

Diversité & contrôle des biofilms marins en Méditerranée

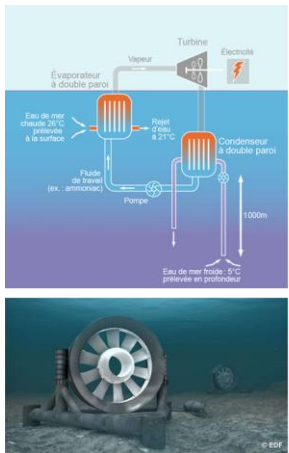
Jean-François Briand, PhD

Maître de conférences
(Ecologie / Ecotoxicologie microbienne)

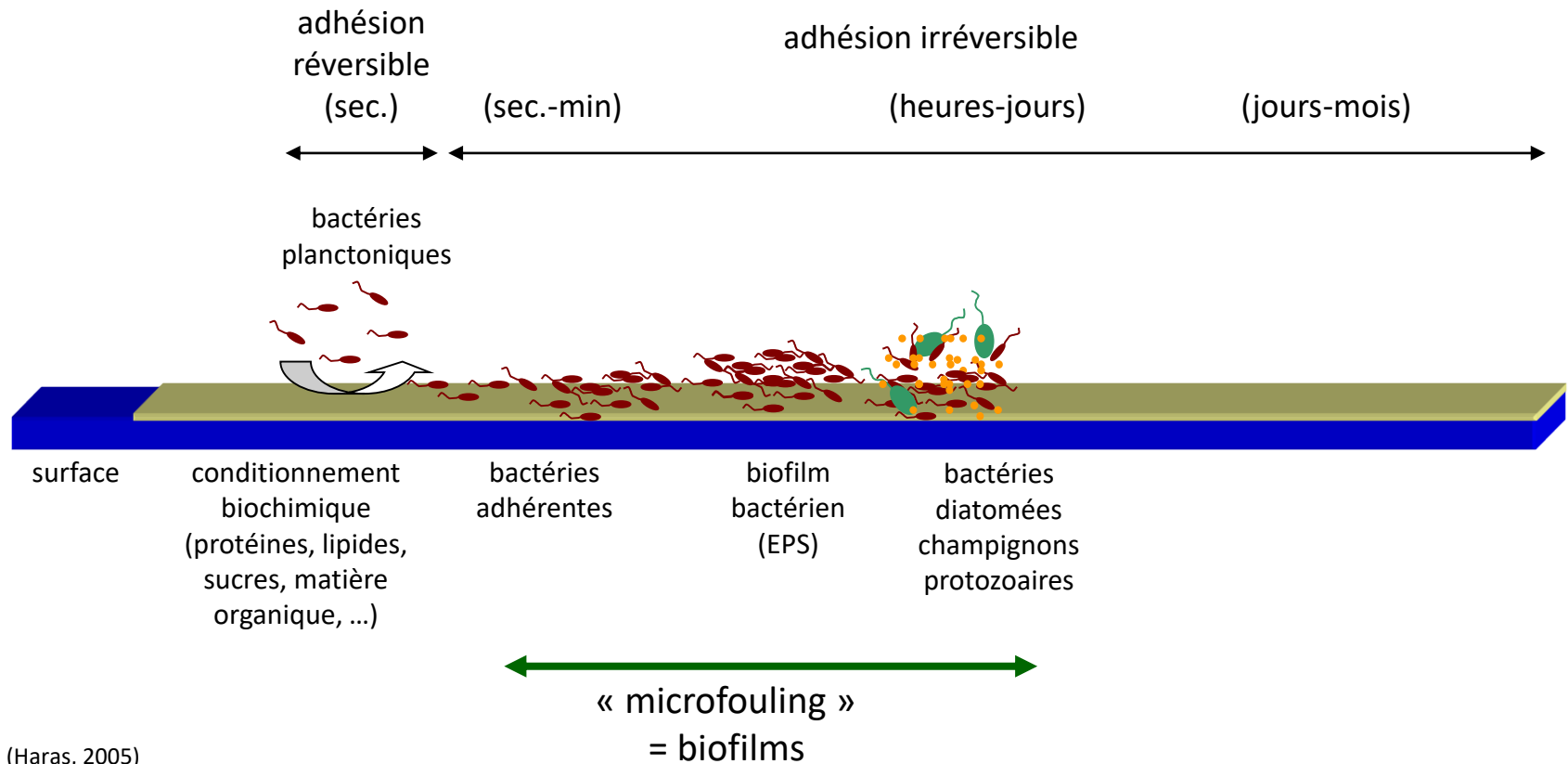
Laboratoire MAPIEM
Université de Toulon (UTLN)
France



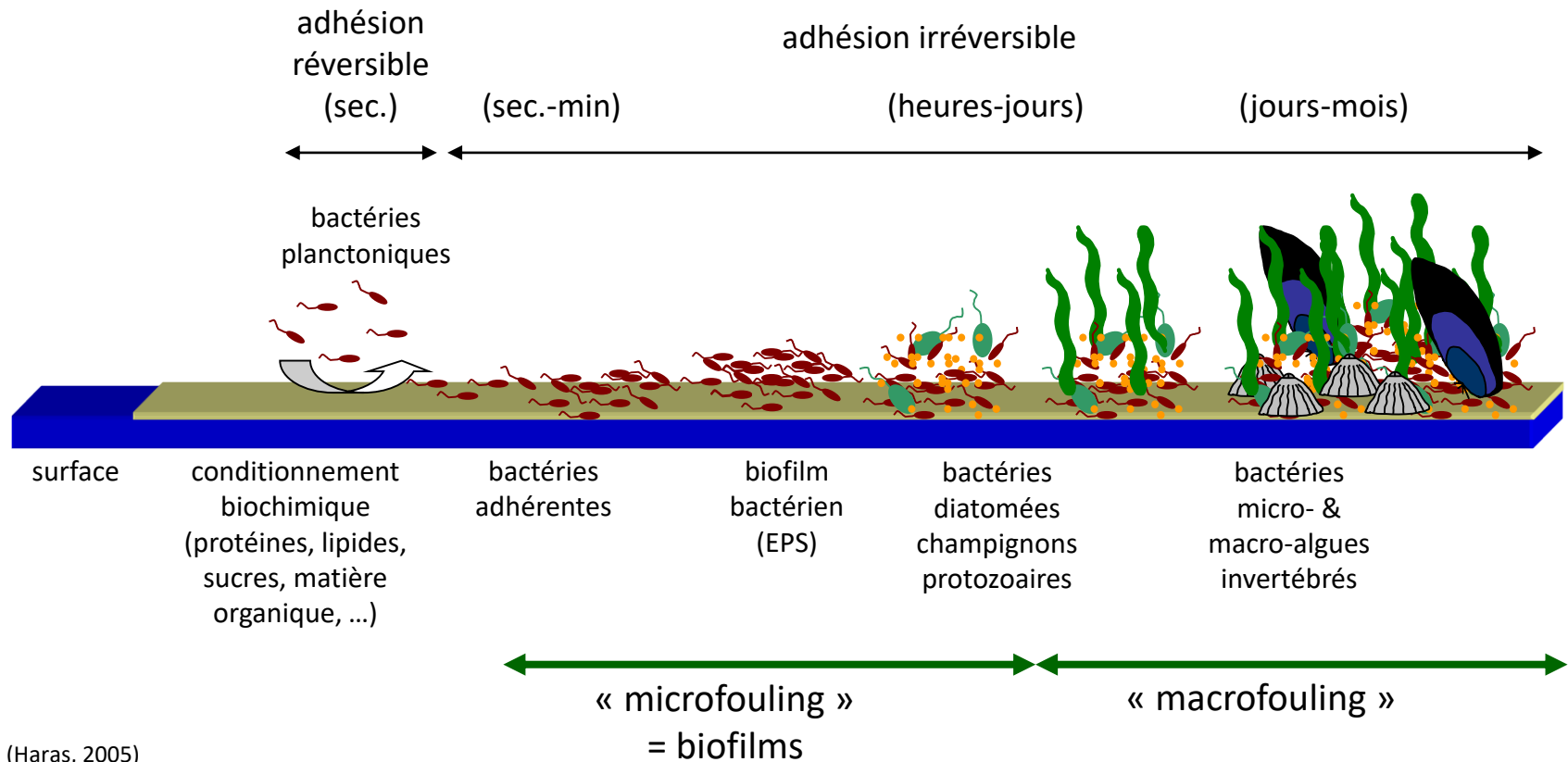
Biofilms
Biofouling



Contexte = biofouling



Contexte = biofouling

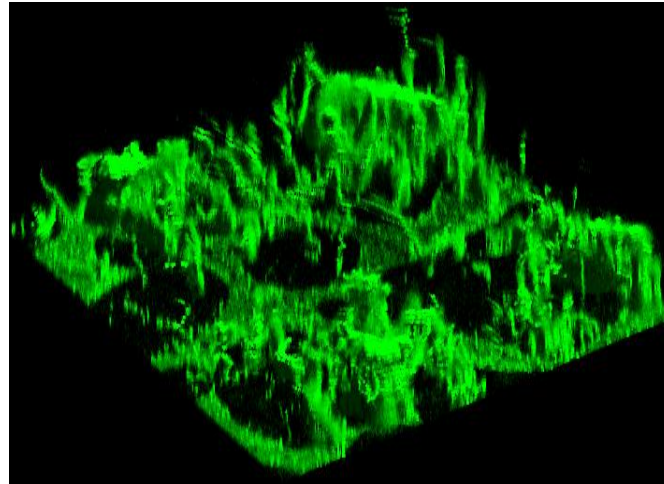


Problématique scientifique : Facteurs de contrôle de la colonisation ?

Biofilm complexe / 3D

Nature des surfaces

(Type de polymère,
Energie de surface,
rugosité,
structuration,
biocides AF, ...)



Paramètres environnementaux

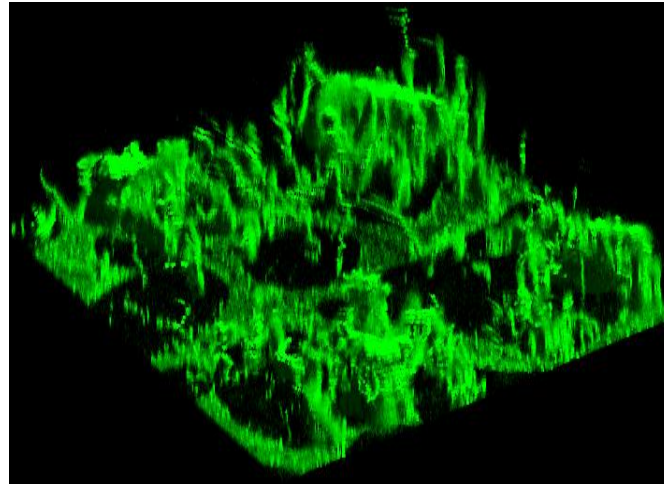
(physico-chimie, pollution,
hydrodynamique, latitude,
milieu pélagique...)

Problématique scientifique : Facteurs de contrôle de la colonisation ?

Biofilm complexe / 3D

Nature des surfaces

(Type de polymère,
Energie de surface,
rugosité,
structuration,
biocides AF, ...)



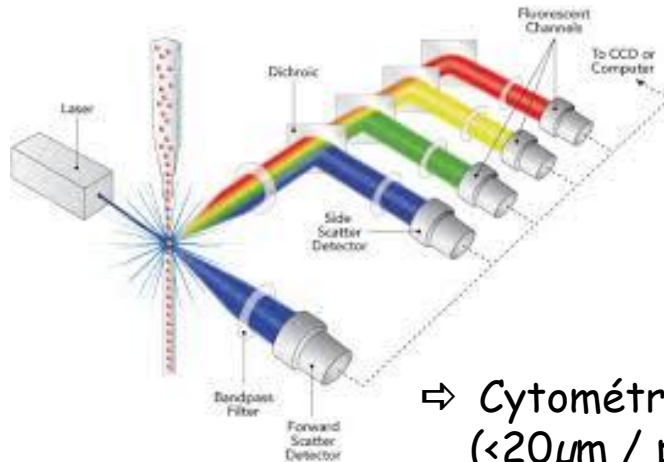
Paramètres environnementaux

(physico-chimie, pollution,
hydrodynamique, latitude,
milieu pélagique...)

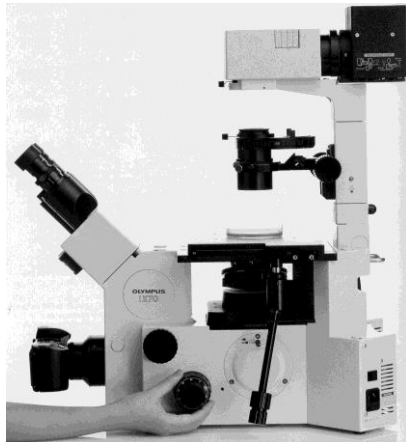
Plan de la conférence :

- Diversité & contrôle des communautés de biofilms sur surfaces artificielles
- Diversité & contrôle des communautés microbiennes épiphytes sur une algue brune

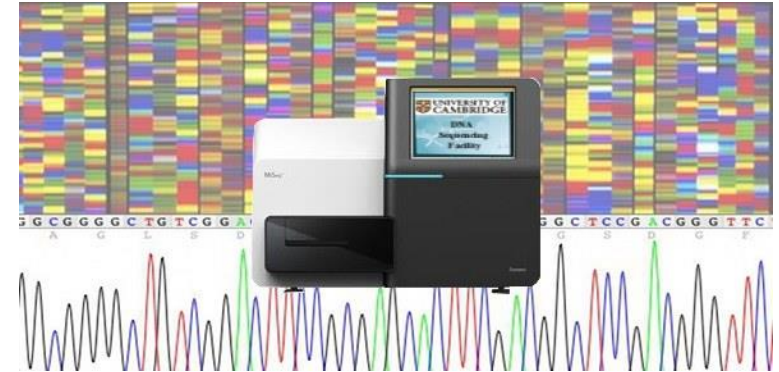
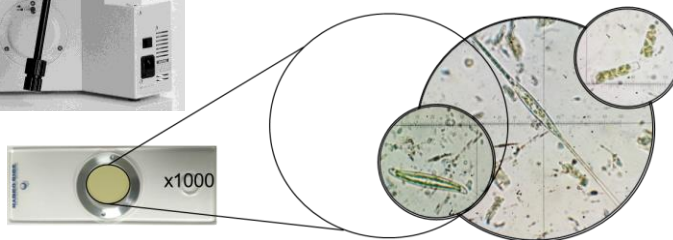
Méthodologies :



⇒ Cytométrie en flux
($<20\mu\text{m}$ / pico-, nano-)



⇒ Microscopie inversée
(Diatomées, $>5\mu\text{m}$)



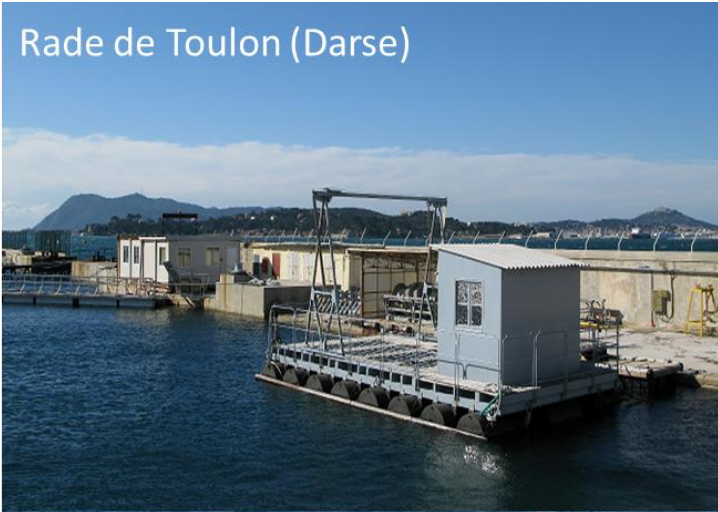
⇒ Séquençage ADN / metabarcoding
(ADNr 16S, 18S -Illumina Miseq)
Traitement Bioinfo (FROGS)
Statistiques multivariées / Network



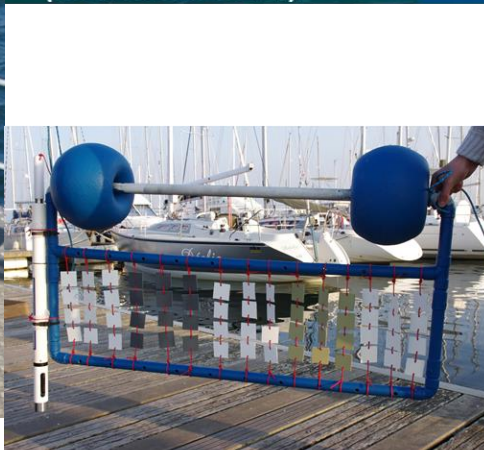
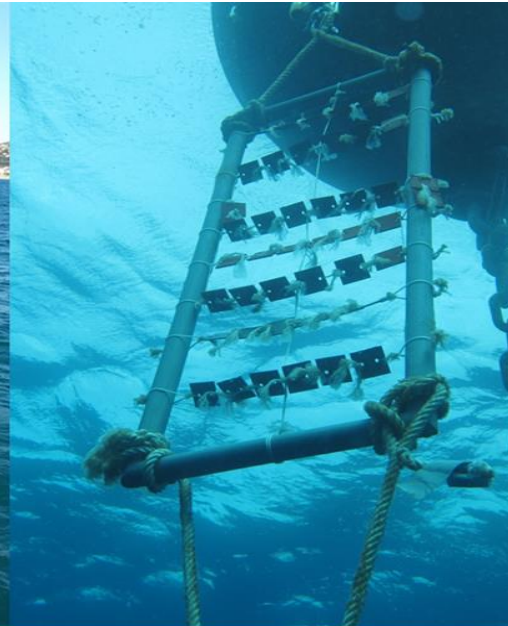
⇒ Microscopie Confocale Balayage Laser
(Marquage fluorescent, Structure 3D)

Diversité & contrôle des biofilms sur surfaces artificielles

Rade de Toulon (Darse)



Baie de Banyuls
(Bouée SOLA)

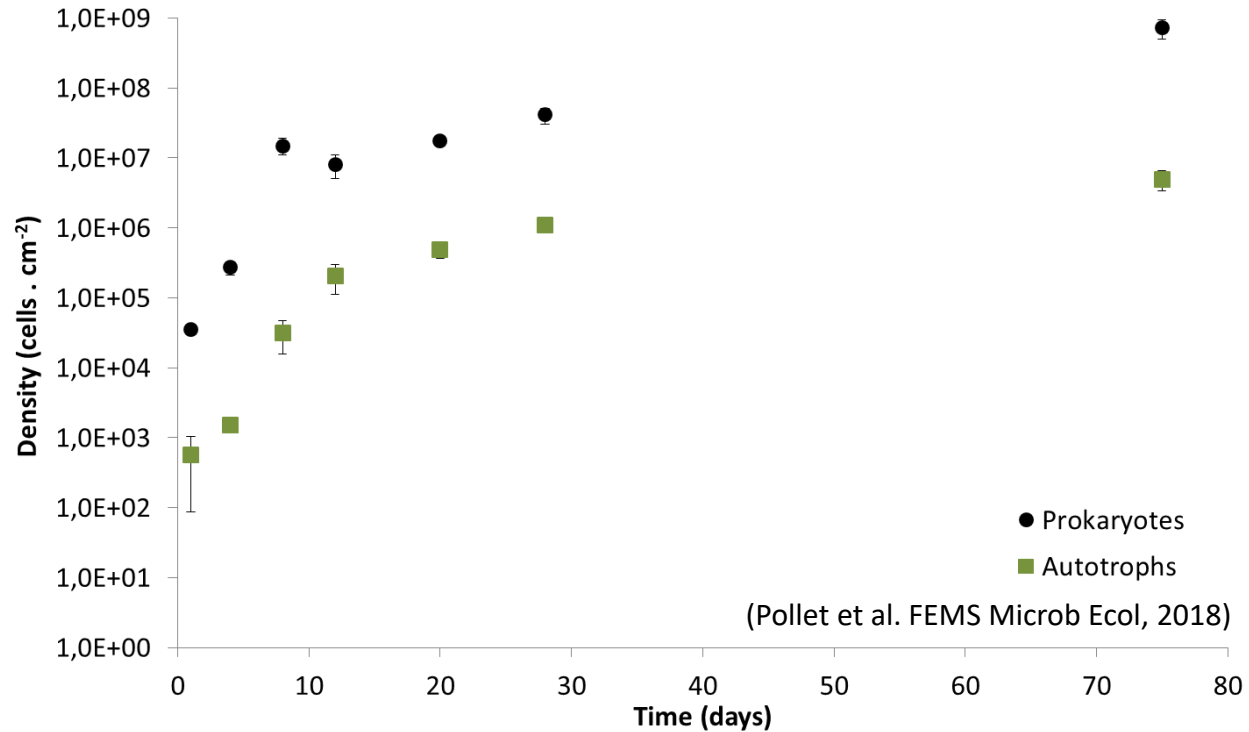


Site d'immersion

Port de Kernevel,
Lorient

1-Variabilité des communautés microbiennes des biofilms marins (PVC)

1-1 Densités microbiennes :

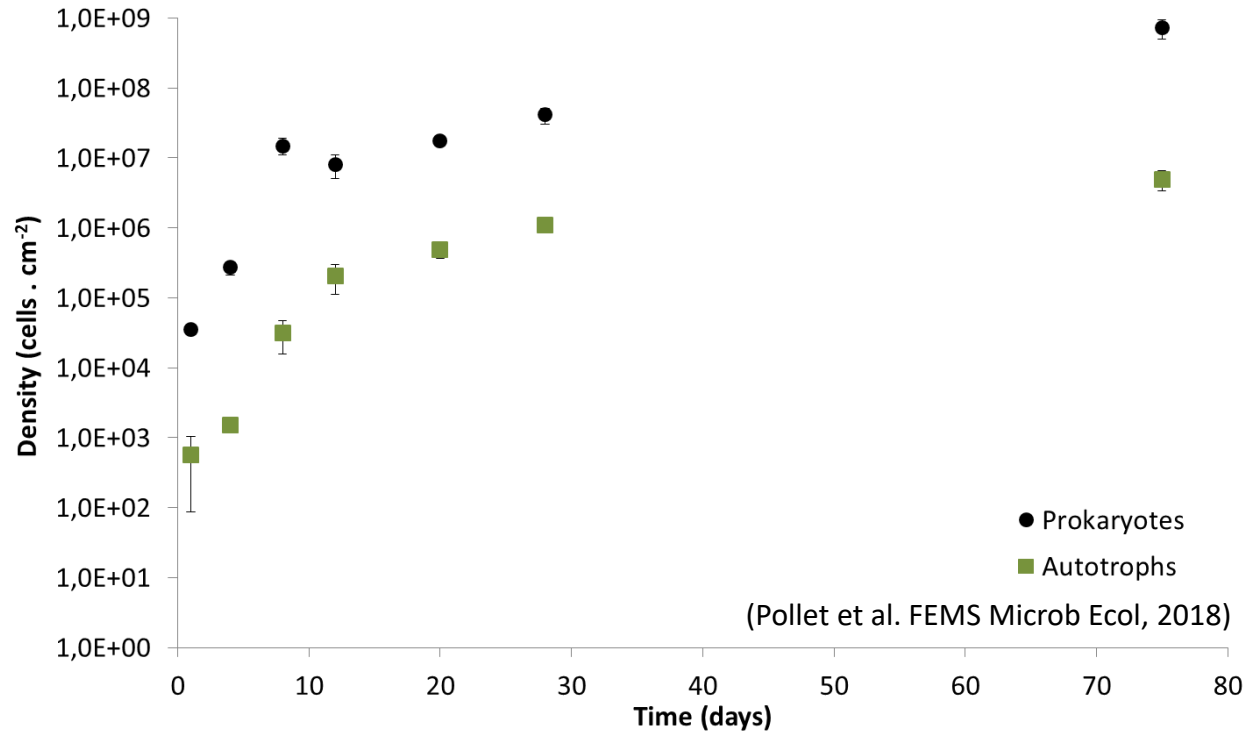


⇒ PVC: Procaryotes hétérotrophes (Bacteria+Archea)
> 10⁴ cell./cm² après 1j
~10⁸- 10⁹ cell./cm² après 75j



1-Variabilité des communautés microbiennes des biofilms marins (PVC)

1-1 Densités microbiennes :



⇒ PVC: Procaryotes hétérotrophes (Bacteria+Archea)

> 10⁴ cell./cm² après 1j

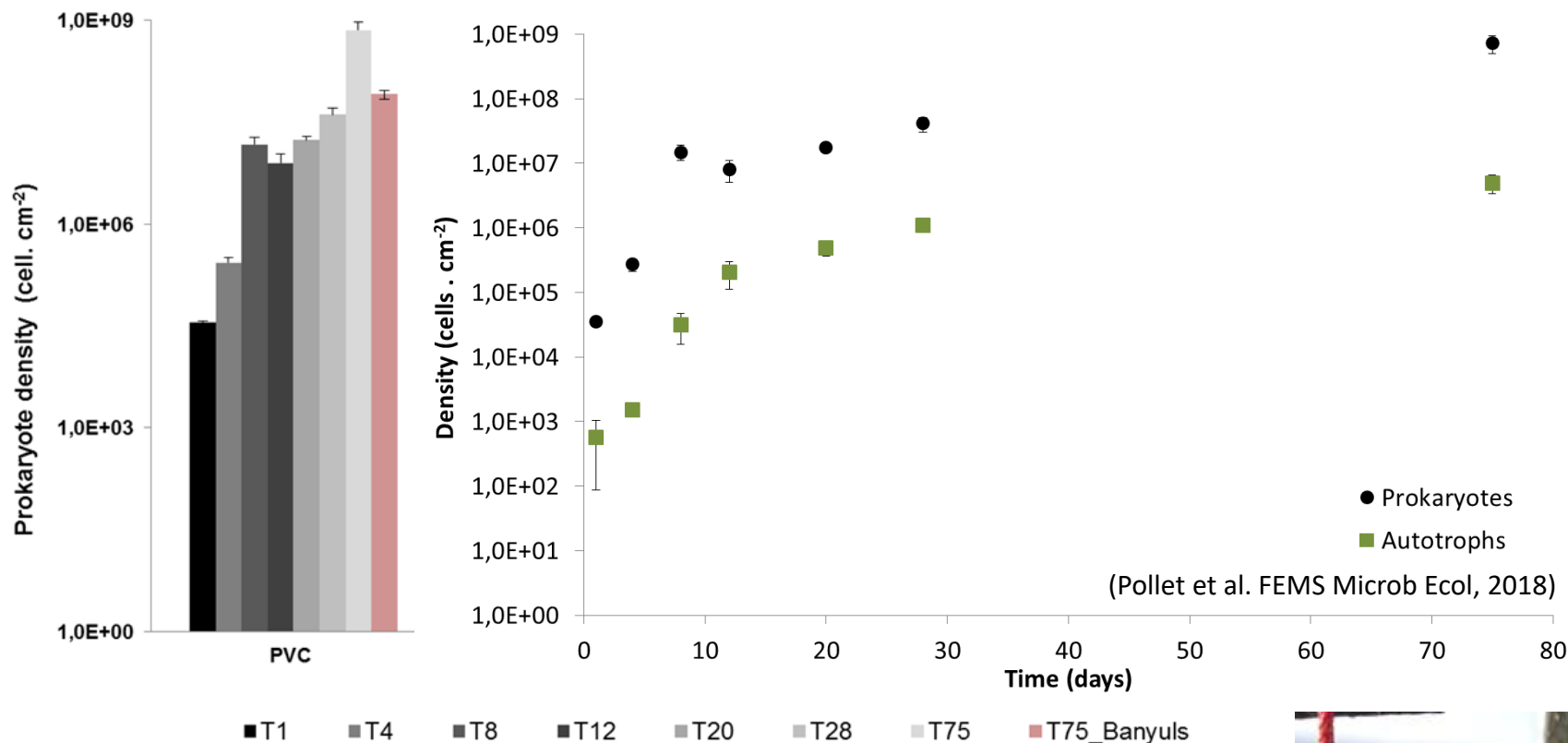
~10⁸- 10⁹ cell./cm² après 75j

⇒ Pico-nanoautotrophes (Eucaryotes, /100-1000)



1-Variabilité des communautés microbiennes des biofilms marins (PVC)

1-1 Densités microbiennes :



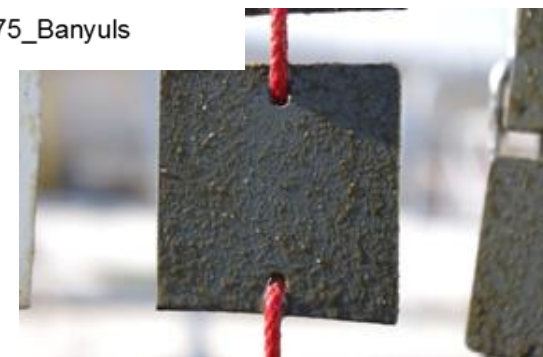
➤ PVC: Procaryotes hétérotrophes (Bacteria+Archea)

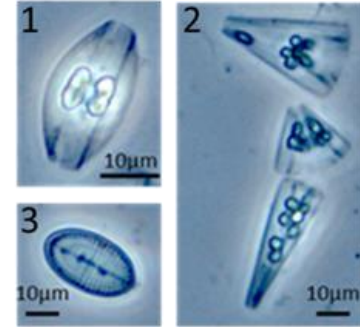
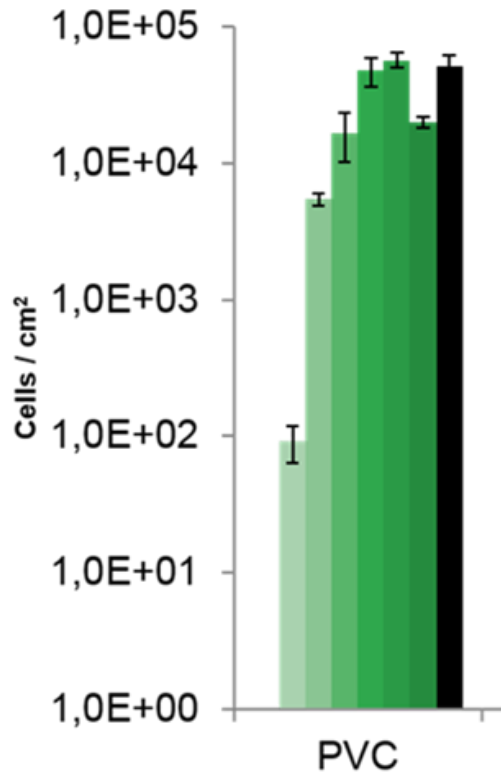
> 10⁴ cell./cm² après 1j

~10⁸- 10⁹ cell./cm² après 75j

➤ Pico-nanoautotrophes (Eucaryotes, /100-1000)

➤ PVC Banyuls : densités + faibles (/10-100)



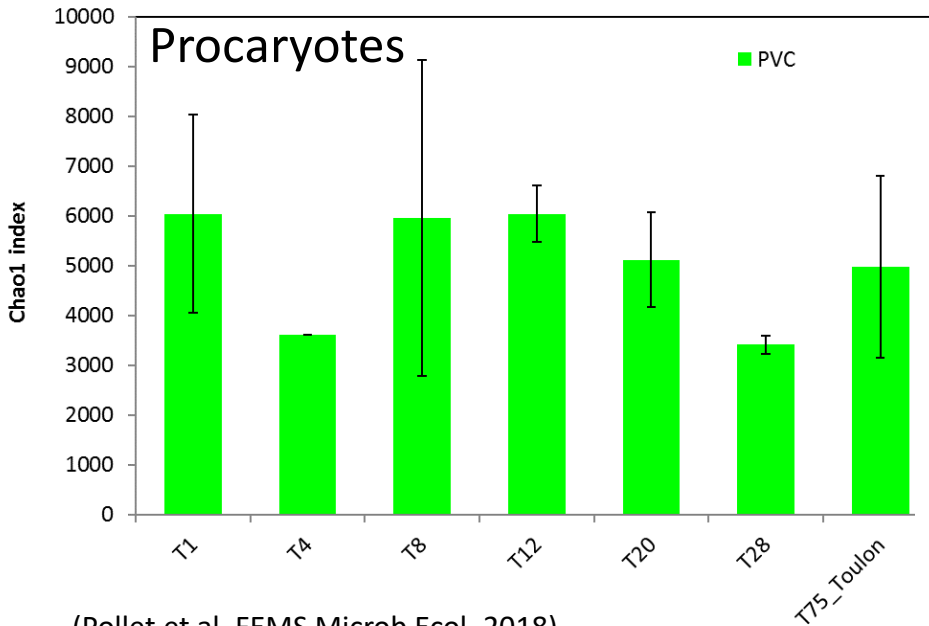


Diatom pictures :
1- *Amphora* sp.
2- *Licmophora* sp.
3- *Coconeis* sp.

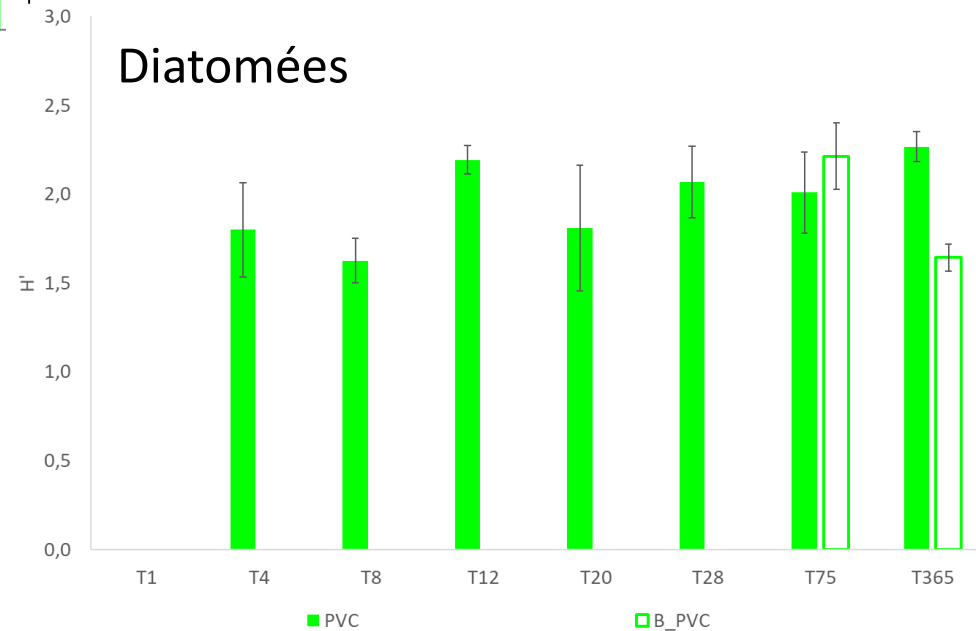
(Barry-Martinet et al. en prep.)

- Délai dans la colonisation des diatomées (4j)
(Eucaryotes/Stramenopiles/Bacillariophyceae)
- Cinétique similaire aux bactéries sur PVC (densités + faibles ...MAIS biovolumes bcq + gds)

1-2 α -diversité des communautés microbiennes :



➡ Diversité élevée et constante
(1j vs 4j)

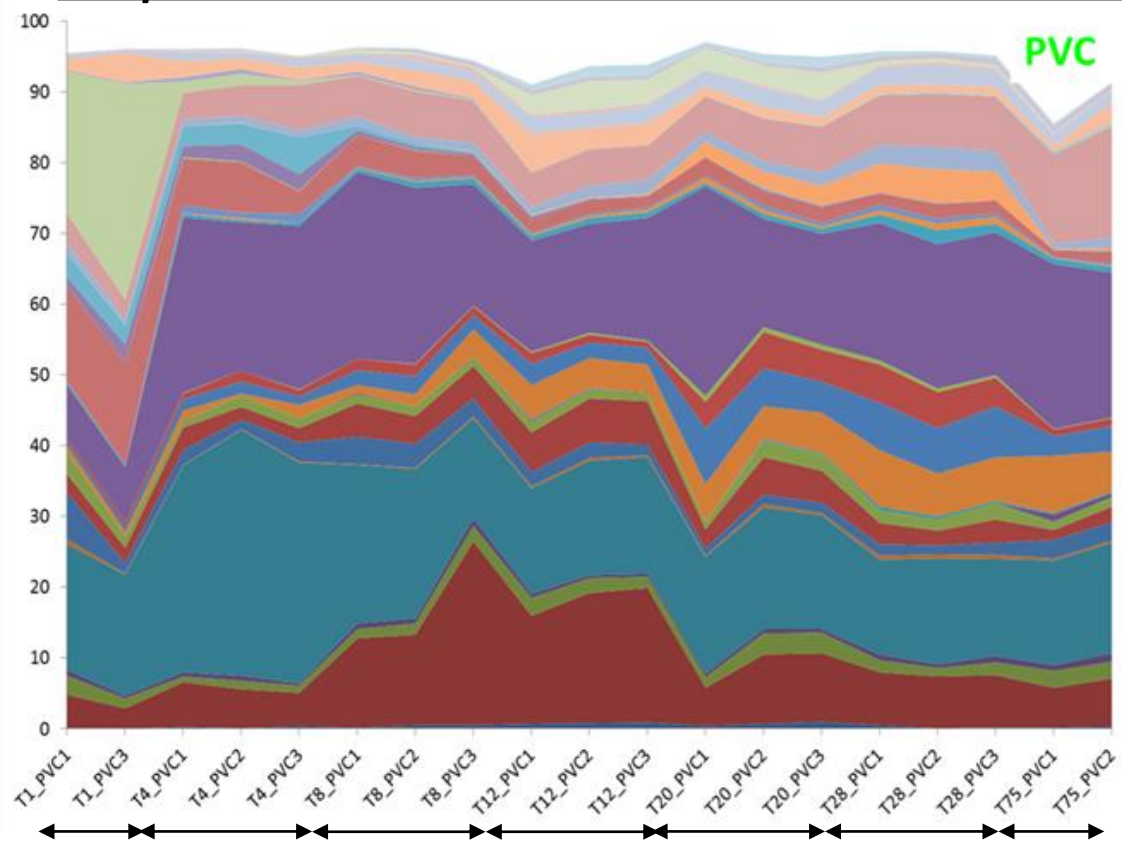


1-3 β -diversité et structure des communautés microbiennes:

Rang taxonomique (taxon)

Règne	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	γ -Proteobacteria
Ordre	Alteromonadales
Famille	Alteromonadaceae
Genre	<i>Marinobacter</i>
Espèce	<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>

1-3 β -diversité et structure des communautés microbiennes:



(Pollet et al. FEMS Microb Ecol, 2018)

⇒ Communautés procaryotes stables au niveau des familles après 4j

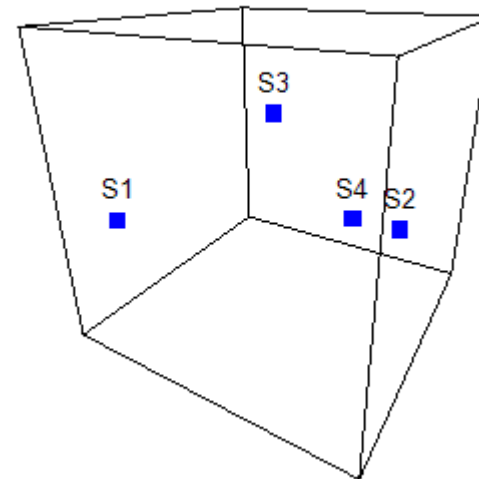
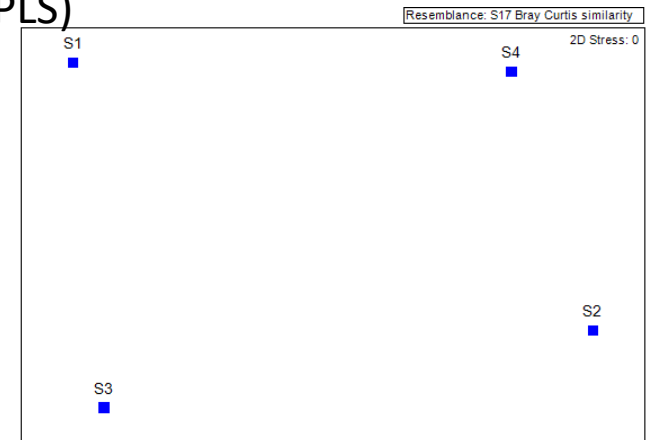
⇒ Archées = 0,1-0,5%

- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiales_unclassified
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiaceae
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Rubritaleaceae
- Verrucomicrobia/Opitutae/Punicicoccaceae
- Proteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria/Vibrionaceae
- Gammaproteobacteria/Piscirickettsiaceae
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillales_unclassified
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillaceae
- Gammaproteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria_order_Incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Granulosicoccaceae
- Gammaproteobacteria/Pseudoalteromonadaceae
- Gammaproteobacteria/Colwelliaceae
- Gammaproteobacteria/Alteromonadales_incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Alteromonadaceae
- Deltaproteobacteria/Bacteriovoraceae
- Betaproteobacteria/Methylophilaceae
- Alphaproteobacteria/Enthrobacteraceae
- Alphaproteobacteria/Rhodobacteraceae
- Alphaproteobacteria/Parvularculaceae
- Alphaproteobacteria/Hyphomonadaceae
- Alphaproteobacteria_unclassified
- Planctomycetes/Planctomycetacia/Planctomycetaceae
- Planctomycetes/Phycisphaerae/Phycisphaeraceae
- Firmicutes/Clostridia/Clostridiales_unclassified
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales_unclassified
- /Bacteroidetes/Sphingobacteria/Saprospiraceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Flammeovirgaceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Cytophagaceae
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Flavobacteriaceae
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Cryomorphaceae
- Bacteroidetes_unclassified
- Bacteria_unclassified
- Actinobacteria_unclassified

Analyses multidimensionnelles (ACP, (N)MDS ou PCoA, PLS)

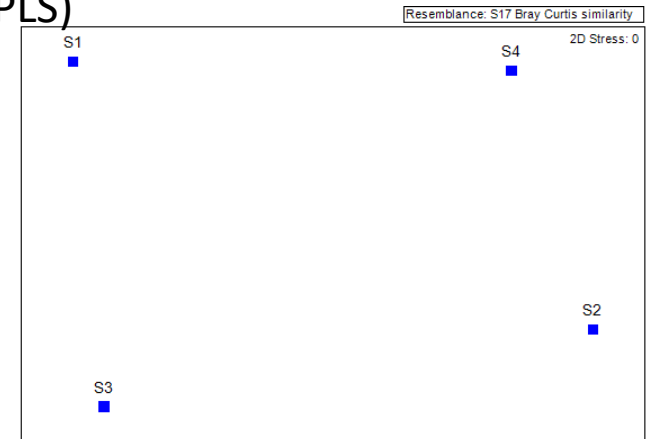
	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4
Bactérie 1	10	1	7	2
Bactérie 2	2	5	0	2

	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4
Bactérie 1	10	1	7	2
Bactérie 2	2	5	0	2
Bactérie 3	0	5	9	2

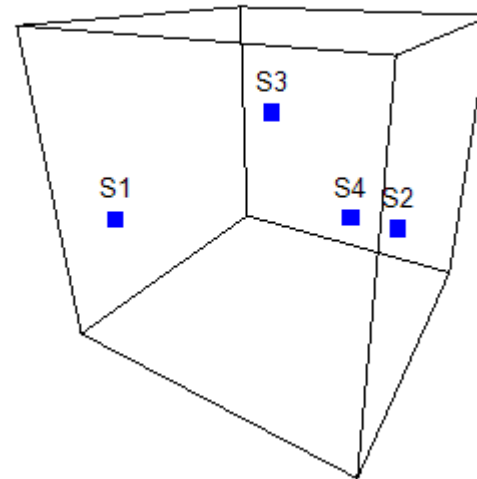


Analyses multidimensionnelles (ACP, (N)MDS ou PCoA, PLS)

	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4
Bactérie 1	10	1	7	2
Bactérie 2	2	5	0	2



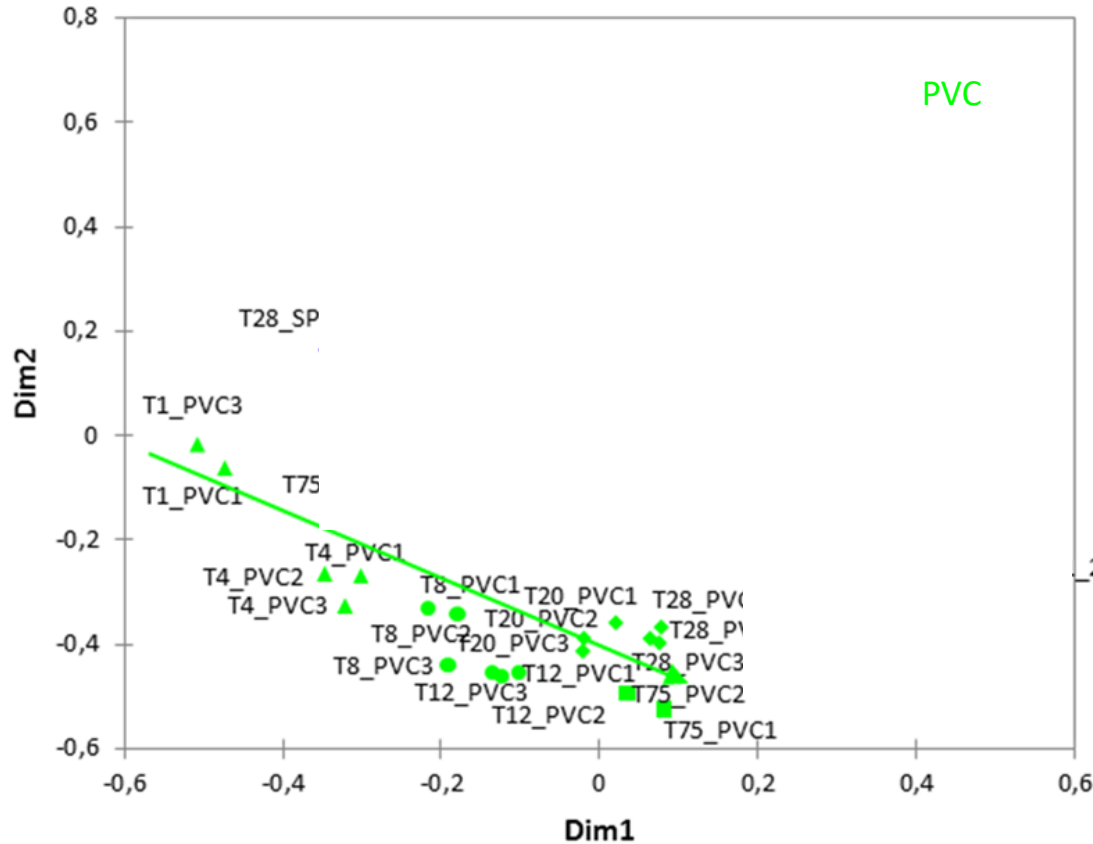
	Ech 1	Ech 2	Ech 3	Ech 4
Bactérie 1	10	1	7	2
Bactérie 2	2	5	0	2
Bactérie 3	0	5	9	2



n bactéries (ou diatomées ou métabolites, ou ...) $\Rightarrow n$ dimensions

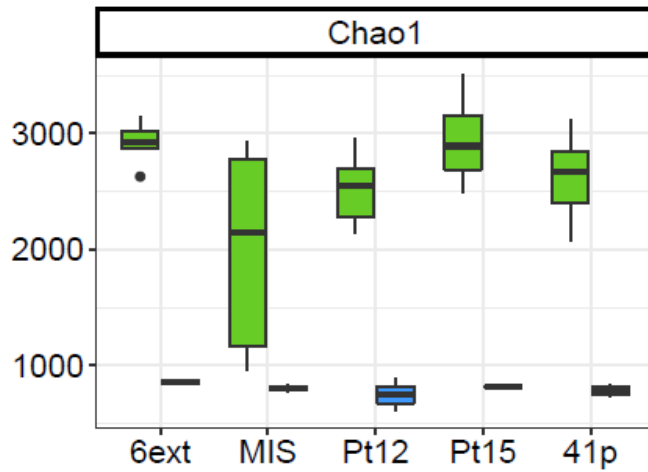
Ech représentés suivant les 2 axes qui contribuent le plus à la dissimilarité entre eux ...

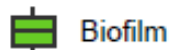
MDS (Bray & Curtis) / Kruskal Stress = 0.184



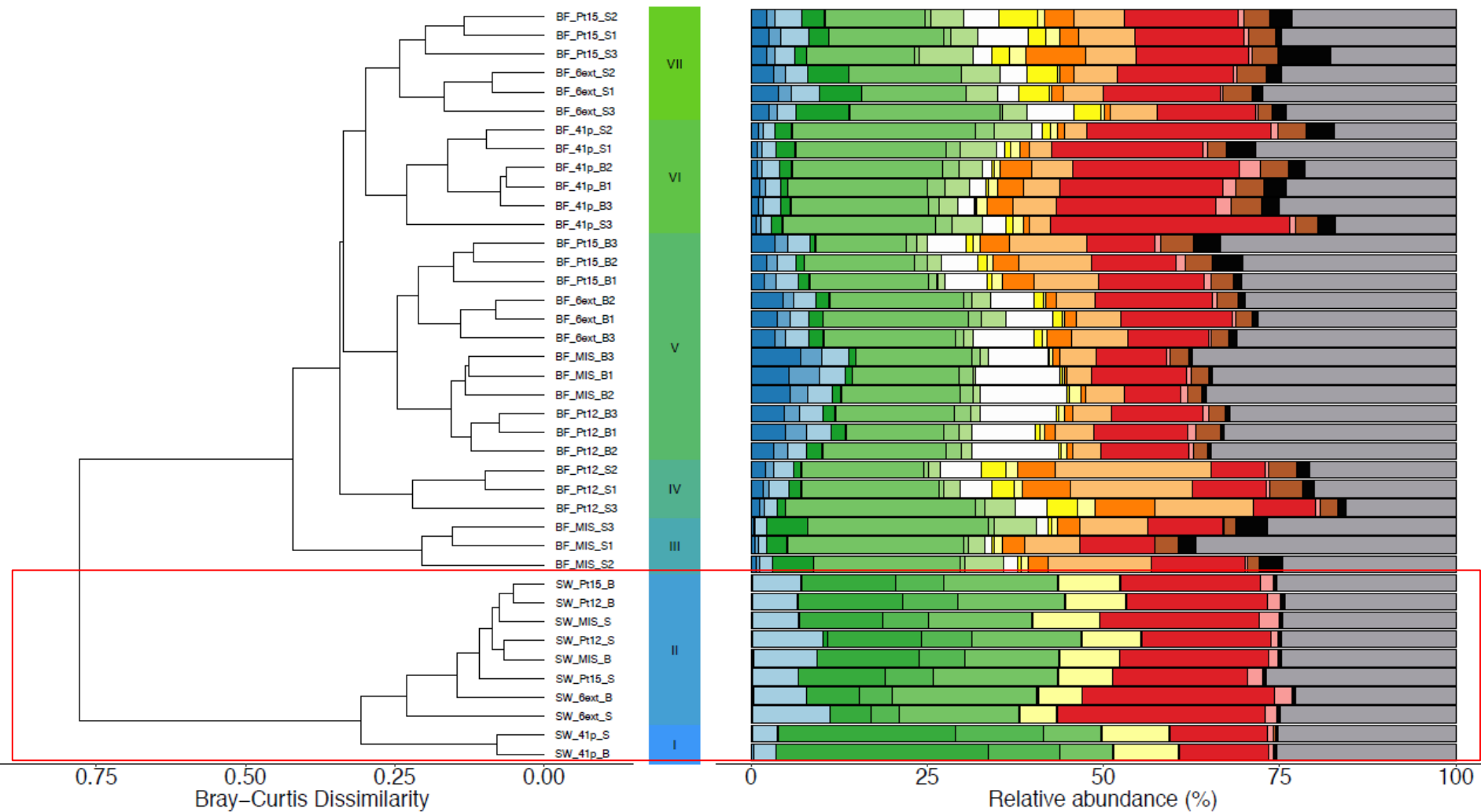
↪ Evolution de la composition
en OTU en fonction du temps

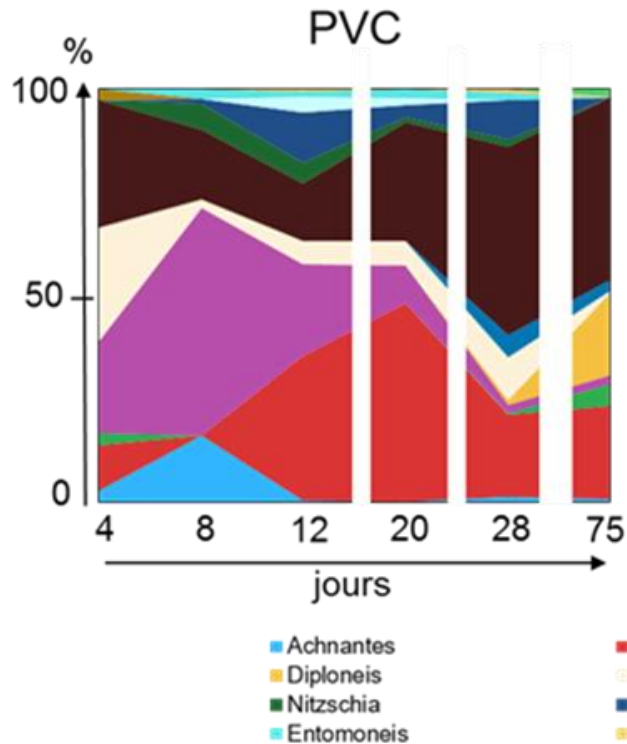
 Biofilm
 Water (Coclet et al. Environ Microb, en revision)





Water (Coclet et al. Environ Microb, en revision)





(Barry-Martin et al. en prep.)

↳ Communautés de diatomées très diversifiées sur le PVC :

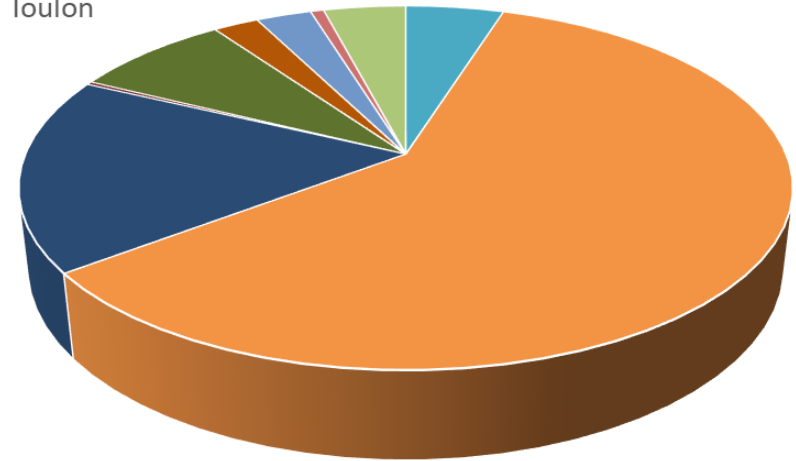
Pionniers = *Licmophora* ou *Cylindrotheca*

Dominance évolue vers d'autres taxa (e.g. *Amphora* et *Navicula*)

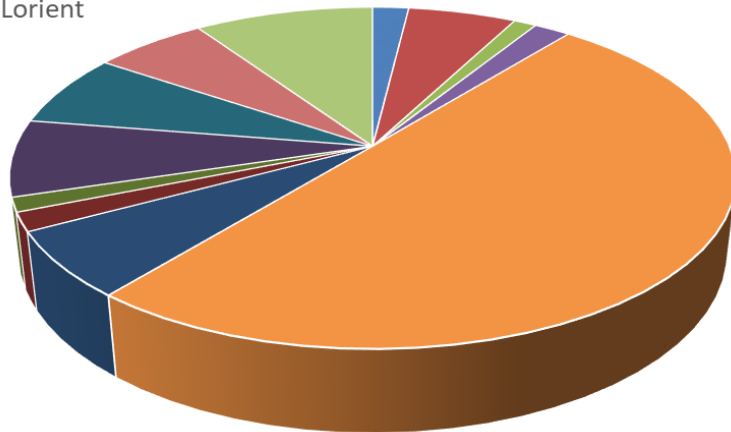
Autres eucaryotes (ADNr 18S):
microorganismes vs macrofouling
(biofilm)



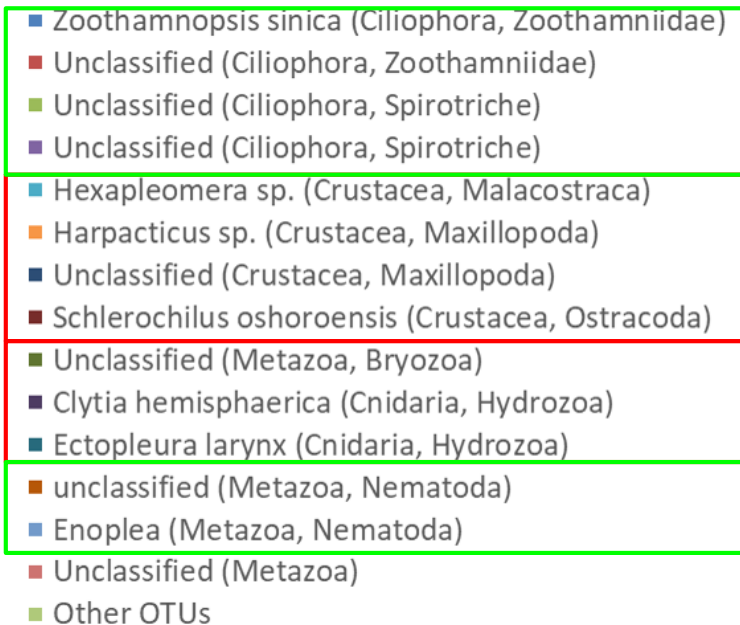
Toulon



Lorient

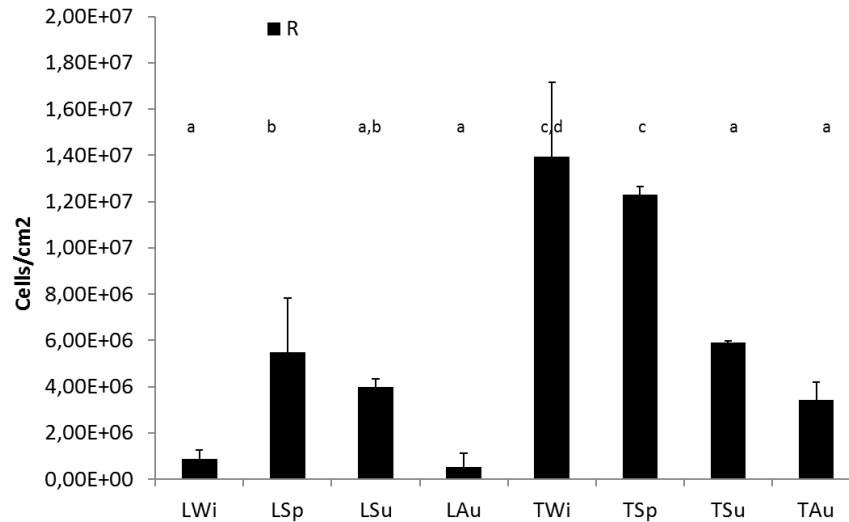


(Briand et al. Biofouling, 2018)



1-4 Effets des paramètres environnementaux sur les communautés de biofilms:

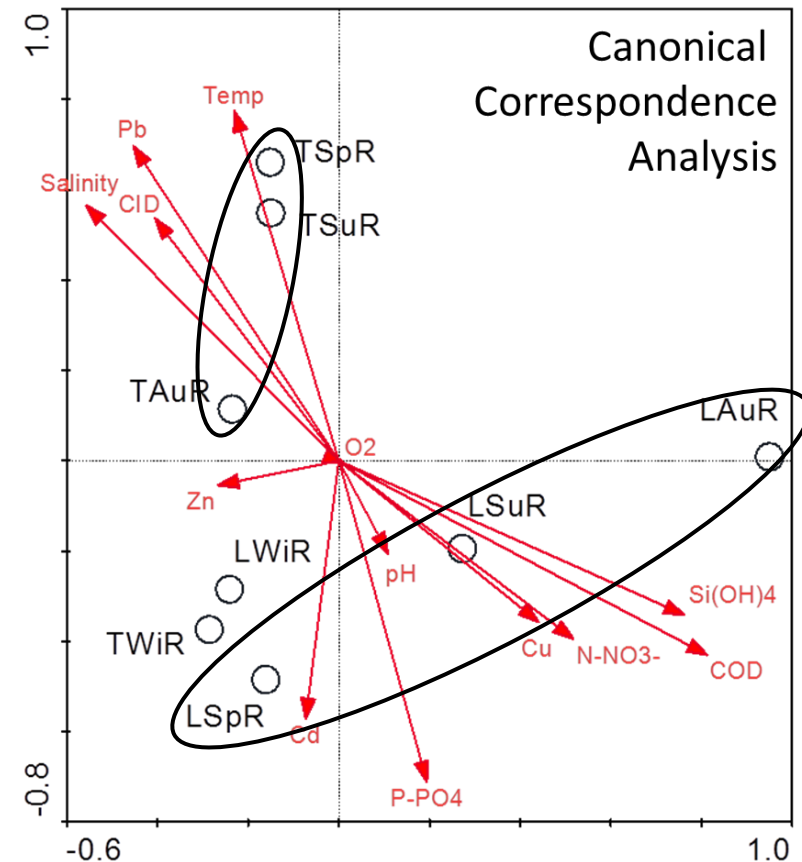
⇒ Température, salinité, nutriments, métaux



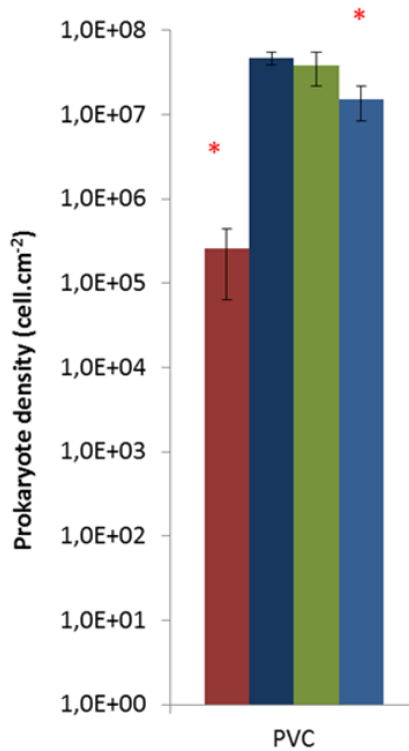
R=PVC

T=Toulon
L=Lorient

(Briand et al. Microb Ecol, 2017)

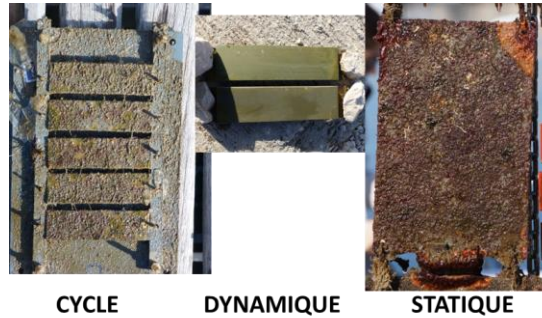


⇒ Hydrodynamique :



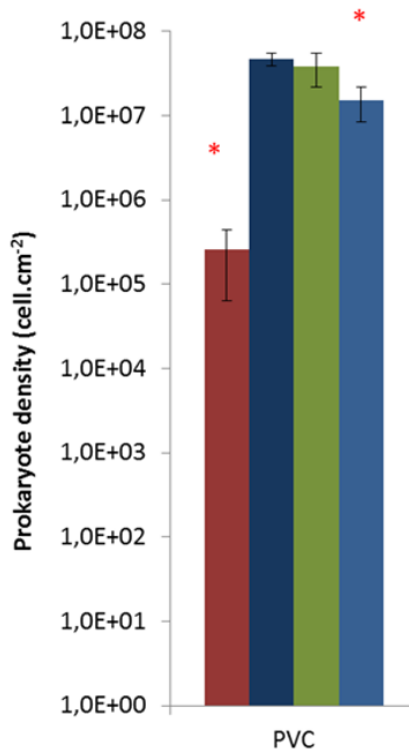
PVC, 1an

Dyn= 15noeuds,
Cycle = 4x(15j Dyn/2,5 mois statique)
Statique Toulon
Statique Banyuls



D-S-C-SBa

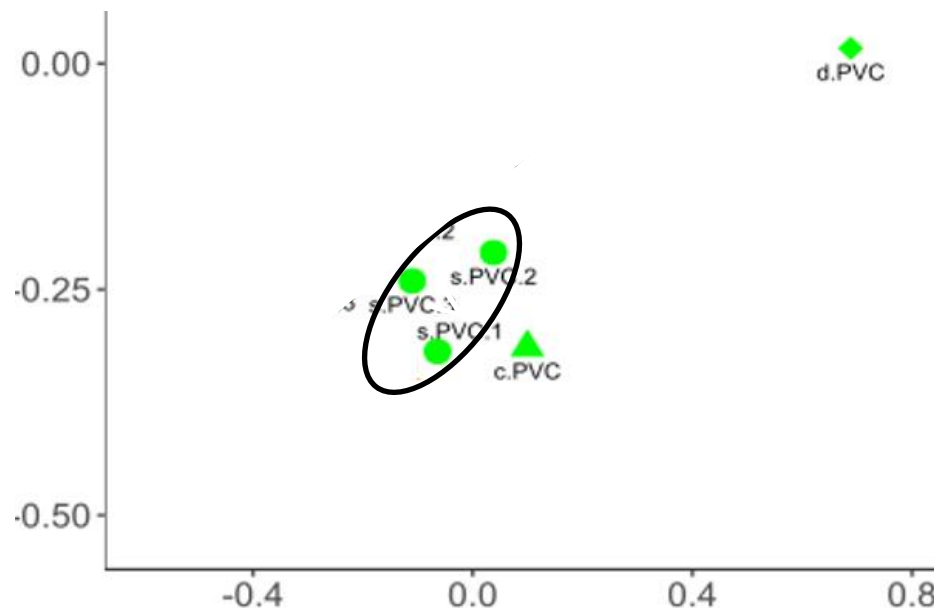
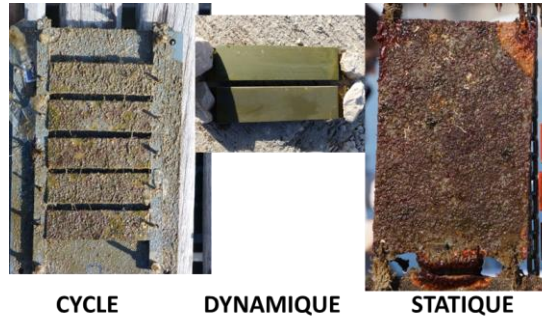
⇒ Hydrodynamique :



D-S-C-SBa

PVC, 1an

Dyn= 15noeuds,
Cycle = 4x(15j Dyn/2,5 mois statique)
Statique Toulon
Statique Banyuls

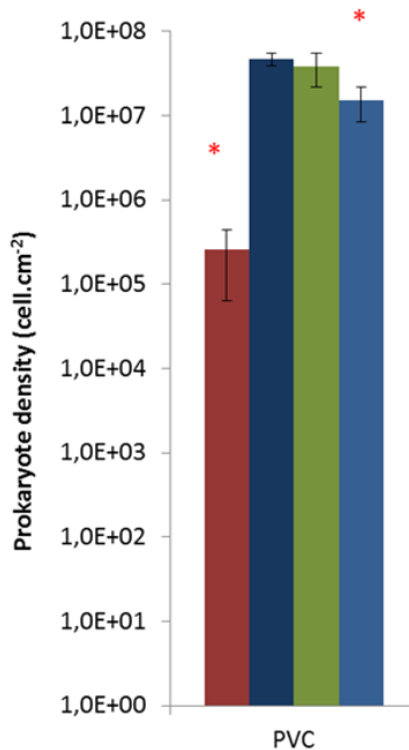


Mode d'immersion

- ▲ cyclique
- ◆ dynamique
- statique
- statique_Banyuls

(Catao et al. Front Microb, en revision)

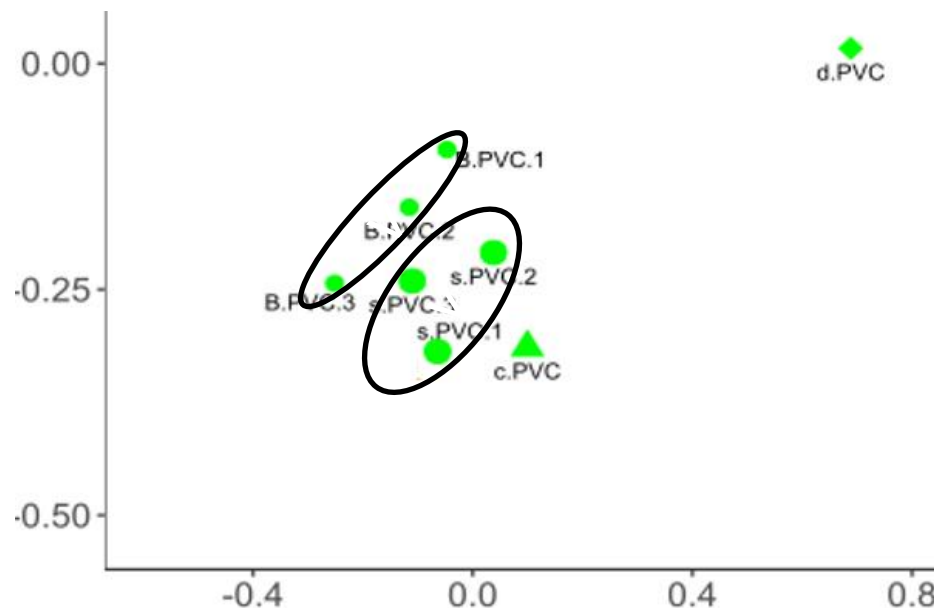
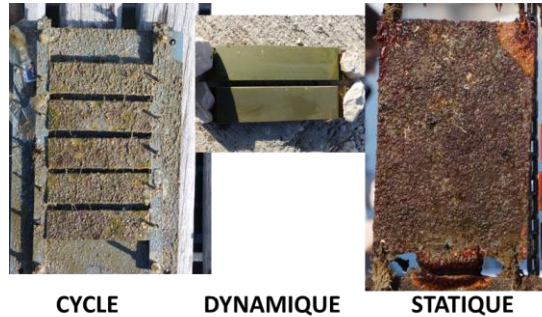
⇒ Hydrodynamique :



D-S-C-SBa

PVC, 1an

Dyn= 15noeuds,
Cycle = 4x(15j Dyn/2,5 mois statique)
Statique Toulon
Statique Banyuls



Mode d'immersion

- ▲ cyclique
- ◆ dynamique
- statique
- statique_Banyuls

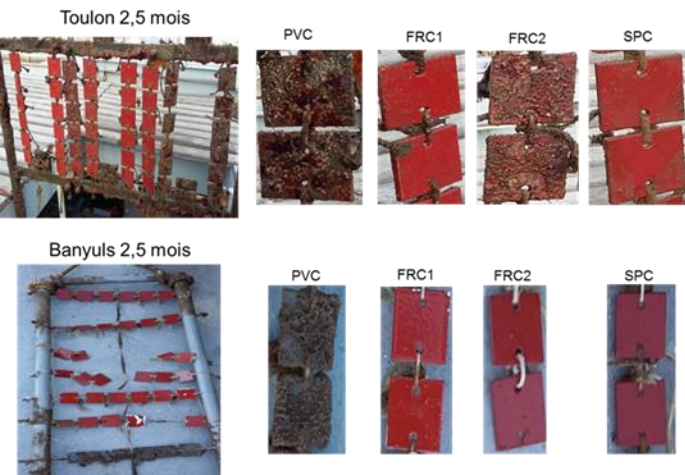
(Catao et al. Front Microb, en revision)

2- Effet de la nature des surfaces sur les communautés de biofilms

FRC=

faible énergie de surface,
rugosité et
module élastique

SPC= biocide(s)



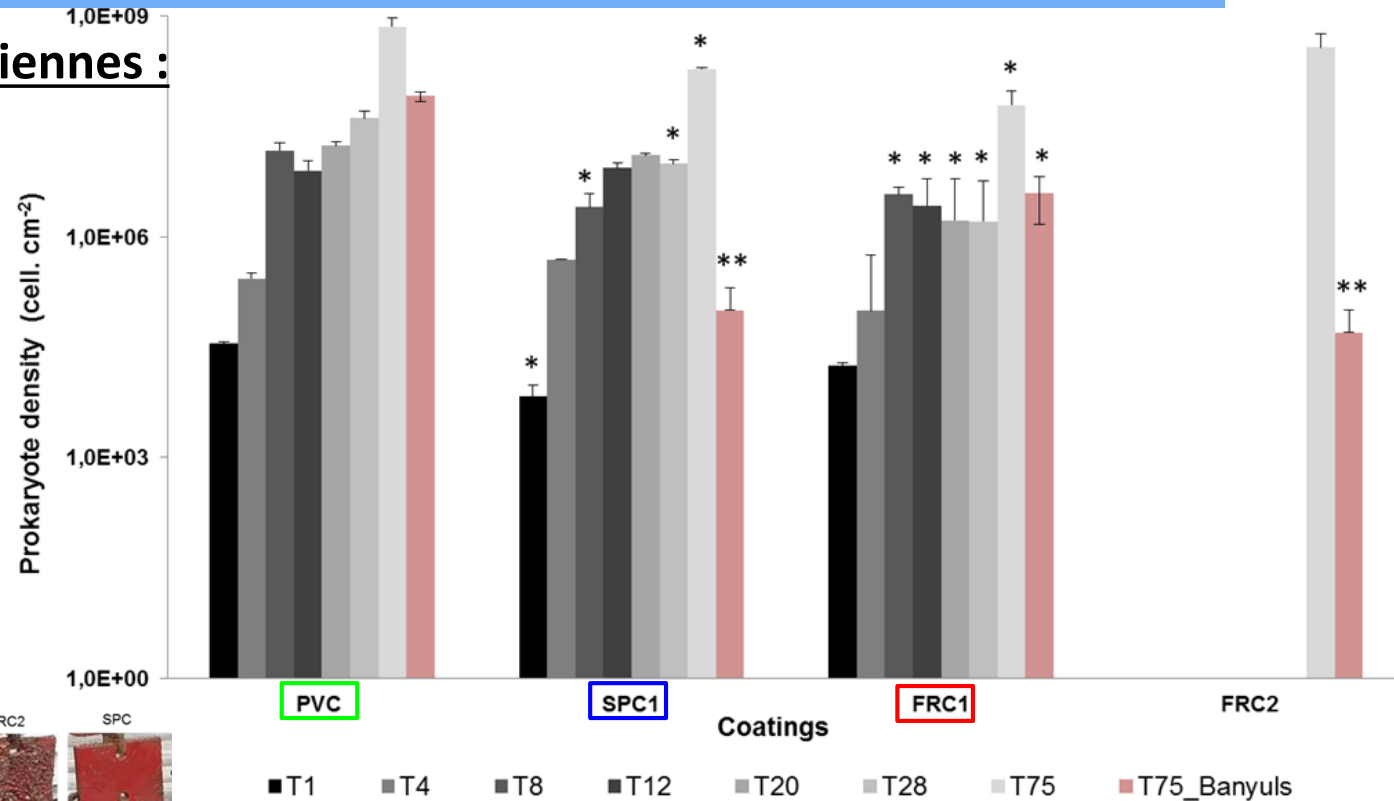
(Pollet et al. en prep; Briand et al 2012, 2017, Camps et al. 2014)

2- Effet de la nature des surfaces sur les communautés de biofilms

2-1 Densités microbiennes :

FRC=
faible énergie de surface,
rugosité et
module élastique

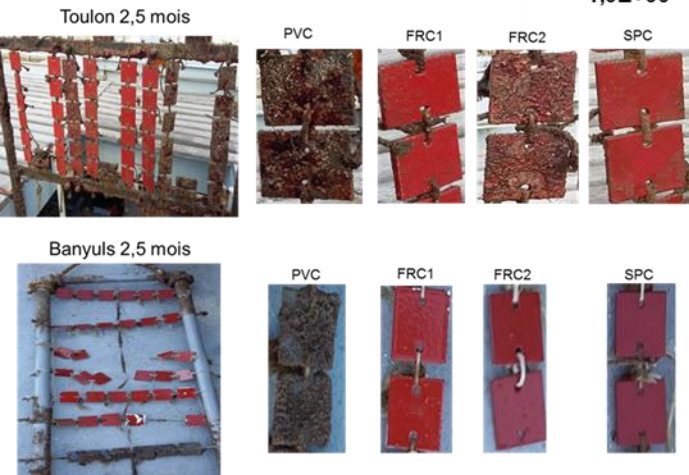
SPC= biocide(s)



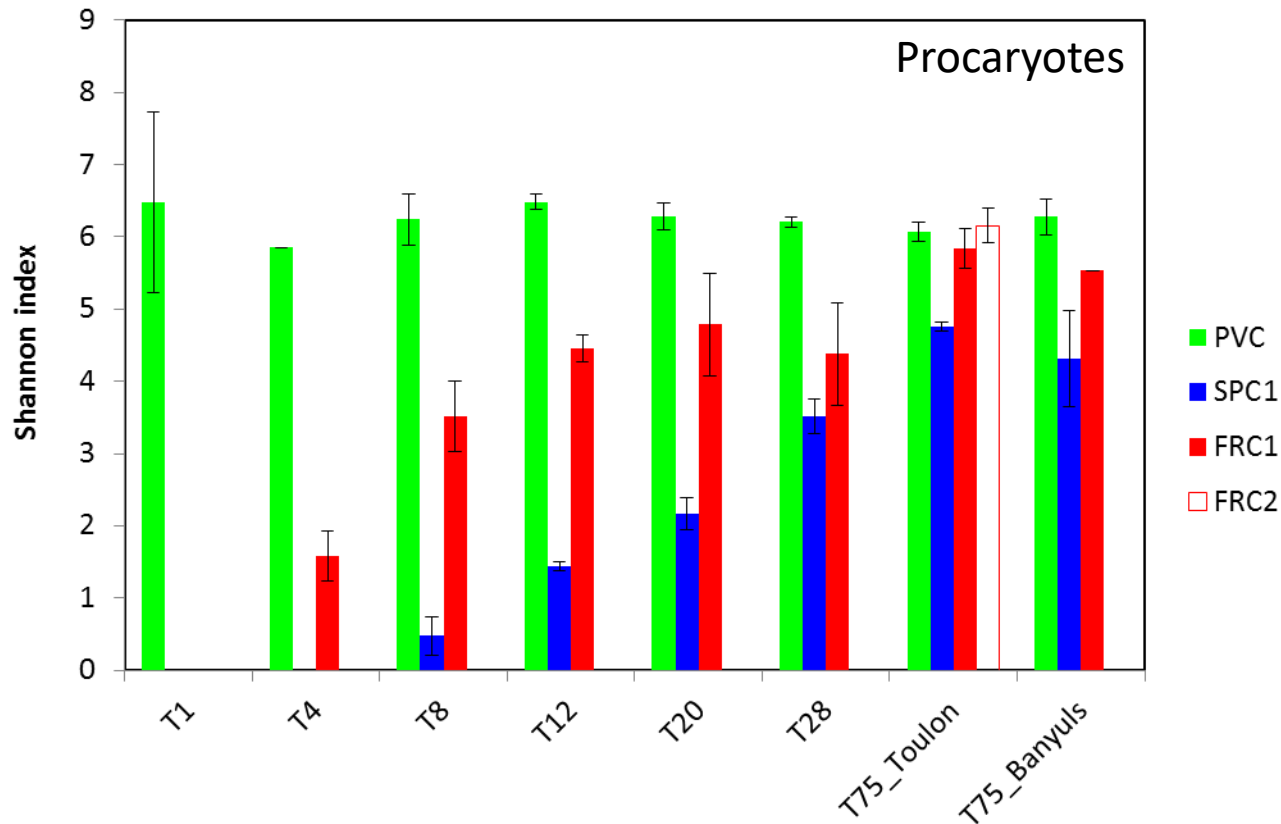
⇒ **SPC1** = **FRC1** < **PVC** (=FRC2) à Toulon

⇒ **SPC1** (=FRC2) < **FRC1** < **PVC** à Banyuls

(Pollet et al. en prep; Briand et al 2012, 2017, Camps et al. 2014)



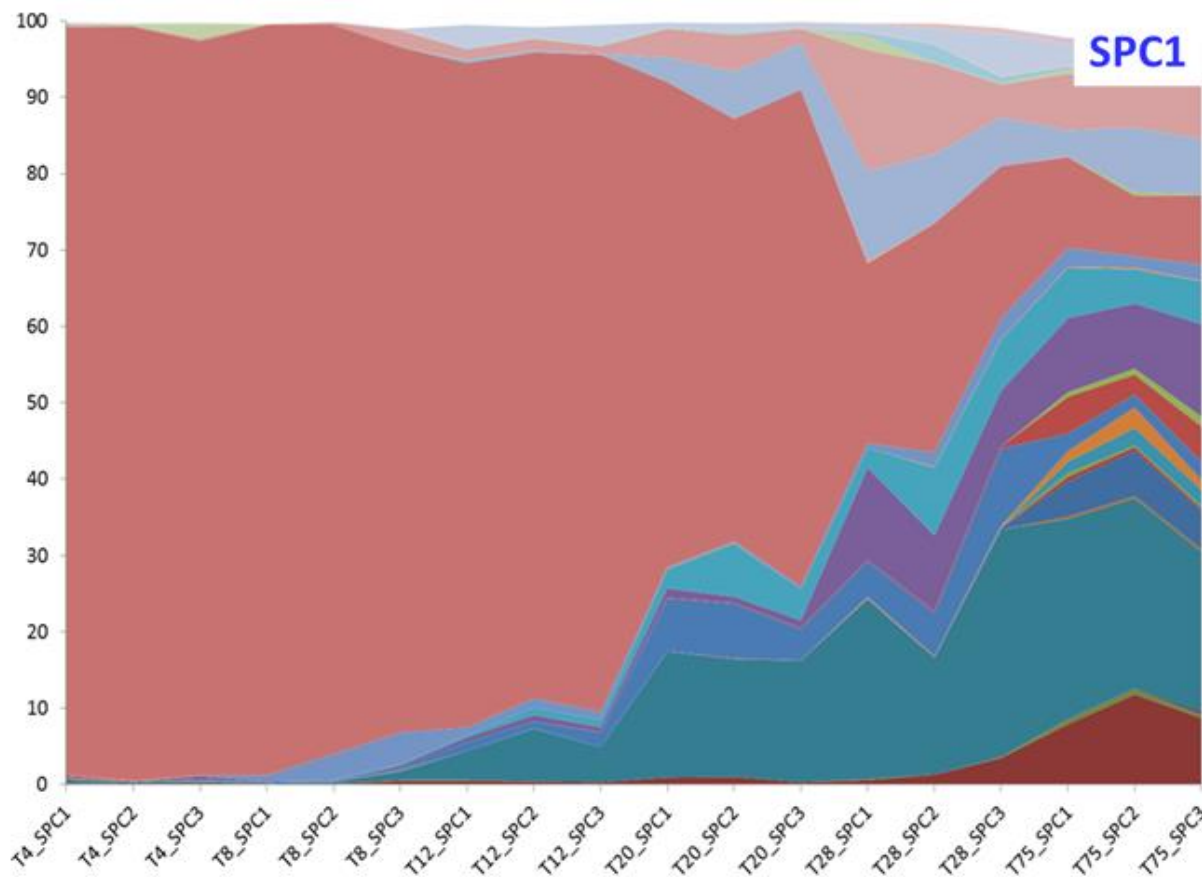
2-2 α -diversité des communautés microbiennes :



⇒ SPC1: diversité ~ nulle jusqu'à 4j / ↗ de 8 à 75j (<PVC) / similaire à Banyuls

⇒ FRC1: diversité ~ nulle à 1j / ↗ de 4 à 75j (cf PVC) / similaire à Banyuls

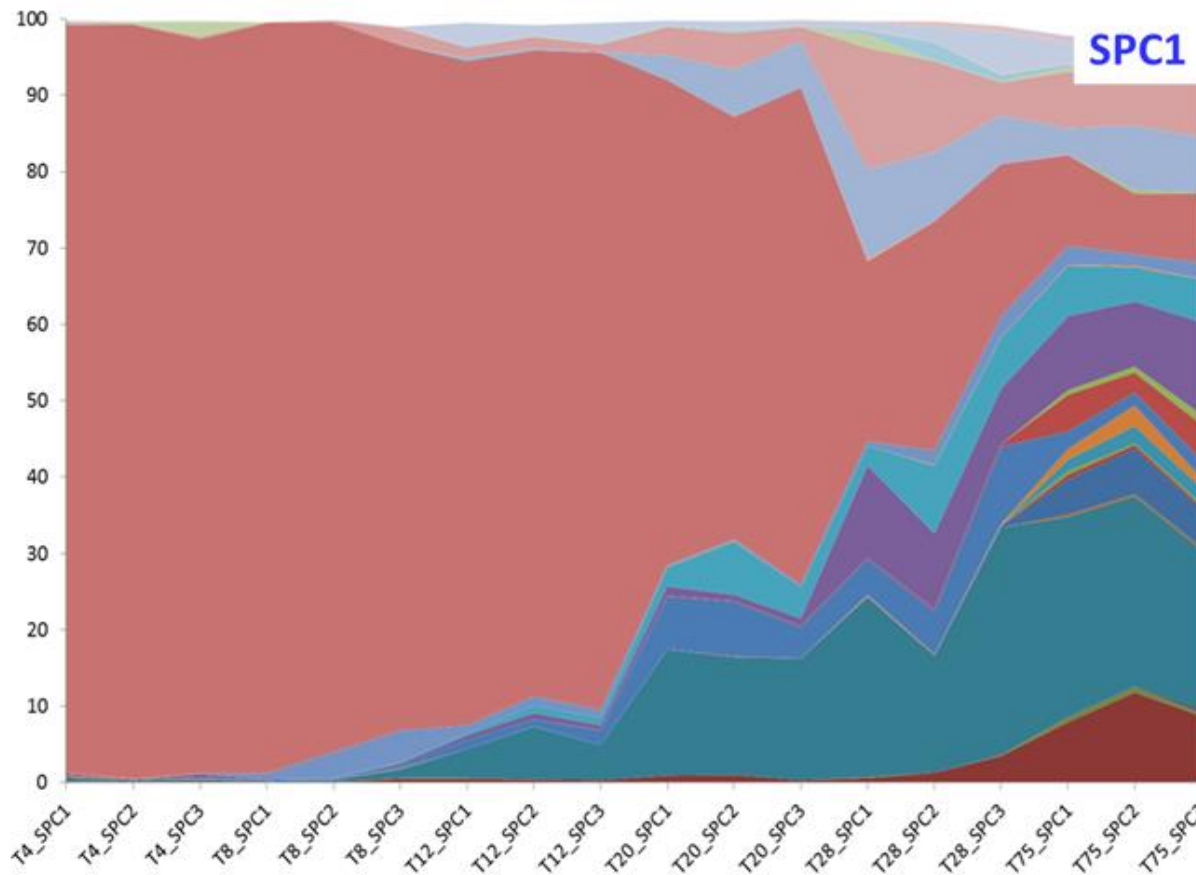
2-3 β -diversité et structure des communautés :



➡ Sélection de bactéries pionnières / résistantes au cuivre
(*Alteromonas* spp. / 2 OTUs)

- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiales_unclassified
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiaceae
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Rubritaleaceae
- Verrucomicrobia/Opitutae/Puniceicoccaceae
- Proteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria/Vibrionaceae
- Gammaproteobacteria/Piscirickettsiaceae
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillales_unclassified
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillaceae
- Gammaproteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria_order_incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Granulosicoccaceae
- Gammaproteobacteria/Pseudoalteromonadaceae
- Gammaproteobacteria/Colwelliaceae
- Gammaproteobacteria/Alteromonadales_incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Alteromonadaceae**
- Deltaproteobacteria/Bacteriovoraceae
- Betaproteobacteria/Methylophilaceae
- Alphaproteobacteria/Erythrobacteraceae
- Alphaproteobacteria/Rhodobacteraceae**
- Alphaproteobacteria/Parvularculaceae
- Alphaproteobacteria/Hyphomonadaceae
- Alphaproteobacteria_unclassified
- Planctomycetes/Planctomycetacia/Planctomycetaceae
- Planctomycetes/Phycisphaerae/Phycisphaeraceae
- Firmicutes/Clostridia/Clostridiales_unclassified
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales_unclassified
- /Bacteroidetes/Sphingobacteria/Saprospiraceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Flammeovirgaceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Cytophagaceae
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Flavobacteriaceae**
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Cryomorphaceae
- Bacteroidetes_unclassified
- Bacteria_unclassified
- Actinobacteria_unclassified

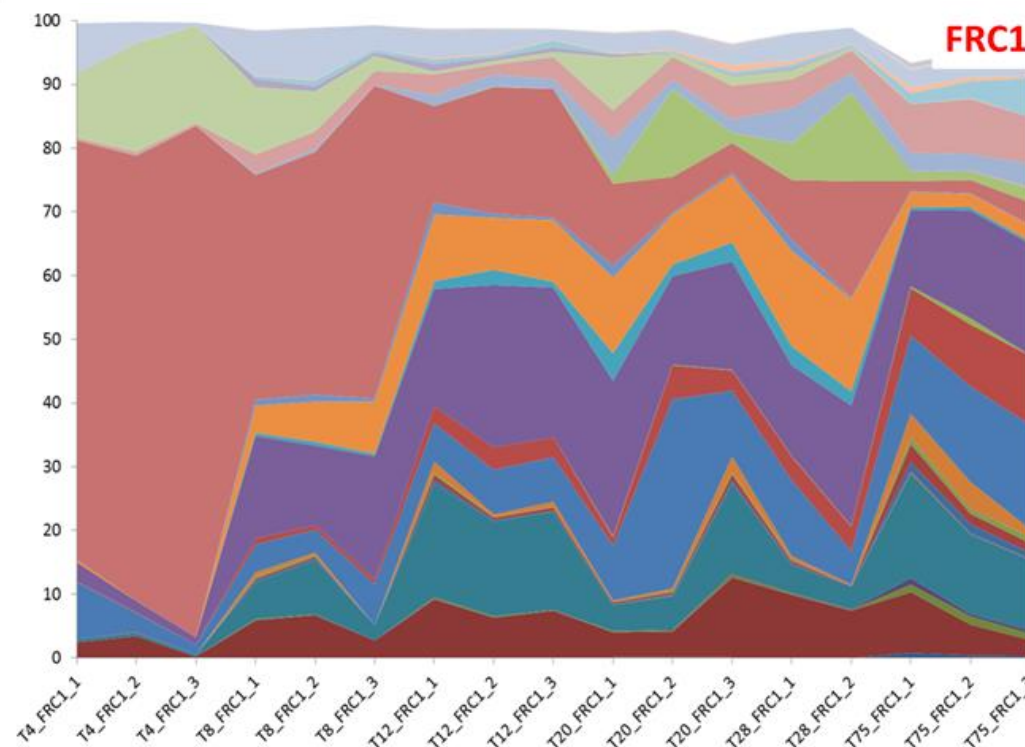
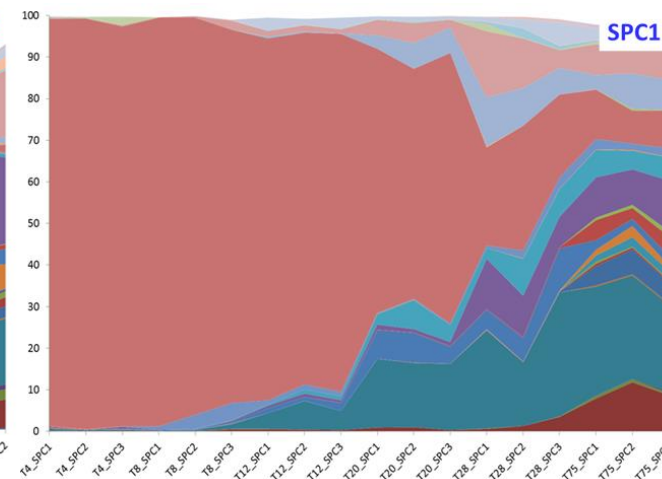
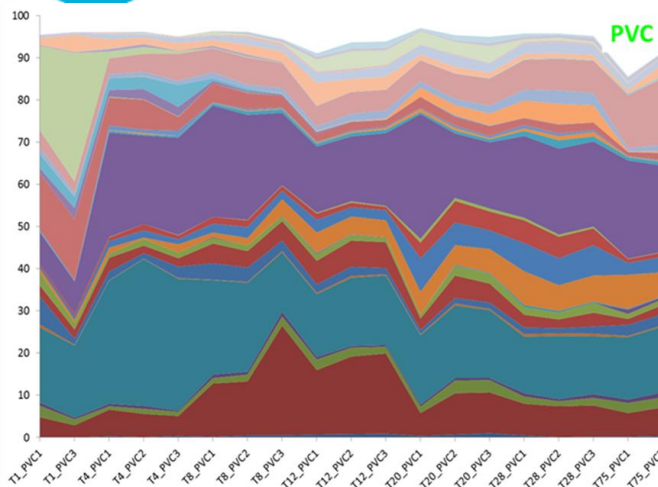
2-3 β -diversité et structure des communautés :



- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiales_unclassified
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiaceae
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Rubritaleaceae
- Verrucomicrobia/Opitutae/Puniceicoccaceae
- Proteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria/Vibrionaceae
- Gammaproteobacteria/Piscirickettsiaceae
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillales_unclassified
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillaceae
- Gammaproteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria_order_incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Granulosicoccaceae
- Gammaproteobacteria/Pseudoalteromonadaceae
- Gammaproteobacteria/Colwelliaceae
- Gammaproteobacteria/Alteromonadales_incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Alteromonadaceae**
- Deltaproteobacteria/Bacteriovoraceae
- Betaproteobacteria/Methylophilaceae
- Alphaproteobacteria/Erythrobacteraceae
- Alphaproteobacteria/Rhodobacteraceae**
- Alphaproteobacteria/Parvularculaceae
- Alphaproteobacteria/Hyphomonadaceae
- Alphaproteobacteria_unclassified
- Planctomycetes/Planctomycetacia/Planctomycetaceae
- Planctomycetes/Phycisphaerae/Phycisphaeraceae
- Firmicutes/Clostridia/Clostridiales_unclassified
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales_unclassified
- /Bacteroidetes/Sphingobacteria/Saprospiraceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Flammeovirgaceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Cytophagaceae
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Flavobacteriaceae**
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Cryomorphaceae
- Bacteroidetes_unclassified
- Bacteria_unclassified
- Actinobacteria_unclassified

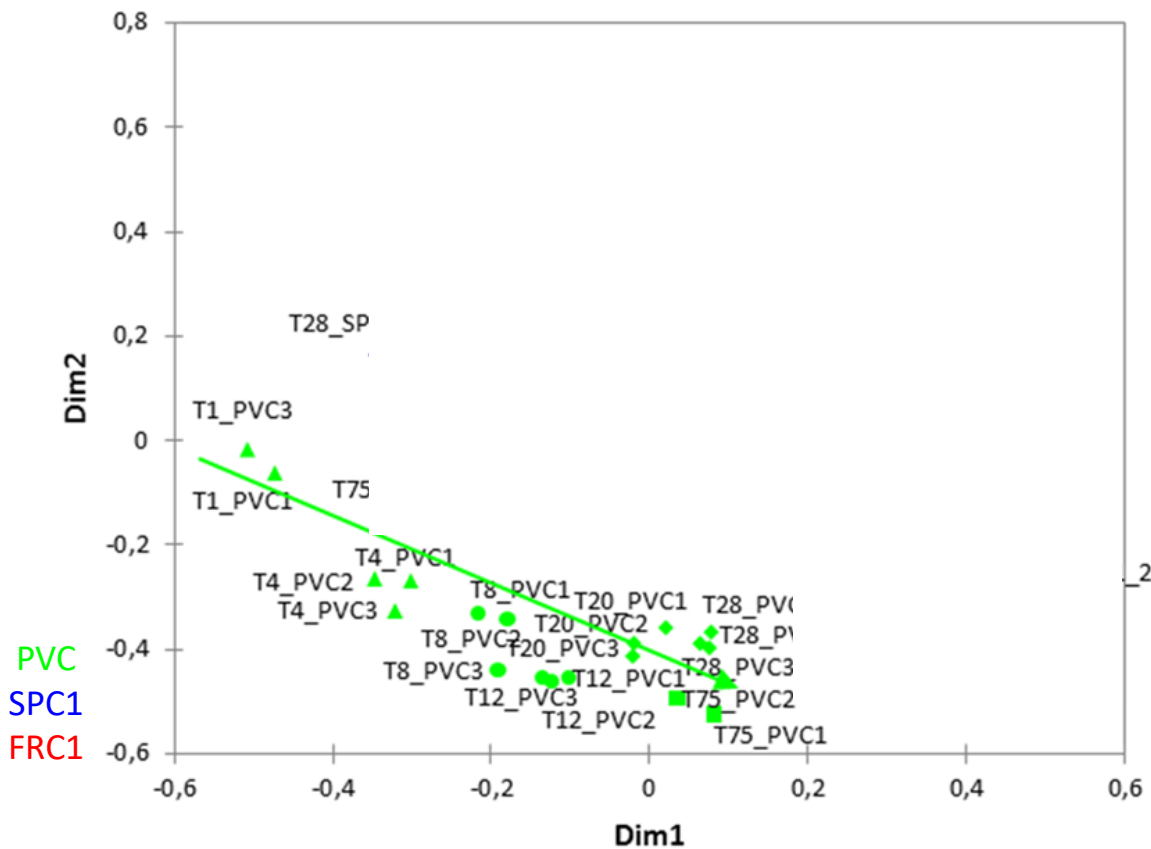
⇒ Sélection de bactéries pionnières / résistantes au cuivre
(*Alteromonas* spp. / 2 OTUs)

⇒ Diversification = EPS secrétés « protègent » le biofilm
qui accepte des taxa moins résistants ?

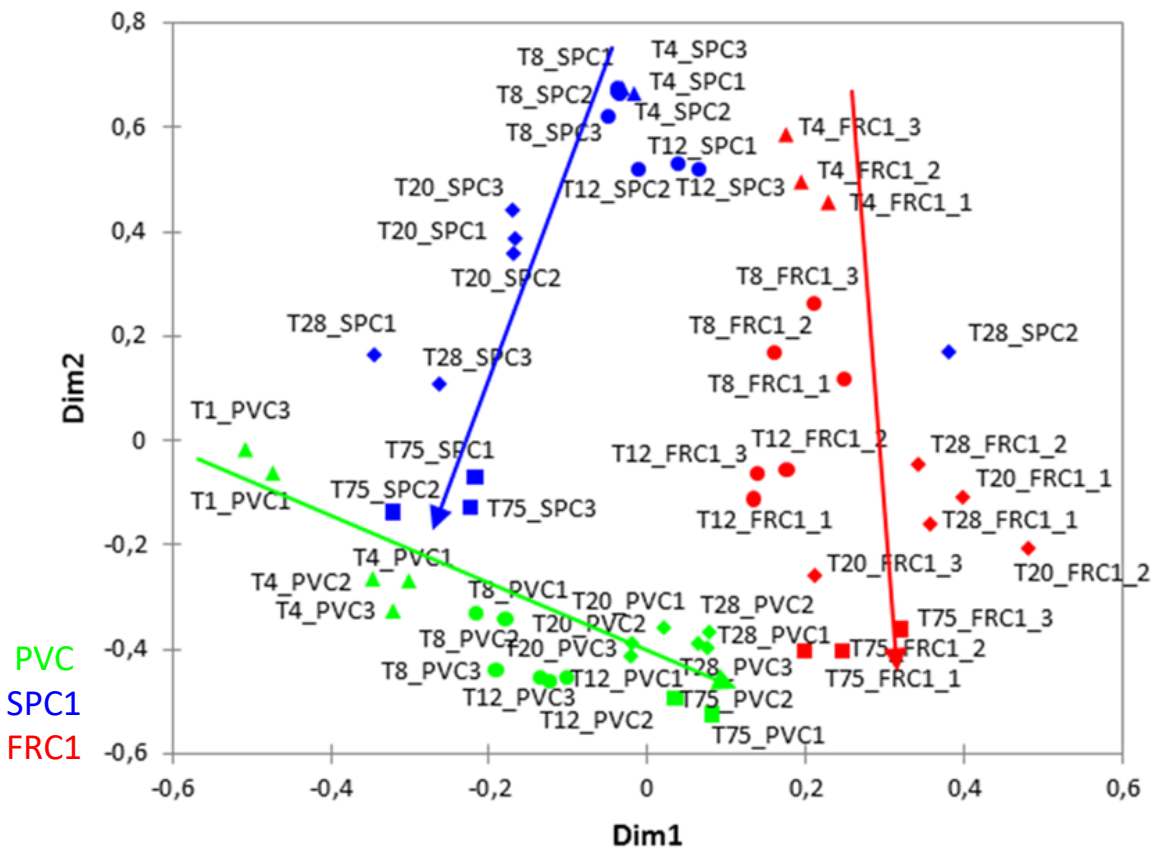


- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiales_unclassified
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Verrucomicrobiaceae
- Verrucomicrobia/Verrucomicrobiae/Rubritaleaceae
- Verrucomicrobia/Opitutae/Puniceicoccaceae
- Proteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria/Vibrionaceae
- Gammaproteobacteria/Piscirickettsiaceae
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillales_unclassified
- Gammaproteobacteria/Oceanospirillaceae
- Gammaproteobacteria_unclassified
- Gammaproteobacteria_order_incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Granulosicoccaceae
- Gammaproteobacteria/Pseudoalteromonadaceae
- Gammaproteobacteria/Colwelliaceae
- Gammaproteobacteria/Alteromonadales_incertae_sedis
- Gammaproteobacteria/Alteromonadaceae
- Deltaproteobacteria/Bacteriovoraceae
- Betaproteobacteria/Methylophilaceae
- Alphaproteobacteria/Erythrobacteraceae
- Alphaproteobacteria/Rhodobacteraceae
- Alphaproteobacteria/Parvularculaceae
- Alphaproteobacteria/Hyphomonadaceae
- Alphaproteobacteria_unclassified
- Planctomycetes/Planctomycetacia/Planctomycetaceae
- Planctomycetes/Phycisphaerae/Phycisphaeraceae
- Firmicutes/Clostridia/Clostridiales_unclassified
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Sphingobacteriales_unclassified
- /Bacteroidetes/Sphingobacteria/Saprospiraceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Flammeovirgaceae
- Bacteroidetes/Sphingobacteria/Cytophagaceae
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Flavobacteriaceae
- Bacteroidetes/Flavobacteria/Cryomorphaceae
- Bacteroidetes_unclassified
- Bacteria_unclassified
- Actinobacteria_unclassified

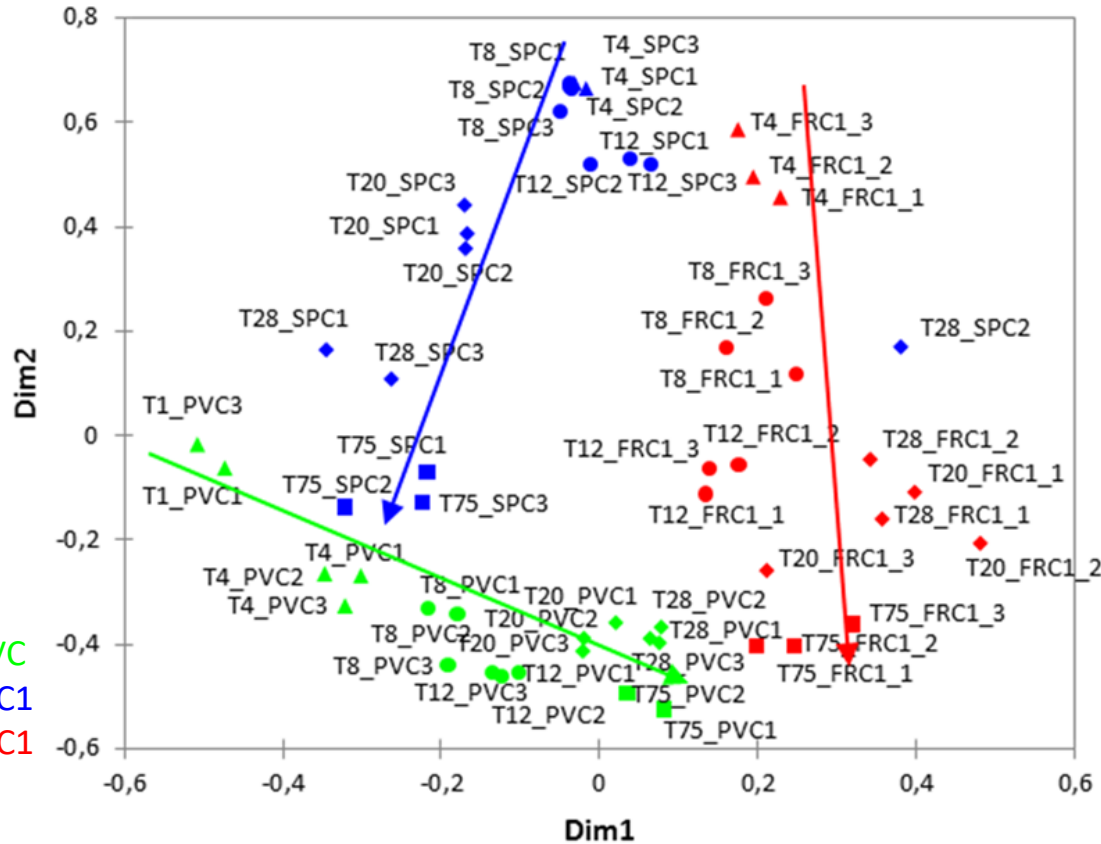
MDS (Bray & Curtis) / Kruskal Stress = 0.184



MDS (Bray & Curtis) / Kruskal Stress = 0.184

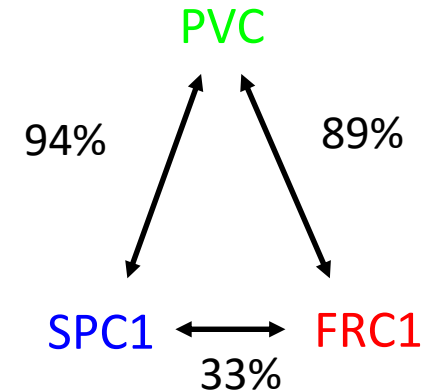


MDS (Bray & Curtis) / Kruskal Stress = 0.184

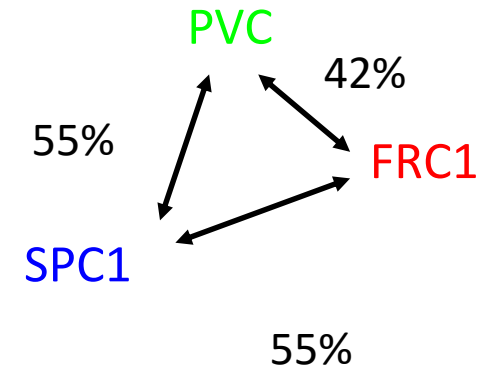


Dissimilarités

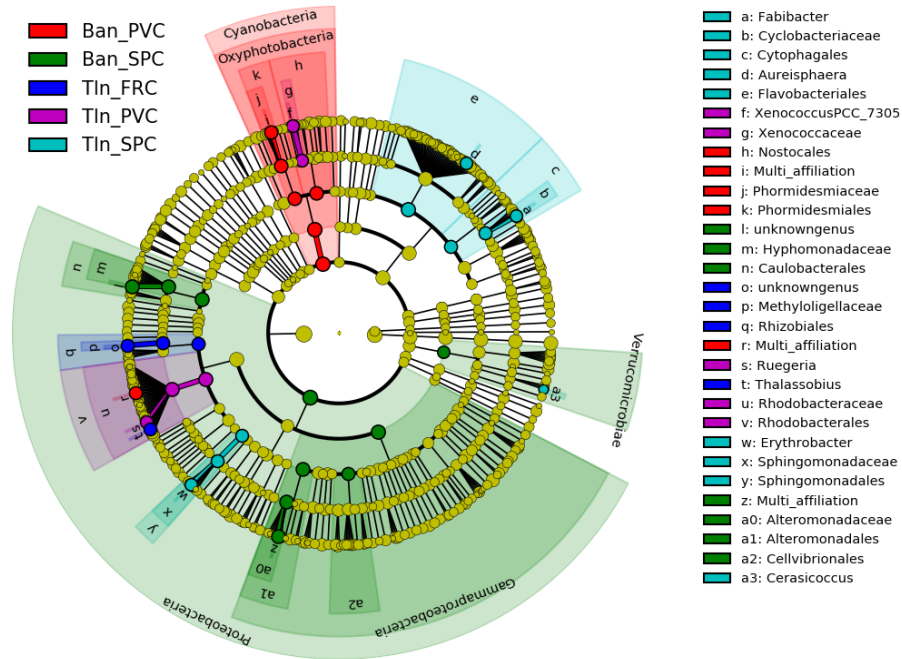
↳ Communautés pionnières (4j):



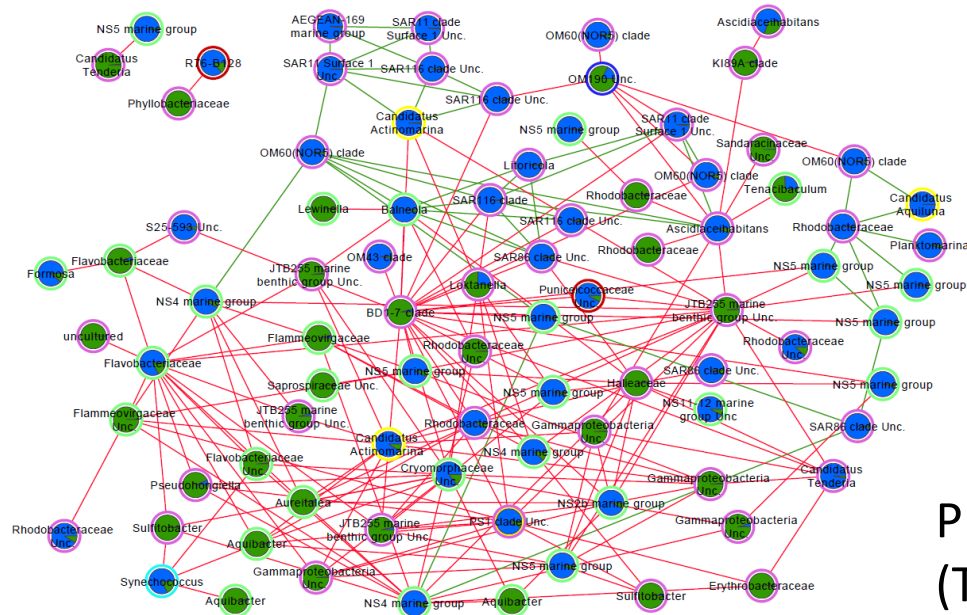
↳ Communautés matures (75j):



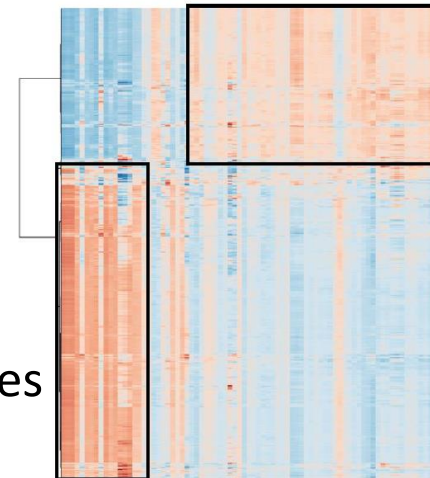
Analyse LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size)



Analyse de Réseaux de cooccurrence (CoNet)



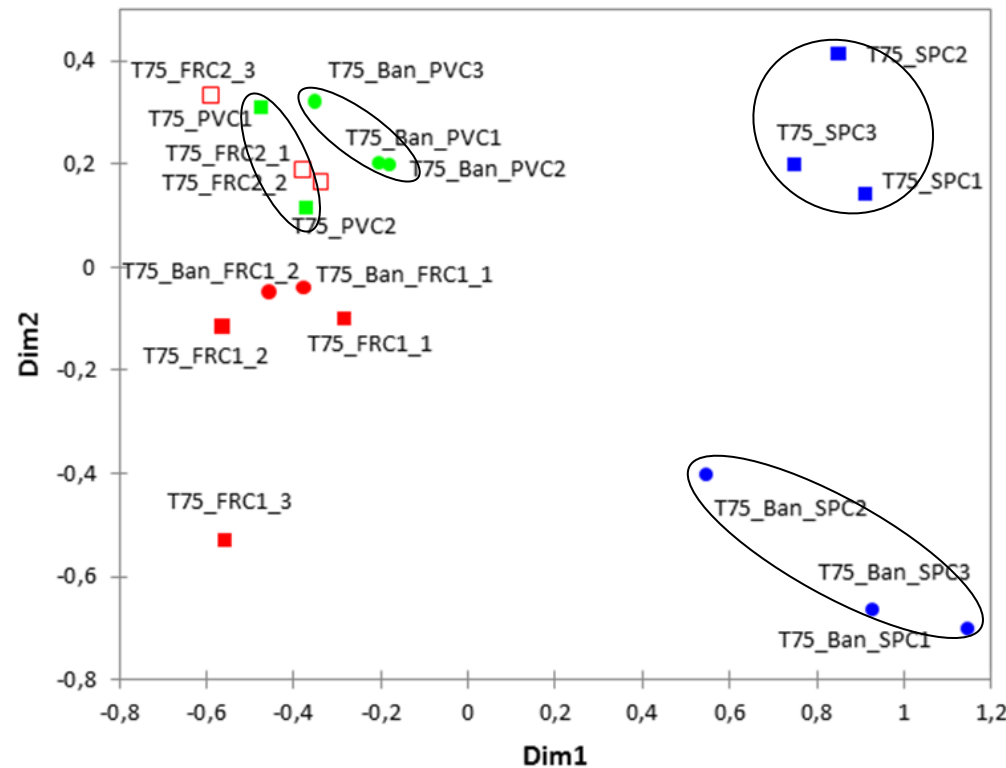
Prédictions fonctionnelles (Tax4Fun-SILVA/KEGG)



3- Effets combinés sur les communautés de biofilms / sites + surfaces :

↪ Dissimilarité entre sites :
47% sur SPC1 vs 33% sur PVC/FRC1
(Pollet et al. en prep.)

NMDS (Bray & Curtis) / Kruskal Stress = 0.101



↪ Dissimilarité entre sites :
47% sur SPC1 vs 33% sur PVC/FRC1
(Pollet et al. en prep.)

Figure 1 is a 2D scatter plot showing the first two dimensions (Dim1 and Dim2) of a PCA analysis of 24 species. The x-axis (Dim1) ranges from -0.2 to 0.2, and the y-axis (Dim2) ranges from -0.2 to 0.2. Three regression lines are shown: a solid line (positive slope), a dashed line (negative slope), and a dash-dot line (negative slope). Species are labeled with codes like LAuC, LWiZ, LSuZ, etc., and are colored and shaped according to their group: green circles for LA, blue diamonds for LW, brown squares for LS, and black squares for TS.

A PCA plot showing the first two dimensions (Dim1 and Dim2) of 18 variables. The variables are represented by colored squares: green for the top-left cluster, red for the middle-left cluster, and blue for the right cluster. Three ellipses highlight specific groups of variables:

- Green Ellipse (Top Left):** Encloses variables T75_FRC2_3, T75_PVC1, T75_FRC2_1, T75_FRC2_2, T75_PVC2, T75_Ban_PVC3, T75_Ban_PVC1, and T75_Ban_PVC2.
- Red Ellipse (Middle Left):** Encloses variables T75_Ban_FRC1_2, T75_Ban_FRC1_1, T75_FRC1_2, and T75_FRC1_1.
- Blue Ellipse (Right):** Encloses variables T75_SPC2, T75_SPC3, and T75_SPC1.

Other variables not enclosed in ellipses include T75_FRC1_3 and T75_Ban_SPC2, T75_Ban_SPC3, and T75_Ban_SPC1.

↪ Effet biocide > effet site
(effet saison faible)
(Briand et al. Microb Ecol 2017)

Diversité & contrôle des communautés microbiennes épiphytes sur une algue brune (holobionte)



Taonia atomaria
(Woodward) J. Agardh

Comment *T. atomaria*
limite son biofouling ?



Diversité & contrôle des communautés microbiennes épiphytes sur une algue brune (holobionte)



Taonia atomaria
(Woodward) J. Agardh

Comment *T. atomaria*
limite son biofouling ?

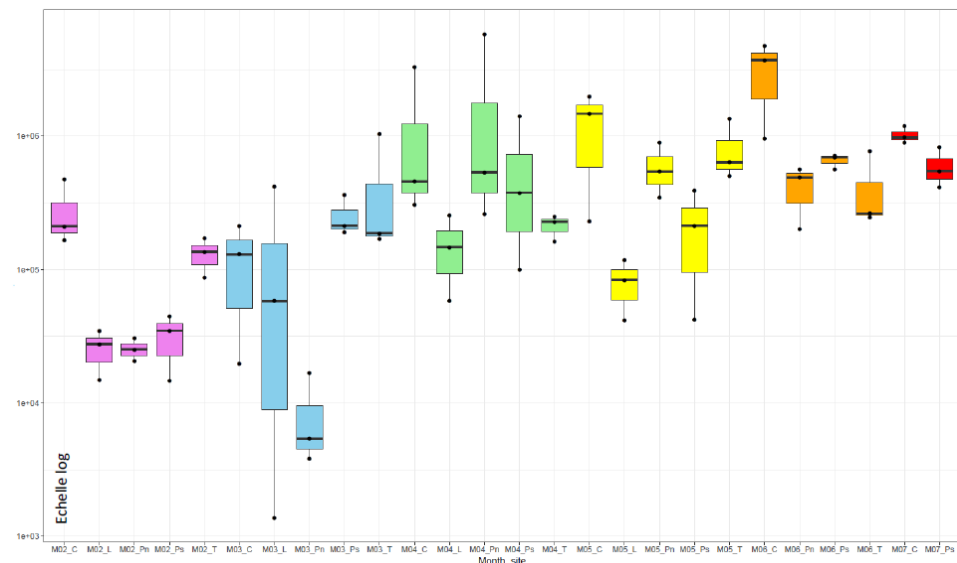


1-Densités bactériennes : 10^4 - 10^6 /cm²

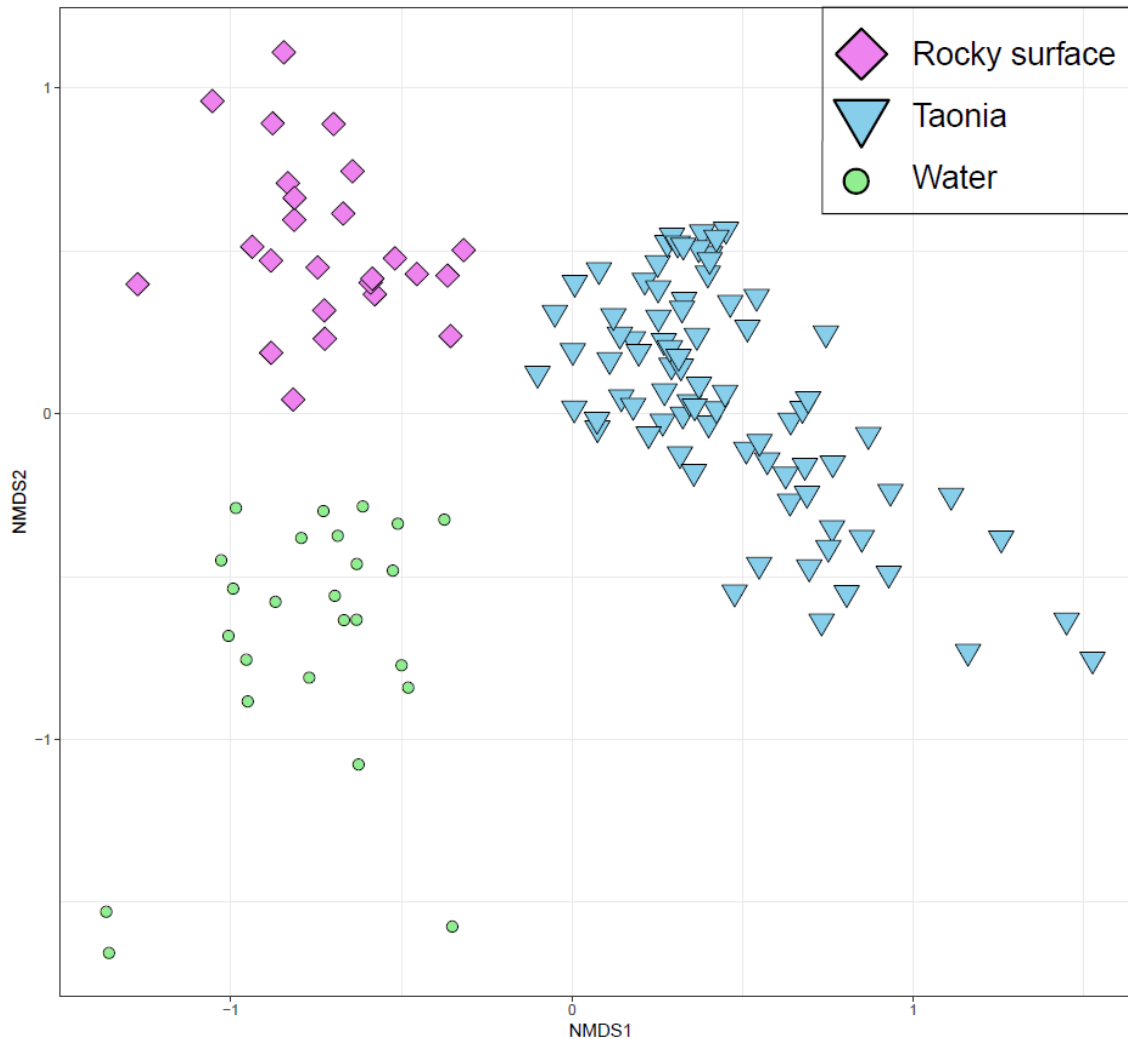
Effet saison

Pas d'effet site

2- α -diversité : Effet saison
Pas d'effet site

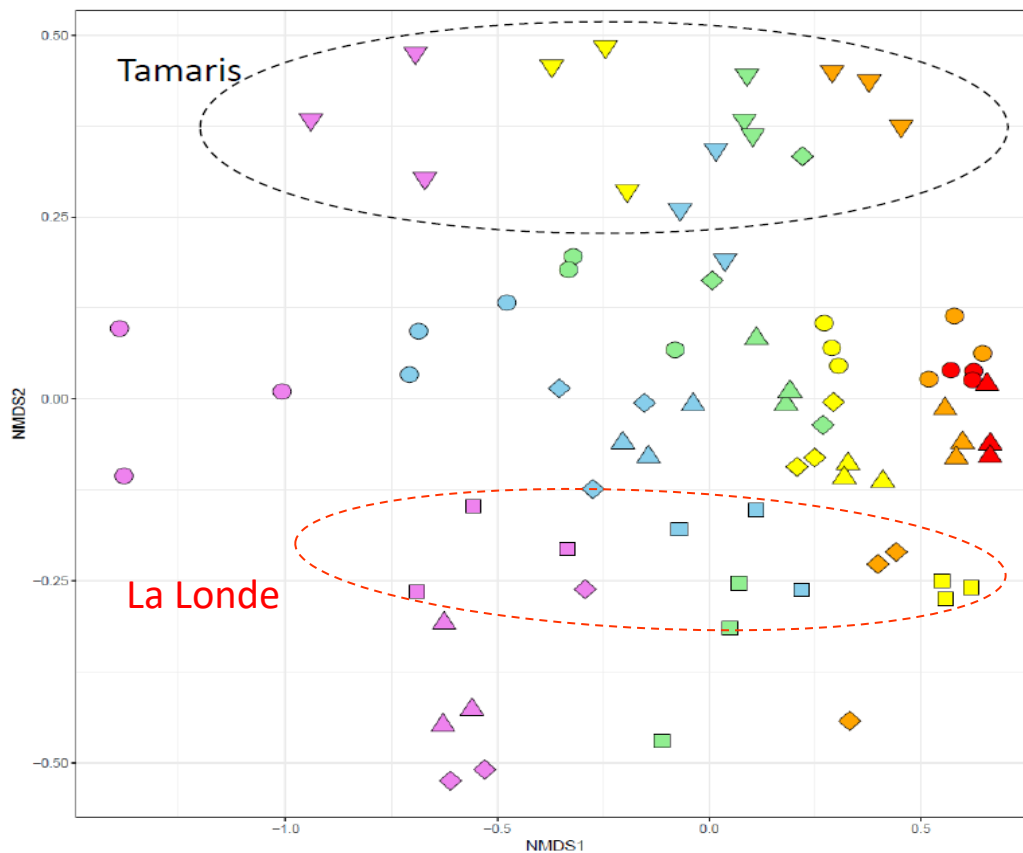


3- β -diversité et structure des communautés épiphytes:

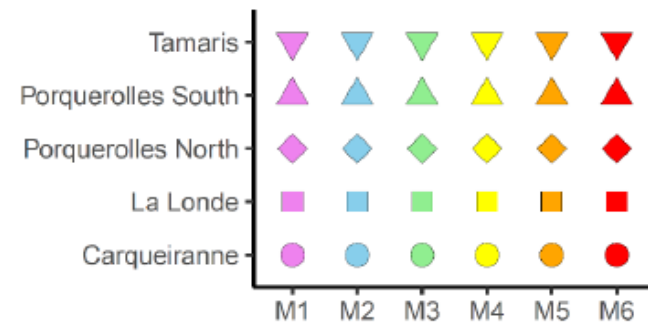


➡ Sélection
des communautés
épiphytes sur *T. atomaria*

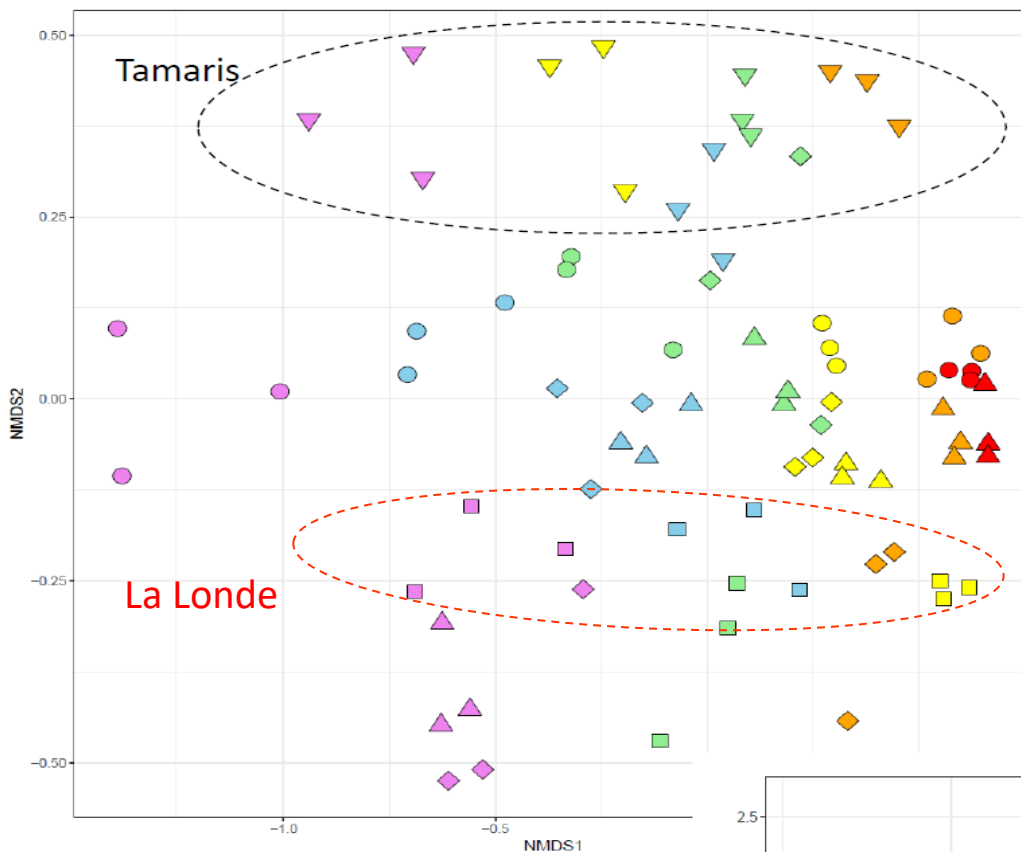
(Paix et al en prep.)



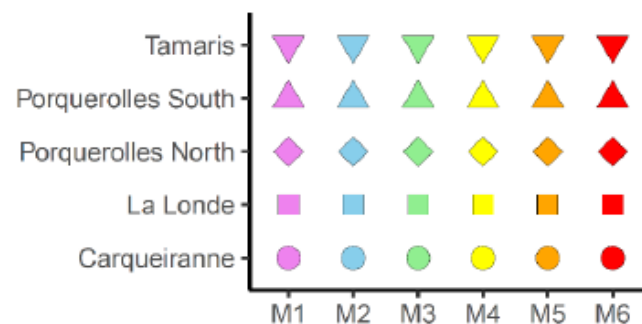
- Variations saisonnières (axe 1)
- Clusterisation 2 sites (axe 2)



(Paix et al en prep.)

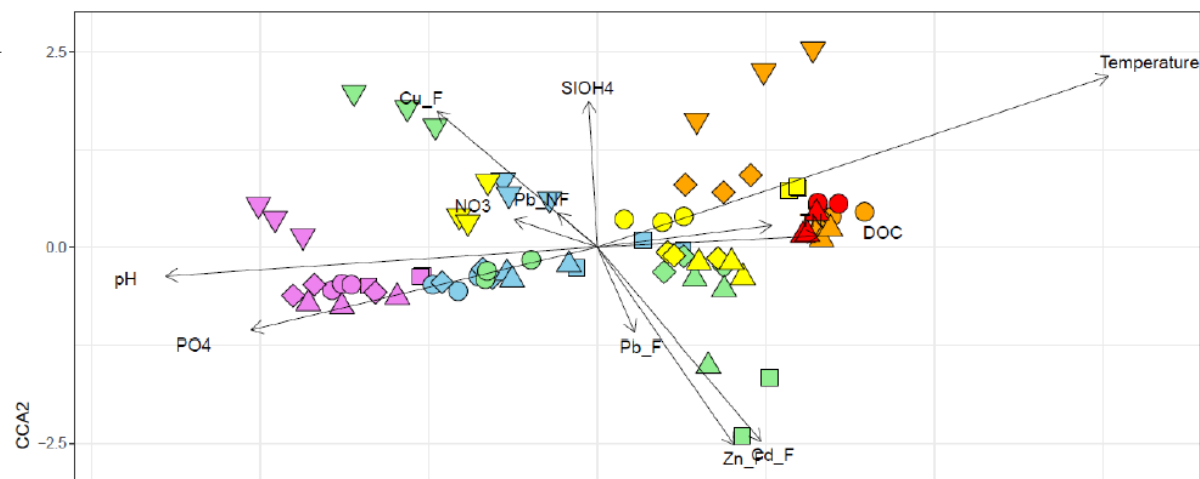


- Variations saisonnières (axe 1)
- Clusterisation 2 sites (axe 2)

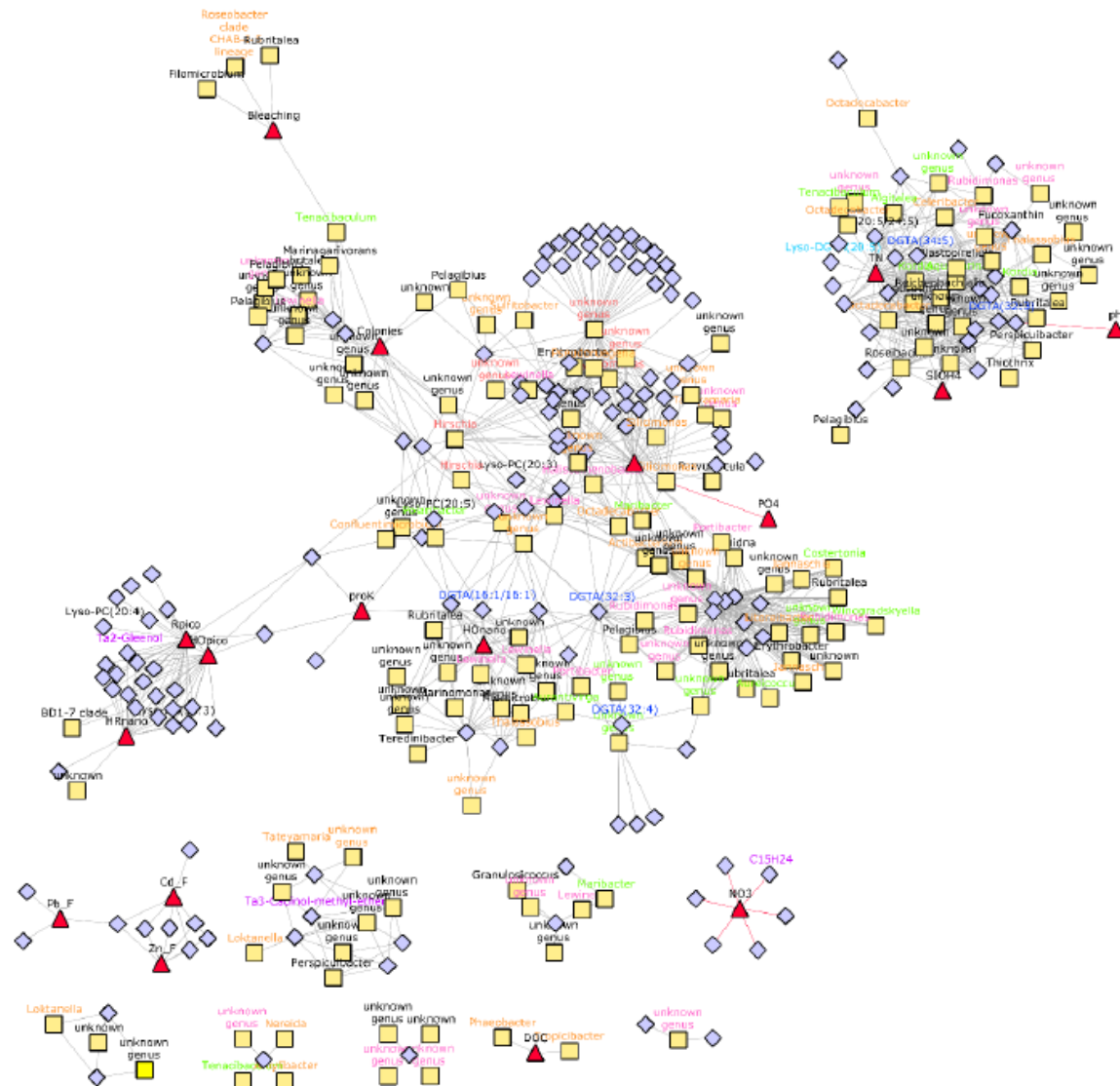
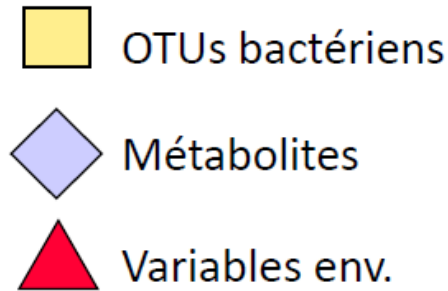


(Paix et al en prep.)

- Clusterisation expliquée par:
Température (PO_4)
Cu / Zn-Cd-Pb
(ACC)

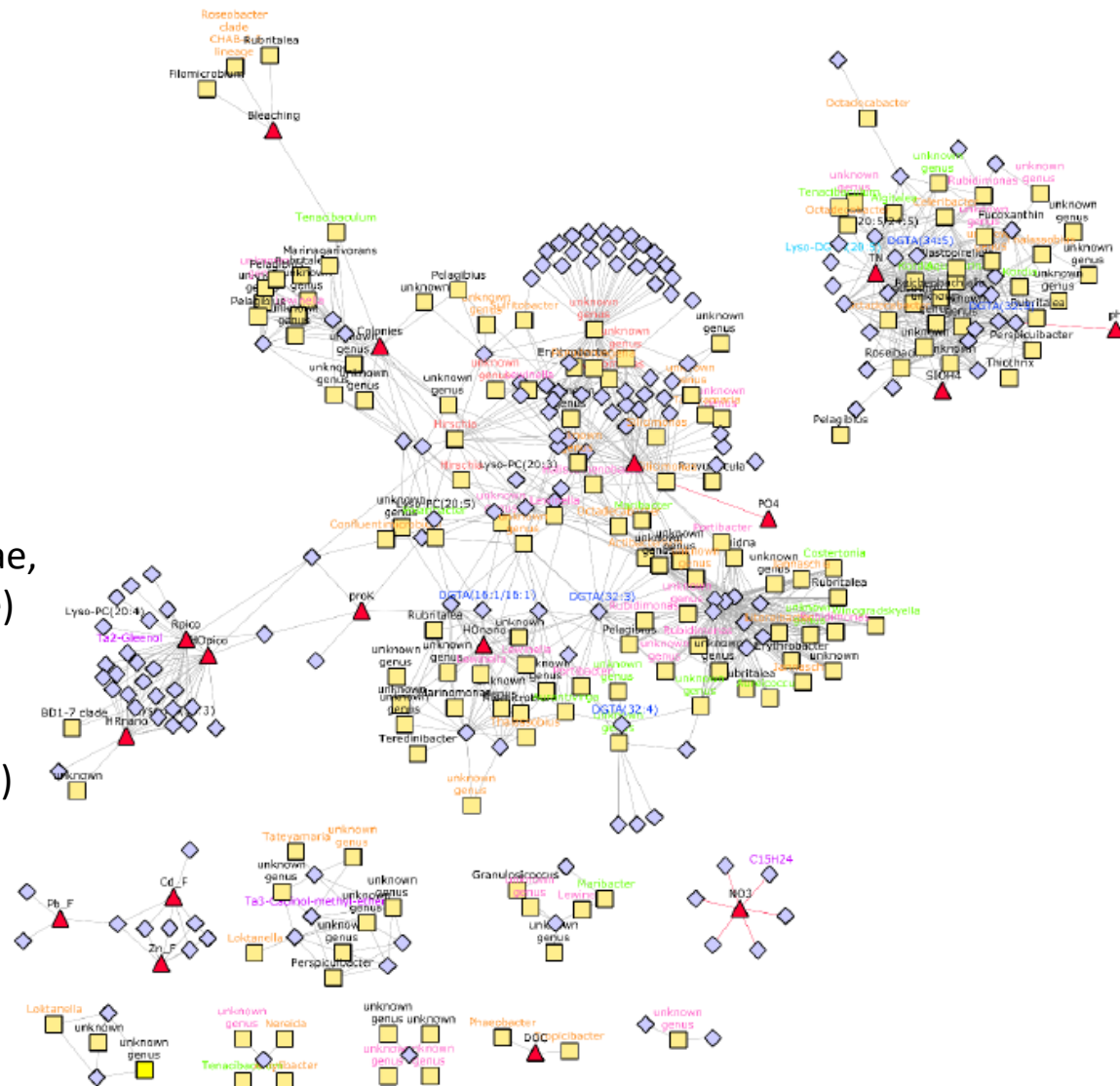


4- Relations métabolomes-microbiotes (Analyse multi-omiques / MixOmic -DIABLO)



 OTUs bactériens
 Métabolites
 Variables env.

(Paix et al. 2019 Environ Microb)



Conclusions :

- ↳ Biofilm = colonisation très rapide (qq heures) procaryotes / pico- et nanoautotrophes puis diatomées (qq jours) / densités élevées / Lien avec dimension
- ↳ Effet structurant (abondance et diversité) des paramètres environnementaux et de la nature des surfaces sur les communautés de biofilms
- ↳ Communautés dynamiques / OTUs
Convergence des communautés pour les surfaces non biocides dans le temps malgré des différences de densités (conditionnement MO, EPS, ...)
- ↳ Relargage de biocide(s) très structurants qq soient les microorganismes
- ↳ -Approche originale multi-omics
- Paramètres environnementaux et métabolites de surface des algues structurent leurs communautés épiphytes (Holobionte)

Remerciements

POLLET Thomas (Post-doc.)
CATAO Elisa (ATER)
COCLET Clément (Doc.)
PAIX Benoit (Doc.)
BARRY Raphaëlle (ASI)
LEJARS Marlène (IR)
BRESSY Christine (MC)
CULIOLI Gérald (MC)



REHEL Karine
FAY Fabienne



TURQUET Jean
TUNIN-LEY Alina



GHIGLIONE Jean-François
VUILLEMIN Renaud



GARNIER Cédric
MISSION Benjamin



DEBROAS Didier



POCHON Xavier



(New-Zealand)





Merci de votre attention !