

Master EPNS spécialité EBE parcours BFI  
Année 2015/2016



# Caractérisation et comparaison du biofilm sur différents matériaux pour la construction de récifs artificiels.

Rapport de stage de Master 2  
Soutenance le 17/06/2016

Elisabeth Riera

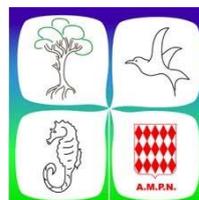
Structure d'accueils :  
UMR BOREA 7208 équipe RESAQUA et FRE 3729 ECOMERS

Encadrée par :

Dominique Lamy Maître de conférence UPMC (BOREA)

Cédric Hubas Maître de conférence MNHN (BOREA)

Patrice Francour Professeur Université Nice Sophia Antipolis (ECOMERS)



## Table des matières

Remerciements .....	2
Avant-propos .....	3
Introduction .....	3
Matériel et Méthodes.....	6
I. Site d'étude et échantillonnage .....	6
II. Analyse génomique .....	8
A. Extraction de l'ADN et purification .....	8
B. PCR.....	9
C. T-RFLP.....	11
III. Analyse des pigments en HPLC .....	12
A. Extraction.....	12
B. Injection .....	12
IV. Analyses biochimique des EPS .....	12
A. Extraction.....	12
B. Colorimétrie des protéines et des polysaccharides .....	13
C. Analyse des Acides aminées en HPLC.....	14
V. Analyses statistiques .....	15
Résultats .....	16
I. . Analyse des communautés bactériennes .....	16
II. Analyse quantitative des communautés photosynthétiques et des caractéristiques biochimiques du biofilm.....	19
III. Analyse qualitative des communautés photosynthétiques et des caractéristiques biochimiques du biofilm.....	20
IV. Analyse factorielle multiple des proportions d'acides aminés et de pigments.....	22
Discussion .....	24
Références .....	29
Annexes.....	31

## Remerciements

Merci à ECOMERS, à Patrice Francour pour m'avoir fait confiance sur l'élaboration du sujet de ce stage avec l'aide de Dominique Lamy et de Cédric Hubas, et pour m'avoir intégrée dans ce projet que j'espère pouvoir poursuivre en thèse.

Merci à BOREA, à Dominique Lamy et Cédric Hubas pour leur encadrement et leur formation sur leurs spécialités respectives, pour leur écoute et leur patience et pour m'avoir soutenue dans l'élaboration de ce projet de stage et de thèse. Merci à toute l'équipe RESAQUA : Tarik, Najete, Pierrick, Frank, Silvia, et aux stagiaires pour leur bonne humeur et leurs conseils.

Merci à l'Institut de Biologie de Valrose (IBV/CNRS UMR7277/INSERM U1091), à Thierry Virolles et Laurent Turchi qui ont mis à notre disposition leur matériel de laboratoire lors de l'échantillonnage.

Merci à la Station Océanographique de Banyuls-sur-Mer et à l'équipe Microbia Environnement, à Delphine Guillebault, Carmen Lara Manes, Elisa Villa et Etienne Deragon pour m'avoir accueilli et formé sur les techniques de biologie moléculaire.

Merci à Jacqueline Gautier-Debernardi (Association Monégasque pour la Protection de la Nature) pour avoir mis à disposition le local et les moyens à la mer de l'AMPN pour le bon déroulement de la phase expérimentale dans la réserve du Larvotto.

Merci à mes proches et à ma famille pour leur soutien durant toute mes études et jusqu'à la fin de mon stage.

## Avant-propos

C'est lors de mon entretien avec Patrice Francour, directeur du Laboratoire ECOMERS à l'université de Nice Sophia Antipolis, que l'idée d'une collaboration avec l'équipe RESAQUA de l'UMR BOREA (MNHN Paris) a émergé.

Précédemment, j'avais travaillé sur la thématique des micro-organismes établissant des biofilms sur les surfaces immergées lors de mon stage volontaire encadré par Dominique Lamy et Cédric Hubas (respectivement MC UPMC et MC MNHN dans l'équipe Resaqua de l'UMR BOREA 7208).

Patrice Francour m'a ainsi proposé de réfléchir sur un sujet axé sur l'utilisation du biofilm comme bio-indicateur pour déterminer la qualité du substrat utilisé pour des nouveaux prototypes de récifs artificiels conçus par une imprimante 3D. C'est donc en concertation avec Patrice Francour, Dominique Lamy et Cédric Hubas que le sujet de ce rapport s'est défini.

Ces travaux préliminaires pourront être poursuivis par un sujet de thèse proposé par Patrice Francour et co-encadré par Cédric Hubas, au sein de l'école doctorale des sciences fondamentales et appliquées (université Nice Sophia-Antipolis), pour lequel je suis candidate.

## Introduction

Les premières installations de récifs artificiels sur le littoral français ont débuté dans les années 60, avec des structures construites à partir de matériaux de recyclage (ex : vieux pneus, carcasses de voitures, épaves de bateau ) et immergées selon des initiatives locales (*Barnabe et al. 2000*). Ce n'est qu'au début des années 80 que ces initiatives se sont structurées et que des programmes spécifiques ont été développés, avec *in fine* l'immersion de structures et des matériaux spécialement conçus pour résister aux conditions marines (*Barnabe et al. 2000*). La convention de Barcelone définit les récifs artificiels comme « des structures spécifiquement édifiées pour protéger, régénérer, concentrer et/ou accroître la production des ressources marines biologiques, que ce soit pour la pêche ou la conservation de la nature, laquelle comprend la protection et la régénération des habitats » (*Programme des Nations Unies pour l'environnement 2005*). En réponse à ces problématiques, près de 40 000 m<sup>3</sup> de béton ont été déployés sur les côtes méditerranéennes depuis une trentaine d'années (*Barnabe et al. 2000*). En région Languedoc Roussillon de nombreux récifs ont été installés comme des obstacles pour aider les pêcheries artisanales à lutter de la pêche illégale au sein de des 5km de limite nautique (*Barnabe et al. 2000*). En région Provence Alpes Côte d'Azur, des récifs ont immergés dans le but d'évaluer la restauration de la faune et des habitats de

posidonie (*Oceanica posidonia*) dégradé par la construction côtière sur les 10 premiers mètres de profondeur (Barnabe et al. 2000). De par la nature du matériau généralement utilisé (i.e. béton), la conception de ces récifs par coffrage limite la complexité de ces ouvrages et ne permet pas de recréer une complexité tridimensionnelle équivalente à celle des milieux rocheux naturels. Récemment, le développement d'imprimantes capables d'imprimer des objets en trois dimensions avec des matériaux plus flexibles a permis de créer des récifs artificiels différents, plus complexes et donc plus proches des habitats naturels. Des prototypes de récifs artificiels ont été développés sur un design proposé par le laboratoire ECOMERS en collaboration avec la branche Recherche & Développement d'une société maritime d'assistance aux projets offshore située aux Pays-Bas (Boskalis) et la société italienne conceptrice de l'imprimante 3D (D-Shape). Ces nouveaux types de récifs artificiels sont imprimés en sable de dolomite ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ) agrégé par de l'oxyde de magnésium ( $\text{MgO}$ ) qui forme après séchage de la brucite ( $\text{CaMg}(\text{OH})_2$ ). Des prototypes devraient être mis à l'eau au cours de l'été 2017 dans la réserve naturelle du Larvotto avec la collaboration de l'Association Monégasque pour la Protection de la Nature (AMPM).

Dans leur revue, Tessier et al. (2015) montrent que la colonisation des récifs artificiels est assez rapide, puisqu'après un mois d'immersion, des poissons (Labridae, *Symphodus* spp., Sparidae, *Diplodus* spp. et Scorpaenidae, *Scorpaena* spp.) sont déjà observés autour de ces structures. Puis, la richesse spécifique continue d'augmenter après 10 ans d'installation autour de ces structures car elles offrent de nouvelles zones de colonisation (Tessier et al. 2015). Jusqu'à présent, la colonisation des récifs artificiels a été suivie essentiellement sur l'établissement des colonies de macroorganismes sessiles (Tessier et al. 2015; Moura et al. 2008; Brown 2005), permettant ensuite l'arrivée des poissons. Les études spécialisées sur le biofouling<sup>1</sup> décrivent largement les processus de colonisation de toutes les surfaces artificielles en milieu marin comme une succession d'étapes, avec en premier lieu l'établissement du microfouling ou biofilm, correspondant à l'établissement de colonies pionnières de microorganismes sessiles (Salta et al. 2013). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à caractériser d'un point de vue biochimique et biologique le biofilm des récifs artificiels, pourtant déterminant dans l'établissement du macrofouling (macroorganismes sessiles : macro-algues, spongiaires, vers tubicoles, balanes; Salta et al. 2013). Le biofilm est défini comme une matrice renfermant des assemblages microbiens adhérant à des surfaces,

---

<sup>1</sup> Biofouling : accumulation de matière biologique sur les surfaces, avec les biofilms produits par les micro-organismes et le macrofouling par les micro-organismes. (D. Bixler & Bhushan 2012)

biologiques ou non (*Costerton et al. 1994, Costerton et al. 1995, Hall-Stoodley et al. 2004*). Dans le milieu marin, les biofilms sont composés de bactéries, d'archées et d'eucaryotes unicellulaires tels que des micro-algues, des champignons microscopiques, des flagellés hétérotrophes et des ciliés sessiles. L'abondance relative de ces différents taxons varie en fonction des conditions environnementales, les diatomées et les bactéries étant majoritairement représentées (*Salta et al. 2013*). Ces micro-organismes qui vivent d'abord une phase planctonique se fixent sur toutes surfaces immergées (artificielles, naturelles, vivantes) qui impliquent des interactions physico-chimiques (interactions électrostatiques, de van der Waals ou hydrophobes lorsque les interactions sont gouvernées par l'entropie). Dans une seconde phase, les communautés s'adaptent physiologiquement à la surface (*Bulard 2012*) en produisant une matrice de polymères extracellulaires (EPS) composée de macromolécules telles que des polysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des lipides et d'autres composés polymériques (*Sheng et al. 2010*). Ces EPS constituent une matrice donnant une structure dynamique tridimensionnelle au biofilm et induit chez les microorganismes qui les produisent l'expression d'un phénotype permettant d'améliorer l'accès aux nutriments, une colonisation plus robuste et une meilleure résistance de la communauté aux contraintes de l'environnement (*Salta et al. 2013*). Les EPS des biofilms sont très hétérogènes et varient spatialement, chimiquement et physiquement selon les gradients environnementaux (pH, température, oxygène etc...; *Costerton et al. 1995*). La compréhension des processus de colonisation d'un récif artificiel nécessite d'approfondir nos connaissances sur la première étape de colonisation du biofilm encore peu étudiée dans ce contexte et jouant un rôle déterminant dans l'établissement de l'épifaune et de l'épiflore, maillons essentiels des réseaux trophiques.

Dans le cadre de l'évaluation de la qualité des nouveaux types de récifs imprimés en dolomite/brucite, une étude comparative se focalisant sur la première étape de colonisation a été mise en place. Des échantillons de différents types de surface (béton, roche naturelle reconstituée et dolomite/brucite) ont été immergés dans la réserve du Larvotto à Monaco sur un cycle de 35 jours afin de déterminer les premières phases de colonisation du biofilm et d'identifier les variations potentielles de composition biologique et biochimique du biofilm entre les différents substrats utilisés.

Les questions posées sont donc : (i) existe-t-il une différence de diversité microbienne dans la colonisation de ces différents substrats ? (ii) existe-t-il une différence de composition des polymères extracellulaires entre les biofilms des différents substrats ? (iii) comment

évoluent la diversité et la composition biochimique des biofilms au cours du temps sur chaque type de substrats ?

L'hypothèse principale est que le type de substrat colonisé influence la diversité et/ou la biomasse des microorganismes du biofilm. Nous avons ainsi cherché à évaluer (i) la composition du biofilm en bactéries par T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) sur les différents types de substrat et (ii) la composition en organismes unicellulaires photosynthétiques par chromatographie en phase liquide. Suivant les microorganismes et les différents types de substrat, la composition biochimique des substances polymériques extracellulaires (EPS) du biofilm est susceptible de changer. Nous avons ainsi cherché à déterminer (iii) la proportion en protéines et polysaccharides par colorimétrie et (iv) la composition en acides aminés de ces EPS a été réalisée par chromatographie en phase liquide.

## Matériel et Méthodes

### I. Site d'étude et échantillonnage

L'étude a été menée dans la réserve du Larvotto, Principauté de Monaco (43.743950° N et 7.434700° E, Figure 1), une aire marine protégée gérée par l'AMPN (Association Monégasque de Protection pour la Nature).

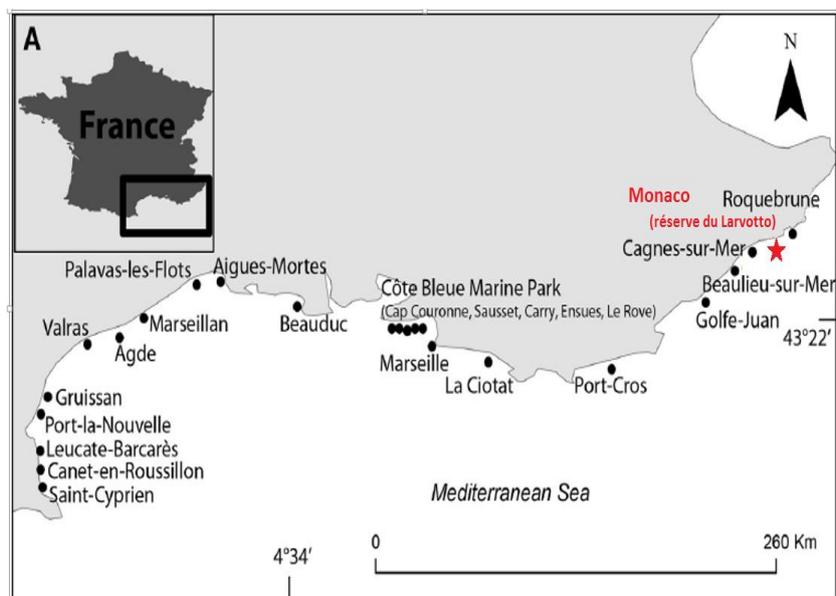


Figure 1. Localisation des récifs artificiels sur la côte méditerranéenne française. (Tessier et al. 2015). Croix rouge : récif en dolomite (immersion prévue en juin 2017), points noirs : récif en béton.

Les échantillons ont été placés à 2 mètres au-dessus d'un fond sableux s'étendant par 18 mètres de profondeur. L'immersion et l'installation des échantillons ont été faites en

plongée sous-marine (Patrice Francour) (Figure 2). Les échantillons sont des pavés, d'approximativement 5x2x2cm de côtés, de béton, de roche naturelle recomposée proche de la constitution du béton et de brucite principalement composé de sable de dolomite. La taille précise de chaque échantillon est mesurée afin de standardiser les expérimentations. Pour chaque substrat (béton : B, roche naturelle reconstituée : N et dolomite/brucite : D), 3 répliquats ont été prévus par type d'analyses (structure des communautés bactériennes et des communautés photosynthétiques, composition biochimique des EPS), et sont fixés sur un quadrat (soient 27 échantillons par quadrat) en plastique de 1 m x 1 m sur une maille de plastique de 0,5 cm (Figure 2).



Figure 2. A. Quadras immergés dans la réserve du Larvotto (Patrice Francour). B. Quadra prélevé J28 (Elisabeth Riera)

L'expérience a duré 35 jours, comprenant 5 temps de prélèvements correspondant à la phase d'initiation 24h après l'immersion, puis un prélèvement toutes les semaines pour suivre la maturation du biofilm et son maintien. Une tempête, durant la troisième semaine, a décalé les prélèvements (Figure 3). Au total, 135 échantillons ont été immergés (Annexe 1).

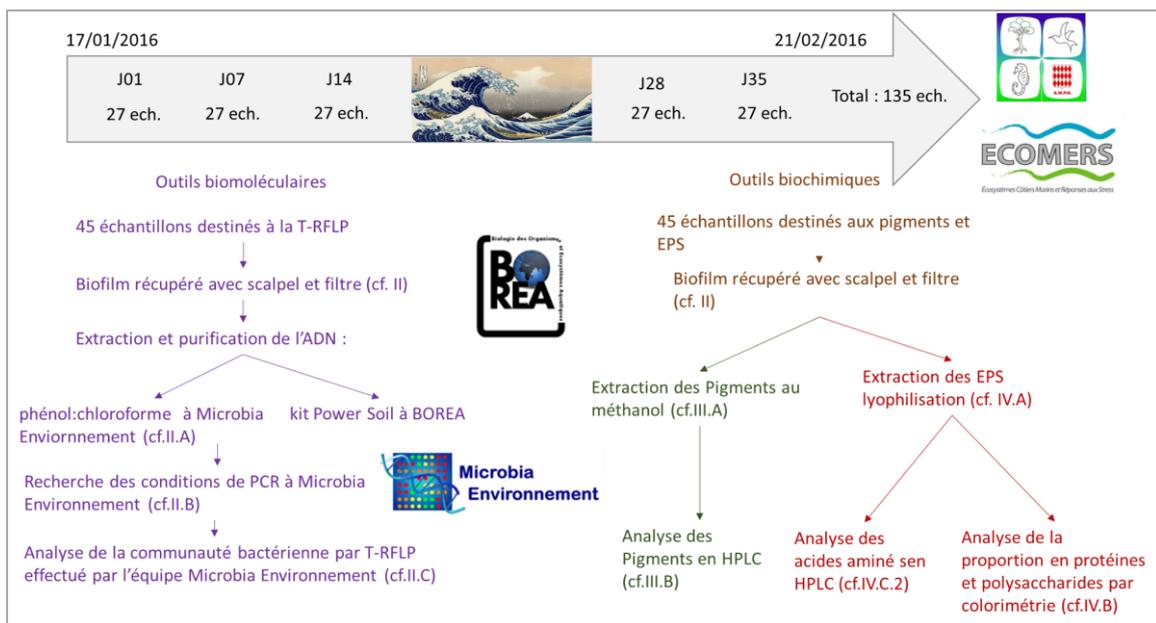


Figure 3. Déroulement des expérimentations (la numérotation indiquée entre parenthèses précise dans quelle partie de la section Matériels et Méthodes ces expérimentations sont développées)

La dernière partie des manipulations de T-RFLP a été faite par l'équipe Microbia-Environnement de Banyuls-sur-Mer, toutes les autres manipulations ont été effectuées par moi-même (Figure 3).

## II. Analyse génomique

Le biofilm a été récupéré à l'aide de scalpel pour gratter manuellement la surface des substrats, des filtres en fibre de verre de type GF/F ont été utilisés pour absorber le biofilm restant.

### A. Extraction de l'ADN et purification

Le biofilm récupéré a été traité pour en extraire l'ADN en suivant le protocole d'extraction du Kit PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit (MOBIO laboratories, Inc). Les premières amplifications en chaîne par polymérase (PCR pour *Polymerase Chain Reaction*) d'ADN ont été faites sur cette première extraction et n'ont donné aucun produit d'amplification spécifique. La présence d'ADN dans les échantillons extraits a été vérifiée par migration (20 minutes à 10 volts) de 3µl des produits d'extraction mélangés à 2µl de tampon de charge, sur gel d'agarose à 1% préparé dans une solution tampon de 40 mM Tris, 40 mM acétate, 1 mM EDTA, à pH 8,2 - 8,4 diluée 75 fois. La présence d'ADN suivi d'une smire, montrant la présence d'autres composés que l'ADN, nous a amené à procéder à une deuxième extraction au phénol:chloroforme afin de garantir une meilleure purification des échantillons de biofilm. En effet, les biofilms peuvent souvent être riches en inhibiteurs de PCR, tels que les polysaccharides et les protéines (*Schrader et al. 2012*), inhibiteurs qui n'avaient visiblement pas été totalement éliminés lors de la première extraction par le kit Power Soil puisque les premières PCR n'ont conduit à aucun produit d'amplification. Pour procéder à la deuxième extraction, 100µl d'alcool phénol:chloroforme:isoamyl (25:24:1) sont ajoutés au même volume d'échantillon à extraire. Le phénol permet de se débarrasser des protéines, le chloroforme mixé avec l'alcool isoamyl permet de se débarrasser des composés phénol et limite l'activité des DNases. L'ensemble est agité délicatement pendant 20 s puis centrifugé 5 min à 16000xg à température ambiante. La phase aqueuse (dans le surnageant) où se trouve l'ADN est récupérée et transférée dans un nouveau tube, puis 50 µl d'acétate d'ammonium (7,5M), 1µl de glycogène (20 g·µl<sup>-1</sup>) et 375 µl d'éthanol (100 %) sont ajoutés. Les tubes sont placés à -20 °C toute la nuit pour précipiter l'ADN. Le lendemain, les produits de précipitation sont centrifugés à 4 °C pendant 30 min à 16 000xg pour culotter l'ADN, puis l'ensemble du surnageant est jeté en faisant attention à ne pas perturber l'ADN culotté. Cette

étape est répétée trois fois pour éliminer un maximum d'éthanol. L'ADN est ensuite séché au speedvac 5 à 10 min à température ambiante. La quantité d'ADN extrait a été mesurée par Nanovue (GE Healthcare ® NanoVue TMUV/Visible Spectrophotometers).

## B. PCR

L'ADN extrait et purifié a été analysé pour déterminer la structure des communautés bactériennes par T-RFLP. La méthode repose sur la comparaison des tailles des fragments de restriction obtenus par digestion des produits de PCR fluorescents. La coupure par enzymes de restriction libère des fragments de tailles variables selon les espèces présentes dans le mélange analysé. Ces produits de digestion sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire et la fluorescence est détectée par un laser. (Figure 4).

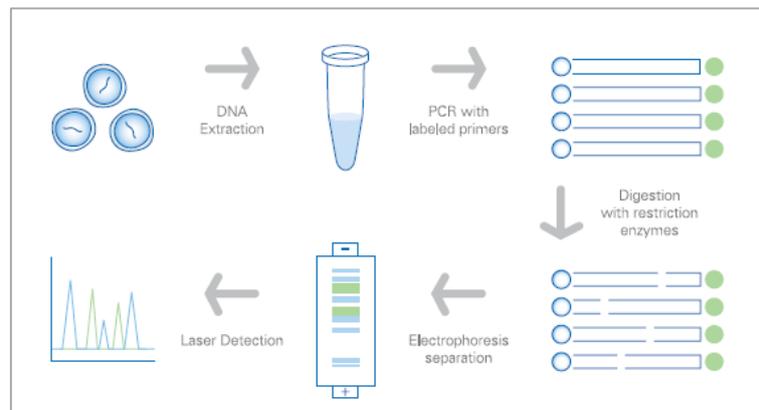


Figure 4: Principe de la TRFLP ( d'après Applied Biosystems, 1995).

L'amplification de l'ADN a été effectuée par PCR avec les primers spécifiques de l'ADN 16S ribosomal des eubactéries ci-dessous :

FAM-labelled primer 27F 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'

HEX -labelled primer 1492R 5'GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'

Les marqueurs FAM et HEX sont des molécules fluorescentes liées à l'extrémité 5' des primers qui permettent de déterminer la taille des fragments digérés grâce à un détecteur de fluorescence. La réaction de PCR (Figure 5) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, la répétition de réaction liée à un programme thermique permet la réplication d'une matrice d'ADN double brin (Figure 5).

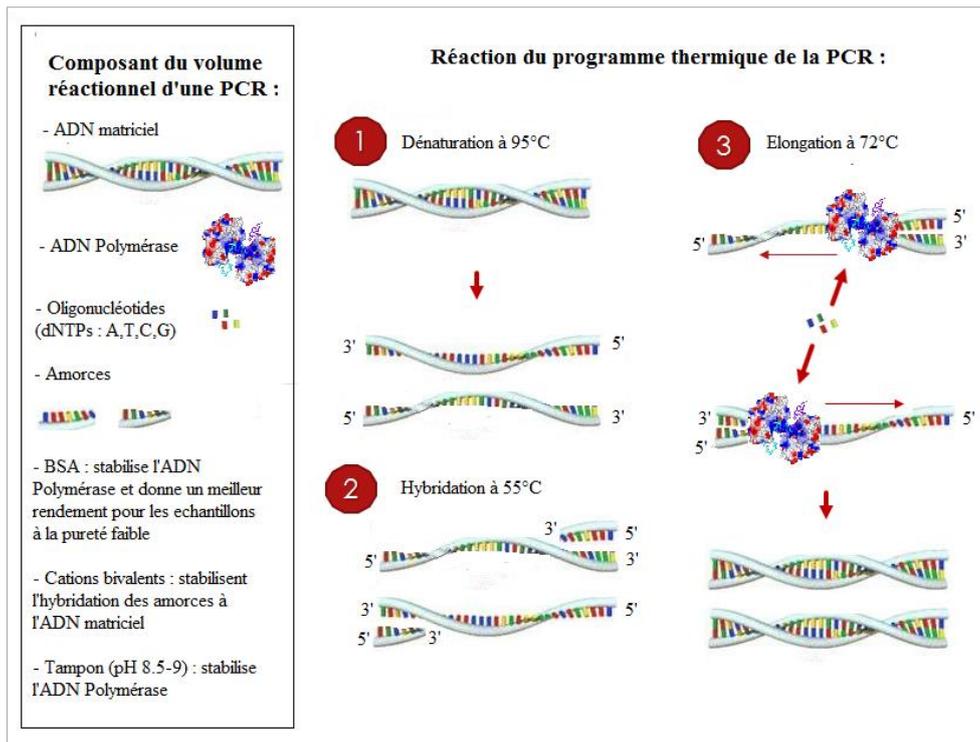


Figure 5. Principe de la PCR et conditions optimales d'amplification appliquées aux échantillons (Elisabeth Riera, d'après <http://www.esrf.eu/files/live/sites/www/files/decouvrir/quelques-resultats/sciences-vie/DNArepair.jpg> et <http://www.eurofins.fr/fr-fr/analyses/produits-alimentaires/ogm-et-genotypage/ogm/analyses-genetiques-par-pcr.aspx>)

Nous avons utilisé une ADN polymérase mutée, la KAPA2G Fast HotStart (KK5609, KappaBiosystem ®) mise en solution par le fabricant dans un tampon contenant les oligonucléotides et 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Il s'agit d'une enzyme de deuxième génération dont la processivité et la vitesse d'élongation est plus rapide que les *Taq polymérase* de type sauvage (KAPABIOSYSTEMS 2014). D'autre part, elle permet de meilleurs rendements et elle détient une meilleure sensibilité que les enzymes concurrents sur une large gamme de cibles (KAPABIOSYSTEMS 2014). Au total, neuf tests de conditions de PCRs ont été nécessaires pour ajuster d'une part les programmes de cycle thermique et d'autre part le volume réactionnel et la concentration de ses différents composants (Figure 5). Les échantillons ont été amplifiés en 3 répliquats dans les conditions présentées ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1: Conditions optimales de PCR (cycle thermique et volume réactionnel) finalement appliquées aux échantillons

Programme de cycle thermique			Composants du volume réactionnel (25µl)	
Nbr. de cycle	Nature du cycle		Composants	Qté.
1	cycle de dénaturation	15' à 95°C	Ready mix KAPA (X1)	12.5µl
35	cycle de dénaturation	1' à 94°C	ADN	0.5µl
	cycle d'hybridation	1' à 55°C	Primer FAM (250nM)	0.25µl
	cycle d'extension	1'30" à 72°C	Primer HEX (250nM)	0.25µl
1	extension finale	10' à 72°C	BSA (0.4µg/µl)	1µl
1	fin	8 à 4°C	H <sub>2</sub> O	10.75µl

Les produits d'amplification sont ensuite migrés (25 minutes à 10 volt) sur gel d'agarose à 1% préparé dans une solution tampon de 40 mM Tris, 40 mM acétate, 1 mM EDTA, à pH 8,2/8,4 diluée 75 fois, et de bromure d'éthidium pour visualiser sous UV les bandes d'ADN amplifiées par PCR.

### C. T-RFLP.

L'analyse s'est focalisée sur les prélèvements de la deuxième semaine d'immersion (J14) puisque des produits d'amplification ont été obtenus pour tous les répliquats de cette série de prélèvement. L'ensemble des 3 répliquats de PCR par échantillon est poolé puis purifié sur plaque à l'aide d'une résine (G50 Sephadex®) permettant de dessaler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La concentration (en ng) de chaque produit est mesurée par coloration au picogreen et 1 µg de chaque produit est prélevé pour réaliser la digestion avec 0,6 unités de l'enzyme de restriction HhaI et 1µg d'ADN pendant 4h à 37 °C selon les recommandations du fournisseur (PROMEA, ref R6441). Les produits de digestion sont purifiés sur plaque avec la résine G50 Sephadex® et la concentration des produits de digestion est mesurée par coloration au picogreen. Chaque produit (30 ng) est mélangé avec 13,6 µl de Hi-Di formamide et 0,4 µl de LIZ size Standard pour un volume final de 20 µl. L'ensemble est dénaturé à 95 °C pendant 5 min et placé sur la glace pendant 5 min. Les produits de TRFLP sont ensuite injectés dans une électrophorèse capillaire qui sépare les fragments d'ADN marqués par fluorescence selon leur rapport charge/taille en passant à l'intérieur de tube capillaire rempli d'un électrolyte<sup>2</sup>. Les profils obtenus sont analysés avec le logiciel T-REX, afin d'éliminer les faux pics et ceux non spécifiques (élimination du bruit de fond). Les profils sont alignés et regroupés en unités taxonomiques fonctionnelles (OTUs), illustrant un regroupement d'individus d'une même espèce dont les séquences d'ADNr 16S présentent une similitude de plus de 97,5% selon la standardisation internationale (<http://reflexions.ulg.ac.be/>, Université de Liège, 2016).

Un seuil de correction (<0,25) sur les résultats de TRFLP a été appliqué, puisque 55 singletons<sup>3</sup> sont retrouvés sur le béton parmi lesquels 10 détiennent une abondance très faible (<0,25). Ce seuil de correction n'affecte pas les OTUs détectées sur les autres échantillons.

---

<sup>2</sup> Substance conductrice, contenant des ions mobiles.

<sup>3</sup> Dans le domaine de la théorie des ensembles en mathématiques, ensemble ne contenant qu'un unique élément.

### III. Analyse des pigments en HPLC

#### A. Extraction

Le biofilm récupéré de la même façon que pour l'analyse génétique (voir A.1 p.8) est conditionné dans des tubes Falcon de 15 ml auxquels sont ajoutés 6 ml de solution de méthanol à 2 % d'acétate d'ammonium (concentration finale) permettant d'extraire les pigments du biofilm (*Brotas & Plante-Cuny 1996*). L'extraction se fait à 4 °C pendant 4 h à l'abri de la lumière. Les échantillons ainsi extraits sont centrifugés 5 min à 2500xg pour récupérer le surnageant puis filtrés à l'aide d'un filtre seringue (porosité de 0,2 µm). Les échantillons sont conservés au congélateur à -25 °C avant l'injection.

#### B. Injection

Les échantillons sont injectés dans un chromatographe en phase liquide (HPLC 1260 Infinity Agilent Technologies ®), 24 h au plus tard après l'extraction pour limiter la dégradation des pigments. Les pigments sont séparés selon leur polarité en fonction de leur affinité avec les solvants utilisés. La fluorescence est enregistrée ainsi que l'absorbance dans le spectre de la lumière entre 190 et 950 nm. La méthode utilisée est celle de Brotas généralement utilisée pour l'étude du phytobenthos (*Brotas & Plante-Cuny 1996*) selon le programme décrit ci-dessous (Tableau 2).

Tableau 2. Programme d'injection des pigments en HPLC

Temps (min)	A(%) : Méthanol (95%) à 2 % Acétate d'ammonium	B(%) : Acétonitrile (90%)	C(%) : Ethylacétate (100%)	flow/min	pression max (bar)
0	60	40	0	0,5	400
2	0	100	0	0,5	400
7	0	80	20	0,5	400
17	0	50	50	0,5	400
21	0	30	70	0,5	400
28,5	0	30	70	0,5	400
29,5	0	100	0	0,5	400
30,5	60	40	0	0,5	400
35	60	40	0	0,5	400

### IV. Analyses biochimique des EPS

#### A. Extraction

Les pavés de chaque substrat sont placés dans des flacons contenant 1 g de résine échangeuse de cations (Dowex Marathon C, forme sodique) préalablement imbibée de 1ml de tampon phosphate salin (PBS) pendant 1 h à 4 °C, puis sont ajoutés 20 ml d'eau de mer

artificielle ( $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de sel). Les échantillons ainsi préparés sont ensuite placés horizontalement sur agitateur (1 h à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Cette étape permet de décrocher les polymères extracellulaires (EPS) présents dans le biofilm, la résine échangeuse de cations permettant de décrocher les composés chargés qui restent accolés aux membranes cellulaires. La fraction ainsi extraite est centrifugée (10 min à  $3000\times g$ ) pour se débarrasser des débris et ne récupérer que les EPS. La fraction récupérée est dialysée dans de l'eau distillée (2 fois 1 h à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) afin d'éliminer le sel qui peut interférer dans l'analyse des acides aminés. Une fois dialysée, la fraction est congelée ( $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) toute la nuit, en maximisant la surface d'échange air/eau, puis lyophilisée le lendemain. La poudre ainsi obtenue, contenant les EPS, qui sera utilisée pour l'analyse des acides aminés et des polysaccharides, est récupérée dans des tubes propres.

## B. Colorimétrie des protéines et des polysaccharides

### 1. Quantification des protéines

La quantification des protéines sur les EPS ainsi extraits s'est faite selon la méthode colorimétrique de Lowry modifiée (Frølund et al., 1996 ; Raunkjær J et al., 1994) Les réactifs listés ci-dessous sont utilisés, ils permettent de réagir avec les protéines des EPS :

- Réactif 1 :  $143\text{mM NaOH}$ ,  $270\text{mM Na}_2\text{CO}_3$
- Réactif 2 :  $57\text{mM CuSO}_4$
- Réactif 3 :  $124\text{mM Na-tatrate}$
- Réactif 4 : Réactif 1, 2 et 3 mélangés dans les rapports  $100 : 1 : 1$  (V : V : V).
- Réactif 5 : Réactif de Folin  $5 : 6$  (V : V), à mélanger avec de l'eau distillée.

Un volume de  $250 \mu\text{l}$  d'échantillon est mélangé à  $250 \mu\text{l}$  de SDS à 2 % (Dodecyl Sulfate de Sodium) et à  $700 \mu\text{l}$  du réactif 4. Les échantillons ainsi préparés sont passés au vortex puis placés 15 min au bain-marie à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Le réactif 5 ( $100 \mu\text{L}$ ) est ajouté à chaque tube, remué et passé au vortex immédiatement, puis placés 30 min au bain-marie à  $30^\circ\text{C}$ . Suite à ces deux réactions se forme un complexe coloré bleu dont l'absorbance est mesurée à  $750 \text{ nm}$  au spectrophotomètre, après centrifugation (1 min à  $1600\times g$ ), l'eau distillée servant de blanc. Une courbe de calibration de  $40$  à  $160 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de protéines est obtenue avec du BSA (albumine de sérum bovin).

### 2. Quantification des polysaccharides

La quantification des polysaccharides contenues dans les EPS se fait selon la méthode colorimétrique de Taylor & Paterson (1998). L'échantillon ( $200 \mu\text{l}$ ) est mélangé à  $200 \mu\text{l}$  de phénol à 5% et à 1 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pur. Chaque échantillon est remué doucement l'un après

l'autre puis placé 30 min au bain-marie à 30 °C. La réaction conduit à la formation d'un complexe jaune-rouge, dont l'absorbance est mesurée à 488 nm au spectrophotomètre, l'eau distillée servant là encore de blanc. Une courbe de calibration est obtenue avec une solution standard de D-glucose, pour des concentrations de 40 à 160 mg·l<sup>-1</sup>.

### C. Analyse des Acides aminés en HPLC

#### 1. Hydrolyse des acides aminés

10 µg de poudre contenant les EPS extraits sont placés dans une ampoule de verre à laquelle sont ajoutés 200 µl d'HCl (6N), puis sont scellées sous vide. Les échantillons ainsi préparés sont mis à l'étuve pendant 24 h à 110 °C puis séchés au speedvac. Les produits ainsi hydrolysés sont reconditionnés dans du diluant composé d'H<sub>2</sub>O (97.9 %), de citrate de sodium (2 %), et de Pro Clean 400 (< 0.1 %) (Chromatographic grade cat.No.NA220 (4 fois 250 ml) Pickering laboratories) afin de procéder à l'injection.

#### 2. Injection

L'injection se fait en chromatographie en phase liquide dans une Colonne (Alliance Waters 2695 separation module), couplée à un réacteur qui réalise la dérivation (Pickering Laboratories PCX 5200 post column derivatizer) et un module de détection UV (Alliance Waters 2996 Photodiode) sous un programme de 72 min avec les solvants ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3. Programme d'injection des acides aminés en HPLC

Solution	Solvants	Composition
A	Tampon Na pH3.14 (Sodium éluant 1700-0112)	eau 93%, Sulfolane (5%), Hydrogen chloride (0.6%), Sodium acetate (1.8%), Phenol (<0.1%, pH3.15)
B	Tampon Na pH 7 (sodium éluant Na740)	eau 94%, Sodium chloride (5%), Sodium acetate (1.4%), Phenol (<0.1%, pH 7.40)
C	Soude (Sodium régénérant RG011)	eau (99%), Sodium hydroxyde (0.6%), Sodium chloride (0.4%, pH 13)
D	H <sub>2</sub> O milliQ	

Les acides aminés sont séparés en fonction de leur affinité avec les solvants A et B selon le pH et la concentration en sodium, le solvant C et l'eau permettent de nettoyer la colonne avant la nouvelle injection. Une fois séparés, les acides aminés sont dérivés à 130 °C avec de l'anhydride dans un réacteur, ils sont alors détectés sous UV à 570 nm pour l'ensemble des

acides aminés détenant un amine primaire, et à 440 nm pour la proline qui détient un amine secondaire.

## V. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques et descriptives ont été effectuées sur le logiciel libre R. Les packages suivants, nécessaires aux analyses, ont été utilisés: FactoMineR, vegan, agricolae, ade4.

Les résultats de TRFLP ont d'abord été analysés par un positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) calculé selon l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis qui permet d'évaluer la dissimilarité entre deux échantillons donnés, en termes d'abondance des OTUs présentes dans chacun des échantillons. Une analyse de la dissimilarité (ANOSIM) selon ce même indice a été réalisée pour déterminer l'influence du facteur substrat sur la composition et l'abondance en OTUs.

L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis est compris entre 0 (les deux échantillons ont la même composition) et 1 (les échantillons sont totalement dissemblables). La distance de Bray-Curtis permet d'évaluer la dissimilarité entre deux échantillons donnés, en terme d'abondance d'OTUs présentes dans chacun de ces échantillons (*Bray & Curtis 1957*).

D'autre part, une analyse de la diversité a été réalisée en prenant en compte la richesse spécifique (S), l'indice de Shannon (H) et l'indice d'équitabilité de Pielou (J) :

- (S) La richesse spécifique correspond au nombre d'OTUs retrouvées par échantillon
- (H') L'indice de Shannon mesure la diversité d'une communauté, en fonction du nombre d'OTUs par échantillon et de l'abondance de chaque OTUs ; il est compris entre 0 et 5 (Shannon, 1948).

$$H' = \sum_{i=1}^s pi \ln pi$$

S : richesse spécifique, nombre total d'OTU sur l'échantillon

H' : indice de diversité de Shannon

i : une OTU d'un échantillon

pi : proportion d'une OTU i par rapport à la richesse spécifique qui se calcule de la façon suivante :  $pi = ni/N$

ni = l'abondance pour une OTU et N l'abondance totale de toutes les OTUs

- (J) L'indice de Pielou qui est une expression de l'équitabilité à partir de l'indice de Shannon. La valeur maximale de l'indice de Pielou est obtenue quand la distribution est parfaitement régulière (*Sheldon 1969*).

$$J = \frac{H'}{\ln(S)}$$

Une analyse factorielle multiple (MFA) a été réalisée sur les résultats de proportions de pigments et d'acides aminés détectés en HPLC. L'analyse consiste à réaliser une Analyse en Composante Principale (ACP) sur l'ensemble des variables préalablement standardisées. Les variables ont été standardisées en réalisant une première ACP par groupe puis en affectant à chaque variable du groupe j un poids égal à l'inverse de la première valeur propre de l'ACP du groupe j. Cela permet d'exprimer chaque variable par unité d'inertie et que l'ordination finale ne soit pas uniquement influencée par le groupe contenant le plus de variables.

Des analyses de variance par permutation calculées à partir de l'indice de Bray Curtis (PERMANOVA ; *Anderson 2001, 2005*) ont été réalisées afin de déterminer l'influence du facteur temporel et du facteur substrat, ainsi que l'interaction des deux facteurs, sur les variables quantitatives de l'ensemble des pigments et des acides aminés. L'homogénéité des variances a été vérifiée afin d'appliquer ce test. Une analyse de la dissimilarité (ANOSIM) a été effectuée sur chaque prélèvement pour déterminer s'il existe des différences significatives entre les substrats à chaque pas de temps. Des tests SIMPER (pourcentage de similarité) ont été effectués en utilisant l'indice de Bray-Curtis pour déterminer quelles parts de pigments et d'acides aminés permettent de différencier les substrats et les prélèvements.

Le test non paramétrique de Van der Waerden a été utilisé pour déterminer des différences entre les substrats sur les indices de diversité des résultats de TRFLP, sur les concentrations de pigments totaux et la concentration de polysaccharides et de protéines entre les différents prélèvements et les différents substrats.

## Résultats

### I. . Analyse des communautés bactériennes

Un total de 121 OTUs a été détecté à J14, comprenant 41 OTUs partagées par l'ensemble des substrats et seulement 14 partagées par l'ensemble des échantillons. Sur le béton, 31 OTUs sont retrouvées exclusivement, 9 d'entre elles appartiennent à un seul échantillon (« singleton»). Seules 8 OTUs sont exclusives à la dolomite, dont 7 singletons et 7 OTUs sont uniques à la roche naturelle reconstituée, dont 5 singletons (Figure 6).

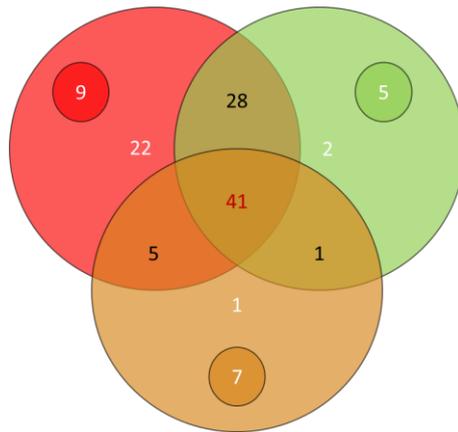


Figure 6 : diagramme de Venn, représentant la répartition des OTUs au sein des substrats, béton (rouge), dolomite (orange), roche naturelle reconstituée (vert), les petits cercles représentent les singletons de chaque substrat.

Une nMDS a été calculée (Figure 7) à partir des abondances en OTUs obtenues à J14. La valeur de stress de 0,1 indique une bonne adéquation entre la distance entre les points sur l'ordination et leur dissimilarité. L'analyse des dissimilarités entre échantillons, calculées à partir de la composition et l'abondance en OTUs, montre que le regroupement des échantillons selon le facteur substrat est significatif (Anosim,  $R = 0,58$  ;  $p = 0,005$ , distance de Bray-Curtis).

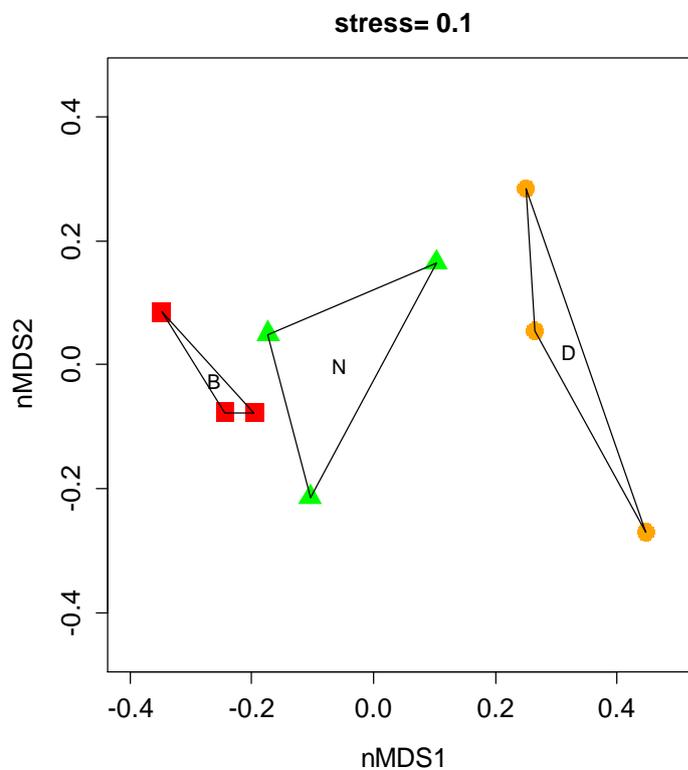


Figure 7 : nMDS sur l'abondance en OTUs, (distance Bray-Curtis). Regroupement selon le béton (rouge), la roche naturelle (vert) et la dolomite (orange)

Le pourcentage de dissimilarité entre tous les échantillons, tous substrats confondus, est de 36 %. Cette dissimilarité s'explique principalement par la dissimilarité moyenne entre la dolomite et les deux autres substrats ( $41,58 \pm 0,07$  %), elle est moins importante entre ces deux derniers ( $31,61 \pm 0,1$  %). La dolomite montre donc des différences de composition et d'abondance en OTUs par rapport à la roche naturelle reconstituée et le béton à J14.

La richesse spécifique ne montre pas de différence significative sur l'ensemble des substrats (test de Van der Waerden ;  $p = 0,06$ ). Cependant, le béton montre la richesse spécifique la plus élevée,  $76 \pm 17$  OTUs ; contre  $37 \pm 12$  sur la dolomite et  $54 \pm 15$  sur la roche naturelle reconstituée (Figure 8.S).

Les indices de diversité de Shannon (Figure 8.H) sont équivalents (Test de Van der Waerden ;  $p = 0,4$ ), bien que celui de la dolomite soit plus faible en moyenne ( $H = 3,3 \pm 0,3$ ) que pour les deux autres substrats (béton :  $H = 3,6 \pm 0,2$  ; roche naturelle reconstituée :  $H = 3,5 \pm 0,2$ ).

Le béton montre l'équitabilité (Figure 8.J) la plus faible ( $J = 0,84 \pm 0,01$  ; test de Van der Waerden,  $p = 0,04$ ) comparativement aux deux autres substrats (dolomite :  $J = 0,94 \pm 0,03$  ; et roche naturelle :  $J = 0,88 \pm 0,04$ ).

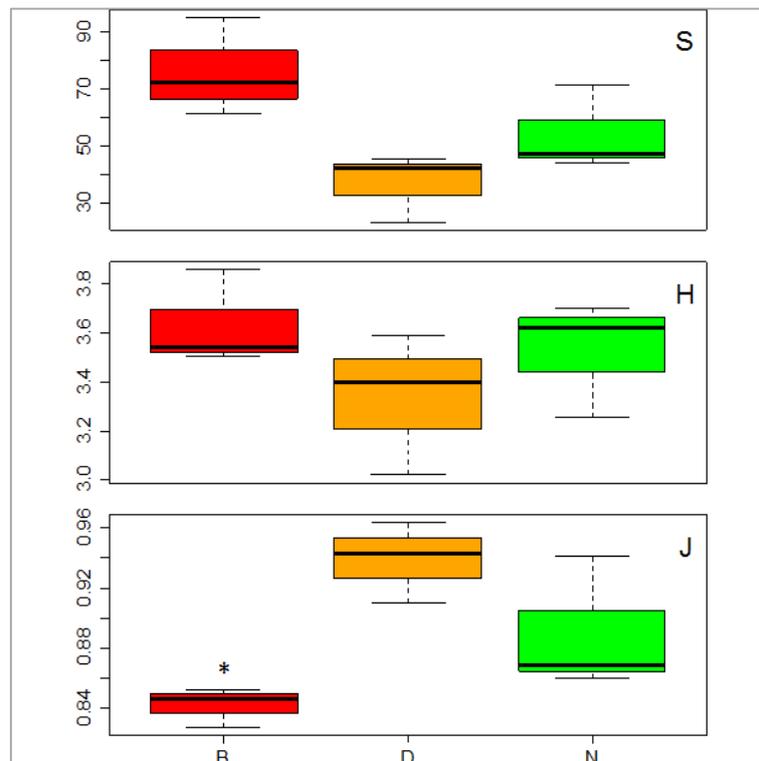


Figure 8: indice de richesse spécifique (S), de diversité de Shannon (H) et d'équitabilité de Pielou (J) à J14 sur les différents substrats B : béton (rouge), D : dolomite (orange), N : Roche Naturelle reconstituée (vert ; (\*) significativement différent ( $p = 0,04$ ).

## II. Analyse quantitative des communautés photosynthétiques et des caractéristiques biochimiques du biofilm

Les quantités de pigments varient entre  $0,2 \cdot 10^{-2}$  et  $1,1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$  pour les pigments, entre  $2,9 \cdot 10^{-5}$  et  $2 \cdot 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$  pour les protéines et entre  $2,6 \cdot 10^{-5}$  et  $2,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$  (Figure 9). Les premiers prélèvements (J01 et J07) sont dans la limite de détection des méthodes utilisées.

Une baisse significative de la concentration en pigments (test Van der Waerden,  $p = 0,0003$ ) est observée pour la dolomite ( $2,9 \cdot 10^{-2} \pm 4,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) et le béton à J28 ( $0,2 \pm 7,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ). À J35, la concentration en pigments continue de baisser pour le béton ( $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) et augmente pour la dolomite ( $0,7 \pm 0,2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ ) (Figure 9.A).

Concernant les concentrations en polysaccharides et en protéines (Figures 9.B et C), elles se stabilisent pour ces deux substrats pour atteindre à J35, respectivement, pour la dolomite  $0,5 \cdot 10^{-2} \pm 1,5 \cdot 10^{-3}$  et  $1,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$  et pour le béton  $7,9 \cdot 10^{-3} \pm 7,9 \cdot 10^{-3}$  et  $1,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,9 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ . Concernant la roche naturelle, ses concentrations en pigments se stabilisent pour atteindre  $0,8 \pm 0,1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$  à J35, et ses concentrations en polysaccharides et protéines continuent d'augmenter pour atteindre  $1,6 \cdot 10^{-2} \pm 0,4 \cdot 10^{-2}$  et  $2,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2}$ , respectivement.

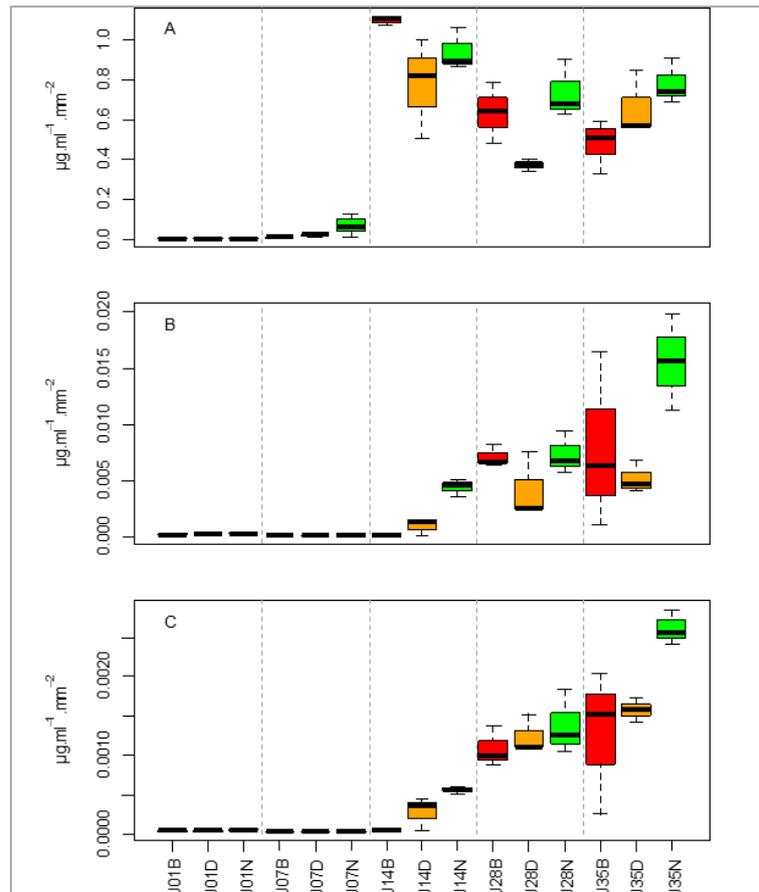


Figure 9 : variation des concentrations de pigments (A), de polysaccharides (B) et de protéines (C) au cours du temps et selon le substrat béton (rouge), dolomite (orange) et roche naturelle reconstituée (vert)

### III. Analyse qualitative des communautés photosynthétiques et des caractéristiques biochimiques du biofilm

Les échantillons sont dominés par des xanthophylles ( $51,7 \pm 5,4$  %) majoritairement représentés par la fucoxanthine, et par la chlorophylle *a* ( $38,8 \pm 5,7$  %). On retrouve ensuite  $6,3 \pm 5$  % de chlorophylle *c*,  $2,7 \pm 5,6$  % de phéopigments et une proportion infime de chlorophylle *b* ( $0,5 \pm 0,6$  % ; Figure 10.A).

La composition en pigments est globalement similaire entre les différents substrats avec toutefois une différence significative à J01 (Anosim :  $R = 0,551$  ;  $p = 0,049$ ). Cela s'explique par une proportion importante de phéopigments observés sur le béton et la dolomite représentant respectivement  $22 \pm 5$  % et  $7 \pm 13$  % de la totalité des pigments quantifiés (Figure 10.A). À J28, une disparition des pigments zéaxanthine, canthaxantine, périidine et chlorophylle *b* est observée. Les proportions de fucoxanthine et de chlorophylle *a*

révèlent d'autre part une différence significative entre la dolomite et les autres substrats (Anosim :  $R = 0,55$  ;  $p = 0,018$  ; distance de Bray-Curtis).

Les proportions de polysaccharides et de protéines (Figure 10.B) sont globalement du même ordre de grandeur, le ratio de polysaccharides sur protéines (S/P) est toutefois plus haut sur la roche naturelle ( $5,1 \pm 2,1$ ) que sur la dolomite ( $3,1 \pm 1,2$ ) (test de Van der Waerden :  $p = 0,03$ )

Une différence significative entre les substrats à J14 est observée avec une proportion de  $1,1 \pm 0,9$  pour le béton, de  $2,5 \pm 1,6$  pour la dolomite et de  $7,7 \pm 1,8$  pour la roche naturelle (test de Van der Waerden ;  $p = 0.001$ ). Lors des deux derniers prélèvements, la dolomite détient un ratio S/P plus bas que les ( $3.2 \pm 1.1$ ) que les deux autres substrats (béton :  $5,9 \pm 1,7$  et roche naturelle reconstituée  $5,6 \pm 1$ ) (test de Van der Waerden ;  $p = 0,02$ ).

Les acides aminés chargés négativement sont dominants sur la dolomite ( $34,1 \pm 4,9$  %) et les hydrophiles et les hydrophobes sont représentés dans une proportion équivalente (respectivement  $29,8 \pm 7,8$  % et  $29,5 \pm 8,3$  %; Figure 10.C). Sur les deux autres substrats, une majorité d'acides aminés hydrophobes est retrouvé ( $36,9 \pm 9,1$  %), suivi des acides aminés chargés négativement ( $29,6 \pm 7$  %) et des hydrophiles ( $25 \pm 7,5$  %).

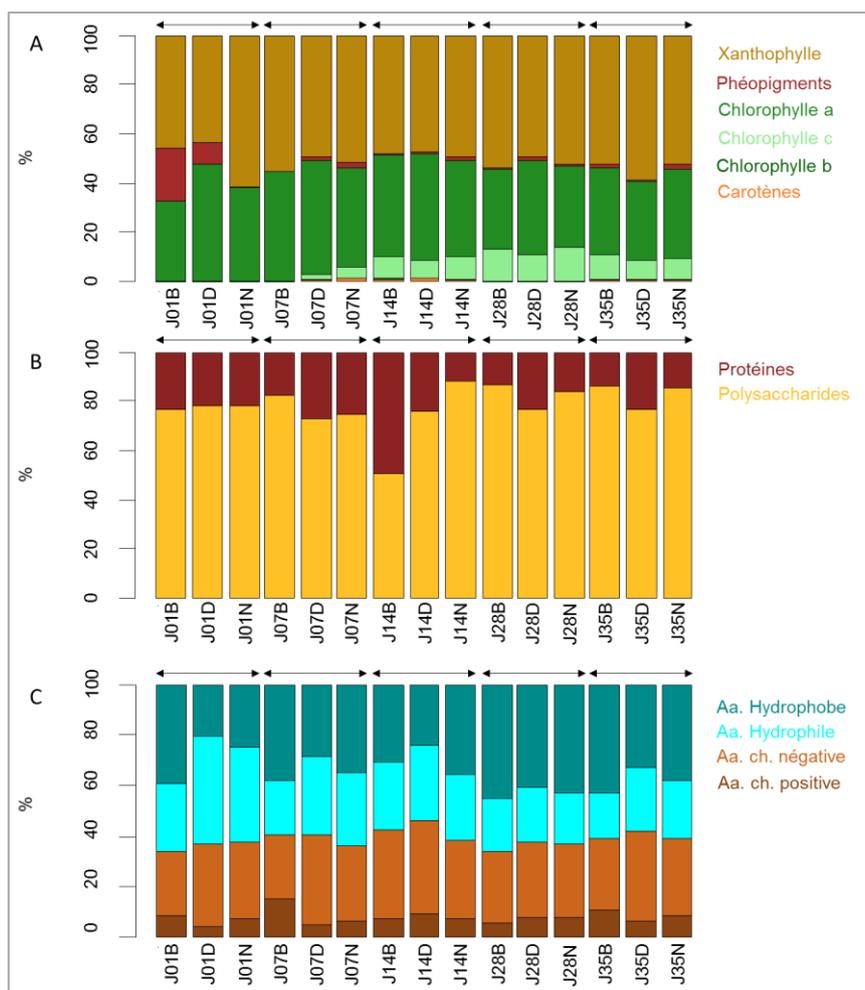


Figure 10 : Proportion moyenne de (A) pigments, (B) protéines et de polysaccharides et (C) acides aminés quantifiés sur les différents substrats au cours du temps.

#### IV. Analyse factorielle multiple des proportions d'acides aminés et de pigments

Les dimensions 1 et 2 de la MFA (Figure 11.A) expliquent 39 % de l'inertie totale du jeu de données. Les groupes de variables contribuent à 50% chacun à la construction de la première dimension et à 41 % et 59 % respectivement pour les acides aminés et pour les pigments pour la construction de la dimension 2. Les deux groupes de variables sont ainsi représentés de façon équitable sur ce plan, mais leur distribution se distingue nettement l'une de l'autre en étant corrélée sur une dimension et inversement corrélée à l'autre. Une corrélation forte est observée entre la glycine et la chlorophylle *a*. Les variables supplémentaires de proportions de polysaccharides et de protéines dans les EPS sont très fortement corrélées entre elles et positivement à la première dimension.

L'ordination des individus sur les dimensions 1 et 2 permet d'individualiser trois groupes de prélèvements (Figure 11.B). Une analyse de la variance par permutation révèle un effet significatif du facteur temps sur les deux groupes de (facteur prélèvement : pigment,  $p = 0,003$  (pigments) et acides aminés,  $p = 0,001$ ). Le facteur substrat et l'interaction des deux facteurs ne révèlent un effet significatif que pour les variables pigment (facteur substrat :  $p = 0,006$  (pigments)  $p = 0,13$  (acides aminés) et interaction:  $p = 0,001$  (pigments) ;  $p = 0,98$  (acides aminés)).

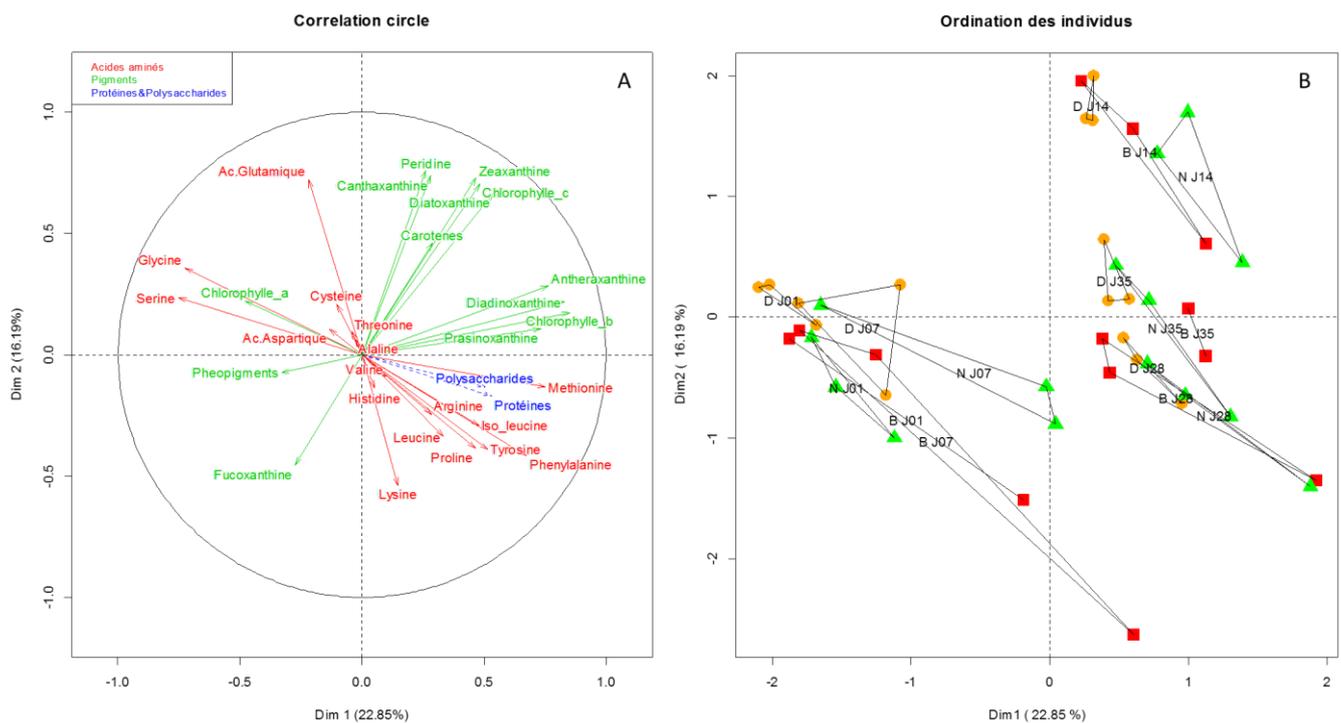


Figure 11 : résultats de l'analyse multifactorielle (MFA) (A) ordination des variables actives : proportion des pigments (vert) et des acides aminés (rouge), et des variables supplémentaires proportion de protéines et polysaccharides (bleue). (B) Ordination des individus (béton : (carré rouge), dolomite : (rond orange), roche naturelle reconstituée : (triangle vert)).

Les premiers prélèvements (J01 et J07) sont corrélés négativement à la dimension 1 et leur distribution s'explique par leurs proportions importantes de chlorophylle *a*, de phéopigments et de fucoxanthine ainsi que d'acide aminés hydrophile (sérine et glycine), excepté des échantillons du béton et de la roche naturelle qui présente davantage de proportion lysine (également hydrophile).

Le prélèvement J14 est corrélé positivement à la dimension 2, les substrats sont davantage distincts, bien que le béton et la roche naturelle présente une forte variabilité. Les échantillons présente alors davantage de pigment xanthophylle (zéaxanthine, diatoxanthine, périidine, canthaxanthine) et de chlorophylle *c* et d'acide glutamique (acide aminé chargé

négativement), excepté un échantillon de roche naturelle reconstituée et de béton qui sont ordonnés parmi les échantillons des prélèvements J28 et J35.

Sur ces derniers prélèvements la distinction entre substrats n'est pas conservée à J28 mais se retrouve à J35. Les échantillons de J28 sont davantage distribués en fonction de leur proportions en acides aminés hydrophobe (phénylalanine, proline, isoleucine et tyrosine) et à J35 par leurs proportions en chlorophylle *b*, et xanthophylle (diadinoxanthine, antheraxanthine, et prasinoxanthine).

## Discussion

De manière globale, sur tous substrats confondus, le biofilm semble avoir atteint sa maturité après deux semaines d'immersion. Les communautés présentent alors des concentrations maximales de pigments, avec une variété de xanthophylles (zéaxanthine, canthaxanthine, périidine, diatoxanthine) et de chlorophylles (chlorophylle *a*, *b* et *c*) laissant supposer qu'elles se composent de cyanobactéries, diatomées, dinoflagellés, et de prasinophytes (*Jeffrey, 2011*). Par ailleurs, de plus nombreuses unités taxonomiques bactériennes sont observées à ce stade, et la présence de polysaccharides et de sucres commence à pouvoir être détectée. La plupart des études faites sur le biofilm marin met en évidence l'établissement d'un biofilm mature au bout de 10 jours d'immersion (*Salta et al. 2013*), ce qui est cohérent avec notre étude.

Le changement de communauté algale à partir de J28, avec la disparition de certains pigments (zéaxanthine, chlorophylle *b*, canthaxanthine et périidine) et la prévalence de diadinoxanthine, antheraxanthine, chlorophylle *c* et prasinoxanthine, laisse supposer une décroissance importante des cyanobactéries au profit de diatomées, de prasinophytes et de dinoflagellés (*Jeffrey, 2011*). Ce changement de communauté et la baisse effective des concentrations de pigments peuvent être expliqués par un événement de remise en suspension du benthos lors de la tempête qui a eu lieu entre J14 et J28. Il est possible que de la matière en suspension ait recouvert le biofilm, minimisant ainsi l'activité photosynthétique des organismes autotrophes. Par ailleurs, la baie de Monaco est comblée par du sédiment fin probablement pollué par les nombreuses activités de construction sur la côte de la Principauté. La suspension de ces éléments, puis leur sédimentation sur les biofilms ont pu également causer des dommages aux communautés. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en positionnant des pièges à sédiment au-dessus des dispositifs utilisés pour cette étude afin de déterminer (i) si une remise en suspension effective a lieu au cours du suivi, (ii) la part de

polluants dans le sédiment et (iii) la cinétique des différentes espèces en fonction de ce facteur.

Les résultats sur les communautés bactériennes auraient pu compléter de façon intéressante ces informations en fonction de leur réponse à cet évènement. La faible rentabilité des produits de PCR, nécessaire à la suite du protocole de T-RFLP, peut s'expliquer par différentes hypothèses. Premièrement, il est possible que des réactions de dégradation du matériel génétique par des DNases aient eu lieu entre le moment du prélèvement sur le bateau et le conditionnement, il serait alors préférable de conditionner directement sur place les échantillons dans du TRIS/EDTA pH7/8. Deuxièmement, il est fort probable que la première étape d'extraction et purification de l'ADN avec le kit MoBio ne soit pas adaptée à nos échantillons et que nous ayons perdu une quantité importante de matériel lors de cette étape. Il serait donc préférable de faire des extractions au phénol : chloroforme pour garantir de meilleurs rendements. Deuxièmement, les biofilms sont des échantillons environnementaux contenant de nombreux produits inhibiteurs de PCR tels que les polysaccharides et les protéines (*Schrader et al. 2012*) et cela a pu limiter nos rendements ; une extraction au phénol : chloroforme est donc préférable. Il est donc indispensable de redéfinir une méthodologie autour de ce type d'échantillon afin de garantir de meilleurs résultats à l'avenir. Une première étape de sonication permettrait de garantir le décrochage des biofilms de leurs substrats respectifs (*Bjerkkan et al. 2009*). Après concentration sur filtre des produits de sonication, nous pourrions procéder à une extraction et purification de l'ADN en s'inspirant du protocole de Miller et al. 1999 qui utilise une combinaison d'homogénéisation au broyeur à billes avec du SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium) et une extraction au phénol : chloroforme.

Néanmoins, les résultats obtenus à J14 sur les communautés bactériennes permettent de distinguer la dolomite des deux autres substrats. Pour un même effort d'échantillonnage, l'abondance en OTUs est plus équitablement répartie entre OTUs sur la dolomite et la roche naturelle que sur le béton. Toutefois, l'indice de Pielou n'indique pas non plus une mauvaise équitabilité sur béton puisqu'il est relativement proche de 1. D'autre part, malgré une forte équitabilité, la dolomite accueille moins d'unités taxonomiques comparativement au béton et à la roche naturelle reconstituée (Figure 12). Concernant les communautés algales, on observe une domination de fucoxanthine sur la dolomite ce qui implique qu'il y a une proportion plus importante de micro-algues brunes telles que les dinoflagellés (Figure 12). D'autre part le ratio de S/P est plus faible sur la dolomite que sur les autres substrats, ce qui implique une

proportion importante de bactérie hétérotrophe qui produisent plus de protéines que de polysaccharides (Lubarsky et al. 2010). Il est d'ailleurs possible que la forte richesse spécifique d'OTUs du béton et de la roche naturelle reconstituée soit liée à la présence de cyanobactéries autotrophes qui expliquerait entre autre cette production plus importante de polysaccharides. (Figure 12). Par ailleurs, les substrats se distinguent davantage au regard des quantités totales de pigment, qui, là encore sont plus faibles sur la dolomite que sur les deux autres substrats.

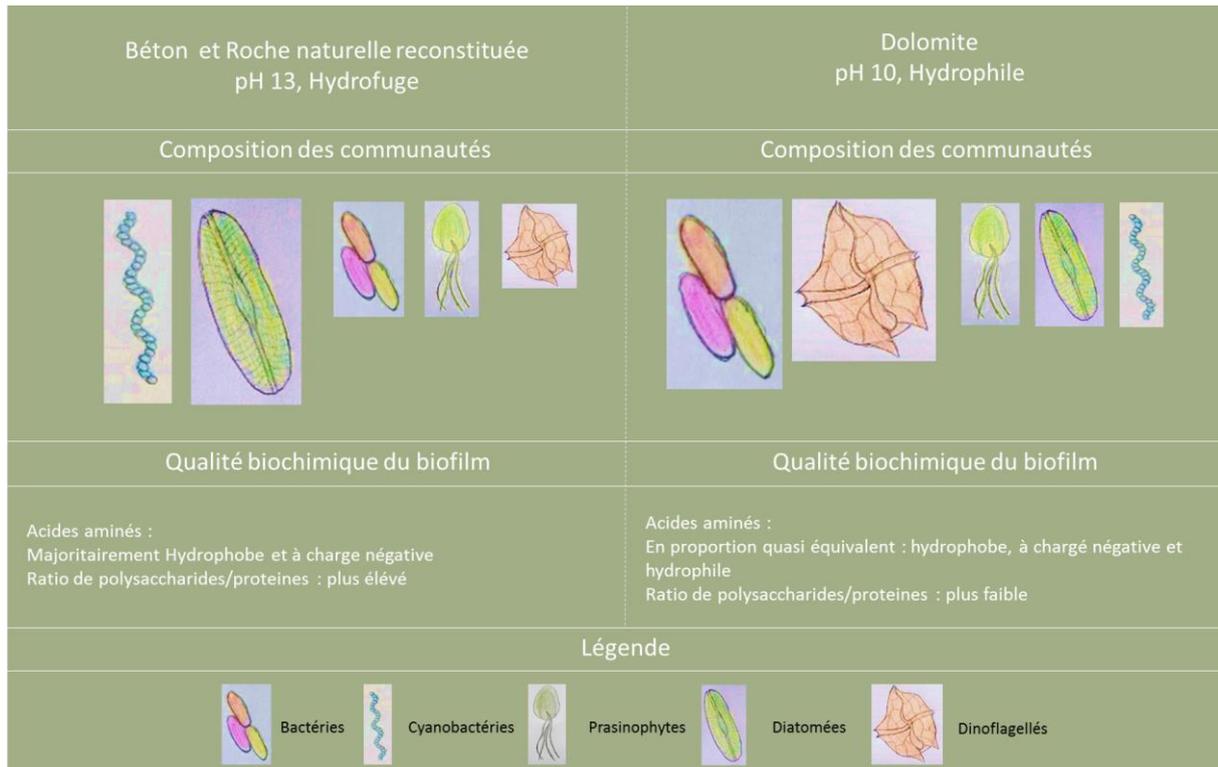


Figure 12: récapitulatif de la composition des communautés et la qualité biochimique de biofilm sur les différents substrats. Elisabeth Riera

Ces différences de communautés peuvent s'expliquer par des caractéristiques physico-chimiques des substrats. En effet, le pH peut influencer la croissance du biofilm, des communautés bactériennes montrent une production de biofilm plus importante à pH 8,5 qu'à pH 7,5 ou 5,5 (Hostacká et al. 2010). Les trois substrats étudiés ici présentent des pH très basiques, de pH 13 et pH 10, respectivement pour le béton et la roche naturelle d'une part, et pour la dolomite d'autre part (Figure 2). Il serait intéressant de déterminer si dans le cadre de notre étude ce facteur a une influence significative sur la composition des communautés. Par ailleurs, un autre facteur à prendre en considération est la rugosité de la surface : les irrégularités d'une surface, la présence de trous et l'augmentation de la porosité sont trois facteurs augmentant le nombre de bactéries adhérant à la surface (Bulard 2012). Kerr et

Cowling (2003) montrent que la formation du biofilm bactérien est meilleure sur des substrats présentant une rugosité de 10 nm. Une autre étude se focalisant sur le recrutement des diatomées montre qu'une plus forte densité de recrutement est observée sur des surfaces avec un pattern<sup>4</sup> de 20 µm de largeur (Xiao 2014). Ainsi, la topographie et la rugosité pourraient jouer un rôle aux différentes échelles bactériennes et eucaryotes, il est cependant difficile d'évaluer ces paramètres sur nos substrats, bien que la dolomite présente une surface plus poreuse et que la roche naturelle détient sur une de ces faces un aspect plus rugueux, le béton étant lui plus homogène. Ces facteurs pourraient également jouer un rôle dans le recrutement des larves d'invertébrés. Il serait donc intéressant de déterminer quel degré de rugosité et/ou de topographie est optimal pour assurer l'établissement des premiers macroorganismes à la surface des récifs artificiels.

La faible corrélation entre les deux groupes pigments et acides aminés et leur opposition sur la dimension 2 de la MFA, suggèrent que la production d'acides aminés est peu liée aux communautés photosynthétiques, qui produisent davantage des polysaccharides (Lubarsky *et al.* 2010). Il aurait été intéressant d'étudier la qualité des polysaccharides afin d'identifier d'éventuelle corrélation avec les variables pigmentaires. Peu de données sont présentes dans la littérature sur la caractérisation des acides aminés présents dans les biofilms et leurs productions par les différents taxons qui composent les communautés. Il serait donc intéressant de déterminer plus précisément quel est le rôle des acides aminés au-delà des caractéristiques générale d'hydrophobicité et de charge négative qu'ils peuvent conférer au biofilm (Epstein *et al.* 2011). Les proportions d'acides aminés hydrophiles présents sur le substrat dolomite sont peu communes pour le développement d'un biofilm cohésif (Epstein *et al.* 2011). L'état de la surface, plus ou moins hydrophobe, peut influencer l'adhésion du biofilm (Bulard 2012). Dans le cas d'interactions avec un substrat hydrophile, les protéines adaptent leur conformation afin d'enfouir les groupements apolaires et hydrophobes au cœur de la structure protéique tertiaire pour limiter les interactions défavorables entre ces groupements et les molécules d'eau (Bulard 2012). Dans le cas où la surface est hydrophobe, les protéines vont au contraire changer leur conformation afin de maximiser les interactions entre elles et la surface. (Bulard 2012). Le béton et la roche naturelle sont de nature hydrophobe, en lien avec les adjuvants plastifiants utilisés pour les produire (CIMbéton 2006). Par contre, la dolomite détient un fort coefficient hydrophile (Géber & Gömze 2009). Ceci pourrait alors expliquer la prépondérance d'acides aminés hydrophiles sur la dolomite et

---

<sup>4</sup> Forme ou structure donnant une représentation simplifiée et fonctionnelle d'un objet

hydrophobes sur le béton et la roche naturelle reconstituée, comme une adaptation à la nature du substrat. Par ailleurs, il a été aussi remarqué que la proportion d'acides aminés à charge négative était plus importante sur la dolomite. Les caractéristiques acido-basiques (au sens de Lewis) et la présence éventuelle de charges dans le substrat peuvent jouer un rôle important par rapport aux simples forces de van der Waals qui sont plus faibles (*Bulard 2012*). Des interactions électrostatiques peuvent conduire à la co-adsorption d'ions présents en solution afin d'optimiser l'énergie du système (surface/biofilm) en neutralisant les charges portées par la surface et les protéines (*Bulard 2012*). Il a été observé lors des expérimentations que le substrat dolomite était relativement friable et peu cohésif, des ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  issus de l'hydrolyse du substrat dolomite ( $CaMg(OH)_2$ ) ont pu ainsi être libérés offrant la possibilité d'établir des liaisons fortes avec des protéines composées d'acides aminés chargés négativement. Ceci pourrait expliquer la part importante de ce type d'acides aminés observée sur la dolomite comme une adaptation des communautés à ce substrat. La production d'acides aminés chargés négativement dans leurs EPS permettrait ainsi une cohésion plus effective au substrat.

Cette étude a permis de mettre en évidence que la dolomite/brucite, telle qu'elle est actuellement utilisée pour la confection des prototypes de récif artificiel 3D n'est pas la plus favorable à l'établissement des premières communautés de micro-organismes colonisateurs. Le béton que l'on supposait moins propice à l'établissement des communautés se révèle être un substrat plutôt bien adapté. La roche naturelle reconstituée présente des résultats très similaires à ceux du béton. Ces deux substrats possèdent plus ou moins la même nature physico-chimique, ils sont constitués de ciment, de granulats (gravions et sable) et d'adjuvants plastifiants leur conférant une nature hydrophobe (*CIMbéton 2006*). Ces caractéristiques semblent plus optimales pour l'établissement de communauté autotrophe de cyanobactérie et de diatomées sécrétant des EPS de nature hydrophobe et à charge négative caractéristique des biofilms marins habituels (*Salta et al. 2013, Epstein et al. 2011*).

De nouvelles perspectives à étudier s'imposent pour optimiser la qualité de ces prototypes de récifs artificiels. Il est crucial de trouver un matériau cohésif et résistant davantage aux conditions marines, peut-être plus proche de la roche naturelle reconstituée. Il serait également intéressant de tester différents degrés de complexité à savoir une surface lisse et rugueuse, puis différents degrés de complexité topographique en lien avec la taille des individus qui seront potentiellement recrutés. Des échantillons de petites tailles similaires à cette étude et au pattern différent (lisse, rugueux, présentant des trous) pourraient être

immergés dès l'hiver prochain pour un suivi plus long et des prélèvements plus espacés afin de déterminer si des dissimilarités mises en évidence ici après 5 semaines se retrouvent. Par ailleurs, il aurait été intéressant d'étudier la qualité des polysaccharides afin de déterminer si leur production est liée aux variables pigmentaires et de mieux préciser la qualité des EPS.

D'autre part, un suivi du recrutement des communautés de macro-sessiles sur des échantillons de plus grande taille (20 cm<sup>2</sup>) pourrait être également effectué avec un prélèvement tous les mois. Une analyse des transferts isotopiques et des marqueurs en acides gras permettrait de déterminer le transfert trophique de matière entre le biofilm et le biofouling.

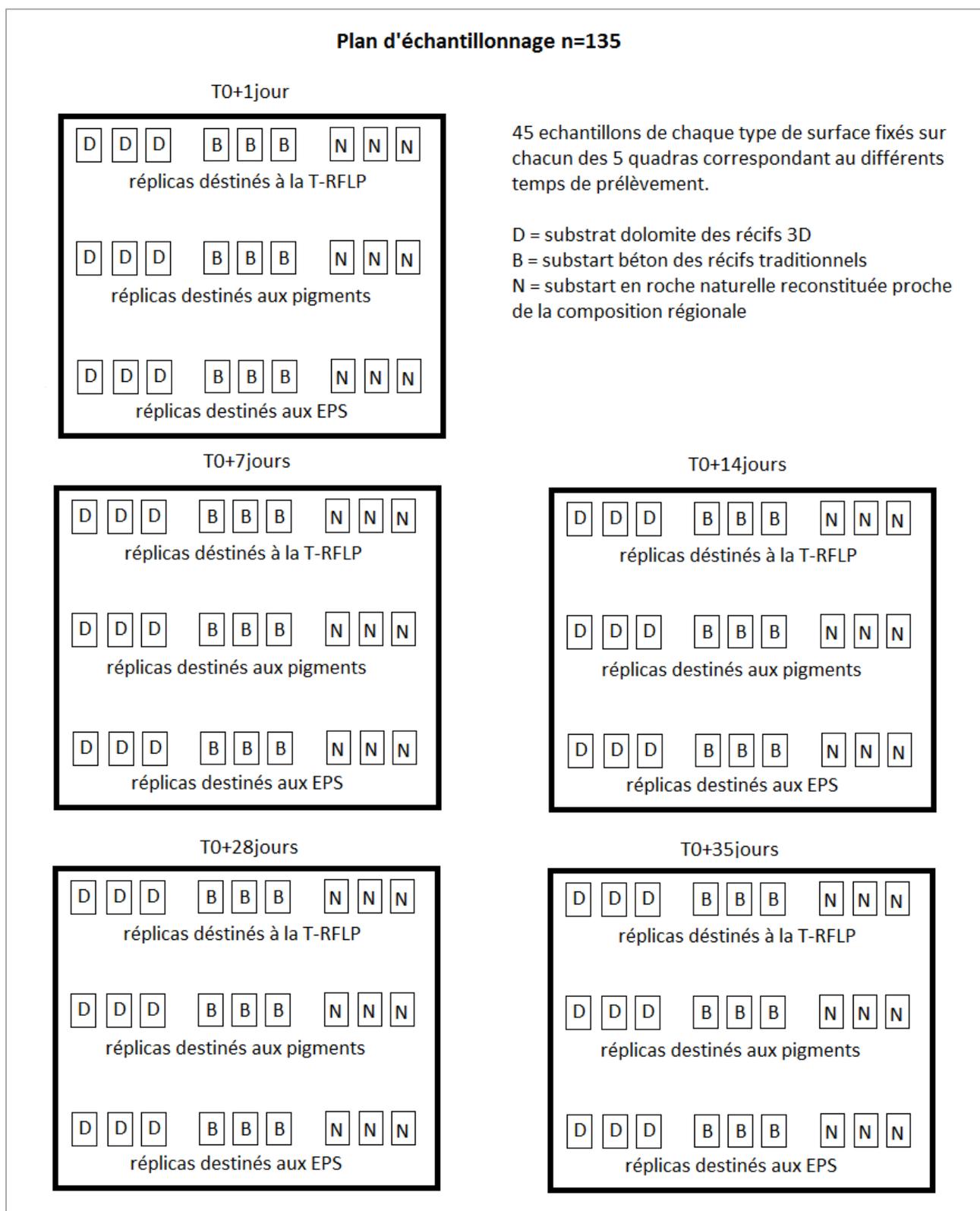
Les nouvelles technologies offrent des potentialités intéressantes pour répondre aux problématiques environnementales actuelles. Cependant, il est crucial de déterminer préalablement à toute production, les conditions optimales répondant aux besoins des communautés à toutes les échelles. Un récif artificiel offrant une complexité tridimensionnelle importante n'a aucun intérêt si le substrat utilisé ne permet pas d'assurer l'établissement des premiers maillons d'un réseau trophique qui s'initie avec l'établissement du biofilm. L'intérêt de l'ingénierie écologique prend alors toute sa valeur dans notre contexte, afin d'optimiser les futures générations de récifs artificiels en considérant les aspects fondamentaux de l'écologie fonctionnelle.

## Références

- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26(32-46).
- Anderson, M. J. (2005). PERMANOVA: a FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance. *Departments of Statistics, University of Auckland, New Zealand*.
- Applied Biosystems, 1995. *Terminal Fragment Length Polymorphism ( T-RFLP ) Analysis on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems*,
- Barnabe, G. et al., 2000. Artificial Reefs in France: Analysis, Assessments and Prospects. *Artificial Reefs in European Seas*, (February 2016), pp.167–184.
- Bray, J.R. & Curtis, J.T., 1957. An Ordination of the upland forest community of southern Wisconsin.pdf. *Ecology Monographs*, 27, pp.325–349.
- Brotas, V. & Plante-cuny, M.-R., 1996. Identification et quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes des sédiments marins: un protocole d'analyse par HPLC. *Oceanologica*, 19(6), pp.623–634.
- Brown, C.J., 2005. Epifaunal colonization of the Loch Linnhe artificial reef: influence of substratum on epifaunal assemblage structure. *Biofouling*, 21(March 2014), pp.73–85.
- Bulard, E., 2012. *L 'adhésion bactérienne sondée à l 'échelle moléculaire*.

- CIMbéton, 2006. *Ciments et bétons, l'essentiel*,
- Costerton, J.W. et al., 1994. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), pp.2137–2142.
- Costerton, J.W. et al., 1995. Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49, pp.711–45.
- D. Bixler, G. & Bhushan, B., 2012. Biofouling : lessons from nature. , pp.2381–2417.
- Epstein, A.K. et al., 2011. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(3), pp.995–1000.
- Géber, R. & Gömze, L.A., 2009. Investigation of Hydrophilic and Hydrophobic Properties of Different Mineral Fillers for Asphalt Mixtures. , pp.945–950.
- Hall-Stoodley, L. et al., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), pp.95–108.
- KAPABIOSYSTEMS, 2014. KAPA2G Fast HotStart KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit. , (January), pp.1–4.
- Lubarsky, H. V. et al., 2010. The Stabilisation Potential of Individual and Mixed Assemblages of Natural Bacteria and Microalgae. *PLoS ONE*, 5(11).
- Miller, D.N. et al., 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), pp.4715–4724.
- Moura, a et al., 2008. Is surface orientation a determinant for colonisation patterns of vagile and sessile macrobenthos on artificial reefs? *Biofouling*, 24(5), pp.381–391.
- Programme des Nations Unies pour l'environnement, 2005. *Lignes directrices pour le depot en mer des matieres a des fins autres que la simple elimination (construction de recifs artificiels)*, Barcelone.
- Salta, M. et al., 2013. Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 15(11), pp.2879–2893.
- Schrader, C. et al., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), pp.1014–1026.
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27(July 1928), pp.379–423.
- Sheldon, A.L., 1969. Equitability indices: dependence on the species count. *Ecology*, 50(3), pp.466–467.
- Sheng, G., Yu, H. & Li, X., 2010. Extracellular polymeric substances ( EPS ) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems : A review. *Biotechnology Advances*, 28(6), pp.882–894.
- Taylor, I.S. & Paterson, D.M., 1998. Microspatial variation in carbohydrate concentrations with depth in the upper millimetres of intertidal cohesive sediments. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 46(3), pp.359–370.
- Tessier, A. et al., 2015. Assessment of French artificial reefs: due to limitations of research, trends may be misleading. *Hydrobiologia*, 753(1), pp.1–29.

## Annexes



Annexe 1: plan d'échantillonnages

## Résumé

La formation de biofilm de surface a été utilisée comme bio-indicateur de la qualité de différents matériaux de construction de récifs artificiels (béton, roche naturelle reconstituée et dolomite) pour établir la base d'un réseau trophique autour de ces derniers. Les communautés de micro-organismes formant ces biofilms ont été étudiées par empreinte génomique pour déterminer la diversité bactérienne et par marqueur pigmentaire pour déterminer la diversité des organismes photosynthétiques. Par ailleurs, la qualité biochimique des substances polymériques extracellulaires (EPS), sécrétées par les communautés du biofilm, a été étudiée en considérant les proportions de protéines et de polysaccharides et la nature et l'abondance des acides aminés. La dolomite et les deux autres substrats portent des biofilms dissimilaires. Le béton et la roche naturelle présentent les caractéristiques classiques d'un biofilm marin, riche en bactérie et diatomées, sécrétant des EPS hydrophobes et à charge négative et une proportion de polysaccharides dominante. La dolomite ne semble pas être un matériau optimal pour l'établissement des biofilms, qui se caractériserait davantage par des communautés de micro-organismes hétérotrophes, tels que des dinoflagellés et des bactéries, des rapports de polysaccharides sur protéines plus faible et la présence d'acides aminés lui conférant une nature plus chargée négativement et plus hydrophile que les autres substrats.

## Summary

The formation of biofilm to surface has been used as a bio indicator to determine the quality of various materials used for the production of artificial reefs (concrete, reconstituted natural rock and dolomite) to established the first link with the trophic network around the artificial reefs. The microorganisms community that form the biofilm has been analysed with finger printing to determine the bacterial diversity and with pigment markers to determine the diversity of photosynthetic organisms. Besides, the biochemical quality of extracelular polymeric substances (EPS) secreted by the community has been investigated, considering the polysaccharides on proteins ratio and the nature and abundance of amino acids. The biofilms shows dissimilarities between the dolomite and the two other substrates. Both concrete and reconstituted natural rock show characteristics usually observed in marin biofilm, abundant in bacteria and diatoms that secrete a negative charged and hydrophobic EPS rich in polysaccharids. The dolomite seems not to be well adapted to the developement of the biofilm, more caracterised by heterotrophic organismes like dinoflagelates and bacteria, with lower polysaccharids on proteins ratio and secretion of amino acids that give a more negatively and hydrophylic nature to the EPS.