'extrait de levure réduit à 0,05 g.L⁻¹,
- PYE : bactopectone 0,2 % (m/v), extrait de levure 0,1 % (m/v), MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 0,5 mM,
- Marine Broth minimum modifié (MBmin) : MB 2216 Difco sans peptone, sans citrate de fer, à 0,05 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 1 mL.L⁻¹ d'une solution d'éléments traces. La solution d'éléments traces contient (pour 1 L d'eau distillée) : 15 mg CuCl₂.2H₂O, 46 mg NiCl₂.6H₂O, 25 mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 70 mg ZnCl_2 , 100 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 120 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4 g FeCl_3 , 2 g EDTA, 6.5 mL HCl 25 %. Le milieu est ajusté à pH 8.

Les milieux ont été solidifiés par l'ajout d'agar ($14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) pour les cultures en boîte de Petri.

Toutes les cultures sur COH ont été effectuées en milieu minimum sans autre source de carbone que celle apportée par le substrat testé. Le milieu minimum utilisé pour chacune des souches est détaillé dans l'annexe 1.

Tableau II-1 : Milieux pour la culture des souches issues de collections internationales (hors MOLA) ou de don.

identifiant	identification	milieu de culture	milieu minimum
B2	<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	MB	MBmin
CB15	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	PYE	PYEmin
DG893	<i>Marinobacter algicola</i> DG893	EMS + GALP	EMS
DSM 11524	<i>Sagittula stellata</i> E-37	MB	MBmin
DSM 15171	<i>Ruegeria pomeroyi</i> strain DSS-3	MB	MBmin
DSM 16502	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	MB + pyruvate (10g/L)	EMS
DSM 17068	<i>Hoeflea phototrophica</i> DFL-43	MB	MBmin
DSM 17123	<i>Woodsholea maritima</i> CM243	DSM 1238	DSM 1238min
DSM 17395	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395	MB	MBmin
DSM 17893	<i>Balneola vulgaris</i> 13IX/A01/164	MB	MBmin
DSM 18339	<i>Pseudodonghicola xiamenensis</i> Y-2	DSM 381	MBmin
DSM 19537	<i>Haliae salexigens</i> 3x/A02/235	MB	MBmin
DSM 19753	<i>Spongiibacter marinus</i> 5IX/A0/131	MB	MBmin
DSM 19796	<i>Pontibacillus halophilus</i> JSM 076056	Marine Broth + NaCl (30g/L)	EMS
DSM 21750	<i>Paraoerskovia marina</i> CTT-37	DSM 92	MBmin
DSM 22007	<i>Litorimicrobium taeanense</i> G4	MB	MBmin
DSM 23232	<i>Bermanella marisrubri</i> RED65	MB	MBmin
HP15	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	EMS + GALP	EMS
IVIA-Po-181	<i>Marinomonas posidonica</i> IVIA-Po-181	MB	MBmin
SP17	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17	EMS + GALP	EMS
LMG 18921	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	MB	MBmin
LMG 2843	<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126	MB	MBmin
Mil-1	<i>Thalassolituus oleivorans</i> Mil-1	EMS + GALP	EMS
MMB1	<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB1	MB	MBmin
NBRC 100887	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	MB	MBmin
NCIMB 13437	<i>Cycloclasticus pugetii</i> PS-1	MB	MBmin
SK2	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	EMS + GALP	EMS
Vf	<i>Vibrio furnissii</i> 2510/74	EMS + GALP	EMS
VT8	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> VT8	EMS + GALP	EMS
DSM 19476	<i>Alishewanella aestuarii</i> B11	DSM 220	EMS
DSM 16280	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046	MB	MBmin
DSM 15446	<i>Alteromonas addita</i> R10SW13	MB	MBmin
DSM 14573	<i>Halomonas halocynthiae</i> 2.1.2	MB	MBmin
DSM 23545	<i>Marinobacterium litorale</i> IMCC1877	MB	MBmin
DSM 16183	<i>Neptunomonas naphthovorans</i> NAG-2N-126	MB	MBmin
DSM 13489	<i>Oleiphilus messinensis</i> ME102	EMS + GALP	EMS

3. Détermination de la gamme de substrats solubles

L'étude de la gamme de substrats solubles ou polymériques utilisables par les souches a été effectuée en milieu minimum (annexe 1) supplémenté avec pour seule source de carbone l'un des composés suivants : glucose, acétate, lactate, pyruvate, propionate, butyrate, glycolate, glycérol, N-acétyl-glucosamine, casaminoacides, peptone, chitine, cellulose, amidon (1 g.L^{-1}), glycogène (5 g.L^{-1}), lécithine ou cholestérol. Tous les substrats ont été testés à une concentration finale de 20 mM, sauf indication contraire.

L'activité caséinase a été testée en milieu minimum supplémenté de 10 g.L^{-1} de caséine. Le test est considéré positif si un halo est observable autour des colonies.

L'activité gélatinase a été examinée en milieu minimum supplémenté de 20 g.L^{-1} de gélatine. Les souches ont été cultivées en tube à 30°C . Les tubes ont ensuite été refroidis à 4°C pendant 4 h.

L'activité gélatinase est considérée positive quand une liquéfaction de la gélatine est observée au terme du test.

4. Étude des capacités d'adhésion et de formation de biofilm

4.1. Criblage des biofilms

4.1.1. Biofilms sur COH solides

4.1.1.1. Préparation des plaques 24 puits

Les cultures de biofilms ont été réalisées dans des plaques en polystyrène transparent 24 puits (Evergreen Scientific). Les puits ont été tapissés uniformément des substrats hydrophobes à tester (paraffine, tristéarine, acide palmitique ou hexadécyl palmitate). Pour cela, les composés ont été déposés dans les puits ($0,2 \text{ g/puits}$), les plaques ont été placées 1 h à 85°C puis refroidies quelques minutes sur un lit de glace. Les plaques ainsi préparées ont été stérilisées aux UV pendant 3 min.

4.1.1.2. Cultures bactériennes et inoculation des plaques 24 puits

Étude de la diversité des souches capables de former un biofilm oléolytique :

Les souches ont été cultivées selon leurs besoins jusqu'à la fin de leur phase exponentielle de croissance. Elles ont alors été lavées 3 fois par centrifugation (8000 g , 10 min, 25°C) puis resuspendues dans le milieu minimum adapté à chacune (cf. « milieu de criblage », annexe 1). Les suspensions cellulaires ont été ajustées à une $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 0,1 et ajoutées dans les puits tapissés de substrats à raison de 1 mL par puits. Des puits sans substrat ont également été inoculés (puits polystyrène). Les plaques ont alors été incubées 4 ou 13 jours à 25°C sous une agitation de 100 rpm. Toutes les cultures ont été réalisées en triplicats. Des plaques tapissées de substrat ont été incubées pendant 4 ou 13 jours avec chacun des milieux non inoculés afin de déterminer le bruit de fond lié à l'adsorption du cristal violet sur les substrats lors de la coloration.

Étude des comportements sociaux au sein de biofilms oléolytiques multi-espèces :

Les cultures sur COH ont été réalisées comme ci-dessus. Afin d'observer d'éventuels comportements sociaux, les souches ont été mélangées en quantité égale dans les plaques 24 puits tapissées de COH à raison de 1 mL de mélange par puits et incubées à 30°C et 100 rpm pendant 96 h.

Les souches ont également été cultivées en monoculture afin de comparer leur valeur de quantification de biofilm à celle des cocultures dans lesquelles elles sont impliquées.

4.1.1.3. Révélation des biofilms au cristal violet

Après 4 ou 13 jours d'incubation, les surnageants de culture sont délicatement aspirés et les puits sont rincés une première fois à l'eau Milli-Q (Millipore), environ 2 mL/puits, avec précaution afin de retirer les cellules non adhérentes ayant sédimenté au fond du puits. L'eau de rinçage est délicatement retirée et les cellules adhérentes au substrat hydrophobe sont colorées pendant 3 min avec 400 µL de cristal violet à 1 % (m/v). Après deux lavages à l'eau Milli-Q, un film violet tapissant la surface du substrat révèle la présence d'un biofilm [167]. L'appréciation visuelle de la formation d'un biofilm à la surface du substrat nécessite que le biofilm soit abondant, c'est-à-dire que la coloration violette à la surface soit intense et homogène. Dans le cas contraire, il n'est pas possible d'évaluer à l'œil la différence entre un véritable biofilm et le bruit de fond lié à l'adsorption du colorant aux substrats ou à l'adhésion aspécifique de l'inoculum qui ne s'est pas développé. Les plaques témoins non ensemencées subissent le même traitement.

La méthode est la même pour la coloration des biofilms cultivés en flacon pénicilline.

4.1.1.4. Quantification de la biomasse adhérente

Afin de quantifier la biomasse de biofilm, le cristal violet est extrait avec 1 mL d'une solution de décoloration contenant 10 % (v/v) d'acide acétique et 50 % (v/v) d'éthanol. L'absorbance de chaque réplica est mesurée à 595 nm. Afin de ne pas dépasser les limites de détection du spectrophotomètre, un facteur de dilution peut être appliqué (les dilutions sont réalisées avec la solution de décoloration).

- Corrections des résultats obtenus après croissance sur COH

Nous considérons qu'un biofilm s'est formé s'il y a eu adhésion et division des cellules. La valeur mesurée doit donc être supérieure à celle après coloration de l'inoculum qui aurait adhéré au substrat sans se diviser. Afin d'estimer cette valeur, 32 souches ont subi le même criblage à la différence que les milieux minimums utilisés étaient carencés en azote et en phosphore afin d'inhiber toute croissance. Ces souches ont été choisies pour couvrir au mieux la diversité criblée. Elles appartiennent aux *Proteobacteria* (*Gammaproteobacteria* et *Alphaproteobacteria*), *Actinobacteria*, *Balneolaeota* et *Firmicutes*. En réalisant cette expérimentation, nous avons constaté que ces valeurs étaient très faibles : en moyenne 0,6 sur paraffine et acide palmitique, 0,7 sur tristéarine et 0,8 sur hexadécyl palmitate. Ces valeurs sont proches de celles observées quand l'inoculation est réalisée sur polystyrène (en moyenne 0,4). N'étant pas en mesure de réaliser la quantification de l'adhésion des inocula sur l'ensemble des souches criblées, et au regard des valeurs obtenues ci-dessus, nous avons choisi d'assimiler la valeur de l'inoculum qui aurait adhéré au substrat sans se diviser à la valeur de biomasse mesurée sur les puits polystyrènes (puits inoculés sans COH).

La seconde correction apportée consiste à soustraire les quantifications obtenues sur les substrats non inoculés. En effet, les substrats peuvent retenir le cristal violet malgré les lavages (Tableau II-2).

Tableau II-2 : Exemple de valeurs de quantification après coloration au cristal violet de puits ne contenant que du milieu minimum

Substrat	EMS	MBmin
Paraffine	0,031	0,143
Tristéarine	0,08	0,097
Acide palmitique	5,525	1,995
Hexadécyl palmitate	0,138	0,082

4.1.2. Biofilms sur interfaces inertes

Une sélection de souches a été testée pour la capacité à former un biofilm en milieu riche sur le polystyrène des plaques 24 puits (Evergreen Scientific), ou sur le verre de flacon pénicilline de 12 mL. Les puits et les flacons avaient le même diamètre, assurant ainsi que les conditions de formation de biofilms sur COH, polystyrène et verre étaient comparables.

Préparation des surfaces :

Les plaques 24 puits en polystyrène transparent (Evergreen Scientific) sont fournies stériles et ne nécessitent donc aucune stérilisation préalablement à l'inoculation.

Les flacons pénicilline ont été bouchés avec du coton cardé et stérilisés par autoclavage (121°C, 20 min).

Cultures bactériennes et inoculation des supports :

Les souches ont été cultivées selon leurs besoins jusqu'au début de leur phase stationnaire de croissance. Les cultures ont été ajustées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,1 dans leur milieu spécifique et inoculées dans les puits ou les flacons pénicilline à raison de 1 mL. Plaques et flacons pénicilline ont alors été incubés 4 jours à 25°C et sous une agitation de 100 rpm. Chaque souche a été inoculée en triplicat sur polystyrène et sur verre. Des témoins avec les milieux non inoculés ont également été réalisés. Les biofilms formés ont été quantifiés par coloration au cristal violet comme décrit ci-dessus (paragraphe 1.2.1.1.4), néanmoins la seule correction apportée aux résultats a été la soustraction des témoins de milieux non inoculés sur verre et polystyrène.

4.2. Étude de l'adhésion en microscopie confocale à épifluorescence

L'adhésion a été étudiée sur des lames en polystyrène et des lames de verre, recouvertes ou non d'un COH.

Préparation des lames recouvertes de COH :

Des lames de microscopie en verre ont été plongées dans des bains de paraffine, de tristéarine ou d'acide palmitique en fusion, puis rapidement sorties et maintenues verticalement jusqu'à solidification afin que seule une fine couche de COH reste adhérente à la lame.

Culture bactérienne et inoculation des lames :

Une sélection de souches parmi celles au génome séquencé a été opérée pour ce test. Ainsi, *Marinobacter algicola* DG893, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, *Thalassolituus oleivorans* Mil-1, *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Alcanivorax dieselolei* B5, *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Donghicola xiamenensis* Y-2, *Alteromons macleodii* ATCC 27126, *Marinomonas mediterranea* MMB1, *Pelagibacterium halotolerans* B2 ont été cultivés en EMS + GALP ou en MB selon leur besoin (annexe 1) jusqu'à atteindre le début de la phase stationnaire. Les cellules ont alors été centrifugées (8000 g,

10 min, 25°C) puis les culots ont été repris dans de l'EMS ou du MBmin sans source de carbone, selon le milieu de culture initial. Les milieux ont été préalablement préchauffés à 30°C. Les suspensions bactériennes ont ensuite été ajustées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,1 dans un volume de 200 mL de milieu minimum et réparti à raison de 30 mL dans des tubes de 50 mL. Les lames ont été ensuite plongées dans les tubes et l'ensemble a été mis à incuber à 30°C et 100 rpm. Trois répliques par substrat et surface ont été réalisés.

Coloration des lames :

Après 3 h d'incubation, des lames ont été rincées avec 30 mL de milieu minimum correspondant pendant 10 min à 30°C et 100 rpm dans d'autres tubes de 50 mL. Les cellules adhérentes ont ensuite été colorées à l'acridine orange en plongeant les lames dans un bain d'une solution de milieu minimum avec $8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'acridine orange pendant 45 min. Après coloration, les lames ont été observées au microscope inversé Axio Observer.Z1 (Zeiss, Allemagne), avec un objectif 40 × longue distance (LD) et des filtres d'excitation et d'émission bandes passantes de 450-490 nm et 500-550 nm respectivement. Les images ont été prises avec une caméra CCD Zeiss AxioCam 506 ICc5 mono, un temps d'exposition de 750 ms et une intensité de 75 %. Les images obtenues ont été retouchées à l'aide du logiciel Zeiss ZEN 2012. Quinze images par lame ont été prises. Les traitements d'images ont été réalisés à l'aide du logiciel Image J/Fiji 1.46 (<http://imagej.nih.gov>) avec la macro détaillée en annexe 2.

4.3. Évaluation du caractère hydrophobe des surfaces utilisées dans cette étude

Le caractère hydrophobe de la paraffine, de la tristéarine, de l'acide palmitique, de l'hexadécyl palmitate, du polystyrène des plaques 24 puits, et du verre a été évalué par mesure des angles de contact du milieu de culture avec ces surfaces.

Ces mesures ont été réalisées à l'aide de l'appareillage Digidrop-angle de contact. Cet appareil doté d'une caméra permet de relever le profil de la goutte de milieu posée sur le substrat au moyen d'une seringue et d'une plateforme mobile. L'angle de contact a été estimé à l'aide du logiciel Windrop ++, option « énergie de surface ». Les mesures ont été effectuées en mode manuel ou semi-manuel.

4.4. Quantification de la dégradation des COH par les biofilms oléolytiques

4.4.1. Culture des souches

La dégradation des COH par les biofilms oléolytiques a été mesurée en comparant la quantité de COH restant après la croissance du biofilm.

- Préparation des flacons pénicilline

Une solution de chaque COH (paraffine, tristéarine, acide palmitique, hexadécyl palmitate) à $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ est préparée dans du chloroforme. Cette solution a été distribuée dans des flacons pénicilline, à raison de 1 mL par flacon, soit 1 mg de COH par flacon. Le chloroforme a été évaporé sous hotte pendant plus de 6 h, de façon à obtenir une fine couche de COH au fond des flacons.

- Cultures bactériennes et inoculation des flacons pénicilline

Les souches sélectionnées pour l'observation microscopique de l'adhésion ont également été testées pour la quantification de la dégradation des COH (Chap. 2, paragraphe 2.2). Les souches ont été cultivées en EMS + GALP ou en MB selon leur besoin (annexe 1) jusqu'à atteindre le début de leur

phase stationnaire. Les cellules ont alors été lavées 2 fois par centrifugation et les culots ont été repris dans de l'EMS pour les souches préalablement cultivées en EMS + GALP, dans du MBmin pour les souches préalablement cultivées en MB. Les suspensions bactériennes ont ensuite été ajustées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,1 dans un volume de 24 mL et réparties à raison de 2 mL par flacon pénicilline contenant 1 mg de substrat. Les flacons ont été incubés à 25°C, 90 rpm. Des flacons contenant les COH et les milieux minimums non inoculés ont également été incubés comme témoins abiotiques de dégradation. Toutes les cultures et témoins ont été réalisés en triplicats.

4.4.2. Chromatographie en couche mince (CCM)

Après 13 jours d'incubation à 25°C et 90 rpm, les COH restant ont été extraits pendant 30 min sous agitation à 300 rpm avec 2 mL de chloroforme contenant 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'hexadécanol comme étalon interne. La phase chloroforme a été prélevée et déposée sur une plaque de CCM (Gel de silice 60, Merck ref 1.05721.0001, 20x20 cm) à raison de 100 μL par dépôt (dépôt réalisé en 4 fois).

La séparation des composants a été réalisée avec comme phase mobile un mélange hexane/ éther diéthylique/ acide acétique (80/ 20/ 1, v/ v/ v). Les lipides et la paraffine sont localisés après avoir exposé la plaque de CCM à des vapeurs d'iode. La quantification des spots de COH a été réalisée après photographie des plaques de CCM et traitement des photos à l'aide du logiciel Image J/Fiji 1.46 (<http://imagej.nih.gov>). Les photographies ont toutes été réalisées dans les mêmes conditions et avec les mêmes paramètres de prise de vue.

5. Mesure de l'activité lipase dans des cultures sur hexadécane et trioléine

L'étude de l'activité lipase lors de la croissance sur alcane ou trioléine a été réalisée sur les souches suivantes : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8, *Marinobacter adhaerens* HP15, *Marinobacter algicola* DG893, *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Alcanivorax dieselolei* B5, *Thalassolituus oleivorans* Mil-1, *Rhodococcus erythropolis* PR4.

Cette étude a été effectuée par un dosage colorimétrique du *p*-nitrophénol produit par l'hydrolyse du *p*-nitrophényl-palmitate (NPP) qui était utilisé comme substrat de lipase.

Les souches ont été cultivées dans le milieu riche adapté à chaque souche jusqu'à atteindre le début de leur phase stationnaire, puis lavées 2 fois par centrifugation (8000 g, 10 min, 30°C) et resuspendues dans un milieu minimum adapté à chaque souche. Les cultures ont été ajustées à une $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,1 dans 5 mL de milieu supplémenté en hexadécane (0,2 %), trioléine (0,2 %) ou acétate (20 mM) comme seule source de carbone. Après 5 jours d'incubation à 30°C, 400 μL de culture sont prélevés pour la mesure de l'absorbance dans 800 μL (volume final, dilution effectuée dans le milieu adéquat à chaque souche). Puis 12,5 mL d'un mélange préchauffé à 30°C de solution A (1 volume) et de solution B (19 volumes) est ajouté au volume de culture restant. La solution A correspond à 8,8 mM de NPP dans de l'isopropanol et la solution B est composée de 0,1 % de déoxycholate et de 0,1 % de gomme arabique dissous dans un tampon Tris à 20 mM et pH 8. Le mélange de la culture et des solutions A et B a été incubé 3 min à 30°C, puis la réaction a été stoppée par l'ajout d'acide trichloroacétique à 5 % final. Les tubes ont ensuite été conservés dans la glace. Le surnageant a été récupéré après centrifugation (8000 g, 10 min, 4°C) et le pH a été réajusté à 8 par ajout de NaOH. Une lecture de l'absorbance à 405 nm a été réalisée pour chaque échantillon traité ainsi que pour un blanc correspondant à du milieu de culture non inoculé ayant subi les mêmes étapes que les échantillons. Ces dosages ont été réalisés en triplicat.

6. Étude de la production de signaux *quorum-sensing*

Dans le cadre de la caractérisation des souches capables de former un biofilm oléolytique, les souches marquées d'un ou plusieurs astérisques dans l'annexe 1 ont été à nouveau cultivées, dans les conditions du criblage, en milieu minimum avec pour seule source de carbone la paraffine, la tristéarine, l'acide palmitique ou l'hexadécyl palmitate. Les surnageants de culture ont été récupérés après 4 jours (souches marquées d'un astérisque), 14 jours (souches marquées de deux astérisques) ou aux deux temps (souches marquées de 3 astérisques), centrifugés à 10000 rpm pendant 5 min et filtrés (filtre 0,2 μm) afin d'éliminer les cellules planctoniques.

Dans le cadre la caractérisation de la souche MOLA 401, la recherche de la production de signaux de type AI-1 a été effectuée sur MOLA 401 et ses 6 plus proches parentes. Des précultures de ces souches ont été réalisées dans 50 mL de MB en Erlenmeyer de 250 mL et incubées à 30°C. Les précultures ayant atteint la phase stationnaire de croissance ont été relancées en culture en Erlenmeyer de 250 mL dans 50 mL de MB sous une agitation de 200 rpm à 30°C à une $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ de départ de 0,25. Trois réplicas ont été réalisés pour chaque souche. Des prélèvements de 150 μL ont été effectués toutes les heures, leur $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ a été mesurée, puis ils ont été centrifugés à 10000 rpm pendant 5 min.

Tous les surnageants ont été stockés à -20°C jusqu'à ce que la présence de signaux QS soit recherchée.

Les souches biosenseurs décrites dans le tableau II-3 ont été cultivées dans du milieu LB en présence de l'antibiotique spécifique à chaque souche. Les cultures ont été incubées 12 h à 37°C (*Escherichia coli* MT102) ou 30°C (*Pseudomonas putida* F117, *Vibrio harveyi* MM32). Les souches F117 et MT102 possèdent un système reporter induisant la production de fluorescence via l'expression du gène de la *gfp*. Ces systèmes rapporteurs sont portés par des plasmides, pKRC12 et pJBA-132 respectivement, insérés dans des souches ne produisant pas d'AHL. Mais le récepteur de type LuxR, apporté par le plasmide, active le système rapporteur en présence d'AHLs dans le milieu et donc la production de fluorescence. Comme indiqué dans le tableau II-3, ces systèmes rapporteurs sont spécifiques d'une certaine gamme d'AHLs (dépendant de la longueur de la chaîne acyl). La souche MM32 ne possède pas d'AI-2 synthase (LuxS) ni de récepteur à AI-1 (LuxN homologue de LuxR), elle ne produit donc pas d'AI-2 endogènes mais la présence d'AI-2 dans le milieu est reconnu par le système récepteur LuxPQ induisant l'activation des gènes de bioluminescence *luxCDABE*. Ces deux types de systèmes rapporteurs sont schématisés dans la figure II-3.

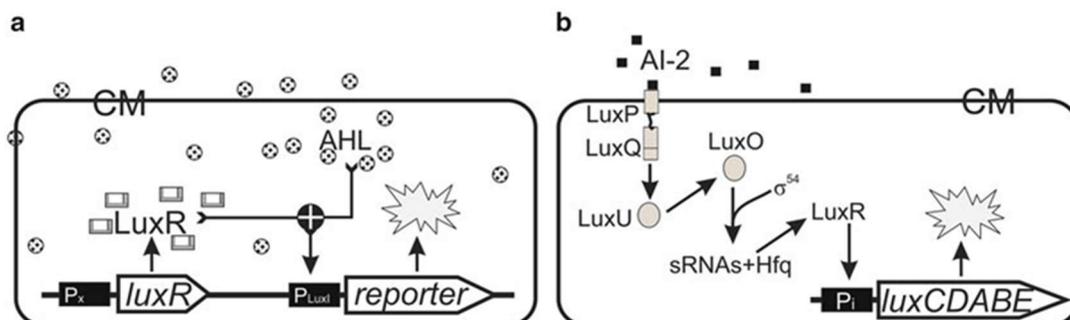


Figure II-3 : Fonctionnement général de systèmes biosenseurs d'AI (d'après Rai et al. [194]).

Ces systèmes sont basés a) sur la production de fluorescence (ex. *gfp*) ou b) sur la production de luminescence.

Tableau II-3 : Biosenseurs des autoinducteurs du *quorum-sensing*

Souches biosenseurs	Systèmes senseurs basés sur les systèmes QS suivant :	AI détectés / AI induisant le meilleur signal	Système rapporteur	Résistance antibiotique (concentration utilisée)	Références
<i>P. putida</i> F117 (pKR-C12)	LasB/R	C ₁₀ à C ₁₂ -AHL / C ₁₂ -3-oxo-AHL	<i>gfp</i>	Gentamycine (20 µg/ml)	[203]
<i>E. coli</i> MT102 (pJBA-132)	LuxI/R	C ₆ à C ₁₀ -AHL / C ₆ -3-oxo-AHL	<i>gfp</i>	Tétracycline (25 µg/ml)	[10]
<i>V. harveyi</i> MM32	LuxS	AI-2	<i>luxCDABE</i>		[162]

Les surnageants ont été mis en présence de biosenseurs afin de détecter la production de signaux *quorum-sensing*. Dans les conditions de l'expérience, les cultures des biosenseurs doivent avoir atteint une DO_{600 nm} de 1, avoir été diluées au 50^e dans du LB supplémenté avec l'antibiotique spécifique à chaque biosenseur et réparties dans une microplaque 96 puits à raison de 150 µL par puits. Cinquante microlitres de surnageant sont ajoutés dans les puits.

Les témoins suivants sont ajoutés dans la plaque :

- le milieu de culture des souches (milieu minimum utilisé lors du criblage ou MB), afin de connaître les valeurs de fluorescence ou de luminescence obtenues en l'absence d'AHL (bruit de fond).
- les standards AHL adaptés au biosenseur (tableau II-3) à une concentration finale de 2 µM comme témoins positifs de l'expérimentation.

Une première lecture de fluorescence ou de luminescence (suivant le biosenseur utilisé) a été réalisée dans un lecteur de microplaque (pour la mesure de fluorescence : longueur d'onde d'excitation = 485 nm, longueur d'onde d'émission = 535 nm). La microplaque est ensuite placée à 25°C sans agitation. Deux lectures sont ensuite réalisées après 5 h et 24 h d'incubation.

Lors de l'analyse des données, les valeurs de bruit de fond sont soustraites aux valeurs obtenues dans les puits contenant les surnageants testés.

Les souches MOLA (hors MOLA 401) ont été testées à Banyuls dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe de Raphaël Lami.

7. Analyses bio-informatiques et bio-statistiques

Les alignements multiples de gènes orthologues ont été réalisés en utilisant la méthode d'alignement Muscle v3.8.31. L'arbre phylogénétique des souches utilisées pour les tests de formation de biofilms a été réalisé à l'aide du logiciel en ligne iTol

L'abondance des COG pour les 33 souches criblées au génome séquencé a été extraite de la base de données JGI IMG/M (<https://img.jgi.doe.gov/>). Un premier tri manuel a été effectué pour supprimer les COG absents sur l'ensemble des souches. La fidélité d'un COG pour un groupe physiologique donné a été testé via l'analyse IndVal initialement développée par Dufrêne et Legendre [70] pour la recherche des espèces indicatrices (Tableau II-4).

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio (Version 1.0.136). L'ensemble de ces analyses est décrit et résumé dans le tableau II-4.

Tableau II-4 : Description détaillée des analyses statistiques réalisées

Description	Détails	Référence / Source / Bibliothèque de programme R
Comparaison des moyennes	t.test : test de Student wilcox.test : test de Wilcoxon Mann-Whitney	Stats [193]
Corrélation	cor.test : test de corrélation avec le coefficient de Spearman (non paramétrique)	-
Classification ascendante hiérarchique.	hclust : classification ascendante hiérarchique (méthode : ward.D) heatmap.2 : représentation graphique des données de criblage liée au dendrogramme établie via la classification ascendante hiérarchique	- vegan 2.4-3 [177] gplots v3.0.1 [255]
Étude de la fidélité des COG pour un groupe physiologique	Indval : recherche des espèces indicatrices	[44,70]

8. Matériel et méthodes spécifiques à la caractérisation de la souche MOLA 401

8.1. La souche MOLA 401 et ses proches parentes

La souche MOLA 401 provient de la collection MOLA (WDCM911, UPMC, France). Cette souche a été isolée d'un échantillon d'eau de mer prélevé dans le lagon sud-ouest de Nouvelle Calédonie. Six souches types, proches parentes de MOLA 401, ont été utilisées pour la caractérisation de cette dernière : *Palleronia abyssalis* 221-F1^T et *Palleronia marisminoris* B33^T provenant de la Belgian coordinated collections of micro-organisms (BCCM), *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T, *Maribius salinus* CL-SP27^T et *Maribius pelagius* B5-6^T provenant de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), et *Palleronia soli* CAU 1105^T provenant de la NITE Biological Resource Center (NBRC).

8.2. Tests physiologiques et biochimiques

La morphologie cellulaire, la taille et la mobilité de la souche ont été déterminées par microscopie optique et par microscopie électronique à transmission (MET). Pour les observations en MET, les cellules ont été fixées sur une grille de cuivre recouverte de Formvar et colorées négativement avec 2 % (m/v) d'acétate d'uranyl.

La gamme de température permettant la croissance de MOLA 401 a été testée à 4, 10, 15, 20, 25, 30, 37, 45 and 50°C dans du MB. La gamme de pH a été examinée à 25°C dans du MB avec ajout de MES (4,90 g.L⁻¹), PIPES (7,5 g.L⁻¹), MOPS (5,23 g.L⁻¹), HEPES (5,96 g.L⁻¹), tricine (4,48 g.L⁻¹), bicine (4,08 g.L⁻¹) sur une gamme de pH s'étendant de 5,5 à 9 avec une incrémentation de 0,5. La gamme de salinité a été déterminée à 25°C de 0 à 100 g.L⁻¹ de NaCl avec une incrémentation de 10 g.L⁻¹ dans du MB réalisé en suivant la composition donnée par Difco excepté pour le NaCl. Les gammes de croissance et les optima de croissance manquant pour les souches types ont été déterminés dans les mêmes conditions.

Cellobiose, D-arabinose, D-fructose, D-glucose, D-mannose, D-raffinose, D-sorbitol, D-sucrose, D-trehalose, L-rhamnose, L-xylose, melezitose, myo-inositol, xylitol, acetate, gluconate, malate, pyruvate, succinate, éthanol, glycérol, amidon (1 g.L^{-1}), glycogène (5 g.L^{-1}), L-proline, peptone, tryptone, ethyl palmitate, lecithin, tricapyrylin, cholestérol, triolein, octanol, 1-phenyldecane, pristane, heptaméthylnonane, méthyl laurate, hexadécane, octane et décane ont été testés comme seule source de carbone dans du MBmin avec une concentration de 20 mM (sauf contre-indication).

Les activités enzymatiques ont été évaluées via le système API-ZYM (bioMérieux). L'activité catalase a été détectée par la formation de bulles après suspension des cellules dans de l'eau oxygénée (H_2O_2 à 30 %). L'activité oxydase a été testée sur une colonie avec le kit Chemicals Oxidase Reagent (VWR chemicals, Belgique). Les activités gélatinase et caséinase ont été réalisées comme décrit dans le paragraphe 2.1.4.

Pour la détermination de la composition en acides gras, lipides polaires et quinone, toutes les souches ont été cultivées en MB. Les cellules ont été récupérées en phase exponentielle de croissance et lyophilisées. Les analyses ont été réalisées par le service d'identification de la DSMZ.

Les FAMES (fatty acid methyl esters) ont été préparés à partir 40 mg de cellules, comme décrit par Miller [161] et Kuykendall *et al.* [139] et identifiés à l'aide du système d'identification microbienne Sherlock (MIDI, ID microbienne, Newark, DE 19 711 USA). Les lipides polaires ont été extraits à l'aide de la méthode de Bligh et Dyer [32], séparés par CCM bidimensionnelle sur gel de silice et analysés selon les procédures décrites par Tindall *et al.* [235,236]. Les lipoquinones respiratoires (RLQ) ont été extraites selon la méthode de Tindall *et al.* [235,236], puis par séparation de phase dans l'hexane. Les RLQ ont été séparées par CCM sur gel de silice. Les bandes absorbant les UV correspondant aux différentes classes de quinones ont été retirées de la plaque et ensuite analysées par HPLC (détection à 269 nm).

8.3. Croissance et quantification des biofilms

8.3.1. Biofilms sur polystyrène

Les cultures de biofilms sur polystyrène de MOLA 401 et ses plus proches parentes ont été réalisées sur 8 jours d'incubation à 30°C. Pour plus de détail, se référer au protocole de culture et quantification de biofilm sur polystyrène du paragraphe 2.2.1.2.

8.3.2. Biofilms sur COH

La capacité à former un biofilm oléolytique de MOLA 401 et ses proches parentes a été testé sur paraffine, tristéarine, acide palmitique, monopalmitine, tripalmitine, hexadécyl palmitate, hexadécanol et monolaurine comme décrit dans les paragraphes 2.2.1.1.

8.4. Détection de la production d'AHLs

La production d'AHLs a été étudiée chez MOLA 401 et ses plus proches parentes via l'utilisation des biosenseurs F117 et MT102. Se référer au protocole d'étude de la production de signaux *quorum-sensing* du paragraphe 2.4.

8.5. Analyses génomiques

Les analyses génomiques ont été menées en collaboration avec Camille Clerissi du Criobe.

- Génomes

Des génomes représentatifs de *Rhodobacteraceae* ont été téléchargés de GenBank et Roseobase (<http://www.roseobase.org/>) tels qu'ils étaient disponibles en juin 2018. Afin d'enraciner les arbres phylogénétiques, nous avons également téléchargé deux groupes externes de GenBank (*Thiothrix nivea* DSM 5205 et *Methylococcus capsulatus* Texas ATCC 19069). Les génomes qui semblaient incomplets (valeur ≤ 3 Mo et valeur L90 supérieure à 115 (définie comme le plus petit nombre de contigs dont la somme en longueur représente 90 % du génome)) ont été supprimés. Les numéros d'accès des 84 génomes sont donnés dans l'annexe 3.

- Gènes orthologues

Les séquences d'ADNr 16S ont été obtenues à l'aide de l'annotation originale des génomes. L'annotation génomique de la souche MOLA 401 a été utilisée pour identifier les séquences des gènes de ménage (*gyrB*, *recA*, *rpoC* et *rpoD*) et des gènes QS (*luxI* et *luxR*). L'annotation de ces gènes a été vérifiée à l'aide de BLASTP [8] et de la base de données de protéines non redondantes du NCBI. Le protéome de la souche MOLA 401 a ensuite été utilisé comme pivot pour identifier l'ensemble des gènes orthologues des 83 génomes (meilleurs résultats bidirectionnels, BLASTP (identité ≥ 40 %, couverture ≥ 50 %, valeur $\leq 10^{-5}$). Le *core*-génomique a été défini comme l'intersection des listes d'orthologues entre le pivot et chaque génome.

- Mesures de similarités entre génomes

Pour chaque paire de génomes, nous avons calculé trois mesures de similarité : une basée sur les répertoires de gènes (POCP : *percentage of conserved proteins*) et deux autres sur la similarité de séquences entre deux génomes (AAI : *amino acid identity* ; ANI : *average nucleotide identity*). Le pourcentage de protéines conservées (POCP) entre deux génomes a été calculé comme décrit précédemment [191]: $[(C1+C2)/(T1+T2)] \times 100$ %, où C1/C2 et T1/T2 représentent le nombre de protéines orthologues et le nombre total de protéines dans les deux génomes comparés, respectivement. En particulier, les protéines orthologues entre une paire de génomes ont été déterminées comme décrit ci-dessus en utilisant BLASTP. Les identités moyennes d'acides aminés (AAI) par paires ont été évaluées à l'aide des valeurs d'identité BLASTP obtenues pour estimer le POCP. Les ANI ont été calculés à l'aide du module pyani Python3 (<https://github.com/widdowquinn/pyani>), avec les paramètres par défaut pour ANIb [201].

- Alignements et analyses phylogénétiques

Des alignements multiples de gènes orthologues ont été réalisés à l'aide de Muscle v3.8.31 [71]. Les régions d'alignements mal alignées et très variables ont été automatiquement supprimées à l'aide de GBlocks 0.91b [46]. Afin de calculer un arbre phylogénomique fiable, kdetrees [261] a été utilisé pour supprimer des gènes ayant des historiques d'évolution différents de ceux de la majorité. En particulier, les valeurs aberrantes ont été identifiées après une reconstruction phylogénétique de chaque gène central à l'aide d'IQ-TREE v1.3.8 [172] et du modèle LG + I + G4 + F. Nous avons ensuite analysé la manière dont l'alignement concaténé des *core-genes* et les alignements des gènes de ménage (16S rRNA, *gyrB*, *recA*, *rpoC* et *rpoD*) correspondaient à différents modèles d'évolution des protéines ou de l'ADN à l'aide d'IQ-TREE v1.3.8. Les meilleurs paramètres ont été identifiés sur la base du critère

d'information bayésien (BIC). Enfin, les arbres avec un maximum de vraisemblance ont été calculés avec IQ-TREE v1.3.8 à l'aide d'un modèle approprié et validés via un bootstrap de 1000 répliques [163].

8.6. Analyses statistiques

Des analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de la version 3.3.1 de R [193]. La corrélation entre les mesures de similarité entre génomes et arbres phylogénétiques a été évaluée à l'aide de distances patristiques (package R) et de test de Mantel (package R {vegan}) [155].

CHAPITRE III :

Biodiversité des biofilms oléolytiques

1. Introduction du chapitre

De nombreuses études ont été réalisées sur la dégradation des hydrocarbures en milieu marin et nous avons maintenant de solides connaissances sur les bactéries hydrocarbonoclastes. À l'inverse, la dégradation des lipides en milieu marin a suscité beaucoup moins d'intérêt bien que ces composés composent majoritairement le POC et qu'ils représentent une source importante d'énergie pour les organismes. Les études menées sur *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, souche décrite comme hydrocarbonoclaste, ont permis à notre équipe de caractériser la gamme de COH assimilable par la souche. Il s'est avéré que cette gamme s'étendait des alcanes à diverses classes de lipides (triglycérides, cires, acide gras) ainsi qu'à des alcools gras tel que l'hexadécanol. Ce constat a mené notre équipe à définir la notion d'oléolytique qui, contrairement à la définition d'hydrocarbonoclaste restreignant la gamme de substrat assimilable aux hydrocarbures, élargit cette gamme aux lipides.

Les études menées sur la dégradation du POC et en particulier de composés polymériques plus ou moins hydrophobes tels que la chitine, la cellulose ou les COH ont montré que cela impliquait la formation de biofilm facilitant l'accès et l'assimilation. Par exemple *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 assimile les COH via la formation d'un biofilm qui a donc été qualifié d'oléolytique.

Ainsi nos connaissances émergentes sur les biofilms oléolytiques nous ont amené à nous intéresser à la physiologie et à l'écologie de ces biofilms en milieu marin.

Dans un premier temps, il s'agissait de mieux appréhender la biodiversité capable de former des biofilms oléolytiques. Du fait de l'absence de marqueurs moléculaires fiables nous permettant de balayer le plus largement possible les mécanismes impliqués dans la formation de biofilms oléolytiques, il était nécessaire, dans un premier temps, de passer par des méthodes culturales.

En collaboration avec la collection MOLA du laboratoire Arago de Banyuls-sur-Mer mettant à notre disposition 2504 souches bactériennes marines, nous avons mis en place un criblage reposant sur la révélation au cristal violet de biofilm cultivés en milieu minimum avec comme support et seule source de carbone un substrat organique hydrophobe.

2. Biodiversité des souches capables de former un biofilm oléolytique

2.1. L'enrichissement sur COH permet l'isolement de souches appartenant à des genres typiques des bactéries hydrocarbonoclastes.

Trente-huit souches isolées précédemment par enrichissement sur COH ou lactate issues d'une zone fortement anthropisée (baie de Bizerte, [76]), d'une nappe de pétrole (mer du Nord) ou d'un mésocosme contenant de l'eau de mer supplémentée en pétrole brut (mer du Nord, [33]) ont été testées pour leur capacité à former un biofilm oléolytique sur paraffine et tristéarine. La paraffine est un ensemble d'alcane linéaires (essentiellement > C₂₀) qui représentait les hydrocarbures et la tristéarine (triglycéride) qui représentait les lipides.

La formation d'un biofilm a été évaluée visuellement par coloration au cristal violet après 2 et 4 jours d'incubation des cultures. La capacité des souches à former un biofilm oléolytique sur paraffine ou tristéarine est présentée dans le tableau III-1.

Tableau III-1 : Informations relatives aux souches isolées par enrichissement sur COH : taxonomie, échantillonnage, isolement, capacité à former un biofilm sur paraffine (P) ou tristéarine (T).

+ : observation d'un biofilm, - : pas de biofilm observé, W : biofilm très faiblement développé. ND : identification non définie. Les souches affiliées à une espèce hydrocarbonoclaste sont identifiées par un astérisque.

Identifiant	Identification	Phylum	Lieu d'échantillonnage	Substrat / milieu d'enrichissement	P	T
14tet1	<i>Alcanivorax venustensis</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - eau de mer non polluée diluée au 1/10 dans l'EMS	tétradécane / EMS	+	+
23par1	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	paraffine / EMS	+	+
23par2A	<i>Pseudomonas oleovorans</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	paraffine / EMS	+	+
23par2B	<i>Pseudomonas oleovorans</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	paraffine / EMS	+	+
23tet5B	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	tétradécane / EMS	+	W
23trio1A	<i>Vibrio hyugaensis</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	trioléine / EMS	+	+
23trio2A	ND		mer du Nord - interface eau/huile	trioléine / EMS	-	-
23trip1	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	tripalmitine / AHB	+	+
23w1	<i>Acinetobacter venetianus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	Hexadécyl palmitate / AHB	+	+
23w2B	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	Hexadécyl palmitate / EMS	+	+
Cubpar1A	<i>Marinobacter flavimaris</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	paraffine / EMS	+	+
Cubtet1B	<i>Marinobacter adhaerens</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	tétradécane / EMS	+	+
Cubtrip2B	<i>Marinobacter adhaerens</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	tripalmitine / EMS	+	+
Cubw2A	<i>Marinobacter adhaerens</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	Hexadécyl palmitate / EMS	+	+
Cubw5A	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	Hexadécyl palmitate / EMS	+	+

Cubw5B	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	mer du Nord - interface eau/huile	Hexadécyl palmitate / EMS	+	+
H13	ND		lagune de Bizerte - S1 (surface)	hexadecane / EMS	-	-
H15	<i>Bacillus halosaccharovorans</i>	Firmicutes	lagune de Bizerte - S1 (surface)	trioléine / EMS	+	+
H16	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S1 (20m)	paraffine / EMS	+	+
H18	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S2 (50cm)	hexadecane / EMS	+	+
H19	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S2 (5m)	tripalmitine / EMS	+	+
H21	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S1 (20m)	hexadecane / EMS	+	+
H22	<i>Bacillus safensis</i>	Firmicutes	lagune de Bizerte - S2 (50cm)	hexadecane / EMS	+	+
H28.1	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S4	paraffine / EMS	+	+
H28.2	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S4	paraffine / EMS	+	+
H29	<i>Vibrio neocaledonicus</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S4	trioléine / EMS	+	+
H30	ND		lagune de Bizerte - S4	trioléine / EMS	-	-
H31	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S4	hexadecane / EMS	+	+
H32	ND		lagune de Bizerte - S4	hexadecane / EMS	-	-
H33	ND		lagune de Bizerte - S4	tripalmitine / EMS	-	-
H34	<i>Halomonas meridiana</i>	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S4	lactate / EMS	+	+
H35	<i>Micrococcus aloeverae</i>	Actinobacteria	lagune de Bizerte - S4	lactate / EMS	+	+
H37	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S4	hexadecane / EMS	+	+
H38	<i>Micrococcus aloeverae</i>	Actinobacteria	lagune de Bizerte - S5	lactate / EMS	+	+
H39	ND		lagune de Bizerte - S6	tripalmitine / EMS	-	-
H40	ND		lagune de Bizerte - S7	tripalmitine / EMS	-	-
H43	ND		lagune de Bizerte - S8	trioléine / EMS	-	-
H9	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> *	Proteobacteria (γ -Proteobacteria)	lagune de Bizerte - S1 (surface)	paraffine / EMS	+	+

Quel que fut le type de substrat utilisé pour l'enrichissement, la formation d'un biofilm oléolytique a été observée sur paraffine et tristéarine pour 30 souches sur 38 après 4 jours de culture. Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S des souches positives nous a permis d'identifier principalement des souches appartenant au genre *Marinobacter* (16 souches) mais également aux genres *Vibrio* (4 souches), *Bacillus* (2 souches), *Pseudomonas* (2 souches), *Micrococcus* (2 souches), *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Halomonas* et *Pseudoalteromonas* (1 souche pour chaque genre) (tableau III-1). La capacité à former un biofilm oléolytique est partagée par des souches appartenant à des phyla très différents : 25 souches sont des représentantes des *Gammaproteobacteria*, 2 sont des *Firmicutes* et 2 autres des *Actinobacteria*. Ces souches sont à Gram négatif ou à Gram positif. Par ailleurs, que l'échantillonnage ait été réalisé en mer du Nord ou dans la baie de Bizerte, un grand nombre de souches identifiées comme *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ont été isolées. Ceci peut être lié à un biais expérimental, cette espèce étant peut-être favorisée dans nos conditions, ou il peut s'agir d'isolements multiples d'une même souche. Toutefois le genre *Marinobacter* et les genres *Acinetobacter*, *Alcanivorax* et *Pseudomonas* sont communément retrouvés dans les environnements pollués aux hydrocarbures et de nombreuses souches qui y sont affiliées sont hydrocarbonoclastes (tableau III-1) [33,65,87,102,110,137,169,270].

Ces résultats montrent que de nombreuses souches isolées pour leur capacité à croître en utilisant des hydrocarbures comme source de carbone, forment des biofilms à l'interface eau-alcane, mais aussi eau-triglycéride. Réciproquement, 11 souches initialement isolées pour leur capacité à utiliser un lipide (tripalmitine, trioléine ou hexadécyl-palmitate) étaient capables de former un biofilm sur alcanes. Il est remarquable que 16 souches appartiennent au genre *Marinobacter*. Même si un biais d'enrichissement lié aux conditions de culture ne peut pas être écarté, la forte représentation de ce genre suggère que les *Marinobacter* sp. seraient parmi les bactéries les mieux adaptées à la croissance et la formation de biofilm sur alcane et triglycéride.

Néanmoins, ces souches hydrocarbonoclastes sont-elles les seules en mesure de dégrader les COH en milieu marin ? Quelle est la diversité des souches oléolytiques ? La formation d'un biofilm oléolytique sur lipide n'est-elle observable que pour des souches hydrocarbonoclastes dites versatiles comme les *Marinobacter* ? Pour répondre à ces questions, nous avons testé la formation de biofilms oléolytiques chez 198 souches marines sélectionnées parmi diverses collections internationales (MOLA, DSMZ, NCIMB, NBRC, LMG).

2.2. Les souches capables de former un biofilm oléolytique couvrent une grande diversité taxonomique.

Le choix des souches à cribler a été orienté par des critères taxonomiques, géographiques et d'habitats. Les 198 souches ont été sélectionnées en fonction de la diversité observée dans les environnements marins [272] (figure III-1). Nous avons néanmoins fait le choix de surreprésenter le genre *Marinobacter* décrit comme un genre hydrocarbonoclaste. En effet, les connaissances sur *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 ainsi que les résultats obtenus ci-dessus suggéraient que ce genre avait un fort potentiel pour la formation de biofilm oléolytique. Ainsi, les *Marinobacter* représentent 10 % de notre sélection, suivi par les *Ruegeria* (*Proteobacteria*, 4,5 %), les *Alteromonas* (*Proteobacteria*, 3,5 %), les *Vibrio* (*Proteobacteria*, 3,5 %), les *Pseudoalteromonas* (*Proteobacteria*, 3 %), les *Pseudomonas* (*Proteobacteria*, 3 %), les *Streptomyces* (*Actinobacteria*, 2,5 %), les *Alcanivorax* (*Proteobacteria*, 2 %), les *Bacillus* (*Firmicutes*, 2 %), les *Kocuria* (*Actinobacteria*, 2 %), les *Micrococcus* (*Actinobacteria*, 2 %) et les *Phaeobacter* (*Proteobacteria*, 2 %). Les 93 autres genres sélectionnés représentent entre 0,5 et 1,5 % de l'effectif. Nous avons également sélectionné des souches issues de divers habitats et de différentes zones géographiques, bien que la majorité des souches issues de la collection MOLA (84 % des souches criblées) aient essentiellement été échantillonnées en mer Méditerranée (figure III-1, III-2, III-3).

Une première série de tests de formation de biofilm sur paraffine ou tristéarine en 2 ou 4 jours d'incubation a été réalisée en évaluant visuellement la coloration au cristal violet, sans réplica ni quantification. Le détail de ces résultats est donné dans l'annexe 4. Ces tests révèlent la présence d'un biofilm sur paraffine pour 14,6 % des souches testées et sur tristéarine pour 15,7 % souches, soit 18,7 % de souches positives sur au moins l'un des 2 substrats. Ces souches sont majoritairement affiliées à des *Proteobacteria* (81,1 % des souches positives, et 21,9 % des *Proteobacteria* criblées), et en moindre proportion à des *Actinobacteria* (13,5 % des souches positives et 16,1 % des *Actinobacteria* criblées), des *Firmicutes* (2,7 % des souches positives, 10 % des *Firmicutes* criblées) et des *Bacteroidetes* (2,7 % des souches positives, 5,3 % des *Bacteroidetes* criblées). Conscients que le choix de surreprésenter les *Marinobacter* dans notre sélection pouvait introduire un biais sur nos résultats, le pourcentage de souches positives sans surreprésentation des *Marinobacter* a été estimé par simulation numérique. Pour cela le pourcentage de positives a été calculé à partir de 100 souches tirées aléatoirement parmi une population où les *Marinobacter* n'étaient pas surreprésentés. Cette opération a été répétée 1000 fois et la moyenne des positives et l'intervalle de confiance à 95 % (IC95 %) ont été calculés. Le pourcentage de souches positives sur paraffine, sans biais dû aux *Marinobacter*, est de 8,7 % IC95 % [6,6 - 11,3] et de 8,8 % (IC95 % [5,7 - 11,3] sur tristéarine.

Une seconde série de tests a ensuite été effectuée sur une gamme élargie de COH sur un sous-échantillonnage des souches utilisées lors de la première série de tests. Ainsi, 97 souches ont été criblées sur paraffine, tristéarine, acide palmitique (acide gras) et hexadécyl palmitate (cire). Ces souches (non grisées de l'annexe 1) correspondent aux souches positives du premier criblage ainsi qu'à des souches négatives sur paraffine et, ou tristéarine. Nous avons veillé à respecter au mieux en proportions relatives les mêmes phyla, zones géographiques et les habitats entre le 1^{er} et le 2nd criblage (figures III-1, III-2, III-3). De plus, nous avons conservé dans ce sous-échantillon les souches dont la séquence du génome était disponible afin de permettre des analyses bio-informatiques ultérieures. La formation d'un biofilm oléolytique a été évaluée par quantification de la biomasse adhérente à chaque substrat par coloration au cristal violet suivi de l'élution du colorant et de sa quantification par spectrophotométrie. La formation d'un biofilm a été considérée comme effective lorsque la biomasse adhérente était deux fois supérieure celle de l'inoculum qui adhérait en l'absence de croissance. La valeur de la biomasse adhérente en l'absence de croissance a été obtenue en incubant l'inoculum dans les mêmes conditions que les tests de biofilm mais en l'absence de sources d'azote et de phosphore pour prévenir la croissance (voir Chap 2., paragraphe 2.1.1.4). Le critère de doublement de la biomasse adhérente permet d'assurer qu'il y a bien eu croissance et pas uniquement adhésion de l'inoculum.

Les valeurs de quantification de biofilm oléolytique indiquées dans l'ensemble du criblage correspondent à la médiane des mesures des triplicats après corrections. Le détail de ces résultats est présenté dans l'annexe 5.

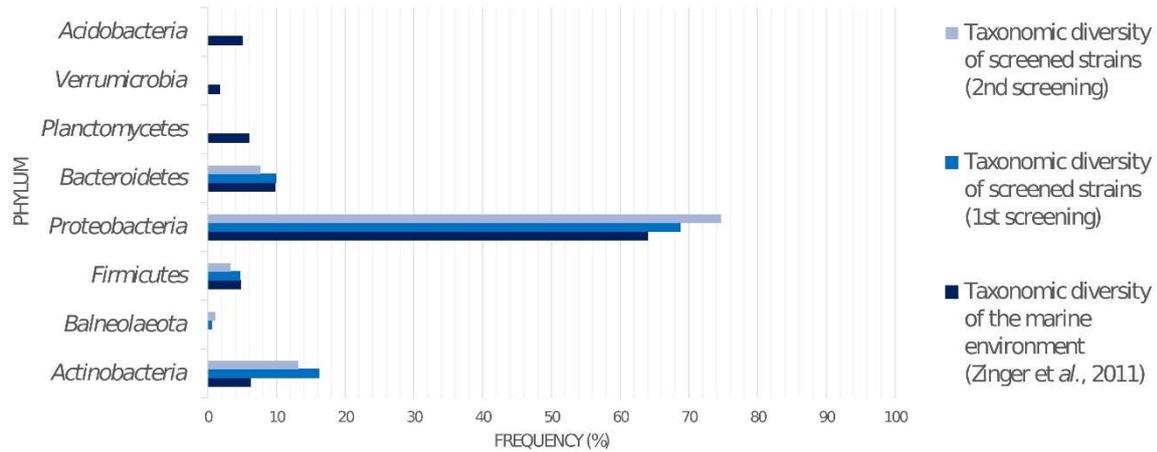


Figure III-1 : Comparaison de la diversité taxonomique (au rang du phylum) de la sélection réalisée parmi les collections bactériennes et celle décrite par Zinger *et al.* [272]

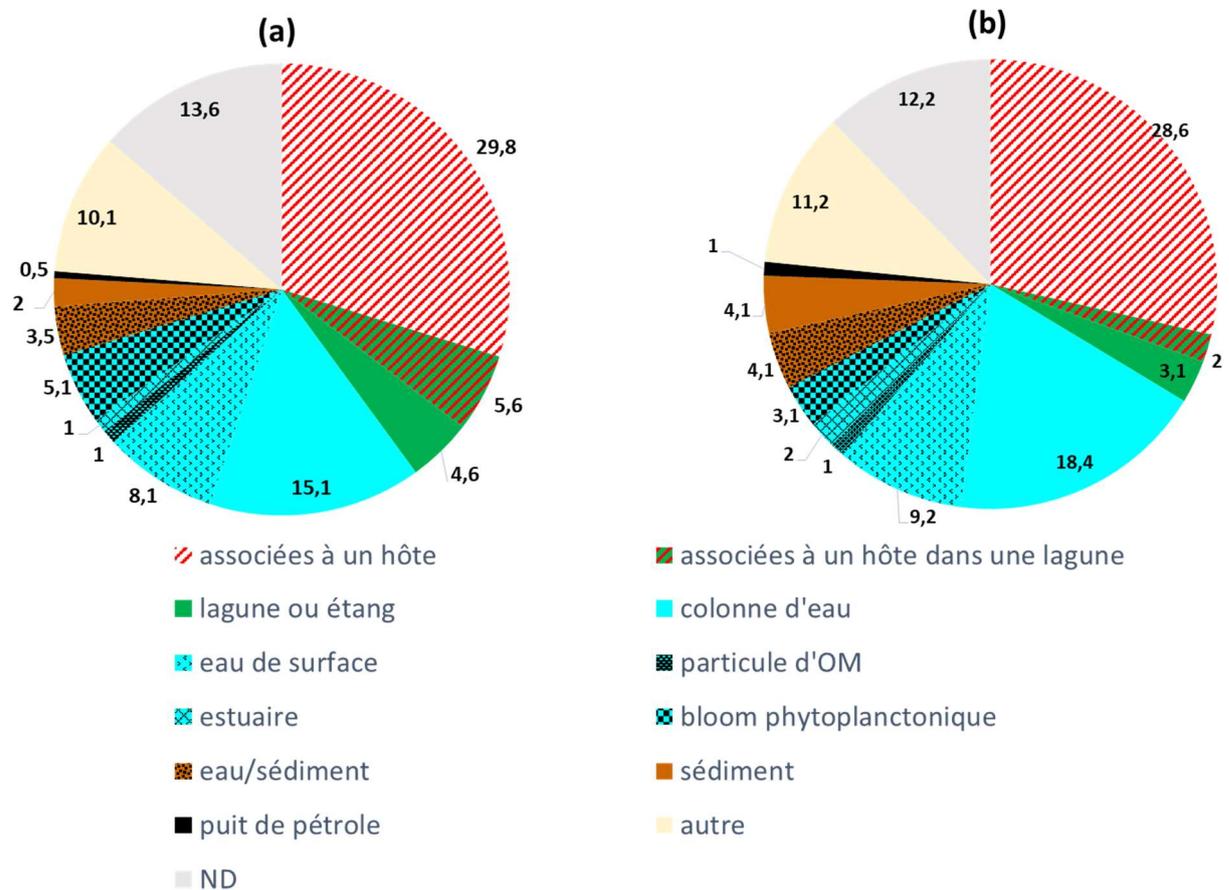


Figure III-2 : Habitats des souches sélectionnées pour le 1^{er} criblage (a) et pour le 2nd criblage (b).

OM : matière organique ; ND : absence d'information sur l'habitat. Éponges, salpes, méduses, posidonies, micro- ou macro-algues et oursins comptent parmi les hôtes auxquels les souches pouvaient être associées. Les habitats regroupés sous le terme « autre » sont des souches issues d'un sol salin (1 souche pour les 2 criblages), d'expérimentation en chemostat avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactéries (14 souches au 1^{er} criblage, 8 au 2nd), ou issues d'isolement par enrichissement sur divers composés tels que le diméthylsulfopropionate, le pristane, le biphényle, un HC (1 souche pour les 2 criblages dans chaque cas). Le détail des habitats d'échantillonnage est donné dans l'annexe 1.

2.3. Dégradation des COH par les souches formant des biofilms oléolytiques

Bien que les COH utilisés lors du criblage étaient la seule source de carbone disponible, nous avons mesuré la dégradation des COH lors de la formation de biofilm en quantifiant par chromatographie en couche mince la quantité de paraffine, de tristéarine, d'acide palmitique et d'hexadécyl palmitate après 13 jours d'incubation. Cette vérification a été réalisée uniquement sur une sélection restreinte de souches positives et négatives (figure III-5). La plupart des souches formant un biofilm sur un substrat étaient capables de dégrader ce substrat. Cependant certaines souches négatives pour la formation de biofilm oléolytique se sont avérées capables de dégrader certains substrats. C'est le cas de *Phaeobacter gallaeciensis* DSM 17395 et de *Marinomonas mediterranea* MMB1 pour lesquelles aucun biofilm n'a été quantifié sur hexadécyl palmitate et acide palmitique respectivement après 4 ou 13 jours d'incubation mais pour lesquelles une dégradation de ces substrats a été constatée. Ceci n'a rien d'étonnant, car ces souches peuvent avoir recours à d'autres mécanismes que la formation de biofilm (production de bio-émulsifiant ou bio-surfactant) pour dégrader ces COH. Il est également possible que les biofilms se soient détachés avant la coloration et la quantification.

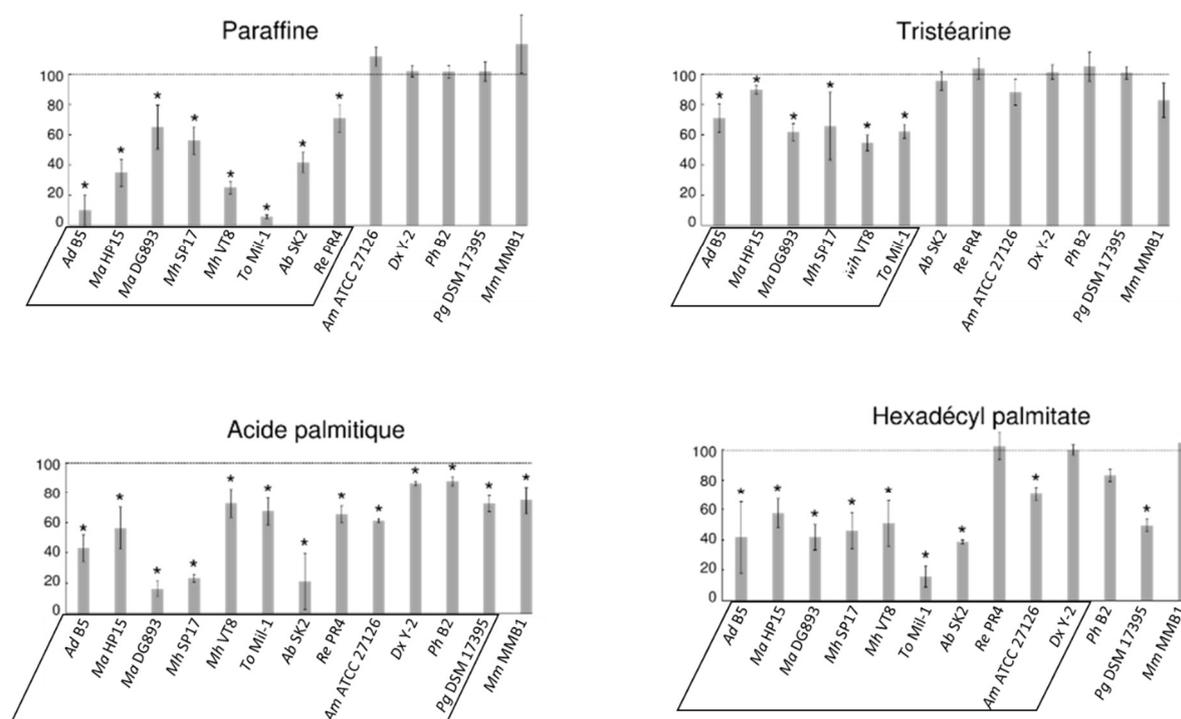


Figure III-5 : Dégradation de la paraffine, de la tristéarine, de l'acide palmitique et de l'hexadécyl palmitate par un sous-échantillonnage de souches étudiées dans ce criblage

Les pourcentages de COH restant comparés au contrôle non inoculé (100 %) sont présentés. Les astérisques indiquent que la quantité de COH restante est statistiquement différente du contrôle non inoculé (t test, p. value $\leq 0,05$, $n \geq 3$). Les souches encadrées correspondent aux souches formant un biofilm oléolytique sur le substrat étudié. Ad B5 : *Alcanivorax dieselolei* B5, Ma HP15 : *Marinobacter adhaerens* HP15, Ma DG893 : *Marinobacter algicola* DG893, Mh SP17 : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, Mh VT8 : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8, To Mil-1 : *Thalassolituus oleovorans* Mil-1, Ab SK2 : *Alcanivorax borkumensis* SK2, Re PR4 : *Rhodococcus erythropolis* PR4, Am ATCC 27126 : *Alteromonas macleodii* ATCC 27126, Dx Y-2 : *Donghicola xiamenensis* Y-2, Ph B2 : *Pelagibacterium halotolerans* B2, Pg DSM 17395 : *Phaeobacter gallaeciensis* DSM 17395, Mm MMB1 : *Marinomonas mediterranea* MMB1.

2.4. Établissement de groupes phénotypiques selon les capacités des souches à former un biofilm oléolytique

Parmi les souches criblées positives, certaines l'étaient sur l'ensemble des substrats et d'autres seulement sur 1 à 3 substrats. Des profils semblant se dégager, nous avons classé les valeurs de biofilms que nous avons obtenu via une méthode de classification ascendante hiérarchique. Ceci nous a permis de définir 8 groupes phénotypiques (figure III-6). Le groupe 1 correspond à 3 souches particulièrement performantes en termes de quantité de biomasse adhérente et de gamme de substrats assimilables. En effet, ces souches ont présenté les quantités les plus élevées de biofilm formé sur l'ensemble des 4 substrats testés. Il s'agit de deux souches de *Marinobacter* (HP15 et DG893) et de *Thalassolituus oleivorans* Mil-1 qui avait été classée parmi les HCB obligatoires (HCOB) [270]. Les souches du groupe 2 présentent des valeurs de biofilm un peu moins élevées mais sont capables de se développer sur paraffine et au moins 2 des lipides testés. La quantité de biomasse adhérente est moins importante pour les souches du groupe 3 qui sont néanmoins capables d'assimiler au moins 3 des substrats testés. Les souches des groupes 4 et 5 se sont développées plus spécifiquement sur hexadécyl palmitate et acide palmitique alors que les souches des groupes 6 et 7 n'ont montré de capacité à former un biofilm que sur l'acide palmitique. Le groupe 8 correspond aux souches négatives ou avec des valeurs extrêmement basses (laissant douter de leur capacité oléolytique) sur l'ensemble des substrats. Cependant, un autre découpage, plus global peut également être envisagé en regroupant les groupes 1 et 2 (les plus performantes sur paraffine et au moins 2 autres substrats), les groupes 3, 4 et 5 (aux performances réduites à 2 ou 3 substrats) ainsi que les groupes 6, 7 et 8 (regroupant les souches négatives ou ne formant de biofilm que sur acide palmitique).

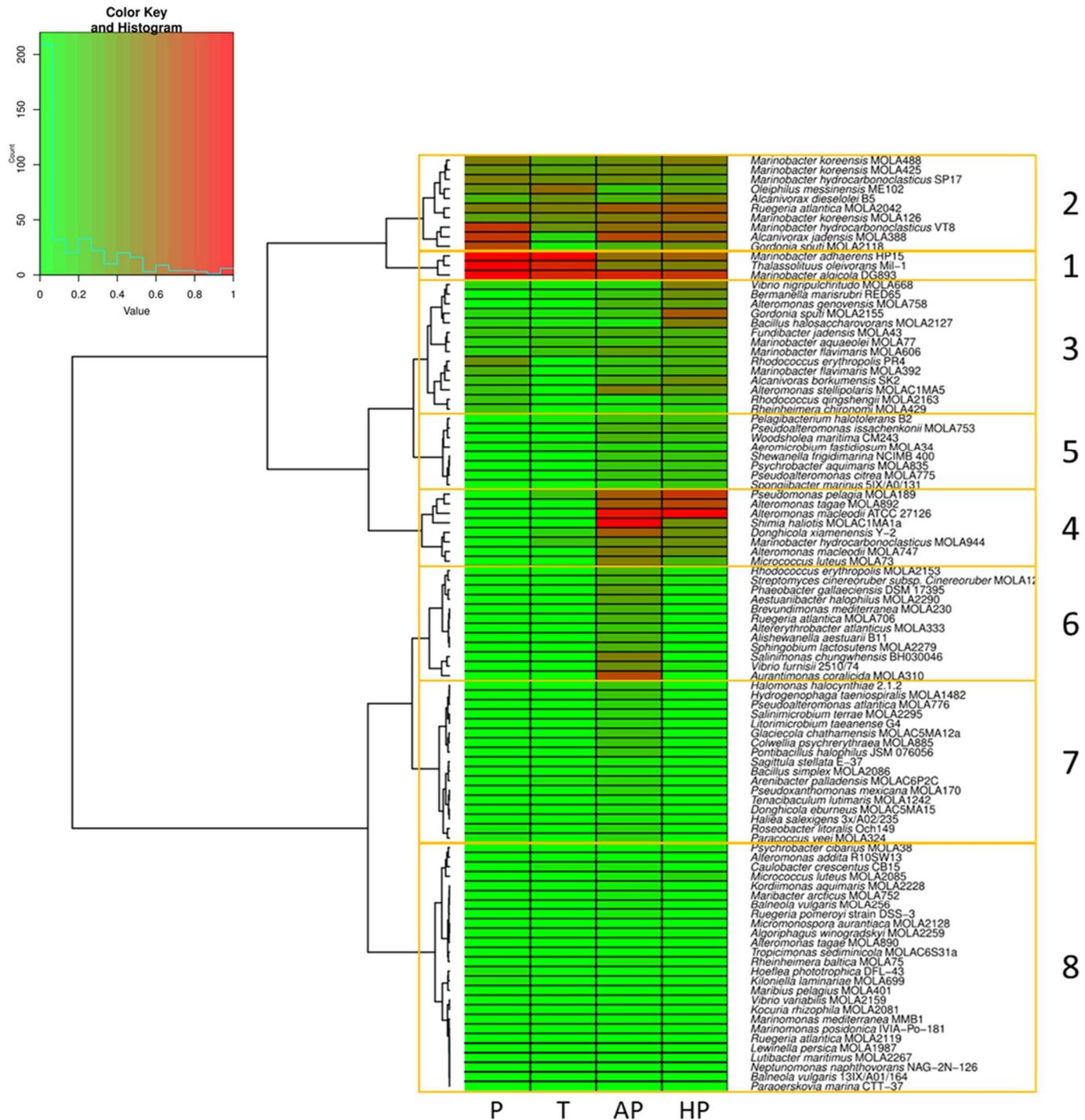


Figure III-6 : Classification des souches criblées pour leur capacité à former un biofilm oléolytique (heatmap réalisée à partir d'une classification hiérarchique ascendante ordonnée avec la méthode Ward

P : paraffine, T : tristéarine, AP : acide palmitique, HP : hexadécyl palmitate. La classification a été réalisée à partir des valeurs maximales observées à 4 ou 13 jours et normalisées sur les 4 COH testés (la normalisation des valeurs a été effectuée en prenant 1 comme référence pour la valeur maximale de chaque substrat afin de pouvoir comparer les valeurs entre substrats).d). Chaque ligne correspond à une souche testée. Plus la coloration est rouge et plus la valeur de quantification du biofilm est importante. La classification générée nous a permis de découper en 8 groupes la sélection de souches criblées selon leur capacité oléolytique.

Les souches de *Marinobacter*, pour lesquelles nous avons particulièrement orienté notre intérêt lors de la sélection des souches, se sont réparties sur les groupes 1 à 4, mais sont essentiellement présentes au sein des groupes 1 à 3, montrant majoritairement la capacité de formation de biofilm sur une gamme de substrats étendue des HC aux lipides (sauf la souche MOLA 944 négative sur paraffine dans nos conditions expérimentales). *Alcanivorax borkumensis* SK2 et *Oleiphilus messinensis* ME-102 présentées comme HCOB [270] appartiennent respectivement aux groupes 3 et 2 et se sont développées sur paraffine et au moins 2 des lipides testés.

3. Conclusion du chapitre

L'effort de criblage mené dans ce chapitre nous a permis d'étendre nos connaissances sur la biodiversité des souches capables de former un biofilm oléolytique. Les isollements par enrichissement sur COH (hydrocarbures ou lipides) issues d'échantillonnage menés au niveau d'une zone anthropisée ou d'une zone polluée aux hydrocarbures a essentiellement permis l'identification de souches appartenant à des genres communément retrouvés dans les environnements pollués aux hydrocarbures. La croissance de ces souches en présence d'hydrocarbure semble favorisée. Certaines études ont montré que le nombre de ces souches était relativement faible au regard de la diversité globale dans un site non pollué donné mais que ce nombre explosait après l'exposition à une pollution aux hydrocarbures [104,109]. La gamme de substrat sur laquelle ces souches identifiées à des espèces décrites comme hydrocarbonoclastes s'étend des HC aux lipides. En effet, la totalité des souches positives (30 souches sur 38) l'étaient sur paraffine et tristéarine. Le criblage mené par la suite sur 198 souches issues de collection nous a permis d'établir que la diversité des souches capables de former un biofilm oléolytique ne se limitait pas aux espèces décrites comme capable de dégrader les hydrocarbures. En effet, bien que les *Proteobacteria* et en particulier les *Gammaproteobacteria* soient particulièrement bien représentées, les souches oléolytiques sont réparties au sein des principaux phyla rencontrés en milieu marin (*Proteobacteria*, *Actinobacteria* et *Firmicutes*). Élargir la gamme de substrats lors de la seconde série de criblage a permis d'ajouter les *Bactéroïdetes* aux phyla représentés par les souches positives. La diversité des souches positives au sein des phyla a également été augmentée avec l'ajout de l'acide palmitique et de l'hexadécyl palmitate lors du criblage. De plus, le criblage réalisé sur paraffine et tristéarine nous a permis d'observer que 18,7 % des souches criblées étaient capables de former un biofilm oléolytique avec néanmoins un biais lié à une surreprésentation des *Marinobacter* dans notre sélection. La simulation numérique nous ayant permis de nous prémunir de ce biais nous a permis d'estimer à 8,7 % le nombre de souches capables de former un biofilm sur paraffine (contre 14,6 % avec la totalité des *Marinobacter* sélectionnées) et à 8,8 % sur tristéarine (contre 15,7 % avec la totalité des *Marinobacter*).

Enfin, ces souches ont pu être classées en huit groupes phénotypiques par une méthode de classification hiérarchique ascendante. Ces groupes se distinguent entre eux par la quantité de biomasse produite et la gamme de COH sur lesquels la formation d'un biofilm a été mesurée. Les souches les plus performantes et formant un biofilm sur au moins 3 des COH testés ont ainsi été réunies dans les groupes 1 et 2. Elles correspondent essentiellement à des *Gammaproteobacteria* affiliées aux *Alteromonadales* et aux *Oceanospirillales* et jusqu'alors décrites comme hydrocarbonoclastes. La classification des souches criblées nous a permis d'orienter la sélection d'un sous-échantillonnage pour lequel nous avons entrepris une caractérisation approfondie des biofilms oléolytiques.

CHAPITRE IV :
Étude fonctionnelle des biofilms
oléolytiques

1. Introduction du chapitre

Accéder à la biodiversité des souches capables de former un biofilm oléolytique constituait une étape préliminaire primordiale à la caractérisation de ces biofilms. En effet, nous savons désormais que ces souches ne se développent pas toutes sur la même gamme de COH et qu'elles ne produisent pas la même quantité de biofilm. La caractérisation des biofilms oléolytiques étant trop lourde à réaliser sur l'ensemble des souches sélectionnées pour le criblage, nous nous sommes appuyés sur l'établissement des groupes phénotypiques constitués par classification hiérarchique ascendante pour définir un sous-échantillonnage de souches au génome séquencé représentatif de chaque groupe. Ainsi, nous avons pu étudier la spécificité de substrat et de surface de colonisation de ces souches oléolytiques. Nous avons également étudié en microscopie leurs capacités d'adhésion aux COH et à des surfaces inertes telles que le polystyrène et le verre afin de déterminer si la capacité d'adhésion des souches est spécifique des surfaces nutritives hydrophobes. Par ailleurs, nous avons remarqué que l'ensemble des souches positives sur paraffine l'étaient aussi sur au moins un lipide. Nous avons donc approfondi la question.

2. Étude fonctionnelle des biofilms oléolytiques

2.1. Étude de la gamme de substrats solubles et polymériques assimilables par un sous-échantillonnage de souches issues du criblage.

Outre les lipides et les hydrocarbures, nous avons également étudié la capacité d'un sous-échantillonnage de 24 souches, représentant les 8 groupes physiologiques définis précédemment, à assimiler ou à dégrader une gamme de substrats hydrosolubles et de substrats de haut poids moléculaire tels que la caséine et divers polysaccharides (chitine, cellulose, amidon et glycogène). En effet, le POC étant principalement formé de protéines, polysaccharides, COH et de métabolites, nous souhaitons savoir si les souches oléolytiques pouvaient également assimiler ces composés comme seule source de carbone.

Aucune croissance n'a été mesurée sur chitine et cellulose quel que fut le groupe d'appartenance des souches. Une hydrolyse de la caséine a été observée avec les 24 souches, mais 7 d'entre elles ne dégradent pas la caséine comme seule source de carbone (*Marinobacter adhaerens* HP15, *Shewanella frigidimarina* NCIM400, *Pelagibacterium halotolerans* B2, *Litomicrobium taenense* G4, *Hoeflea phototrophica* DFL-43, *Sagittula stellata* E-37, *Haliae salexigens* 3x/A02/235). La capacité d'hydrolyse de la gélatine est moins répandue chez ces souches : pas d'activité gélatinase pour 13 des 24 souches, parmi lesquelles toutes les souches des groupes phénotypiques 1 et 2 ainsi que *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Donghicola xiamenensis* Y-2, *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395, *Vibrio furnisii* 2510/74 et *Sagittula stellata* E-37. Une croissance a été observée sur amidon pour 10 souches parmi lesquelles nous n'avons compté aucune souche appartenant aux groupes 1 et 2. Les mêmes souches se sont développées sur glycogène à la différence que *Thalassolituus oleivorans* Mil-1 (groupe 1) faisait également partie des positives. Toutes les souches ont été capables d'assimiler la peptone et les casamino-acides comme seule source de carbone. Concernant les substrats hydrosolubles, seules *Bermanella marisrubri* RED65 (groupe 3), *Litomicrobium taenense* G4 (groupe 7) et *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 (groupe 8) ont présenté une gamme de substrats hydrosolubles assimilables réduite par rapport à l'étendue de la gamme de composés testés (1 seul composé assimilable par *Bermanella marisrubri* RED65, et 3 par *Litomicrobium taenense* G4 et *Ruegeria pomeroyi* DSS-3 sur les 9 substrats hydrosolubles testés). L'ensemble des résultats avec le détail des substrats testés est présenté dans le tableau IV-1.

Ainsi, la gamme de substrats assimilables par les souches oléolytiques ne se limite pas aux COH ou à des composés polymériques, mais s'étend également à des substrats hydrosolubles. Ces substrats peuvent correspondre à des métabolites produits au cours de la dégradation de substrats de plus haut poids moléculaire tels que les polysaccharides et les protéines. Il est également intéressant de noter que les souches capables de former un biofilm oléolytique sont également capables d'hydrolyser des polysaccharides ou des protéines. En effet, ces composés sont plus ou moins associés avec les COH dans le POC. Il ne semble donc pas surprenant que ces souches soient également capables d'hydrolyser ce type de composés. De plus, la capacité à former un biofilm leur permet de concentrer dans la matrice d'EPS du biofilm des exo-produits nécessaires à la solubilisation et à l'hydrolyse de ces polymères, favorisant l'assimilation du POC.

Tableau IV- 1 : Gamme de substrats hydrosolubles et polymériques assimilables comme seule source de carbone par une sous-sélection de souches représentant les différents groupes phénotypiques (Gpe) définis par classification des résultats de criblage.

NAG : N-acétyl glucosamine. Les tests caséinase et gélatinase ont été réalisés en milieu gélosé supplémenté ou non en GALP (glucose, acétate, lactate, pyruvate, à 20 mM concentration finale). Les résultats négatifs marqués d'un astérisque signifient que la souche n'utilise pas le substrat comme seule source de carbone mais qu'une hydrolyse du substrat est néanmoins observée quand le milieu est supplémenté en GALP. + : croissance. - : absence de croissance. W : faible croissance.

Gpe	Souche	Glucose	Acetate	Lactate	Pyruvate	Propionate	Butyrate	Glycolate	Glycérol	NAG	Casamino-acids	Peptone
1	<i>M. adhaerens</i> HP15	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
1	<i>T. oleivorans</i> Mil-1	+	+	+	+	W	+	-	+	-	+	+
1	<i>M. algicola</i> DG893	+	+	+	+	-	W	-	+	-	+	W
2	<i>A. dieselolei</i> B5	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
2	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
2	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> VT8	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
3	<i>B. marisrubri</i> RED65	-	+	-	-	-	-	-	-	-	W	W
3	<i>R. erythropolis</i> PR4	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3	<i>A. borkumensis</i> SK2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
4	<i>A. macleodii</i> ATCC27126	+	+	+	+	W	W	-	+	W	+	+
4	<i>D. xiamenensis</i> Y-2	+	+	+	+	W	+	-	+	-	+	+
5	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB400	-	+	+	+	W	+	-	-	-	+	W
5	<i>P. halotolerans</i> B2	+	+	+	+	W	-	-	+	-	+	+
5	<i>W. maritima</i> CM243	+	+	+	+	-	W	-	+	-	+	+
6	<i>P. gallaeciensis</i> DSM17395	+	+	+	+	W	+	-	+	+	+	+
6	<i>V. furnisii</i> 2510/74	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
7	<i>L. taeanense</i> G4	-	-	-	+	W	W	-	-	-	+	+
7	<i>H. phototrophica</i> DFL-43	+	+	+	W	-	+	-	+	-	+	+
7	<i>P. halophilus</i> JSM076056	+	+	W	W	-	W	-	+	-	+	+
7	<i>S. stellata</i> E-37	+	+	+	+	W	+	-	+	W	+	+
7	<i>H. salexigens</i> 3x/A02/235	+	+	-	+	W	-	-	+	-	+	+
8	<i>R. pomeroyi</i> DSS-3	-	W	-	-	-	W	-	-	W	W	+
8	<i>M. mediterranea</i> MMB1	+	+	+	+	W	+	-	-	-	+	+
8	<i>M. posidonica</i> IVIA-Po-181	+	+	+	+	W	W	-	+	-	+	+

Tableau IV-1 (suite).

Gpe	Souche	Chitine	Cellulose	Amidon	Glycogène	Caséine	Gélatine
1	<i>M. adhaerens</i> HP15	-	-	-	-	- *	-
1	<i>T. oleivorans</i> Mil-1	-	-	-	+	+	-
1	<i>M. algicola</i> DG893	-	-	-	-	+	-
2	<i>A. dieselolei</i> B5	-	-	-	-	+	-
2	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SP17	-	-	-	-	+	-
2	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i> VT8	-	-	-	-	+	-
3	<i>B. marisrubri</i> RED65	-	-	-	-	+	+
3	<i>R. erythropolis</i> PR4	-	-	-	-	+	-
3	<i>A. borkumensis</i> SK2	-	-	+	+	+	+
4	<i>A. macleodii</i> ATCC27126	-	-	+	+	+	+
4	<i>D. xiamenensis</i> Y-2	-	-	+	+	+	-
5	<i>S. frigidimarina</i> NCIMB400	-	-	-	-	- *	+
5	<i>P. halotolerans</i> B2	-	-	+	+	- *	+
5	<i>W. maritima</i> CM243	-	-	+	+	+	+
6	<i>P. gallaeciensis</i> DSM17395	-	-	-	-	+	-
6	<i>V. furnisii</i> 2510/74	-	-	+	+	+	-
7	<i>L. taeanense</i> G4	-	-	-	-	- *	+
7	<i>H. phototrophica</i> DFL-43	-	-	-	-	- *	+
7	<i>P. halophilus</i> JSM076056	-	-	+	+	+	+
7	<i>S. stellata</i> E-37	-	-	+	+	- *	-
7	<i>H. salexigens</i> 3x/A02/235	-	-	W	W	- *	+
8	<i>R. pomeroyi</i> DSS-3	-	-	-	-	+	+
8	<i>M. mediterranea</i> MMB1	-	-	-	-	+	-
8	<i>M. posidonica</i> IVIA-Po-181	-	-	+	+	+	-

2.2. Corrélation entre la capacité à former un biofilm sur alcane et sur lipide

L'enrichissement sur COH effectué sur les échantillons provenant de mer du Nord et de la lagune de Bizerte a permis d'isoler spécifiquement des souches décrites jusqu'alors comme hydrocarbonoclastes. Nous avons pu observer que ces souches étaient effectivement capables de former un biofilm oléolytique sur paraffine mais également sur la tristéarine, un triglycéride. Ceci nous a amené à envisager une corrélation entre la capacité à dégrader les hydrocarbures et la capacité de dégrader les lipides. En effet, toutes les souches criblées positives sur paraffine le sont aussi au moins sur l'un des 3 lipides. Une forte corrélation positive (r_s (coefficient de corrélation de Spearman) = 0,66) s'établit entre la capacité des souches à former un biofilm sur paraffine et celle sur au moins l'un des trois lipides testés (figure IV-1). La corrélation positive entre la capacité d'assimilation des alcanes et l'assimilation des lipides suggère un lien physiologique entre l'assimilation de ces deux familles de COH.

2.3. Mesure de l'activité lipase dans les cultures de souches oléolytiques

L'activité lipase a été mesurée pour un sous-échantillonnage de souches oléolytiques affiliées aux groupes physiologiques 1 à 3 regroupant des souches capables de former un biofilm oléolytique sur paraffine (HC) et au moins un lipide. Pour des raisons techniques, cette expérimentation a été réalisée avec des COH liquides : l'hexadécane (HC) ou la trioléine (TG) comme seule source de carbone. Pour les mêmes raisons nous avons quantifié l'activité lipase totale (intra et extra-cellulaire). Pour ce faire, nous avons utilisé le para-nitrophényl palmitate (p-NPP) comme substrat spécifique des lipases. La dégradation du p-NPP par les lipases engendre la formation d'un produit de couleur jaune (le para-nitrophénol) dont l'absorbance à 405 nm est mesurable et permet de quantifier l'activité de l'enzyme. L'activité lipase a également été mesurée dans les cultures supplémentées en acétate comme seule source de carbone.

L'activité lipase est essentielle à l'assimilation des triglycérides. Nous nous attendions donc à observer une activité dans les cultures sur trioléine plus importante que sur acétate, mais de façon plus surprenante nous avons également constaté une surexpression de l'activité lipase dans les cultures supplémentées en hexadécane comme seule source de carbone par rapport aux cultures avec acétate (figure IV-2). *A. dieselolei* B5 fait exception : son activité lipase semble constitutive. Les résultats présentés sur la figure IV-2 ont été normalisés par les valeurs de croissance des cultures (mesure de la $DO_{600\text{ nm}}$) au moment de la mesure de l'activité lipase. La tendance à s'agréger de *M. adhaerens* HP15 rend difficile la mesure de la $DO_{600\text{ nm}}$, ce qui explique la forte différence que l'on constate entre cette souche et les autres après normalisation.

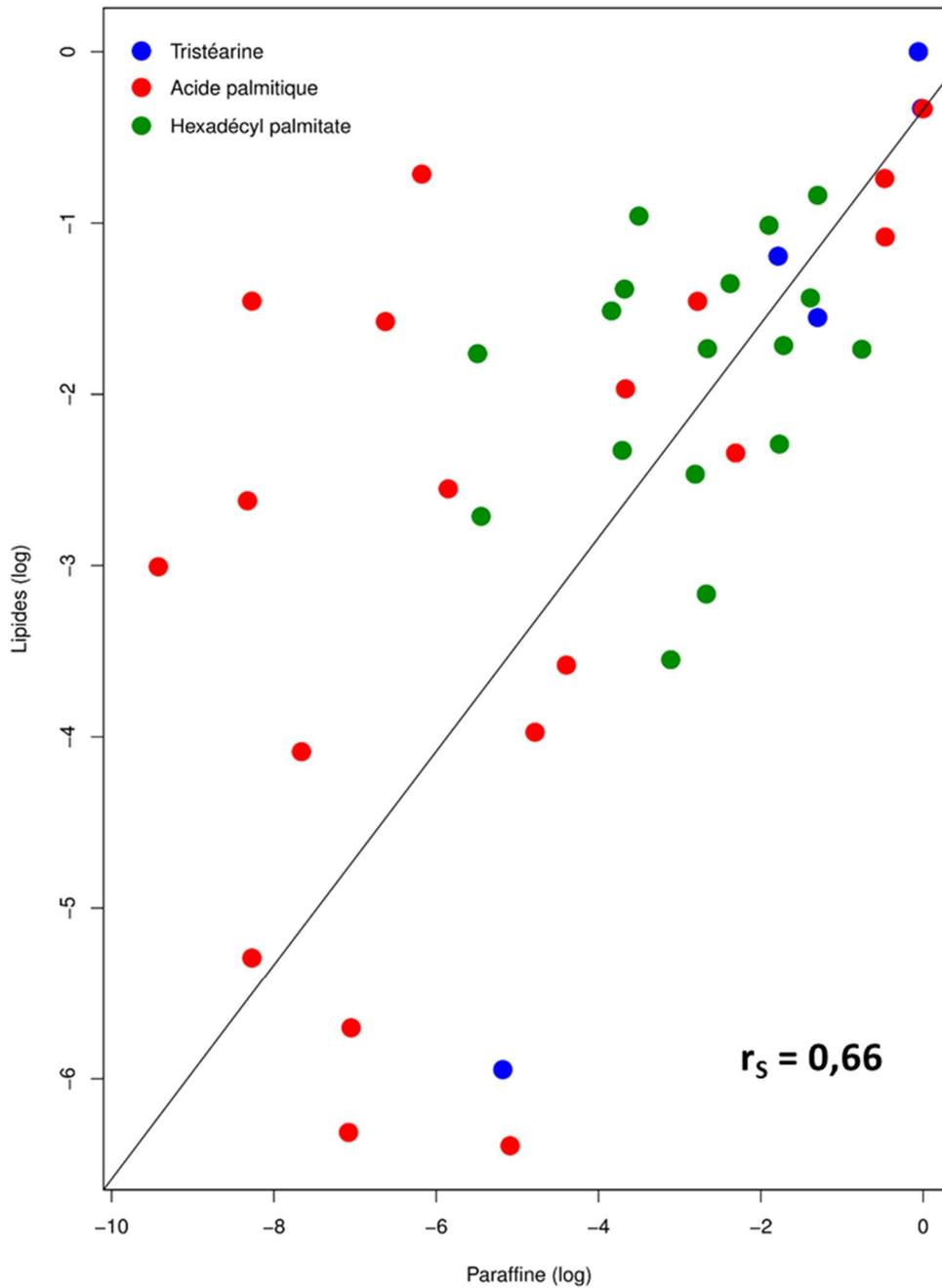


Figure IV-1 : Corrélation entre la capacité des souches à former un biofilm sur paraffine et sur l'un des 3 lipides (tristéarine, acide palitique et hexadécyl palmitate).

Chaque point représente une souche formant un biofilm sur paraffine. L'axe des abscisses correspond au log de la valeur maximale du biofilm sur paraffine (à 4 ou 13 jours) et l'axe des ordonnées au log de la valeur maximale des biofilms sur tristéarine, acide palitique ou hexadécyl palmitate (à 4 ou 13 jours). La pente de la droite correspond au coefficient de corrélation de Spearman : $r_s = 0,66$, p-value < 0.05.

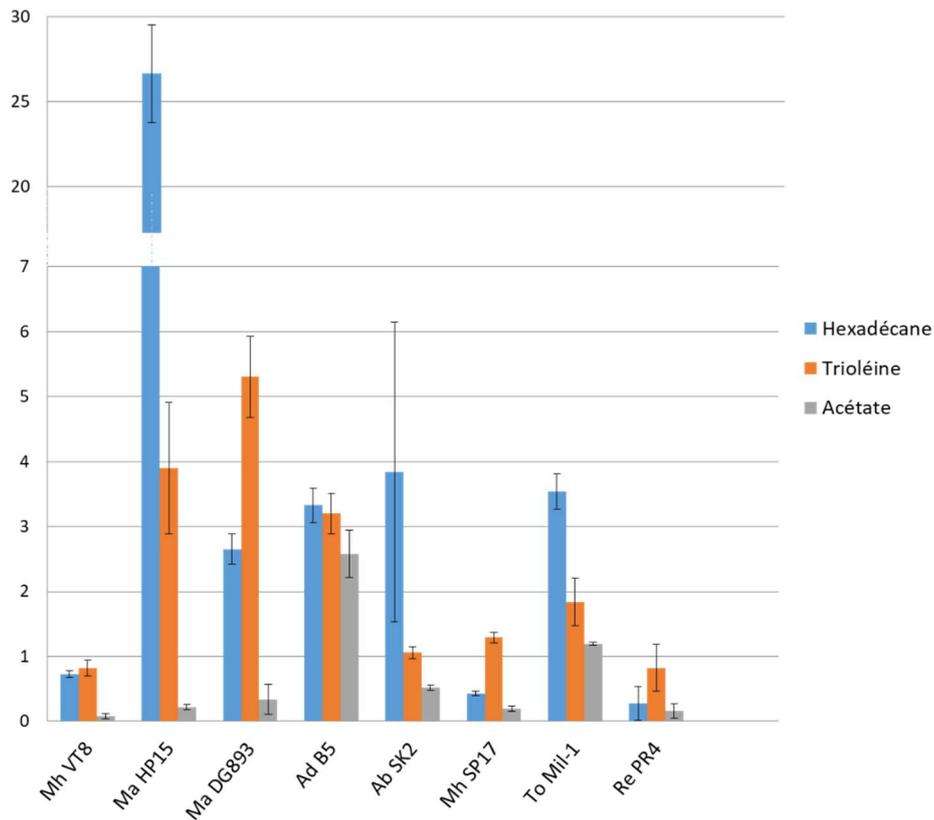


Figure IV-2 : Concentration d'activité lipase en micromole/seconde/L

Dans les cultures de *M. hydrocarbonoclasticus* VT8 (Mh VT8), *M. adhaerens* (Ma HP15), *M. algicola* DG893 (Ma DG893), *A. dieselolei* B5 (Ad B5), *A. borkumensis* SK2 (Ab SK2), *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 (Mh SP17), *T. oleivorans* Mil-1 (To Mil-1) et *R. erythropolis* PR4 (Re PR4) supplémentées en hecadécane, trioléine ou acétate.

2.4. Étude de la capacité à former un biofilm oléolytique sur une surface inerte hydrophobe ou hydrophile

La formation de biofilm, par les souches oléolytiques, sur des surfaces nutritives hydrophobes nous a amené à nous interroger sur leur capacité à former un biofilm en présence de sources de carbone solubles sur des surfaces non assimilables d'hydrophobicités variées. Le polystyrène a été choisi comme surface hydrophobe et le verre comme surface hydrophile. Le caractère hydrophobe du verre, du polystyrène et des COH a été évalué en mesurant les angles de contact avec le milieu de culture. Le polystyrène avait un angle de contact de 107° qui est comparable à celui des COH qui était de 106° pour la paraffine, 121° pour la tristéarine, 99° pour l'acide palmitique et 118° pour l'hexadecyl palmitate. Par contre, l'angle de contact du verre était de 8°, montrant son caractère hydrophile (figure IV-3).

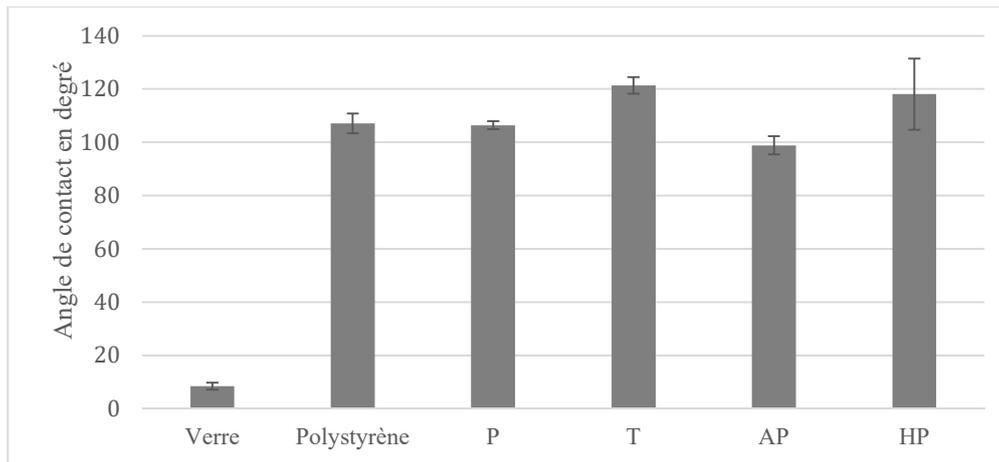


Figure IV-3 : Moyennes des angles de contact avec le milieu de culture mesurés sur une lame en verre, le polystyrène des plaques 24 puits utilisées pour les cultures de biofilm, la paraffine (P), la tristéarine (T), l'acide palmitique (AP) et l'hexadécyl palmitate (HP).

Dix mesures ont été effectuées pour chaque surface.

Nous avons quantifié les biofilms formés après 4 jours d'incubation en milieu riche sur polystyrène et sur verre, par un ensemble de souches représentant les différents profils de formation de biofilms oléolytiques définis précédemment. Le choix d'un milieu riche permettait d'utiliser le même milieu pour l'ensemble des souches qui possèdent des gammes de substrats différents. Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus sur COH (figure IV-4). De nombreuses souches sont effectivement capables de former un biofilm sur le polystyrène ou le verre. Cependant, les valeurs de biomasse sont en général beaucoup plus faibles que les valeurs mesurées sur les COH. Seules certaines souches affiliées aux *Alphaproteobacteria* (*Woodsholea maritima* CM243, *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395 et *Roseobacter litoralis* Och149) et une *Gammaproteobacteria* (*Alteromonas macleodii* ATCC27126) ont une capacité plus importante à former un biofilm sur polystyrène ou sur verre, cette capacité pouvant s'exprimer sur une seule de ces surfaces. *Woodsholea maritima* CM243 forme préférentiellement un biofilm sur le verre alors que *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395 est plus spécifique du polystyrène, contrairement à *Roseobacter litoralis* Och19, ou dans une moindre mesure *Caulobacter crescentus* CB15, qui forme un biofilm sur verre et sur polystyrène. Les souches oléolytiques ne montrent pas une meilleure capacité que les autres à former un biofilm sur une surface inerte hydrophobe telle que le polystyrène. Les souches du groupe 8, ne formant pas de biofilm oléolytique ne forment pas non plus (ou à des valeurs faibles) de biofilms sur polystyrène ou sur verre à l'exception de *C. crescentus* CB15, souche très bien étudiée pour ses capacités d'adhésion sur des surfaces biotiques ou abiotiques via la production d'adhésine particulières, les holdfast [77,222]. Les souches oléolytiques formant des biofilms sur alcanes et lipides forment peu ou pas de biofilm sur les supports inerts. Il semble donc que la capacité à former un biofilm oléolytique ne soit pas liée à une disposition particulière à former un biofilm quelle que soit la surface. Les souches oléolytiques présenteraient donc une spécificité de substrat et/ou de support pour la formation d'un biofilm.

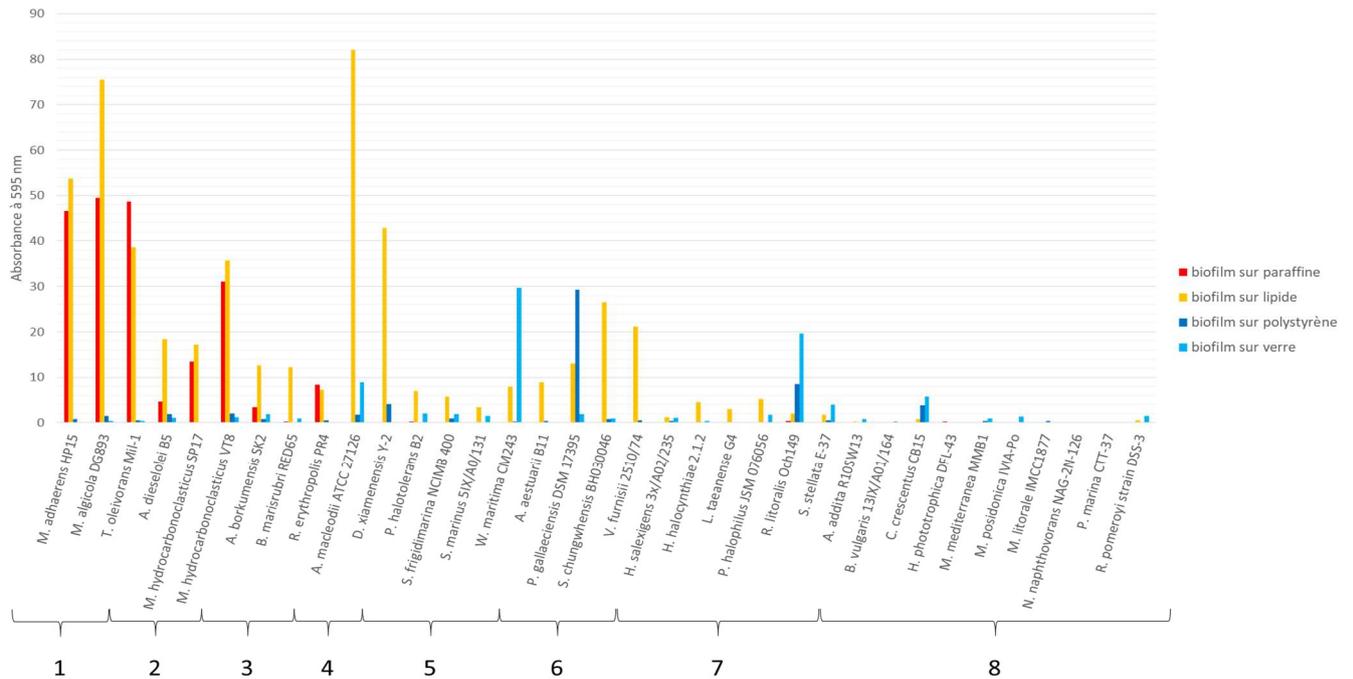


Figure IV-4 : Quantification des biofilms formés sur COH, polystyrène et verre des souches représentant les groupes phénotypiques 1 à 8 définis ci-dessus.

Les cultures sur COH ont été réalisées en milieu minimum, et les cultures sur polystyrène et verre ont été réalisées en milieu riche. Les biofilms ont été quantifiés par mesure de l'absorbance à 595 nm après coloration au cristal violet.

2.5. Mesure de l'adhésion des souches sur COH et surfaces inertes

Les expériences précédentes suggérant une spécificité vis-à-vis du type de surface (nutritive ou pas), nous avons ensuite étudié les capacités d'adhésion des souches sur ces mêmes surfaces. Ainsi, nous avons mesuré l'adhésion par microscopie (voir Chap. 2, paragraphe 2.2) d'un échantillonnage de 12 souches (*Marinobacter algicola* DG 893, *Marinobacter adhaerens* HP15, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, *Alcanivorax dieselolei* B5, *Alcanivorax borkumensis* SK2, *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Donghicola xiamenensis* Y-2, *Alteromonas macleodii* ATCC27126, *Woodsholea maritima* CM243, *Pelagibacterium halotolerans* B2, *Phaeobacter gallaeciensis* DSM 17395, *Marinomonas mediterranea* MMB1) sur des lames de paraffine, tristéarine, polystyrène et verre après 3 h de mise en contact (figure IV-5).

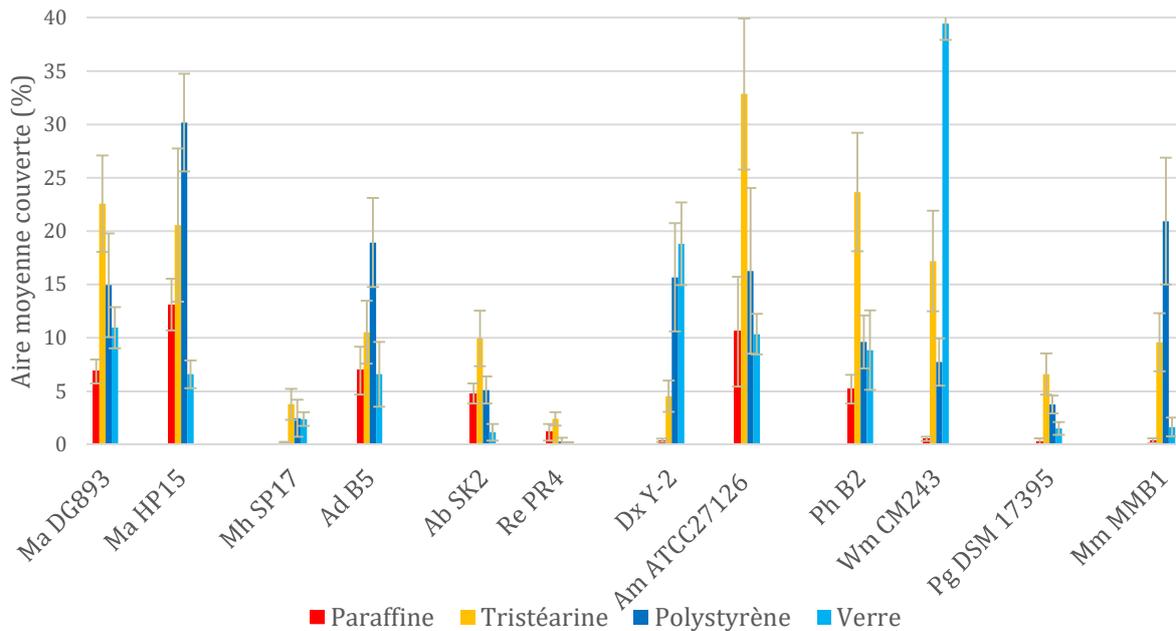


Figure IV-5 : Aire moyenne couverte par les cellules adhérentes sur lame de paraffine, tristéarine, polystyrène et verre évaluée par observation microscopique des cellules colorées à l'acridine orange après 3 h d'adhésion. Ma DG893 : *M. algicola* DG893, Ma HP15 : *M. adhaerens* HP15, Mh SP17, *M. hydrocarbonoclasticus* SP17, Ad B5 : *A. dieselolei* B5, Ab SK2 : *A. borkumensis* SK2, Re PR4 : *R. erythropolis* PR4, Dx Y-2 : *D. xiamenensis* Y-2, Am ATCC27126 : *A. macleodii* ATCC27126, Ph B2 : *P. halotolerans* B2, Wm CM243 : *W. maritima* CM243, Pg DSM 17395 : *P. gallaeciensis* DSM 17395, Mm MMB1 : *M. mediterranea* MMB1.

Les souches oléolytiques formant un biofilm sur lipides et alcanes ne présentent pas une meilleure adhésion sur une surface hydrophobe (polystyrène) que sur une surface hydrophile (verre). Cela suggère que la spécificité de formation de biofilm observée chez ces souches ne se fait pas selon l'hydrophobicité lors de l'adhésion. D'autre part, aucune des souches présente une sélectivité au niveau de l'adhésion vis-à-vis du caractère nutritif de la surface, à l'exception toutefois de *Rhodococcus erythropolis* RP4. Par exemple, *Marinobacter algicola* DG893, *Marinobacter adherens* HP15 et *Alcanivorax dieselolei* B5 adhèrent d'une façon similaire sur paraffine, tristéarine polystyrène et verre alors qu'elles sont capables d'assimiler la paraffine et la tristéarine et qu'elles montrent une préférence marquée pour la formation de biofilm sur ces deux substrats.

2.6. Étude du potentiel fonctionnel commun aux souches capables de former un biofilm oléolytique : analyse des COG

Les COG (*clusters of orthologous groups of proteins*) correspondent à des groupes de protéines orthologues définis par comparaison de séquences protéiques issues de génomes complets représentant des principales lignées phylogénétiques. Les COG constituent une base de données très utile à la comparaison, à la recherche et à l'annotation de fonctions codées dans les génomes. Afin de déterminer si les souches des groupes phénotypiques décrits ci-dessus se définissent par des fonctions spécifiques à chaque groupe, la liste des COG présents dans les 33 génomes dont nous disposons a été générée sous IMG (Integrated Microbial Genomes system - <https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>), soit près de 3000 COG. Afin d'associer un COG à un groupe, nous avons réalisé une analyse statistique habituellement utilisée en écologie pour la

recherche d'espèce indicatrices de groupement d'échantillon, la fonction IndVal [70]. Dans notre analyse, l'indice est maximal lorsqu'un COG est trouvé dans un seul groupe et lorsque ce COG apparaît dans tous les génomes appartenant à ce groupe. Un COG est estimé fidèle à un groupe si la p-value du test est $\leq 0,05$. Pour faciliter l'analyse, nous avons dans un premier temps regroupé les groupes 1 et 2, les groupes 3 à 5 et les groupes 6 à 8 pour former 3 super-groupes. Dans un second temps, la fidélité des COG se démarquant en fonction des 8 groupes a été analysée plus finement.

Nous avons identifié 121 COG communs aux groupes oléolytiques 1 à 5, dont 107 sont spécifiquement communs aux groupes 1 et 2. Parmi les 121, 29 COG sont impliqués dans la production d'adhésines telles que les pili ou le flagelle. D'autres sont impliqués dans la voie du diGMPc. Les groupes 1 à 5 ont en commun des COG impliqués dans l'hydrolyse des lipides (COG1075 : TG esterase / lipase, COG3540 : phosphodiesterase, COG5380 : chaperonne de la lipase LimK) ainsi que des COG affiliés à des NAD(P)H oxydoreductases (COG : 0543, 2904, 2070) et des rubredoxines (COG1773) potentiellement impliquées dans la voie de dégradation des alcanes.

Étonnamment, parmi les 107 COG plus spécifiques des groupes 1 et 2, 14 COG sont impliqués dans la production de système de sécrétion de type VI. Ces systèmes peuvent être impliqués dans des interactions entre bactéries ou entre une bactérie et son hôte eucaryote. Un dernier COG a retenu notre attention, une *Acyl CoA binding protein* assignée au COG4281 fidèle aux groupes physiologiques 1, 2 et 3 mais uniquement retrouvé dans les génomes des souches de *Marinobacter* et *Alcanivorax*. Ce COG est peu commun chez les procaryotes et pourrait expliquer le lien que nous avons établi entre la capacité de dégradation des alcanes et des lipides. En effet, l'un comme l'autre de ces métabolismes aboutit à la formation d'un acyl-CoA pris en charge par la β -oxydation. Le détail complet des COG se démarquant pour leur fidélité à certains groupes physiologiques avec une p-value $\leq 0,05$ est disponible dans l'annexe 6. Les principaux résultats sont présentés dans le tableau IV-3 ci-après.

Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, les systèmes de sécrétion de type VI peuvent être des éléments impliqués dans la compétition entre souches. L'étude des comportements sociaux pourrait nous apporter des pistes quant à l'utilité de cette fonction parmi les souches capables de former un biofilm oléolytique. De plus, le biofilm représente un environnement favorisant les interactions sociales entre souches et peu d'études se sont intéressées à ce type d'interaction dans le cadre de la dégradation des COH en milieu marin.

Tableau IV-2 : Abondance des COG affiliés aux fonctions (a) (b) (c) NADPH oxydo-réductase (COG : 2070, 0543, 2904), Rubredoxine (COG1773), Acyl-CoA binding protein (COG4281), du métabolisme des lipides (COG : 1398, 5380, 3540, 1075) et (c) de production du système de sécrétion de type VI (COG : 3501, 4104, 3521, 3455, 3518, 3519, 3520, 3522, 3523, 3516, 3157, 3517, 3456). Pour plus de lisibilité, pour chaque tableau (a, b, c, d), les souches n'ayant aucun des COG n'apparaissent pas. Les souches sont affiliées à leur groupe phénotypique (de 1 à 8). Groupe 1 : Ma HP15 : *Marinobacter adhaerens* HP15, Ma DG893 : *Marinobacter algicola* DG893, To Mil-1 : *Thalassolituus oleivorans* Mil-1 ; Groupe 2 : Ad B5 : *Alcanivorax dieselolei* B5, Mh VT8 : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8, Mh SP17 : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, Om ME-102 : *Oleiphilus messinensis* ME-102 ; Groupe 3 : Ab SK2 : *Alcanivorax borkumensis* SK2, Bm RED65 : *Bermanella marisrubri* RED65, Re PR4 : *Rhodococcus erythropolis* PR4 ; Groupe 4 : Am ATCC27126 : *Alteromonas macleodii* ATCC27126, Dx Y-2 : *Donghicola xiamenensis* Y-2 ; Groupe 5 : Ph B2 : *Pelagibacterium halotolerans* B2, Sf NCIMB400 : *Shewanella frigidimarina* NCIMB400, Sm 5IX/A0/131 : *Spongibacter marinus* 5IX/A0/131, *Woodsholea maritima* CM243 ; Groupe 6 : Sc BH030046 : *Salinimonas chungwhensis* BH030046, Pg DSM17395 : *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395, Hh 2.1.2 : *Halomonas halocynthiae* 2.1.2, Aa B11 : *Alishewanella aestuarii* B11, Groupe 7 : Hs 3x/A02/235 : *Haliea salexigens* 3x/A02/235, Lt G4 : *Litorimicrobium taeanense* G4, Ph JSM 076056 : *Pontibacillus halophilus* JSM 076056, RI Och149 : *Roseobacter litoralis* Och149, Ss E-37 : *Sagittula stellata* E-37 ; Groupe 8 : Rp DSS-3 : *Ruegeria pomeroyi* DSS-3, Mm MMB1 : *Marinomonas mediterranea* MMB1, Mp IVIA-Po-181 : *Marinomonas posidonica* IVIA-Po-181, Hp DFL-43 : *Hoeflea phototrophica* DFL-43, Aa R10SW13 : *Alteromonas addita* R10SW13, Cc CB15 : *Caulobacter crescentus* CB15.

a	Fonction	1			2			
		Ma HP15	Ma DG893	To Mil-1	Ad B5	Mh VT8	Mh SP17	Om ME-102
COG2070	NAD(P)H-dependent flavin oxidoreductase YrpB, nitropropane dioxygenase family	1	3	2	6	3	2	1
COG0543	NAD(P)H-flavin reductase	2	3	2	1	1	2	1
COG2904	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase QueF, N-terminal domain	1	1	1	1	1	1	1
COG1773	Rubredoxin	1	1	2	1	3	2	0
COG4281	Acyl-CoA-binding protein	1	1	0	1	1	1	0
COG1398	Fatty-acid desaturase	1	2	2	2	2	2	0
COG5380	Lipase chaperone LimK	2	2	1	1	0	1	0
COG3540	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D	2	1	2	3	1	1	0
COG1075	Triacylglycerol esterase/lipase EstA, alpha/beta hydrolase fold	2	2	1	2	0	1	0

b	Fonction	3			4		5			
		Ab SK2	Bm RED65	Re PR4	Am ATCC27126	Dx Y-2	Ph B2	Sf NCIMB400	Sm 5IX/A0/131	Wm CM243
COG2070	NAD(P)H-dependent flavin oxidoreductase YrpB, nitropropane dioxygenase family	2	2	7	0	2	0	1	4	0
COG0543	NAD(P)H-flavin reductase	1	2	4	1	0	1	1	1	0
COG2904	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase QueF, N-terminal domain	1	1	0	1	0	0	1	1	0
COG1773	Rubredoxin	2	1	4	0	0	0	0	1	0
COG4281	Acyl-CoA-binding protein	1	0	0	0	0	0	0	0	0
COG1398	Fatty-acid desaturase	1	2	0	1	0	0	1	2	1
COG5380	Lipase chaperone LimK	1	2	0	1	0	0	1	0	0
COG3540	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D	0	1	1	1	1	1	1	3	3
COG1075	Triacylglycerol esterase/lipase EstA, alpha/beta hydrolase fold	1	2	0	1	0	0	1	1	0

C	Fonction	6				7					8					
		Sc BH030046	Pg DSM17395	Hh 2.1.2	Aa B11	Hs 3x/A02/235	Lt G4	Ph 076056	JSM Och149	RI	Ss E-37	Rp DSS-3	Mm MMB1	Mp IVIA-Po 181	Hp DFL-43	Aa R13
COG2070	NAD(P)H-dependent flavin oxidoreductase YrpB, nitropropane dioxygenase family	0	2	1	0	6	1	1	0	0	3	0	0	2	0	4
COG0543	NAD(P)H-flavin reductase	1	0	2	1	0	0	1	0	0	0	3	3	0	1	0
COG2904	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase QueF, N-terminal domain	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
COG1773	Rubredoxin	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
COG4281	Acyl-CoA-binding protein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COG1398	Fatty-acid desaturase	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
COG5380	Lipase chaperone LimK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COG3540	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	2
COG1075	Triacylglycerol esterase/lipase EstA, alpha/beta hydrolase fold	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0

d	Fonction	1			2				3	5	7	8	
		Ma HP15	Ma DG893	To Mil-1	Ad B5	Mh VT8	Mh SP17	Om ME-102	Bm RED65	Sf NCIMB 400	Ss E-37	Mm MMB1	Mp IVIA-Po 181
COG3501	Uncharacterized conserved protein, implicated in type VI secretion and phage assembly	2	3	1	5	5	3	1	1	1	1	3	4
COG4104	Zn-binding Pro-Ala-Ala-Arg (PAAR) domain, involved in TypeVI secretion	1	1	1	1	2	1	0	0	1	0	1	1
COG3521	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	2	1
COG3455	Type VI protein secretion system component VasF	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	2	1
COG3518	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	2	2
COG3519	Type VI protein secretion system component VasA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
COG3520	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
COG3522	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
COG3523	Type VI protein secretion system component VasK	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
COG3516	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2
COG3157	Type VI protein secretion system component Hcp (secreted cytotoxin)	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	3
COG3517	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	1	3	1	1	1	2	2	2	1	3	3
COG3456	Predicted component of the type VI protein secretion system, contains a FHA domain	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1

3. Conclusion du chapitre

Les expérimentations menées dans ce chapitre nous ont permis de mieux caractériser les souches et les biofilms oléolytiques. Dans un premier temps, l'analyse de la gamme de substrats solubles et polymériques assimilables par les souches oléolytiques n'a pas montré que les souches oléolytiques ne pouvaient utiliser spécifiquement que des COH. En effet, les souches oléolytiques sont capables d'assimiler comme seule source de carbone des substrats solubles tels que des intermédiaires métaboliques, du glycérol, des casamino-acides ou la peptone ainsi que des substrats polymériques comme la caséine.

En outre, nous avons remarqué que les souches capables de former un biofilm sur paraffine formaient également un biofilm sur au moins un lipide. Nous avons testé statistiquement cette observation et nous avons effectivement montré que la formation d'un biofilm sur paraffine était corrélée positivement avec la formation d'un biofilm sur au moins un lipide avec un coefficient de Spearman de 0,66. Ceci nous a amené à mesurer et comparer l'activité lipase dans des cultures avec trioléine (un TG), hexadécane (un alcane) ou acétate comme seule source de carbone. Ainsi, comme attendu, une surexpression de l'activité lipase a été mesurée dans les cultures avec trioléine comparé aux cultures avec acétate. Mais de façon plus surprenante, nous avons également constaté une surexpression de l'activité lipase quand les souches sont cultivées avec de l'hexadécane. Ces résultats suggèrent un lien physiologique entre l'assimilation des alcanes et celle des lipides. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le métabolisme des alcanes comme celui des lipides aboutissent à la formation d'un acyl-CoA. Cette hypothèse a été renforcée par l'étude de la fidélité des COG à un groupe phénotypique issu de la classification. En effet l'Acyl CoA binding protein semble être une fonction fidèle aux *Marinobacter*, *Alcanivorax* et *Oleiphilus*. Cette protéine est impliquée dans le transfert des acyl CoA à la β -oxydation. Sans surprise, l'analyse des COG a également permis de mettre en évidence des COG impliqués dans la formation de biofilm, ainsi que le métabolisme des lipides ou des alcanes. De façon plus remarquable, une série de COG impliqués dans la production de système de sécrétion de type VI est particulièrement associée aux groupes phénotypiques 1 et 2.

Enfin, la comparaison des capacités d'adhésion et de formation de biofilm d'un sous-échantillonnage de souches sur des surfaces au degré d'hydrophobicité variable (nutritives ou pas) ne nous a pas permis d'établir de lien entre les capacités d'adhésion des souches à un COH et leur capacité à former un biofilm oléolytique. Il ne semble pas non plus y avoir de lien entre la formation de biofilm sur surface inerte (polystyrène ou verre) et la formation de biofilm sur une surface nutritive hydrophobe. Ceci pourrait indiquer que la spécificité des souches oléolytiques n'est pas la formation d'un biofilm mais seraient plutôt une spécificité à dégrader les COH. Le biofilm n'étant qu'un mécanisme facilitant l'accès et l'assimilation de ces substrats particuliers du fait de leur hydrophobicité. La formation de biofilm apporte l'avantage à ses souches d'un habitat à part entière dans un environnement marin dynamique et dilué peu favorable à leur développement.

CHAPITRE V :
Comportements sociaux au sein des
biofilms oléolytiques

1. Introduction du chapitre

Les observations faites lors des tests de biofilm nous ont amenés à envisager que les biofilms oléolytiques pourraient constituer des environnements propices à l'établissement de comportements sociaux. En effet, au sein d'un biofilm, la densité cellulaire est importante et la diffusion des molécules est limitée par la matrice extracellulaire enveloppant les cellules (cf. chapitre I). De plus, l'accès à une surface nutritive dans un environnement aussi dilué que le milieu marin représente un défi considérable pour les bactéries et pourrait donner lieu à des compétitions entre espèces capables d'utiliser le même type de surface nutritive. Enfin, l'assimilation des COH nécessite la production d'enzymes ou de facteurs extracellulaires qui, de fait, deviennent des biens communs disponibles pour toutes les bactéries du voisinage immédiat et peuvent conduire à des comportements coopératifs. Cependant, les coopérations basées sur l'utilisation de bien communs sont exposées à des comportements de triche où des bactéries utilisent les biens communs produits par des voisines sans en synthétiser elles-mêmes. Ainsi, des comportements sociaux tels que la compétition, la triche (*cheating*) et la coopération peuvent potentiellement s'observer dans les biofilms oléolytiques.

2. Étude de comportements sociaux

2.1. Recherche de systèmes *quorum-sensing* associé aux biofilm oléolytiques

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'éventuelle implication de la communication *quorum-sensing* dans la formation des biofilms oléolytiques. En effet, comme indiqué dans l'introduction bibliographique, *quorum-sensing* et biofilm ont souvent été observés en lien, le *quorum-sensing* pouvant réguler la formation de biofilm et la production d'exoenzymes. De plus, le biofilm permet la concentration des signaux de communication.

Les gènes de synthèse d'auto-inducteurs de systèmes de QS ont été recherchés dans les génomes des souches utilisées dans cette étude. Seulement 12 souches parmi les 33 souches au génome séquencé dont nous disposons, possèdent des gènes affiliés au COG3916 (N-acyl-L-homoserine lactone synthetase) et 6 au COG1854 (protéine de synthèse des signaux *quorum-sensing* de type 2 (AI-2), LuxS), *Alishewanella aestuarii* B11 possède des gènes des deux COG. Aucune de ces souches n'appartient aux groupes physiologiques 1 à 3 définis précédemment.

Afin d'être plus exhaustif dans notre recherche d'une éventuelle implication du QS dans la formation des biofilms oléolytiques, nous avons testé la production de signaux QS de type AI-1 et AI-2 via l'utilisation de biosenseurs sur les souches oléolytiques issues de la collection MOLA dont nous ne disposons pas du génome. Ce criblage de la production de signaux QS a été réalisé sur des surnageants de biofilms sur paraffine, tristéarine, acide palmitique et hexadécyl palmitate. Ainsi, 37 souches capables de former un biofilm oléolytique sur au moins l'un des 4 substrats lors du criblage ont été testées. Aucune production de signaux de type AI-1 n'a été constatée avec les biosenseurs F117 et MT102. La détection de signaux de type AI-2 par le biosenseur MM32 s'est révélée positive sur 4 souches : *Gordonia sputi* MOLA 2155 et *Bacillus halosaccharovorans* MOLA 2127 (groupe 3), *Psychrobacter aquimaris* MOLA835 (groupe 5) et *Rheinheimera baltica* MOLA 75 (groupe 8). Néanmoins, quel que fut le substrat, ces souches ont présenté la même intensité de signal que le témoin sans COH. Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe de Raphaël Lami à Banyuls.

Bien que quelques souches présentent un système QS, aucun élément ne nous a permis de relier le *quorum-sensing* à la capacité à former des biofilms oléolytiques. La communication bactérienne n'est pas le seul type de comportement social qui pourrait influencer sur la dynamique des biofilms oléolytiques. L'abondance des COG impliqués le système de sécrétion de type VI pourrait indiquer un potentiel compétitif des souches concernées. Nous avons donc entrepris de réaliser un premier état des lieux des éventuelles compétitions et synergies pouvant s'établir au sein des biofilms oléolytiques.

2.2. Étude des comportements compétitifs ou synergiques pouvant s'établir entre 2 souches au sein d'un biofilm oléolytique.

Cette étude a été menée sur 10 souches positives lors du criblage appartenant aux groupes phénotypiques 1, 2, 3, 4 et 6. Dans un premier temps, les pentes des courbes de croissance planctonique et les DO_{600 nm} en phase stationnaire ont été mesurées dans l'EMS et le MBmin supplémentés en GALP afin d'établir des couples les plus homogènes possible en terme de temps de croissance et de biomasse produite. Étant donné que l'établissement de certains couples nécessitait de cultiver l'une des deux souches dans un milieu minimum différent de celui utilisé lors du criblage des souches, nous avons à nouveau testé ces souches sur COH afin de vérifier si les profils de formation des biofilms oléolytiques restaient les mêmes. Il s'est avéré que ces profils ont été modifiés avec la modification des conditions de culture (tableau V-1). À partir de ces données, nous avons formé 11 couples. Les souches ont été cultivées individuellement et en co-culture sur paraffine, tristéarine, acide palmitique et hexadécyl palmitate à 25°C et 10 rpm pendant 4 jours.

Tableau V-1 : Combinaisons des souches étudiées en biofilm mix (P : Paraffine ; T : Tristéarine ; AP : Acide palmitique ; HP : hexadécyl palmitate. Les pentes ont été calculées avec un $r^2 > 0,9$).

Combinaison.	Milieu minimum	Souches	Pente de la courbe de croissance	DO _{600nm} max	Profil des biofilms oléolytique
1	MBmin	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	0,11	0,81	P/T/AP/HP
		<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17	0,12	0,79	P/T/AP/HP
2	MBmin	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	0,11	0,81	P/AP/HP
		<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	0,16	0,91	P/AP/HP
3	MBmin	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17	0,12	0,79	P/T/AP/HP
		<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	0,16	0,91	P/AP/HP
4	MBmin	<i>Marinobacter algicola</i> DG893	0,19	0,76	P/T/AP/HP
		<i>Aleromonas macleodii</i> ATCC 27126	0,13	0,8	P/T/AP/HP
5	MBmin	<i>Donghicola xiamenensis</i> Y-2	0,11	1,22	T/AP/HP
		<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM17395	0,08	1	AP/HP
6	MBmin	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	0,13	0,81	T/AP/HP
		<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> VT8	0,14	0,91	P/T/AP/HP
7	MBmin	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	0,13	0,81	AP/HP
		<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17	0,12	0,79	P/T/AP/HP
8	EMS	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	0,1	0,59	P/AP/HP
		<i>Marinobacter algicola</i> DG893	0,09	0,5	P/T/AP/HP
9	EMS	<i>Thalassolituus oleivorans</i> Mil-1	0,05	0,72	P/T/AP/HP
		<i>Marinobacter algicola</i> DG893	0,09	0,5	P/T/AP/HP
10	EMS	<i>Aleromonas macleodii</i> ATCC 27126	0,15	0,43	AP/HP
		<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	0,16	1,27	P/T/AP/HP

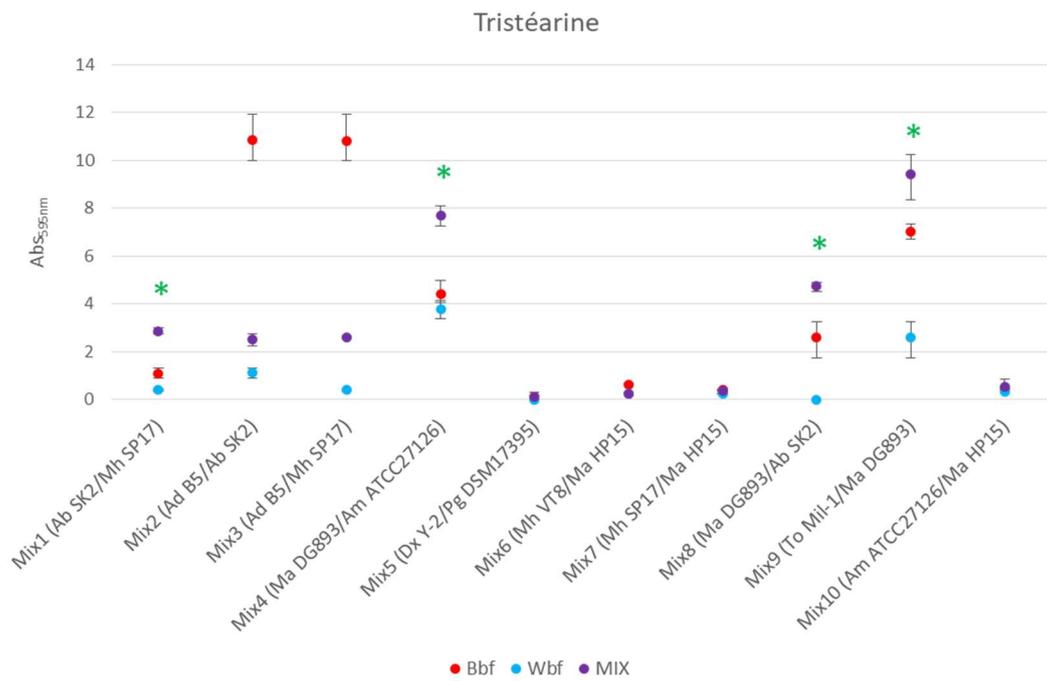
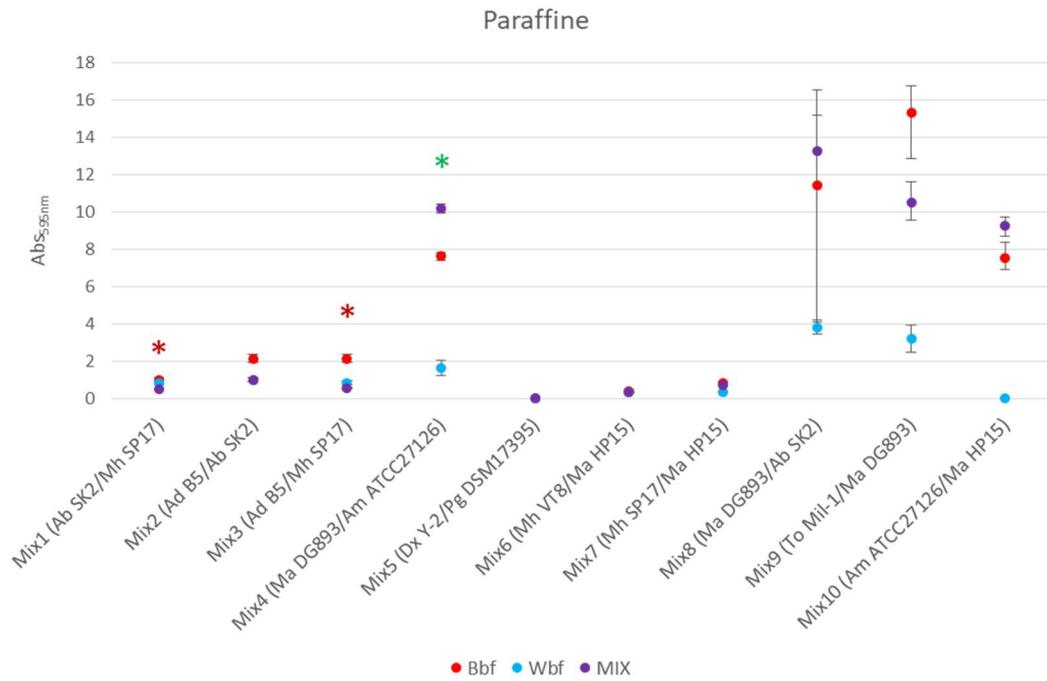
Tout comme Ren *et al.* [198], nous avons défini un effet synergique comme une augmentation de la production de biomasse en coculture (Mix : biofilm multiespèces) comparée à la biomasse produite par le meilleur producteur de biofilm en monoculture (Bbf : *best biofilm former*). Il est plus délicat de définir un effet compétitif dans nos conditions expérimentales. Dans les biofilms mix, les souches ont été co-inoculées en proportions égales (50/50) pour un volume équivalent à celui des cultures monospécifiques. Ainsi, un effet compétitif serait observé si la valeur du biofilm mix était inférieure à la valeur moyenne des valeurs de biofilm des souches individuelles. Néanmoins, notre expérience nous a prouvé que la quantification des biofilms d'une expérimentation à l'autre peut varier considérablement, tout en gardant les mêmes tendances. Cette définition risquerait donc d'introduire dans notre estimation des faux positifs. Nous avons donc préféré être plus restrictif et définir qu'un effet compétitif a lieu si la valeur du biofilm mix est inférieure à la valeur du biofilm de la souche la

moins performante (Wbf : *worst biofilm former*), conscient que nous pouvions ainsi sous-estimer ce trait phénotypique. La significativité des différences entre les valeurs des biofilms multi-espèces et mono-spécifiques a été contrôlée par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney (p -value < 0,05). Les résultats sont présentés dans la figure V-1.

Cinq effets synergiques et 3 effets compétitifs ont été observés. Aucun comportement social n'a été observé sur acide palmitique. Une compétition a eu lieu entre *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8 et *Marinobacter adhaerens* HP15 sur hexadécyl palmitate, tout comme entre *Alcanivorax borkumensis* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 ou *Alcanivorax dieselolei* B5 et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 sur paraffine. Les 5 synergies ont été observées sur paraffine et tristéarine. Elles concernaient *Marinobacter algicola* DG893 et *Alteromonas macleodii* ATCC27126 sur les 2 substrats et *Alcanivorax borkumensis* et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, *Thalassolituus oleivorans* Mil-1 et *Marinobacter algicola* DG893 ou *Alcanivorax borkumensis* SK2 et *Marinobacter algicola* DG893 sur tristéarine uniquement.

Les compétitions n'ont concerné que des souches des groupes 1, 2 et 3. Elles sont affiliées aux genres *Marinobacter* et *Alcanivorax*. Les souches des groupes 1 et 2 possèdent la série de COG impliquée dans la production de système de sécrétion de type VI. De plus, dans chaque couple concerné, une souche de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* est en jeu (VT8 ou SP17). Nous avons été surpris de constater que le mix 1 impliquant *Alcanivorax borkumensis* SK2 et *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 présentait un effet compétitif sur paraffine mais synergique sur tristéarine. A contrario, il n'a été constaté que des effets synergiques entre les souches du mix 4 correspondant au biofilm de *Marinobacter algicola* DG893 et *Alteromonas macleodii* ATCC27126 sur paraffine et tristéarine. Cette expérimentation a été menée une seconde fois pour les combinaisons ayant présenté un comportement social et les tendances ont été confirmées.

Dans nos conditions, la source de carbone n'était pas limitante. On peut alors s'interroger sur la cause des compétitions observées. Une lutte pour la surface n'est certainement pas en jeu, car des compétitions auraient alors certainement eu lieu sur tous les substrats assimilables par les souches le cas échéant, bien que des compétitions aient pu être omises en raison de la méthode d'évaluation que nous avons choisie. De plus, le cas du mix 1 conforte l'idée que la surface n'est pas en cause du fait de la différence de comportement observée selon le substrat. Les effets synergiques semblent plus facilement explicables. En effet, les souches, au sein d'un même biofilm, peuvent concentrer et partager des bien publics tels que des bio-surfactants, des exo-enzymes ou le produit de l'hydrolyse du substrat par ces mêmes enzymes. À ce stade, il est difficile de tirer des conclusions sur cette expérimentation, d'une part du fait du faible nombre de couples testés et de la diversité taxonomique restreinte des souches sélectionnées. D'autre part, des expérimentations permettant de quantifier la biomasse de chaque souche au sein des biofilms multi-spécifiques seraient nécessaires pour confirmer les comportements sociaux observés et apporter des éléments d'explication.



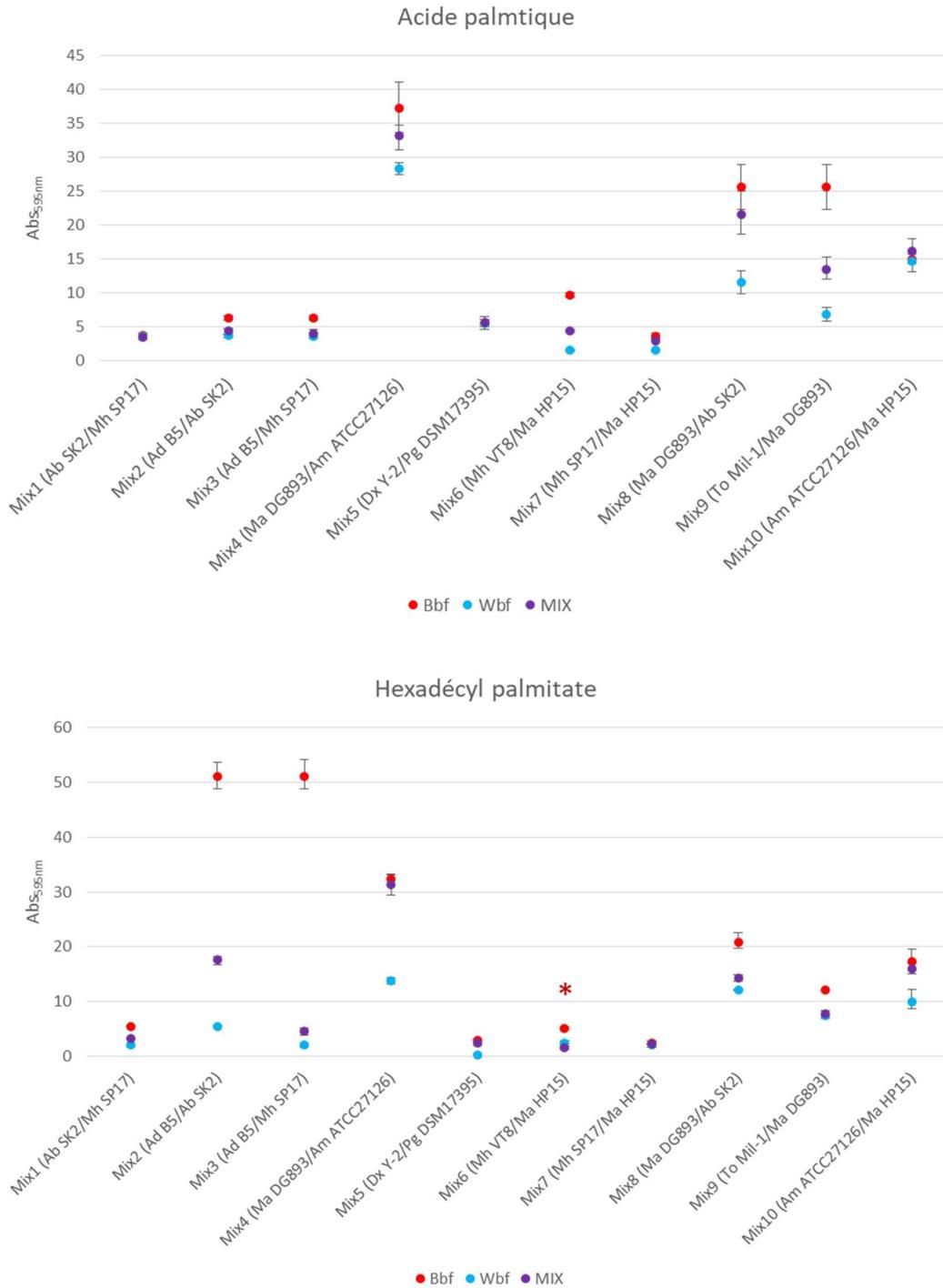


Figure V-1 : Quantification des biofilms oléolytiques mix et individuels correspondant aux 10 couples testés pour l'étude des comportements sociaux sur paraffine, tristearine, acide palmitique et hexadécyl palmitate.

Bbf : *Best biofilm former*, quantité de biofilm formé par la souche individuelle la plus performante au sein du couple étudié. Wbf : *Worst biofilm former*, quantité de biofilm mesuré pour la souche individuelle la moins performante du couple testé. Ab SK2 : *Alcanivorax borkumensis* SK2, Mh SP17 : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17, Ad B5 : *Alcanivorax dieselolei* B5, Ma DG893 : *Marinobacter algicola* DG893, Am ATCC27126 : *Alteromonas macleodii* ATCC27126, Dx Y-2 : *Donghicola xiamenensis* Y-2, Pg DSM17395 : *Phaeobacter gallaeciensis* DSM17395, Mh VT8 : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* VT8, Ma HP15 : *Marinobacter adhaerens* HP15, To Mil-1 : *Thalassolituus oleivorans* Mil-1. Les astérisques verts indiquent les biofilms dans lesquels un effet synergique significatif a été observé, les astérisques rouges indiquent les biofilms dans lesquels un effet compétitif a été observé. La significativité des résultats a été évaluée par un test de Wilcoxon Mann Withney (p-value ≤ 0.5).

3. Conclusion du chapitre

À partir des résultats préliminaires qui ont été présentés dans cette partie, il semble que dans nos conditions il n'y ait pas de lien particulier entre le *quorum-sensing* des souches et leur capacité à former un biofilm oléolytique. Néanmoins, ces observations peuvent être influencées par la méthode utilisée bien que l'analyse des génomes dont nous disposons n'ait pas non plus permis d'établir de lien. Néanmoins, des interactions sociales ont été observées au sein des biofilms oléolytiques. En effet, des effets synergiques (impliquant 4 couples sur les 10 testés) ont été observés sur paraffine et tristéarine et des effets compétitifs (impliquant 3 couples sur 10) ont été observés sur paraffine et hexadécyl palmitate. Curieusement, parmi les lipides la tristéarine est celui sur lequel les souches oléolytiques se sont le moins bien développées en termes de biomasse formée et de fréquence de souches positives (47 souches positives contre 60 et 88 sur hexadécyl palmitate et acide palmitique respectivement). Et seules des synergies ont été observées sur ce substrat. La tristéarine serait-elle plus difficilement assimilable ? Une coopération des souches faciliterait-elle sa dégradation ? Comme indiqué ci-dessus, il est très difficile de formuler une conclusion sur ces données préliminaires. Un effort plus important doit être fait dans cette expérimentation en termes de nombre de couples testés et de diversité des souches impliquées. De plus, si la quantification des biofilms au cristal violet permet une approche de ces phénomènes, il apparaît nécessaire de pouvoir quantifier chaque souche au sein des biofilms mixtes pour caractériser précisément la nature des comportements observés.

CHAPITRE VI :
***Palleronia rufa* MOLA 401^T, souche
oléolytique**

1. Introduction du chapitre

La souche MOLA 401^T est étudiée par l'équipe du Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologies Microbiennes (LBBM) pour l'étendue remarquable de sa gamme d'AHL (signaux QS) produites [67]. Elle fait partie des isolats criblés visuellement et sans réplique sur paraffine et tristéarine. Lors de ce criblage, il nous a semblé que la souche avait formé un biofilm sur tristéarine. Bien que la quantité de biofilm paraisse faible par rapport à d'autres souches, la possibilité que le système QS de cette souche puisse être impliqué dans la formation de biofilm oléolytique nous a amenés à entamer, en collaboration avec le LBBM, une étude plus approfondie. Ainsi, nous avons testé la capacité de la souche à former un biofilm oléolytique sur paraffine (HC), tristéarine et tripalmitine (TG), monolaurine et monopalmitine (monoglycérides), acide palmitique (acide gras), hexadécyl palmitate (cire) et hexadécanol (alcool gras) comme sources de carbone en MBmin après 4 jours de culture. L'expérimentation a été faite en triplicat et la présence d'un biofilm a de nouveau été évaluée visuellement. Nous n'avons pas pu confirmer la formation d'un biofilm sur tristéarine. Néanmoins, nous avons pu observer un biofilm sur monolaurine et tripalmitine. C'est pourquoi nous avons décidé de continuer nos investigations, d'autant plus que la souche appartient au groupe des *Roseobacter*, l'un des groupes les plus abondamment retrouvés en milieu marin et fréquemment observé associé à des surfaces [59,75,122,214,221]. Nous avons associé à l'étude des capacités oléolytiques de la souche MOLA 401^T une caractérisation taxonomique afin d'identifier formellement cette souche. Cette étude nous amenés à décrire MOLA 401^T comme souche type d'une nouvelle espèce.

2. Description de *Palleronia rufa* sp. nov., un nouveau membre de la famille des *Rhodobacteraceae*

Cette partie correspond à la version française des sections Résultats, Discussion et Conclusion de la publication en cours de soumission à Systematic and Applied Microbiology.

Cette étude a été menée en collaboration avec le laboratoire Arago et en particulier Raphaël Lami (LBBM), ainsi qu'avec Camille Clerissi (Criobe) qui nous a apporté son expertise pour les analyses génomiques.

Résultats :

La souche MOLA 401^T a été isolée sur MB à partir d'eau de mer au sud-ouest du lagon de la Nouvelle Calédonie (France) (22°21.23' S, 166°23.43' E), à 4 m de profondeur, entre des eaux oligotrophes proches de la barrière de corail et des eaux mésotrophes sujettes à des intrants terrestres et des effluents issus de la ville de Nouméa. L'analyse BLAST de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S a révélé que la souche MOLA 401^T appartient à la famille des *Rhodobacteraceae* et qu'elle est plus étroitement affiliée à *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T (96,9 % de similarité), *Maribius Pontilimi* GH1-23^T (96,4 % de similarité) et *Palleronia marisminoris* B33^T (96,3 % de similarité) (annexe 7, Figure VI-1).

Après une semaine d'incubation à 30° C sur MA, les colonies de la souche MOLA 401^T sont légèrement convexes, lisses, circulaires (1-2 mm de diamètre), non swarming et de couleur caramel. Les cellules sont coccoïdes et non motiles. La morphologie a été confirmée par observation en microscopie électronique après coloration négative des cellules (annexe 8). Les cellules ont un diamètre de 0,77 +/- 0,07 µm. Les principales caractéristiques sont présentées dans le tableau VI-1. La souche MOLA 401^T se développe entre 4 et 37° C avec un optimum à 30° C. La croissance est observée à un pH situé entre 6,5 et 8,5, avec un optimum à 8. La souche MOLA 401^T peut croître en l'absence de NaCl dans le milieu, mais la croissance est observée jusqu'à 90 g.L⁻¹ de NaCl et avec un optimum à 30 g.L⁻¹. Aucune croissance de MOLA 401^T n'est observée en MBmin avec 0,05 g.L⁻¹ d'extrait de levure, confirmant que l'extrait de levure à cette concentration ne peut pas soutenir la croissance. La souche MOLA 401^T peut se développer avec le D-glucose, D-mannose, D-raffinose, D-saccharose, L-rhamnose, acétate, gluconate, pyruvate, D-sorbitol, glycérol, myo-inositol et succinate comme seule source de carbone. Une faible croissance a été observée sur melezitose, malate et éthanol. Cellobiose, D-arabinose, D-fructose, D-tréhalose, D-fructose, L-xylose, xylitol, glycogène, amidon, peptone et tryptone ne permettent pas la croissance. La comparaison des profils d'assimilation des substrats de MOLA 401^T et de ses plus proches parentes est présentée dans le tableau VI-2. La souche MOLA 401^T montre des activités phosphatase alcaline, esterase (C4), esterase lipase (C8), valine arylamidase, cystine arylamidase, leucine arylamidase, phosphatase acide et naphthol-AS-BI phosphohydrolase. La comparaison des profils enzymatiques de MOLA 401^T et de ses plus proches parentes est donnée dans le tableau VI-2. Les tests d'activité catalase et oxydase sont négatifs.

Tableau VI-1 : Comparaison des caractéristiques de la souche MOLA 401^T avec ses plus proches parentes. 1 : MOLA 401^T; 2 : *Palleronia soli* CAU1105^T; 3 : *Palleronia abyssalis* 221-F1^T; 4 : *Palleronia marisminoris* B33^T; 5 : *Maribius salinus* CL-SP27^T; 6 : *Maribius pelagius* B5-6^T; 7 : *Maribius pontilimi* GH1-23^T; 8 : *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T; 9 : *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T; 10 : *Profundibacterium mesophilum* KAUST100406-0324^T; 11 : *Boseongicola aestuarii* CECT 8489^T. *Données issues de cette étude.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
G+C %	67,6	64,3	64,7	64,2	67,7	66,9	66,7	68,7	61	64	58,7
mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
couleur des colonies	caramel	crème	rouge	rose pâle	crème	crème	crème	jaune grisâtre	rose grisâtre	incolore	jaune pâle
forme	coque	petit bacille	coque/bacille	petit bacille	bacille	bacille	bacille	ovoïde/bacille	coccoïde	coccoïde	coque/bacille
taille (µm)	0,77	0,5-0,8/ 1,2-2,6	0,8-1	0,75-1/ 2-2,5	0,7-1,4/ 1,0-4,5	0,4-0,8/ 1,3-2,8	0,8-1,2/ 1,2-2,3	0,3-1,6/ 0,5-10,0	0,8-1,2	5,0-8,0	0,5-2/ 0,7-10,0
oxydase	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
catalase	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
gamme de température (°C)	15-37	20-40	15-37	20-37	10-35	10-40	10-30	10-37	15-35	15-25	10-30
optimum (°C)	30	37	30	30*	30-35	30-35	30	25-30	25-30	20-25	25
gamme de pH	6,5-8,5	4,5-11	6,0-8,0	5,0-10	7-9	6-9	6-10	6-8	6-8	6-8,5	6,5-8
optimum	8	7	6,5-7	7*	8*	7-8*	7	7-8	6,5-7,5	7-8	7
gamme de salinité (% NaCl)	0-9	1-11	0-13	0,5-15	1-10	2-15	0,5-5	0,5-5	1,5-6	0,5-20	0,5-5
optimum (%)	3	3	2-5	5	1,5*	2,5*	1	2	2-3	2-6	2
ubiquinone	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10

Tableau VI-2 : Comparaison des profils d'utilisation de substrats et des activités enzymatiques entre la souche MOLA 401^T et ses plus proches parentes. 1 : MOLA 401^T ; 2 : *Palleronia soli* CAU1105^T; 3 : *Palleronia marisminoris* B33^T; 4 : *Palleronia abyssalis* 221-F1^T; 5 : *Maribius salinus* CL-SP27^T; 6 : *Maribius pelagius* B5-6^T ; 7 : *Maribius pontilimi* GH1-23^T ; 8 : *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T ; 9 : *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T. +, positive; -, négative; w, faible. Toutes les souches sont positives pour les activités esterase (C4), esterase lipase (C8), et leucine arylamidase. Toutes les souches sont négatives pour les activités trypsine, β -galactosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase et α -fucosidase.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Substrat:									
cellobiose	-	-	-	+	+	-	-	+	+
D-fructose	-	-	-	+	w	w	+	w	+
D-glucose	+	-	+	+	-	+	+	+	+
D-mannose	+	-	-	+	-	-	+	w	+
D-raffinose	+	-	w	-	-	-	+	-	+
D-saccharose	+	+	-	-	+	+	-	-	+
D-tréhalose	-	-	-	w	-	-	+	+	+
L-rhamnose	+	-	-	+	-	-	+	w	-
mélézitose	w	-	-	w	-	-	+	-	+
D-sorbitol	+	-	-	-	+	-	-	+	+
myo-inositol	+	-	+	-	+	-	-	-	+
Activité:									
phosphatase alcaline	+	+	+	w	-	-	-	+	+
lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-	w	-
valine arylamidase	+	-	-	-	-	-	w	w	-
cystine arylaminidase	+	w	w	-	-	-	-	w	-
α -chymotrypsine	-	-	-	-	-	-	-	w	-
phosphatase acide	+	+	+	w	-	-	-	w	+
naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	-	+	+	-	-	+	w	w
α -galactosidase	-	-	-	-	-	-	+	-	-
β -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-	w	-
α -glucosidase	-	-	+	+	-	-	-	-	-
β -glucosidase	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Les principaux acides gras cellulaires de MOLA 401^T sont C_{18:1} ω 7c (63,14 %), C_{18:0} (12,49 %), C_{19:0} cyclo ω 8c (8,97 %) (tableau VI-3). Le profil des lipides polaires est constitué de 5 classes de lipides : aminolipide, glycolipide, phosphatidylglycérol, diphosphatidylglycérol et phosphatidylcholine. La seule quinone respiratoire détectée est l'ubiquinone 10.

Tableau VI-3 : Composition en acides gras de la souche MOLA 401^T et de ses plus proches parentes. Les gammes de pourcentages sont basées sur les données issues des références [3,50,127,128,140,147,156,181,182] et de cette étude. 1 : MOLA 401^T; 2 : *Palleronia soli* CAU1105^T; 3 : *Palleronia abyssalis* 221-F1^T; 4 : *Palleronia marisminoris* B33^T; 5 : *Maribius salinus* CL-SP27^T; 6 : *Maribius pelagius* B5-6^T; 7 : *Maribius pontilimi* GH1-23^T; 8 : *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T; 9 : *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T; 10 : *Profundibacterium mesophilum* KAUST100406-0324^T; 11 : *Boseongicola aestuarii* CECT 8489^T. -, non détecté. tr, trace (< 0,5 %).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C _{12:0}	tr	0,6-1,1	0-0,5	-	0- tr	0- tr	-		1,1-1,3	-	-
C _{15:0}	-	-	-	-	0- tr	-	-		-	-	-
C _{16:0}	2,1	2,6-5,1	3,1-6,3	1,5-4,3	3,5-4,9	0-2,4	4,7	1,9-2,1	8,31-11,9	3,4	1,5-2,0
C _{17:0}	0,6	0,8-7,5	tr-1,5	0-1,7	1,1-2,7	0-0,7	-	4,9-6,4	-	-	-
C _{18:0}	12,5	6,1-9,7	2,5-3,1	3,0-4,2	2,7-5,4	2,7-4,6	7,2	3,0-3,4	2,5-2,8	0,5-0,7	5,5-5,6
C _{19:0}	-	-	-	-	-	-	-		-	0-0,6	-
C _{16:1} ω7c/16:1ω6c/											
C _{15 iso 20H}	-	0-1,2	0- tr	0- tr	0-0,6	0- tr	-	0,6-0,7	-	1,0-3,6	tr-0,8
C _{17:1} ω6c	-	-	-	0- tr	-	-	-	1,0-1,4	-	-	-
C _{17:1} ω7c	-	0- tr	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-
C _{17:1} ω8c	-	0-1,5	0-0,7	-	0- tr	tr	-	1,6-2,0	-	-	-
C _{18:1} ω7c	63,1	62,9-79,1	39,7-80,9	54,8-79,6	32,7-69,7	36,3-79,4	51	67,2-70,7	63,4-82,9	83,3-85,6	73,1-81,1
C _{18:1} ω9c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4-1,7
C _{18:3} ω6c	-	-	-	-	0-1,7	-	-		-	-	-
C _{19:6c} /											
C _{19:0 cyclo} ω10c	2,5	0-1,3	-	-	1,7-5,5	1,8-2,8	4	1,1-1,5	-	-	tr-0,7
C _{20:1} ω7c	0,5	0- tr	-	0- tr	0- tr	0-1,0	-	tr	0,7	-	0,9-1,2
C _{10:0 3OH}	1,5	2,2-2,8	1,6-2	2,2-5	1,3-4,3	3,2-5,2	-	2,3-2,5	0-2,7	1,8	2,2-2,7
C _{11:0 3OH}	-	0- tr	0- tr	0- tr	-	-	-	tr-0,6	-	-	-
C _{12:0 3OH}	-	0-2,6	1,9-2,9	-	-	-	-	-	-	1,7	tr
C _{12:1 3OH}	-	-	-	-	-	0- tr	-	-	-	-	-
C _{14 3OH}	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0-1,5	-	-
C _{19:0 cyclo} ω8c	8,9	0-6,6	5,2-43,5	10,8-31,3	5,8-38,9	3,3-36,5	22,3	3,7-6,8	0,6-9,3	-	-
C _{11-Me-C} _{18:1} ω7c	7,5	2,1-6,3	0-1,6	0-1,4	3,4-8,4	3,4-10,8	6,8	5,4-7,4	2,3-4,5	5,7-7,2	5,3-12,9
C _{10-Me-C} _{19:0}	-	-	-	-	0- tr	-	-	-	-	-	-
unknown ECL 11.799	tr	2,8	2,1-2,6	0,8-1	2,3-2,4	2,3-2,8	-	-	1,23-1,5	-	-

La séquence du génome de MOLA 401^T a été comparée à celles de 83 autres génomes de souches de *Rhodobacteraceae* (annexe 3). Les pourcentages d'ANI les plus élevés ont été obtenus avec les génomes de *Palleronia marisminoris* B33^T (76,98 %), *Maribius salinus* CL-SP27^T (76,37 %), *Maribius pelagius* B5-6^T (76,08 %) et *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T (75,77 %). L'estimation des AAI a donné des résultats assez similaires, les pourcentages plus élevés étant avec les séquences de *Palleronia marisminoris* B33^T (73,40 %), *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T (71,35 %), *Maribius salinus* CL-SP27^T (71,06 %) et *Maribius pelagius* B5-6^T (70,98 %) (annexe 9). Les POCP les plus importantes ont également été obtenus pour avec les mêmes génomes : *Maribius salinus* CL-SP27^T (62,77 %), *Maribius pelagius* B5-6^T (61,95 %), *Palleronia marisminoris* B33^T (57,88 %) et *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T (54,68 %)(annexe 10).

D'autres marqueurs phylogénétiques ont été utilisés : *gyrB*, *recA*, *rpoC* et *rpoD*. Les reconstructions phylogénétiques obtenues avec *gyrB*, *rpoC* et *rpoD* sont cohérentes : la souche MOLA 401^T est plus proche de *Palleronia marisminoris* B33^T, dans un cluster robuste (valeurs de bootstrap entre 99 et 100 %) regroupant *Palleronia marisminoris* B33^T, *Maribius salinus* CL-SP27^T, *Maribius pelagius* B5-6^T et *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T (figure VI-2 et annexe 11). La phylogénie obtenue sur la base des séquences de *recA* a donné une structure très différente et moins robuste dans laquelle la souche MOLA 401^T était cependant toujours proche de *Palleronia marisminoris* B33^T (annexe 12). Une autre reconstruction phylogénétique basée sur 585 core-gènes a été réalisée. Elle montre un regroupement similaire des souches mentionnées plus haut, ainsi que le même positionnement de MOLA 401^T (figure VI-3). La corrélation entre l'AAI, l'ANI, le POCP et les pourcentages d'identité entre les gènes codant pour l'ARN 16S, les gènes *gyrB*, *rpoC*, *rpoD* et *recA* a été estimée par calcul des coefficients de Pearson (annexe 13). La meilleure corrélation s'établit entre l'AAI et le pourcentage d'identité du core-génome (0,907). Avec des coefficients de Pearson entre 0,79 et 0,825, le core-génome et les gènes de ménage apparaissent également fortement corrélés. Le POCP n'est nettement corrélé qu'avec l'AAI (0,765).

La souche MOLA 401^T est étudiée pour sa capacité à produire une large gamme d'AHLs. Nous avons donc évalué la production d'AHLs à courtes et longues chaînes de ses plus proches parentes pour savoir si celles-ci partageaient ou non tout ou partie de l'étonnante capacité de MOLA 401^T. Les deux types d'AHLs ont été détectés dans les surnageants de culture des 3 souches de *Palleronia*, alors que seules les AHLs à chaînes longues l'ont été dans les cultures de MOLA 401^T. *Maribius salinus* CL-SP27^T, *Maribius pelagius* B5-6^T et *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T ont produit de faibles quantités d'AHLs. Le COG3916, correspondant à l'AHL synthase LuxI, a été retrouvé dans tous les génomes disponibles explorés (tableau VI-4).

Les souches appartenant au groupe des *Roseobacter* sont fréquemment observées associées à des surfaces. La capacité des proches parentes de MOLA 401^T à former des biofilms a été étudiée. Ces 8 souches ont été capables de former un biofilm sur polystyrène en MB après 8 jours de croissance. Ces résultats ont été comparés à ceux de 29 autres souches marines étudiées au laboratoire. Elles appartiennent majoritairement aux *Proteobacteria* (25 souches), dont 10 sont des *Alphaproteobacteria* et, parmi elles, 6 sont des *Rhodobacteraceae*. Les autres souches sont 2 *Actinobacteria*, 1 *Firmicutes* et 1 *Balneolata*. Les souches appartenant aux *Rhodobacteraceae* ont été les plus performantes pour la formation de biofilm sur polystyrène (figure VI-4).

Tableau VI-4 : Production d’AHLs par la souche MOLA 401^T et ses plus proches parentes.

Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôle positif. Le nombre de COG3916 correspondant à l’AHL synthase a été confronté aux résultats de production d’AI-1. 1 : MOLA 401^T; 2 : *Maribius pelagius* B5-6^T; 3 : *Maribius salinus* CL-SP27^T; 4 : *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T; 5 : *Palleronia marisminoris* B33^T; 6 : *Palleronia abyssalis* 221-F1^T; 7 : *Palleronia soli* CAU1105^T. NA, génome non disponible.

	1	2	3	4	5	6	7
Valeur maximale d’AHL à longue chaîne détectée (en % du contrôle positif / OD ₆₀₀)	53,72±18,97	0,95±0,13	1,93±0,46	3,64±1,43	174,68±41,22	87,58±12,81	135,06±13,38
Valeur maximale d’AHL à courte chaîne détectée (en % de contrôle positif / OD ₆₀₀)	0,19±0,22	0,16±0,02	1,35±0,53	1,98±0,44	65,33±6,45	15,18±3,07	45,46±1,98
AHL synthase (COG3916)	2	1	1	2	2	NA	NA

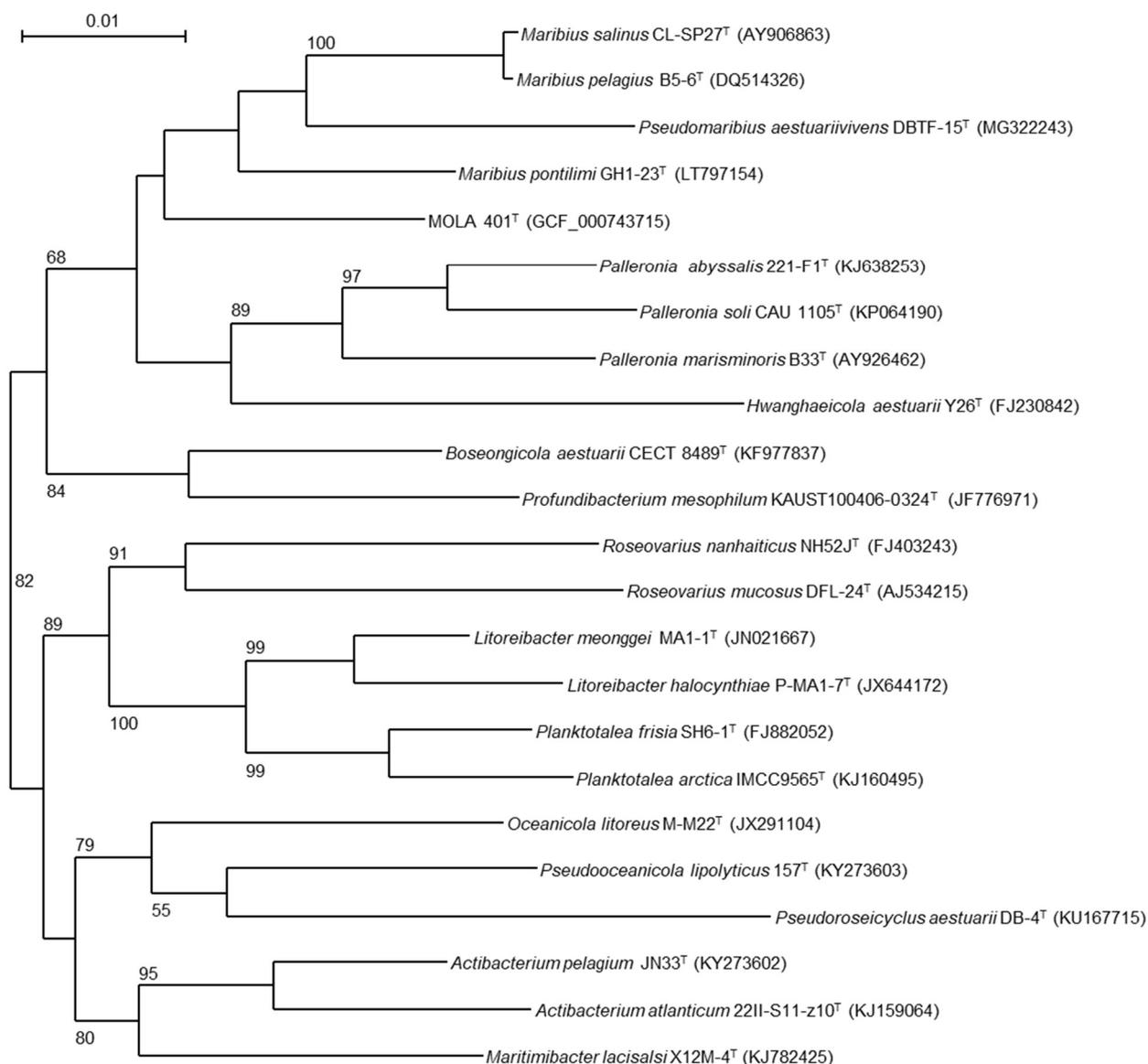


Figure VI-1 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S montrant le positionnement de la souche MOLA 401^T et de ses plus proches parentes.

Les valeurs de bootstrap (pourcentages de 1000 répétitions) supérieures à 50 % sont indiquées. Échelle : 0,01 substitution par position nucléotidique.

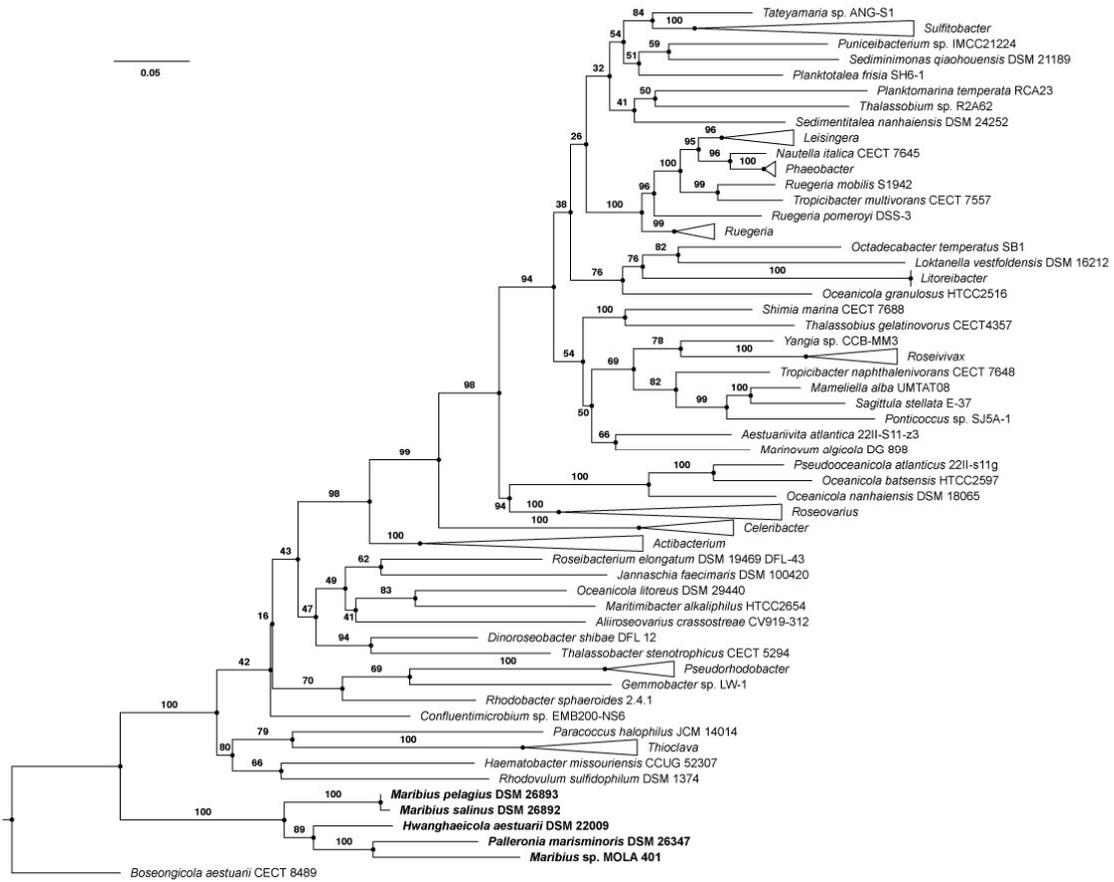


Figure VI-1 : Arbre phylogénétique base sur les séquences de *gyrB* montrant la position de MOLA 401^T et ses plus proches parents

Les valeurs de bootstrap sont en pourcentage de 1000 répétitions. Échelle : 0,05 substitution par position nucléotidique.

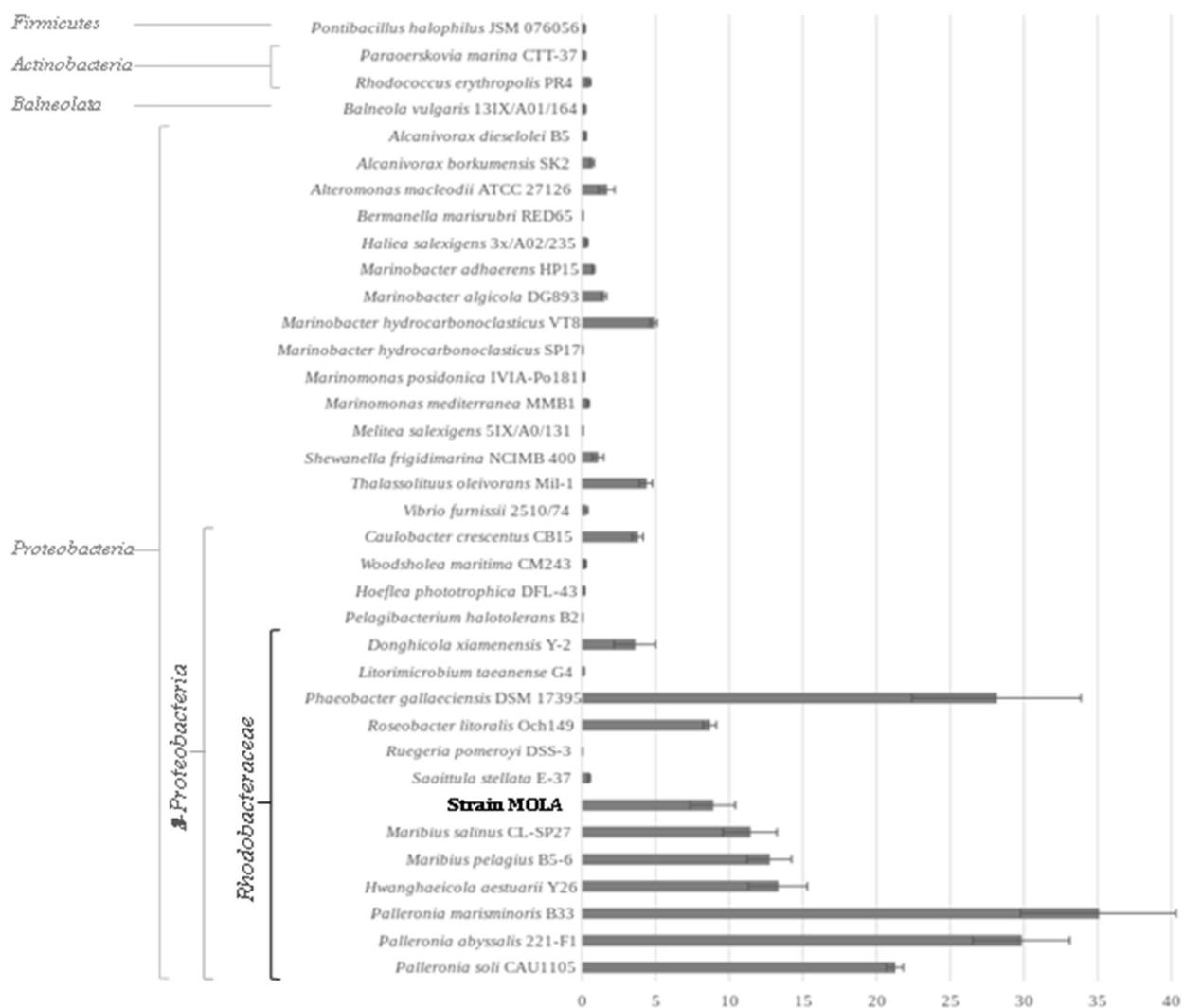


Figure VI-3 : Quantité de biofilm produite sur polystyrène (Abs_{595 nm}).
La biomasse attachée au fond du puits à été quantifiée par coloration au cristal violet.

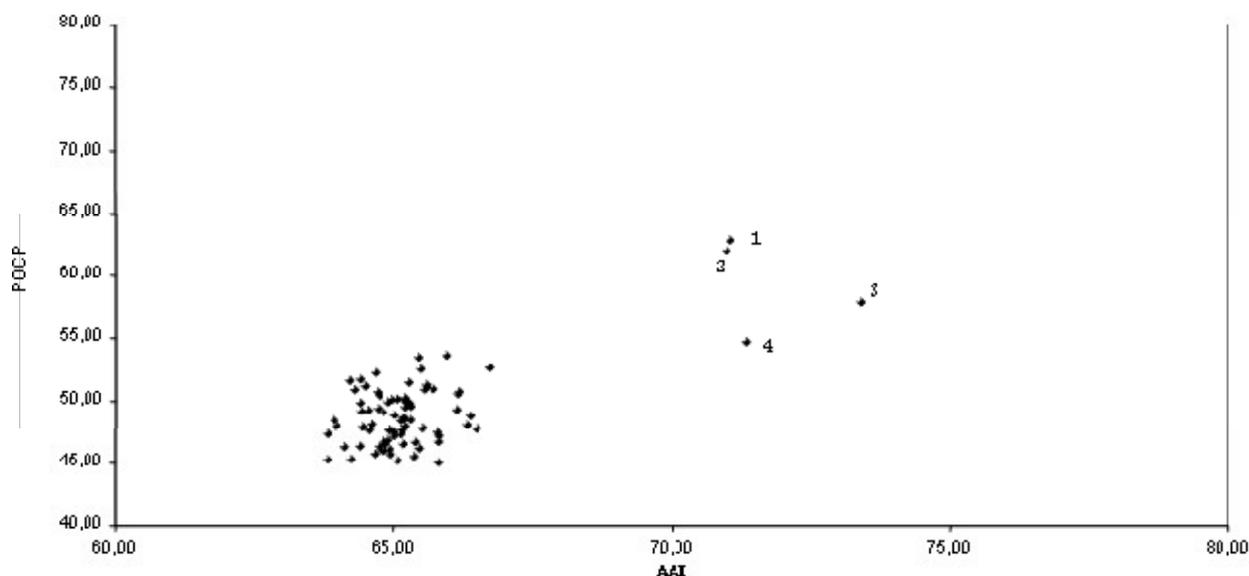


Figure VI-4 : Distribution de la comparaison des génomes de MOLA 401^T et de ses plus proches parentes (>95% d'identité des séquences des gènes de l'ARNr 16S) en fonction des valeurs AAI et POCP.

1 : MOLA 401^T et *M. salinus* CL-SP27^T ; 2 : MOLA 401^T et *M. pelagius* B5-6^T ; 3 : MOLA 401^T et *P. marisminoris* B33^T ; 4 : MOLA 401^T et *H. aestuarii* Y26^T.

Discussion :

La caractérisation de la souche MOLA 401^T montre qu'elle représente une nouvelle espèce. Les pourcentages d'identité de séquence de gène codant pour l'ARNr 16S avec ses plus proches parentes *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T, *Maribius Pontilimi* GH1-23^T et *Palleronia marisminoris* B33^T, sont entre 96,9 et 96,3 %, sous le seuil usuel de 97 % utilisé pour la délimitation des espèces. Mais, nous n'avons pas pu traiter *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T et *Maribius Pontilimi* GH1-23^T comme les autres souches utilisées pour la comparaison de MOLA 401^T (c'est-à-dire vérifier les tests de substrats, les activités enzymatiques, les compositions en acides gras et lipides polaires et les gammes de croissance, comme cela a été fait pour les autres) car les descriptions de ces deux souches ont été publiées alors que nous avons terminé l'ensemble de nos expérimentations. De plus, les génomes de ces souches n'étant pas disponibles, nous n'avons pas pu mener l'étude génomique qui a été cruciale pour déterminer l'affiliation de MOLA 401^T. Cependant, sur la base des données fournies dans leurs descriptions, ces souches ont été prises en compte.

MOLA 401^T présente des profils enzymatiques et d'assimilation de substrats différents de ses plus proches parentes (tableaux VI-1 et VI-2). Elle a les mêmes principaux acides gras que les espèces types de *Palleronia*, *Maribius*, *Pseudomaribius* et *Hwanghaeicola*, mais présente des différences au niveau des acides gras mineurs (tableau VI-3). Les valeurs d'ANI entre le génome de MOLA 401^T et les génomes disponibles de 4 des plus proches parentes sont inférieures à la limite de 94 % qui correspond à 70 % d'hybridation ADN-ADN, critère utilisé pour délimiter les espèces [234]. Les caractéristiques physiologiques, métaboliques, morphologiques et biochimiques ainsi que les données de génomique renforcent la définition de MOLA 401^T comme une nouvelle espèce, mais ne permettent pas son affiliation à un genre. En effet, lors de cette étude il est apparu également nécessaire de clarifier la position taxonomique des plus proches parentes de MOLA 401^T. En se basant les séquences du gène de l'ARNr 16S, les 3 plus proches parentes de MOLA 401^T appartiennent à 3 genres différents et, sur la seule base de cette séquence, MOLA 401^T serait affiliée au genre *Pseudomaribius* (annexe 7). Cependant, la pertinence de ce marqueur est remise en cause pour les souches appartenant aux

Rhodobacteraceae [218,267]. En effet, de nombreux genres appartenant à la famille des *Rhodobacteraceae* ont été validés malgré un pourcentage d'identité de séquence du gène de l'ARNr 16S supérieur à 96 % (et même > 98 %) entre les espèces types et les plus proches. Cette situation ne serait pas acceptée dans la majorité des autres familles bactériennes, à moins de fournir des données supplémentaires pertinentes permettant une discrimination au rang du genre. Afin de déterminer à quel genre appartient MOLA 401^T, ses caractéristiques physiologiques, métaboliques, morphologiques et biochimiques ont été comparées aux 10 souches types les plus proches (tableau VI-1) [3,50,127,128,140,147,156,181,182]. La souche MOLA 401^T a les mêmes principaux acides gras que les espèces types des genres *Palleronia*, *Maribius*, *Pseudomaribius* et *Hwanghaeicola*. Néanmoins, l'interprétation des profils d'acide gras doit être faite avec précaution étant donné les variations importantes constatées entre différentes analyses pour de mêmes souches de *Rhodobacteraceae* [267]. La même situation s'est produite pour MOLA 401^T et ses plus proches parentes où des variations intra-génériques plus importantes que des variations inter-génériques ont été observées pour les acides gras C_{17:0}, C_{10:0} 3OH, C_{12:0} 3OH et C_{19:0} cyclo ω8c entre les espèces de *Palleronia* et entre celles de *Maribius*. L'utilisation des profils d'acides gras est donc difficile pour argumenter une discrimination au niveau du genre. De plus, les différences phénotypiques et dans les profils enzymatiques et de substrats de ces souches ne suffisent pas à les séparer dans des genres distincts.

Les alignements de séquences de *gyrB*, *rpoC* et *rpoD* montrent que la souche MOLA 401^T est proche de *Palleronia marisminoris* B33^T et que ces deux souches appartiennent à un cluster incluant *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T, *Maribius salinus* CL-SP27^T et *Maribius pelagius* B5-6^T. Les valeurs de bootstrap de 99-100 % indiquent une forte robustesse et montrent que ces séquences sont des marqueurs pertinents dans le groupe des *Roseobacter*, comme indiqué par Wirth et Withman [267] pour *rpoC*. La phylogénie basée sur les 585 core-gènes est cohérente avec celle basée sur les séquences de *gyrB*, *rpoC* et *rpoD*. À l'opposé, l'alignement des séquences de *recA* donne un arbre à la topologie incohérente avec tous les autres et, par conséquent, ce marqueur ne devrait pas être utilisé pour la phylogénie des *Rhodobacteraceae*.

Les pourcentages AAI entre le génome de MOLA 401^T et les génomes disponibles de 4 de ses plus proches parentes (*Palleronia marisminoris* B33^T, *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T, *Maribius salinus* CL-SP27^T et *Maribius pelagius* B5-6^T) se situent entre 71,06 et 73,40 %, donc dans la gamme de 60-80 % qui suggère que ces souches pourraient appartenir au même genre [133,206] (annexe 9). Une limite de genre à 50 % de POCP a été suggérée [191]. Les pourcentages entre MOLA 401^T et ses plus proches parentes sont supérieurs à 54 % (annexe 10). Or, les pourcentages entre *Palleronia marisminoris* B33^T, *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T, *Maribius salinus* CL-SP27^T et *Maribius pelagius* B5-6^T sont également tous supérieurs à 50 %, ce qui suggère que toutes ces souches pourraient appartenir au même genre, en accord avec la conclusion qui se dessinait selon les valeurs d'AAI (annexe 9). Les valeurs seuils d'AAI et POCP pour la définition d'un genre sont discutées [234]. Cependant, la distribution des génomes de *Rhodobacteraceae* selon les valeurs d'AAI et de POCP (figure VI-5 et annexe 14) montre que les souches MOLA 401^T, *Palleronia marisminoris* B33^T, *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T, *Maribius salinus* CL-SP27^T et *Maribius pelagius* B5-6^T se regroupent, soutenant qu'elles appartiennent à un seul et même genre.

Une observation inattendue concernant *Maribius salinus* CL-SP27^T et *Maribius pelagius* B5-6^T a été faite. Leurs différences génomiques, métaboliques, chemotaxonomiques et phénotypiques sont mineures et selon les études, certaines de ces différences n'ont pas toujours été observées. Avec les valeurs d'ANI, d'AAI et de POCP à 96,12, 97,46, et 86,80 respectivement, ces 2 souches devraient appartenir à la même espèce. Ceci est également supporté par le pourcentage d'identité des séquences du gène de l'ARNr 16S qui est de 99,86 %.

Parce que la souche MOLA 401^T a été d'abord étudiée pour la diversité remarquable de sa production d' AHLs, la détection de la production d' AHLs a été menée sur ses 6 plus proches parentes. Comme attendu, la souche MOLA 401^T produit des AHLs à longues chaînes. Les 3 souches de *Palleronia* produisent des AHLs à courtes et longues chaînes, tandis que les 2 souches de *Maribius* ainsi que *H. aestuarii* Y-26^T ont montré une capacité production limitée d' AHLs dans nos conditions. La présence du COG3916 codant pour une AHL synthase dans l'ensemble des génomes des 6 plus proches parentes étudiés est assez cohérent avec l'estimation précédemment faite que le QS est un trait commun au groupe des *Roseobacter* [41,42], même si les deux souches de *Maribius* et *H. aestuarii* Y-26^T testées n'ont pas montré des valeurs élevées de production d' AHLs. La faible détection des AHLs pour ces 3 souches pourrait être liée à des facteurs environnementaux tels que la source de carbone, la température, le pH ou autres qui pourraient perturber la production d' AHL [38].

Nos résultats montrent que la souche MOLA 401^T et ses proches parentes sont performantes pour la production de biofilm et qu'elles possèdent un système QS à AHLs. La capacité à coloniser une surface et les systèmes QS sont souvent observés comme liés et ce particulièrement pour le groupe des *Roseobacter* qui a été identifié comme colonisateur ubiquitaire des surfaces marines [59]. En offrant un environnement structuré limitant la diffusion des solutés, les biofilms représentent un habitat propice à la communication QS.

Conclusion :

Nos résultats QS et biofilm soutiennent les observations précédemment réalisées sur le groupe des *Roseobacter* qui le place comme un groupe de spécialistes accroissant leur potentiel commun de QS dans les environnements marins.

Sur la base de l'ensemble des données présentées, la souche MOLA 401^T peut être placée dans le genre *Palleronia*. Nous proposons la reclassification de *Maribus pelagius* comme synonyme de *Maribius salinus* (souche type du genre *Maribius*), et d'inclure les espèces de *Maribius* ainsi que *H. aestuarii* dans le genre *Palleronia* (qui a été décrit le premier).

Plusieurs séquences de génome ne sont pas disponibles, empêchant les analyses génomiques. Donc même si les positions taxonomiques de *M. pontilimi* GH1-23^T, *P. soli* CAU 1105^T et *P. abyssalis* 221-F1^T pourraient maintenant être considérées incertaines, leurs affiliations devraient être maintenues dans leurs genres respectifs. En conséquence, ces souches devraient également être renommées pour être en accord avec les nouvelles délimitations proposées. Le cas de *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T est différent, car cette souche est la seule de son genre. Donc même si cette souche pourrait être groupée avec les autres, tant que de nouvelles données ne sont pas disponibles, elle devrait être maintenue comme souche type de son genre séparé.

Une délimitation claire des espèces et des genres de la famille des *Rhodobacteraceae* n'est pas évidente. Les marqueurs génomiques et phylogénétiques apportent des données permettant d'aider et de clarifier un positionnement incertain après avoir observé les paramètres usuels requis dans une approche taxonomique polyphasique. De récentes références concernant les *Roseobacter* et les *Rhodobacteraceae* soulignent l'importance des séquences génomiques et la taxonomie pour comprendre l'évolution écologique et phylogénomique de ces bactéries [153,203,234]. Nous suggérons ici une réorganisation basée sur des marqueurs phylogénétiques et génomiques, utilisés en combinaison avec tous les autres paramètres usuels, ce qui pourrait être appliqué pour d'autres cas concernant cette famille pour parvenir à une structure taxonomique plus robuste des *Rhodobacteraceae*.

Modification des caractéristiques du genre *Palleronia* [156].

Les informations suivantes modifient les précédentes définitions du genre [3,127,156]. Les tests oxydase et catalase sont positif ou négatif. Les acides gras majoritaires sont C_{18:1}ω7c et C₁₉ cyclo ω8c, C_{16:0} et C_{18:0} sont parmi les principaux. La souche type est *Palleronia marisminoris* B33^T.

Reclassification de *M. pelagius* comme *M. salinus*.

Basonyme : *Maribius pelagius* B5-6^T. La description est celle donnée par Choi *et al.* [50], avec les modifications suivantes : le contenu en G+C est 66,9 % sur la base de la séquence du génome.

La souche type est *Palleronia pelagius* B5-6^T,

Reclassification de *Maribius salinus* comme *Palleronia salinus* comb. nov.

Basonyme : *Maribius salinus* CL-SP27^T. La description est celle donnée par Choi *et al.* [50], avec les modifications suivantes : le D-fructose et le D-raffinose ne permettent pas la croissance et le contenu en G+C est de 67,7 % sur la base de la séquence du génome.

La souche type est *Palleronia salinus* CL-SP27^T.

Reclassification de *Maribius pontilimi* comme *Palleronia pontilimi* comb, nov,

Basonyme : *Maribius pontilimi* GH1-23^T. La description est celle donnée par Lee [147],

La souche type est *Palleronia Pontilimi* GH1-23^T.

Reclassification de *Hwanghaeicola aestuarii* comme *Palleronia aestuarii* comb. nov.

Basonyme : *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T. La description est celle donnée par Kim *et al.* [128].

La souche type est *Palleronia aestuarii* Y26^T.

Description de *Palleronia rufa* sp. nov.

Palleronia rufa (ru'fa, L, fem, adj, rufa, rouxs, de couleur caramel).

En complément des caractéristiques données dans la description du genre, les colonies sur MA sont de couleur caramel, légèrement bombées, lisses, circulaires (1-2 mm de diamètre) et sont non swarming. Les cellules sont des coques de 0,7 à 0,8 μm de diamètre. La croissance a lieu dans une gamme de températures comprises entre 4 et 37°C (optimum à 30°C), à des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 8,5 (optimum à 8) et avec 0 à 9 % (m/v) de NaCl (optimum à 3 %). La gélatine est hydrolysée. L'activité catalase est négative et l'activité oxydase est positive. La croissance a lieu avec les sources de carbone suivantes : D-glucose, D-mannose, D-raffinose, D-saccharose, L-rhamnose, acétate, gluconate, pyruvate, D-sorbitol, glycérol, myo-inositol et succinate. Une croissance faible a été observée sur melezitose, malate et éthanol. Aucune croissance n'a été constatée avec du cellobiose, D-arabinose, D-fructose, D-trehalose, D-fructose, L-xylose, xylitol, glycogène, amidon, peptone et tryptone. Les principaux acides gras cellulaires sont C_{18:1}ω7c, C_{18:0}, C₁₁-Me-C_{18:1}ω7c et C_{19:0} cyclo ω8c. La seule ubiquinone est le Q-10. Le contenu en G+C est de 67,6 %. La souche type est

MOLA 401^T (DSM 106827, numéro CIP en attente), isolée d'un échantillon d'eau de mer collectée dans le sud-ouest du lagon de Nouvelle Calédonie [53,67].

3. Études des capacités oléolytiques de MOLA 401^T et de ses plus proches parentes

En amont de la description taxonomique qui a été réalisée, une étude sur une gamme élargie de COH a également été menée. Un premier criblage visuel de MOLA 401^T sur paraffine, tristéarine, tripalmitine, acide palmitique, hexadécyl palmitate, monopalmitine, monolaurine et hexadécanol dans les conditions du criblage initial (en MBmin, incubation de 4 jours à 25°C et 100 rpm) a montré la formation d'un biofilm oléolytique sur monolaurine et tripalmitine. La croissance de MOLA 401^T étant plus lente que la majorité des souches criblées (48 h en moyenne pour atteindre la phase exponentielle de croissance en MB à 30°C), nous avons décidé d'augmenter la durée de culture sur COH à 8 jours et la température d'incubation de 25 à 30°C (température optimale de croissance de MOLA 401^T). Ainsi, MOLA 401^T et ses plus proches parentes ont de nouveau été cultivées en MBmin pendant 8 jours à 30°C en triplicat sur paraffine, tristéarine, tripalmitine, acide palmitique, hexadécyl palmitate, monopalmitine, monolaurine et hexadécanol. Les biofilms ont été quantifiés après coloration au cristal violet. Dans ces nouvelles conditions, MOLA 401^T a formé un biofilm sur monolaurine, tripalmitine et acide palmitique, *Palleronia marisminoris* B33^T a formé un biofilm sur monolaurine, monopalmitine et acide palmitique, *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T sur monopalmitine et acide palmitique. Les autres souches n'ont pas montré de capacité à former un biofilm oléolytique ou, si les valeurs de quantification n'étaient pas nulles, elles étaient très faibles (< 0,5) laissant un doute sur les capacités des souches (figure VI-6). La quantité de biofilm produite par *Palleronia marisminoris* B33^T sur monolaurine a été particulièrement remarquable par rapport à celles sur les autres COH, ou à celles des autres souches sur l'ensemble des COH testés.

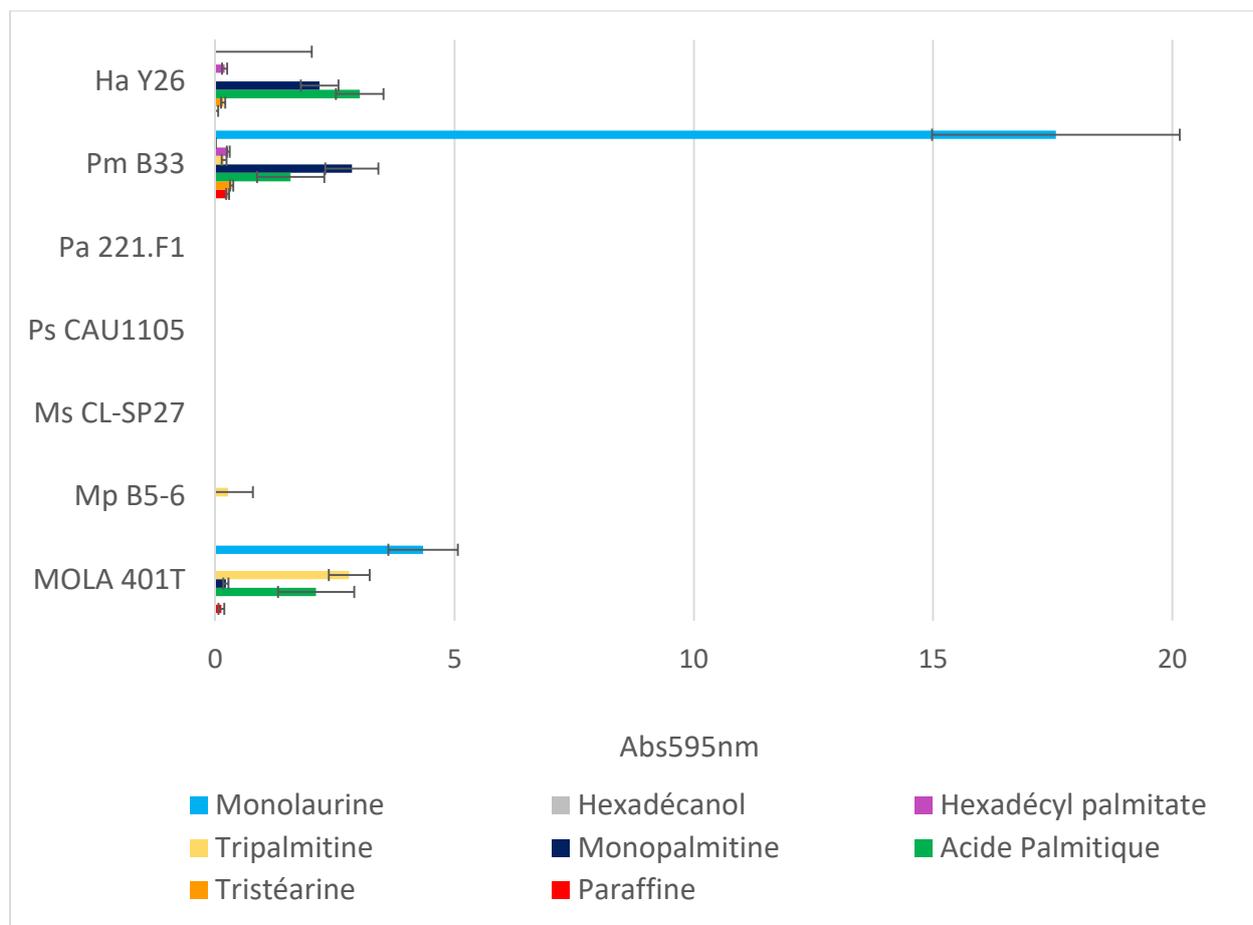


Figure VI-6 : Quantité de biofilm produite par MOLA 401^T et ses plus proches parentes sur paraffine, tristéarine, tripalmitine, acide palmitique, hexadécyl palmitate, monopalmitine, monolaurine et hexadécanol. Ha Y26 : *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T, Pm B33 : *Palleronia marismminoris* B33^T, Pa 221-F1 : *Palleronia abyssalis* 221-F1^T, Ps CAU1105 : *Palleronia soli* CAU1105^T, Ms CL-SP27 : *Maribius salinus* CL-SP27^T, Mp B5-6 : *Maribius pelagius* B5-6^T.

Contrairement au criblage visuel sur 4 jours d'incubation à 25°C, MOLA 401^T s'est révélée capable de former un biofilm sur acide palmitique. Ceci s'explique certainement par le changement des conditions expérimentales. En effet, cultiver la souche plus longtemps et à sa température optimale de croissance a pu favoriser ses capacités à former un biofilm sur ce COH.

Les surnageants de cultures sur COH ont été prélevés et la production d'AHLs a été testée. Aucune production d'AHLs n'a été détectée dans nos conditions.

4. Étude de la détection de la production *quorum-sensing* en fonction des conditions de culture

Les investigations menées sur la production d’AHLs par la souche MOLA 401^T et ses plus proches parentes nous ont permis de remarquer que la détection d’AHLs par les biosenseurs dans les surnageants de cultures pouvait être très dépendante des conditions de culture. En comparant les cinétiques de croissance et la production d’AHLs à longues chaînes par MOLA 401^T mise en culture dans différentes conditions, nous avons constaté des différences au niveau des capacités de croissance de la souche ainsi qu’au niveau de ses capacités à produire des AHLs. Le contenant et le milieu de culture influencent la croissance et la production d’AHLs (Figures VI-7 et VI-8). En effet cultivée en plaque 24 puits (1 mL de culture par puits), MOLA 401^T a atteint un maximum de DO à 600 nm de 0,30 et de 0,44 en MB et MBmin+GALP respectivement, alors qu’en Erlenmeyer (50 mL de culture par Erlenmeyer), les maxima mesurés ont été de 1,36 et 1,32 en MB et MBmin+GALP respectivement. De plus, la production d’AHLs a été impactée en MBmin+GALP où les niveaux d’AHLs détectés sont quasiment nuls par rapport au niveau constaté quand la souche a été cultivée en MB. La production d’AHLs en MB change si la souche est cultivée en Erlenmeyer ou en plaque 24 puits : la quantité de fluorescence mesurée par le biosenseur est moindre sur les surnageants de culture réalisée en plaque que celle réalisée en Erlenmeyer. Cette dernière différence semble néanmoins s’expliquer par les différences observées sur la croissance : étant donné que la croissance est amoindrie en plaque, le nombre de cellules serait donc moins important et la quantité d’AHLs produite serait donc plus faible. Par contre, les différences observées entre le MB (milieu riche) et le MBmin+GALP (milieu minimum supplémenté de glucose, acétate, pyruvate et lactate) est plus surprenant du fait que dans ces deux conditions, en Erlenmeyer, les niveaux de croissance sont relativement similaires.

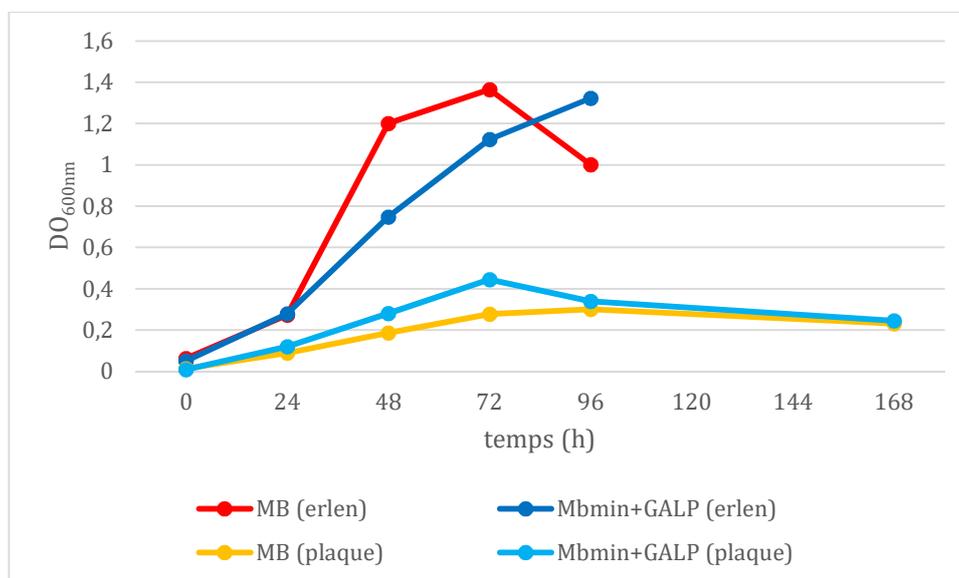


Figure VI-7 : Cinétique de croissance de MOLA 401^T cultivée en MB ou en MBmin+GALP dans un Erlenmeyer ou en plaque 24 puits.

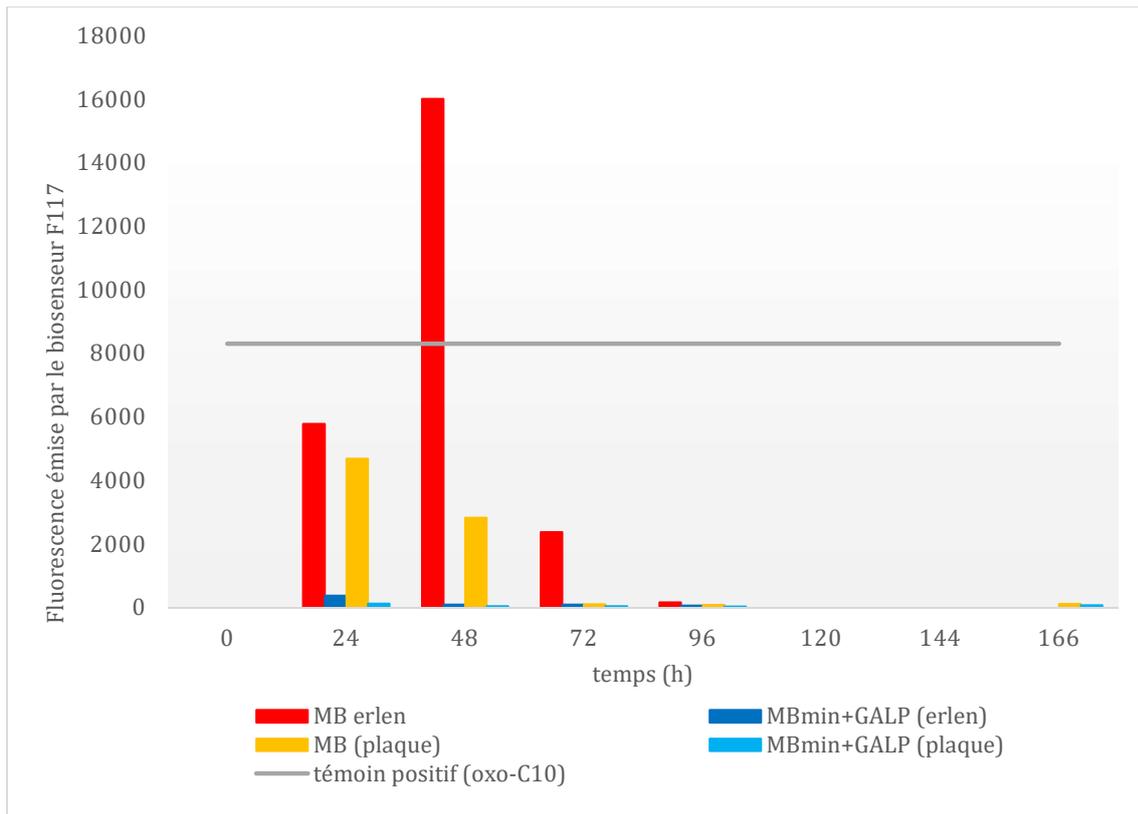


Figure VI-8 : Niveaux de fluorescence émis par *Pseudomonas putida* F117, biosenseur détectant les AHLs à longues chaînes, en présence des surnageants de MOLA 401^T cultivée en MB ou en MBmin+GALP dans un Erlenmeyer ou en plaque 24 puits.

5. Conclusion du chapitre

L'étude de MOLA 401^T nous a permis d'appréhender certaines limites liées à notre méthode de criblage. En effet, la capacité de formation d'un biofilm oléolytique par MOLA 401^T s'est montrée très sensible aux choix des conditions expérimentales : gamme de COH testée, température et temps d'incubation. De plus, nous avons pu constater que l'absence de détection de la production d'AHLs par nos souches pouvait être liée au milieu de culture et au contenant : dans les cultures sur COH en milieu minimum dans des plaques 24 puits ces deux conditions ont influencé négativement la production d'AHLs par MOLA 401^T.

Par ailleurs, la caractérisation taxonomique de MOLA 401^T conduit d'une part à proposer une nouvelle espèce appartenant au genre *Palleronia* (*Palleronia rufa*) et d'autre part, une réorganisation des genres *Palleronia*, *Maribius* et *Hwanghaeicola* aboutissant à une clarification de liens phylogénétiques au sein du groupe des *Roseobacter*.

Conclusion Générale

La dégradation des COH s'intègre dans le cycle biogéochimique du carbone en milieu marin. La dégradation des lipides, représentant une part majeure des COH, constituait jusqu'alors un sujet peu étudié, a contrario des hydrocarbures, qui, du fait de leur impact écologique et sociétal ont suscité un grand intérêt. Aucun lien n'avait jusqu'alors été établi entre les souches capables de dégrader les hydrocarbures et la dégradation des lipides en milieu marin. Notre étude a permis de d'approcher la diversité des souches capables de dégrader les COH en milieu marin via la formation d'un biofilm et nous avons entamé une caractérisation approfondie de la physiologie et de l'écologie des biofilms oléolytiques.

L'étude de la diversité des souches capables de former un biofilm oléolytique a été réalisée par un criblage d'une sélection de plus de 200 souches marines. **Une première estimation de la fréquence et de la diversité des biofilms oléolytiques en milieu marin a pu être établie.** Du fait de l'absence de marqueurs moléculaires, le recours à une méthode culturale était nécessaire pour ce criblage. Toutefois, la diversité des souches cultivées est bien moindre que celle observée par métagénomique et notre effort de criblage, bien que conséquent vis-à-vis des ressources nécessaires, est loin de couvrir toute la diversité de souches marines disponible en collection. Nous avons donc conscience que nos résultats ne correspondent qu'à une approche de la diversité des souches oléolytiques cultivables qui certainement sous-estime la diversité réelle. De plus, un criblage de cette ampleur réalisé dans un temps restreint nécessite une standardisation des conditions de culture utilisées (milieux minimums, source de carbone, température d'incubation, temps d'incubation). Au cours des expérimentations, nous avons constaté que le choix du milieu minimum, les COH utilisés comme seule source de carbone et le temps d'incubation influençaient les performances et la fréquence des souches formant un biofilm oléolytique. Il est donc probable que nos résultats sous-estiment l'abondance des souches capables de former un biofilm oléolytique.

La fréquence des souches positives sur paraffine a été estimée à 8,7 % et à 8,8 % sur tristéarine. La diversité des souches oléolytiques observée ne s'est pas limitée à la diversité des souches hydrocarbonoclastes mais s'est étendue à l'ensemble des principaux phyla rencontrés en milieu marin (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*) parmi lesquels les *Gammaproteobacteria* ont été particulièrement bien représentées. Nous avons néanmoins pu constater que des souches appartenant à des genres fréquemment observés dans les environnements pollués et généralement affiliés aux HCB étaient spécifiquement isolées après enrichissement des échantillonnages sur COH (HC ou lipides). Il aurait été intéressant de pouvoir analyser si un lien existe entre les habitats des souches et leur capacité à former un biofilm oléolytique. Cette étude n'a pas pu être menée du fait du manque de précision des informations fournies concernant les habitats des souches.

L'établissement de groupes phénotypiques à partir des données de criblage nous a permis de distinguer différents profils chez les souches positives. En effet, certaines souches ont été capables de former une quantité plus ou moins importante de biomasse sur la majorité des substrats (au moins 3 sur 4 dont la paraffine) alors que chez d'autres souches la formation d'un biofilm n'a été mesurable que sur les lipides. Les souches les plus performantes en termes de quantité de biomasse produite et d'étendue de la gamme de COH assimilée appartiennent aux groupes 1 et 2. Ce sont principalement des *Gammaproteobacteria* décrites dans la littérature comme hydrocarbonoclastes. Elles appartiennent aux genres *Thalassolituus*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Oleiphilus* (pour les *Gammaproteobacteria*) ainsi que *Ruegeria* et *Gordonia* (affiliées aux *Alphaproteobacteria* et aux *Actinobacteria* respectivement). Cela confirme que bien que les HCB ne sont pas les seules capables

de former un biofilm oléolytique, ces souches sont particulièrement bien adaptées à l'assimilation à la fois des hydrocarbures et des lipides via la formation d'un biofilm.

La classification des souches en 8 groupes phénotypiques a orienté le choix d'une sous sélection de souches au génome séquencé sur lesquelles des expérimentations visant à mieux caractériser les biofilms oléolytiques ont été menées.

La comparaison des quantités de biomasse formées par les souches oléolytiques sur une surface inerte hydrophobe (le polystyrène) ou sur une surface inerte hydrophile (le verre) était bien moindre que les celles obtenues sur COH. De plus, l'étude quantitative de l'adhésion sur COH et surfaces inertes réalisée par microscopie montre que l'adhésion (dans les conditions testées) n'est pas un facteur déterminant de la formation de biofilms sur ces mêmes surfaces. **Ces résultats suggèrent que la capacité des souches oléolytiques à former un biofilm est spécifique aux surfaces nutritives hydrophobes et que cette spécificité ne réside pas dans l'adhésion mais vraisemblablement dans les étapes plus tardives de développement du biofilm.**

Par ailleurs, l'étude de la gamme de substrat assimilable par des OHCB s'est étendue aux lipides, mais ces souches ont également été capables d'assimiler comme seule source de carbone d'autres substrats polymériques tels que l'amidon, le glycogène, la caséine ou la gélatine ainsi que de nombreux substrats hydrosolubles. Ces souches ont été particulièrement performantes pour la formation de biofilm oléolytique. En effet, avec les *Marinobacter*, elles ont formé les plus importantes quantités de biomasse sur paraffine et au moins 2 des lipides testés. **Les hydrocarbonoclastes obligatoires étudiées aux cours de thèse sont en fait des souches présentant des adaptations physiologiques à l'assimilation des hydrocarbures mais elles sont capables d'utiliser d'autres sources de carbone comme les lipides et les protéines.**

Dans les environnements naturels, en cas de pollution aux hydrocarbures, une explosion de l'abondance des souches jusqu'alors décrites comme hydrocarbonoclastes a été systématiquement observée alors qu'en dehors de ces épisodes de pollution leur présence n'est que très faiblement détectée. Ces souches pourraient ainsi dégrader préférentiellement les hydrocarbures et persistent dans l'environnement en assimilant les lipides, composant ubiquitaire et majoritaire de la matière organique particulaire, ainsi que d'autres composés polymériques du POC et leurs produits de dégradation.

Une corrélation positive a été observée entre la capacité des souches à former un biofilm sur paraffine (un ensemble d'alcanes) et la capacité à former un biofilm sur au moins un lipide. Ceci suggère un lien physiologique entre l'assimilation de ces deux familles de COH. Afin d'explorer la potentialité de ce lien, une mesure de l'activité lipase a été réalisée sur des cultures de souches oléolytiques poussant sur acétate, trioléine (un triglycéride) ou hexadécane (un hydrocarbure). L'activité lipase est essentielle à l'assimilation des triglycérides. Comme attendu, les cultures sur triglycéride ont toutes montré une surexpression de l'activité lipase par rapport aux cultures avec acétate. De façon plus surprenante, **les cultures sur hexadécane ont également montré une surexpression de l'activité lipase, renforçant l'idée d'un lien physiologique entre la dégradation des alcanes et la dégradation des lipides. Ce lien pourrait s'expliquer par le fait que les voies métaboliques d'assimilation des alcanes et des lipides aboutissent toutes deux à la formation d'un acyl-CoA pris en charge par la β -oxydation.** Si les souches capables de dégrader les alcanes sont également capables de dégrader les lipides, un lien évolutif pourrait être envisagé entre ces deux voies métaboliques. La similarité existant entre FadL (impliqué dans le transport des lipides dans la cellule)

et AupA (nouvellement décrite chez *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 comme impliquée dans l'assimilation des alcanes) pourrait soulever l'hypothèse d'un lien évolutif entre ces deux métabolismes. Des souches capables de dégrader les lipides auraient évolué et étendu leurs capacités de dégradation aux hydrocarbures, leur permettant d'investir des niches difficilement accessibles.

Enfin, une analyse bioinformatique portant sur la fidélité des COG aux groupes phénotypiques établis à la suite du criblage a été menée sur les souches pour lesquelles nous disposons du génome. **Un premier COG a éveillé notre attention : le COG 4281 auquel est assigné l'Acyl CoA binding protein (ACBP). En effet, ce groupe fonctionnel renforce un peu plus le lien physiologique entre la dégradation des alcanes et des lipides** suggéré ci-dessus. Des homologues de l'ACBP sont retrouvés dans les 4 règnes eucaryotes (*Animalia*, *Plantae*, *Fungi* et *Protista*), mais sont très peu représentés chez les procaryotes. Pourtant, des homologues de cette protéine sont codés dans les génomes des souches de *Marinobacter* et d'*Alcanivorax* des groupes 1, 2 et 3. L'ACBP est une protéine se liant avec une forte affinité aux esters d'acyl-CoA de C₁₂ à C₂₂. Elle serait entre autre impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires et notamment la régulation de la synthèse des acides gras, la synthèse de lipides complexes et le transfert des esters d'acyl-CoA à la β -oxydation [43,269]. Ainsi, de futures investigations sur des souches délétées pour le gène codant l'ACBP permettraient de déterminer si cette protéine est effectivement essentielle aux métabolismes des alcanes et des lipides. **Une seconde série de COG s'est démarquée : des COG impliqués dans la production de systèmes de sécrétion de type VI.** Ce type de système de sécrétion présente une structure proche des protéines des bactériophages permettant l'injection d'effecteurs dans des cellules procaryotes ou eucaryotes. Il est ainsi impliqué dans la colonisation et la manipulation de l'hôte et la compétition inter-bactérienne. Ces systèmes pourraient également être impliqués dans la formation de biofilm [30,115,212,238]. Ils sont exprimés chez 25 % des bactéries à Gram négatif et en particulier chez les *Proteobacteria*. Ces bactéries sont pour la plupart pathogènes, symbiotiques ou commensales. Certaines souches d'HCB ont été isolées associées au phytoplancton [94,99,101]. Cette association n'a rien d'étonnant puisque ces eucaryotes sont capables d'adsorber, d'accumuler et de synthétiser des hydrocarbures [100]. **Ainsi les systèmes de sécrétion de type VI pourraient apporter un avantage à ces bactéries dans la colonisation de leur hôte en leur permettant d'éliminer d'éventuels compétiteurs symbiotiques** [149,226]. Ces systèmes de sécrétion participeraient également chez certains symbiontes de plantes à des fonctions de bio-contrôle en protégeant leurs hôtes d'éventuels pathogènes [29]. Ceci pourrait également être envisagé dans l'interaction entre les HCB et les micro-algues.

Le biofilm est souvent perçu comme un environnement à part entière composé de plusieurs populations interagissant les unes avec les autres. La production de matrice extracellulaire permet la concentration de nombreuses molécules sécrétées par les bactéries constituant le biofilm. Ces molécules peuvent jouer le rôle de bien public et faire l'objet de compétition ou de coopération. Les signaux de communication intra- ou interspécifiques de *quorum-sensing* sont sécrétés dans le milieu et sont impliqués dans de nombreux comportements collectifs chez les bactéries. Ce type de communication peut être favorisé par le biofilm qui retient ces signaux et optimise donc leur effet. La formation d'un biofilm correspond à un comportement coordonné qui peut être régulé par *quorum sensing*. C'est pourquoi nous avons étudié l'éventualité que ce type de communication soit mis en jeu au sein des biofilms oléolytiques. Les premiers résultats obtenus semblent indiquer que le QS basé sur les AI-1 ou les AI-2 n'intervient pas spécifiquement au sein des biofilms oléolytiques. L'analyse des COG n'a pas révélé une fidélité particulière des COG 3916 et 1854 correspondant respectivement aux protéines de type LuxI (N-acyl homosérine lactone synthase) et aux protéines responsables de la synthèse de signaux QS de type 2 (LuxS). Nous avons néanmoins, en collaboration avec le Laboratoire

de Biodiversité et Biotechnologies Microbienne (LBBM) de Banyuls-sur-Mer, criblé la capacité à produire des signaux QS de type AI-1 ou AI-2 d'une sélection de 37 souches de la collection MOLA positives pour la formation de biofilm oléolytique. Ce criblage semble confirmer ce que l'analyse des génomes révélait : **aucun lien n'a pu être établi entre la capacité des souches à former un biofilm oléolytique et celle à produire des signaux quorum-sensing de type 1 ou 2 dans nos conditions expérimentales**. Cette étude n'a pas pu prendre en compte la détection d'autres molécules signal telles que les peptides ou les signaux de la famille CAI-1 (Cholera Autoinducer-1) ou DSF (Diffusible Signal Factor). En effet, il n'existe pas à ce jour de méthode fiable et rapide permettant, comme pour les signaux AI-1 et AI-2, de détecter et quantifier via l'utilisation de biosenseur la production de ces types de signaux. De plus, nos conditions expérimentales ainsi que la méthode utilisée ont pu influencer les résultats. En effet, les limites de sensibilité des biosenseurs pourraient expliquer l'absence de détection de signaux dans les surnageants. Une concentration des surnageants aurait peut-être pu permettre la détection de signaux QS. En outre, à notre connaissance, la détection de signaux QS via l'utilisation des biosenseurs de cette étude n'a jamais été démontrée en milieu minimum.

En dehors des interactions de type QS, la production d'exo-produit tels que des biosurfactants ou bioémulsifiants ainsi que des enzymes extracellulaires telles que les lipases permettent l'accès à un ensemble de biens publics pouvant générer synergie ou compétition entre les souches d'un même biofilm. De plus, la mise en évidence d'une fidélité des COG affiliés au système de sécrétion de type VI aux groupes phénotypiques de souches les plus performantes pour la formation de biofilms oléolytiques pourrait également indiquer la mise en jeu de comportements compétitifs pour la colonisation des COH. Une exploration préliminaire des potentiels comportements pouvant se jouer dans les biofilms mixtes a été menée sur 10 couples formés par 10 souches positives lors du criblage mélangées 2 à 2 en proportions égales. La comparaison des valeurs de biofilms mixtes et individuels nous a permis d'obtenir une première estimation des effets synergiques ou compétitifs observables dans un biofilm oléolytique.

Ainsi des comportements sociaux ont pu être mis en évidence dans 8 biofilms mixtes, trois étant des compétitions et cinq des synergies. Les définitions que nous avons établies pour ces comportements étaient particulièrement strictes, il est donc fort probable que de tels comportements soient plus fréquents. Néanmoins, la quantification de la biomasse totale des biofilms mixtes par coloration au cristal violet ne permet pas de déterminer la proportion relative des deux souches. Cette information qui pourrait être obtenue par qPCR, est indispensable pour caractériser les interactions interspécifiques qui se déroule au sein de ces biofilms. Un marquage, avec des gènes de protéine autofluorescente des souches impliquées dans un comportement social permettrait d'observer en microscopie l'architecture des biofilms mixtes et surtout de déterminer la distribution spatiale des deux souches. Il est également envisageable de suivre le développement de ces biofilms au cours du temps en cellule à flux pour observer la mise en place de ces comportements et leur conséquence sur l'architecture du biofilm mixte. Beaucoup reste à faire pour évaluer la mise en jeu de comportements sociaux dans les biofilms oléolytiques mais nos premières observations confortent l'importance de s'intéresser à cette question.

Enfin, l'étude et la caractérisation de la souche MOLA 401, négative lors du criblage sur paraffine, tristéarine, acide palmitique et hexadécyl palmitate a renforcé l'idée selon laquelle nous sous-estimons encore la fréquence des biofilms oléolytiques en milieu marin. En effet, en élargissant la gamme de COH testés pour la production de biofilm avec cette souche, nous avons constaté que celle-ci avait pourtant la capacité de former un biofilm sur monolaurine (un monoglycéride) et tripalmitine

(un triglycéride). La caractérisation de cette souche nous a permis de l'affilier au genre *Palleronia* et de **proposer la description d'une nouvelle espèce : *Palleronia rufa* dont MOLA 401^T est la souche type. Cette caractérisation a également été l'occasion de refonder le genre *Palleronia* en reclassant deux souches de *Maribius* (*M. pelagius* et *M. salinus*) ainsi que *Hwanghaeicola aestuarii* parmi les *Palleronia*. La souche MOLA 401, préalablement étudiée [67], se démarque par l'originalité de la gamme de signaux AHLs produits. Nous avons également testé si les capacités QS de cette souche pouvait être liées à ses capacités oléolytiques. De nouveau, la détection d'AHL n'a pas pu être observée dans nos conditions expérimentales et ceci nous a amené à comparer la production d'AHL de la souche MOLA 401 en milieu riche et en milieu minimum supplémenté en GALP. Les résultats obtenus semblent confirmer que la croissance en milieu minimum influencerait sur la capacité des souches à produire des signaux QS.**

En conclusion, les expérimentations menées dans ce travail de thèse ont apporté une meilleure connaissance de la biodiversité et de la fonctionnalité des biofilms oléolytiques en milieu marin. La fréquence de ces biofilms pourrait approcher les 10 % en milieu marin ce qui n'est pas négligeable, d'autant que nous avons certainement sous-estimé ce chiffre du fait d'une standardisation de notre méthode de criblage. De plus, il a pu être mis en évidence que la biodiversité au sein de ces biofilms était étendue à l'ensemble des principaux phyla marins. D'un point de vue fonctionnel, nos résultats suggèrent un lien physiologique entre la capacité des souches à assimiler un alcane et un lipide. Cette hypothèse a été renforcée par l'analyse bioinformatique des COG spécifiquement associés aux souches oléolytiques. De plus l'écologie des biofilms oléolytiques a pu être explorée par une étude préliminaire des comportements sociaux se jouant au sein de ces biofilms.

Références bibliographiques

- [1] Abbasnezhad, H., Gray, M., Foght, J.M. (2011) Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92(4), 653–75, Doi: 10.1007/s00253-011-3589-4.
- [2] Akkanen, J., Tuikka, A., Kukkonen, J.V.K. (2012) On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 78, 91–8, Doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.11.010.
- [3] Albuquerque, L., França, L., Taborda, M., La Cono, V., Yakimov, M., da Costa, M.S. (2015) *Palleronia abyssalis* sp. nov., isolated from the deep Mediterranean Sea and the emended description of the genus *Palleronia* and of the species *Palleronia marisminoris*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107(2), 633–42, Doi: 10.1007/s10482-014-0358-2.
- [4] Allen, B., Gore, J., Nowak, M.A. (2013) Spatial dilemmas of diffusible public goods. *ELife* 2, e01169, Doi: 10.7554/eLife.01169.
- [5] Allison, S.D. (2005) Cheaters, diffusion and nutrients constrain decomposition by microbial enzymes in spatially structured environments: Constraints on enzymatic decomposition. *Ecol. Lett.* 8(6), 626–35, Doi: 10.1111/j.1461-0248.2005.00756.x.
- [6] Allison, S.D., Lu, L., Kent, A.G., Martiny, A.C. (2014) Extracellular enzyme production and cheating in *Pseudomonas fluorescens* depend on diffusion rates. *Front. Microbiol.* 5, Doi: 10.3389/fmicb.2014.00169.
- [7] Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M. (2000) Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(8), 3262–8.
- [8] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3), 403–10, Doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [9] Alvarez, H.M., Steinbüchel, A. (2002) Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60(4), 367–76, Doi: 10.1007/s00253-002-1135-0.
- [10] Andersen, J.B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B.B., Molin, S., Givskov, M. (2001) gfp-Based N-Acyl Homoserine-Lactone Sensor Systems for Detection of Bacterial Communication. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(2), 575–85, Doi: 10.1128/AEM.67.2.575-585.2001.
- [11] Arnosti, C., Bell, C., Moorhead, D.L., Sinsabaugh, R.L., Steen, A.D., Stromberger, M., Wallenstein, M., Weintraub, M.N. (2014) Extracellular enzymes in terrestrial, freshwater, and marine environments: perspectives on system variability and common research needs. *Biogeochemistry* 117(1), 5–21, Doi: 10.1007/s10533-013-9906-5.
- [12] Asfahl, K.L., Schuster, M. (2017) Social interactions in bacterial cell-cell signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 41(1), 92–107, Doi: 10.1093/femsre/fuw038.
- [13] Athenstaedt, K., Daum, G. (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(12), 1355–69, Doi: 10.1007/s00018-006-6016-8.

- [14] Azam, F., Long, R.A. (2001) Oceanography: Sea snow microcosms. *Nature* 414(6863), 495–8, Doi: 10.1038/35107174.
- [15] Azam, F., Malfatti, F. (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(10), 782–91, Doi: 10.1038/nrmicro1747.
- [16] Baldi, F., Ivošević, N., Minacci, A., Pepi, M., Fani, R., Svetličić, V., Žutić, V. (1999) Adhesion of *Acinetobacter venetianus* to Diesel Fuel Droplets Studied with In Situ Electrochemical and Molecular Probes. *Appl Env. Microbiol* 65(5), 2041–8.
- [17] Baldi, F., Pepi, M., Capone, A., della Giovampaola, C., Milanese, C., Fani, R., Focarelli, R. (2003) Envelope glycosylation determined by lectins in microscopy sections of *Acinetobacter venetianus* induced by diesel fuel. *Res. Microbiol.* 154(6), 417–24, Doi: 10.1016/S0923-2508(03)00128-1.
- [18] Baptist, J.N., Gholson, R.K., Coon, M.J. (1963) Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system: I. Products of octane oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 69, 40–7, Doi: 10.1016/0006-3002(63)91223-X.
- [19] Bassler, B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum-sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2(6), 582–587.
- [20] Baty, A.M., Eastburn, C.C., Diwu, Z., Techkarnjanaruk, S., Goodman, A.E., Geesey, G.G. (2000) Differentiation of Chitinase-Active and Non-Chitinase-Active Subpopulations of a Marine Bacterium during Chitin Degradation. *Appl Env. Microbiol* 66(8), 3566–73, Doi: 10.1128/AEM.66.8.3566-3573.2000.
- [21] Beier, S., Bertilsson, S. (2013) Bacterial chitin degradation—mechanisms and ecophysiological strategies. *Front. Microbiol.* 4, Doi: 10.3389/fmicb.2013.00149.
- [22] van Beilen, J.B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R., Witholt, B. (1992) DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol. Microbiol.* 6(21), 3121–3136.
- [23] van Beilen, J.B., Funhoff, E.G. (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1), 13–21, Doi: 10.1007/s00253-006-0748-0.
- [24] van Beilen, J.B., Funhoff, E.G., van Loon, A., Just, A., Kaysser, L., Bouza, M., Holtackers, R., Röthlisberger, M., Li, Z., Witholt, B. (2006) Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1), 59–65, Doi: 10.1128/AEM.72.1.59-65.2006.
- [25] van Beilen, J.B., Kingma, J., Witholt, B. (1994) Substrate specificity of the alkane hydroxylase system of *Pseudomonas oleovorans* GPo1. *Enzyme Microb. Technol.* 16(10), 904–11, Doi: 10.1016/0141-0229(94)90066-3.
- [26] van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* 147(6), 1621–1630.

- [27] van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M., Witholt, B. (2001) Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* 147(6), 1621–1630.
- [28] Benner, R., Amon, R.M.W. (2015) The Size-Reactivity Continuum of Major Bioelements in the Ocean. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7(1), 185–205, Doi: 10.1146/annurev-marine-010213-135126.
- [29] Bernal, P., Allsopp, L.P., Filloux, A., Llamas, M.A. (2017) The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *ISME J.* 11(4), 972–87, Doi: 10.1038/ismej.2016.169.
- [30] Bernal, P., Llamas, M.A., Filloux, A. (2018) Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. *Environ. Microbiol.* 20(1), 1–15, Doi: 10.1111/1462-2920.13956.
- [31] Bhardwaj, A.K., Vinothkumar, K., Rajpara, N. (2013) Bacterial quorum-sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.* 8(1), 68–83.
- [32] Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37(8), 911–7, Doi: 10.1139/o59-099.
- [33] Bonin, P., Vieira, C., Grimaud, R., Militon, C., Cuny, P., Lima, O., Guasco, S., Brussaard, C.P.D., Michotey, V. (2015) Substrates specialization in lipid compounds and hydrocarbons of *Marinobacter* genus. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(20), 15347–59, Doi: 10.1007/s11356-014-4009-y.
- [34] Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.-P. (1997) An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. *Microbiology* 143(4), 1087–93, Doi: 10.1099/00221287-143-4-1087.
- [35] Bouchez-Naïtali, M., Blanchet, D., Bardin, V., Vandecasteele, J.-P. (2001) Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology* 147(9), 2537–2543.
- [36] Bourguet, N., Goutx, M., Ghiglione, J.-F., Pujo-Pay, M., Mével, G., Momzikoff, A., Mousseau, L., Guigue, C., Garcia, N., Raimbault, P., Pete, R., Oriol, L., Lefèvre, D. (2009) Lipid biomarkers and bacterial lipase activities as indicators of organic matter and bacterial dynamics in contrasted regimes at the DYFAMED site, NW Mediterranean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56(18), 1454–69, Doi: 10.1016/j.dsr2.2008.11.034.
- [37] Boyd, C.D., O’Toole, G.A. (2012) Second Messenger Regulation of Biofilm Formation: Breakthroughs in Understanding c-di-GMP Effector Systems. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28(1), 439–62, Doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155705.
- [38] Boyer, M., Wisniewski-Dyć, F. (2009) Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum: Cell–cell signalling in bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 70(1), 1–19, Doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00745.x.
- [39] Brint, J.M., Ohman, D.E. (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* 177(24), 7155–7163.
- [40] Bruger, E., Waters, C. (2015) Sharing the sandbox: Evolutionary mechanisms that maintain bacterial cooperation. *F1000Research*, Doi: 10.12688/f1000research.7363.1.

- [41] Buchan, A., Collier, L.S., Neidle, E.L., Moran, M.A. (2000) Key aromatic-ring-cleaving enzyme, protocatechuate 3, 4-dioxygenase, in the ecologically important marine *Roseobacter* lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11), 4662–4672.
- [42] Buchan, A., Gonzalez, J.M., Moran, M.A. (2005) Overview of the Marine *Roseobacter* Lineage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10), 5665–77, Doi: 10.1128/AEM.71.10.5665-5677.2005.
- [43] Burton, M., Rose, T.M., Færgeman, N.J., Knudsen, J. (2005) Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). *Biochem. J.* 392(2), 299–307, Doi: 10.1042/BJ20050664.
- [44] Cáceres, M.D., Legendre, P. (2009) Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* 90(12), 3566–74, Doi: 10.1890/08-1823.1.
- [45] Camilli, A., Bassler, B.L. (2006) Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science* 311(5764), 1113–6, Doi: 10.1126/science.1121357.
- [46] Castresana, J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17(4), 540–52, Doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334.
- [47] Chagnot, C., Zorgani, M.A., Astruc, T., Desvaux, M. (2013) Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front. Microbiol.* 4, Doi: 10.3389/fmicb.2013.00303.
- [48] Chakrabarty, A.M., Chou, G., Gunsalus, I.C. (1973) Genetic Regulation of Octane Dissimilation Plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70(4), 1137–40, Doi: 10.1073/pnas.70.4.1137.
- [49] Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., Li, X., Chen, F., Gao, Y., Chen, X., Yu, Z., Li, X. (2013) Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum-sensing-Dependent Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 14(9), 17477–500, Doi: 10.3390/ijms140917477.
- [50] Choi, D.H., Cho, J.-C., Lanoil, B.D., Giovannoni, S.J., Cho, B.C. (2007) *Maribius salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a solar saltern and *Maribius pelagius* sp. nov., cultured from the Sargasso Sea, belonging to the *Roseobacter* clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(2), 270–5, Doi: 10.1099/ijs.0.64552-0.
- [51] Chua, S.L., Hultqvist, L.D., Yuan, M., Rybtke, M., Nielsen, T.E., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Yang, L. (2015) In vitro and in vivo generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm–dispersed cells via c-di-GMP manipulation. *Nat. Protoc.* 10(8), 1165–80, Doi: 10.1038/nprot.2015.067.
- [52] Churchill, P.F., Dudley, R.J., Churchill, S.A. (1995) Surfactant-enhanced bioremediation. *Waste Manag.* 15(5), 371–7, Doi: 10.1016/0956-053X(95)00038-2.
- [53] Conan, P., Joux, F., Torrétou, J., Pujou-Pay, M., Douki, T., Rochelle-Newall, E., Mari, X. (2008) Effect of solar ultraviolet radiation on bacterio- and phytoplankton activity in a large coral reef lagoon (southwest New Caledonia). *Aquat. Microb. Ecol.* 52, 83–98, Doi: 10.3354/ame01204.
- [54] Confer, D.R., Logan, B.E. (1998) A conceptual model describing macromolecule degradation by suspended cultures and biofilms. *Water Sci. Technol.* 37(4), 231–4, Doi: 10.1016/S0273-1223(98)00112-7.

- [55] Cornelissen, S., Julsing, M.K., Volmer, J., Riechert, O., Schmid, A., Bühler, B. (2013) Whole-cell-based CYP153A6-catalyzed (S)-limonene hydroxylation efficiency depends on host background and profits from monoterpene uptake via AlkL. *Biotechnol. Bioeng.* 110(5), 1282–92, Doi: 10.1002/bit.24801.
- [56] Cornforth, D.M., Foster, K.R. (2013) Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11(4), 285–93, Doi: 10.1038/nrmicro2977.
- [57] Costerton, J.W. (1995) Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15(3), 137–140.
- [58] Czárán, T., Hoekstra, R.F. (2009) Microbial Communication, Cooperation and Cheating: Quorum-sensing Drives the Evolution of Cooperation in Bacteria. *PLoS ONE* 4(8), e6655, Doi: 10.1371/journal.pone.0006655.
- [59] Dang, H., Lovell, C.R. (2016) Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80(1), 91–138, Doi: 10.1128/MMBR.00037-15.
- [60] Dang, H., Lovell, C.R. (2002) Numerical Dominance and Phylotype Diversity of Marine *Rhodobacter* Species during Early Colonization of Submerged Surfaces in Coastal Marine Waters as Determined by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis and Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl Env. Microbiol* 68(2), 496–504, Doi: 10.1128/AEM.68.2.496-504.2002.
- [61] Darch, S.E., West, S.A., Winzer, K., Diggle, S.P. (2012) Density-dependent fitness benefits in quorum-sensing bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(21), 8259–63, Doi: 10.1073/pnas.1118131109.
- [62] Davey, M.E., O’toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4), 847–867.
- [63] De La Rocha, C.L., Passow, U. (2014) The Biological Pump. *Treatise on Geochemistry*, Elsevier, pp. 93–122.
- [64] Decho, A.W., Gutierrez, T. (2017) Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) in Ocean Systems. *Front. Microbiol.* 8, 922, Doi: 10.3389/fmicb.2017.00922.
- [65] Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., Fani, R. (1997) Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res. Microbiol.* 148(3), 237–49, Doi: 10.1016/S0923-2508(97)85244-8.
- [66] DiRusso, C. oncett. C., Black, P. au. N., Weimar, J. ame. D. (1999) Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. *Prog. Lipid Res.* 38(2), 129–97, Doi: 10.1016/S0163-7827(98)00022-8.
- [67] Doberva, M., Stien, D., Sorres, J., Hue, N., Sanchez-Ferandin, S., Eparvier, V., Ferandin, Y., Lebaron, P., Lami, R. (2017) Large Diversity and Original Structures of Acyl-Homoserine Lactones in Strain MOLA 401, a Marine *Rhodobacteraceae* Bacterium. *Front. Microbiol.* 8, Doi: 10.3389/fmicb.2017.01152.
- [68] Drescher, K., Nadell, C.D., Stone, H.A., Wingreen, N.S., Bassler, B.L. (2014) Solutions to the public goods dilemma in bacterial biofilms. *Curr. Biol.* CB 24(1), 50–5, Doi: 10.1016/j.cub.2013.10.030.

- [69] Du, J., Mehler, W.T., Lydy, M.J., You, J. (2012) Toxicity of sediment-associated unresolved complex mixture and its impact on bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Hazard. Mater.* 203–204, 169–75, Doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.11.099.
- [70] Dufrière, M., Legendre, P. (1997) Species Assemblages and Indicator Species: the Need for a Flexible Asymmetrical Approach. *Ecol. Monogr.* 67(3), 345–66, Doi: 10.1890/0012-9615(1997)067[0345:SAIST]2.0.CO;2.
- [71] Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32(5), 1792–7, Doi: 10.1093/nar/gkh340.
- [72] Eggink, G., Engel, H., Meijer, W.G., Otten, J., Kingma, J., Witholt, B. (1988) Alkane utilization in *Pseudomonas oleovorans*. Structure and function of the regulatory locus alkR. *J. Biol. Chem.* 263(26), 13400–5.
- [73] Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P., Witholt, B. (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J. Mol. Biol.* 212(1), 135–42, Doi: 10.1016/0022-2836(90)90310-I.
- [74] Eggink, G., Lageveen, R.G., Altenburg, B., Witholt, B. (1987) Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262(36), 17712–8.
- [75] Elifantz, H., Horn, G., Ayon, M., Cohen, Y., Minz, D. (2013) *Rhodobacteraceae* are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85(2), 348–57, Doi: 10.1111/1574-6941.12122.
- [76] Ennouri, H. (2016) Recherche des gènes impliqués dans l'assimilation des composés organiques hydrophobes chez la bactérie marine *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. 2016.
- [77] Entcheva-Dimitrov, P., Spormann, A.M. (2004) Dynamics and Control of Biofilms of the Oligotrophic Bacterium *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 186(24), 8254–66, Doi: 10.1128/JB.186.24.8254-8266.2004.
- [78] Erken, M., Lutz, C., McDougald, D. (2015) Interactions of *Vibrio* spp. with Zooplankton. *Microbiol. Spectr.* 3(3), Doi: 10.1128/microbiolspec.VE-0003-2014.
- [79] Everuss, K.J., Delpin, M.W., Goodman, A.E. (2008) Cooperative interactions within a marine bacterial dual species biofilm growing on a natural biodegradable substratum. *Aquat. Microb. Ecol.* 53(2), 191–9, Doi: 10.3354/ame01235.
- [80] Federle, M.J., Bassler, B.L. (2003) Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 112(9), 1291–9, Doi: 10.1172/JCI20195.
- [81] Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P. (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281(5374), 237–40, Doi: 10.1126/science.281.5374.237.
- [82] 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), 563–75, Doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.

- [83] Folsø, H.J., Allison, S.D. (2012) Cooperation, Competition, and Coalitions in Enzyme-Producing Microbes: Social Evolution and Nutrient Depolymerization Rates. *Front. Microbiol.* 3, Doi: 10.3389/fmicb.2012.00338.
- [84] Franzetti, A., Bestetti, G., Caredda, P., La Colla, P., Tamburini, E. (2008) Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63(2), 238–48, Doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00406.x.
- [85] Fuqua, C., Greenberg, E.P. (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling: Signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(9), 685–95, Doi: 10.1038/nrm907.
- [86] Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., Koonin, E.V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 203(1), 11–21, Doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10814.x.
- [87] Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., Bertrand, J.-C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42(4), 568–576.
- [88] Ghoul, M., Mitri, S. (2016) The Ecology and Evolution of Microbial Competition. *Trends Microbiol.* 24(10), 833–45, Doi: 10.1016/j.tim.2016.06.011.
- [89] Goutx, M., Acquaviva, M., Bertrand, J.-C. (1990) Cellular and extracellular carbohydrates and lipids from marine bacteria during growth on soluble substrates and hydrocarbons. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61, 291–6, Doi: 10.3354/meps061291.
- [90] Goutx, M., Saliot, A. (1980) Relationship between dissolved and particulate fatty acids and hydrocarbons, chlorophyll a and zooplankton biomass in Villefranche Bay, Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 8(4), 299–318, Doi: 10.1016/0304-4203(80)90019-5.
- [91] Goutx, M.M. (1988) Particulate lipid survey in the Bedford Basin (Nova Scotia) using thin-layer chromatography with flame ionization detection. Comparison of hydrocarbons data with gas chromatography analyses. *Mar. Environ. Res.* 26(2), 83–95, Doi: 10.1016/0141-1136(88)90020-7.
- [92] Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y., Faure, D. (2016) Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 40(1), 86–116, Doi: 10.1093/femsre/fuv038.
- [93] Grant, C., Deszcz, D., Wei, Y.-C., Martínez-Torres, R.J., Morris, P., Folliard, T., Sreenivasan, R., Ward, J., Dalby, P., Woodley, J.M., Baganz, F. (2015) Identification and use of an alkane transporter plug-in for applications in biocatalysis and whole-cell biosensing of alkanes. *Sci. Rep.* 4(1), Doi: 10.1038/srep05844.
- [94] Green, D.H., Bowman, J.P., Smith, E.A., Gutierrez, T., Bolch, C.J.S. (2006) *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56(Pt 3), 523–7, Doi: 10.1099/ijs.0.63447-0.
- [95] Grimaud, R. (2010) Biofilm Development at Interfaces between Hydrophobic Organic Compounds and Water. In: Timmis, K.N., (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1491–9.

- [96] Grondin, J.M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D.W., Brumer, H. (2017) Polysaccharide Utilization Loci: Fueling Microbial Communities. *J. Bacteriol.* 199(15), e00860-16, Doi: 10.1128/JB.00860-16.
- [97] Grossart, H.-P., Schlingloff, A., Bernhard, M., Simon, M., Brinkhoff, T. (2004) Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47(3), 387–96, Doi: 10.1016/S0168-6496(03)00305-2.
- [98] Guilhen, C., Forestier, C., Balestrino, D. (2017) Biofilm dispersal: multiple elaborate strategies for dissemination of bacteria with unique properties: Biofilm dispersal: multiple strategies to disseminate. *Mol. Microbiol.* 105(2), 188–210, Doi: 10.1111/mmi.13698.
- [99] Gutierrez, T. (2017) Cultivating Aerobic Hydrocarbon-Degrading Bacteria from Micro-algae. In: McGenity, T.J., Timmis, K.N., Nogales, B., (Eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Isolation and Cultivation*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 95–106.
- [100] Gutierrez, T. (2017) Aerobic Hydrocarbon-Degrading *Gammaproteobacteria: Porticoccus*. In: McGenity, T.J., (Ed.), *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*, Springer International Publishing, Cham, pp. 1–9.
- [101] Gutierrez, T., Rhodes, G., Mishamandani, S., Berry, D., Whitman, W.B., Nichols, P.D., Semple, K.T., Aitken, M.D. (2014) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation of Phytoplankton-Associated *Arenibacter* spp. and Description of *Arenibacter algicola* sp. nov., an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium. *Appl. Env. Microbiol.* 80(2), 618–28, Doi: 10.1128/AEM.03104-13.
- [102] Gutierrez, T., Singleton, D.R., Berry, D., Yang, T., Aitken, M.D., Teske, A. (2013) Hydrocarbon-degrading bacteria enriched by the Deepwater Horizon oil spill identified by cultivation and DNA-SIP. *ISME J.* 7(11), 2091–104, Doi: 10.1038/ismej.2013.98.
- [103] Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2002) Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(3), 228–33, Doi: 10.1016/S0958-1669(02)00318-X.
- [104] Harayama, S., Kasai, Y., Hara, A. (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(3), 205–14, Doi: 10.1016/j.copbio.2004.04.002.
- [105] Harms, H., Smith, K.E.C., Wick, L.Y. (2010) Microorganism-Hydrophobic Compound Interactions. In: Timmis, K.N., (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1479–90.
- [106] Harms, H., Smith, K.E.C., Wick, L.Y. (2018) Problems of Hydrophobicity/Bioavailability: An Introduction. In: Krell, T., (Ed.), *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions*, Springer International Publishing, Cham, pp. 3–15.
- [107] Harms, H., Wick, L.Y. (2004) Mobilisation of Organic Compounds and Iron by Microorganisms. *Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces*, Wiley-Blackwell, pp. 401–44.
- [108] Hawver, L.A., Jung, S.A., Ng, W.-L. (2016) Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 40(5), 738–52, Doi: 10.1093/femsre/fuw014.

- [109] Hazen, T.C., Dubinsky, E.A., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Piceno, Y.M., Singh, N., Jansson, J.K., Probst, A., Borglin, S.E., Fortney, J.L., Stringfellow, W.T., Bill, M., Conrad, M.E., Tom, L.M., Chavarria, K.L., Alusi, T.R., Lamendella, R., Joyner, D.C., Spier, C., Baelum, J., Auer, M., Zemla, M.L., Chakraborty, R., Sonnenthal, E.L., D'haeseleer, P., Holman, H.-Y.N., Osman, S., Lu, Z., Van Nostrand, J.D., Deng, Y., Zhou, J., Mason, O.U. (2010) Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria. *Science* 330(6001), 204–8, Doi: 10.1126/science.1195979.
- [110] Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F.M. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(3), 173–82, Doi: 10.1038/nrmicro1348.
- [111] Heilmann, S., Krishna, S., Kerr, B. (2015) Why do bacteria regulate public goods by quorum-sensing?—How the shapes of cost and benefit functions determine the form of optimal regulation. *Front. Microbiol.* 6, Doi: 10.3389/fmicb.2015.00767.
- [112] Helman, Y., Chernin, L. (2015) Silencing the mob: disrupting quorum-sensing as a means to fight plant disease. *Mol. Plant Pathol.* 16(3), 316–29, Doi: 10.1111/mpp.12180.
- [113] Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., Peterson, S.B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(1), 15–25, Doi: 10.1038/nrmicro2259.
- [114] Hmelo, L.R., Mincer, T.J., Van Mooy, B.A.S. (2011) Possible influence of bacterial quorum-sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments: Quorum-sensing on sinking particles. *Environ. Microbiol. Rep.* 3(6), 682–8, Doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00281.x.
- [115] Ho, B.T., Dong, T.G., Mekalanos, J.J. (2014) A view to a kill: the bacterial type 6 secretion system. *Cell Host Microbe* 15(1), 9–21, Doi: 10.1016/j.chom.2013.11.008.
- [116] Hong, H., Patel, D.R., Tamm, L.K., van den Berg, B. (2006) The Outer Membrane Protein OmpW Forms an Eight-stranded β -Barrel with a Hydrophobic Channel. *J. Biol. Chem.* 281(11), 7568–77, Doi: 10.1074/jbc.M512365200.
- [117] Jatt, A.N., Tang, K., Liu, J., Zhang, Z., Zhang, X.-H. (2015) Quorum-sensing in marine snow and its possible influence on production of extracellular hydrolytic enzymes in marine snow bacterium *Pantoea ananatis* B9. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91(2), 1–13, Doi: 10.1093/femsec/fiu030.
- [118] Jenal, U., Reinders, A., Lori, C. (2017) Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(5), 271–84, Doi: 10.1038/nrmicro.2016.190.
- [119] Jimenez-Diaz, L., Caballero, A., Segura, A. (2017) Pathways for the Degradation of Fatty Acids in Bacteria. In: Rojo, F., (Ed.), *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, Springer International Publishing, Cham, pp. 1–23.
- [120] Johnsen, A.R., Karlson, U. (2004) Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63(4), 452–9, Doi: 10.1007/s00253-003-1265-z.
- [121] Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H. (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133(1), 71–84, Doi: 10.1016/j.envpol.2004.04.015.

- [122] Jones, P.R., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., Dexter, S.C. (2007) Bacterial Community Structure of Biofilms on Artificial Surfaces in an Estuary. *Microb. Ecol.* 53(1), 153–62, Doi: 10.1007/s00248-006-9154-5.
- [123] Joye, S., Kleindienst, S., Peña-Montenegro, T.D. (2018) SnapShot: Microbial Hydrocarbon Bioremediation. *Cell* 172(6), 1336-1336.e1, Doi: 10.1016/j.cell.2018.02.059.
- [124] Joye, S.B., Kleindienst, S., Gilbert, J.A., Handley, K.M., Weisenhorn, P., Overholt, W.A., Kostka, J.E. (2016) Responses of Microbial Communities to Hydrocarbon Exposures. *Oceanography* 29(3), 136–49.
- [125] Julsing, M.K., Schrewe, M., Cornelissen, S., Hermann, I., Schmid, A., Bühler, B. (2012) Outer Membrane Protein AlkL Boosts Biocatalytic Oxyfunctionalization of Hydrophobic Substrates in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(16), 5724–33, Doi: 10.1128/AEM.00949-12.
- [126] Kepkay, P.E. (2000) Colloids and the Ocean Carbon Cycle. In: Wangersky, P.J., (Ed.), *Marine Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 35–56.
- [127] Kim, J.-H., Kim, W., Lee, J.-S., Kim, Y., Lee, K.C. (2015) *Palleronia soli* sp. nov., isolated from a soil sample on reclaimed tidal land, and emended description of the genus *Palleronia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(8), 2516–21, Doi: 10.1099/ijs.0.000297.
- [128] Kim, J.M., Jung, J.Y., Chae, H.B., Park, W., Jeon, C.O. (2010) *Hwanghaeicola aestuarii* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a tidal flat of the Yellow Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(12), 2877–81, Doi: 10.1099/ijs.0.021048-0.
- [129] Kjørboe, T. (2001) Formation and fate of marine snow: small-scale processes with large-scale implications. *Sci. Mar.* 65(S2), 57–71, Doi: 10.3989/scimar.2001.65s257.
- [130] Klein, B., Grossi, V., Bouriat, P., Goulas, P., Grimaud, R. (2008) Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane–water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Res. Microbiol.* 159(2), 137–44, Doi: 10.1016/j.resmic.2007.11.013.
- [131] Kleindienst, S., Joye, S.B. (2017) Global Aerobic Degradation of Hydrocarbons in Aquatic Systems. In: Rojo, F., (Ed.), *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, Springer International Publishing, Cham, pp. 1–18.
- [132] Kok, M., Oldenhuis, R., van der Linden, M.P.G., Meulenbergh, C.H.C., Kingma, J., Witholt, B. (1989) The *Pseudomonas oleovorans* alkBAC Operon Encodes Two Structurally Related Rubredoxins and an Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264(10), 5442–51.
- [133] Konstantinidis, K.T., Tiedje, J.M. (2005) Towards a Genome-Based Taxonomy for Prokaryotes. *J. Bacteriol.* 187(18), 6258–64, Doi: 10.1128/JB.187.18.6258-6264.2005.
- [134] Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. (2017) Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(12), 740–55, Doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.
- [135] Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J. (2013) Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3(4), a010306–a010306, Doi: 10.1101/cshperspect.a010306.

- [136] Köster, W., Leeuwen. (2018) Physicochemical kinetics and transport at the biointerface: setting the stage. *Physicochem. Kinet. Transp. Biointerfaces*.
- [137] Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T.C., Huettel, M. (2011) Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(22), 7962–74, Doi: 10.1128/AEM.05402-11.
- [138] Kragh, K.N., Hutchison, J.B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A.E.L., Irie, Y., Jensen, P.Ø., Diggle, S.P., Allen, R.J., Gordon, V., Bjarnsholt, T. (2016) Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *MBio* 7(2), Doi: 10.1128/mBio.00237-16.
- [139] Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O’neill, J.J., Devine, T.E. (1988) Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 38(4), 358–361.
- [140] Lai, P.Y., Miao, L., Lee, O.O., Liu, L.-L., Zhou, X.-J., Xu, Y., Al-Suwailem, A., Qian, P.-Y. (2013) *Profundibacterium mesophilum* gen. nov., sp. nov., a novel member in the family *Rhodobacteraceae* isolated from deep-sea sediment in the Red Sea, Saudi Arabia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(Pt 3), 1007–12, Doi: 10.1099/ijss.0.041525-0.
- [141] Lanfranconi, M.P., Alvarez, H.M., Studdert, C.A. (2003) A strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane. *Environ. Microbiol.* 5(10), 1002–8.
- [142] Lauro, F.M., McDougald, D., Thomas, T., Williams, T.J., Egan, S., Rice, S., DeMaere, M.Z., Ting, L., Ertan, H., Johnson, J. (2009) The genomic basis of trophic strategy in marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, pnas–0903507106.
- [143] Lee, C., Wakeham, S., Arnosti, C. (2004) Particulate Organic Matter in the Sea: The Composition Conundrum. *AMBIO J. Hum. Environ.* 33(8), 565–75, Doi: 10.1579/0044-7447-33.8.565.
- [144] Lee, M.-H., Lee, C.-H., Oh, T.-K., Song, J.K., Yoon, J.-H. (2006) Isolation and Characterization of a Novel Lipase from a Metagenomic Library of Tidal Flat Sediments: Evidence for a New Family of Bacterial Lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(11), 7406–9, Doi: 10.1128/AEM.01157-06.
- [145] Lee, R.F., Loeblich, A.R. (1971) Distribution of 21:6 hydrocarbon and its relationship to 22:6 fatty acid in algae. *Phytochemistry* 10(3), 593–602, Doi: 10.1016/S0031-9422(00)94703-4.
- [146] Lee, R.F., Nevenzel, J.C., Paffenhöfer, G.A. (1970) Wax esters in marine copepods. *Science* 167(3924), 1510–1, Doi: 10.1126/science.167.3924.1510.
- [147] Lee, S.D. (2018) *Maribius pontilimi* sp. nov., isolated from a tidal mudflat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(1), 353–7, Doi: 10.1099/ijsem.0.002512.
- [148] Li, H., Martin, F.L., Zhang, D. (2017) Quantification of Chemotaxis-Related Alkane Accumulation in *Acinetobacter baylyi* Using Raman Microspectroscopy. *Anal. Chem.* 89(7), 3909–18, Doi: 10.1021/acs.analchem.6b02297.
- [149] Lin, H.-H., Huang, H.-M., Yu, M., Lai, E.-M., Chien, H.-L., Liu, C.-T. (2018) Functional Exploration of the Bacterial Type VI Secretion System in Mutualism: *Azorhizobium caulinodans* ORS571-*Sesbania rostrata* as a Research Model. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 31(8), 856–67, Doi: 10.1094/MPMI-01-18-0026-R.

- [150] Lo Piccolo, L., De Pasquale, C., Fodale, R., Puglia, A.M., Quatrini, P. (2011) Involvement of an Alkane Hydroxylase System of *Gordonia* sp. Strain SoCg in Degradation of Solid *n*-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(4), 1204–13, Doi: 10.1128/AEM.02180-10.
- [151] Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010) Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(7), a000398–a000398, Doi: 10.1101/cshperspect.a000398.
- [152] Lu, Y., Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R. (2006) Enzyme–microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(44), 16165–9, Doi: 10.1073/pnas.0605381103.
- [153] Luo, H., Moran, M.A. (2014) Evolutionary Ecology of the Marine *Roseobacter* Clade. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78(4), 573–87, Doi: 10.1128/MMBR.00020-14.
- [154] Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., McDougald, D. (2013) Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 4, Doi: 10.3389/fmicb.2013.00375.
- [155] Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27(2), 209–20.
- [156] Martinez-Checa, F. (2005) *Palleronia marismenoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the “*Alphaproteobacteria*”, isolated from a saline soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55(6), 2525–30, Doi: 10.1099/ijs.0.63906-0.
- [157] Martins, L.F., Peixoto, R.S. (2012) Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Braz. J. Microbiol.* 43(3), 865–72, Doi: 10.1590/S1517-83822012000300003.
- [158] McCormick, D., Stevens, M., Boles, B., Rickard, A. (2011) Does it take two to Tango? The role of coaggregation in multi-species biofilms. *Culture* 32, 1–5.
- [159] McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., Sanni, G.O. (2012) Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.* 8(1), 10, Doi: 10.1186/2046-9063-8-10.
- [160] Mikkelsen, H., Sivaneson, M., Filloux, A. (2011) Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 13(7), 1666–81, Doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x.
- [161] Miller, L.T. (1982) Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16(3), 584–586.
- [162] Miller, S.T., Xavier, K.B., Campagna, S.R., Taga, M.E., Semmelhack, M.F., Bassler, B.L., Hughson, F.M. (2004) *Salmonella typhimurium* Recognizes a Chemically Distinct Form of the Bacterial Quorum-Sensing Signal AI-2. *Mol. Cell* 15(5), 677–87, Doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.020.
- [163] Minh, B.Q., Nguyen, M.A.T., von Haeseler, A. (2013) Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 30(5), 1188–95, Doi: 10.1093/molbev/mst024.
- [164] Miyashiro, T., Oehlert, D., Ray, V.A., Visick, K.L., Ruby, E.G. (2014) The putative oligosaccharide translocase SypK connects biofilm formation with quorum signaling in *Vibrio fischeri*. *MicrobiologyOpen* 3(6), 836–48, Doi: 10.1002/mbo3.199.

- [165] Mok, K.C., Wingreen, N.S., Bassler, B.L. (2003) *Vibrio harveyi* quorum-sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J.* 22(4), 870–81, Doi: 10.1093/emboj/cdg085.
- [166] Monds, R.D., O’Toole, G.A. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* 17(2), 73–87, Doi: 10.1016/j.tim.2008.11.001.
- [167] Mounier, J., Camus, A., Mitteau, I., Vaysse, P.-J., Goulas, P., Grimaud, R., Sivadon, P. (2014) The marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 degrades a wide range of lipids and hydrocarbons through the formation of oleolytic biofilms with distinct gene expression profiles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90(3), 816–31, Doi: 10.1111/1574-6941.12439.
- [168] Mounier, J., Hakil, F., Branchu, P., Naïtali, M., Goulas, P., Sivadon, P., Grimaud, R. (2018) *AupA* and *AupB* Are Outer and Inner Membrane Proteins Involved in Alkane Uptake in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *MBio* 9(3), e00520–18.
- [169] Mulani, N., Fulke, A.B., DeSouza, E., Ram, A., Maloo, A., Sayed, F., Gajbhiye, S.N. (2017) Biodegradation of crude oil using marine *Bacillus* species from Vadinar coast, Gujarat, India.
- [170] Nadell, C.D., Drescher, K., Foster, K.R. (2016) Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 14(9), 589–600, Doi: 10.1038/nrmicro.2016.84.
- [171] Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R. (2013) Quorum-sensing and phytochemicals. *Int. J. Mol. Sci.* 14(6), 12607–19, Doi: 10.3390/ijms140612607.
- [172] Nguyen, L.-T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2015) IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32(1), 268–74, Doi: 10.1093/molbev/msu300.
- [173] Ni Chadhain, S.M., Norman, R.S., Pesce, K.V., Kukor, J.J., Zylstra, G.J. (2006) Microbial Dioxxygenase Gene Population Shifts during Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(6), 4078–87, Doi: 10.1128/AEM.02969-05.
- [174] Nicolaisen, M.H., Worm, J., Jørgensen, N.O.G., Middelboe, M., Nybroe, O. (2012) Proteinase production in *Pseudomonas fluorescens* ON2 is affected by carbon sources and allows surface-attached but not planktonic cells to utilize protein for growth in lake water. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80(1), 168–78, Doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01285.x.
- [175] Nie, Y., Chi, C.-Q., Fang, H., Liang, J.-L., Lu, S.-L., Lai, G.-L., Tang, Y.-Q., Wu, X.-L. (2015) Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. *Sci. Rep.* 4(1), Doi: 10.1038/srep04968.
- [176] van Nuland, Y.M., Eggink, G., Weusthuis, R.A. (2016) Application of AlkBGT and AlkL from *Pseudomonas putida* GPo1 for Selective Alkyl Ester ω -Oxyfunctionalization in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(13), 3801–7, Doi: 10.1128/AEM.00822-16.
- [177] Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H. (2017) *vegan*: Community Ecology Package.
- [178] Ortega-Calvo, J.J., Alexander, M. (1994) Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7), 2643–6.

- [179] Özkaya, Ö., Balbontín, R., Gordo, I., Xavier, K.B. (2018) Cheating on Cheaters Stabilizes Cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Biol.* 28(13), 2070-2080.e6, Doi: 10.1016/j.cub.2018.04.093.
- [180] Özkaya, Ö., Xavier, K.B., Dionisio, F., Balbontín, R. (2017) Maintenance of Microbial Cooperation Mediated by Public Goods in Single- and Multiple-Trait Scenarios. *J. Bacteriol.* 199(22), e00297-17, Doi: 10.1128/JB.00297-17.
- [181] Park, S., Park, J.-M., Choi, Su Jung., Choi, J., Yoon, J.-H. (2018) *Pseudomaribius aestuariivivens* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1344–9, Doi: 10.1099/ijsem.0.002677.
- [182] Park, S., Park, J.-M., Lee, K.-C., Bae, K.S., Yoon, J.-H. (2014) *Boseongicola aestuarii* gen. nov., sp. nov., isolated from a tidal flat sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(Pt 8), 2618–24, Doi: 10.1099/ijms.0.061960-0.
- [183] Parrish, C.C. (2013) Lipids in Marine Ecosystems. *ISRN Oceanogr.* 2013, 1–16, Doi: 10.5402/2013/604045.
- [184] Parrish, C.C. (1988) Dissolved and particulate marine lipid classes: a review. *Mar. Chem.* 23(1), 17–40, Doi: 10.1016/0304-4203(88)90020-5.
- [185] Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., Harshey, R.M. (2010) The c-di-GMP Binding Protein YcgR Controls Flagellar Motor Direction and Speed to Affect Chemotaxis by a “Backstop Brake” Mechanism. *Mol. Cell* 38(1), 128–39, Doi: 10.1016/j.molcel.2010.03.001.
- [186] Petrova, O.E., Sauer, K. (2012) Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *J. Bacteriol.* 194(10), 2413–25, Doi: 10.1128/JB.00003-12.
- [187] Pettigrew, M.M., Marks, L.R., Kong, Y., Gent, J.F., Roche-Hakansson, H., Hakansson, A.P. (2014) Dynamic Changes in the *Streptococcus pneumoniae* Transcriptome during Transition from Biofilm Formation to Invasive Disease upon Influenza A Virus Infection. *Infect. Immun.* 82(11), 4607–19, Doi: 10.1128/IAI.02225-14.
- [188] Papat, R., Cornforth, D.M., McNally, L., Brown, S.P. (2015) Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria. *J. R. Soc. Interface* 12(103), 20140882, Doi: 10.1098/rsif.2014.0882.
- [189] Pride, A.C., Herrera, C.M., Guan, Z., Giles, D.K., Trent, M.S. (2013) The Outer Surface Lipoprotein VolA Mediates Utilization of Exogenous Lipids by *Vibrio cholerae*. *MBio* 4(3), Doi: 10.1128/mBio.00305-13.
- [190] Pruzzo, C., Vezzulli, L., Colwell, R.R. (2008) Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin: *V. cholerae* - chitin interactions. *Environ. Microbiol.* 10(6), 1400–10, Doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01559.x.
- [191] Qin, Q.-L., Xie, B.-B., Zhang, X.-Y., Chen, X.-L., Zhou, B.-C., Zhou, J., Oren, A., Zhang, Y.-Z. (2014) A Proposed Genus Boundary for the Prokaryotes Based on Genomic Insights. *J. Bacteriol.* 196(12), 2210–5, Doi: 10.1128/JB.01688-14.
- [192] Quéméneur, M., Marty, Y. (1994) Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Water Res.* 28(5), 1217–26, Doi: 10.1016/0043-1354(94)90210-0.

- [193] R Development Core Team. (2008) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- [194] Rai, N., Rai, R., Kareenhalli, V. (2015) Quorum-sensing Biosensors. Quorum-sensing vs Quorum Quenching: A Battle with no end in Sight, pp. 173–83.
- [195] Rasmussen, T.B., Givskov, M. (2006) Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int. J. Med. Microbiol. IJMM 296(2–3), 149–61, Doi: 10.1016/j.ijmm.2006.02.005.
- [196] Ratajczak, A., Geißsdörfer, W., Hillen, W. (1998) Alkane Hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 Is Encoded by *alkM* and Belongs to a New Family of Bacterial Integral-Membrane Hydrocarbon Hydroxylases. Appl. Environ. Microbiol. 64(4), 1175–1179.
- [197] Rath, J., Wu, K.Y., Herndl, G.J., DeLong, E.F. (1998) High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. Aquat. Microb. Ecol. 14(3), 261–269.
- [198] Ren, D., Madsen, J.S., Sørensen, S.J., Burmølle, M. (2015) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. ISME J. 9(1), 81–9, Doi: 10.1038/ismej.2014.96.
- [199] Rendueles, O., Ghigo, J.-M. (2012) Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. FEMS Microbiol. Rev. 36(5), 972–89, Doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.
- [200] Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E., Ghigo, J.-M. (2011) Screening of *Escherichia coli* Species Biodiversity Reveals New Biofilm-Associated Antiadhesion Polysaccharides. MBio 2(3), e00043-11, Doi: 10.1128/mBio.00043-11.
- [201] Richter, M., Rosselló-Móra, R. (2009) Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106(45), 19126–31, Doi: 10.1073/pnas.0906412106.
- [202] Rickard, A.H., Gilbert, P., High, N.J., Kolenbrander, P.E., Handley, P.S. (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol. 11(2), 94–100, Doi: 10.1016/S0966-842X(02)00034-3.
- [203] Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Høiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. (2001) N-Acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. Microbiology 147(12), 3249–62, Doi: 10.1099/00221287-147-12-3249.
- [204] Rodrigues, A.C., Wuertz, S., Brito, A.G., Melo, L.F. (2005) Fluorene and phenanthrene uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: Kinetics and physiological aspects. Biotechnol. Bioeng. 90(3), 281–9, Doi: 10.1002/bit.20377.
- [205] Rodríguez-Moyá, M., Gonzalez, R. (2015) Proteomic analysis of the response of *Escherichia coli* to short-chain fatty acids. J. Proteomics 122, 86–99, Doi: 10.1016/j.jprot.2015.03.033.
- [206] Rodríguez-R, L.M., Konstantinidis, K.T. (2014) Bypassing cultivation to identify bacterial species. Microbe 9(3), 111–118.
- [207] Rojo, F. (2009) Degradation of alkanes by bacteria. Environ. Microbiol. 11(10), 2477–90, Doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x.

- [208] Romling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M. (2013) Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77(1), 1–52, Doi: 10.1128/MMBR.00043-12.
- [209] Rosenberg, M., Bayer, E.A., Delarea, J., Rosenberg, E. (1982) Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(4), 929–37.
- [210] Rosenberg, M., Rosenberg, E. (1981) Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *J. Bacteriol.* 148(1), 51–7.
- [211] Sakuragi, Y., Kolter, R. (2007) Quorum-Sensing Regulation of the Biofilm Matrix Genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189(14), 5383–6, Doi: 10.1128/JB.00137-07.
- [212] Salinero, K.K., Keller, K., Feil, W.S., Feil, H., Trong, S., Di Bartolo, G., Lapidus, A. (2009) Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation. *BMC Genomics* 10, 351, Doi: 10.1186/1471-2164-10-351.
- [213] Saliot, A., Laureillard, J., Scribe, P., Sicre, M.A. (1991) Evolutionary trends in the lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Mar. Chem.* 36(1–4), 233–248.
- [214] Salta, M., Wharton, J.A., Blache, Y., Stokes, K.R., Briand, J.-F. (2013) Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics: Marine biofilms: structure and dynamics. *Environ. Microbiol.*, n/a-n/a, Doi: 10.1111/1462-2920.12186.
- [215] Schluter, J., Nadell, C.D., Bassler, B.L., Foster, K.R. (2015) Adhesion as a weapon in microbial competition. *ISME J.* 9(1), 139–49, Doi: 10.1038/ismej.2014.174.
- [216] Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P. (2003) Identification, Timing, and Signal Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Controlled Genes: a Transcriptome Analysis. *J. Bacteriol.* 185(7), 2066–79, Doi: 10.1128/JB.185.7.2066-2079.2003.
- [217] Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H. (2004) Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* 38, 228A-231A.
- [218] Simon, M., Scheuner, C., Meier-Kolthoff, J.P., Brinkhoff, T., Wagner-Döbler, I., Ulbrich, M., Klenk, H.-P., Schomburg, D., Petersen, J., Göker, M. (2017) Phylogenomics of *Rhodobacteraceae* reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *ISME J.* 11(6), 1483.
- [219] Sivadon, P., Grimaud, R. (2017) Assimilation of Hydrocarbons and Lipids by Means of Biofilm Formation. In: Krell, T., (Ed.), *Cellular Ecophysiology of Microbe*, Springer International Publishing, Cham, pp. 1–12.
- [220] Sivan, A. (2011) New perspectives in plastic biodegradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22(3), 422–6, Doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.013.
- [221] Slightom, R.N., Buchan, A. (2009) Surface Colonization by Marine *Roseobacters*: Integrating Genotype and Phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(19), 6027–37, Doi: 10.1128/AEM.01508-09.

- [222] Smith, C.S., Hinz, A., Bodenmiller, D., Larson, D.E., Brun, Y.V. (2003) Identification of Genes Required for Synthesis of the Adhesive Holdfast in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 185(4), 1432–42, Doi: 10.1128/JB.185.4.1432-1442.2003.
- [223] Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., Azam, F. (1992) Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359(6391), 139–42, Doi: 10.1038/359139a0.
- [224] Smits, T.H.M., Balada, S.B., Witholt, B., van Beilen, J.B. (2002) Functional Analysis of Alkane Hydroxylases from Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 184(6), 1733–42, Doi: 10.1128/JB.184.6.1733-1742.2002.
- [225] Smits, T.H.M., Rothlisberger, M., Witholt, B., van Beilen, J.B. (1999) Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* 1(4), 307–17, Doi: 10.1046/j.1462-2920.1999.00037.x.
- [226] Speare, L., Cecere, A.G., Guckes, K.R., Smith, S., Wollenberg, M.S., Mandel, M.J., Miyashiro, T., Septer, A.N. (2018) Bacterial symbionts use a type VI secretion system to eliminate competitors in their natural host. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 201808302, Doi: 10.1073/pnas.1808302115.
- [227] Stanley, N.R., Lazazzera, B.A. (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation: Signalling in biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52(4), 917–24, Doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04036.x.
- [228] Stocker, R. (2012) Marine Microbes See a Sea of Gradients. *Science* 338(6107), 628–33, Doi: 10.1126/science.1208929.
- [229] Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56(1), 187–209, Doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- [230] Sutherland, I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147(1), 3–9.
- [231] Svendsen, A. (2000) Lipase protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1543(2), 223–38, Doi: 10.1016/S0167-4838(00)00239-9.
- [232] Tannières, M., Lang, J., Barnier, C., Shykoff, J.A., Faure, D. (2017) Quorum-quenching limits quorum-sensing exploitation by signal-negative invaders. *Sci. Rep.* 7, 40126, Doi: 10.1038/srep40126.
- [233] Teschler, J.K., Zamorano-Sánchez, D., Utada, A.S., Warner, C.J.A., Wong, G.C.L., Linington, R.G., Yildiz, F.H. (2015) Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 13(5), 255–68, Doi: 10.1038/nrmicro3433.
- [234] Thompson, C.C., Chimetto, L., Edwards, R.A., Swings, J., Stackebrandt, E., Thompson, F.L. (2013) Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* 14(1), 913.
- [235] Tindall, B.J. (1990) Lipid composition of *Halobacterium lacusprofundi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66(1–3), 199–202.

- [236] Tindall, B.J. (1990) A Comparative Study of the Lipid Composition of *Halobacterium saccharovororum* from Various Sources. *Sytematic Appl. Microbiol.* 13(2), 128–30, Doi: 10.1016/S0723-2020(11)80158-X.
- [237] Touw, D.S., Patel, D.R., van den Berg, B. (2010) The Crystal Structure of OprG from *Pseudomonas aeruginosa*, a Potential Channel for Transport of Hydrophobic Molecules across the Outer Membrane. *PLoS ONE* 5(11), e15016, Doi: 10.1371/journal.pone.0015016.
- [238] Tseng, T.-T., Tyler, B.M., Setubal, J.C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol.* 9(1), S2, Doi: 10.1186/1471-2180-9-S1-S2.
- [239] Turner, J.T. (2015) Zooplankton fecal pellets, marine snow, phytodetritus and the ocean's biological pump. *Prog. Oceanogr.* 130, 205–48, Doi: 10.1016/j.pocean.2014.08.005.
- [240] Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46(4), 327–38.
- [241] Ueda, A., Wood, T.K. (2009) Connecting Quorum-sensing, c-di-GMP, Pel Polysaccharide, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* through Tyrosine Phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog.* 5(6), e1000483, Doi: 10.1371/journal.ppat.1000483.
- [242] Vaysse, P.-J., Sivadon, P., Goulas, P., Grimaud, R. (2011) Cells dispersed from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 biofilm exhibit a specific protein profile associated with a higher ability to reinitiate biofilm development at the hexadecane-water interface: *M. hydrocarbonoclasticus* biofilm-dispersed cells. *Environ. Microbiol.* 13(3), 737–46, Doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02377.x.
- [243] Verdugo, P., Alldredge, A.L., Azam, F., Kirchman, D.L., Passow, U., Santschi, P.H. (2004) The oceanic gel phase: a bridge in the DOM–POM continuum. *Mar. Chem.* 92(1), 67–85, Doi: 10.1016/j.marchem.2004.06.017.
- [244] Verma, S., Miyashiro, T. (2013) Quorum-sensing in the Squid-*Vibrio* Symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 14(8), 16386–401, Doi: 10.3390/ijms140816386.
- [245] Vetter, Y.A., Deming, J.W., Jumars, P.A., Krieger-Brockett, B.B. (1998) A Predictive Model of Bacterial Foraging by Means of Freely Released Extracellular Enzymes. *Microb. Ecol.* 36(1), 75–92, Doi: 10.1007/s002489900095.
- [246] Voegel, T.M., Doddapaneni, H., Cheng, D.W., Lin, H., Stenger, D.C., Kirkpatrick, B.C., Roper, M.C. (2013) Identification of a response regulator involved in surface attachment, cell-cell aggregation, exopolysaccharide production and virulence in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*: *Xylella* XhpT response regulator. *Mol. Plant Pathol.* 14(3), 256–64, Doi: 10.1111/mpp.12004.
- [247] Volkman, J.K. (1986) A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.* 9(2), 83–99, Doi: 10.1016/0146-6380(86)90089-6.
- [248] Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D. (1989) Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128(3), 219–40, Doi: 10.1016/0022-0981(89)90029-4.

- [249] Volkman, J.K., Nichols, P.D. (1991) Application of thin layer chromatography-flame ionization detection to the analysis of lipids and pollutants in marine environmental samples. *J. Planar Chromatogr.* 4, 19–25.
- [250] Walencka, E., Różalska, S., Sadowska, B., Różalska, B. (2008) The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol. (Praha)* 53(1), 61, Doi: 10.1007/s12223-008-0009-y.
- [251] Walker, B.D., Beaupré, S.R., Guilderson, T.P., McCarthy, M.D., Druffel, E.R.M. (2016) Pacific carbon cycling constrained by organic matter size, age and composition relationships. *Nat. Geosci.* 9(12), 888–91, Doi: 10.1038/ngeo2830.
- [252] Wang, W., Shao, Z. (2013) Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Front. Microbiol.* 4, Doi: 10.3389/fmicb.2013.00116.
- [253] Wang, Z.-W., Hamilton-Brehm, S.D., Lochner, A., Elkins, J.G., Morrell-Falvey, J.L. (2011) Mathematical modeling of hydrolysate diffusion and utilization in cellulolytic biofilms of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor obsidiansis*. *Bioresour. Technol.* 102(3), 3155–62, Doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.104.
- [254] Wang, Z.-W., Lee, S.-H., Elkins, J.G., Morrell-Falvey, J.L. (2011) Spatial and temporal dynamics of cellulose degradation and biofilm formation by *Caldicellulosiruptor obsidiansis* and *Clostridium thermocellum*. *AMB Express* 1(1), 30, Doi: 10.1186/2191-0855-1-30.
- [255] Warnes, G.R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W.H.A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B. (2016) gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data.
- [256] Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., Bassler, B.L. (2008) Quorum-sensing Controls Biofilm Formation in *Vibrio cholerae* through Modulation of Cyclic Di-GMP Levels and Repression of vpsT. *J. Bacteriol.* 190(7), 2527–36, Doi: 10.1128/JB.01756-07.
- [257] Webb, J.S., Givskov, M., Kjelleberg, S. (2003) Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(6), 578–85, Doi: 10.1016/j.mib.2003.10.014.
- [258] Weiss, M.S., Abele, U., Weckesser, J., Welte, W., Schiltz, E., Schulz, G.E. (1991) Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. *Science* 254(5038), 1627–30, Doi: 10.1126/science.1721242.
- [259] West, S.A., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A., Griffin, A.S. (2007) The Social Lives of Microbes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38(1), 53–77, Doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095740.
- [260] West, S.A., Griffin, A.S., Gardner, A., Diggle, S.P. (2006) Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 4(8), 597–607, Doi: 10.1038/nrmicro1461.
- [261] Weyenberg, G., Huggins, P.M., Schardl, C.L., Howe, D.K., Yoshida, R. (2014) kdetrees: non-parametric estimation of phylogenetic tree distributions. *Bioinformatics* 30(16), 2280–7, Doi: 10.1093/bioinformatics/btu258.
- [262] Whyte, L.G., Slagman, S.J., Pietrantonio, F., Bourbonnière, L., Koval, S.F., Lawrence, J.R., Inniss, W.E., Greer, C.W. (1999) Physiological Adaptations Involved in Alkane Assimilation at a Low Temperature by *Rhodococcus* sp. Strain Q15. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(7), 2961–8.

- [263] Wick, L., de Munain, A., Springael, D., Harms, H. (2002) Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(3), 378–85, Doi: 10.1007/s00253-001-0898-z.
- [264] Widdel*, F., Musat, F. (2010) Diversity and Common Principles in Enzymatic Activation of Hydrocarbons. In: Timmis, K.N., (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 981–1009.
- [265] Wilkes, R.A., Aristilde, L. (2017) Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *J. Appl. Microbiol.* 123(3), 582–93, Doi: 10.1111/jam.13472.
- [266] Williams, T.C., Ayrapetyan, M., Oliver, J.D. (2014) Implications of Chitin Attachment for the Environmental Persistence and Clinical Nature of the Human Pathogen *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(5), 1580–7, Doi: 10.1128/AEM.03811-13.
- [267] Wirth, J.S., Whitman, W.B. (2018) Phylogenomic analyses of a clade within the roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariivita*, *Citreicella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68(7), 2393–411, Doi: 10.1099/ijsem.0.002833.
- [268] Witholt, B., de Smet, M.J., Kingma, J., van Beilen, J.B., Kok, M., Lageveen, R.G., Eggink, G. (1990) Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. *Trends Biotechnol.* 8(2), 46–52.
- [269] Xiao, S., Chye, M.-L. (2011) New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 50(2), 141–51, Doi: 10.1016/j.plipres.2010.11.002.
- [270] Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(3), 257–66, Doi: 10.1016/j.copbio.2007.04.006.
- [271] Yu, C., Lee, A.M., Bassler, B.L., Roseman, S. (1991) Chitin utilization by marine bacteria. A physiological function for bacterial adhesion to immobilized carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 266(36), 24260–7.
- [272] Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., Welch, D.B.M., Martiny, J.B.H., Sogin, M., Boetius, A., Ramette, A. (2011) Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. *PLoS ONE* 6(9), e24570, Doi: 10.1371/journal.pone.0024570.

Annexes

Annexe 1 : Informations sur les 198 souches sélectionnées pour le criblage sur paraffine et tristéarine.
 ND : non déterminé. L'identification des souches MOLA a été réalisée par séquençage du gène de l'ARNr 16S (amorces 8F et 1492R). Les lignes grisées correspondent aux souches qui n'ont pas été criblées sur acide palmitique et hexadécyl palmitate.

Identifiant	Identification	Ref	Localisation géographique de l'isolement	Habitat	Milieu de culture	Milieu minimum
B2	<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	Xue-Wei Xu et al., 2011	mer de Chine orientale	colonne d'eau	MB	MBmin
CB15	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	Stove Poindexter, 1964	ND	eau d'étang	PYE	MBmin
DG893	<i>Marinobacter algicola</i> DG893	Green et al., 2006	mer Jaune, Corée	isolée d'une culture de deux dinoflagellées	EMS + GALP	EMS
DSM 11524	<i>Sagittula stellata</i> E-37	Gonzalez et al., 1997	Georgie	eau de mer, enrichissement avec un effluent d'usine de pâte à papier	MB	MBmin
DSM 13489	<i>Oleiphilus messinensis</i> ME102	Golyshin et al., 2002	Messine, Italie	eau de mer, sédiment issu de 8 m de profondeur	EMS + GALP	EMS
DSM 14573	<i>Halomonas halocynthiae</i> 2.1.2	Romanenko et al., 2002	mer du Japon	tissu branchial de l'ascidie <i>Halocynthia aurantium</i>	MB	MBmin
DSM 15171	<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	González et al., 2003	Georgie	eau de mer, enrichissement sur dimethylsulfonylpropionate	MB	MBmin
DSM 15446	<i>Alteromonas addita</i> R10SW13	Ivanova et al., 2005	baie de Chazhma, mer du Japon	eau de mer	MB	MBmin
DSM 16183	<i>Neptunomonas naphthovorans</i> NAG-2N-126	Hedlund et al., 1999	port de Eagle, Puget Sound, USA	sédiment marin issu de 15,5 m de profondeur, contaminé à la créosote de goudron de houille	MB	MBmin
DSM 16280	<i>Salinimonas chunghwensis</i> BH030046	Jeon et al., 2005	zone de Chungwha, Corée du Sud	sol salin	MB	MBmin
DSM 16502	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	Liu & Shao, 2005	mer de Bohai, Chine	eau de surface	MB + pyruvate (10g/L)	EMS

DSM 17068	<i>Hoeflea phototrophica</i> DFL-43	Biebl et al., 2006	ND	isolée à partir d'une culture de <i>Prorocentrum lima</i> ME130	MB	MBmin
DSM 17123	<i>Woodsholea maritima</i> CM243	Abraham et al., 2004	océan Atlantique, Wodds Hole, USA	eau d'estuaire	DSMZ 1238	DSMZ 1238min
DSM 17395	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395	Martens et al., 2006	Espagne	eau de mer, isolée d'une culture de <i>Pecten maximus</i>	MB	MBmin
DSM 17893	<i>Balneola vulgaris</i> 13IX/A01/164	Urios et al., 2006	Baie de Banyuls	colonne d'eau, 0,5m de profondeur	MB	MBmin
DSM 18339	<i>Pseudodonghicola xiamenensis</i> Y-2	Tan et al., 2009	île de Xiamen, Chine	eau de mer, surface	DSMZ 381	MBmin
DSM 19476	<i>Alishewanella aestuarii</i> B11	Roh et al., 2009	Yeosu, Corée du Sud	sédiment prélevé à marée basse	DSMZ 220	EMS
DSM 19537	<i>Haliea salexigens</i> 3x/A02/235	Urios et al., 2008	Baie de Banyuls	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
DSM 19753	<i>Spongiibacter marinus</i> 5IX/A0/131	Urios et al., 2006	Baie de Barcelone	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
DSM 19796	<i>Pontibacillus halophilus</i> JSM 076056	Chen et al., 2009	Leizhou Bay, mer de Chine, Chine	isolée d'un oursin	MB + NaCl (30g/L)	MBmin
DSM 21750	<i>Paraoerskovia marina</i> CTT-37	Khan et al., 2009	plage de la côte de Tottori, Japon	sédiment	DSMZ 92	MBmin
DSM 22007	<i>Litorimicrobium taeanense</i> G4	Jin et al., 2011	plage de Taeon, Corée du sud	sédiment	MB	MBmin
DSM 23232	<i>Bermanella marisrubri</i> RED65	Pinhasi et al., 2009	Golf de Eilat, mer Rouge, Israël	eau de mer, surface	MB	MBmin
DSM 23545	<i>Marinobacterium litorale</i> IMCC1877	Kim et al., 2007	proximité des côtes de l'île de Deokjeok (mer Jaune)	eau de mer de surface	MB	MBmin
HP15	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	Kaepffel et al., 2012	mer des Wadden, Allemagne	aggrégats marins formés avec une diatomée	EMS + GALP	EMS
IVIA-Po-181	<i>Marinomonas posidonica</i> IVIA-Po-181	Lucas-Elio et al., 2011	îles Baleares, Espagne	isolée de <i>Posidonia oceanica</i>	MB	MBmin
SP17	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17	Gauthier et al., 1992	mer Méditerranée	isolée à proximité d'une raffinerie	EMS + GALP	EMS

LMG 18921	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400		Mer du Nord, Aberdeen	eau de mer	MB	MBmin
LMG 2843	<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126	Baumann et al., 1976	au large des côtes de Oahu, Hawaii	eau de mer	MB	MBmin
Mil-1	<i>Thalassolituus oleivorans</i> Mil-1	Yakov et al., 2004	Milazzo, Italie	eau de mer/sédiment, enrichissement de n-tétradécane	EMS + GALP	EMS
MMB1	<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB1	Solano et al., 1999	Méditerranée, côte sud-est de l'Espagne	ND	MB	MBmin
DSM 6996	<i>Roseobacter litralis</i> Och149	Shiba 1991	Japon	isolée à partir d'une algue	MB	MBmin
SK2	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	Yakov et al. 1998	île de Borkum, Mer du Nord	eau de mer/sédiment, enrichissement de Mithagol (C14,15-n-alkanes)	EMS + GALP	EMS
Vf	<i>Vibrio furnissii</i> 2510/74	Brenner et al., 1984	estuaire Humber, Angleterre	eau d'estuaire	EMS + GALP	EMS
VT8	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> VT8	Nguyen et al., 1999	sud du Vietnam	isolée d'un puits de pétrole offshore	EMS + GALP	EMS
NBRC 100887	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	Komukai-Nakamura et al., 1996	Océan Pacifique	isolée à partir d'un enrichissement de pristane	MB	MBmin
MOLA 1	<i>Micrococcus luteus</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 1007	<i>Pseudomonas baetica</i>		Etang de Leucate, France	association avec une méduse	MB	MBmin
MOLA 101	<i>Thalassospira lucentensis</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 1014	<i>Pseudomonas koreensis</i>		Etang de Leucate, France	association avec une méduse	MB	MBmin
MOLA 1015	<i>Vibrio ordalii</i>		Etang de Leucate, France	association avec une méduse	MB	MBmin
MOLA 1075	<i>Microbulbifer epialgicus</i>		Méditerranée, Marseille, France	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 1094	<i>Paenibacillus harenae</i>		Méditerranée, Marseille, France	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 1112	<i>Microbulbifer cystodytense</i>		Méditerranée, Banyuls, France	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 1122	<i>Bhargavaea cecembensis</i>		Mer rouge, Marsa Alam, Egypte	trou d'eau dans le récif corallien à marée basse	MB	MBmin
MOLA 1224**	<i>Streptomyces cinereoruber</i>		Mer rouge, Marsa Alam, Egypte	trou d'eau dans le récif corallien à marée basse	MB	MBmin

	<i>subsp. cinereoruber</i>					
MOLA 1239	<i>Phaeobacter arcticus</i>		Aquarium de Banyuls sur mer, France	association avec un oursin malade	MB	MBmin
MOLA 1242	<i>Tenacibaculum lutimaris</i>		Aquarium de Banyuls sur mer, France	association avec un oursin malade	MB	MBmin
MOLA 126*	<i>Marinobacter koreensis</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 1270	<i>Hoeflea halophila</i>		Etang de Canet, France	lagune	MB	MBmin
MOLA 1288	<i>Streptomyces sioyaensis</i>		Méditerranée, Banyuls, France	association avec des détritiques d'éponge	MB	MBmin
MOLA 14	<i>Olleya marilimosa</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 1482	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i>		étang de La Palme	lagune	MB	MBmin
MOLA 166	<i>Nocardioides kribbensis</i>		Méditerranée, Baie de Barcelone, France	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 167	<i>Dietzia maris</i>		Méditerranée, Baie de Barcelone, France	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 168	<i>Micrococcus aloeverae</i>		Méditerranée, Baie de Barcelone, France	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 170*	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>		Méditerranée, Baie de Barcelone, Espagne	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 189*	<i>Pseudomonas pelagia</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 19	<i>Marinobacter flavimaris</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 1987	<i>Lewinella agarilytica</i>		Méditerranée, Banyuls, France	association avec une macro-algue verte	MB	MBmin
MOLA 1990	<i>Streptomyces specialis</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 2042*	<i>Ruegeria atlantica</i>		ND	associée à une algue rouge	MB	MBmin
MOLA 2080	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2081*	<i>Kocuria rhizophila</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2084	<i>Brevibacterium pityocampae</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2085*	<i>Micrococcus yunnanensis</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2086	<i>Bacillus simplex</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2118***	<i>Gordonia sputi</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin

MOLA 2119	<i>Ruegeria atlantica</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2127**	<i>Bacillus thuringiensis</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2128	<i>Micromonospora aurantiaca</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2150	<i>Micromonospora aurantiaca</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2153**	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2155**	<i>Gordonia sputi</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2159	<i>Vibrio variabilis</i>		Méditerranée, Banyuls, France	association avec une Posidonie	MB	MBmin
MOLA 2161	<i>Cohaesibacter marisflavi</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une Posidonie	MB	MBmin
MOLA 2163**	<i>Rhodococcus qingshengii</i>		Méditerranée, Marseille, France	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 2170	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 2171	<i>Microbacterium lacticum</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Hemimycale columella</i>)	MB	MBmin
MOLA 218	<i>Nocardioides marinus</i>		ND	ND	MB	MBmin
MOLA 2205	<i>Aquimarina amphilecti</i>		Méditerranée, Banyuls, France	association à une Posidonie	MB	MBmin
MOLA 2212	<i>Ruegeria atlantica</i>		Méditerranée, Banyuls, France	association à une Posidonie	MB	MBmin
MOLA 2228	<i>Kordiimonas aquimaris</i>		Méditerranée, Banyuls, France	association avec une Posidonie	MB	MBmin
MOLA 2257	<i>Streptomyces xanthophaeus</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	interface eau de mer/sédiment	MB	MBmin
MOLA 2259	<i>Algoriphagus winogradskyi</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	interface eau de mer/sédiment	MB	MBmin
MOLA 2261	<i>Brachybacterium ginsengisoli</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	interface eau de mer/sédiment	MB	MBmin
MOLA 2266	<i>Erythrobacter citreus</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	interface eau de mer/sédiment	MB	MBmin
MOLA 2267	<i>Lutibacter maritimus</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	interface eau de mer/sédiment	MB	MBmin
MOLA 2279	<i>Sphingobium lactosutens</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Corticium candelabrum</i>)	MB	MBmin
MOLA 2282	<i>Sulfitobacter pontiacus</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Corticium candelabrum</i>)	MB	MBmin

MOLA 2285	<i>Erythrobacter aquimaris</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Corticium candelabrum</i>)	MB	MBmin
MOLA 2290*	<i>Aestuariibacter halophilus</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Corticium candelabrum</i>)	MB	MBmin
MOLA 2294	<i>Vibrio pectenica</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Corticium candelabrum</i>)	MB	MBmin
MOLA 2295	<i>Salinimicrobium terrae</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge (<i>Corticium candelabrum</i>)	MB	MBmin
MOLA 230*	<i>Brevundimonas mediterranea</i>		Méditerranée, Baie de Barcelone, Espagne	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 2311	<i>Vibrio splendidus</i>		ND	association à des <i>Salpa</i>	MB	MBmin
MOLA 2323	<i>Pelagibius litoralis</i>		ND	association à des <i>Salpa</i>	MB	MBmin
MOLA 2333	<i>Marinoscillum luteum</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	isolée d'une expérimentation en batch, en association avec un biofilm cyanobactérien	MB	MBmin
MOLA 237	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 2428	<i>Vibrio mytili</i>		Méditerranée, Banyuls, station SOLA, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 2438	<i>Ruegeria halocynthiae</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	association avec une éponge <i>Crambe crambe</i>	MB	MBmin
MOLA 248	<i>Exiguobacterium aestuarii</i>		Méditerranée, Baie de Barcelone, France	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 255	<i>Brevundimonas aurantiaca</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	eau de mer, micro-couche de surface et eau sous jacente	MB	MBmin
MOLA 272	<i>Marinobacter litoralis</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	eau de mer, micro-couche de surface	MB	MBmin
MOLA 310*	<i>Aurantimonas coralica</i>		Mer adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 314	<i>Tetrasphaera elongata</i>		Mer Adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 315	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>		Mer Adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 322	<i>Litoreaibacter albidus</i>		Mer Adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 324	<i>Paracoccus yeei</i>		Mer adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin

MOLA 333**	<i>Altererythrobacter atlanticus</i>		Mer adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 34*	<i>Aeromicrobium fastidiosum</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 35	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, station SOLA, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 358	<i>Eudoraea adriatica</i>		Mer Adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 361	<i>Planktotalea frisia</i>		Mer Adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 367	<i>Ruegeria pelagia</i>		upwelling Chilien, gyre Pacifique	ND	MB	MBmin
MOLA 374	<i>Leeuwenhoekella blandensis</i>		upwelling Chilien, gyre Pacifique	ND	MB	MBmin
MOLA 38**	<i>Psychrobacter cibarius</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 388***	<i>Alcanivorax jadensis</i>		upwelling Chilien, gyre Pacifique	ND	MB	MBmin
MOLA 392*	<i>Marinobacter flavimaris</i>		upwelling Chilien, gyre Pacifique	ND	MB	MBmin
MOLA 400	<i>Kocuria rosea</i>		Pacifique, Nouvelle Calédonie	ND	MB	MBmin
MOLA 401	<i>Maribius pelagius</i>		Nouvelle Calédonie	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 421	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Baie de Guanabara, Brésil	ND	MB	MBmin
MOLA 423	<i>Algoriphagus marincola</i>		Baie de Guanabara, Brésil	ND	MB	MBmin
MOLA 429	<i>Rheinheimera chironomi</i>		Baie de Guanabara, Brésil	ND	MB	MBmin
MOLA 43*	<i>Fundibacter jadensis / Alcanivorax jadensis</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 451	<i>Bacillus licheniformis</i>		Baie de Guanabara, Brésil	ND	MB	MBmin
MOLA 48	<i>Algoriphagus ornithinivorans</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, station SOLA, France	colone d'eau	MB	MBmin
MOLA 485*	<i>Marinobacter algicola</i>		Baie de Banyuls	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 488***	<i>Marinobacter koreensis</i>		Baie de Banyuls	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 5	<i>Kocuria rhizophila</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, station SOLA, France	colone d'eau	MB	MBmin
MOLA 551	<i>Marinobacter litoralis</i>		Mer Adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin
MOLA 599	<i>Ruegeria atlantica</i>		Mer Adriatique	isolée lors d'un bloom phytoplanktonique	MB	MBmin

MOLA 606***	<i>Marinobacter flavimaris</i>		Mer adriatique, Delta du Po	ND	MB	MBmin
MOLA 663	<i>Streptomyces atratus</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 668*	<i>Vibrio caribbeanicus</i>		Pacifique	association à une éponge	MB	MBmin
MOLA 682	<i>Bacillus flexus</i>		Pacifique	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 699*	<i>Kiloniella laminariae</i>		Pacifique	association à une éponge	MB	MBmin
MOLA 705	<i>Acinetobacter variabilis</i>		Pacifique	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 706*	<i>Ruegeria atlantica</i>		Pacifique	association à une éponge	MB	MBmin
MOLA 710	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>		Pacifique	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 719	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>		Pacifique	association avec une éponge	MB	MBmin
MOLA 73**	<i>Micrococcus luteus</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 747**	<i>Alteromonas macleodii</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 75	<i>Rheinheimera baltica</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 752	<i>Maribacter arcticus</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 753*	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 755	<i>Pseudomonas stutzeri</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 758*	<i>Alteromonas genovensis</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 761	<i>Marinobacter psychrophilus</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 77**	<i>Marinobacter aquaeolei</i>		Baie de Banyuls, station SOLA	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 775**	<i>Pseudoalteromonas citrea</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 776*	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 786	<i>Marinobacter psychrophilus</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 791	<i>Psychroflexus torquis</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 793	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 798	<i>Marinobacter psychrophilus</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 799	<i>Marinobacter psychrophilus</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 82	<i>Thalassospira profundimaris</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 835***	<i>Psychrobacter aquimaris</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin

MOLA 84	<i>Thalassobaculum salexigens</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 844	<i>Acinetobacter johnsonii</i>		mer de Beaufort	ND	MB	MBmin
MOLA 848	<i>Pseudoalteromonas undina</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 857	<i>Pseudoalteromonas tetradonis</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 862	<i>Loktanella soesokkakensis</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 864	<i>Muricauda lutimaris</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 866	<i>Arenibacter palladensis</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 867	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 870	<i>Arenibacter echinorum</i>		Etang de Leucate, France	association avec une méduse	MB	MBmin
MOLA 871	<i>Shimia biformata</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 872	<i>Gaetbulicola (Marivita) byunsanensis</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 877	<i>Ruegeria scottomollicae</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 878	<i>Phaeobacter caeruleus</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 881	<i>Celeribacter neptunius</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 885	<i>Colwellia psychrerythraea</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 889	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 890	<i>Alteromonas tagae</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 892*	<i>Alteromonas tagae</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 920	<i>Roseibacterium elongatum</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 922	<i>Marivita byunsanensis</i>		étang de Bages de Sigean, France	lagune, colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 944***	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>		Pacifique	association avec une éponge	MB	MBmin

MOLA 96	<i>Thalassospira tepidiphila</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 992	<i>Sulfitobacter delicatus</i>		Méditerranée, Baie de Banyuls, station SOLA, France	colonne d'eau	MB	MBmin
MOLA 996	<i>Kocuria palustris</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA 997	<i>Janibacter hoylei</i>		Méditerranée, baie de Banyuls, France	association avec une méduse (<i>Aurelia aurita</i>)	MB	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 10	<i>Tenacibaculum adriaticum</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 12	<i>Pelagicola litoralis</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 1a*	<i>Alteromonas stellipolaris</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 5**	<i>Glaciecola chathamensis</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C5 (-2) MA 12a**	<i>Donghicola eburneus</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 13b	<i>Marinovum algicola</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 15	<i>Arenibacter palladensis</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 17	<i>Croceicoccus marinus</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 1b	<i>Neptuniibacter halophilus</i>		ND	expérimentation en chemostats	MB	MBmin

				avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie		
MOLA C5 (-3) MA 1c	<i>Methylophaga nitratireducentis</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C6 P 2c*	<i>Shimia haliotis</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C6 S3 1a	<i>Tropicimonas sediminicola</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C6 S3 2a	<i>Hyphomonas atlanticus</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin
MOLA C6 S3 3a	<i>Leisingera methylohalidivora</i>		ND	expérimentation en chemostats avec enrichissement d'exsudat de diatomée ou de cyanobactérie	MB	MBmin

Annexe 2 : Traitement des images d'adhésion sous ImageJ.

```

idOrig = getImageID();
run("Duplicate...", "title=Duplicate1");
idDuplicate1 = getImageID();
run("Duplicate...", "title=Duplicate2");
idDuplicate2 = getImageID();
selectImage(idDuplicate1);
run("Gaussian Blur...", "sigma=1");
selectImage(idDuplicate2);
run("Gaussian Blur...", "sigma=10");
imageCalculator("Subtract create", idDuplicate1, idDuplicate2);
close(idDuplicate1);
close(idDuplicate2);
run("Set Scale...", "distance=0 known=0 pixel=1 unit=pixel");
setAutoThreshold("Triangle dark");
//run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", false);
run("Set Measurements...", "area standard median area_fraction display redirect=None decimal=5");
run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity show=Outlines display summarize add in_situ");
selectImage(idDuplicate1);
close();
selectImage(idDuplicate2);
close();
selectWindow("Result of Duplicate1");
close();
selectImage(idOrig);
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
roiManager("Draw");
roiManager("Show All without labels");
run("Duplicate...", "title=results");
selectImage(idOrig);
close();
roiManager("Delete");

```

Annexe 3 : Liste des 84 génomes analysés dans la description de MOLA 401 (Chap. 6). L90 est défini comme le plus petit nombre de contigs dont la somme des longueurs représente 90 % du génome.

Souche	Taille du génome (bp)	Nombre de contigs	L90	N° d'accension
<i>Actibacterium atlanticum</i> 22II-S11-z10	3176407	24	10	GCF 000671395.1
<i>Actibacterium mucosum</i> KCTC 23349	3715359	22	8	GCF 000647975.1
<i>Actibacterium pelagium</i> JN33	3494031	9	4	GCF 002285415.1
<i>Aestuariivita atlantica</i> 22II-S11-z3	4342698	56	14	GCF 001205715.1
<i>Aliiroseovarius crassostreae</i> CV919-312	3725406	27	8	GCF 001307765.1
<i>Boseongicola aestuarii</i> CECT 8489	4001339	69	17	GCF 900184815.1
<i>Celeribacter baekdonensis</i> B30	4333641	44	14	GCF 000299875.1
<i>Celeribacter neptunius</i> DSM 26471	4398143	19	8	GCA 900113955.1
<i>Confluentimicrobium</i> sp. EMB200-NS6	4147430	4	1	GCF 001305615.1
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12	4417874	6	1	GCF 000018145.1
<i>Gemmobacter</i> sp. LW-1	4343267	93	48	GCF 001303875.1
<i>Haematobacter missouriensis</i> CCUG 52307	3958944	136	40	GCF 000740775.1
<i>Hwanghaeicola aestuarii</i> DSM 22009	4541514	82	33	GCF 003253995.1
<i>Jannaschia faecimaris</i> DSM 100420	3810805	48	21	GCA 900107415.1
<i>Leisingera aquaemixtae</i> CECT 8399	4614100	40	17	GCF 001458395.1
<i>Leisingera daeponensis</i> DSM 23529	4641766	12	3	GCF 000473145.1
<i>Leisingera methylohalidivorans</i> DSM 14336	4650999	3	1	GCF 000511355.1
<i>Litoreibacter arenae</i> DSM 19593	3682278	17	5	GCF 000442275.2
<i>Loktanella vestfoldensis</i> DSM 16212	3718050	49	21	GCF 000382265.1
<i>Mameliella alba</i> UMTAT08	5837444	62	28	GCF 000807715.1
<i>Maribius pelagius</i> DSM 26893	3858460	25	9	GCA 900110115.1
<i>Maribius salinus</i> DSM 26892	3573932	32	14	GCA 900141995.1
<i>Maribius</i> sp. MOLA 401	3849804	33	18	GCF 000743715.1
<i>Marinovum algicola</i> DG 898	5252402	12	5	GCF 001046955.1
<i>Maritimibacter alkaliphilus</i> HTCC2654	4528489	46	22	GCF 000152805.1
<i>Methylococcus capsulatus</i> ATCC 19069	3263785	23	12	GCF 000424685.1

<i>Nautella italica</i> CECT 7645	4049604	37	15	GCF 001258055.1
<i>Oceanibulbus indolifex</i> HEL-45	4105629	105	21	GCF 000172095.1
<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597	4437262	23	13	GCF 000152725.1
<i>Oceanicola granulosis</i> HTCC2516	4037742	85	46	GCF 000153305.1
<i>Oceanicola litoreus</i> DSM 29440	4095465	3	1	GCA 900142295.1
<i>Oceanicola nanhaiensis</i> DSM 18065	4659750	20	6	GCF 000688295.1
<i>Octadecabacter temperatus</i> SB1	3264630	2	0	GCF 001187845.1
<i>Palleronia marisminoris</i> DSM 26347	3937277	27	13	GCA 900113405.1
<i>Paracoccus halophilus</i> JCM 14014	4012973	122	40	GCF 000763905.1
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> DSM 26640	4542787	45	11	GCF 000819625.1
<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 16374	4130675	8	3	GCF 000473105.1
<i>Planktomarina temperata</i> RCA23	3288123	1	0	GCF 000738435.1
<i>Planktotalea frisia</i> SH6-1	4106963	227	114	GCA 001890925.1
<i>Ponticoccus marisrubri</i> SJ5A-1	4562669	116	18	GCF 001482405.1
<i>Pseudoceanicola atlanticus</i> 22II-s11g	4938352	47	17	GCF 000768315.1
<i>Pseudorhodobacter aquimaris</i> KCTC 23043	3818514	77	33	GCF 001202025.1
<i>Pseudorhodobacter ferrugineus</i> DSM 5888	3430316	42	21	GCF 000420745.1
<i>Pseudorhodobacter wandonensis</i> KCTC 23672	3887486	45	18	GCF 001202035.1
<i>Puniceibacterium</i> sp. IMCC21224	5563494	9	3	GCF 001038505.1
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	4602822	9	2	GCF 000012905.2
<i>Rhodovulum sulfidophilum</i> DSM 1374	4347932	3	0	GCF 001633165.1
<i>Roseibacterium elongatum</i> DSM 19469	3555110	1	0	GCF 000590925.1
<i>Roseivivax halodurans</i> JCM 10272	4492960	150	46	GCF 000521785.1
<i>Roseivivax isopora</i> LMG 25204	4898431	203	48	GCF 000521865.1
<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149	4745454	4	0	GCF 000154785.2
<i>Roseovarius atlanticus</i> R12B	4578421	73	22	GCF 001441615.1
<i>Roseovarius mucosus</i> DSM 17069	4245982	26	14	GCF 000768555.1
<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM	3668506	10	3	GCF 000152625.1
<i>Ruegeria conchae</i> TW15	4490441	28	12	GCF 000192475.1
<i>Ruegeria halocynthiae</i> MOLA R1 13b	4314516	19	5	GCF 000743705.1

<i>Ruegeria mobilis</i> S1942	4787755	93	29	GCF 000967745.1
<i>Ruegeria pomeroyi</i> DSS-3	4601050	2	1	GCF 000011965.2
<i>Sagittula stellata</i> E-37	5262932	39	19	GCF 000169415.1
<i>Sedimentitalea nanhaiensis</i> DSM 24252	4945826	30	14	GCF 000473225.1
<i>Sediminimonas qiaohouensis</i> DSM 21189	3553918	68	29	GCF 000423645.1
<i>Shimia marina</i> CECT 7688	3997456	76	34	GCF 001458175.1
<i>Sulfitobacter donghicola</i> KCTC 12864	3513294	92	9	GCF 000712275.1
<i>Sulfitobacter geojensis</i> MM-124	4229472	5	1	GCF 000622325.1
<i>Sulfitobacter guttiformis</i> KCTC 32187	3976676	4	0	GCF 000622425.1
<i>Sulfitobacter mediterraneus</i> 1FIGIMAR09	3861756	55	19	GCF 000647535.1
<i>Sulfitobacter mediterraneus</i> KCTC 32188	4131111	31	14	GCF 000622345.1
<i>Sulfitobacter noctilucae</i> NB-68	3914555	14	5	GCF 000622365.1
<i>Sulfitobacter noctilucicola</i> NB-77	4085984	8	2	GCF 000622385.1
<i>Sulfitobacter pontiacus</i> 3SOLIMAR09	3453197	25	8	GCF 000647675.1
<i>Sulfitobacter pseudonitzschiae</i> H3	4945375	80	18	GCF 000712315.1
<i>Tateyamaria</i> sp. ANG-S1	4425439	33	10	GCF 000814025.1
<i>Thalassobacter arenae</i> DSM 19593	3687440	18	5	PRJNA178144
<i>Thalassobacter stenotrophicus</i> CECT 5294	3592088	33	11	GCF 001458315.1
<i>Thalassobium</i> sp. R2A62	3487610	8	4	GCF 000161835.1
<i>Thalassobius gelatinovorans</i> CECT4357	3902827	30	11	GCF 001458355.1
<i>Thioclava atlantica</i> 13D2W-2	3928490	47	16	GCF 000737065.1
<i>Thioclava dalianensis</i> DLFJ1-1	4179154	98	42	GCF 000715505.1
<i>Thioclava indica</i> DT23-4	3822173	105	40	GCF 000714545.1
<i>Thioclava pacifica</i> DSM 10166	3728335	42	11	GCF 000714535.1
<i>Thiothrix nivea</i> DSM 5205	4690426	15	0	GCF 000260135.1
<i>Tropicibacter multivorans</i> CECT 7557	4175663	45	16	GCF 001458415.1
<i>Tropicibacter naphthalenivorans</i> CECT 7648	4459219	34	11	GCF 001458375.1
<i>Yangia</i> sp. CCB-MM3	5522068	7	3	GCF 001687105.1

Annexe 4 : Résultat du criblage visuel réalisé sur paraffine et tristéarine. Y : un biofilm a été observé à la surface du COH, N : aucun biofilm observé.

Identifiant	Identification	P	T	Milieu de criblage
B2	<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	Y	Y	MBmin
CB15	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	N	N	MBmin
DG893	<i>Marinobacter algicola</i> DG893	Y	Y	EMS
DSM 11524	<i>Sagittula stellata</i> E-37	N	N	MBmin
DSM 13489	<i>Oleiphilus messinensis</i> ME102	Y	Y	EMS
DSM 14573	<i>Halomonas halocynthiae</i> 2.1.2	N	N	MBmin
DSM 15171	<i>Ruegeria pomeroyi strain</i> DSS-3	N	N	MBmin
DSM 15446	<i>Alteromonas addita</i> R10SW13	N	N	MBmin
DSM 16183	<i>Neptunomonas naphthovorans</i> NAG-2N-126	N	N	MBmin
DSM 16280	<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046	N	N	MBmin
DSM 16502	<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	Y	Y	EMS
DSM 17068	<i>Hoeflea phototrophica</i> DFL-43	N	N	MBmin
DSM 17123	<i>Woodsholea maritima</i> CM243	N	N	DSM 1238min
DSM 17395	<i>Phaeobacter inhibens</i> DSM 17395	N	N	MBmin
DSM 17893	<i>Balneola vulgaris</i> 13IX/A01/164	N	N	MBmin
DSM 18339	<i>Pseudodonghicola xiamenensis</i> Y-2	N	Y	MBmin
DSM 19476	<i>Alishewanella aestuarii</i> B11	N	N	EMS
DSM 19537	<i>Haliae salexigens</i> 3x/A02/235	N	N	MBmin
DSM 19753	<i>Spongiibacter marinus</i> 5IX/A0/131	N	N	MBmin
DSM 19796	<i>Pontibacillus halophilus</i> ISM 076056	N	N	MBmin
DSM 21750	<i>Paraoerskovia marina</i> CTT-37	N	N	MBmin
DSM 22007	<i>Litorimicrobium taeanense</i> G4	N	N	MBmin
DSM 23232	<i>Bermanella marisrubri</i> RED65	N	N	MBmin
DSM 23545	<i>Marinobacterium litorale</i> IMCC1877	N	N	MBmin
DSM 6996	<i>Roseobacter litoralis</i> Och149	N	N	MBmin
HP15	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	Y	Y	EMS
IVIA-Po-181	<i>Marinomonas posidonica</i> IVIA-Po-181	N	N	MBmin
JM1	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> JM1	Y	Y	EMS
LMG 18921	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	N	N	MBmin
LMG 2843	<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126	N	Y	MBmin
Mil-1	<i>Thalassolituus oleivorans</i> Mil-1	Y	Y	EMS
MMB1	<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB1	N	N	MBmin
MOLA 1224**	<i>Streptomyces cinereoruber</i> subsp. <i>Cinereoruber</i> MOLA 1224	N	N	MBmin
MOLA 1242	<i>Tenacibaculum lutimaris</i> MOLA 1242	N	N	MBmin
MOLA 126*	<i>Marinobacter koreensis</i> MOLA 126	Y	Y	MBmin
MOLA 1482	<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> MOLA1482	N	N	MBmin
MOLA 170*	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> MOLA 170	N	N	MBmin
MOLA 189*	<i>Pseudomonas pelagia</i> MOLA 189	N	Y	MBmin
MOLA 1987	<i>Lewinella agarilytica</i> MOLA 1987	N	N	MBmin
MOLA 2042*	<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA 2042	Y	Y	MBmin

MOLA 2081*	<i>Kocuria rhizophila</i> MOLA 2081	N	N	MBmin
MOLA 2085*	<i>Micrococcus yunnanensis</i> MOLA 2085	N	N	MBmin
MOLA 2086	<i>Bacillus simplex</i> MOLA 2086	N	N	MBmin
MOLA 2118***	<i>Gordonia sputi</i> MOLA 2118	Y	Y	MBmin
MOLA 2119	<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA 2119	N	Y	MBmin
MOLA 2127**	<i>Bacillus thuringiensis</i> MOLA 2127	Y	Y	MBmin
MOLA 2128	<i>Micromonospora aurantiaca</i> MOLA 2128	N	N	MBmin
MOLA 2153**	<i>Rhodococcus erythropolis</i> MOLA 2153	N	N	MBmin
MOLA 2155**	<i>Gordonia sputi</i> MOLA 2155	N	N	MBmin
MOLA 2159	<i>Vibrio variabilis</i> MOLA 2159	N	N	MBmin
MOLA 2163**	<i>Rhodococcus qingshengii</i> MOLA 2163	Y	N	MBmin
MOLA 2228	<i>Kordiimonas aquimaris</i> MOLA 2228	N	N	MBmin
MOLA 2259	<i>Algoriphagus winogradskyi</i> MOLA 2259	N	N	MBmin
MOLA 2267	<i>Lutibacter maritimus</i> MOLA 2267	N	N	MBmin
MOLA 2279	<i>Sphingobium lactosutens</i> MOLA 2279	N	N	MBmin
MOLA 2290*	<i>Aestuariibacter halophilus</i> MOLA 2290	N	N	MBmin
MOLA 2295	<i>Salinimicrobium terrae</i> MOLA 2295	N	N	MBmin
MOLA 230*	<i>Brevundimonas mediterranea</i> MOLA 230	N	N	MBmin
MOLA 256	<i>Balneola vulgaris</i> MOLA 256	N	N	MBmin
MOLA 310*	<i>Aurantimonas coralicida</i> MOLA 310	N	N	MBmin
MOLA 324	<i>Paracoccus yeei</i> MOLA 324	N	N	MBmin
MOLA 333**	<i>Altererythrobacter atlanticus</i> MOLA 333	N	N	MBmin
MOLA 34*	<i>Aeromicrobium fastidiosum</i> MOLA 34	N	Y	MBmin
MOLA 38**	<i>Psychrobacter cibarius</i> MOLA 38	N	N	MBmin
MOLA 388***	<i>Alcanivorax jadensis</i> MOLA 388	Y	Y	MBmin
MOLA 392*	<i>Marinobacter flavimaris</i> MOLA 392	Y	Y	MBmin
MOLA 401	<i>Maribius pelagius</i> MOLA 401	N	N	MBmin
MOLA 429	<i>Rheinheimera chironomi</i> MOLA 429	Y	N	MBmin
MOLA 43*	<i>Alcanivorax jadensis</i> MOLA 43	Y	Y	MBmin
MOLA 485*	<i>Marinobacter algicola</i> MOLA 485	Y	Y	MBmin
MOLA 488***	<i>Marinobacter koreensis</i> MOLA 488	Y	Y	MBmin
MOLA 606***	<i>Marinobacter flavimaris</i> MOLA 606	Y	Y	MBmin
MOLA 668*	<i>Vibrio caribbeanicus</i> MOLA 668	Y	Y	MBmin
MOLA 699*	<i>Kiloniella laminariae</i> MOLA 699	Y	N	MBmin
MOLA 706*	<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA 706	N	N	MBmin
MOLA 73**	<i>Micrococcus luteus</i> MOLA 73	Y	Y	MBmin
MOLA 747**	<i>Alteromonas macleodii</i> MOLA 747	N	N	MBmin
MOLA 75	<i>Rheinheimera baltica</i> MOLA 75	N	N	MBmin
MOLA 752	<i>Maribacter arcticus</i> MOLA 752	N	N	MBmin
MOLA 753*	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> MOLA 753	N	N	MBmin
MOLA 758*	<i>Alteromonas genovensis</i> MOLA 758	N	N	MBmin
MOLA 77**	<i>Marinobacter aquaeolei</i> MOLA 77	Y	Y	MBmin
MOLA 775**	<i>Pseudoalteromonas citrea</i> MOLA 775	N	N	MBmin
MOLA 776*	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> MOLA 776	N	N	MBmin
MOLA 835***	<i>Psychrobacter aquimaris</i> MOLA 835	N	N	MBmin

MOLA 885	<i>Colwellia psychrerythraea</i> MOLA 885	N	N	MBmin
MOLA 890	<i>Alteromonas tagae</i> MOLA 890	N	N	MBmin
MOLA 892*	<i>Alteromonas tagae</i> MOLA 892	N	N	MBmin
MOLA 944***	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MOLA 944	Y	Y	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 1a*	<i>Alteromonas stellipolaris</i> MOLA C1(-3)MA1a	N	N	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 5**	<i>Glaciecola chathamensis</i> MOLA C1(-3)MA5	Y	N	MBmin
MOLA C5 (-2) MA 12a**	<i>Donghicola eburneus</i> MOLA C5(-2)MA12a	N	N	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 15	<i>Arenibacter palladensis</i> MOLA C5(-3)MA15	N	Y	MBmin
MOLA C6 P 2c*	<i>Shimia haliotis</i> MOLA C6 P 2c	N	Y	MBmin
MOLA C6 S3 1a	<i>Tropicimonas sediminicola</i> MOLA C6 S3 1a	N	N	MBmin
NBRC 100887	<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	Y	N	MBmin
SK2	<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	Y	N	EMS
Vf	<i>Vibrio furnissii</i> 2510/74	N	N	EMS
VT8	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> VT8	Y	Y	EMS
MOLA 1	<i>Micrococcus luteus</i> MOLA 1	N	N	MBmin
MOLA 1007	<i>Pseudomonas baetica</i> MOLA 1007	N	N	MBmin
MOLA 101	<i>Thalassospira lucentensis</i> MOLA 101	N	N	MBmin
MOLA 1014	<i>Pseudomonas koreensis</i> MOLA 1014	N	N	MBmin
MOLA 1015	<i>Vibrio ordalii</i> MOLA 1015	N	N	MBmin
MOLA 1075	<i>Microbulbifer epialgicus</i> MOLA 1075	N	N	MBmin
MOLA 1094	<i>Paenibacillus harenae</i> MOLA 1094	N	N	MBmin
MOLA 1112	<i>Microbulbifer cystodytense</i> MOLA 1112	N	N	MBmin
MOLA 1122	<i>Bhargavaea cecembensis</i> MOLA 1122	N	N	MBmin
MOLA 1239	<i>Phaeobacter arcticus</i> MOLA 1239	Y	Y	MBmin
MOLA 1270	<i>Hoeflea halophila</i> MOLA 1270	N	N	MBmin
MOLA 1288	<i>Streptomyces sioyaensis</i> MOLA 1288	N	N	MBmin
MOLA 14	<i>Olleya marilimosa</i> MOLA 14	N	N	MBmin
MOLA 166	<i>Nocardioides kribbensis</i> MOLA 166	N	N	MBmin
MOLA 167	<i>Dietzia marisflavi</i> MOLA 167	N	N	MBmin
MOLA 168	<i>Micrococcus aloeverae</i> MOLA 168	N	N	MBmin
MOLA 19	<i>Marinobacter flavimaris</i> MOLA 19	N	N	MBmin
MOLA 1990	<i>Streptomyces specialis</i> MOLA 1990	N	N	MBmin
MOLA 2080	<i>Pseudovibrio ascidiaceicola</i> MOLA 2080	N	N	MBmin
MOLA 2084	<i>Brevibacterium pityocampae</i> MOLA 2084	N	N	MBmin
MOLA 2150	<i>Micromonospora aurantiaca</i> MOLA 2150	N	N	MBmin
MOLA 2161	<i>Cohaesibacter marisflavi</i> MOLA 2161	N	N	MBmin
MOLA 2170	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> MOLA 2170	N	N	MBmin
MOLA 2171	<i>Microbacterium lacticum</i> MOLA 2171	N	N	MBmin
MOLA 218	<i>Nocardioides marinus</i> MOLA 218	N	N	MBmin
MOLA 2205	<i>Aquimarina amphilecti</i> MOLA 2205	N	N	MBmin
MOLA 2212	<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA 2212	N	N	MBmin
MOLA 2257	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> MOLA 2257	N	N	MBmin
MOLA 2261	<i>Brachybacterium ginsengisoli</i> MOLA 2261	N	N	MBmin
MOLA 2266	<i>Erythrobacter citreus</i> MOLA 2266	N	N	MBmin

MOLA 2282	<i>Sulfitobacter pontiacus</i> MOLA 2282	N	N	MBmin
MOLA 2285	<i>Erythrobacter aquimaris</i> MOLA 2285	N	N	MBmin
MOLA 2294	<i>Vibrio pectenecida</i> MOLA 2294	N	N	MBmin
MOLA 2311	<i>Vibrio splendidus</i> MOLA 2311	N	N	MBmin
MOLA 2323	<i>Pelagibius litoralis</i> MOLA 2323	N	N	MBmin
MOLA 2333	<i>Marinoscillum luteum</i> MOLA 2333	N	N	MBmin
MOLA 237	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> MOLA 237	N	N	MBmin
MOLA 2428	<i>Vibrio mytili</i> MOLA 2428	N	N	MBmin
MOLA 2438	<i>Ruegeria halocynthiae</i> MOLA 2438	N	N	MBmin
MOLA 248	<i>Exiguobacterium aestuarii</i> MOLA 248	N	N	MBmin
MOLA 255	<i>Brevundimonas aurantiaca</i> MOLA 255	N	N	MBmin
MOLA 272	<i>Marinobacter litoralis</i> MOLA 272	N	N	MBmin
MOLA 314	<i>Tetrasphaera elongata</i> MOLA 314	N	N	MBmin
MOLA 315	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> MOLA 315	N	N	MBmin
MOLA 322	<i>Litoreibacter albidus</i> MOLA 322	N	N	MBmin
MOLA 35	<i>Corynebacterium aurimucosum</i> MOLA 35	N	N	MBmin
MOLA 358	<i>Eudoraea adriatica</i> MOLA 358	N	N	MBmin
MOLA 361	<i>Planktotalea frisia</i> MOLA 361	N	N	MBmin
MOLA 367	<i>Ruegeria pelagia</i> MOLA 367	N	N	MBmin
MOLA 374	<i>Leeuwenhoekella blandensis</i> MOLA 374	N	N	MBmin
MOLA 400	<i>Kocuria rosea</i> MOLA 400	N	N	MBmin
MOLA 421	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MOLA 421	N	N	MBmin
MOLA 423	<i>Algoriphagus marincola</i> MOLA 423	N	N	MBmin
MOLA 451	<i>Bacillus licheniformis</i> MOLA 451	N	N	MBmin
MOLA 48	<i>Algoriphagus ornithinivorans</i> MOLA 48	N	N	MBmin
MOLA 5	<i>Kocuria rhizophila</i> MOLA 5	N	N	MBmin
MOLA 551	<i>Marinobacter litoralis</i> MOLA 551	N	N	MBmin
MOLA 599	<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA 599	N	N	MBmin
MOLA 663	<i>Streptomyces atratus</i> MOLA 663	N	N	MBmin
MOLA 682	<i>Bacillus flexus</i> MOLA 682	N	N	MBmin
MOLA 705	<i>Acinetobacter variabilis</i> MOLA 705	N	N	MBmin
MOLA 710	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MOLA 710	N	N	MBmin
MOLA 719	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MOLA 719	N	N	MBmin
MOLA 755	<i>Pseudomonas stutzeri</i> MOLA 755	N	N	MBmin
MOLA 761	<i>Marinobacter psychrophilus</i> MOLA 761	N	N	MBmin
MOLA 786	<i>Marinobacter psychrophilus</i> MOLA 786	N	N	MBmin
MOLA 791	<i>Psychroflexus torquis</i> MOLA 791	N	N	MBmin
MOLA 793	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> MOLA 793	N	N	MBmin
MOLA 798	<i>Marinobacter psychrophilus</i> MOLA 798	N	N	MBmin
MOLA 799	<i>Marinobacter psychrophilus</i> MOLA 799	N	N	MBmin
MOLA 82	<i>Thalassospira profundimaris</i> MOLA 82	N	N	MBmin
MOLA 84	<i>Thalassobaculum salexigens</i> MOLA 84	N	N	MBmin
MOLA 844	<i>Acinetobacter johnsonii</i> MOLA 844	N	N	MBmin
MOLA 848	<i>Pseudoalteromonas undina</i> MOLA 848	N	Y	MBmin
MOLA 857	<i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> MOLA 857	N	N	MBmin

MOLA 862	<i>Loktanella soesokkakensis</i> MOLA 862	N	N	MBmin
MOLA 864	<i>Muricauda lutimaris</i> MOLA 864	N	N	MBmin
MOLA 866	<i>Arenibacter palladensis</i> MOLA 866	N	N	MBmin
MOLA 867	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> MOLA 867	N	N	MBmin
MOLA 870	<i>Arenibacter echinorum</i> MOLA 870	N	N	MBmin
MOLA 871	<i>Shimia biformata</i> MOLA 871	N	N	MBmin
MOLA 872	<i>Gaetbulicola (Marivita) byunsanensis</i> MOLA 872	N	N	MBmin
MOLA 877	<i>Ruegeria scottomollicae</i> MOLA 877	N	N	MBmin
MOLA 878	<i>Phaeobacter caeruleus</i> MOLA 878	N	N	MBmin
MOLA 881	<i>Celeribacter neptunius</i> MOLA 881	N	N	MBmin
MOLA 889	<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> MOLA 889	N	N	MBmin
MOLA 920	<i>Roseibacterium elongatum</i> MOLA 920	N	N	MBmin
MOLA 922	<i>Marivita byunsanensis</i> MOLA 922	N	N	MBmin
MOLA 96	<i>Thalassospira tepidiphila</i> MOLA 96	N	N	MBmin
MOLA 992	<i>Sulfitobacter delicatus</i> MOLA 992	N	N	MBmin
MOLA 996	<i>Kocuria palustris</i> MOLA 996	N	N	MBmin
MOLA 997	<i>Janibacter hoylei</i> MOLA 997	N	N	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 10	<i>Tenacibaculum adriaticum</i> MOLA C1(-3)MA10	N	N	MBmin
MOLA C1 (-3) MA 12	<i>Pelagicola litoralis</i> MOLA C1(-3)MA12	N	N	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 13b	<i>Marinovum algicola</i> MOLA C5(-3)MA13b	N	N	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 17	<i>Croceicoccus marinus</i> MOLA C5(-3)MA17	N	N	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 1b	<i>Neptuniibacter halophilus</i> C5(-3)MA1b	N	N	MBmin
MOLA C5 (-3) MA 1c	<i>Methylophaga nitratireducenticrescens</i> MOLA C5(-3)MA1c	N	N	MBmin
MOLA C6 S3 2a	<i>Hyphomonas atlanticus</i> MOLA C6 S3 2a	N	N	MBmin
MOLA C6 S3 3a	<i>Leisingera methylohalidivorans</i> MOLA C6 S3 3a	N	N	MBmin

Annexe 5 : Valeurs médianes maximales obtenues à 4 ou 13 jours sur paraffine, tristéarine, acide palmitique et hexadécyl palmitate.

Identification des souches	Paraffine	Tristéarine	Acide palmitique	Hexadécyl palmitate
<i>Marinobacter algicola</i> DG893	49,5030	37,6437	75,5297	43,1937
<i>Thalassolituus oleivorans</i> Mil-1	48,6017	38,6417	26,9277	18,7917
<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15	46,6610	53,8010	36,2490	29,0360
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> VT8	30,9970	8,9970	35,7230	16,5653
<i>Alcanivorax jadensis</i> MOLA388	30,8050	1,0220	50,2630	28,2630
<i>Gordonia sputi</i> MOLA2118	23,2393	0,9413	9,7523	12,5523
<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA2042	13,4993	12,6513	43,8723	30,8353
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> SP17	13,4817	11,3970	17,1830	11,0070
<i>Marinobacter koreensis</i> MOLA488	12,3343	7,7113	17,5423	16,9353
<i>Marinobacter koreensis</i> MOLA425	8,8677	6,0937	18,6557	12,8287
<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	8,4223	0,0000	5,6103	7,2113
<i>Oleiphilus messinensis</i> ME102	8,2890	16,3090	7,0183	10,6053
<i>Marinobacter koreensis</i> MOLA126	7,4060	8,7780	29,5990	25,8790
<i>Marinobacter flavimaris</i> MOLA392	4,9127	0,0000	6,1657	6,8457
<i>Alcanivorax dieselolei</i> B5	4,5877	11,5473	11,2337	18,4177
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	3,4697	0,0207	8,2877	12,5947
<i>Rhodococcus qingshengii</i> MOLA2163	3,4227	0,0000	0,4797	3,0057
<i>Alteromonas stellipolaris</i> MOLAC1MA5	3,0730	0,0000	24,5410	8,3140
<i>Fundibacter jadensis</i> MOLA43	2,9850	3,5010	7,9930	6,0510
<i>Rheinheimera chironomi</i> MOLA429	2,2077	0,0737	0,9957	2,0487
<i>Gordonia sputi</i> MOLA2155	1,4907	0,2597	7,4337	27,3137
<i>Marinobacter flavimaris</i> MOLA606	1,2643	3,0480	14,7190	7,3190
<i>Bacillus halosaccharovorans</i> MOLA2127	1,2483	0,7500	0,6153	17,8370
<i>Marinobacter aquaeolei</i> MOLA77	1,2140	3,2400	7,3310	6,9510
<i>Vibrio nigripulchritudo</i> MOLA668	1,0643	0,5203	4,1483	15,6990
<i>Paracoccus yeei</i> MOLA324	0,6107	0,0000	2,9337	0,0000
<i>Roseobacter litoralis</i> Och149	0,4147	0,2027	1,9817	0,0457
<i>Hoeflea phototrophica</i> DFL-43	0,3050	0,0880	0,1770	0,0000
<i>Kiloniella laminariae</i> MOLA699	0,2787	0,1407	0,0000	0,0000
<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2	0,2133	0,4183	6,9297	4,7297
<i>Bermanella marisrubri</i> RED65	0,2043	0,3233	5,8663	12,2313
<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> MOLA753	0,1423	0,0523	8,2100	5,5230
<i>Aurantimonas coralicida</i> MOLA310	0,1027	0,0747	51,5817	0,0000
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> MOLA944	0,0657	3,3047	21,8050	12,6780
<i>Tropicimonas sediminicola</i> MOLAC6S31a	0,0430	0,0000	0,3513	0,0293
<i>Maribius pelagius</i> MOLA401	0,0417	0,0977	0,0000	0,0000
<i>Sagittula stellata</i> E-37	0,0233	0,1143	1,7690	0,0250
<i>Micrococcus luteus</i> MOLA73	0,0127	0,0000	24,5657	6,2657
<i>Ruegeria pomeroyi</i> strain DSS-3	0,0127	0,0000	0,5303	0,0000
<i>Streptomyces cinereoruber</i> subsp. <i>cinereoruber</i> MOLA1224	0,0120	0,0000	7,6570	0,6250
<i>Pontibacillus halophilus</i> JSM 076056	0,0040	0,0710	5,2090	0,0060

<i>Marinomonas mediterranea</i> MMB1	0,0030	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Aeromicrobium fastidiosum</i> MOLA34	0,0000	0,9400	1,9550	2,7860
<i>Psychrobacter cibarius</i> MOLA38	0,0000	0,0000	0,1730	0,5160
<i>Rheinheimera baltica</i> MOLA75	0,0000	0,0000	0,6310	0,0640
<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> MOLA170	0,0000	0,0000	2,0390	0,0000
<i>Pseudomonas pelagia</i> MOLA189	0,0000	3,4547	38,4657	42,4657
<i>Brevundimonas mediterranea</i> MOLA230	0,0000	0,0000	7,6083	0,0000
<i>Balneola vulgaris</i> MOLA256	0,0000	0,0000	0,6390	0,0000
<i>Altererythrobacter atlanticus</i> MOLA333	0,0000	0,0160	7,3610	0,0000
<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA706	0,0000	0,0000	7,5650	0,0000
<i>Alteromonas macleodii</i> MOLA747	0,0000	0,1097	28,6963	13,9527
<i>Maribacter arcticus</i> MOLA752	0,0000	0,0000	0,5130	0,0000
<i>Alteromonas genovensis</i> MOLA758	0,0000	0,0183	9,0150	10,5280
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> MOLA775	0,0000	0,0000	6,6433	3,3513
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> MOLA776	0,0000	0,0000	3,9787	0,0000
<i>Psychrobacter aquimaris</i> MOLA835	0,0000	0,0000	5,5390	3,2540
<i>Colwellia psychrerythraea</i> MOLA885	0,0000	0,0000	5,6823	0,0357
<i>Alteromonas tagae</i> MOLA890	0,0000	0,0000	0,3257	0,0000
<i>Alteromonas tagae</i> MOLA892	0,0000	0,2027	42,8097	37,4097
<i>Tenacibaculum lutimaris</i> MOLA1242	0,0000	0,0000	1,8277	0,0000
<i>Hydrogenophaga taeniospiralis</i> MOLA1482	0,0000	0,0000	4,2737	0,0000
<i>Lewinella persica</i> MOLA1987	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Kocuria rhizophila</i> MOLA2081	0,0000	0,0000	0,0583	0,0000
<i>Micrococcus luteus</i> MOLA2085	0,0000	0,0000	1,8390	1,3790
<i>Bacillus simplex</i> MOLA2086	0,0000	0,1040	1,4377	0,0000
<i>Ruegeria atlantica</i> MOLA2119	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Micromonospora aurantiaca</i> MOLA2128	0,0000	0,0000	0,4490	0,0000
<i>Rhodococcus erythropolis</i> MOLA2153	0,0000	0,0000	10,9470	0,9497
<i>Vibrio variabilis</i> MOLA2159	0,0000	0,0000	0,0757	0,0000
<i>Kordiimonas aquimaris</i> MOLA2228	0,0000	0,0000	0,5550	0,0000
<i>Algoriphagus winogradskyi</i> MOLA2259	0,0000	0,0000	0,4463	0,0000
<i>Lutibacter maritimus</i> MOLA2267	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Sphingobium lactosutens</i> MOLA2279	0,0000	0,0000	8,3590	0,0000
<i>Aestuariibacter halophilus</i> MOLA2290	0,0000	0,0013	13,8450	0,0000
<i>Salinimicrobium terrae</i> MOLA2295	0,0000	0,0000	3,1623	0,0000
<i>Shimia haliotis</i> MOLAC1MA1a	0,0000	0,0000	105,3817	14,7103
<i>Glaciecola chathamensis</i> MOLAC5MA12a	0,0000	0,0000	5,7683	0,1290
<i>Donghicola eburneus</i> MOLAC5MA15	0,0000	0,0000	1,5190	0,0000
<i>Arenibacter palladensis</i> MOLAC6P2C	0,0000	0,2467	2,2417	0,0000
<i>Halomonas halocynthiae</i> 2.1.2	0,0000	0,0000	4,4577	0,0000
<i>Alteromonas addita</i> R10SW13	0,0000	0,0190	0,2983	0,1863
<i>Neptunomonas naphthovorans</i> NAG-2N-126	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Salinimonas chungwhensis</i> BH030046	0,0000	0,0170	26,5770	0,0830
<i>Alishewanella aestuarii</i> B11	0,0000	0,0000	8,8950	0,0000
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	0,0000	0,3063	0,7663	0,2327
<i>Woodsholea maritima</i> CM243	0,0000	0,2117	7,9967	4,2907

<i>Phaebacter gallaciensis</i> DSM 17395	0,0000	0,0220	13,0263	0,1470
<i>Balneola vulgaris</i> 13IX/A01/164	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Donghicola xiamenensis</i> Y-2	0,0000	1,4107	42,8417	13,6417
<i>Haliea salexigens</i> 3x/A02/235	0,0000	0,0000	1,2703	0,0000
<i>Spongiibacter marinus</i> 5IX/A0/131	0,0000	0,0000	3,4823	2,9623
<i>Paraoerskovia marina</i> CTT-37	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Litorimicrobium taeanense</i> G4	0,0000	0,0000	2,9777	0,0000
<i>Marinomonas posidonica</i> IVIA-Po-181	0,0000	0,0000	0,0000	0,0020
<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	0,0000	0,0000	5,8057	3,1457
<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126	0,0000	0,0000	82,0990	71,2990
<i>Vibrio furnisii</i> 2510/74	0,0000	0,0000	21,2150	0,7670

Annexe 6 : Résultats obtenus à la suite de l'analyse IndVal nous ayant permis de déterminer la fidélité des COG à chaque groupe. Les lignes grisées correspondent aux COG ayant retenus notre attention dans le chapitre 4.

COG	functions	GRP1 (1 & 2)	GRP2 (3-5)	GRP3 (6-8)	statistique	p.value
COG3515	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	0	0	0.783436737939615	0.001
COG4104	Zn-binding Pro-Ala-Ala-Arg (PAAR) domain, involved in TypeVI secretion	1	0	0	0.835205596878847	0.001
COG3521	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	0	0	0.801129475342122	0.001
COG3455	Type VI protein secretion system component VasF	1	0	0	0.781306589438905	0.001
COG3519	Type VI protein secretion system component VasA	1	0	0	0.812085438005565	0.001
COG3520	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	0	0	0.812085438005565	0.001
COG3522	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	0	0	0.812085438005565	0.001
COG3523	Type VI protein secretion system component VasK	1	0	0	0.812085438005565	0.001
COG3501	Uncharacterized conserved protein, implicated in type VI secretion and phage assembly	1	0	0	0.897128507030794	0.001
COG3518	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	0	0	0.762885920796009	0.002
COG3516	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	0	0	0.783873606728343	0.002
COG3157	Type VI protein secretion system component Hcp (secreted cytotoxin)	1	0	0	0.790448338478854	0.003
COG3517	Predicted component of the type VI protein secretion system	1	0	0	0.790730937040929	0.003
COG3456	Predicted component of the type VI protein secretion system, contains a FHA domain	1	0	0	0.663661211515623	0.01
COG3540	Phosphodiesterase/alkaline phosphatase D	1	1	0	0.87262475493781	0.002
COG1398	Fatty-acid desaturase	1	1	0	0.827365770661363	0.002
COG5380	Lipase chaperone LimK	1	1	0	0.75	0.003
COG1075	Triacylglycerol esterase/lipase EstA, alpha/beta hydrolase fold	1	1	0	0.754628407794521	0.008
COG1773	Rubredoxin	1	1	0	0.753254339176304	0.009
COG0543	NAD(P)H-flavin reductase	1	1	0	0.839897669576577	0.009
COG2904	NADPH-dependent 7-cyano-7-deazaguanine reductase QueF, N-terminal domain	1	1	0	0.781857640407136	0.014
COG2070	NAD(P)H-dependent flavin oxidoreductase YrpB, nitropropane dioxygenase family	1	1	0	0.803864932939208	0.049
COG4281	Acyl-CoA-binding protein	1	0	0	0.786213627541439	0.001

COG3417	Outer membrane lipoprotein LpoB, binds and activates PBP1b	1	1	0	0.721204536358167	0.008
COG2829	Outer membrane phospholipase A	1	1	0	0.78801040636923	0.014
COG2921	Putative lipoic acid-binding regulatory protein	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2956	Lipopolysaccharide biosynthesis regulator YciM, contains six TPR domains and a predicted metal-binding C-terminal domain	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2980	Outer membrane lipoprotein LptE/RlpB (LPS assembly)	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG3017	Outer membrane lipoprotein LolB, involved in outer membrane biogenesis	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG3107	Outer membrane lipoprotein LpoA, binds and activates PBP1a	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG3117	Lipopolysaccharide export system protein LptC	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG1307	Fatty acid-binding protein DegV (function unknown)	1	0	0	0.693549613508933	0.012
COG3725	Membrane protein required for beta-lactamase induction	1	1	0	0.796647758426967	0.001
COG3360	Flavin-binding protein dodecin	1	1	0	0.75	0.001
COG0027	Formate-dependent phosphoribosylglycinamide formyltransferase (GAR transformylase)	1	1	0	0.82072218543206	0.001
COG0422	Thiamine biosynthesis protein ThiC	1	1	0	0.877330500335069	0.001
COG1742	Uncharacterized inner membrane protein YnfA, drug/metabolite transporter superfamily	1	1	0	0.784949027191131	0.002
COG3897	Predicted nicotinamide N-methylase	1	1	0	0.784949027191131	0.002
COG3268	Uncharacterized conserved protein, related to short-chain dehydrogenases	1	1	0	0.799474925341627	0.002
COG4229	Enolase-phosphatase E1 involved in methionine salvage	1	1	0	0.773288621211553	0.002
COG1944	Ribosomal protein S12 methylthiotransferase accessory factor YcaO	1	1	0	0.759573834466473	0.003
COG2937	Glycerol-3-phosphate O-acyltransferase	1	1	0	0.806028243092275	0.004
COG3072	Adenylate cyclase	1	1	0	0.731658392330386	0.005
COG3123	Uncharacterized conserved protein YaiE, UPF0345 family	1	1	0	0.807130630080781	0.005
COG3332	Uncharacterized conserved protein, contains NRDE domain	1	1	0	0.794192702982069	0.005
COG3094	Uncharacterized membrane protein SirB2	1	1	0	0.741875344760569	0.006
COG0163	3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase	1	1	0	0.824554362290963	0.006
COG2836	Sulfite exporter TauE/SafE	1	1	0	0.794192702982069	0.007
COG3198	Uncharacterized protein	1	1	0	0.794192702982069	0.007
COG0851	Septum formation topological specificity factor MinE	1	1	0	0.818846572159806	0.007

COG0043	3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase	1	1	0	0.818846572159806	0.007
COG3751	Proline 4-hydroxylase (includes Rps23 Pro-64 3,4-dihydroxylase Tpa1), contains SM-20 domain	1	1	0	0.81675024695992	0.008
COG3846	Type IV secretory pathway, TrbL components	1	1	0	0.612372435695794	0.009
COG5314	Conjugal transfer/entry exclusion protein	1	1	0	0.612372435695794	0.009
COG3249	Uncharacterized protein	1	1	0	0.741875344760569	0.009
COG0798	Arsenite efflux pump ArsB, ACR3 family	1	1	0	0.866470212499854	0.009
COG3114	Heme exporter protein D	1	1	0	0.781857640407136	0.011
COG4323	Uncharacterized protein	1	1	0	0.766428956190558	0.011
COG4959	Type IV secretory pathway, protease TraF	1	1	0	0.612372435695794	0.012
COG4302	Ethanolamine ammonia-lyase, small subunit	1	1	0	0.673731162697959	0.012
COG4303	Ethanolamine ammonia-lyase, large subunit	1	1	0	0.673731162697959	0.012
COG3137	Putative salt-induced outer membrane protein YdiY	1	1	0	0.812220101042392	0.012
COG4623	Membrane-bound lytic murein transglycosylase MltF	1	1	0	0.804096135218592	0.012
COG4566	Two-component response regulator, FixJ family, consists of REC and HTH domains	1	1	0	0.744433781256774	0.012
COG1380	Putative effector of murein hydrolase LrgA, UPF0299 family	1	1	0	0.819354489032068	0.014
COG1346	Putative effector of murein hydrolase	1	1	0	0.819354489032068	0.015
COG3122	Uncharacterized conserved protein YaiL, DUF2058 family	1	1	0	0.781857640407136	0.016
COG4206	Outer membrane cobalamin receptor protein	1	1	0	0.83721869720621	0.016
COG0535	Radical SAM superfamily enzyme, MoaA/NifB/PqqE/SkfB family	1	1	0	0.771497793392078	0.017
COG4067	Uncharacterized conserved protein	1	1	0	0.807772805102796	0.017
COG0722	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase	1	1	0	0.839897669576577	0.018
COG0279	Phosphoheptose isomerase	1	1	0	0.814544371259842	0.019
COG2087	Adenosyl cobinamide kinase/adenosyl cobinamide phosphate guanylyltransferase	1	1	0	0.835526596309653	0.02
COG3272	Uncharacterized conserved protein YbgA, DUF1722 family	1	1	0	0.727539337246996	0.02
COG2333	Metal-dependent hydrolase, beta-lactamase superfamily II	1	1	0	0.795990525968238	0.022
COG1509	L-lysine 2,3-aminomutase (EF-P beta-lysylation pathway)	1	1	0	0.795899905527982	0.022
COG0850	Septum formation inhibitor MinC	1	1	0	0.807175952855339	0.023

COG2894	Septum formation inhibitor-activating ATPase MinD	1	1	0	0.807175952855339	0.023
COG0826	Collagenase-like protease, PrtC family	1	1	0	0.739317102216815	0.023
COG3245	Cytochrome c5	1	1	0	0.801171910519802	0.024
COG4125	Uncharacterized membrane protein	1	1	0	0.627159729991552	0.025
COG1055	Na ⁺ antiporter NhaD or related arsenite permease	1	1	0	0.799486643981744	0.025
COG0553	Superfamily II DNA or RNA helicase, SNF2 family	1	1	0	0.798080896512408	0.028
COG5016	Pyruvate/oxaloacetate carboxyltransferase	1	1	0	0.795899905527982	0.029
COG0368	Cobalamin synthase	1	1	0	0.819402085923685	0.03
COG3071	Uncharacterized conserved protein HemY, contains two TPR repeats	1	1	0	0.795899905527982	0.03
COG0614	ABC-type Fe ³⁺ -hydroxamate transport system, periplasmic component	1	1	0	0.892472304910115	0.03
COG1704	Uncharacterized conserved protein	1	1	0	0.781487160023913	0.032
COG0455	MinD-like ATPase involved in chromosome partitioning or flagellar assembly	1	1	0	0.765967547122384	0.033
COG0429	Predicted hydrolase of the alpha/beta-hydrolase fold	1	1	0	0.727539337246996	0.036
COG3671	Uncharacterized membrane protein	1	1	0	0.712364153061595	0.037
COG1553	Sulfur relay (sulfurtransferase) complex TusBCD TusD component, DsrE family	1	1	0	0.776949446539397	0.039
COG4655	Uncharacterized membrane protein	1	1	0	0.559016994374947	0.042
COG0585	tRNA(Glu) U13 pseudouridine synthase TruD	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2850	Ribosomal protein L16 Arg81 hydroxylase, contains JmjC domain	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2914	Putative antitoxin component Pasi (RatB) of the RatAB toxin-antitoxin module, ubiquitin-RnfH superfamily	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2915	Regulator of phage lambda lysogenization HflD, binds to CII and stimulates its degradation	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2924	Fe-S cluster biosynthesis and repair protein YggX	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2959	Uncharacterized conserved protein HemX (no evidence of involvement in heme biosynthesis)	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2969	Stringent starvation protein B	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2976	Putative negative regulator of RcsB-dependent stress response	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2991	Uncharacterized protein	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG3026	Negative regulator of sigma E activity	1	1	0	0.770080032083649	0.043

COG3028	Ribosomal 50S subunit-associated protein YjgA (function unknown), DUF615 family	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG3079	Uncharacterized conserved protein YgfB, UPF0149 family	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG3086	Positive regulator of sigma E activity	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG3116	Cell division protein FtsL, interacts with FtsB, FtsL and FtsQ	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG4137	ABC-type uncharacterized transport system, permease component	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG4445	tRNA isopentenyl-2-thiomethyl-A-37 hydroxylase MiaE (synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin)	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG4535	Mg2 and Co2 transporter CorC, contains CBS pair and CorC-HlyC domains	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG4658	Na+translocating ferredoxin:NAD oxidoreductase RNF, RnfD subunit	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG4660	Na+translocating ferredoxin:NAD oxidoreductase RNF, RnfE subunit	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG2918	Gamma-glutamylcysteine synthetase	1	1	0	0.775509570759525	0.044
COG3165	Ubiquinone biosynthesis protein UbiJ, contains SCP2 domain	1	1	0	0.775509570759525	0.046
COG1026	Zn-dependent peptidase, M16 (insulinase) family	1	1	0	0.654154125674752	0.05
COG3031	Type II secretory pathway, component PulC	1	1	0	0.836003268363058	0.002
COG3156	Type II secretory pathway, component PulK	1	1	0	0.818846572159806	0.005
COG3167	Tfp pilus assembly protein PilO	1	1	0	0.794192702982069	0.007
COG3168	Tfp pilus assembly protein PilP	1	1	0	0.794192702982069	0.007
COG4796	Type II secretory pathway, component HofQ	1	1	0	0.76768571679651	0.009
COG1868	Flagellar motor switch protein FliM	1	1	0	0.836949678620487	0.01
COG1450	Type II secretory pathway component GspD/PulD (secretin)	1	1	0	0.802838565985202	0.011
COG4972	Tfp pilus assembly protein, ATPase PilM	1	1	0	0.786722339097443	0.015
COG4795	Type II secretory pathway, component PulJ	1	1	0	0.775509570759525	0.015
COG3149	Type II secretory pathway, component PulM	1	1	0	0.780355831579797	0.017
COG3297	Type II secretory pathway, component PulL	1	1	0	0.780355831579797	0.017
COG1317	Flagellar biosynthesis/type III secretory pathway protein FliH	1	1	0	0.780355831579797	0.018
COG3166	Tfp pilus assembly protein PilN	1	1	0	0.764444242571033	0.019
COG2165	Type II secretory pathway, pseudopilin PulG	1	1	0	0.807798899788803	0.019
COG4968	Tfp pilus assembly protein PilE	1	1	0	0.761734547567644	0.03

COG2804	Type II secretory pathway ATPase GspE/PuE or T4P pilus assembly pathway ATPase PilB	1	1	0	0.825109500129402	0.032
COG5008	Tfp pilus assembly protein, ATPase PilU	1	1	0	0.723797552333698	0.038
COG4970	Tfp pilus assembly protein FimT	1	1	0	0.786543382654494	0.038
COG4969	Tfp pilus assembly protein, major pilin PilA	1	1	0	0.697384337392312	0.041
COG2901	DNA-binding protein Fis (factor for inversion stimulation)	1	1	0	0.770080032083649	0.043
COG1886	Flagellar motor switch/type III secretory pathway protein FliN	1	1	0	0.741668870083101	0.044
COG1419	Flagellar biosynthesis GTPase FlhF	1	1	0	0.770080032083649	0.05
COG2913	Outer membrane protein assembly factor BamE, lipoprotein component of the BamABCDE complex	0	1	1	0.885822290775626	0.001
COG0524	Sugar or nucleoside kinase, ribokinase family	0	1	1	0.948572683778809	0.001
COG1247	L-amino acid N-acyltransferase YncA	0	1	1	0.877058019307029	0.002
COG2355	Zn-dependent dipeptidase, microsomal dipeptidase homolog	0	1	1	0.877058019307029	0.002
COG0287	Prephenate dehydrogenase	0	1	1	0.898717034272917	0.002
COG0775	Nucleoside phosphorylase	0	1	1	0.877058019307029	0.002
COG1473	Metal-dependent amidase/aminoacylase/carboxypeptidase	0	1	1	0.911065050197679	0.002
COG0736	Phosphopantetheinyl transferase (holo-ACP synthase)	0	1	1	0.878132997719366	0.004
COG1435	Thymidine kinase	0	1	1	0.832050294337844	0.004
COG0295	Cytidine deaminase	0	1	1	0.85485041426511	0.004
COG2017	Galactose mutarotase or related enzyme	0	1	1	0.80860754006264	0.005
COG3185	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and related hemolysins	0	1	1	0.85485041426511	0.005
COG0039	Malate/lactate dehydrogenase	0	1	1	0.884287153597957	0.005
COG0673	Predicted dehydrogenase	0	1	1	0.885110776358584	0.005
COG4325	Uncharacterized membrane protein	0	1	1	0.80860754006264	0.006
COG4123	tRNA1(Val) A37 N6-methylase TrmN6	0	1	1	0.80860754006264	0.006
COG1574	Predicted amidohydrolase YtcJ	0	1	1	0.832050294337844	0.006
COG2365	Protein tyrosine/serine phosphatase	0	1	0	0.687184270936277	0.007
COG1609	DNA-binding transcriptional regulator, LacI/PurR family	0	1	1	0.859683565907949	0.007
COG2057	Acyl CoA:acetate/3-ketoacid CoA transferase, beta subunit	0	1	1	0.870525327217502	0.007

COG0599	Uncharacterized conserved protein YurZ, alkylhydroperoxidase/carboxymuconolactone decarboxylase family	0	1	1	0.836435907158344	0.008
COG3565	Predicted dioxygenase of extradiol dioxygenase family	0	1	1	0.784464540552736	0.008
COG3153	Predicted N-acetyltransferase YhbS	0	1	1	0.827558042683669	0.008
COG1820	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	0	1	1	0.784464540552736	0.009
COG0822	NifU homolog involved in Fe-S cluster formation	0	1	1	0.784464540552736	0.009
COG0612	Predicted Zn-dependent peptidase	0	1	1	0.842175852530223	0.009
COG2761	Predicted dithiol-disulfide isomerase, DsbA family	0	1	1	0.867297514896568	0.009
COG2723	Beta-glucosidase/6-phospho-beta-glucosidase/beta-galactosidase	0	1	1	0.75955452531275	0.011
COG2211	Na??? symporter or related transporter	0	1	1	0.784464540552736	0.012
COG3508	Homogentisate 1,2-dioxygenase	0	1	1	0.784464540552736	0.012
COG1201	Lhr-like helicase	0	1	1	0.75955452531275	0.013
COG1396	Transcriptional regulator, contains XRE-family HTH domain	0	1	1	0.814197317244314	0.014
COG1472	Periplasmic beta-glucosidase and related glycosidases	0	1	1	0.870403850091453	0.014
COG1748	Saccharopine dehydrogenase, NADP-dependent	0	1	1	0.75955452531275	0.016
COG0274	Deoxyribose-phosphate aldolase	0	1	1	0.75955452531275	0.016
COG2066	Glutaminase	0	1	1	0.733799385705343	0.017
COG1228	Imidazolonepropionase or related amidohydrolase	0	1	1	0.854653870924721	0.017
COG3200	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase, class II	0	1	1	0.837818339417381	0.019
COG1897	Homoserine trans-succinylase	0	1	1	0.733799385705343	0.02
COG1828	Phosphoribosylformylglycinamide (FGAM) synthase, PurS component	0	1	1	0.733799385705343	0.02
COG1058	Predicted nucleotide-utilizing enzyme related to molybdopterin-biosynthesis enzyme MoeA	0	1	1	0.75955452531275	0.021
COG1922	UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid transferase, WecB/TagA/CpsF family	0	1	1	0.733799385705343	0.022
COG1819	UDP:flavonoid glycosyltransferase YjiC, YdhE family	0	1	1	0.75955452531275	0.022
COG3119	Arylsulfatase A or related enzyme	0	1	1	0.808931163639505	0.025
COG3483	Tryptophan 2,3-dioxygenase (vermillion)	0	1	1	0.733799385705343	0.025
COG1957	Inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	0	1	1	0.779661847311927	0.026
COG5331	Uncharacterized protein	0	1	0	0.624712973578433	0.027

COG3191	L-aminopeptidase/D-esterase	0	1	1	0.733799385705343	0.027
COG1940	Sugar kinase of the NBD/HSP70 family, may contain an N-terminal HTH domain	0	1	1	0.856850598534891	0.027
COG5473	Uncharacterized membrane protein	0	1	1	0.733799385705343	0.028
COG2388	Predicted acetyltransferase, GNAT superfamily	0	1	0	0.691728370329901	0.028
COG0738	Fucose permease	0	1	1	0.733799385705343	0.031
COG2740	Predicted RNA-binding protein YlxR, DUF448 family	0	1	1	0.707106781186548	0.034
COG1785	Alkaline phosphatase	0	1	0	0.733882408773517	0.035
COG5010	Flp pilus assembly protein TadD, contains TPR repeats	0	1	1	0.707106781186548	0.036
COG0818	Diacylglycerol kinase	0	1	1	0.707106781186548	0.037
COG4425	Uncharacterized membrane protein	0	1	0	0.549015882936288	0.038
COG4964	Flp pilus assembly protein, secretin CpaC	0	1	1	0.707106781186548	0.039
COG3823	Glutamine cyclotransferase	0	1	0	0.592807885094734	0.04
COG0246	Mannitol-1-phosphate/altronate dehydrogenases	0	1	1	0.752862284507066	0.041
COG0698	Ribose 5-phosphate isomerase RpiB	0	1	1	0.707106781186548	0.042
COG3843	Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase)	0	1	0	0.502247202333923	0.043
COG5268	Type IV secretory pathway, TrbD component	0	1	0	0.502247202333923	0.043
COG5649	Uncharacterized protein	0	1	0	0.514928650544437	0.05
COG2026	mRNA-degrading endonuclease RelE, toxin component of the RelBE toxin-antitoxin system	1	0	0	0.799435891338951	0.001
COG4637	Predicted ATPase	1	0	0	0.817565994065731	0.001
COG1101	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	1	0	0	0.812365612393064	0.001
COG4120	ABC-type uncharacterized transport system, permease component	1	0	0	0.812365612393064	0.001
COG1030	Membrane-bound serine protease (ClpP class)	1	0	0	0.783119156498941	0.001
COG1350	Predicted alternative tryptophan synthase beta-subunit (paralog of TrpB)	1	0	0	0.786213627541439	0.001
COG4324	Predicted aminopeptidase	1	0	0	0.759611813431798	0.001
COG3526	Predicted selenoprotein, Rdx family	1	0	0	0.845549094392536	0.001
COG4254	Uncharacterized conserved protein, contains LysM and FecR domains	1	0	0	0.792514238190072	0.001
COG3784	Uncharacterized conserved protein YdbL, DUF1318 family	1	0	0	0.863910564476806	0.001
COG3215	Tfp pilus assembly protein PilZ	1	0	0	0.800104595672801	0.001

COG4565	Response regulator of citrate/malate metabolism	1	0	0	0.782369488798505	0.001
COG3829	Transcriptional regulator containing PAS, AAA-type ATPase, and DNA-binding Fis domains	1	0	0	0.817149612070776	0.001
COG2984	ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component	1	0	0	0.83057960388805	0.001
COG4252	Extracellular (periplasmic) sensor domain CHASE2 (specificity unknown)	1	0	0	0.857039977366079	0.001
COG2909	ATP-, maltotriose- and DNA-dependent transcriptional regulator MalT	1	0	0	0.777515715278789	0.001
COG3174	Uncharacterized membrane protein, DUF4010 family	1	0	0	0.786213627541439	0.002
COG4321	Predicted DNA-binding protein, contains Ribbon-helix-helix (RHH) domain	1	0	0	0.798852148368568	0.002
COG3228	Mlc titration factor MtfA, regulates ptsG expression	1	0	0	0.74942621061144	0.002
COG1791	Acireductone dioxygenase (methionine salvage), cupin superfamily	1	0	0	0.766866716697714	0.002
COG1556	L-lactate utilization protein LutC, contains LUD domain	1	0	0	0.797882078613809	0.002
COG3271	Predicted double-glycine peptidase	1	0	0	0.762434909275185	0.002
COG0579	L-2-hydroxyglutarate oxidase LhgO	1	0	0	0.851337176538926	0.002
COG3189	Uncharacterized conserved protein YeaO, DUF488 family	1	0	0	0.71978832867395	0.003
COG5373	Uncharacterized membrane protein	1	0	0	0.781306589438905	0.003
COG5339	Uncharacterized conserved protein YdgA, DUF945 family	1	0	0	0.759611813431798	0.003
COG2876	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase	1	0	0	0.71978832867395	0.003
COG1687	Branched-chain amino acid transport protein AzlD	1	0	0	0.679417460538155	0.003
COG3782	Uncharacterized protein	1	0	0	0.764868549513608	0.003
COG2119	Putative Ca ²⁺ antiporter, TMEM165/GDT1 family	1	0	0	0.771576787688439	0.003
COG1586	S-adenosylmethionine decarboxylase or arginine decarboxylase	1	0	0	0.783873606728343	0.003
COG1139	L-lactate utilization protein LutB, contains a ferredoxin-type domain	1	0	0	0.751845021238148	0.003
COG3528	Uncharacterized protein	1	0	0	0.751629066897563	0.003
COG3687	Predicted metal-dependent hydrolase	1	0	0	0.765021700442547	0.003
COG1078	HD superfamily phosphohydrolase	1	0	0	0.688380415045936	0.004
COG2056	Predicted histidine transporter YuiF, NhaC family	1	0	0	0.735539521407953	0.005
COG0182	Methylthioribose-1-phosphate isomerase (methionine salvage pathway), a paralog of eIF-2B alpha subunit	1	0	0	0.771576787688439	0.005
COG4307	Uncharacterized protein	1	0	0	0.750874689552386	0.005

COG5615	Uncharacterized membrane protein	1	0	0	0.654653670707977	0.006
COG3418	Flagellar biosynthesis/type III secretory pathway chaperone	1	0	0	0.747560969150612	0.006
COG1910	Periplasmic molybdate-binding protein/domain	1	0	0	0.676920249555854	0.007
COG1254	Acylphosphatase	1	0	0	0.733123949953428	0.007
COG5626	Uncharacterized protein	1	0	0	0.715958908694223	0.007
COG5404	Cell division inhibitor SulA, prevents FtsZ ring assembly	1	0	0	0.691668501245082	0.008
COG3320	Thioester reductase domain of alpha aminoadipate reductase Lys2 and NRPSs	1	0	0	0.715958908694223	0.008
COG3170	Tfp pilus assembly protein FimV	1	0	0	0.717841276880309	0.008
COG1464	ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface antigen	1	0	0	0.71323207227186	0.009
COG3901	Regulator of nitric oxide reductase transcription	1	0	0	0.696416379371789	0.009
COG3978	Acetolactate synthase small subunit, contains ACT domain	1	0	0	0.663661211515623	0.01
COG5377	Phage-related protein, predicted endonuclease	1	0	0	0.629255697565985	0.011
COG1135	ABC-type methionine transport system, ATPase component	1	0	0	0.713619713474896	0.011
COG2011	ABC-type methionine transport system, permease component	1	0	0	0.713619713474896	0.011
COG0392	Uncharacterized membrane protein YbhN, UPF0104 family	1	0	0	0.737672849546405	0.011
COG2187	Aminoglycoside phosphotransferase family enzyme	1	0	0	0.695696356336706	0.012
COG2065	Pyrimidine operon attenuation protein/uracil phosphoribosyltransferase	1	0	0	0.770080032083649	0.012
COG2431	Uncharacterized membrane protein YbjE, DUF340 family	1	0	0	0.660754955149346	0.013
COG4908	Uncharacterized protein, contains a NRPS condensation (elongation) domain	1	0	0	0.608998457205863	0.013
COG3315	O-Methyltransferase involved in polyketide biosynthesis	1	0	0	0.663661211515623	0.014
COG2865	Predicted transcriptional regulator, contains HTH domain	1	0	0	0.613878889228481	0.015
COG4150	ABC-type sulfate transport system, periplasmic component	1	0	0	0.660754955149346	0.015
COG3190	Flagellar biogenesis protein FliO	1	0	0	0.758411477975388	0.015
COG5607	CHAD domain (function unknown)	1	0	0	0.641426980589819	0.016
COG3323	Uncharacterized protein	1	0	0	0.758411477975388	0.016
COG1061	Superfamily II DNA or RNA helicase	1	0	0	0.787359619347018	0.016
COG3203	Outer membrane protein (porin)	1	0	0	0.791297044662334	0.016
COG1669	Predicted nucleotidyltransferase	1	0	0	0.623354977979184	0.019

COG3067	Na ⁺ antiporter NhaB	1	0	0	0.717841276880309	0.019
COG1373	Predicted ATPase, AAA superfamily	1	0	0	0.660754955149346	0.02
COG3290	Sensor histidine kinase regulating citrate/malate metabolism	1	0	0	0.659849416256709	0.02
COG2923	Sulfur relay (sulfurtransferase) complex TusC component, DsrF/TusC family	1	0	0	0.756989899447257	0.02
COG2206	HD-GYP domain, c-di-GMP phosphodiesterase class II (or its inactivated variant)	1	0	0	0.772956508316464	0.02
COG3144	Flagellar hook-length control protein FliK	1	0	0	0.677062206199872	0.023
COG1683	Uncharacterized conserved protein YbbK, DUF523 family	1	0	0	0.638802012626152	0.024
COG3101	Elongation factor P hydroxylase (EF-P beta-lysylation pathway)	1	0	0	0.745897872609673	0.024
COG0699	Replication fork clamp-binding protein CrfC (dynammin-like GTPase family)	1	0	0	0.583383351196948	0.026
COG4787	Flagellar basal body rod protein FlgF	1	0	0	0.745897872609673	0.026
COG3749	Uncharacterized conserved protein, DUF934 family	1	0	0	0.756989899447257	0.027
COG4226	Predicted nuclease of the RNase H fold, HicB family	1	0	0	0.583383351196948	0.028
COG2110	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase (regulator of RNase III), contains Macro domain	1	0	0	0.618901161817369	0.031
COG3113	ABC-type transporter Mla maintaining outer membrane lipid asymmetry, MlaB component, contains STAS domain	1	0	0	0.717841276880309	0.032
COG5470	Uncharacterized conserved protein, DUF1330 family	1	0	1	0.756485605589439	0.032
COG3868	Uncharacterized protein	1	0	0	0.598593198533203	0.037
COG3255	Putative sterol carrier protein	1	0	0	0.675082901299412	0.037
COG2168	Sulfur transfer complex TusBCD TusB component, DsrH family	1	0	0	0.716201565508068	0.037
COG1479	Uncharacterized conserved protein, contains ParB-like and HNH nuclease domains	1	0	0	0.579882519363824	0.042
COG1513	Cyanate lyase	1	0	0	0.669247541394635	0.042
COG1639	HD-like signal output (HDOD) domain, no enzymatic activity	1	0	0	0.74230748895809	0.042
COG1067	Predicted ATP-dependent protease	1	0	0	0.730508977213734	0.044
COG4263	Nitrous oxide reductase	1	0	0	0.579882519363824	0.049
COG4314	Nitrous oxide reductase accessory protein NosL	1	0	0	0.579882519363824	0.049
COG3068	Uncharacterized protein YjaG, DUF416 family	1	0	0	0.659849416256709	0.05
COG3954	Phosphoribulokinase	1	0	0	0.659849416256709	0.05
COG2942	Mannose or cellobiose epimerase, N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase family	0	0	1	0.641688947919748	0.02

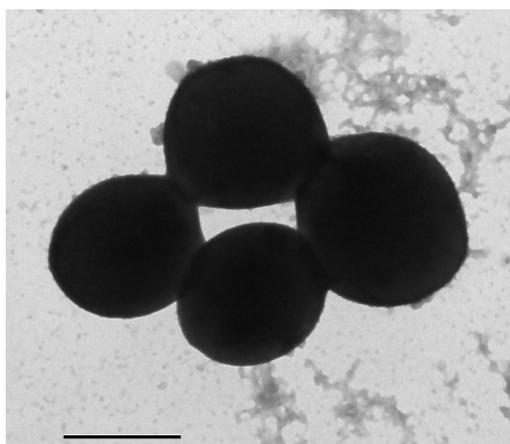
COG1834	N-Dimethylarginine dimethylaminohydrolase	0	0	1	0.594088525786005	0.021
COG1874	Beta-galactosidase GanA	0	0	1	0.641688947919748	0.029
COG2872	Ser-tRNA(Ala) deacylase AlaX (editing enzyme)	0	0	1	0.594088525786005	0.033
COG3302	DMSO reductase anchor subunit	0	0	1	0.594088525786005	0.033
COG4583	Sarcosine oxidase gamma subunit	0	0	1	0.673127149194349	0.039
COG2143	Thioredoxin-related protein	0	0	1	0.594088525786005	0.043
COG5616	TolB amino-terminal domain (function unknown)	0	0	1	0.629143767476028	0.046

Annexe 7 : Pourcentages d'identité de la séquence du gène de l'ARNr 16S entre la souche MOLA 401^T et ses plus proches parentes. Les pourcentages les plus élevés sont en évidence en gras.

1 : MOLA 401^T; 2: *Palleronia soli* CAU1105^T; 3: *Palleronia abyssalis* 221-F1^T; 4: *Palleronia marisminoris* B33^T; 5: *Maribius salinus* CL-SP27^T; 6: *Maribius pelagius* B5-6^T; 7: *Maribius pontilimi* GH1-23^T; 8: *Pseudomaribius aestuariivivens* DBTF-15^T; 9: *Profundibacterium mesophilum* KAUST100406-0324^T; 10: *Boseongicola aestuarii* CECT 8489^T; 11: *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	96,03	95,75	96,25	95,66	95,66	96,38	96,90	95,16	94,88	94,04
2		97,91	96,68	94,36	94,36	94,24	96,10	94,01	93,07	94,86
3			96,79	95,22	95,22	95,46	95,37	94,25	93,21	95,22
4				95,30	95,30	94,76	95,82	93,29	93,15	94,35
5					99,86	97,63	96,68	95,38	95,09	94,64
6						97,63	96,68	95,32	95,09	94,64
7							95,72	95,21	94,99	94,20
8								93,50	93,94	92,40
9									96,40	94,49
10										93,12

Annexe 8 : Observation en microscopie électronique des cellules MOLA 401^T colorées négativement.



Annexe 9 : Pourcentages d'AAI entre la souche MOLA 401^T et des plus proches parentes.

1 : MOLA 401^T; 2: *Palleronia marisminoris* B33^T; 3: *Maribius salinus* CL-SP27^T; 4: *Maribius pelagius* B5-6^T; 5: *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T.

	2	3	4	5
1	73,40	71,06	70,98	71,35
2	-	70,26	70,01	70,26
3		-	97,46	71,82
4			-	71,65

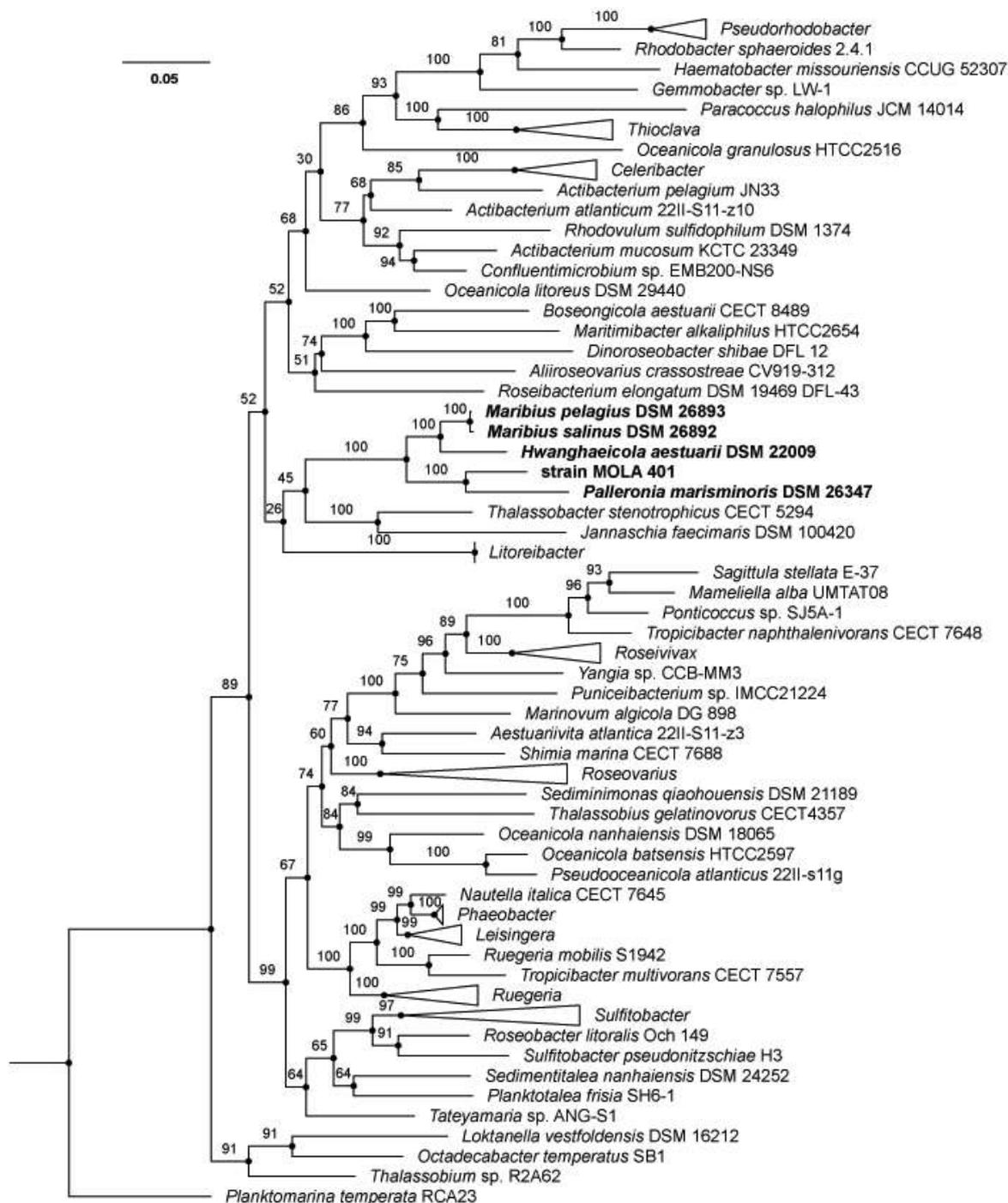
Annexe 10 : Pourcentages POCP entre la souche MOLA 401^T et ses plus proches parentes.

1 : MOLA 401^T; 2: *Palleronia marisminoris* B33^T; 3: *Maribius salinus* CL-SP27^T; 4: *Maribius pelagius* B5-6^T; 5: *Hwanghaeicola aestuarii* Y26^T.

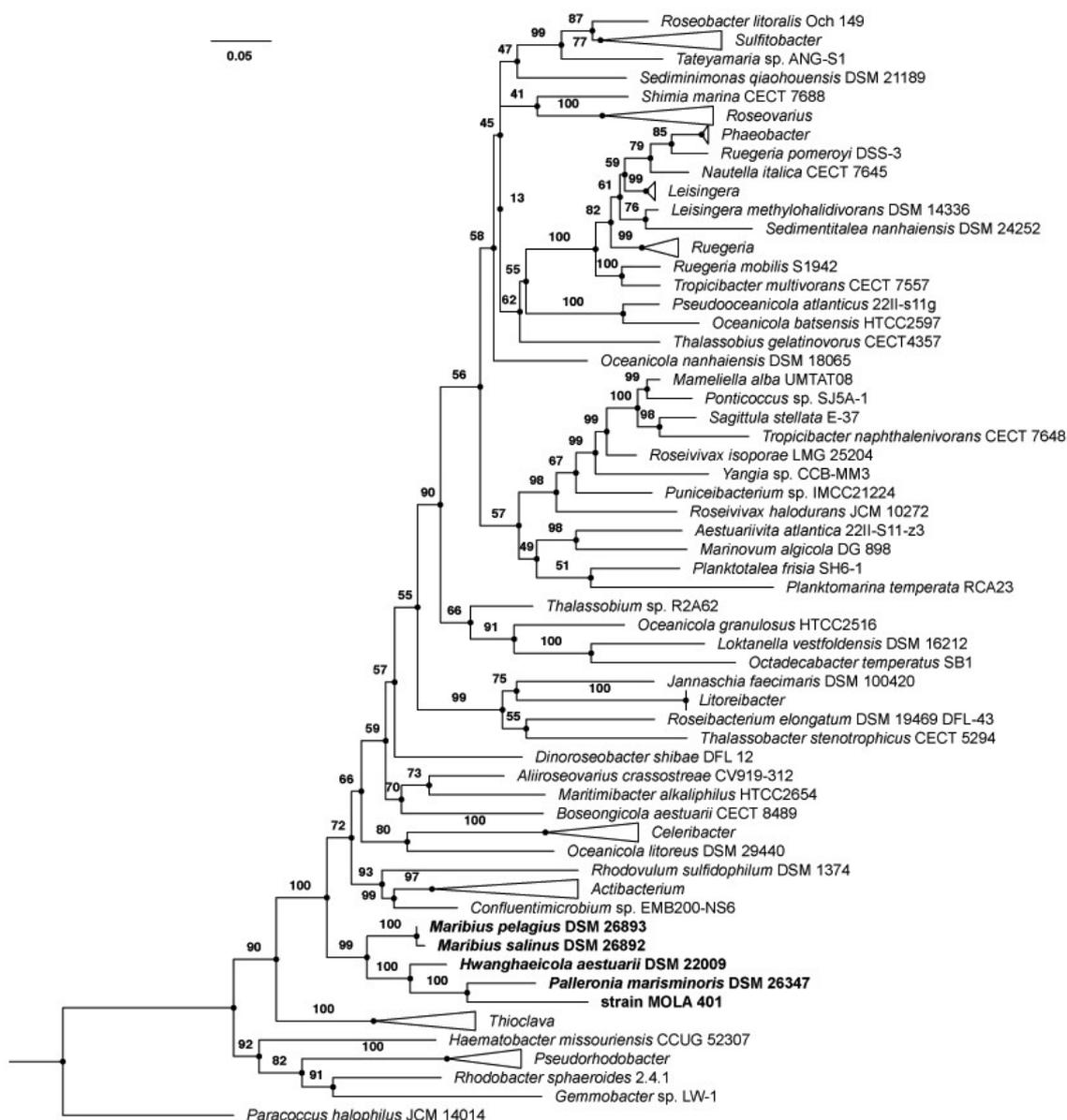
	2	3	4	5
1	57,88	62,77	61,95	54,68
2	-	58,46	57,23	54,23
3		-	86,80	57,02
4			-	56,46

Annexe 11 : Arbres phylogénétiques basés sur les séquences de *rpoC* (a) et *rpoD* (b), montrant la position de la souche MOLA 401^T et ses plus proches parentes. Les valeurs de Bootstrap sont les pourcentages de 1000 replicas. Échelle: 0.05 substitution par position nucléotidique.

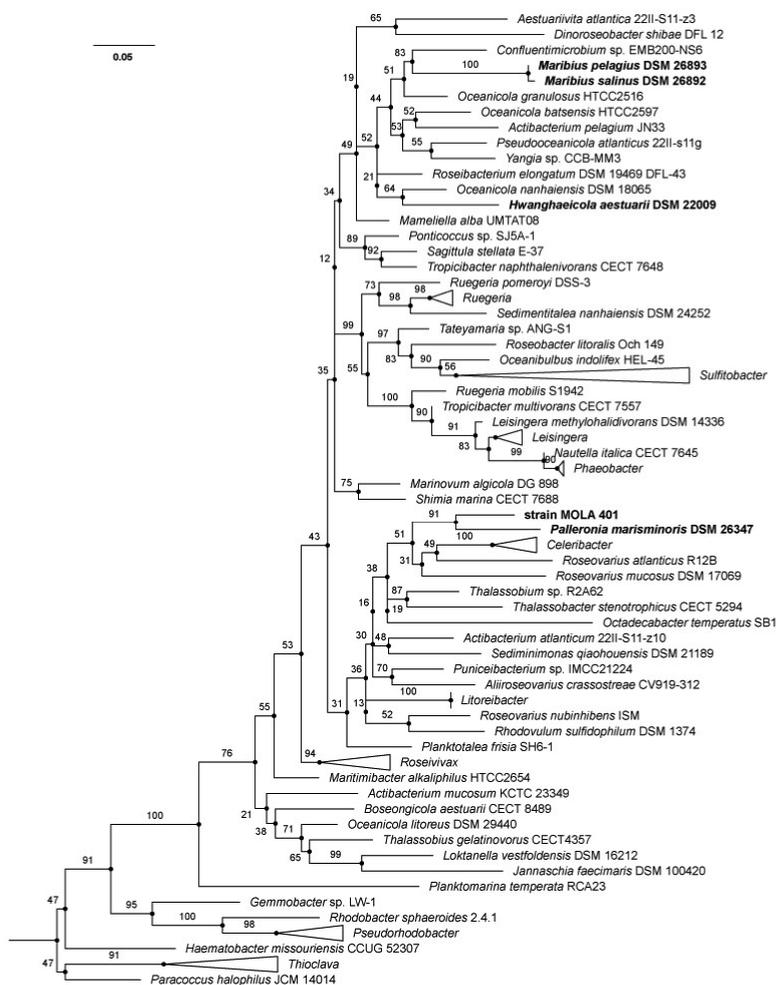
a



b



Annexe 12 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences de *recA* montrant la position de la souche MOLA 401^T et ses plus proches parentes. Les valeurs de Bootstrap sont les pourcentages de 1000 replicas. Échelle : 0.05 substitution par position nucléotidique.



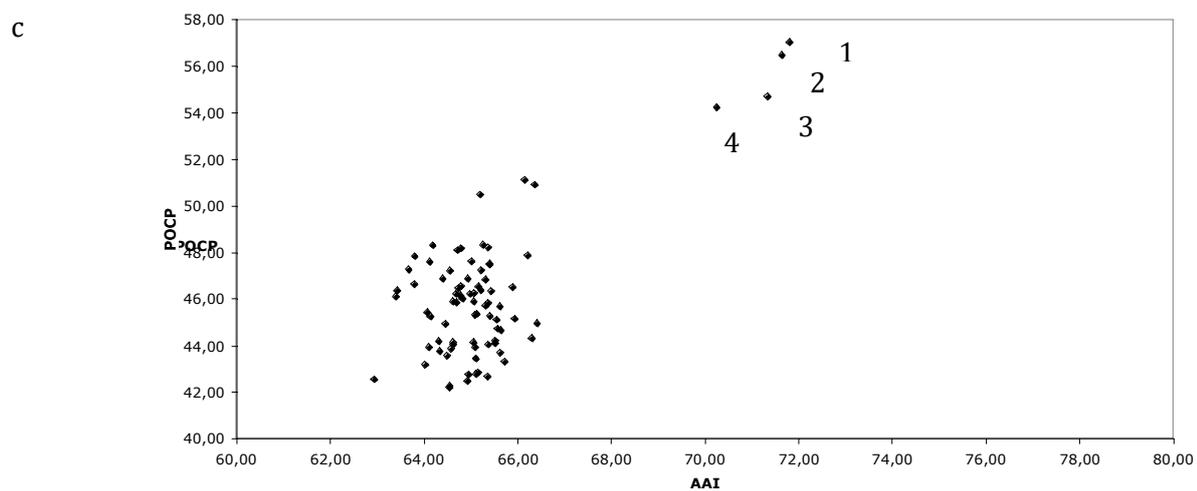
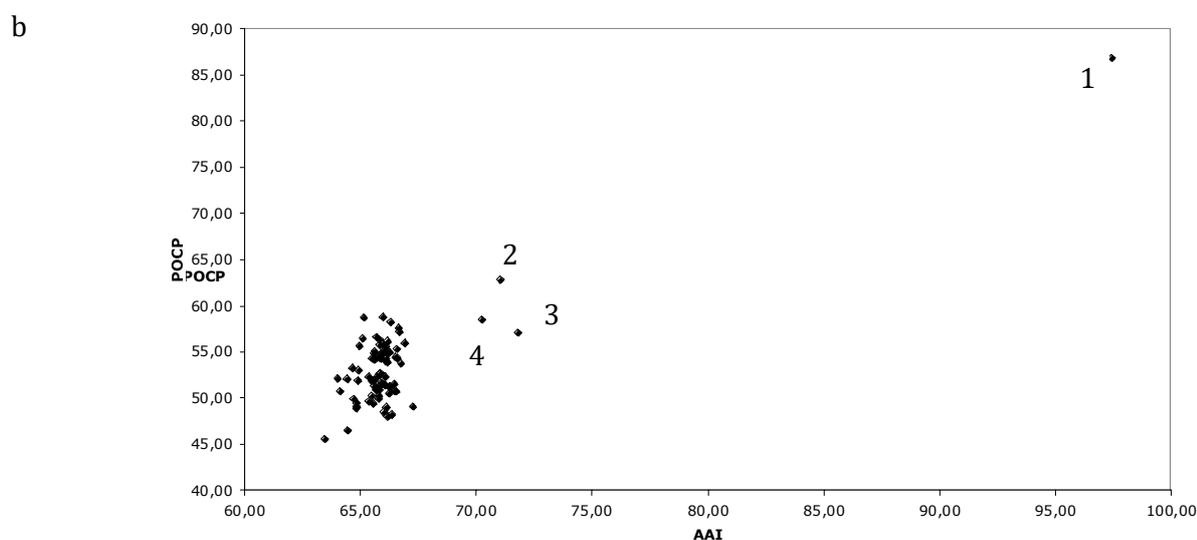
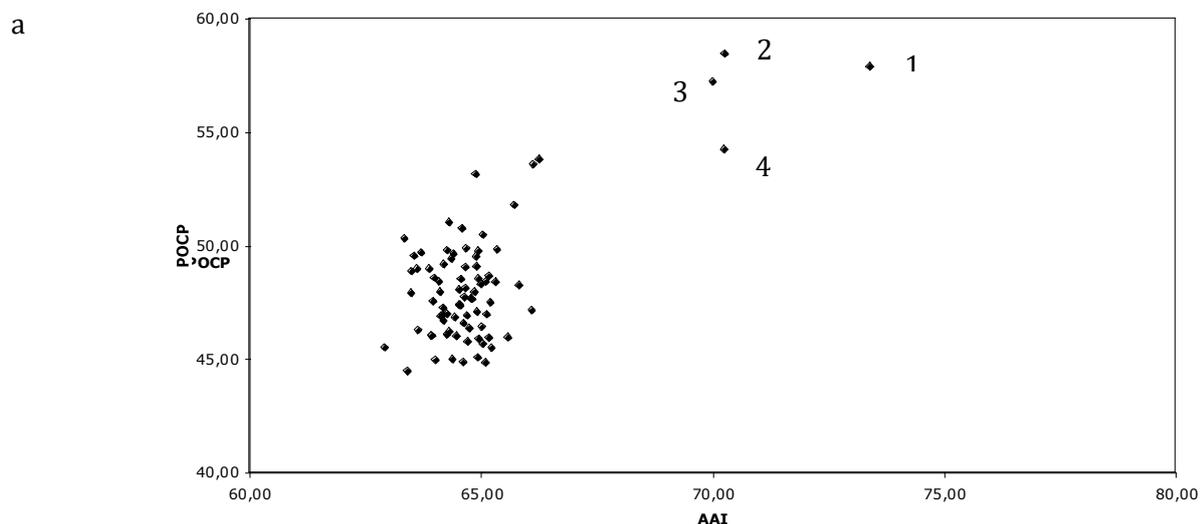
Annexe 13 : Coefficient de corrélation de Pearson pour les différentes métriques. CG : core-gènes.

	<i>gyrB</i>	<i>rpoC</i>	<i>rpoD</i>	<i>recA</i>	CG	ANI	AAI	POCP
16S	0,679	0,631	0,673	0,601	0,643	0,291	0,550	0,432
<i>gyrB</i>	-	0,672	0,69	0,538	0,825	0,376	0,726	0,531
<i>rpoC</i>		-	0,765	0,552	0,799	0,439	0,741	0,612
<i>rpoD</i>			-	0,63	0,799	0,436	0,723	0,524
<i>recA</i>				-	0,619	0,412	0,567	0,331
CG					-	0,542	0,907	0,659
ANI						-	0,693	0,422
AAI							-	0,765

*

Annexe 14 : Distribution des comparaisons de génomes selon les valeurs d'AAI et de POCP.

a : *P. marisminoris* B33^T contre (1) MOLA 401^T, (2) *M. salinus* CL-SP27^T, (3) *H. aestuarii* Y26^T et (4) *M. pelagius* B5-6^T. b: *M. salinus* CL-SP27^T contre (1) *M. pelagius* B5-6^T, (2) MOLA 401^T, (3) *H. aestuarii* Y26^T and (4) *P. marisminoris* B33^T. c: *H. aestuarii* Y26^T contre (1) *M. salinus* CL-SP27^T, (2) *M. pelagius* B5-6^T, (3) MOLA 401^T et (4) *P. marisminoris* B33^T.



RÉSUMÉ

En milieu marin le carbone organique particulaire (POC) représente 25 % du carbone organique total. Sa dégradation est réalisée par des microorganismes hétérotrophes ayant mis en place diverses stratégies pour parvenir à le dissoudre et l'assimiler. Peu d'études se sont intéressées à la dégradation des composés polymériques et/ou hydrophobes, quasiment insolubles dans l'eau constituant le POC. Parmi ces composés, on retrouve les lipides et les hydrocarbures regroupés sous le terme de COH (composés organiques hydrophobes). La dégradation des COH est réalisée par des bactéries dites oléolytiques ayant entre autre pour stratégie la formation de biofilms également qualifiés d'oléolytiques. Nos connaissances sur la diversité et la fonctionnalité des biofilms oléolytiques se limitent actuellement aux bactéries spécifiquement étudiées pour leur capacité à dégrader les HC. Ainsi la dégradation des lipides est souvent négligée alors que cette famille de molécules représente une part significative du POC.

La diversité taxonomique des bactéries formant des biofilms oléolytiques a été déterminée par un criblage de 198 souches marines sur 4 substrats : un alcane (paraffine), un triglycéride (tristéarine), un acide gras (acide palmitique) et une cire (l'hexadécyl palmitate). Cette étude a révélé que les bactéries oléolytiques (formant un biofilm sur au moins 1 des substrats) sont relativement répandues parmi les bactéries marines puisque qu'elles représentent 18,7 % des souches testées. Cette étude montre également que les bactéries capables d'assimiler les alcanes sont également capables d'assimiler au moins un lipide. Les bactéries hydrocarbonoclastes, jusqu'alors décrites comme spécialisées, voir restreintes à l'assimilation des hydrocarbures, présentent donc une gamme de substrats s'étendant aux lipides. La corrélation positive entre la capacité d'assimilation des alcanes et l'assimilation des lipides suggère un lien physiologique entre l'assimilation de ces deux familles de COH. L'activité lipase qui est essentielle à l'assimilation des triglycérides mais pas à l'assimilation des alcanes, a été mesurée dans des cultures de souches oléolytiques poussant sur acétate, triglycéride ou hexadécane. Comme attendu, les cultures sur triglycérides montrent toutes une surexpression de l'activité lipases par rapport aux cultures sur acétate. Les cultures sur hexadécane montraient aussi une surexpression de l'activité lipase renforçant l'idée d'un lien physiologique entre dégradation des alcanes et dégradation des lipides. De plus les souches oléolytiques n'ont pas montré de capacité à former un biofilm sur une surface inerte hydrophobe telle que le polystyrène ou sur une surface hydrophile telle que le verre à la hauteur de celles constaté sur COH. Une étude quantitative de l'adhésion sur COH et substrats inertes réalisée par microscopie montre que l'adhésion (dans les conditions testées) n'est pas un facteur déterminant de la formation de biofilm sur ces mêmes substrats. Cela suggère que la spécificité de formation de biofilm sur les substrats COH, ne réside pas dans l'adhésion mais vraisemblablement dans les étapes de développement du biofilm plus tardives.

Enfin, les biofilms oléolytiques mettant en jeu des produits extracellulaires (enzymes et facteurs de solubilisation) qui constituent des biens communs, sont propices à l'établissement de comportements sociaux. Nous avons mis en évidence des comportements synergiques (5/8 des comportements observés) ou compétitifs au sein de biofilm oléolytiques (3/8 des comportements observés).

Mots clés : biofilm, oléolytique, hydrocarbures, alcanes, lipides, hydrocarbonoclaste, adhésion, composés organiques hydrophobes.

ABSTRACT

Particulate organic carbon (POC), in marine environment, accounts for 25% of total organic carbon. POC degradation is carried out by heterotrophic microorganisms which have developed strategies to dissolve and assimilate it. Few studies have investigated the degradation of the polymeric and / or hydrophobic components of POC, which are almost insoluble in the water. Among these compounds, there are lipids and hydrocarbons (HC) grouped under the term of HOCs (hydrophobic organic compounds). The degradation of the HOCs is carried out by oleolytic bacteria which form biofilms at the HOC– water interface. Our knowledge of the diversity and functionality of oleolytic biofilms is mostly limited to HC degrading bacteria, while the degradation of lipids is often neglected although this family of molecules represents a significant part of the POC.

A screening of 198 marine strains on 4 substrates: an alkane (paraffin), a triglyceride (tristearin), a fatty acid (palmitic acid) and a wax ester (hexadecyl palmitate) was performed to determine the taxonomic diversity of bacteria able to form oleolytic biofilms. This study revealed that oleolytic bacteria (forming a biofilm on at least 1 substrate) were relatively widespread among marine bacteria since they represented 18.7% of tested strains. This study also showed that bacteria able to assimilate alkanes were also able to assimilate at least one lipid. Hydrocarbonoclastic bacteria, previously described as specialized, or restricted to the assimilation of hydrocarbons, have actually a substrate range spanning from HC to lipids. The positive correlation between the ability to form a biofilm on alkanes and on lipids suggested a physiological link between the assimilation of these two HOC families. The lipase activity, which is essential for triglycerides assimilation but not for the alkanes assimilation, was measured in oleolytic strains cultures growing on acetate, triglyceride or hexadecane. As expected, overexpression of lipase activity was observed in cultures on triglycerides compared to cultures on acetate. Moreover, overexpression of lipase activity was also observed in cultures on hexadecane reinforcing the idea of a physiological link between alkanes and lipids degradation.

Oleolytic strains exhibited a very weak ability to form a biofilm on the inert surfaces (non-nutritive) polystyrene or glass compared to the HOC nutritive surface indicating that oleolytic strains have a specificity for HOC to form a biofilm. A quantitative study of adhesion on HOC and inert substratums carried out by microscopy shows that adhesion (in the tested conditions) is not a determining factor of the biofilm formation on these same substrates. This suggests that the specificity of biofilm formation on HOC substrates does not reside in adhesion but presumably in later biofilm development stages.

Lastly, oleolytic biofilms, involving extracellular products (enzymes and solubilization factors) that constitute public goods, are favorable to the establishment of social behaviors. We have demonstrated synergistic behaviors (5/8 of observed behaviors) or competitive behaviors (3/8 of observed behaviors) in oleolytic biofilms.

Keywords: biofilm, oleolytic, hydrocarbons, alkane, lipid, hydrocarbonoclastic, adhesion, hydrophobic organic compounds

ECOLE DOCTORALE :
ED SEA (ED211)

LABORATOIRE :
IPREM

Contacts

claudie.barnier@univ-pau.fr
regis.grimaud@univ-pau.fr
laurent.urios@univ-pau.fr