



Université du Québec
à Rimouski

**POTENTIEL ANTIMICROBIEN DU PIGMENT
MICROALGAL MARIN MARENNINE SUR *VIBRIO*
SPLENDIDUS :**

**ÉTUDE DE SON INTERACTION MEMBRANAIRE PAR
RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE**

Thèse présentée

dans le cadre du programme de doctorat en océanographie en
vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D)

PAR

© Zeineb BOUHLEL

Octobre 2019

Composition du jury :

Richard SAINT-LOUIS, président du jury, Université de Québec à Rimouski

Réjean TREMBLAY, directeur de recherche, Université de Québec à Rimouski

Isabelle MARCOTTE, codirectrice de recherche, Université de Québec à Montréal

Arnaud BONDON, examinateur externe, Université de Rennes 1

Dépôt initial le 18 avril 2019

Dépôt final, le 18 octobre 2019

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Je dédie cette thèse à mon papa,
parti le 22 juin 2018 vers le royaume
des cieux...

REMERCIEMENTS

Ce travail est rendu possible grâce à la contribution de plusieurs personnes que j'aimerais remercier. Les deux personnes que j'aimerais remercier le plus sont Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. Je les considère comme mes parents académiques, puisqu'ils m'ont accompagnée depuis ma maîtrise, un parcours de sept ans!

Je remercie **Réjean** pour sa contribution dans le projet, pour ses remarques très pertinentes, pour son soutien illimité et pour sa positivité. Je me souviens très bien du premier jour à l'ISMER, lors de la préparation de mon dossier administratif, la secrétaire m'a dit clairement que je suis chanceuse d'avoir Réjean comme directeur. À l'époque, je me demandais si elle disait cela à tous les nouveaux étudiants. En effet, je pense que non, et je réalise que je suis vraiment chanceuse d'être dans l'équipe Tremblay. Réjean a une grande expérience dans le domaine scientifique, mais aussi une grande capacité de gérer plusieurs étudiants en même temps d'une manière très fluide et efficace. Malgré ses plusieurs engagements et ses voyages très fréquents, Réjean était toujours disponible pour répondre à mes questions, pour m'écrire des lettres à temps, ou pour me donner des conseils. Je me demande toujours comment il fait! Ce que j'aime chez Réjean aussi c'est qu'il fait confiance à ses étudiants, ce qui favorise le sens de l'autonomie et de responsabilité. Aussi, il interagit toujours d'une manière positive, où il transforme à chaque fois l'énergie de stress transmise dans mes courriels ou dans mes conversations, en solutions applicables ou en mots d'encouragement qui m'ont permis d'avancer et de persister. Grâce à lui, j'ai appris que la recherche ne se passe pas nécessairement comme on le prévoit, mais qu'il faut toujours s'ajuster, chercher des solutions et s'adapter avec les moyens du bord tout en restant calme. Je ne sais pas comment je pourrais te remercier Réjean, j'ai paniqué plusieurs fois (en faisant des erreurs parfois), mais ta manière de communication et ton attitude très '*chill*' m'ont beaucoup aidée.

Isabelle, ce message est pour toi ! Tu es la personne la plus fine et la plus présente durant ce projet. Je suis également chanceuse de faire partie de ton équipe. Ta générosité, ton support illimité et tes qualités humaines étaient toujours présents. Tu m'as connue dans tous mes états de joie, de stress, de déception, de frustration, de deuil, etc. et tu étais toujours présente avec tant de soutien psychologique. Tu étais également toujours à l'écoute et ouverte pour les discussions que ce soit sur le projet, les expériences, les résultats ou sur tout autre sujet. Je me rappelle le nombre de fois où j'ai voulu arrêter le projet, mais tu m'encourageais à persister tout le temps. Je te remercie également pour ta compréhension, d'avoir pris en considération ma formation non chimique, de me donner confiance en moi et de m'encourager à apprendre la RMN et toutes techniques pertinentes. Tu t'assures également que je sois entourée par les bonnes personnes qui peuvent m'aider et m'orienter lorsque tu n'es pas disponible. J'ai également beaucoup appris de toi, rien qu'en observant comment tu te comportes pour gérer les projets et les collaborations avec d'autres chercheurs. J'ai appris aussi de ton intelligence émotionnelle et de ta diplomatie, pour pouvoir gérer des étudiants de différentes personnalités (incluant moi-même), par exemple, comment se comporter en situation de conflit ou de malentendu. Il s'agit de compétences transférables qui ont fortement contribué à mon développement personnel et professionnel, des choses que nous ne pourrions pas apprendre à l'école, mais plutôt en étant en contact avec des personnes leaders, comme toi !

J'aimerais remercier également **Alexandre Arnorld** (UQAM). Honnêtement ton plus grand atout c'est tes blagues. Ne le prends pas mal, je sais que tu es un scientifique, un génie physicien très compétent même, surtout en RMN, qui a toujours contribué aux discussions d'une manière très stimulante. Tes remarques m'ont souvent incitée à réfléchir et m'ont permis parfois d'orienter mon projet (par exemple la partie sur les détergents dans mon premier article). Mais je pourrais te dire que tout le monde peut apprendre la science, mais ce n'est pas n'importe qui, qui peut faire des blagues ! Parfois tu me montres mes erreurs avec humour ce qui me fait rire de moi-même. En tout cas je te remercie pour ton énergie positive, elle est très importante au laboratoire et dans l'équipe, pour pouvoir travailler facilement et efficacement. Tu étais également à l'écoute à plusieurs reprises et tu

m'as donné plusieurs conseils pertinents qui m'ont servi et me serviront toujours, que ce soit sur le plan professionnel ou personnel. Merci beaucoup Alex !!

Dror (UQAM) mérite également un gros merci. Ma première expérience de RMN était avec Dror, je ne pourrais être que reconnaissante. Je suis toujours impressionnée par sa manière de réfléchir. C'est quelqu'un qui est capable de réfléchir à plusieurs choses à la fois et à une vitesse de 10 kHz (à l'angle magique souvent), que parfois je me perds dans ses explications. Ce que j'aime en lui c'est qu'il veut s'assurer que je comprenne les concepts à partir de leurs fondements et que je digère les quantités d'informations pour être la plus prête possible pour ma future carrière scientifique. Mes interactions avec Dror tout au long du projet représentent également une vraie piste de développement personnel. En effet, j'ai souvent des avis et des visions différentes que celles de Dror, et cela m'a toujours '*challengé*'. Cela m'a permis de développer des compétences de négociation et de communication lorsque je défends mes idées, tout en essayant de comprendre ses idées et de mettre l'ensemble en perspectives. Je trouve ces exercices très bénéfiques, car ils me permettront dans le futur d'apprendre à développer mes idées, à les reformuler, les défendre, et à travailler facilement dans des équipes multidisciplinaires. Si tout le monde est d'accord avec nous, on n'apprend rien ! Merci, Dror, pour tout, pour ta compréhension et surtout pour ta disponibilité en tout temps!

Je remercie également professeur **Karine Lemarchand** (ISMER-UQAR), qui a fourni la souche de *V. splendidus*, mais aussi qui m'a transmis son expertise d'ordre bactériologique ce qui a constitué les bonnes bases pour réussir mes expériences. Karine était également présente pour répondre à toutes mes questions ou pour me transmettre ses révisions d'une manière très rapide. J'ai aussi trouvé ses remarques soulevées au cours des présentations orales ou au cours de la révision de l'article, très pertinentes. Cela m'a permis de fortifier mon travail et de le rendre de meilleure qualité. Merci Karine !

Je remercie aussi **François Turcotte** (MSc) et **Jean Sébastien Deschenes** (PhD) (ISMER-UQAM) pour la production de la marennine, pour les conseils sur tout ce qui se rapporte sur le pigment et ses propriétés chimiques.

Je voudrais remercier **Alexandre Poulhazan** (UQAM) de m'avoir initié aux formules et aux calculs des moments spectraux, depuis son premier stage à l'UQAM. Je le remercie aussi pour être toujours prêt à m'écouter, à me donner son avis d'une manière objective, et de m'aider au laboratoire ou au bureau. Merci Mr. Pou !!

Je remercie également **Mathew, Jean-Phillipe** et **Mahsa** (UQAM) pour leurs supports et assistances. Mathew m'a aidé à dessiner les structures chimiques des phospholipides alors que JP et Mahsa m'ont aidé au cours des traitements de données de GCMS.

Je remercie aussi le reste de l'équipe Marcotte, même s'ils ont fini leurs parcours universitaires. Je remercie : **Andrée, Maiwen, David, André-Luis, Marwa** et **Soussou**. J'ai eu beaucoup d'interactions très positives et de très beaux souvenirs avec eux.

Finalement, je remercie ma famille, particulièrement ma **mère** (Mounira) qui m'a soutenue tout au long de cette thèse. Je la remercie pour ses sacrifices et pour son amour inconditionnel, même si je suis loin de ses yeux. Ma mère m'a même aidé à faire certains calculs chimiques une fois, lorsque j'étais débordée et occupée. Je remercie **mes deux frères** Marwan et Khaldoun pour leur amour et leur support. Je remercie surtout mon **père**, même s'il est décédé il y a quelques mois et qu'il ne sera pas là pour lire ces mots...Papa m'a beaucoup soutenue sur tous les plans. D'ailleurs, c'est lui qui m'a encouragé à poursuivre des études graduées de l'autre côté de l'Atlantique et à faire ce doctorat. Il rêvait de venir voir ma soutenance. Dommage qu'il ne soit pas présent pour voir ce projet se concrétiser.

En espérant ne pas oublier personne, je remercie tous ceux qui, de près ou de la loin, ont contribué à ce travail.

RÉSUMÉ

L'aquaculture est un secteur de production alimentaire dont la croissance est la plus rapide dans le monde. Cependant, cette activité fait face à plusieurs problèmes d'ordre pathologique, où les animaux en élevage sont souvent sous la menace des infections bactériennes qui pourraient engendrer des mortalités. Dans le milieu marin, les bactéries du genre *Vibrio* sont parmi les espèces les plus problématiques, en raison de leur large distribution mondiale, de leur grande capacité d'adaptation aux milieux aquatiques et de leur grande diversité génétique. Au Québec, l'élevage des bivalves est parmi les secteurs aquacoles les plus importants. Bien que pour l'instant la production de juvéniles provienne essentiellement du milieu naturel, le développement des écloséries apportera des problématiques sanitaires nouvelles liées à la plus grande sensibilité des larves aux pathologies bactériennes. Ce type d'élevage est particulièrement sensible à la prolifération de plusieurs espèces de *Vibrio*, tel que *V. splendidus*, qui est opportuniste et peut causer des mortalités massives dans les élevages larvaires. Devant les limitations importantes d'utilisation des antibiotiques chimiques, les éclosiers font face à des risques de pertes économiques importantes occasionnées par les infections bactériennes. Toutefois, la "marennine" représente une solution potentielle qui pourrait limiter la virulence de *V. splendidus*. La marennine est un pigment naturel sécrété par des microalgues diatomées *Haslea ostrearia* et elle constituerait une alternative aux antibiotiques conventionnels, plus respectueuse de la santé animale, de la santé humaine et de l'environnement. Cependant, le mécanisme d'action de la marennine sur les bactéries aquatiques est encore méconnu.

Dans une tentative de valorisation de la marennine comme un agent antibactérien, nous avons étudié dans cette thèse, le mécanisme d'interaction moléculaire du pigment avec les bactéries *V. splendidus*. Notre hypothèse localise son interaction au niveau des lipides de la paroi bactérienne, principal siège d'échange avec l'environnement extérieur. Plus spécifiquement, nous avons exploité les effets du pigment, à une faible et à une forte concentration (concentration minimale inhibitrice), et sur les composantes hydrophiles et hydrophobes des phospholipides membranaires.

Afin de mettre en évidence cette interaction, nous avons utilisé essentiellement la résonance magnétique nucléaire de l'état solide (RMN-ÉS). Nous avons utilisé la RMN du deutérium qui permet d'examiner la fluidité membranaire des chaînes acyles de la bactérie à l'échelle atomique sans la perturber, ainsi que la RMN du phosphore qui permet d'étudier les

changements associés aux têtes polaires. Des méthodes complémentaires ont été également mises en place, comme les méthodes microbiologiques ainsi que les analyses physico-chimiques et chromatographiques (GCMS), pour décrire davantage les processus associés à l'interaction.

Les résultats ont abouti pour la première fois au développement d'un protocole de marquage isotopique sélectif des membranes de *V. splendidus*, tout en respectant leur physiologie et leur intégrité cellulaire. Ainsi, nous avons pu mesurer en temps réel l'organisation et la dynamique membranaire par RMN *in vivo*. Cette étape représente une approche innovatrice vers le raffinement des mécanismes d'action de contaminants et de composés bioactifs de l'environnement aquatique sur les microorganismes. Nous avons aussi démontré dans une seconde étape que la marennine occasionne un effet perturbateur de l'intégrité de la bactérie en agissant sur la fluidité membranaire. La marennine a montré que celle-ci occasionne une augmentation de la rigidité des phospholipides. Un tel effet est comparé avec celui d'un antibiotique utilisé en aquaculture – la polymyxine. Finalement, pour étudier l'effet de la marennine sur les têtes polaires, nous avons utilisé des membranes modèles de *V. splendidus* qui sont composées de phosphoéthanolamine, de phosphatidylglycérol et de cardiolipines. Nous avons démontré qu'à des concentrations élevées, la marennine induit un changement dans la configuration et les phases lipidiques. Elle a permis également de souligner le rôle possible des interactions électrostatiques induites par les charges négatives du pigment.

L'ensemble de ces résultats sont discutés dans cette thèse, pour aboutir à un mécanisme d'interaction que nous proposons. Ce travail représente une plateforme utile pour des applications futures de la marennine ainsi que pour les recherches qui utiliseraient la RMN *in vivo*.

Mots clés : *Vibrio splendidus*, marennine, Résonance magnétique nucléaire de l'état solide, marquage isotopique, membranes, phospholipides, acides gras, tête polaire, mécanisme d'action

ABSTRACT

Aquaculture is one of the most growing food production sectors in the world. However, this activity faces several pathology problems as farmed animals are often threatened by bacterial infections that may cause mortality. In marine environments, *Vibrio* bacteria are the most problematic species, due to their wide global distribution, their large adaptability to aquatic environments, and to their high genetic diversity. In Québec, bivalve farming is one of the most important aquaculture sectors. Today, most of spat and juvenile production comes from natural environments. However, with the development of industrial hatcheries, new sanitary problems such as extreme sensitivity of larvae to bacteria, are more expected in the future. The proliferation of *Vibrio* species, like *V. splendidus*, an opportunistic bacterium causing frequent mortality in larval culture, could be particularly problematic. With the very limiting use of chemical antibiotics, commercial hatchery risks important economic losses induced by bacterial infections. On the other hand, “marennine” constitutes a potential solution to limit *V. splendidus* pathogenicity due to its antibacterial activity. Marennine is a natural pigment secreted by the microalgae diatoms, *Haslea ostrearia* species, and would be an alternative to the conventional antibiotics, more suitable to animal health, to the human consumption and to the environment. Nevertheless, marennine action mechanism on aquatic bacteria is still unknown.

In an attempt to value marennine as a potential antibacterial agent, we have studied, in this thesis, the molecular interaction mechanism of the pigment with *V. splendidus* bacteria. Our hypothesis locates its interaction with the lipid bacterial membrane. More specifically, we explored the effects of the pigment, at a low and at a high concentration (minimum inhibitory concentration), on the hydrophilic and hydrophobic membrane phospholipid components.

To highlight this interaction, we essentially used solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) - a non-destructive method. We used deuterium NMR to examine the fluidity of the bacteria membrane lipids at the molecular level, as well as phosphorus NMR to study perturbations of the lipid polar headgroups. Complementary methods have also been used, such as microbiological methodologies, physicochemical and chromatographic analyses (GCMS) to further describe processes that are associated with the interaction.

The results led for the first time to a protocol to isotopically and selectively label *V. splendidus* membranes - which respects bacterial physiology and cell integrity - to measure membrane dynamics and organization by *in vivo* NMR. This step represents an innovative approach to elucidate the action mechanism, towards microorganisms, of contaminants and bioactive compounds from the aquatic environment. We also demonstrated, in a second step, that marennine has a disruptive effect on the integrity of the bacterium by acting on membrane fluidity. Marennine caused an increase in phospholipid rigidity. Such effect is compared to that of a widely used antibiotic in aquaculture – polymyxin. Finally, to elucidate the effect of marennine on lipid polar headgroups, we used model membranes of *V. splendidus* composed of phosphoethanolamine, phosphatidylglycerol and cardiolipin. This part showed that at high concentrations, marennine induces changes in lipid organization and phase. It also emphasizes a possible role of electrostatic interactions, induced by the negative charges of the pigment.

Altogether, the results presented in this thesis help proposing an interaction mechanism. This work represents a useful platform for future applications of marennine as well as for *in vivo* NMR approaches.

Key words: *Vibrio splendidus*, marennine, SS-NMR, isotopic labelling, membranes, phospholipids, fatty acids, polar headgroups, mechanism

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ix
RÉSUMÉ.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
TABLE DES MATIÈRES.....	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xxi
LISTE DES FIGURES.....	xxiii
LISTE DES ÉQUATIONS.....	xxxi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xxxiii
LISTE DES SYMBOLES.....	xxxvii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	39
SECTION 1: BACTÉRIES <i>VIBRIO</i>	39
1. Biologie et écologie.....	39
2. Isolation des souches et culture.....	42
3. Taxonomie et diversité.....	43
4. Virulence et opportunisme.....	45
5. Vibrio spp en aquaculture.....	47
6. Vibrio splendidus.....	51
7. Souche 7SHRW.....	54
SECTION 2: MARENNINE.....	55
1. Diatomées.....	55
1.1. Biologie et écologie.....	55
1.2. Produits et potentiels d'application.....	56

1.3.	<i>Haslea ostrearia</i>	57
2.	Pigment de marennine	59
2.1.	Phénomènes de verdissement	59
2.2.	Propriétés chimiques de la marennine	61
2.3.	Propriétés biologiques de la marennine.....	62
SECTION 3 : RMN <i>IN VIVO</i> : HISTORIQUE ET DERNIÈRES AVANCÉES		63
SECTION 4 : SYSTÈMES MEMBRANAIRES		66
1.	Membrane biologique des bactéries intactes	66
1.1.	Structure et composition lipidique	66
1.2.	Fluidité membranaire	73
1.3.	RMN du deutérium pour l'étude des membranes intactes	75
2.	Extraits des membranes biologiques et OMVs	77
3.	Membranes modèles des bactéries	78
3.1.	Description	78
3.2.	Choix des membranes modèles pour l'étude des bactéries	80
3.3.	Étude du polymorphisme par les membranes modèles	81
SECTION 5: AGENTS ANTIMICROBIENS & MÉCANISMES MEMBRANAIRES		83
1.	Antibiotiques en aquaculture.....	83
2.	Nouvelles alternatives aux antibiotiques.....	85
3.	Mécanismes membranaires des agents antimicrobiens	86
3.1.	Principaux mécanismes d'action sur les membranes	86
3.2.	Mécanismes des peptides antimicrobiens (AMPs).....	88
3.3.	Mécanismes d'action des composés phénoliques	91
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....		93
CHAPITRE 2 ASPECTS THÉORIQUES & MÉTHODES UTILISÉES		97
1.	Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	97
1.1.	Concepts théoriques	97
1.1.1.	Présentation générale.....	97
1.1.2.	Condition de résonance : effet Zeeman	100

1.1.3.	Principaux types d'interactions.....	101
1.1.4.	Transformée de Fourier.....	105
1.1.5.	RMN de l'état solide versus RMN en solution.....	106
1.2.	Application de la RMN de l'état solide pour l'étude des membranes	108
1.2.1.	Séquences d'acquisitions et techniques d'optimisation.....	108
1.2.2.	RMN du phosphore pour les membranes.....	111
1.2.3.	RMN du deutérium pour les membranes	116
2.	Viabilité cellulaire.....	121
3.	Concentration et degré de purification de la marennine	121
4.	Concentration minimale inhibitrice (CMI)	123
5.	Analyses des lipides membranaires	123
5.1.	Extraction des acides gras et des têtes polaires.....	124
5.2.	Méthodes de séparation chromatographique	125
6.	Potentiel Zeta	125
CHAPITRE 3 STRATÉGIE DE MARQUAGE ET CARACTÉRISATION DE LA		
MEMBRANE DES BACTÉRIES MARINES <i>VIBRIO SPLENDIDUS</i> PAR RMN- ² H		
<i>IN VIVO</i>		
		129
	RÉSUMÉ.....	131
LABELLING STRATEGY AND MEMBRANE CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA		
<i>VIBRIO SPLENDIDUS</i> BY <i>IN VIVO</i> ² H NMR		
		132
CHAPITRE 4 APERÇU DU MÉCANISME D'INTERACTION DE LA		
MARENnine AVEC <i>VIBRIO SPLENDIDUS</i> PAR RMN- ² H de L'ÉTAT SOLIDE		
<i>IN VIVO</i>		
		155
	RÉSUMÉ.....	157
INSIGHT INTO THE INTERACTION MECHANISM OF MARENnine WITH <i>VIBRIO SPLENDIDUS</i>		
AS SEEN BY <i>IN VIVO</i> ² H SOLID-STATE NMR.....		
		158

CHAPITRE 5 EFFET DU PIGMENT MARIN MARENNINE SUR LES MEMBRANES MODÈLES DE <i>V. SPLENDIDUS</i> ÉTUDIÉ PAR RMN DU ^{31}P DE L'ÉTAT SOLIDE.....	177
RÉSUMÉ	178
EFFECT OF MARINE PIGMENT MARENNINE ON MODEL <i>V. SPLENDIDUS</i> MEMBRANES PROBED BY ^{31}P SOLID-STATE NMR.....	179
DISCUSSION GÉNÉRALE	197
ANNEXES : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES.....	215
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	225

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Espèces récurrentes de <i>Vibrio spp</i> en aquaculture et des exemples des effets pathologiques et des mortalités observées sur les organismes hôtes	49
Tableau 2 : Compositions des membranes bactériennes en phospholipides, exprimées en % molaires des lipides totaux.....	69
Tableau 3 : Différents mécanismes d'action des antibiotiques utilisés en aquaculture (adapté de Romero <i>et al.</i>, 2012).....	85
Tableau 4 : Propriétés des isotopes les plus utilisés en RMN des systèmes biologiques (Marcotte, 2016).	100
Tableau 5 : Expériences préliminaires de mesure de la viabilité de <i>V. splendidus</i> après différentes conditions expérimentales	121
Tableau 6 : Propriétés des colloïdes selon les magnitudes de potentiels Zeta mesurées (Riddick, 1968)	127
Table 7 : Average second spectral moment, M_2 (10^9 s⁻²) with a standard deviation for <i>V. splendidus</i> exposed to marennine and polymyxin B at different concentrations. ..	167
Table 8 : Estimated phase contributions expressed in % from area integration of <i>V. splendidus</i> model membranes at 75°C, in the absence and presence of marennine at two concentrations. Standard deviation is indicated between brackets.	190

Table 9 : Zeta potential measurements (in mV) of membrane models dispersed in different marennine solutions and temperature..... 190

LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Micrographie électronique de *Vibrio pectenica* (souche A365T) à un grossissement de 8000X (Paillard *et al.*, 2004).....39**
- Figure 2: Interactions écologiques possibles de *Vibrio spp* dans l’environnement marin présentant les principales voies de contamination des humains et des animaux aquatiques ainsi que des exemples d’espèces fréquemment associées à chaque type de contamination. (adaptée d’Urakawa et Rivera (2006) et de Baker-Austin *et al.* (2018)) ...40**
- Figure 3: Classification phylogénétique des Vibrionacea selon la dernière mise à jour de Sawabe *et al.* (2013). Les Clades sont indiqués en ligne rouge. Les lignes rouges foncées indiquent les clades nouvellement ajoutés par rapport à la classification de Sawabe *et al.* (2007).....44**
- Figure 4 : Exemples d’infections bactériennes provoquées par *Vibrio spp* en aquaculture. (A) hémorragie externe du loup de mer contaminé par *V. anguillarum* (Frans *et al.*, 2011) (B) lésions des tissus mous des larves d’huitres infectées par *V. tubiashii* ou *V. coralliilyticus* (Travers *et al.*, 2015) et (C) infection de l’hétopancréas et des uropodes chez la crevette blanche infectée par *V. harveyi* (Aguilera-Rivera *et al.*, 2018)48**
- Figure 5: Principales voies d’infection et de contamination bactériennes dans les écloséries des bivalves (Dubert *et al.*, 2017a)51**
- Figure 6 : Cellule d’*H. ostrearia* observée sous microscope (Gastineau *et al.*, 2014)57**

Figure 7 : Modes de reproduction chez les diatomées pénales et <i>H. ostrearia</i> : principales étapes de la division asexuée (a) (Sze, 1986) et de la division sexuée (b) (Davidovich <i>et al.</i> , 2009).....	59
Figure 8 : Verdissement des huitres nourries par <i>H. ostrearia</i>. (a) <i>H. ostrearia</i> avec marennine bleue aux extrémités de la cellule; (b) huitre nourrie avec <i>H. ostrearia</i> (Gastineau <i>et al.</i> , 2012c).	60
Figure 9 : Structure chimique d'un phénol	62
Figure 10 : Structure de la paroi bactérienne (LPS : Lipopolysaccharides) (Epanand <i>et al.</i> , 2016), avec permission.....	67
Figure 11 : Structure d'un Lipopolysaccharides (LPS)	68
Figure 12 : Principaux constituants moléculaires des phospholipides. Structures des phospholipides majoritaires chez les bactéries à Gram(-). Les lignes intercontinues indiquent les différences dans les groupements constituant la tête polaire (adaptée de Denich <i>et al.</i> , 2003).	69
Figure 13 Principales structures d'acides gras dans les membranes des bactéries (adaptée de Denich <i>et al.</i> , 2003), avec permission.....	71
Figure 14 : Schémas récapitulatif de la biosynthèse des acides gras bactériens. Exemple de <i>V. harveyi</i> (adaptée de Byers, 1989).	72
Figure 15: Formation des OMVs par extraction expérimentale (Acevedo <i>et al.</i> , 2014)77	
Figure 16: Différents types de membranes modèles. SUV, small lamellar vesicles; LUV, large lamellar vesicles et MLV, multilamellar vesicles (Yingchoncharoen <i>et al.</i> , 2016). ...	79
Figure 17: Exemples de structures des membranes modèles (Selvy <i>et al.</i> , 2011)	81

Figure 18 : Polymorphisme des lipides. les sphères bleues indiquent les têtes hydrophiles, les chaînes jaunes représentent les chaînes hydrophobes (Lee <i>et al.</i> , 2008; Epanand <i>et al.</i> , 2015)	82
Figure 19 : Différents mécanismes membranaires des agents antimicrobiens (adaptées de Koller et Lohner, 2014 et d'Epanand <i>et al.</i> , 2016) avec permission.	88
Figure 20 : Mécanismes d'action de la polymyxine-B sur les membranes des bactéries à Gram(-) (adaptée de Deris <i>et al.</i> , 2014).....	90
Figure 21 Représentation simplifiée de l'instrumentation utilisée en résonance magnétique nucléaire (Polenova, 2011)	98
Figure 22 : Propriétés du spin d'un noyau (a) : Spin qui précesse autour d'un axe défini, selon son moment angulaire I. (b) : orientation du spin dans un champ magnétique selon son moment magnétique μ	99
Figure 23 : Niveaux d'énergie d'un noyau de spin $\frac{1}{2}$ (a) en absence de champ magnétique, (b) mouvement de précession du spin, et (c) séparation des niveaux d'énergie en présence du champ magnétique (effet Zeeman)	101
Figure 24 : Représentation schématique du couplage scalaire (entre deux spins d'atome d'hydrogène) et de couplage dipolaire (entre deux spins d'atome de carbone) dans une molécule organique. La flèche du couplage dipolaire plus épaisse indique un effet plus fort du couplage par rapport au couplage scalaire.	103
Figure 25 : Spectre théorique des noyaux de ^2H et états de transitions de spin. Les lignes interrompues représentent la contribution individuelle de chaque transition. Les lignes continues indiquent la somme des deux composantes (adaptée de Seelig, 1977)....	105

Figure 26 : Étapes de traitement du signal FID par transformée de Fourier (Aljohani, 2016).....	106
Figure 27 : Différences spectrales entre les molécules à mouvements lents, et celles à mouvements rapides à l'échelle de la RMN, donnant respectivement des spectres larges et des raies individuelles (Marcotte, 2016)	108
Figure 28 : Séquence d'impulsion de l'écho de Hahn expliquée avec le vecteur de magnétisation selon les pulses appliqués (Carr et Purcell, 1954).....	109
Figure 29 : Écho de Hahn avec découplage en proton : Séquence utilisée pour les expériences de RMN du phosphore	110
Figure 30 : Description de la rotation à l'angle magique (MAS)(a) : Photo d'une sonde RMN pour un rotor de 4 mm (Lindon <i>et al.</i> , 2009). (b) Orientation de l'échantillon à l'angle magique contenant l'échantillon « solide » avec différentes orientations moléculaires indiquées par des flèches (Power, 2011), (c) : Exemple de spectre d'un échantillon d'une poudre analysé en mode statique (sans MAS) et à deux fréquences de rotation MAS, montrant plus de pics résolus (Lowe, 1959).	111
Figure 31 : Schéma simplifié d'un phospholipide : principaux constituants et mouvements de rotation axiale dans le champ magnétique	112
Figure 32 : Mouvements et orientations des phospholipides d'une membrane lipidique et spectre RMN-³¹P correspondant (Marcotte, 2016).....	112
Figure 33: Représentation géométrique d'un ellipsoïde (adaptée de Picard <i>et al.</i> , 1999)	114

Figure 34 : Variation géométrique des membranes dans les spectres de RMN-ÉS du phosphore, selon la déformation des vésicules lipidiques. (r) définit le rapport des demi-axes c/a (adaptée de Pott et Dufourc (1995) et de Picard <i>et al.</i> , (1999))	115
Figure 35 : Le polymorphisme des phospholipides hydratés et leurs spectres RMN $-^{31}\text{P}$ correspondants (adaptée de Seelig (1978), de Cullis et Kruijff (1979) et de Selvy <i>et al.</i> , (2011))	116
Figure 36 : Spectre RMN-^2H d'un phospholipide marqué. (a) marquage d'un seul site sur les chaînes acyles, (b) marquage sur tous les sites des chaînes acyles. Les mouvements sont plus rapides à l'extrémité du phospholipide (région 2) ce qui donne un $\Delta\nu_Q$ plus petit que celui de la région 1 qui est plus rigide (Marcotte, 2016).	118
Figure 37 : Exemples de spectres de membranes lipidiques marquées entièrement au ^2H et analysées en mode statique et en mode de rotation à l'angle magique (MAS). Les spectres reflètent la variation de la fluidité membranaire, ils sont par exemple moins larges lorsque la membrane est plus fluide (adaptée de Warnet <i>et al.</i> , 2016)	120
Figure 38 : Production de la marennine (a) : Photobioréacteurs pour la culture des algues <i>H. ostreraria</i> . (b) Variation des quantités de marennine avec la croissance algale (Gastineau <i>et al.</i> , 2014).....	122
Figure 39 : Protocole simplifié de la méthode utilisée pour l'extraction des lipides membranaires (phospholipides et acides gras méthylés). Toutes les centrifugations ont été réalisées avec 2000 rpm durant 2 minutes	124
Figure 40 : Charge de surface et potentiel Zeta d'une particule colloïdale (exemple d'un liposome), adaptée de Lombardo <i>et al.</i> (2016).....	126

Figure 41 : Effect of different surfactants on *V. splendidus* growth. Control (a) experiment using the growth medium, and was compared to the following detergents at their CMC: Tween-20 (b), Brij-35 (c), DPC (d), Triton-X (e), CHAPS (f) and OG (g). Tween-20 was also tested at 0.25 mM (h). 141

Figure 42 : *In vivo* ^2H MAS (10 kHz) SS-NMR spectra of *V. splendidus* harvested in the mid-log phase. Control experiment corresponding to bacteria labelled with $\text{d}_{31}\text{-PA}$ without detergent (A), bacteria labelled with $\text{d}_{31}\text{-PA}$ in the presence of Tween-20 (0.14 mM) without (B), and with (C) OA (1:1). Spectra are normalized according to the central peak. Average second spectral moments M_2 are indicated (10^9 s^{-2}). 142

Figure 43: Fatty acid composition and corresponding SFA/UFA ratio at exponential (mid-log) and early stationary growth phases of *V. splendidus* in the presence of exogenous FAs. (A) Control sample in LB medium, (B) in presence of $\text{d}_{31}\text{-PA}$, and (C) in presence of $\text{d}_{31}\text{-PA}$ and OA (1:1). 145

Figure 44 : ^2H MAS (10 kHz) SS-NMR spectra of intact *V. splendidus* harvested at three different cell growth times. (A) after 15 h in the mid-log phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.3$), (B) after 22 h ($\pm 2\text{h}$) at the beginning of the stationary stage ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.5$), and (C) after 30 h at advanced stationary phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.5$). Bacteria were labelled with $\text{d}_{31}\text{-PA}$ in presence of OA. Average second spectral moments M_2 are indicated (10^9 s^{-2}). 147

Figure 45 Representative ^2H SS-NMR MAS spectra of *V. splendidus* exposed to marennine during exponential (a-c) and stationary (d-f) stages. Spectra (a) and (d) are control experiments (b) and (e) correspond to bacteria exposed to low marennine (2 $\mu\text{g/mL}$)

concentration, and (c) and (f) correspond to bacteria exposed to marennine at MIC (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). All spectra are normalized according to the central peak.....	166
Figure 46 : Representative ^2H SS-NMR MAS spectra of <i>V. splendidus</i> exposed to polymyxin B during exponential (a-c) and stationary (d-f) stages. Spectra (a) and (d) are control experiments, spectra (b) and (e) correspond to bacteria exposed to low PxB (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration, and spectra (c) and (f) correspond to bacteria exposed to PxB at MIC (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). All spectra are normalized according to the central peak.....	168
Figure 47 : Second spectral moment M_2 of <i>V. splendidus</i> after exposition to marennine (top), and PxB (bottom). Control cells (solid lines) are compared to bacteria exposed to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of marennine or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PxB (dotted lines), and at the MIC (dashed lines). Values correspond to average means of three replicates with 3-22% error for marennine samples and 8-40% error for PxB samples.....	170
Figure 48: ^{31}P solution NMR spectrum of lipid extracts of <i>V. splendidus</i> (7SHRW) grown in LB medium at 25°C	186
Figure 49 : Chemical structures of phospholipids used in model membranes of <i>V. splendidus</i>. A: phosphatidylethanolamine (PE), B: phosphatidylglycerol (PG) and C: cardiolipin (CL)	187
Figure 50 : ^{31}P-SS NMR spectra of membrane models of <i>V. splendidus</i> at different temperatures. “r” is the ratio of the biggest and the smallest axis, calculated with spectrum simulation. Approximate membrane shapes and sizes are illustrated	189
Figure 51 : Schéma conceptuel récapitulatif des hypothèses des mécanismes d’action de la marennine sur les membranes de <i>V. splendidus</i>.....	207

Figure 52 : Schéma hypothétique de l'effet antivirulent de la marennine extracellulaire dans les conditions d'élevages larvaires..... 214

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 1 :	$\gamma = \hbar \cdot \frac{\vec{\mu}}{I}$	99
Équation 2 :	$E = -\mu \cdot B = -\gamma \cdot I \cdot B$	100
Équation 3 :	$\omega = \gamma \cdot B \text{ (rad.s}^{-1}\text{)}$	100
Équation 4 :	$\Delta E = h \cdot \nu$	101
Équation 5 :	$\nu = \gamma \cdot B / 2\pi \text{ (Hz)}$	101
Équation 6 :	$B_{\text{effectif}} = (B_0 - B') = B_0 (1 - \sigma)$	102
Équation 7 :	$(\delta) = 10^6 (\nu - \nu_{\text{ref}}) / \nu_{\text{ref}}$	102
Équation 8 :	$D_{AX} = (\mu_0 / 4\pi) (\mu_1 : \mu_2 / r^3) \cdot (3\cos^2\theta - 1)$	103
Équation 9 :	$\Delta\nu_Q = 3/2 \cdot A_Q \cdot (3\cos^2\theta - 1) / 2$	104
Équation 10 :	$P(\beta) = 2\pi c^2 \sin\beta / [\sin^2\beta + r^2 \cos^2\beta]^2$	114
Équation 11 :	$\Delta\nu_Q = 3/2 \cdot A_Q \cdot (3\cos^2\theta - 1) / 2 \cdot S_{CD}$	117
Équation 12 :	$M_2 = 0 \infty \omega 2 f \omega d \omega 0 \infty f \omega d \omega = 4\pi 2 \nu Q 25 SCD 2$	119
Équation 13 :	$M_2 = \omega r 2 N = 0 \infty N 2 A N N = 0 \infty A N$	120
Équation 14 :	$A = \epsilon \cdot C \cdot l$	123

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AG	acide gras
AMP	antimicrobial peptide
ASW	artificial sea water
BW	blue water
CAHPS	3-[(3-cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
CL	cardiolipid / cardioline
CMI	concentration minimale inhibitrice
CMC	concentration micellaire critique
CSA	chemichal shift anisotropy
D₂O	oxide du deutérium
D₃₁-PA	deuterated palmitic acid
DMSO	diméthylsulfoxyde
DSC	differential scanning calorimetry
DMPC	1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine
DOPE-Me	N-methyl-dioleoylphosphatidyl-éthanolamine
DPC	dodecylphosphocholine
DRV	dehydration-rehydratation vesicules
EDL	electric double layer

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMn	extracellular marennine
EMA	eau de mer artificielle
FA	fatty acid
FAME	fatty acid methyl ester
FID	free induction decay
GCMS	gas chromatography-mass spectrometry
GUV	giant unilamellar vesicles
HPA	homéophasic adaptation
HVA	homéoviscous adaptation
Hz	hertz
IMn	intracellular marennine
IRM	imagerie par résonance magnétique
ISMER	Institut des Sciences de la Mer de Rimouski
kDa	kilodalton
kHz	kilohertz
LB	lysogeny broth
LPS	lipopolysaccharides
LUV	large unilamellar vesicle
MAS	magic angle spinning

MHz	mégahertz
MIC	minimum inhibitory concentration
MLSA	multilocus sequence analysis
MLV	multilamellar vesicles
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényltétrazolium
mV	millivolts
NMR	nuclear magnetic resonance
OA	oleic acid
OD	optical density
OG	octylglucopyranoside
OMV	outer membrane vesicles
PA	palmitic acid
PBR	photobioréacteurs
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PE	phosphatidyléthanolamine
PG	phosphatidylglycérol
POPE	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac- glycerol)
PPM	parties par million

PxB	polymyxine B
QQ	quorum quenching
QS	quorum sensing
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMN-ÉS	résonance magnétique nucléaire de l'état solide
REV	reverse evaporation vesicule
SFA	saturated fatty acid
SSB	spinning side-band
SS-NMR	solid state nuclear magnetic resonance
SSP	plusieurs espèces
SUV	small unilamellar vesicules
TCBS	thiosulfate-citrate-sels biliaries
TMS	tétraméthylsilane
TOCSY	total correlation spectroscopy
UFA	unsaturated fatty acid
ULV	unilamellar vesicule
VET	vesicule by the extrusion technique

LISTE DES SYMBOLES

B	champ magnétique
°C	degré Celsius
M₁	moment d'ordre 1
M₂	moment d'ordre 2
pH	potentiel d'hydrogène
S_{CD}	paramètre d'ordre carbone-deutérium
T°	température
T	tesla
γ	rapport gyromagnétique
ω	fréquence de précession
ν	fréquence de Larmor
δ	déplacement chimique
Δν_Q	écart quadripolaire
ω_r	fréquence de rotation à l'angle magique
ε	coefficient d'extinction spécifique

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

SECTION 1: BACTÉRIES *VIBRIO*

1. *Biologie et écologie*

Les membres du genre *Vibrio* (Pacini, 1854) sont des bactéries à Gram négatif (Figure1), retrouvées principalement dans les milieux aquatiques (Thompson *et al.*, 2004; Urakawa et Rivera, 2006). Ils sont en forme de bacilles courbés et ils sont dotés d'une mobilité assurée par des flagelles (Figure1) (Farmer, 2006; Travers *et al.*, 2015).

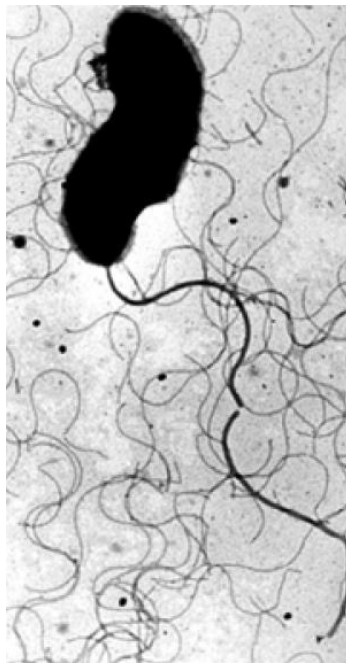


Figure 1: Micrographie électronique de *Vibrio pectenicida* (souche A365T) à un grossissement de 8000X (Paillard *et al.*, 2004)

Ce sont des bactéries à métabolisme fermentatif, qui peuvent pousser dans des conditions d'aérobie ou d'anaérobie, mais qui nécessitent la présence de Na^+ pour leur développement (Farmer, 2006). Certaines espèces de ce genre sont réputées pour être pathogènes chez l'humain. L'espèce la plus connue et la plus étudiée est *V. cholerae*, qui

est responsable de maladies diarrhéiques extrêmement contagieuses (Faruque *et al.*, 1998; Plaza *et al.*, 2017). D'autres espèces de *Vibrio* sont plutôt spécifiques pour les animaux aquatiques, et peuvent constituer un risque majeur pour l'industrie aquacole ainsi que pour la santé humaine lors de la consommation d'animaux aquatiques infectés (Figure 2) (Urakawa et Rivera, 2006; Plaza *et al.*, 2017; Baker-Austin *et al.*, 2018)

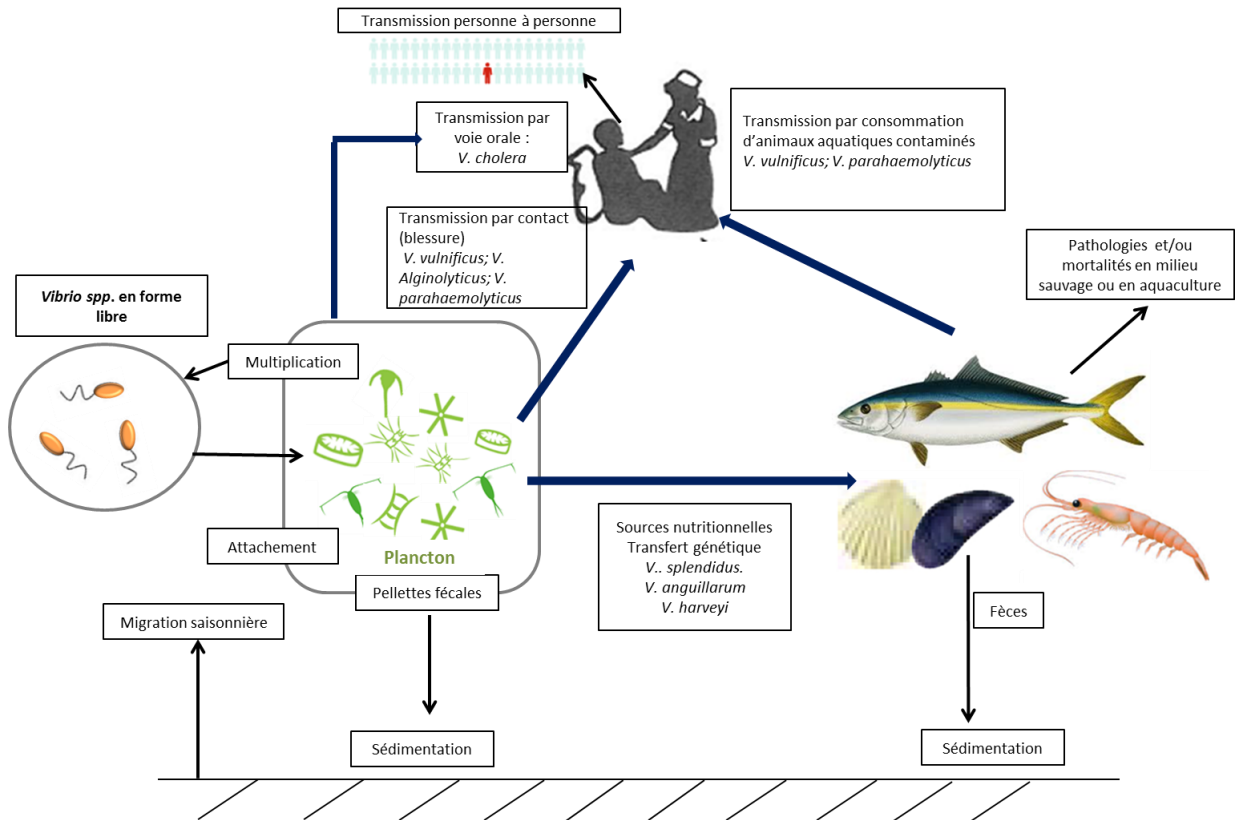


Figure 2: Interactions écologiques possibles de *Vibrio* spp dans l'environnement marin présentant les principales voies de contamination des humains et des animaux aquatiques ainsi que des exemples d'espèces fréquemment associées à chaque type de contamination. (adaptée d'Urakawa et Rivera (2006) et de Baker-Austin *et al.* (2018))

Les *Vibrio* spp des environnements marins se retrouvent dans la colonne d'eau, dans les sédiments ou associées aux organismes biologiques, notamment le plancton (Cavallo et Stabili, 2002; Thompson *et al.*, 2004; McDougald et Kjelleberg, 2006; Urakawa et Rivera, 2006). Leur distribution est gouvernée par les facteurs environnementaux où, chaque espèce colonise des niches préférentielles, dépendamment de ses propres conditions

optimales de température, de salinité, de profondeur de la colonne d'eau et du type d'organisme hôte (Simidu et Tsukamoto, 1985; Thompson *et al.*, 2004; Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b; Farmer, 2006; Urakawa et Rivera, 2006). Ce sont aussi des bactéries dotées d'une grande capacité d'adaptation aux changements rapides (Munn, 2005; Farmer, 2006; McDougald et Kjelleberg, 2006; Urakawa et Rivera, 2006; Soto *et al.*, 2009). Elles peuvent survivre dans des conditions appauvries en nutriments et se multiplier activement et même de surpasser les autres populations bactériennes lorsque les conditions nutritives redeviennent favorables (Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b; McDougald et Kjelleberg, 2006). Les *Vibrio spp* peuvent constituer un minimum de 10 à 50% des bactéries hétérotrophes dans les milieux côtiers (Simidu et Tsukamoto, 1985).

La salinité est un autre facteur déterminant pour la biologie des *Vibrio spp*. La plupart de ces bactéries sont considérées comme halophiles et nécessitent un minimum de sel pour leur développement, soit un taux de NaCl situé entre 0,5% à 0,85% (Farmer, 2006). Toutefois, certaines espèces sont capables de s'adapter à de plus faibles teneur en sels, ou de tolérer des changements brusques en salinité (Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b). Cela explique la large distribution des *Vibrio spp* dans les milieux aquatiques les plus diversifiés, allant des eaux salines océaniques aux eaux estuariennes saumâtres (Kogut et Russell, 1984; Wright *et al.*, 1996; Eguchi *et al.*, 2000; Munn, 2005; Sarita, 2005; Urakawa et Rivera, 2006; Soto *et al.*, 2009).

Finalement, la température représente probablement le facteur le moins gênant pour la survie, la prolifération et la persistance des *Vibrio spp* dans l'environnement. Les *Vibrio* peuvent proliférer tout en gardant leur potentiel de pathogénicité sur une large gamme de température de 4 à 37°C (Egidius *et al.*, 1981; Masini *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013a; Tall *et al.*, 2013; Pérez-Cataluña *et al.*, 2016). Certaines espèces peuvent également s'adapter parfaitement aux conditions thermiques défavorables (par exemple $T^{\circ} < 5^{\circ}\text{C}$) (Vezzulli *et al.*, 2015). Dans ce cas, elles adoptent un mode de vie en dormance, ou couramment appelé l'état viable non cultivable (*Viable but non-culturable*), jusqu'à ce que la température de l'eau change en leur faveur pour déclencher leurs multiplications de nouveau (Munn, 2005;

Liu *et al.*, 2013a; Vezzulli *et al.*, 2015). Pour la majorité des espèces qui vivent dans les milieux côtiers, la prolifération est favorisée par une élévation de la température, généralement au-delà de ≈ 15 à 20°C , dépendamment de l'espèce concernée (Kaneko et Colwell, 1973; Wright *et al.*, 1996; Lacoste *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2004; Munn, 2005; Soto *et al.*, 2009). Certaines espèces mènent aussi des modes écologiques différents selon la saison. Par exemple dans l'estuaire de Chesapeake, les espèces *V. parahaemolyticus* se retrouvent associées aux sédiments et aux communautés benthiques durant les saisons froides, mais se multiplient activement dans la colonne d'eau lorsque la température dépasse 14°C (Kaneko et Colwell, 1973).

Durant les dernières années, de plus en plus de corrélations entre l'élévation annuelle de la température de l'eau dans les milieux marins en raison du réchauffement climatique et la présence des *Vibrio* ont été observées (Vezzulli *et al.*, 2015; Baker-Austin *et al.*, 2017; Baker-Austin *et al.*, 2018). Certains chercheurs qualifient même ce groupe de bactéries comme un baromètre pour les changements climatiques dans les écosystèmes océaniques (Baker-Austin *et al.*, 2017).

2. Isolation des souches et culture

Les océans constituent le plus grand réservoir de bactéries dans le monde avec une très grande diversité microbienne. La plupart des bactéries procaryotes marines indigènes (99,9%) n'ont jamais été cultivées en laboratoire (Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b). Cependant, il a été observé que plusieurs souches de *Vibrio spp* peuvent être facilement isolées à partir des populations bactériennes présentes dans l'environnement naturel (Simidu et Tsukamoto, 1985; Thompson *et al.*, 2004; Munn, 2005; Farmer, 2006; Masini *et al.*, 2007). L'isolation est généralement plus facile durant les saisons chaudes, où les bactéries sont plus abondantes (Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b). Le thiosulfate-citrate-sels biliaires (TCBS) est pour le moment le milieu idéal pour l'isolation des *Vibrio*. (Cavallo et Stabili, 2002; Thompson *et al.*, 2004; Masini *et al.*, 2007; Mateo *et al.*, 2009). Il a été observé également que plusieurs souches isolées soient capables de croître dans les conditions de laboratoire dans un milieu solide (Agar) ou liquide, riche en peptone

commerciale ou en tryptone de soja (Kaneko et Colwell, 1973; Simidu et Tsukamoto, 1985; Thompson *et al.*, 2004; Farmer, 2006; Travers *et al.*, 2015). Selon l'espèce et la souche, les conditions de température et de salinité doivent être optimisées afin de réussir le maintien des cultures. À l'exception des espèces psychrophiles, les *Vibrio* requièrent généralement des températures de croissance optimales qui se situent entre 15 et 30°C (Thompson *et al.*, 2004; Farmer, 2006; Masini *et al.*, 2007) et des conditions de salinités optimales de 1 à 2% de NaCl, pour croître dans un laps de temps variant de 1 à 2 jours (Thompson *et al.*, 2004).

Ce qui présente un défi dans le processus d'isolations des *Vibrio spp* reste sans doute l'identification de l'espèce et de la souche isolée. Contrairement aux bactéries couramment utilisées dans les essais cliniques, les bactéries marines sont peu étudiées et mal identifiées (Farmer, 2006). Pour les bactéries *Vibrio spp* qui présentent une grande variabilité d'adaptation aux environnements diversifiés, l'identification appropriée des souches isolées nécessite généralement des méthodes plus spécifiques, comme l'amplification par PCR, le séquençage génétique ou encore des méthodes de dilution et de fluorescence *in situ* pour les bactéries planctoniques (Thompson *et al.*, 2004; Munn, 2005; Farmer, 2006). Aujourd'hui, il y a une faible fraction de *Vibrio* marins isolées à partir des sédiments, considérant la grande abondance et diversification des communautés benthiques dans ces milieux (Munn, 2005).

3. Taxonomie et diversité

Le nom du genre « *Vibrio* » a été initialement attribué par Pacini en 1854. Ce genre appartient à l'embranchement de *Protéobacteria* de type gamma et à la famille de *Vibrionaceae* (Farmer, 2006). Historiquement, la classification taxonomique a commencé par des critères de morphologie générale. Par la suite, et jusqu'aux années 90, les critères d'ordre biochimique et métabolique se sont ajoutés. Aujourd'hui, la classification inclut nécessairement des analyses génétiques (Thompson *et al.*, 2004; Farmer, 2006). Grâce aux nouvelles techniques moléculaires comme le séquençage multilocus (*Multilocus Sequence Analysis* (MLSA)), la classification des *Vibrio spp* évolue rapidement permettant la

découverte annuelle de nouvelles espèces (Lasa *et al.*, 2013; Sawabe *et al.*, 2013; Tall *et al.*, 2013; Romalde *et al.*, 2014; Pérez-Cataluña *et al.*, 2016). Cela rend la taxonomie des *Vibrionaceae* en évolution constante, ce qui crée plusieurs controverses et confusions quant à l'identification génétique exacte des espèces ou quant à la détermination du caractère pathogène chez les organismes hôtes (Thompson *et al.*, 2004; Farmer, 2006; Hoffmann *et al.*, 2012; Romalde *et al.*, 2014).

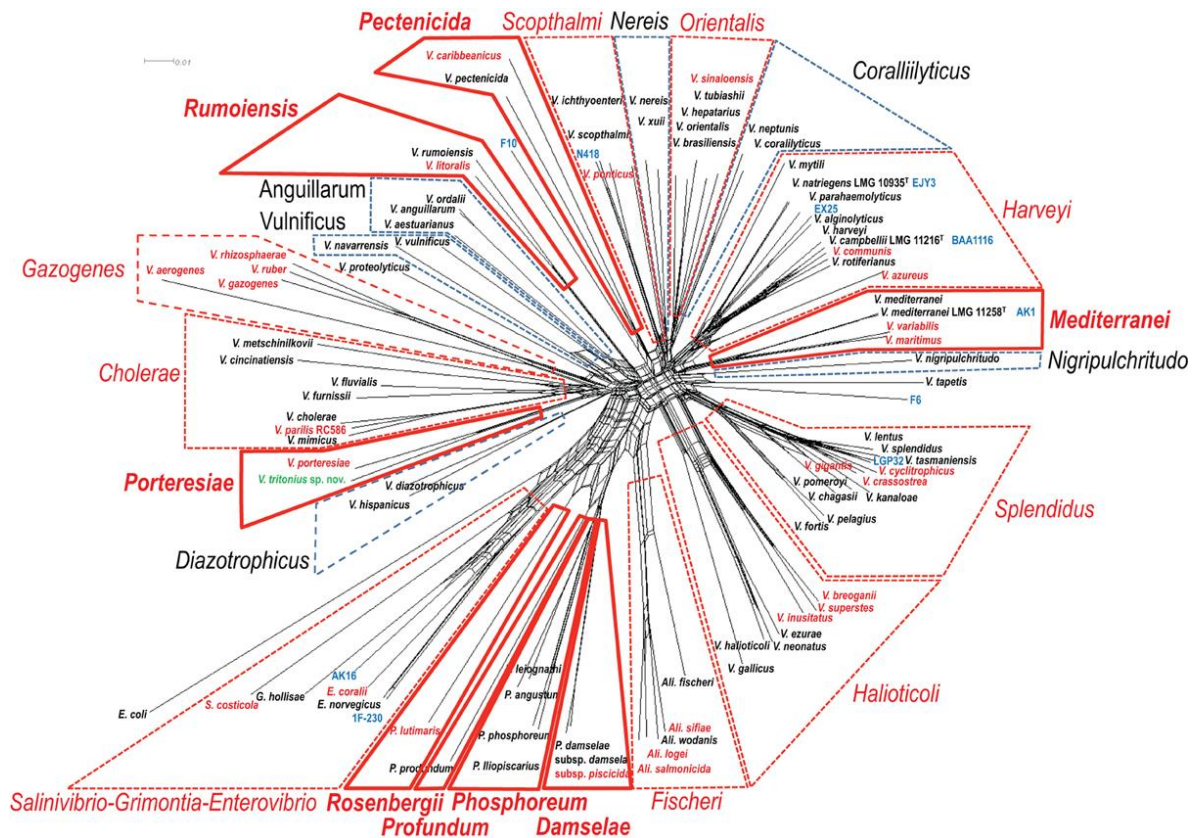


Figure 3: Classification phylogénétique des Vibrionaceae selon la dernière mise à jour de Sawabe *et al.* (2013). Les Clades sont indiqués en ligne rouge. Les lignes rouges foncées indiquent les clades nouvellement ajoutés par rapport à la classification de Sawabe *et al.* (2007)

Durant les deux dernières décennies, un consensus a été établi pour définir les « clades » de *Vibrio* regroupant plusieurs espèces similaires génétiquement (Sawabe *et al.*, 2007; Sawabe *et al.*, 2013; Oden *et al.*, 2018). La classification la plus utilisée pour les *Vibrio* marins est celle qui a été proposée par Sawabe et coll. en 2007 et qui a été mise à jour

en 2013 (Figure 3). Aujourd'hui on compte plus que 140 espèces de *Vibrio*, regroupées en 14 clades (Sawabe *et al.*, 2013; Romalde *et al.*, 2014; Travers *et al.*, 2015). Par exemple on retrouve plusieurs espèces apparentées à *V. harveyi*, formant le clade de « *V. harveyi* » (Hoffmann *et al.*, 2012). Pareillement, plusieurs espèces apparentées à *V. splendidus*, constituent ensemble le clade de « *V. splendidus* » (Saulnier *et al.*, 2017).

4. Virulence et opportuniste

La virulence des *Vibrio spp* n'est pas systématique. Sa manifestation chez l'organisme hôte repose sur *l'infectivité* qui définit la capacité à infecter un tissu et celui de la *pathogénicité* qui définit la capacité à induire des lésions, une maladie (*Vibriose ou Vibriosis*) ou une mortalité (Casadevall et Pirofski, 2009). La limite qui sépare les deux phénotypes est très reliée au caractère opportuniste des *Vibrio* (Elston, 1984; Le Roux *et al.*, 2002). Par définition, un pathogène opportuniste est celui qui n'affecte pas les organismes en bonne santé, mais qui profitent de la détérioration des défenses immunitaires des organismes vulnérables pour exprimer sa virulence (Peloux, 1985). Ainsi, les mécanismes de la pathogénicité sont placés le plus souvent sous le contrôle de la coopération entre les composantes microbiennes et la susceptibilité de l'organisme hôte, dont le résultat serait le degré de cette virulence (Casadevall et Pirofski, 2009). La grande diversité taxonomique des *Vibrio spp* complexifie davantage l'identification génotypique et phénotypique de la pathogénicité et rend l'expression de leur virulence difficiles à prévoir (Gay *et al.*, 2004b; Liu *et al.*, 2013a; Travers *et al.*, 2015). Le degré et le mécanisme de virulence chez *Vibrio* peuvent aussi dépendre des interactions synergiques ou additives entre les bactéries de différentes souches présentes dans le même milieu (Gay *et al.*, 2004b).

L'expression de la virulence de *Vibrio* est fortement dépendante d'une panoplie de facteurs abiotiques. Dans les conditions les plus défavorables, les *Vibrio* se retrouvent en état viable non cultivable avec de très faibles activités métaboliques (Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b). Tout commence par la présence de stimuli, comme la température adéquate de la souche en question, ou la présence de nutriments, pour que la prolifération se déroule

activement dans les tissus (Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b; McDougald et Kjelleberg, 2006). Les gènes de virulence conservés durant la dormance de la bactérie commencent à s'exprimer lorsque d'autres facteurs s'ajoutent, tels que la vulnérabilité du système immunitaire de l'organisme hôte (Pruzzo *et al.*, 2005b). Par exemple, chez les mollusques bivalves la susceptibilité au *Vibrio* est reliée à l'activité bactéricide de l'hémolymphe, elle-même reliée à des facteurs de stress environnemental (Pruzzo *et al.*, 2005a). Cela explique en grande partie l'affaiblissement des défenses immunitaires et la récurrence des *Vibrioses* dans les élevages aquacoles en général et dans les écloséries en particulier (Elston, 1984; Thompson *et al.*, 2004; Dubert *et al.*, 2017a; Plaza *et al.*, 2017).

Du côté de la bactérie, plusieurs espèces de *Vibrio* sont armées avec des facteurs de virulence et de processus biologiques qui leur permettent d'exprimer la pathogénicité lorsque les conditions environnementales le permettent (Travers *et al.*, 2015; Dubert *et al.*, 2017a). Du fait de leur diversité taxonomique, les mécanismes et les facteurs de virulence sont nombreux et dépendent de l'espèce en question (Elston, 1984). Communément, les principaux facteurs de virulence chez les *Vibrio spp* incluent les protéines membranaires, les capsules de polysaccharide, les métalloprotéinases et les toxines de type cytolysines (Beaubrun *et al.*, 2011; Travers *et al.*, 2015; Dubert *et al.*, 2017a). Ces facteurs de virulence sont souvent orchestrés par un système de régulation appelé « *quorum sensing* (QS) » (Bruhn *et al.*, 2005). Il s'agit d'un processus de communication entre les cellules bactériennes en utilisant des signaux moléculaires spécifiques (Winzer et Williams, 2001; Defoirdt *et al.*, 2004; Bruhn *et al.*, 2005). Le QS contrôle des phénotypes, dont la production de biofilm et l'expression des facteurs de virulence comme la production de toxines et l'adhésion moléculaire. Pour pouvoir surmonter le système immunitaire de l'hôte, la production des facteurs de virulence est retardée jusqu'à ce que la densité atteigne un niveau seuil dans le tissu infecté (Defoirdt *et al.*, 2004). Le QS est utilisé par la plupart des bactéries *Vibrio* incluant *V. splendidus* (Bruhn *et al.*, 2005; Milton, 2006; Yang *et al.*, 2011).

5. *Vibrio spp en aquaculture*

Plusieurs espèces de *Vibrio* sont retrouvées dans un large groupe d'animaux marins issus des milieux naturels comme les crustacés, les mollusques, les éponges, les coraux, les abalones, les poissons et les mammifères (Munn, 2005). Cependant, les épisodes de *Vibriose* ont explosé durant les dernières années avec le développement de l'activité aquacole, notamment dans les écloséries de bivalves (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Romalde *et al.*, 2014; Travers *et al.*, 2015; Dubert *et al.*, 2017a) ou dans les fermes d'élevage de poissons (Olafsen, 2001; Frans *et al.*, 2011; Hickey et Lee, 2018) et des crevettes (Moriarty, 1999; Austin et Zhang, 2006; Chandrakala et Priya, 2017; Dash *et al.*, 2017) (Figure 4). *V. anguillarum*, *V. fisherii* et *V. harveyi* sont les espèces les plus souvent décrites, parce qu'elles sont capables d'infecter plusieurs groupes d'animaux aquatiques dans différents endroits du monde (Thompson *et al.*, 2004; Austin et Zhang, 2006; Plaza *et al.*, 2017).

Les recherches effectuées sur les *Vibrio* en aquaculture sont très nombreuses. Cela s'explique en grande partie par la valeur commerciale des animaux aquatiques touchés (Meyer, 1991), mais aussi par la nature de l'industrie elle-même qui favorise l'apparition des *Vibrioses* (Figure 4). Plusieurs facteurs combinés, reliés à l'intensification des élevages, comme le stress de manipulation, la densité importante des animaux, la détérioration de la qualité des eaux, ainsi que l'abondance de la nourriture, constituent des conditions propices pour affaiblir les systèmes immunitaires des organismes en culture, qui deviennent alors vulnérables aux *Vibrio spp* opportunistes (Elston, 1984; Lacoste *et al.*, 2001; Mohapatra *et al.*, 2013).

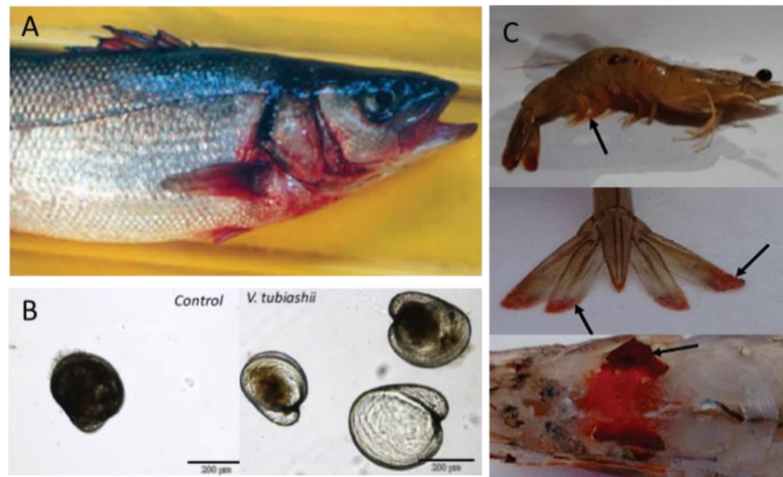


Figure 4 : Exemples d’infections bactériennes provoquées par *Vibrio spp* en aquaculture. (A) hémorragie externe du loup de mer contaminé par *V. anguillarum* (Frans *et al.*, 2011) (B) lésions des tissus mous des larves d’huitres infectées par *V. tubiashii* ou *V. coralliilyticus* (Travers *et al.*, 2015) et (C) infection de l’hépatopancréas et des uropodes chez la crevette blanche infectée par *V. harveyi* (Aguilera-Rivera *et al.*, 2018)

Les échanges génétiques entre les communautés de *Vibrio spp* dans des milieux non contrôlés, comme les eaux des élevages peuvent aboutir à la complexification des identifications des espèces de *Vibrio* (Vandenberghé *et al.*, 2003). La première colonne du tableau 1 présente une liste non exhaustive des espèces les plus récurrentes qui touchent les principaux groupes d’animaux retrouvés en aquaculture (Moriarty, 1999; Olafsen, 2001; Paillard *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004; Munn, 2005; Austin et Zhang, 2006; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Frans *et al.*, 2011; Travers *et al.*, 2015; Chandrakala et Priya, 2017; Dash *et al.*, 2017; Dubert *et al.*, 2017a; Plaza *et al.*, 2017; Hickey et Lee, 2018). En fonction du type d’organisme, les *Vibrio* sont capables d’affecter les animaux aquatiques à différents stades de développement et de différentes manières (Tableau 1).

Les mollusques bivalves sont en tête du podium quant à l’accumulation de *Vibrio* dans leurs organismes et quant à la fréquence des *Vibrioses* par rapport aux autres animaux aquatiques (Paillard *et al.*, 2004; Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Romalde *et al.*, 2014; Prado *et al.*, 2015; Travers *et al.*, 2015).

Tableau 1: Espèces récurrentes de *Vibrio spp* en aquaculture et des exemples des effets pathologiques et des mortalités observées sur les organismes hôtes

Groupe	<i>Vibrio spp.</i>	Organisme hôte nom commun (espèce)	Stade	Effets pathologiques/mortalité	Références
Crevettes	<i>V. harveyi</i>	Crevette tigrée (<i>P. monodon</i>)	juvénile et adulte	Altération de la flore intestinale- mortalité 40-100%	(Moriarty, 1999; Rungrassamee <i>et al.</i> , 2016)
			larve et juvénile	Lésions hépatopancréatiques et mortalité 70%	(Lavilla-Pitogo <i>et al.</i> , 1998)
		Crevette Kuruma (<i>P. japonicus</i>)	larve et juvénile	Mortalité massive dans les écloséries au Taiwan (1994)	(Lee <i>et al.</i> , 1996)
	<i>V. harveyi</i> (<i>V. alginolyticus</i>)	Crevette blanche du pacifique (<i>L. vannamei</i>)	juvénile	Lésions hépatopancréatiques et mortalité de 30%	(Rungrassamee <i>et al.</i> , 2016; Aguilera-Rivera <i>et al.</i> , 2018)
		Crevette Kuruma (<i>M. japonicus</i>)	adulte	Mortalité 40 à 80%	(Cheng <i>et al.</i> , 2007)
Poissons	<i>V. anguillarum</i>	Plus que 50 espèces y compris les salmonidés (<i>S. salar</i> ; <i>O. mykiss</i>); dorade royale (<i>S. aurata</i>) et le bar européen (<i>D. labrax</i>)	adulte	Mortalité évaluée par DL50	(Lee <i>et al.</i> , 1996)
			larve, juvénile et adulte	Lésions tissulaires et mortalité	(Toranzo et Barja, 1990; Frans <i>et al.</i> , 2011)
	<i>V. salmonicida</i>	Saumon Atlantique (<i>S. solar</i>)	adulte	Mortalité de 100% après 14 jours	(Bjelland <i>et al.</i> , 2012)
	<i>V. vulnificus</i>	Palomine (<i>T. ovatus</i>)	adulte	Hémorragie et ulcères des tissulaires	(Li <i>et al.</i> , 2006)
	Bivalves	<i>V. harveyi</i> (<i>V. alginolyticus</i>)	Palourde (<i>R. philippinarum</i>)	larve	Mortalité de 48%-60%
Moule européenne (<i>M. galloprovincialis</i>)			larve	Changement métabolique	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
<i>V. splendidus</i>		Moule bleu (<i>M. edulis</i>)	larve	Mortalité de 30%	(Turcotte <i>et al.</i> , 2016)
		Pétoncle (<i>P. magellanicus</i>)	larve	Mortalité de 60%	
		Palourde (<i>R. philippinarum</i>)	larve/ juvénile	Nécrose tissulaire et mortalité de 50 à 80%	(Nicolas <i>et al.</i> , 1996)
<i>V. tubashii</i>		Huitre (<i>C. gigas</i>)	juvénile	Mortalité de 25% à 60%	(Le Roux <i>et al.</i> , 2002; Gay <i>et al.</i> , 2004b; Gómez-León <i>et al.</i> , 2005; De Decker et Saulnier, 2011)
			larve	Mortalité de 60%	(Elston <i>et al.</i> , 2008)
		Huitre (<i>O. edulis</i>)	larve	Mortalité de 100% après 48h	(Prado <i>et al.</i> , 2015)
		Palourde (<i>V. philippinarum</i>)	larve	Mortalité de 100% après 48h	(Prado <i>et al.</i> , 2015)
		Palourde (<i>R. philippinarum</i>)	larve	Mortalité de 60%	(Dubert <i>et al.</i> , 2017b)
<i>V. coralliilyticus</i>	Huitre pacifique (<i>C. gigas</i>)	larve	Mortalité de 17% après 48h	(Genard <i>et al.</i> , 2013)	
	Huitre (<i>O. edulis</i>)	larve	Mortalité de 19 %	(Kesarcodi-Watson <i>et</i>	

	pétoncle (<i>P. maximus</i>)	larve	mortalité de 61 %	<i>al.</i> , 2009) (Kesarcodi-Watson <i>et al.</i> , 2009)
<i>V. aestuarianus</i>	Huitre pacifique (<i>C. gigas</i>)	larve	mortalité de 90% à 100% après 5 jours	(Travers <i>et al.</i> , 2017)
<i>V. tapetis</i>	Palourde (<i>R. philippinarum</i>)	adulte	mortalité de 100%	(Allam <i>et al.</i> , 2002)

Le système d'alimentation basé sur la filtration de grand volume d'eau permet aux bivalves de concentrer les bactéries dans leurs tissus (Cavallo et Stabili, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005b). Ainsi, la concentration des bactéries peut être 100 fois plus importante que celle retrouvée dans les eaux environnantes (Wright *et al.*, 1996). Même si les *Vibrio* accumulés ne sont pas nécessairement pathogènes (Cavallo et Stabili, 2002; Tall *et al.*, 2013), ils peuvent se proliférer activement et causer des lésions et des mortalités (Pruzzo *et al.*, 2005b). Les premiers stades de développement (larves et juvéniles) représentent un risque particulièrement élevé pour les infections (Elston, 1984; Munn, 2005; Pruzzo *et al.*, 2005b). À ce stade, le système immunitaire est vulnérable ou non accompli, ce qui coïncide aussi avec la présence de plusieurs voies de contamination potentielles dans les écloséries (Figure 5). Par exemple, l'alimentation vivante comme les microalgues, la matière organique particulaire accumulée et la circulation de l'eau entre les unités d'élevage représentent des réservoirs bactériens et des vecteurs de contamination et d'infection (Elston, 1984; Dubert *et al.*, 2017a) (Figure 5). Les bivalves adultes sont généralement beaucoup moins susceptibles aux *Vibrio*, ou du moins, les mortalités qui y sont associées sont plus rares, à l'exception de *Vibrio tapetis* qui touchent les palourdes, *Ruditapes philippinarum* et provoque la maladie de l'anneau brun (Munn, 2005).

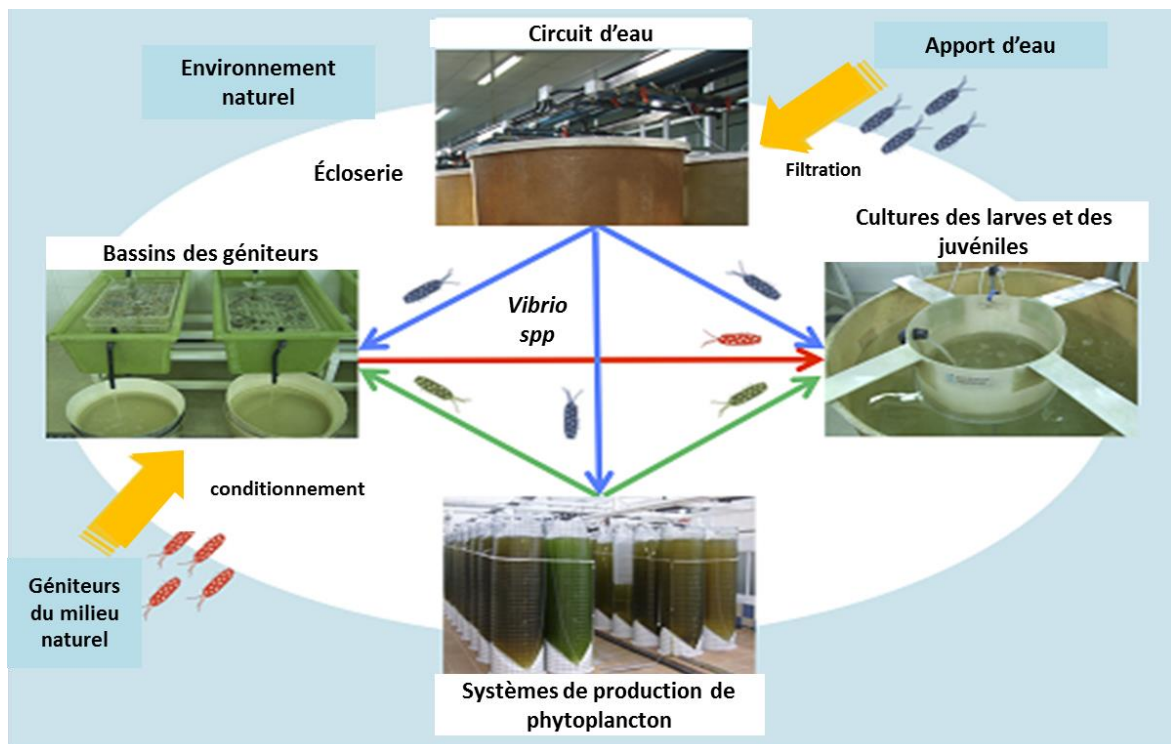


Figure 5: Principales voies d'infection et de contamination bactériennes dans les écloseries des bivalves (Dubert *et al.*, 2017a)

6. *Vibrio splendidus*

Les bactéries *V. splendidus* peuvent être distinguées de leurs congénères du genre *Vibrio*, par trois principales caractéristiques. Tout d'abord (1), Elles sont le groupe qui présente la plus grande diversité génétique (Gay *et al.*, 2004b; Le Roux *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005; Le Roux *et al.*, 2009; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Tall *et al.*, 2013; Oden *et al.*, 2018). La plupart des études sur *V. splendidus* font référence à un large groupe d'espèces et de souches différentes génétiquement, mais qui partagent un seul ancêtre commun (Farto *et al.*, 1999; Le Roux *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004a). Par exemple, Thompson *et coll.* (2005) ont étudié la diversité du bactérioplancton selon une dynamique annuelle et ils ont identifié au minimum mille génotypes différents associés à *V. splendidus* (Thompson *et al.*, 2005). Aujourd'hui, le clade de *V. splendidus* comprend le plus grand nombre d'espèces au sein des *Vibrio*, soient au minimum 17 espèces (Sawabe *et al.*, 2013; Oden *et al.*, 2018). D'autant plus, suite à des améliorations des techniques d'identification

génétique, plusieurs modifications sont fréquemment effectuées au sein de ce clade, comme des mises à jour (Saulnier *et al.*, 2017; Oden *et al.*, 2018), des ajouts de nouvelles espèces (Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; Lasa *et al.*, 2013), ou des révisions dans les noms des espèces. Par exemple, la souche LGP32 anciennement identifiée comme *V. splendidus* (Gay *et al.*, 2004a; Gay *et al.*, 2004b) a été révisée pour être renommé *V. tasmaniensis* en 2013 (Sawabe *et al.*, 2013), tout en étant considérée comme « espèce apparentée à *V. splendidus* » (Travers *et al.*, 2015). Pour des raisons de simplification, *V. splendidus* indique les différentes espèces qui font partie du large groupe (ou clade) de *V. splendidus*.

Par ailleurs (2), *V. splendidus* et les espèces apparentées représentent aussi le groupe de *Vibrio* le plus abondant dans les écosystèmes marins côtiers (Nicolas *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 2005). Ce groupe comprend aussi les principales espèces cultivables provenant de l'environnement marin, comme *V. celticus*, *V. crassostreae*, *V. chagasii*, *V. cyclitrophicus*, *V. gallaecicus*, *V. gigantis*, *V. kanaloae*, *V. lentus*, *V. pomeroyi*, *V. splendidus* et *V. tasmaniensis* (Tall *et al.*, 2013).

Finalement (3), *V. splendidus* est caractérisé par son association aux infections des larves et des naissains des bivalves, beaucoup plus que les autres animaux aquatiques (Sugumar *et al.*, 1998; Farto *et al.*, 1999; Le Roux *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004b; Pruzzo *et al.*, 2005a; Holbach *et al.*, 2015; Travers *et al.*, 2015). D'ailleurs, certaines souches ont été associées à des événements de mortalités massives dans plusieurs écloséries du monde, notamment, en France (Nicolas *et al.*, 1996; Lacoste *et al.*, 2001; Waechter *et al.*, 2002; Saulnier *et al.*, 2010), en Espagne (Gómez-León *et al.*, 2005; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010), au Japon (Sugumar *et al.*, 1998), en Chine (Liu *et al.*, 2013a; Liu *et al.*, 2013b), au Chili (Rojas *et al.*, 2015), ou en Nouvelle-Zélande (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2009).

Ces trois caractéristiques de *V. splendidus* expliquent l'orientation des recherches effectuées sur cette espèce. Par exemple, du fait de leur diversité génétique, *V. splendidus* manifeste différents degrés de virulence (Farto *et al.*, 1999; Lambert *et al.*, 1999; Le Roux *et al.*, 2002; De Decker et Saulnier, 2011; Tanguy *et al.*, 2013). À l'instar de beaucoup d'espèces de *Vibrio*, le potentiel de pathogénicité de *V. splendidus* est relié aux conditions environnementales comme la température (Thompson *et al.*, 2005), l'acidification (Cao *et*

al., 2018a; Cao *et al.*, 2018b) ou la présence de fer (Song *et al.*, 2018) ainsi qu'à son fort pouvoir de survie dans des conditions défavorables (Liu *et al.*, 2013a; Vezzulli *et al.*, 2015). Cependant, les propriétés spécifiques et génétiques de ces bactéries sont généralement mises en avant pour discuter le statut opportuniste ou pathogène de plusieurs souches (Le Roux *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004a; Gauthier-Clerc *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013a; Tanguy *et al.*, 2013).

De nombreuses études ont scruté les aspects relatifs à la pathogénicité chez certaines souches de *V. splendidus*. La plupart d'entre elles étaient axées sur les réponses immunologiques suite à l'exposition à des souches potentiellement pathogènes (Araya *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013b; Tanguy *et al.*, 2013) ou sur la recherche de gènes spécifiques qui seraient corrélés directement avec la virulence observée (Nicolas *et al.*, 1996; Farto *et al.*, 1999; Gómez-León *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005; De Decker et Saulnier, 2011). Depuis quelques années, il y a de plus en plus d'effort, quant à l'identification des facteurs de virulence chez ces espèces. La majorité de ces facteurs a été identifiée chez la souche virulente LGP32 (Gay *et al.*, 2004b; Binesse *et al.*, 2008; Duperthuy, 2010; Vanhove *et al.*, 2015). Les métalloprotéines associées aux gènes *Vsm* ont été évoquées comme l'un des principaux facteurs de virulence chez cette souche (Le Roux *et al.*, 2007; Binesse *et al.*, 2008; Saulnier *et al.*, 2010). Il a été confirmé également que les souches de *V. splendidus* non virulentes ne disposent pas de ces gènes (Binesse *et al.*, 2008). Les protéines membranaires de type OmpU semblent aussi avoir une contribution importante dans l'effet virulent de LGP32 en jouant un rôle dans l'interaction entre la bactérie et la cellule hôte (Duperthuy *et al.*, 2010; Duperthuy *et al.*, 2011). La souche LGP32 peut également sécréter des vésicules membranaires externes (*outer membranes vesicles*) riches en hydrolases (protéases, lipases, phospholipases, hémolysines et nucléases.). Ces vésicules sont relâchées dans le milieu extérieur ou dans les hémocytes des larves, pour provoquer des dommages cellulaires (Vanhove *et al.*, 2015). D'autres facteurs de virulence ont également été mis en évidence sur d'autres souches de *V. splendidus*. Par exemple, on retrouve, une enzyme toxique nommée « *Vis* » chez la souche 12B01 (Ravulapalli *et al.*, 2015), ainsi que des composés non protéiques thermostables qui sont essentiels pour médiatiser les produits

extracellulaires chez les trois souches VPAP16, VPAP18 et VPAP23 (Rojas *et al.*, 2015). Finalement, Jia *et coll.* (2015) ont identifié que les lipopolysaccharides (LPS) de *V. splendidus* (souche JZ6) joueraient un rôle potentiel dans la pathogénicité observée sur les larves de *Crassostrea gigas* en augmentant le pouvoir d'attachement de la bactérie aux protéines intégrines impliquées dans les processus d'adhésion, de phagocytoses, de prolifération et de régulation cellulaire (Jia *et al.*, 2015).

En général, les mécanismes et les facteurs de virulence chez *V. splendidus* sont encore mal élucidés. Comme nous l'avons évoqué, la grande diversité génétique de ce groupe ainsi que son statut opportuniste complique leur étude (Gay *et al.*, 2004a). Les mécanismes de virulences peuvent être spécifiques ou le résultat d'une combinaison de différents mécanismes variables selon les conditions (Le Roux *et al.*, 2009). Dans une tentative récente pour étudier les facteurs de virulence chez plusieurs souches de *V. splendidus* (435 souches) issues des bivalves, du zooplancton, des sédiments et des eaux dans plusieurs endroits en Europe, Nasfi *et coll.* (2015) ont révélé qu'il n'existe aucune corrélation claire et directe entre les protéines OMP-U et le gène *Vsm* (responsable de la virulence par sécrétion de métalloprotéases). Il a été suggéré que *V. splendidus* est doté d'une plasticité génomique importante qui dépasse les propriétés de l'environnement et de l'hôte en question, pour inclure d'autres facteurs comme les transferts génétiques latéraux massifs susceptibles de se dérouler entre les différentes souches (Nasfi *et al.*, 2015).

7. Souche 7SHRW

La souche *V. splendidus* 7SHRW utilisée dans l'ensemble de cette thèse, est une souche endémique, isolée à partir des sédiments de la rivière Hillsborough, à l'Île du Prince Édouard au large du Golfe Saint-Laurent (Canada) (Mateo *et al.*, 2009). Il a été prouvé que cette souche est facile à conserver et à cultiver dans des conditions de laboratoire, à des températures entre 16 et 25°C en présence de 2% de sel (NaCl) (Mateo *et al.*, 2009; Turcotte *et al.*, 2016). La croissance *in vitro* de cette souche est aussi influencée par la composition chimique du milieu selon la présence de

nanoparticules, d'ions divalents ou de matière organique particulaire (Doiron *et al.*, 2014; Millour *et al.*, 2016).

V. splendidus 7SHRW a été testée sur quelques espèces de bivalves, notamment *M. edulis* (Gauthier-Clerc *et al.*, 2013; Tanguy *et al.*, 2013; Turcotte *et al.*, 2016; Tanguy *et al.*, 2018) et *Placopecten magellanicus* (Turcotte *et al.*, 2016) et *Mya arenaria* (Mateo *et al.*, 2009). Jusqu'à maintenant elle n'est pas considérée comme une souche virulente pour les adultes bivalves (Mateo *et al.*, 2009; Gauthier-Clerc *et al.*, 2013; Tanguy *et al.*, 2013), même si dans une étude récente sur l'identification des facteurs moléculaires des hémocytes de moules adultes après exposition à *V. splendidus*, la 7SHRW a induit les mêmes réponses métaboliques que la souche virulente LGP32 (Tanguy *et al.*, 2018). La pathogénicité de la souche a toutefois été démontrée chez les larves de pétoncles (*Placopecten magellanicus*) et celles des moules (*Mytilus edulis*) en provoquant des mortalités de 65 et de 30%, respectivement (Turcotte *et al.*, 2016).

SECTION 2: MARENNINE

1. Diatomées

1.1. Biologie et écologie

Les diatomées ou les Bacillariophycées sont des organismes unicellulaires photosynthétiques d'importance écologique majeure pour les océans et les milieux côtiers (Werner, 1977). Il est suggéré qu'ils peuvent contribuer à plus que 25% de la production primaire mondiale (Scala et Bowler, 2001) et jusqu'à 40% de la biomasse marine (Bozarth *et al.*, 2009). À l'heure actuelle, à peu près 10^6 espèces de 250 genres sont connues (Pulz et Gross, 2004; Smol et Stoermer, 2010) et il est estimé qu'à peine 10% des espèces sont caractérisées (Cadoret et Bernard, 2008). Les diatomées sont capables de coloniser pratiquement tous les habitats aquatiques du globe terrestre (Werner, 1977). Certaines espèces sont plus spécifiques à certaines géographiques comme les régions polaires ou tropicales, alors que d'autres sont considérées comme cosmopolites telles que *Chaetoceros atlanticus*, *Nitzschia sp* ou *Asteromphalus heptactis* (Werner, 1977; Bowler *et al.*, 2010).

La particularité des diatomées est la présence d'un exosquelette en silice constitué de deux valves (comme les boîtes de pétries) et d'une ceinture en bande. La plus grande valve l'*épithéca* emboîte une valve plus petite l'*hypothéca*. Selon les particularités des propriétés des valves, comme l'épaisseur, l'ornementation, la présence de pores ou d'extensions, les diatomées sont divisées en deux groupes, soient les « centrales » de symétrie radiale et les « pennales , ou pennates ou pennées » de symétrie bilatérale avec la présence du raphé (une fente longitudinale de la valve) (Sze, 1986; Scala et Bowler, 2001; Smol et Stoermer, 2010).

1.2.Produits et potentiels d'application

Dans le milieu naturel, les diatomées produisent plusieurs métabolites secondaires qui sont utilisés comme des signaux de défenses ou de communication avec les organismes de leurs écosystèmes (Pulz et Gross, 2004; Maibam *et al.*, 2014; Kuczynska *et al.*, 2015). Ces molécules bioactives constituent une voie prometteuse pour plusieurs applications industrielles (Lebeau et Robert, 2003a). Plus particulièrement, l'intérêt biotechnologique des diatomées est associé à la facilité de leur culture et à leur croissance rapide. Cela explique en partie l'essor des systèmes de production, de petites à grandes échelles industrielles, afin d'optimiser la production de la biomasse algale ainsi que la production de métabolites et de coproduits recherchés (Lebeau et Robert, 2003b; Lebeau et Robert, 2003a). Les constituants externes comme la silice des frustules, peuvent être utilisés dans l'industrie microélectronique (Bozarth *et al.*, 2009). Les métabolites extracellulaires secrétés dans le milieu comme les pigments, les antibiotiques et certaines toxines sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique (Foley *et al.*, 2011; Ibañez et Cifuentes, 2013; Falaise *et al.*, 2016), tandis que les métabolites intracellulaires comme les lipides, les acides aminés et les vitamines sont exploités pour produire du biodiesel ou pour l'industrie alimentaire (Ibañez et Cifuentes, 2013; Yen *et al.*, 2013).

Par ailleurs, comme plusieurs groupes de phytoplanctons, l'utilisation de diatomées est principalement orientée vers le secteur aquacole (Borowitzka, 1997; Pulz et Gross, 2004). Certaines espèces sont utilisées directement comme nourriture vivante pour les mollusques

ou pour le zooplancton utilisé comme nourriture distribuée aux larves de poissons (Helm *et al.*, 2006; Seychelles *et al.*, 2009; Gagné *et al.*, 2010). Les diatomées, comme plusieurs autres types de phytoplanctons, sont cultivées pour leur apport nutritif en acides gras polyinsaturés essentiels comme l'acide eicosapentaénoïque, l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque (Pulz et Gross, 2004; Bozarth *et al.*, 2009).

1.3. *Haslea ostrearia*

Parmi les produits de diatomées à fort potentiel d'applications, on retrouve un pigment bleu non photosynthétique produit par quelques espèces du genre *Haslea* (Massé *et al.*, 2001; Gastineau *et al.*, 2012b; Gastineau *et al.*, 2014). Plus spécifiquement, *H. ostrearia* est l'espèce la plus réputée pour produire ce pigment unique (Massé *et al.*, 2001). *H. ostrearia* est une diatomée pennée benthique qui appartient à la classe des Naviculaceae (Hoek *et al.*, 1995). Cette espèce était longtemps considérée dans l'ancienne littérature comme une espèce de *Navicula*, mais après la découverte du microscope électronique à balayage, elle a été transférée par Simonsen 1974 vers le genre *Haslea* (Gastineau *et al.*, 2012b). Comme montré dans la figure 6, *H. ostrearia* est de forme allongée ayant une longueur qui varie entre 60 à 120 µm et une largeur de 6 à 12 µm (Gastineau, 2011). Le pigment bleu se concentre au niveau des extrémités apicales de la cellule (Gastineau *et al.*, 2012b).

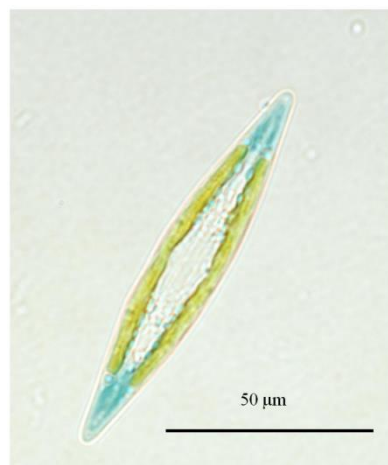


Figure 6 : Cellule d'*H. ostrearia* observée sous microscope (Gastineau *et al.*, 2014)

H. ostrearia est une espèce euryhaline, qui démontre des capacités d'adaptation exceptionnelles aux conditions défavorables telles que les fortes intensités lumineuses (Mouget *et al.*, 1999), ou l'exposition aux rayons ultra-violetts (Rech *et al.*, 2005). Cela lui permet de coloniser les endroits côtiers peu profonds et les plus exposés à la lumière. D'ailleurs, comme plusieurs espèces de diatomées, *H. ostrearia* est signalée dans plusieurs endroits du monde. Elle est présente dans les zones côtières des trois océans mondiaux ainsi qu'en Australie et dans les mers fermées comme la Méditerranée, la mer noire, et la mer Adriatique (Gastineau, 2011).

Le mode de reproduction chez *H. ostrearia* est similaire à celui décrit chez les diatomées pennées (Figure 7) avec un mode principal de reproduction asexuée par division cellulaire. Le noyau subit une mitose pour former deux cellules filles. Chaque cellule fille hérite d'une valve de silice de la cellule mère et en forme une deuxième par élongation vésiculaire et polymérisation siliceuse (Davidovich *et al.*, 2009). Ainsi, au fil des générations, la taille moyenne de la population diminue. Lorsque la taille des cellules atteint la moitié de la taille maximale, les cellules ne peuvent plus se reproduire asexuellement. La taille cellulaire est alors restituée par reproduction sexuée (appelée aussi phase d'auxosporulation). Dans ce type de reproduction, la cellule végétative se transforme en cellule sexuée (gamète). Chez les pennées, les gamètes sont amiboïdes et sont rassemblés par un tissu mucilagineux. Chaque gamète se divise par méiose pour former des nucléides haploïdes. Les zygotes se forment après un échange de gamètes puis il s'accroît en taille par accumulation d'eau pour former l'auxospore. Ce dernier s'allonge finalement, au fur et à mesure de la mise en place de dépôt de silice pour former la nouvelle frustule (Sze, 1986; Hoek *et al.*, 1995; Davidovich *et al.*, 2009; Gastineau, 2011).

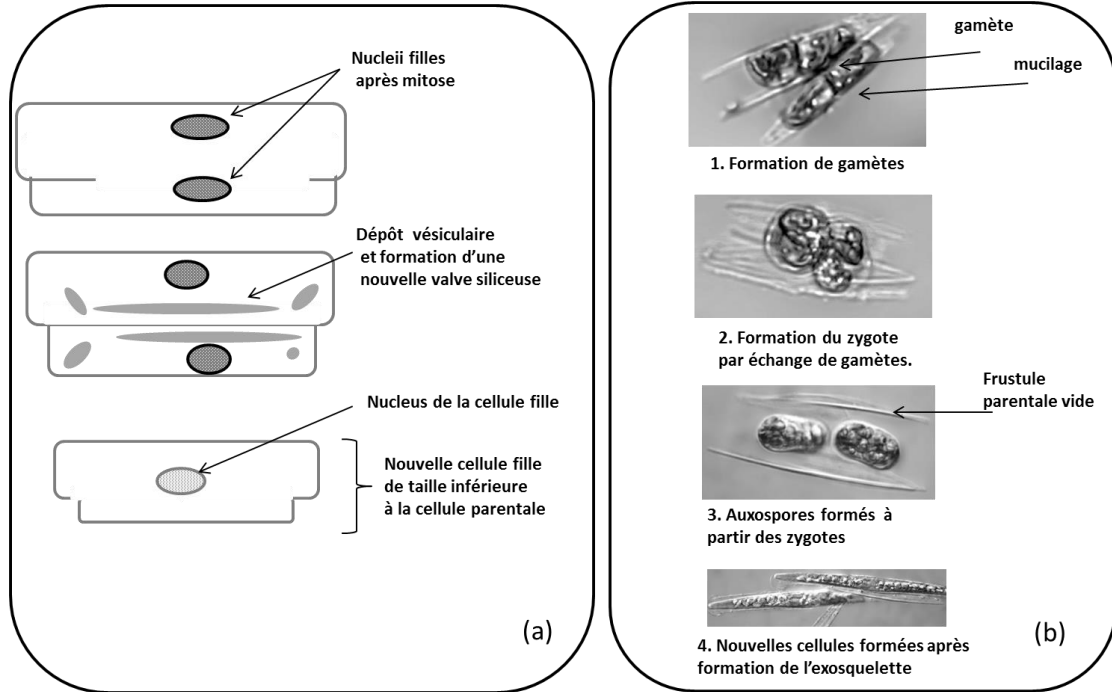


Figure 7 : Modes de reproduction chez les diatomées pénales et *H. ostrearia* : principales étapes de la division asexuée (a) (Sze, 1986) et de la division sexuée (b) (Davidovich *et al.*, 2009)

2. Pigment de marennine

2.1. Phénomènes de verdissement

En 1886, Lankester a nommé le pigment produit par *H. ostrearia* « marennine » (Lankester, 1895). Ce nom est inspiré de la baie de Marennes-Oléron en France ayant une importante activité ostréicole et où *H. ostrearia* fut observée pour la première fois (Gastineau *et al.*, 2014). La coloration de la marennine est dépendante du pH (Pouvreau *et al.*, 2006b). À l'intérieur de la cellule d'*H. ostrearia*, le pigment est bleu (milieu acide). Lorsqu'il est relâché dans le milieu extérieur, d'un pH basique, la coloration du pigment vire au vert. Également lorsque le pigment s'accumule par filtration dans les branchies et les palpes labiaux des huitres qui sont mises en affinage (Figure 8), ces tissus acquièrent une coloration verte très caractéristique, connue par le phénomène de verdissement (Robert *et al.*, 2002; Gastineau *et al.*, 2012c; Gastineau *et al.*, 2014). Le verdissement des huitres représente un avantage économique important pour les commerçants ostréicoles puisqu'il

peut contribuer à augmenter considérablement les prix de vente sur les marchés (Tremblin *et al.*, 2000; Gastineau *et al.*, 2014).



Figure 8 : Verdissement des huîtres nourries par *H. ostrearia*. (a) *H. ostrearia* avec marennine bleue aux extrémités de la cellule; (b) huître nourrie avec *H. ostrearia* (Gastineau *et al.*, 2012c).

Bien que l'apparition des eaux bleues-vertes fût observée depuis longtemps au niveau de plusieurs milieux côtiers dans le monde (Gastineau *et al.*, 2014), le phénomène à l'échelle temporelle et spatiale reste aléatoire et imprévisible (Mouget *et al.*, 1999). Les raisons de cette variabilité sont encore inconnues, car les mécanismes et les facteurs déclencheurs du processus de sécrétion de la marennine par *H. ostrearia* sont mal identifiés.

Il a été démontré que le pigment bleu est produit et relâché dans le milieu extérieur durant toutes les phases de croissance de la diatomée, soit par les jeunes cellules en phase exponentielle (Robert *et al.*, 2002), soit par les cellules plus âgées ou sénescents durant des phases plus avancées (Gastineau *et al.*, 2014). Cette forme de marennine relâchée dans le milieu est appelée marennine extracellulaire (EMn), alors que la forme de marennine piégée à l'intérieur du cytoplasme à l'apex de la cellule est appelée marennine intracellulaire (IMn) (Nassiri *et al.*, 1998). La marennine est aussi davantage relâchée lorsque la diatomée se rapproche du fond (Lebeau et Robert, 2003b; Mouget *et al.*, 2005). Ces résultats semblent suggérer que la luminosité pourrait jouer un rôle dans le relargage de

la marennine, mais le mécanisme n'a pas encore été entièrement démontré (Mouget *et al.*, 1999; Tremblin *et al.*, 2000; Mouget *et al.*, 2005).

2.2. Propriétés chimiques de la marennine

Jusqu'aux années 90, les propriétés biologiques et biochimiques du pigment marennine étaient peu étudiées. Carbonnelle et coll. ont pu déduire, à partir des expériences réalisées par l'utilisation des eaux de cultures d'*H. ostrearia* contenant le pigment, des propriétés antitumorales et antiprolifératives des cellules cancéreuses (Carbonnelle *et al.*, 1998). Toutefois, pour une meilleure mise en évidence des propriétés du pigment, il fallait élaborer des techniques afin de l'extraire et de le purifier. L'équipe de Robert (Vandanjon *et al.*, 1999; Robert *et al.*, 2002) a fourni les premiers essais d'extraction. Plus tard, plusieurs techniques et procédés ont été employés par Pouvreau et coll. pour une meilleure qualité de purification et de quantification (Pouvreau *et al.*, 2006b; Pouvreau *et al.*, 2006a; Pouvreau *et al.*, 2007). Ces études ont permis d'une part une caractérisation préliminaire du pigment, et d'autre part, de mieux orienter les avenues de recherche vers une meilleure identification des propriétés biologiques de la marennine.

La marennine relâchée dans le milieu externe est un pigment parfaitement soluble dans l'eau (Pouvreau *et al.*, 2006b). Elle est d'une composition différente de celle des pigments photosynthétiques (Moreau, 1970; Robert *et al.*, 2002; Pouvreau *et al.*, 2006b). Bien que sa structure moléculaire soit encore méconnue, la marennine est considérée comme un polyphénol (Pouvreau *et al.*, 2006b). Récemment, une analyse chimique utilisant la technique de résonance magnétique nucléaire (RMN) a permis de démontrer que la marennine pourrait contenir des groupements glucidiques, en plus des régions aliphatiques phénoliques (Gastineau *et al.*, 2014). Cependant, la signature spectrale du pigment correspond à un mélange de molécules difficilement identifiable (Pouvreau *et al.*, 2006b; Gastineau *et al.*, 2014). En effet, les groupements composants le phénol (Figure 9) sont connus pour leurs hautes réactivités. Par exemple, les groupes hydroxylés ont tendance à former des liaisons hydrogène très stables avec les molécules environnantes comme

l'oxygène, le fluor et l'azote. Cela explique la complexité des molécules phénoliques et la difficulté de leur caractérisation (Vermerris et Nicholson, 2006).

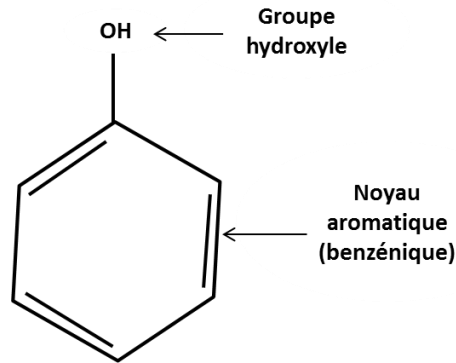


Figure 9 : Structure chimique d'un phénol

2.3. Propriétés biologiques de la marennine

La présence de groupements phénoliques dans la molécule de marennine confère au pigment des rôles biologiques attrayants. Les phénols sont souvent impliqués dans des interactions avec les bactéries et les champignons symbiotiques et ils sont très recherchés pour leurs effets antioxydants et antibiotiques (Zdunczyk *et al.*, 2002; Quideau *et al.*, 2011). Effectivement, plusieurs activités biologiques ont été démontrées à partir de la marennine issue des cultures d'*H. ostrearia*. La marennine a montré une action allélopathique par inhibition de la croissance et du développement des espèces de microalgues autres que *H. ostrearia* lorsqu'elles sont exposées au pigment bleu (Moreau, 1970; Tremblin *et al.*, 2000; Windarto *et al.*, 2014; Prasetya *et al.*, 2016). La marennine aurait également des effets antioxydants (Pouvreau *et al.*, 2008), anticoagulants (Bergé *et al.*, 1996), antimoraux (Carbonnelle *et al.*, 1998) et antibactériens (Gastineau *et al.*, 2012a).

L'activité antimicrobienne de la marennine nécessite une discussion particulière. Le terme antibactérien qui par définition désigne l'inhibition de la croissance bactérienne (Romero *et al.*, 2012) est encore sous controverse pour la marennine. Par exemple, il a déjà été démontré que le pigment inhibe le développement de trois espèces de bactéries marines

à Gram(-), *Vibrio aesturianus*, *Polaribacter irgensii* et *Pseudoalteromonas elyakowii* dans le milieu Agar (Gastineau *et al.*, 2012a). Cependant, Turcotte (2014) a démontré que la marennine n'est pas nocive pour le développement de *V. splendidus* même à des concentrations élevées (100 µg/ml) (Turcotte, 2014). L'action du pigment est plutôt de nature anti-virulente étant donné que le pigment a réussi à augmenter la survie des larves des bivalves dans les bassins d'élevage exposés à *V. splendidus* sans tuer les bactéries.

Les activités biologiques ont été démontrées avec les deux formes de marennine (externe et interne). Toutefois, les différences au niveau de leurs poids moléculaires, de leurs propriétés spectroscopiques (Pouvreau *et al.*, 2006b) et du degré de leurs actions biologiques (Tardy-Laporte *et al.*, 2013) suggérèrent que chaque forme cible des activités qui lui sont spécifiques. Par exemple, Tardy-Laporte et coll. (2013) ont démontré que la forme externe interagit avec les bactéries d'*Escherichia coli* alors que la forme interne a une action beaucoup plus limitée. Par conséquent, le relargage de la forme externe dans le milieu extérieur suggère que cette forme particulière serait la plus impliquée dans les interactions avec les microorganismes environnants comme les bactéries, les champignons et les microalgues (Tardy-Laporte *et al.*, 2013).

SECTION 3 : RMN *IN VIVO* : HISTORIQUE ET DERNIÈRES AVANCÉES

La résonance magnétique (RMN) nucléaire est une technique de caractérisation moléculaire qui a gagné une très bonne réputation auprès des biologistes, grâce à la faible énergie de radiation dans l'intervalle de radiofréquence, qui n'occasionne pas d'effet nuisible pour les tissus biologiques (Reckel *et al.*, 2005) (voir chapitre 2). La RMN a permis de contribuer aux études sur les systèmes biologiques en se focalisant sur différents noyaux dans les organismes vivants analysés en entier (*in vivo*) ou dans les cellules et les tissus, ce qui est référé par la RMN *in cell* ou *in cellulo*. Dans ce cas les cellules ne sont pas nécessairement vivantes (Reckel *et al.*, 2005; Serber *et al.*, 2005; Warnet *et al.*, 2015).

Historiquement, la RMN *in vivo* avait permis d'étudier les métabolites qui sont abondants, ce qui permet d'obtenir un signal spectral suffisamment résolu (Ratcliffe, 1994; Serber *et al.*, 2005). Grâce aux avancées en matière de technologies spectroscopiques, de techniques de marquage isotopique et de manipulations génétiques, le terme *in cell* est apparu plus fréquemment pour se référer aux expériences qui permettent de scruter des molécules plus larges dans les systèmes cellulaires (Serber *et al.*, 2001; Selenko et Wagner, 2007; Maldonado *et al.*, 2011). Cependant, les études de la RMN *in cell* des grosses molécules ont toujours été limitées par la contrainte de la faible qualité spectrale (Selenko et Wagner, 2007; Maldonado *et al.*, 2011). En effet, les types de mouvements sont déterminés par la dynamique globale de la molécule qui est largement dépendante de son poids moléculaire, de sa taille et de sa viscosité (Warschawski *et al.*, 2011). De ce fait, la RMN *in vivo* a été pratiquement exclusive pour les petites molécules ou les grosses molécules libres et mobiles, ce qui explique en grande partie la dominance de la RMN en solution dans le domaine de la RMN *in cell* (Reckel *et al.*, 2005; Serber *et al.*, 2005; Selenko et Wagner, 2007; Maldonado *et al.*, 2011).

Même si la première application de la RMN-ÉS *in vivo* est apparue dans les années 70, avec les travaux sur la bactérie du genre *Acholeplasma* (Oldfield *et al.*, 1972; Stockton *et al.*, 1975), les études sur les membranes intactes ont été rares avant les années 90. En effet, la faible résolution spectrale constituait un défi majeur comparé aux membranes purifiées. D'autant plus que les concentrations cellulaires importantes, l'hétérogénéité des échantillons, la rigidité de la matrice membranaire et la coexistence de plusieurs lipides différents dans un même système (Bernad *et al.*, 1987) complexifient les analyses, puisqu'ils génèrent des anisotropies spectrales importantes, schématisées en de larges bandes spectrales (Warschawski *et al.*, 2011). Durant les cinq dernières années, la RMN-ÉS a permis plusieurs contributions pertinentes dans ce sens, pour permettre d'étudier non seulement les grosses molécules de faibles mouvements moléculaires, mais aussi les systèmes hétérogènes et complexes (Warschawski *et al.*, 2011; Separovic et Naito, 2014; Warnet *et al.*, 2015). Aujourd'hui, la RMN *in vivo* permet de se référer plus fréquemment aux organismes vivants, comme les bactéries, les microalgues, et les petits invertébrés tant

que leurs tailles leur permettent de remplir un rotor de RMN (Chauton *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2015; Simpson *et al.*, 2015; Laadhari *et al.*, 2016).

Les défis de la RMN *in vivo* restent sans doute le maintien des échantillons dans des conditions physiologiques optimales au cours des expériences. Les changements extrêmes dans les conditions comme le passage de la culture dans le rotor accompagnée par un changement de pH, la diminution du taux de nutriments, du taux d'oxygène ou l'augmentation des taux de déchets métaboliques affectent largement le taux de survie des organismes à analyser (Ratcliffe, 1994; Reckel *et al.*, 2005; Serber *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2011). Contrairement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) où il est possible de maintenir un flux de nutriment et d'oxygène pour le tissu, la RMN ne le permet pas, particulièrement pour la RMN-ÉS où les cellules sont très concentrées et condensées dans le rotor (Simpson *et al.*, 2015). Même si les bactéries représentent un modèle convenable pour ce genre d'expérience, puisqu'elles possèdent une enveloppe robuste comparée aux cellules eucaryotes (Bloom et Mouritsen, 1988; Reckel *et al.*, 2005), plusieurs heures (\approx 12h et plus) sont nécessaires pour obtenir des spectres résolus sur de tels systèmes. Cela constitue une contrainte majeure pour l'aspect *in vivo*, puisque les longues expériences affecteraient les métabolismes cellulaires et pourraient refléter des données biaisées et non représentatives de la cellule vivante (Davis *et al.*, 1979; Reckel *et al.*, 2005; Tardy-Laporte *et al.*, 2013).

Certains chercheurs ont trouvé des moyens pour protéger les cellules de la dégradation au cours du temps en ajoutant des agents chimiques comme le glycérol ou le ficcol (Maldonado *et al.*, 2011). Cependant, une méthode plus efficace a été mise au point plus récemment pour résoudre ce problème de RMN-ÉS *in vivo* sur les bactéries. Il s'agit d'utiliser la RMN du deutérium combiné avec la technique de la rotation de l'angle magique (*magic angle spinning* (MAS)) qui permet un compromis entre une bonne résolution spectrale et la conservation des conditions physiologiques des échantillons vivants (voir explications théoriques au chapitre 2). La technique permet également d'augmenter la sensibilité spectrale tout en réduisant le temps de l'expérimentation d'un facteur de 10, permettant l'étude des membranes biologiques dans les cellules intactes à

l'état vivant sans avoir recours aux agents chimiques (Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016).

SECTION 4 : SYSTÈMES MEMBRANAIRES

Pour décrire les mécanismes moléculaires des membranes cellulaires, deux champs d'expertise en RMN sont principalement utilisés. La RMN du phosphore permet d'étudier les têtes polaires des phospholipides, tandis que la RMN du deutérium permet d'étudier les mouvements des chaînes acyles (Seelig, 1977; Seelig, 1978). Bien que ces techniques soient complémentaires pour révéler les mouvements des principaux constituants des membranes que sont les phospholipides, chaque technique présente des avantages et des limites. Les concepts théoriques sont détaillés dans le chapitre 2. Les études sur les membranes des bactéries ainsi que les mécanismes antibactériens utilisent trois principaux systèmes membranaires : (1) les membranes biologiques des cellules que ce soit des cellules vivantes et intactes (étude *in vivo*) ou non vivantes (étude *in cellulo*), (2) les membranes extraites des bactéries y compris les OMVs (*outer membrane vesicles*) et (3) les membranes modèles.

1. Membrane biologique des bactéries intactes

1.1. Structure et composition lipidique

(i) Structure

Les procaryotes possèdent un système membranaire particulier caractérisé par la présence d'une paroi cellulaire constituée d'une couverture entourant la membrane cytoplasmique. Les bactéries sont divisées en deux principaux groupes : les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (Figure 10). Cela est fondé sur la réaction de la coloration Gram qui trouve son origine dans les différences de structure et de composition au niveau de leurs parois externes (Neidhardt *et al.*, 1994; Martinko et Madigan, 2005).

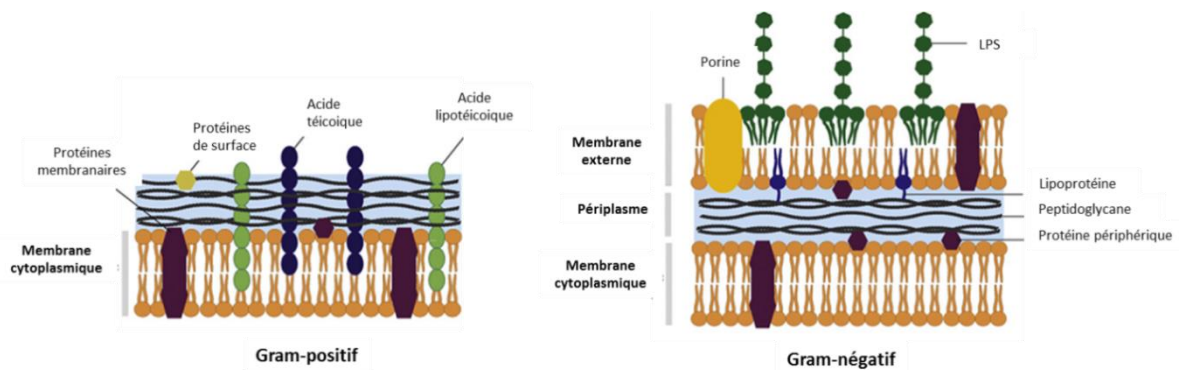


Figure 10 : Structure de la paroi bactérienne (LPS : Lipopolysaccharides) (Epanand *et al.*, 2016), avec permission.

La paroi externe des bactéries à Gram(+) est constituée d'une couche de peptidoglycane dans laquelle s'enfoncent des acides teicoïques. Chez les bactéries à Gram(-), la paroi externe est constituée en plus de la couche de peptidoglycane (moins épaisse que celle des bactéries à Gram(+)), d'une membrane supplémentaire externe. Cette dernière comporte un feuillet externe couvert par un constituant particulier, les lipopolysaccharides (LPS) (Neidhardt *et al.*, 1994; Martinko et Madigan, 2005) (Figure 11). Les LPS sont constitués par une portion polysaccharidique (le cœur polysaccharide et l'antigène-O) ainsi qu'une portion lipidique, le lipide-A. La membrane cytoplasmique et la membrane externe sont séparées par un liquide gélatineux appelé périclasme (Neidhardt *et al.*, 1994).

Généralement, les lipides dans la paroi externe ne constituent que 1 à 3% de l'ensemble des lipides membranaires chez les bactéries à Gram(+) et 10 à 20% des lipides chez les bactéries à Gram(-) (O'Leary, 1962). Le système membranaire des bactéries, particulièrement la membrane cytoplasmique, est organisé en un modèle de mosaïque fluide composé principalement de glycérophospholipides et de phospholipides. Ces derniers sont constitués par un groupe hydroxylé (les têtes polaires) et une région lipophile (les chaînes acyles). Le glycérol joue le rôle d'un support auquel s'attachent deux acides gras et un groupement phosphate (Denich *et al.*, 2003; Sohlenkamp et Geiger, 2016).

Lipopolysaccharides (LPS)

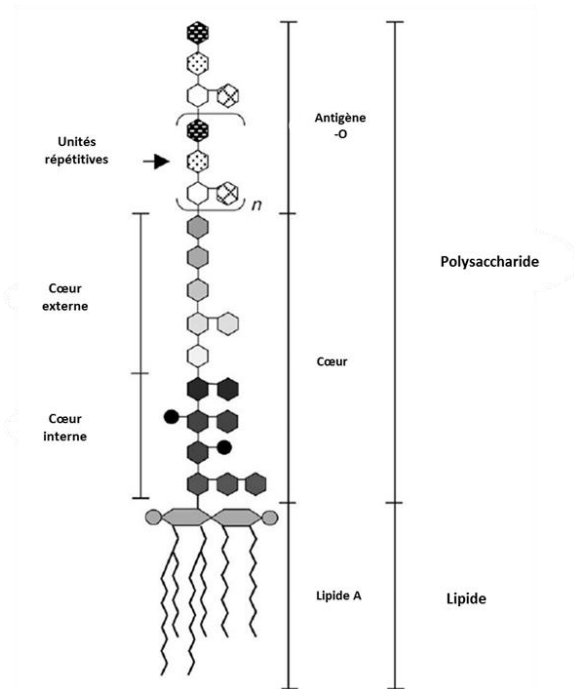


Figure 11 : Structure d'un Lipopolysaccharides (LPS)

(ii) Composition en lipides polaires

De point de vue de la composition, il existe une grande diversité de phospholipides constituant les membranes bactériennes avec des chaînes acyles d'acides gras variables (O'Leary, 1962; Martinko et Madigan, 2005). Les principaux groupes de lipides polaires retrouvés chez les bactéries sont la PE (phosphatidyléthanolamine), la PG (phosphatidylglycérol) et la CL (cardiolipine) (Figure 12). Leurs proportions relatives varient entre les types de bactéries (type de Gram et espèce) et même entre les monocouches au sein d'une même membrane (Denich *et al.*, 2003; Warschawski *et al.*, 2011; Sohlenkamp et Geiger, 2016; López-Lara et Geiger, 2017).

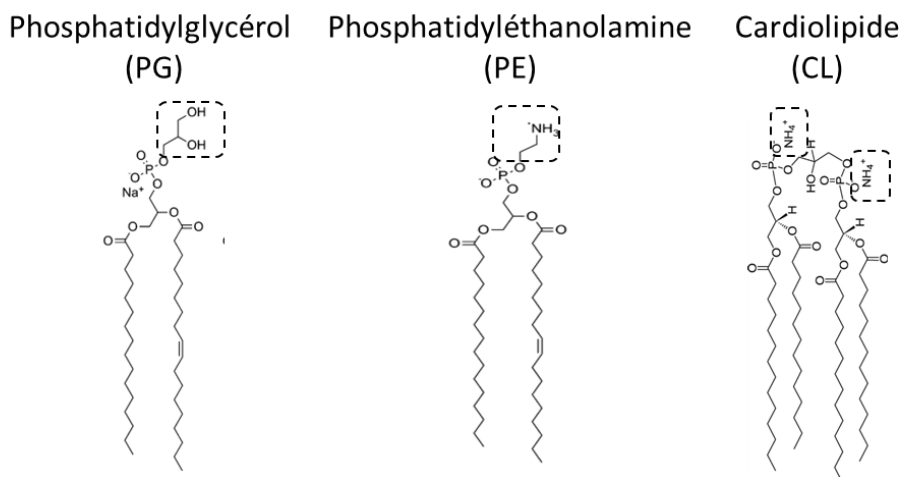


Figure 12 : Principaux constituants moléculaires des phospholipides. Structures des phospholipides majoritaires chez les bactéries à Gram(-). Les lignes intercontinues indiquent les différences dans les groupements constituant la tête polaire (adaptée de Denich *et al.*, 2003).

Généralement la composition chez les bactéries à Gram(-) est dominée par la PE (Martinko et Madigan, 2005; Warschawski *et al.*, 2011). Par exemple la moyenne des proportions des PE chez quelques espèces de *Vibrio* est de 77% de l'ensemble des lipides (Freese *et al.*, 2009). Pour les bactéries à Gram(+), les proportions de PG sont les plus dominantes ($\approx 75\%$). Les LPS et les peptidoglycanes sont aussi considérés comme structures lipidiques particulières et constituent respectivement 25 et 6% des membranes des bactéries à Gram(-) comme *E. coli* et des Gram(+) comme *Bacillus subtilis* (Tableau 2).

Tableau 2 : Compositions des membranes bactériennes en phospholipides, exprimées en % molaires des lipides totaux.

	Gram	PE	iso-PE	PG	CL	autres	Références
<i>E. coli</i> (membrane externe)	-	60	0	33	7	0	Warschawski <i>et al.</i> , 2011
<i>E. coli</i> (membrane interne)	-	61	0	13	1	25 (LPS)	Warschawski <i>et al.</i> , 2011
<i>V. splendidus</i> (NB73)		77	0	33	0	0	Freese <i>et al.</i> , 2009
<i>V. alginosus</i>	-	64,3	11,2	15	1,8	0	Oliver et Colwell, 1973
<i>V. marinofulvus</i>	-	60,6	3,8	32,3	0,8	0	Oliver et Colwell, 1973
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	80,1	1,3	17,5	1,1	0	Oliver et Colwell, 1973
<i>B. subtilis</i>	+	13	0	77	4	6 (GL*)	Warschawski <i>et al.</i> , 2011

*GL : galactolipides

Même si les têtes polaires sont considérées comme des groupements neutres, elles peuvent avoir des charges négatives en conditions physiologiques (Denich *et al.*, 2003). Par exemple, la PE est généralement zwitterionique alors que la PG et la CL sont des groupements anioniques. Ces propriétés de charges jouent un rôle primordial dans l'arrangement des lipides de structure, dans la stabilité des protéines membranaires et dans l'accomplissement des fonctions biologiques en général (White et Tucker, 1969; Shibuya, 1992; Epanand *et al.*, 2016; Sohlenkamp et Geiger, 2016).

(iii) Composition en acides gras

Les chaînes acyles des bactéries sont extrêmement diversifiées selon l'espèce, la souche, les conditions de l'environnement et selon la croissance (O'Leary, 1962; White et Tucker, 1969; Sohlenkamp et Geiger, 2016; López-Lara et Geiger, 2017). D'une manière générale, les lipides sont plus saturés et plus courts par rapport aux membranes des cellules eucaryotes (Epanand *et al.*, 2016).

Les acides gras bactériens ont des longueurs de chaîne de 12 à 24 carbones, et plus communément entre 14 à 20 carbones. Les phospholipides typiques ont un AG (acide gras) saturé et un AG insaturé (Denich *et al.*, 2003). L'acide palmitique (C16) est généralement l'AG le plus abondant. Pour les autres AGs saturés, on retrouve communément de l'acide stéarique (C18), l'acide myristique (C14) et l'acide laurique (C12) (O'Leary, 1962; López-Lara et Geiger, 2017). Pour les AGs insaturés, les acides octadécénoïques (acides oléiques C18:1 et ses dérivés) ainsi que les acides hexadécénoïques (y compris l'acide palmitoléique C16:1) sont les plus communs (O'Leary, 1962). Par exemple, la composition en acides gras d'une souche de *V. splendidus* qui croît dans les sédiments profonds est dominée par l'acide palmitique (C16) et l'acide palmitoléique (C16:1) (Freese *et al.*, 2009).

Les bactéries ont aussi la propriété d'avoir des AGs à structures particulières qui présentent des branches (AGs branchés) ou des cycles (AGs cycliques ou cyclopropanes) (Figure 13). Les AGs branchés sont particulièrement plus abondants chez les bactéries à Gram(+) (jusqu'à 50% de l'ensemble des AGs), alors que les bactéries à Gram(-) sont

caractérisées par la présence de plus importantes proportions en cyclopropanes et en AGs insaturés (Denich *et al.*, 2003).

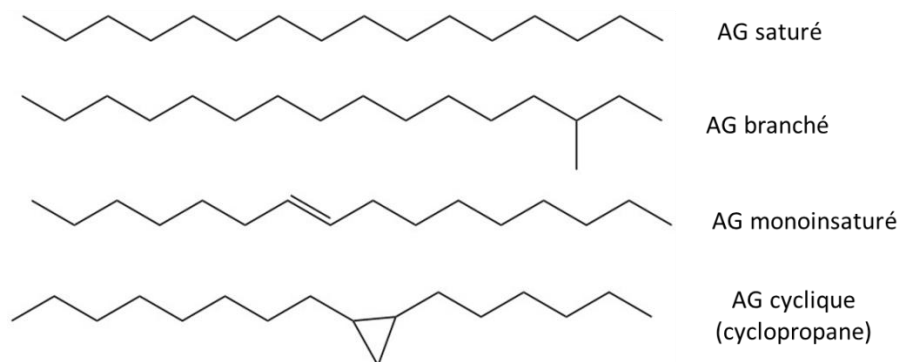


Figure 13 Principales structures d'acides gras dans les membranes des bactéries (adaptée de Denich *et al.*, 2003), avec permission.

En ce qui concerne la synthèse lipidique des AGs, il existe deux mécanismes principaux (Figure 14) : Le processus le plus connu et le plus commun est celui de la dégradation réversible assurée par le système de l'oxydation β qui est associée aux enzymes CoA. Cela consiste à une élongation directe des AGs existants grâce à des gènes de régulation qui s'activent (O'Leary, 1962; Byers, 1989; Zhang et Rock, 2008). Le deuxième processus, celui de la *synthèse de novo* ou « acylation », utilise des intermédiaires chimiques comme l'Acyl-ACP et les catalyseurs acetyl-CoA carboxylases. L'acylation consiste à convertir l'acétyl-CoA en malonyl-CoA qui sera condensée pour former des AGs à chaînes longues (O'Leary, 1962; Byers, 1989).

Les bactéries sont aussi capables d'incorporer des acides gras exogènes tant pour les souches sauvages que pour les souches mutantes qui sont incapables de synthétiser les AGs (Silbert *et al.*, 1968; Mavis et Vagelos, 1972; Byers, 1989; Brown et Gulig, 2008). L'incorporation est possible, car la *synthèse de novo* des AGs est plus coûteuse en énergie comparativement à la fabrication des membranes par des processus de conversion et d'élongation (Zhang et Rock, 2008).

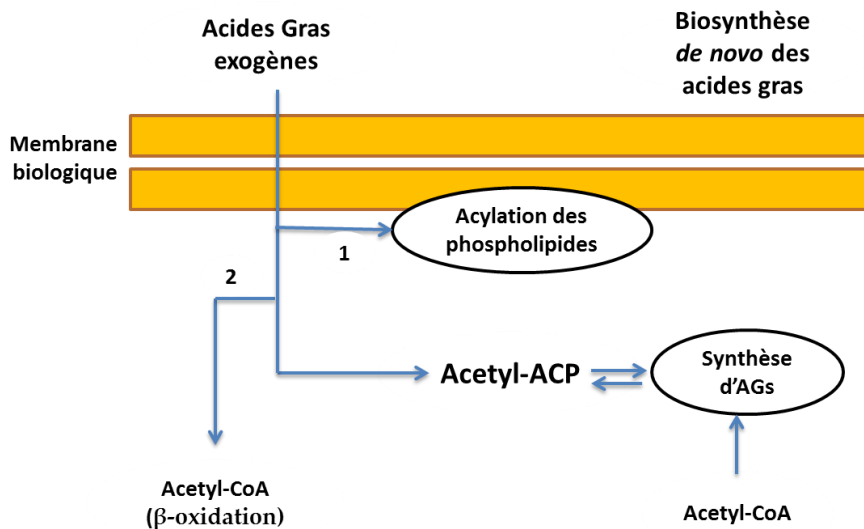


Figure 14 : Schémas récapitulatif de la biosynthèse des acides gras bactériens. Exemple de *V. harveyi* (adaptée de Byers, 1989).

Dans une étude comparative entre *E. coli* et deux souches marines de *Vibrio* (*V. harveyi* et *V. fisheri*), il a été observé chez les deux genres de bactéries que l'ajout des acides gras exogènes mène à leur incorporation dans les phospholipides membranaires par les deux mécanismes de biosynthèse lipidique (oxydation- β et acylation). La seule différence qui existait entre *Vibrio spp* et *E. coli*, alors qu'elles sont reliées et se chevauchent chez les espèces de *Vibrio spp*. Chez les *Vibrio*, l'acyl-CoA peut servir comme substrat pour l'acylation (*synthèse de novo*) ou pour le processus d'oxydation β (élongation) d'une manière parallèle (Byers, 1989).

Finalement d'autres mécanismes secondaires de synthèse lipidiques peuvent exister pour synthétiser les AGs insaturées. Cela peut être assuré par déshydrogénation, qui permet de convertir des AGs saturés en AGs insaturés (par exemple production de l'acide oléique à partir de l'acide stéarique) ou par la prolongation à partir d'un précurseur d'une courte chaîne insaturée (O'Leary, 1962).

1.2. Fluidité membranaire

La fluidité membranaire est définie par le degré de désordre et la dynamique moléculaire au sein de la bicouche lipidique (Los et Murata, 2000). Ce paramètre est d'une importance primordiale pour le fonctionnement de la membrane biologique qui se comporte comme un senseur des facteurs environnementaux externes à la cellule. (Beney et Gervais, 2001; Denich *et al.*, 2003; Guilhelmelli *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2015; Epanand *et al.*, 2016). La bactérie est en perpétuelle régulation grâce à son pool génétique, pour maintenir sa fluidité, non seulement pour assurer la stabilité de la structure lipidique, mais aussi pour garantir un fonctionnement adéquat pour les protéines membranaires (Denich *et al.*, 2003; Bohuszewicz *et al.*, 2016). Par exemple, des processus comme la formation de structures non lamellaires pour des phénomènes d'exocytose, de sécrétion de toxine ou de la communication entre les bactéries (le *quorum sensing*) sont directement reliés à la fluidité membranaire (Baysse *et al.*, 2005; Bohuszewicz *et al.*, 2016; Epanand *et al.*, 2016).

Des techniques variées peuvent être utilisées pour évaluer la fluidité des membranes biologiques comme celles des bactéries (sur membranes intactes ou extraites). Nous citons par exemple, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC, *differential scanning calorimetry*), la résonance paramagnétique électronique, la diffraction par les rayons X, la polarisation par fluorescence et la RMN (Denich *et al.*, 2003; Los et Murata, 2004). La polarisation par fluorescence est la technique la plus connue pour la mesure de la fluidité depuis les années 70. Cette méthode se base sur l'utilisation des marqueurs chimiques qui s'insèrent entre les groupes polaires des membranes, qui seront détectées par fluorescence. La popularité de la technique est reliée à la possibilité de prendre des mesures *in vivo* sans extraction membranaire (Mykytczuk *et al.*, 2007). Cependant, cette technique ne permet pas une évaluation quantitative de la fluidité, puisque la distribution des marqueurs chimiques est généralement hétérogène dans les lipides, ce qui peut modifier les structures et donner des interférences avec le signal de la membrane (Denich *et al.*, 2003; Los et Murata, 2004). La résonance magnétique nucléaire *in vivo* développée durant les cinq dernières années représente une méthode alternative performante à la polarisation par

fluorescence puisqu'elle permet d'étudier la dynamique membranaire tout en quantifiant sa fluidité sans avoir recours aux marqueurs chimiques (Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016).

Les études sur la fluidité membranaire ont été largement discutées en relation avec les mécanismes d'adaptation et de régulation cellulaire (Denich *et al.*, 2003). En conditions physiologiques adéquates, les membranes cytoplasmiques des bactéries sont organisées en phase lamellaire, considérées comme l'état d'activité biologique le plus stable. Lors d'un changement de conditions du milieu, comme un changement de la température, de la pression osmotique, de la présence d'ions et de solutés, des taux de nutriments, du milieu de croissance, ou en présence de molécules xénobiotiques ou de polluants, les bactéries utilisent plusieurs mécanismes d'ajustement de la fluidité comme processus de défense ou d'adaptation (Carty et Ingram, 1981; Denich *et al.*, 2003; Los et Murata, 2004; Baysse *et al.*, 2005; Mykytczuk *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015).

Deux théories d'adaptation sont proposées pour expliquer cette régulation. La première, l'adaptation homéovisqueuse suggère que la bactérie compense lors du changement du milieu par régulation biochimique et structurale, de telle sorte que la fluidité membranaire reste inchangée (Sinensky, 1974; Denich *et al.*, 2003). La deuxième théorie, l'adaptation homéophasique suggère que la bactérie peut ajuster sa membrane, tout en ayant différents degrés de fluidité, une théorie plus soutenue par les études les plus récentes (Denich *et al.*, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007). Ainsi, lors de la quantification de la fluidité, il est important de noter qu'il n'existe pas de valeur absolue et caractéristique de l'état biologique des membranes bactériennes. Les bactéries tolèrent un large intervalle de fluidité membranaire de l'état fluide-cristallin à l'état gel. Dans certains cas, elles peuvent tolérer des proportions importantes de lipides membranaires présents à l'état gel, *i.e.* entre 50 et 90%, sans affecter leur croissance (Denich *et al.*, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007).

Pour les deux types de théories de régulation de fluidité membranaire, les mécanismes de régulation moléculaires sont les mêmes, et ils incluent principalement la régulation au niveau des chaînes d'acides gras. Les principaux mécanismes de régulation sont reliés aux

changements de la composition des AGs, de la longueur de la chaîne acyle, du ratio d'AGs saturés/AGs insaturés, de l'isomérisation des insaturations (la configuration *cis* à *trans*) et du taux d'AGs cycliques ou branchées (Denich *et al.*, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015). Il faut noter que le processus d'isomérisation représente la voie l'adaptation la plus rapide et qu'elle est utilisée pour des ajustements à court terme. Ce mécanisme est également le moins coûteux au point de vue énergétique et peut s'accomplir même par les cellules en croissance interrompue, contrairement aux autres mécanismes qui impliquent des synthèses *de novo* et des processus métaboliques plus lents et plus énergétiques (Okuyama *et al.*, 1991; Diefenbach *et al.*, 1992).

Les processus de régulation par changement de la composition des têtes polaires sont moins communs par rapport aux changements dans les chaînes acyles, même si les changements des charges et de la conformation (les phases) peuvent parallèlement y jouer un rôle (Denich *et al.*, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015). Tous ces mécanismes convergent vers un état de phase le plus stable et une épaisseur de la bicouche qui permet une intégration adéquate des protéines membranaires assurant leur fonctionnement biologique (Denich *et al.*, 2003).

1.3. RMN du deutérium pour l'étude des membranes intactes

Tel que cité précédemment, la RMN *in vivo* est une technique adéquate pour étudier les propriétés des membranes biologiques, y compris la fluidité sans avoir recours à des méthodes destructives ou des marquages chimiques qui risqueraient d'endommager la structure membranaire (Marcotte et Booth, 2014; Warnet *et al.*, 2015). Cela est rendu possible notamment grâce à la RMN du deutérium qui permet d'étudier les lipides membranaires, d'une manière rapide avec quantification précise de la dynamique membranaire (Warnet *et al.*, 2015).

La RMN du deutérium est une technique particulièrement avantageuse pour l'étude des cellules intactes puisqu'elle reflète le signal d'un plus grand nombre de protons (remplacés par du deutérium), au sein d'une unité membranaire, ce qui procure un meilleur rapport

signal/bruit, contrairement à la RMN du phosphore dont le signal provient d'un noyau unique, le phosphore (Marcotte et Booth, 2014). La RMN du deutérium est aussi avantageuse pour les systèmes complexes hydratés, comme les cellules biologiques, car le signal de l'eau est complètement invisible à travers cette technique (Marcotte et Booth, 2014).

La RMN du deutérium a été très employée durant les 50 dernières années en utilisant au départ les membranes lipidiques artificielles (Davis, 1979; Lafleur *et al.*, 1989; Holte *et al.*, 1995) et des extraits membranaires (Davis *et al.*, 1979; Davis *et al.*, 2009; Juhasz *et al.*, 2009; McConnell, 2010). Ces recherches ont apporté des retombées importantes pour ce qui est de la caractérisation des membranes sous différentes conditions comme la détermination de l'épaisseur des membranes et la fluidité à travers la quantification des moments spectraux (Oldfield *et al.*, 1972; Davis, 1979; Akutsu et Seelig, 1981; Holte *et al.*, 1995; Vermeer *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2009). Cela a permis d'orienter les recherches notamment vers l'étude des mécanismes d'action membranaire de molécules exogènes de l'environnement comme les antibiotiques, les agents chimiques, les éléments inorganiques (Heerklotz *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 2006; Vermeer *et al.*, 2007; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016). Grâce aux avancées en RMN de l'état solide *in vivo*, la RMN du ^2H permet de donner des informations sur l'orientation et les mouvements des chaînes des membranes d'une manière plus précise (voir partie théorique du chapitre 2). Cela explique le succès de plusieurs études effectuées sur des membranes biologiques (Monck *et al.*, 1992; Pius *et al.*, 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016).

L'isotope du deutérium a une abondance naturelle de 0,01%, ce qui limite donc la sensibilité des mesures de RMN *in vivo* des cellules biologiques. Des méthodes d'enrichissement isotopique doivent donc être développées pour permettre l'étude en haute résolution des systèmes biologiques utilisés (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016). Dans cette thèse, le marquage isotopique est optimisé

pour l'étude par RMN *in vivo* de *V. splendidus*, comme modèle de bactéries marine de Gram (-) (chapitre 3).

2. Extraits des membranes biologiques et OMVs

Certaines équipes ont choisi de travailler sur les propriétés membranaires avec des extraits de membranes bactériennes. Ces dernières constituent un choix de systèmes membranaires plus simple que celui d'une cellule intacte. Les extraits peuvent être obtenus par destruction complète de la cellule biologique et l'extraction des unités lipidiques (Ramamoorthy *et al.*, 2006). Les extraits membranaires ont été particulièrement utilisés durant les premières recherches sur la dynamique membranaire qui permettent de corroborer ou de vérifier les informations issues de l'étude des membranes lipidiques artificielles (Davis, 1979). Les extraits membranaires ont été utilisés dans l'optique de l'étude du polymorphisme membranaire (Cullis et Kruijff, 1979), de la rigidité des chaînes acyles (Davis *et al.*, 1979; Davis *et al.*, 2009; Juhasz *et al.*, 2009; McConnell, 2010), ainsi que pour des essais antimicrobiens (Ramamoorthy *et al.*, 2006).

Dans d'autres cas, les composés lipidiques membranaires peuvent être extraits avec d'autres composés non lipidiques ciblés comme les protéines membranaires, les canaux ioniques et les LPS pour obtenir les vésicules membranaires externes ou les OMVs (*outer membrane vesicles*) (Figure 15).

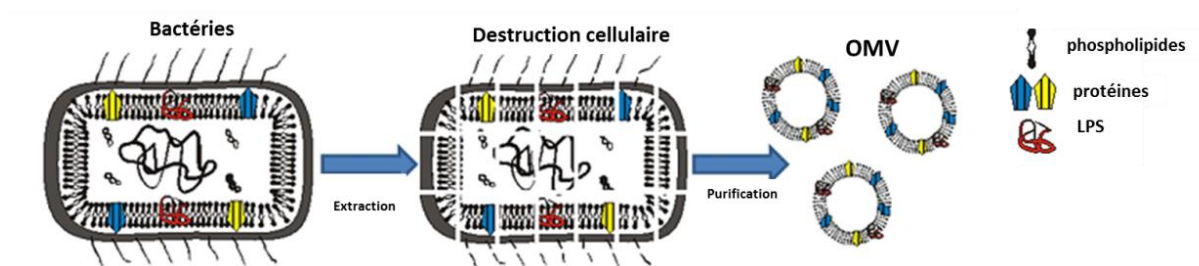


Figure 15: Formation des OMVs par extraction expérimentale (Acevedo *et al.*, 2014)

Il s'agit d'unités cellulaires les plus représentatives de la membrane externe des bactéries. Elles ont des diamètres de 50 à 250 nm et elles sont relarguées naturellement par les cellules bactériennes en croissance (Baker *et al.*, 2014; Klimentová et Stulík, 2015).

Généralement, la plus grande production vésiculaire s'effectue dans les tissus infectés par la bactérie (Kuehn et Kesty, 2005). Ces vésicules sont dotées de plusieurs fonctions physiologiques, comme le transport de toxines, la communication avec la cellule hôte, la colonisation des niches bactériennes, et elles jouent également un rôle dans la transmission des facteurs de virulence (Kuehn et Kesty, 2005; Acevedo *et al.*, 2014). La composition des OMVs reflète celle des membranes externes, puisqu'elles sont constituées par des protéines membranaires (porines, récepteurs pores, etc.), des lipopolysaccharides et d'une couche interne faite de phospholipides, ainsi qu'une partie du périplasma (Kuehn et Kesty, 2005; Baker *et al.*, 2014). Les OMVs constituent de bons candidats pour étudier les interactions de substances exogènes avec toutes les composantes membranaires (lipides et protéines) des bactéries pathogènes. À notre connaissance, aucune étude en RMN-ÉS n'a été réalisée sur ce genre de système.

3. Membranes modèles des bactéries

3.1. Description

Dans certains cas, l'étude des membranes *in vivo* ou des extraits membranaires n'est pas possible due à la complexité des structures biologiques. Les lipides de la membrane biologique ne sont pas seulement influencés par la présence de protéines membranaires et de canaux ioniques, mais aussi par des facteurs reliés à la biosynthèse continue des lipides et à l'asymétrie entre les bicouches qui sont d'une inhomogénéité dans la composition et dans l'épaisseur. (Sackmann et Ben-Shaul, 2016). Pour pallier à ce problème, certains chercheurs utilisent les membranes modèles qui sont des structures constituées de lipides artificiels et fabriquées dans l'objectif de mimer les membranes biologiques (taille et composition) (Warschawski *et al.*, 2011). Ce système d'unités simplifiées est une alternative qui permet de cibler indirectement les phospholipides des membranes biologiques comme étant ses composés majoritaires (Neidhardt *et al.*, 1994; Warschawski *et al.*, 2011). Ces structures ont également plusieurs applications biomédicales (Kraft *et al.*, 2014; Lombardo *et al.*, 2016; Yingchoncharoen *et al.*, 2016).

Du point de vue structural, les membranes modèles sont diversifiées et sont classées selon la taille, la forme, la lamellarité (Jones, 1995; Fröhlich *et al.*, 2001), ainsi que selon le mode de préparation expérimental (Yingchoncharoen *et al.*, 2016). Les principaux types de membranes modèles (Figure 16) sont les vésicules multilamellaires (MLV, *multilamellar vesicles*) et les vésicules unilamellaires (ULV, *unilamellar vesicles*). Ces dernières sont classées selon la taille en SUV (*small unilamellar vesicles*), LUV (*large unilamellar vesicles*) et en GUV (*giant unilamellar vesicles*) (Jones, 1995; Warschawski *et al.*, 2011; Kraft *et al.*, 2014; Lombardo *et al.*, 2016).

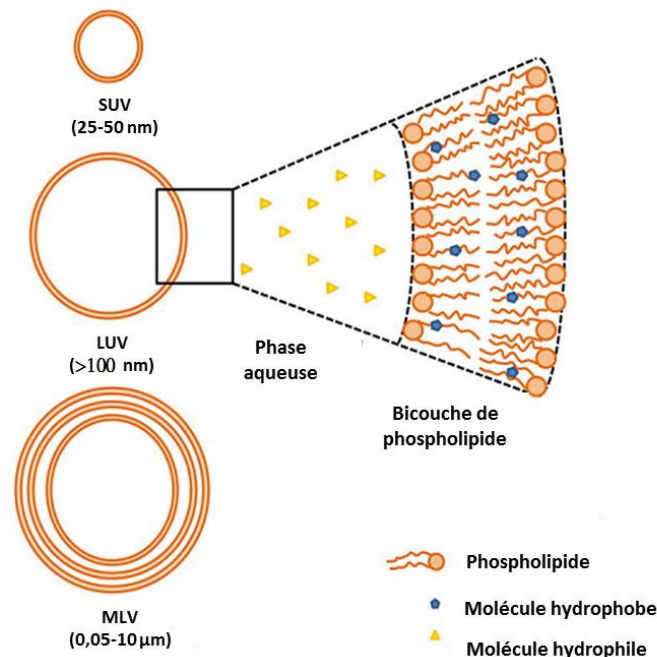


Figure 16: Différents types de membranes modèles. SUV, small lamellar vesicles; LUV, large lamellar vesicles et MLV, multilamellar vesicles (Yingchoncharoen *et al.*, 2016).

D'autres formes sont également retrouvées comme les bicelles (Warschawski *et al.*, 2011; Lombardo *et al.*, 2016), les REV (*reverse evaporation vesicles*), les VET (*vesicles by the extrusion technique*) et les DRV (*dehydration-rehydration vesicles*) (Jones, 1995). Selon Warschawski et coll., le choix du type de membranes modèles pour les études repose non seulement sur les critères de composition du modèle à mimer, mais aussi sur des

critères, dont principalement les critères techniques et expérimentaux (Warschawski *et al.*, 2011).

3.2. Choix des membranes modèles pour l'étude des bactéries

Les membranes modèles des bactéries doivent être fabriquées de telle sorte qu'elles prennent en considération les types de phospholipides existants dans le système à étudier, pour respecter au maximum l'épaisseur de la bicouche lamellaire à former ainsi que les propriétés de charges de surface et la morphologie (Warschawski *et al.*, 2011; Kraft *et al.*, 2014; Yingchoncharoen *et al.*, 2016). Les études sur les membranes modèles des bactéries sont principalement focalisées sur les membranes des bactéries *E. coli* (Rietveld *et al.*, 1993; Warschawski *et al.*, 2011; Warschawski *et al.*, 2018) dont la composition est constituée de PE, de PG et de CL (Rietveld *et al.*, 1993; Warschawski *et al.*, 2011). Cette composition est aussi très semblable à celle de plusieurs souches de bactéries marines et estuariennes dont celles du genre *Vibrio*, qui est constituée majoritairement par de la PE (60 à 80%) ainsi que de la PG (15 à 30%) (Oliver et Colwell, 1973).

Les MLVs sont les types de membranes modèles bactériennes les plus utilisées pour des études physico-chimiques, y compris les caractérisations par RMN-ÉS (Lu *et al.*, 2005; Warschawski *et al.*, 2011; Morini *et al.*, 2015). Les MLVs représentent de bons systèmes pour étudier les bactéries puisque leur taille (diamètre de ≈ 1000 nm) est proche de celle des cellules procaryotes (Figure 17) (Warschawski *et al.*, 2011). La présence de plusieurs couches lamellaires emboîtées en forme d'oignon confère également aux MLVs le caractère de stabilité manquant aux vésicules unilamellaires (Yingchoncharoen *et al.*, 2016). La bicouche lamellaire présente moins de tension de courbure, ce qui permet de stabiliser la structure des MLVs contrairement aux SUVs qui ont des mouvements rapides et sont moins stables (Lombardo *et al.*, 2016). Cette stabilité est davantage renforcée par la composition membranaire des bactéries caractérisée par la présence de phospholipides chargés (comme les PG) qui contribuent à éviter l'agglomération des MLVs lorsqu'elles sont formées, et à empêcher la dissociation en vésicules individuelles (Kraft *et al.*, 2014; Yingchoncharoen *et al.*, 2016). Ce critère de stabilité des MLVs se traduit par des

mouvements moléculaires lents à l'échelle de la RMN, ce qui représente un élément favorable permettant d'étudier les interactions de l'état solide (Warschawski *et al.*, 2011).

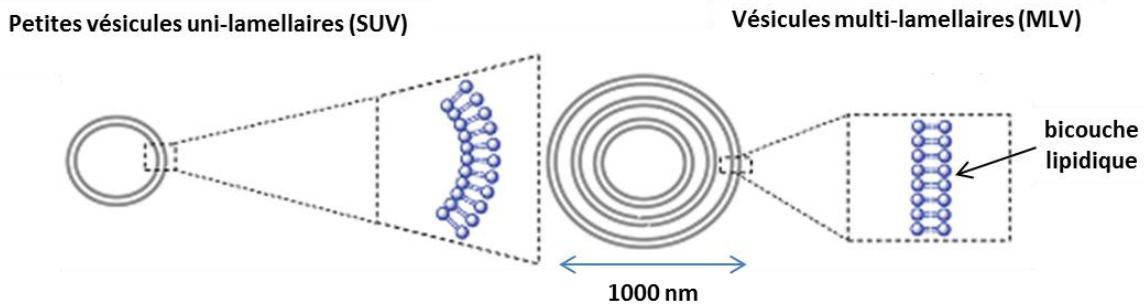


Figure 17: Exemples de structures des membranes modèles (Selvy *et al.*, 2011)

3.3. Étude du polymorphisme par les membranes modèles

Dans la membrane biologique, les phospholipides sont organisés de telle sorte que la membrane assure son équilibre en bicouche lamellaire ou en configuration de phase liquide cristalline (Cullis et Kruijff, 1979; Vasilenko *et al.*, 1982). Les lipides sont organisés selon une structure en deux couches parallèles et symétriques (d'où le terme cristallin) tout en étant suffisamment hydratés pour être élastiques et assurer un minimum de fluidité (d'où le terme fluide) (Seelig, 1978). Chez les bactéries, cet équilibre est directement relié à un potentiel de régulation du ratio de lipides lamellaires/non lamellaires, pour pouvoir accomplir certaines fonctions biologiques (Dowhan *et al.*, 2002). Par exemple, les formes micellaires, et cylindriques sont utilisées pour faciliter les processus d'endocytose, d'exocytose, la libération des toxines et le transfert des lipides transmembranaires (Cullis et Kruijff, 1979; Dowhan *et al.*, 2002). Ce potentiel de changement de phase est un processus de régulation que la bactérie adopte selon les conditions imposées par son environnement (Vikström *et al.*, 2000).

Les premiers chercheurs qui ont révélé le comportement des lipides naturels ont utilisé les lipides synthétiques testés sous différentes conditions (Cullis et Kruijff, 1979). Le concept du polymorphisme membranaire, qui définit les états physiques des membranes lipidiques présents dans la membrane biologique, est facilement étudié en utilisant les

membranes artificielles (Cullis et Kruijff, 1979; Jones, 1995; Sackmann et Ben-Shaul, 2016). Les lipides ont un pouvoir versatile d'autoassemblage gouverné par les interactions entre les phospholipides constitutants et les conditions physico-chimiques dans lesquels ils se retrouvent (milieu aqueux ou organique, pH, force ionique, température, etc.) (Figure 18). Par exemple, dans un milieu hydraté les phospholipides membranaires se réorganisent spontanément dépendamment de leur structure chimique. C'est le polymorphisme lyotropique (Sackmann et Ben-Shaul, 2016). Ce phénomène, excessivement décrit chez les membranes modèles permet de donner des informations qui peuvent être extrapolées pour les membranes biologiques des bactéries, même si ces dernières sont dotées par des pouvoirs d'ajustement enzymatique (Seelig, 1978; Lee *et al.*, 2008; Sackmann et Ben-Shaul, 2016).

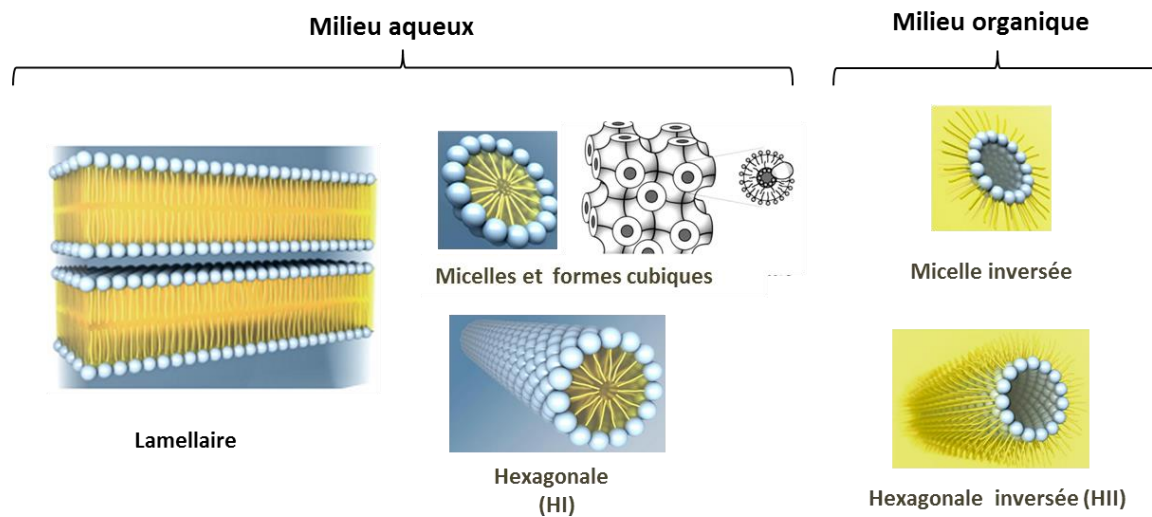


Figure 18 : Polymorphisme des lipides. les sphères bleues indiquent les têtes hydrophiles, les chaînes jaunes représentent les chaînes hydrophobes (Lee *et al.*, 2008; Epanand *et al.*, 2015)

La température représente le facteur qui influence le plus la configuration lipidique (Seelig, 1978; Vasilenko *et al.*, 1982). C'est le polymorphisme thermotropique qui décrit la formation des lipides sous l'effet thermique (en plus du polymorphisme lyotropique). Les formes les plus diversifiées et les plus nombreuses des membranes sont retrouvées dans cette catégorie de polymorphisme (Sackmann et Ben-Shaul, 2016). Les phases les plus

courantes sont les phases lamellaires, hexagonales et micellaires telles qu'illustrées à la figure 18. (Seelig, 1978; Vasilenko *et al.*, 1982; Lee *et al.*, 2008). Le changement entre les différentes phases est un changement réversible (Lombardo *et al.*, 2016). Cela est conforme avec les bactéries qui sont susceptibles d'être exposées à de grandes variations de température, et disposent d'une large variété de lipides qui leur permettent de maintenir l'intégrité de la membrane biologique (Dowhan *et al.*, 2002).

La présence de certains métaux divalents est aussi un autre facteur qui pourrait initier le processus de changement de phase pour certains lipides. L'importance de l'interaction entre les métaux divalents avec les phospholipides des membranes dérive de leur rôle dans les phénomènes biologiques, comme par exemple provoquer les transitions vers la phase hexagonale (Cohen et Cohen, 1981). La présence des métaux divalents peut être même vitale pour les organismes unicellulaires. Par exemple, il est connu que la souche mutante d'*E. coli* (AD93) est incapable de synthétiser la PE (de forme hexagonale) et nécessite la présence de métaux divalents comme le calcium ou le magnésium pour convertir les cardiolipides de phase lamellaire en des formes hexagonales, permettant ainsi d'accomplir ses fonctions biologiques (Rietveld *et al.*, 1993; Killian *et al.*, 1994).

Les membranes modèles peuvent être étudiées par RMN du phosphore qui permet d'exploiter les différentes phases lipidiques sans avoir recours au marquage isotopique (Seelig, 1978; Cullis et Kruijff, 1979; Marcotte *et al.*, 2003; Marcotte et Auger, 2005; Robert *et al.*, 2015). La partie théorique explique plus en détail l'étude du polymorphisme par ces techniques (chapitre 2).

SECTION 5: AGENTS ANTIMICROBIENS & MÉCANISMES MEMBRANAIRES

1. Antibiotiques en aquaculture

Les agents antimicrobiens ont été découverts en 1928 par Alexandre Fleming et définissent les substances naturelles ou synthétiques qui ont la capacité de tuer ou d'inhiber la croissance des micro-organismes (Romero *et al.*, 2012). Comme toute activité d'élevage animal, les antibiotiques sont utilisés en aquaculture pour des mesures

thérapeutiques ou prophylactiques (Serrano, 2005). Les antibiotiques ont connu un grand succès grâce à leur efficacité à maintenir la rentabilité des productions (Keyser *et al.*, 2008). Le plus grand usage s'effectue durant les stades de développement les plus fragiles des animaux aquatiques, soit dans les écloséries au moment de l'élevage larvaire et post-larvaire (del Carmen Flores-Miranda *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012; Watts *et al.*, 2017). Certaines espèces d'élevage comme les crevettes et les salmonidés sont également fortement dépendantes de l'utilisation des antibiotiques (Watts *et al.*, 2017).

Cependant, le succès des antibiotiques est accompagné par l'émergence des souches bactériennes multirésistantes, qui constituent un problème alarmant pour la santé publique (Serrano, 2005). La bactérie devient résistante à l'agent antimicrobien par mutation ou par transfert génétique horizontal dans l'environnement particulièrement dans les milieux aquacoles qui présentent des milieux propices pour de tels échanges génétiques (Romero *et al.*, 2012; Watts *et al.*, 2017). Aujourd'hui, 90% des bactéries retrouvées dans l'eau de mer des systèmes aquacoles sont résistantes au moins à un type d'antibiotique et jusqu'à 20% sont résistantes au moins à cinq types d'antibiotiques (Martinez, 2003).

Les agents antimicrobiens peuvent agir avec des mécanismes diversifiés selon les propriétés chimiques de la molécule en question (Tableau 3). Par exemple, le mode d'action des polymyxines, une famille de peptides antimicrobiens très communs en aquaculture (Oliver *et al.*, 1992; Serrano, 2005; Vaseeharan *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2012), est connu pour agir au niveau de la membrane des bactéries à Gram(-) (Clausell *et al.*, 2003; Sahalan et Dixon, 2008; Falagas *et al.*, 2010; Deris *et al.*, 2014).

Selon le rapport de la FAO, la polymyxine B n'est plus utilisée en aquaculture en raison du développement de souches bactériennes résistantes (Serrano, 2005). Cependant, cette famille d'antibactériens est très documentée considérant sa large application dans l'industrie agricole et pharmaceutique (Vaara, 2010; Kempf *et al.*, 2013; Deris *et al.*, 2014; Olaitan et Li, 2016).

Tableau 3 : **Différents mécanismes d'action des antibiotiques utilisés en aquaculture** (adapté de Romero *et al.*, 2012)

Mécanismes d'action	Exemples d'agents antibactériens
Interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire	céphalosporines, carbapénèmes, monobactames
Inhibition de la synthèse des protéines	macrolides, chloramphenicol, clindamycine
Interférence avec la synthèse des acides nucléiques	mupirocine, fluoroquinolone, rifampine
Inhibition des voies métaboliques	sulfonamides, acides foliques analogues
Perturbation de la structure membranaire	polymyxine, daptomycine

Les réglementations liées à l'utilisation des agents antimicrobiens en aquaculture sont extrêmement variables d'un pays à un autre (Defoirdt *et al.*, 2011; Weir *et al.*, 2012). Les pays de l'Amérique du Nord et de l'Europe présentent les régulations les plus strictes quant aux types d'antibiotiques autorisés, aux voies d'administrations, aux doses et aux fréquences d'utilisation (Romero *et al.*, 2012). Au Canada, seulement quelques antibiotiques sont autorisés dépendamment de la province et de l'activité d'élevage (Weir *et al.*, 2012). Au Québec l'achat et les traitements curatifs sont conditionnels à la prescription d'un médecin vétérinaire (Morin *et al.*, 2004). En revanche, il faut considérer que 90% de la production aquacole mondiale se déroule dans les pays en développement, qui présentent des régulations très faibles (Defoirdt *et al.*, 2011; Watts *et al.*, 2017). Considérant les flux fréquents des échanges commerciaux des produits de la mer, le phénomène de résistance liée à la santé publique est devenu un problème mondial (Defoirdt *et al.*, 2011; Manage, 2018).

2. Nouvelles alternatives aux antibiotiques

Aujourd'hui dans les élevages, il y a de plus en plus de pression pour réduire l'utilisation des agents antibiotiques à l'échelle mondiale et des mesures d'amélioration de

la santé animale sont de plus en plus adoptées (Serrano, 2005; Cabello, 2006; Watts *et al.*, 2017). Cela inclut la mise en place de stratégies de conditionnement des stocks d'élevage (Holbach *et al.*, 2015) ainsi que l'utilisation de molécules biologiquement actives comme les immunostimulants, les bactériophages et les probiotiques (Defoirdt *et al.*, 2007; Ravi *et al.*, 2007; del Carmen Flores-Miranda *et al.*, 2011).

Il y a de plus en plus d'efforts pour trouver de nouvelles alternatives aux antibiotiques conventionnels afin de réduire les problèmes de résistance (Winzer et Williams, 2001; Defoirdt *et al.*, 2004; Defoirdt *et al.*, 2011). Par exemple, les substances anti-virulentes qui bloquent le processus de virulence, plutôt que de provoquer la mort des bactéries pathogènes sont valorisées davantage (Serrano, 2005; Clatworthy *et al.*, 2007; Keyser *et al.*, 2008; Defoirdt *et al.*, 2011). Ces agents contribuent à préserver la flore microbienne endogène de l'organisme hôte et de réduire la pression de sélection des populations bactériennes, ce qui conduit à la réduction des phénomènes de résistance (Clatworthy *et al.*, 2007). Les mécanismes d'anti-virulence ciblent principalement les gènes responsables de l'expression des facteurs de virulence (Defoirdt *et al.*, 2011). Cela implique les facteurs responsables de l'adhésion, de l'invasion, des capsules, des exotoxines et des endotoxines (Keyser *et al.*, 2008), ainsi que le processus du *quorum sensing* (Defoirdt *et al.*, 2011).

3. Mécanismes membranaires des agents antimicrobiens

3.1. Principaux mécanismes d'action sur les membranes

Les principaux mécanismes d'actions des agents antimicrobiens sur les membranes bactériennes peuvent être des interactions spécifiques avec un lipide particulier, ou des actions non spécifiques (Figure 19). Ces mécanismes aboutissent généralement à des changements des propriétés physiques des membranes (Koller et Lohner, 2014; Epanand *et al.*, 2016). L'insertion de certains agents exogènes pourrait induire une pression latérale locale dans la membrane ce qui provoquerait un changement de la courbure intrinsèque des lipides et de la courbure générale de la membrane (Koller et Lohner, 2014) (Figure-19-J). Les agents antimicrobiens peuvent également modifier la distribution des lipides

membranaires, en formant des domaines (Figure 19-A). Par exemple ils déclenchent des échanges transmembranaires en rassemblant les lipides anioniques et cationiques ensemble (Epanand *et al.*, 2016). Ces mécanismes préliminaires affectent considérablement l'homéostasie et la charge membranaire et leur évolution conduit à la formation de pores (Figure 19-C), à des modifications des propriétés de charge et à des perturbations de processus d'échanges cellulaires (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Koller et Lohner, 2014; Epanand *et al.*, 2015; Epanand *et al.*, 2016). Autrement dit, le mécanisme de formation des pores et d'augmentation de la perméabilité membranaire, pourrait être un mécanisme direct des agents antimicrobiens ou une étape à ce qui succède l'effet du changement de la courbure ou du changement dans les domaines lipidiques. Lorsque l'interaction est spécifique, avec un type de phospholipide particulier, les conséquences d'un tel mécanisme pourraient aboutir à un ou à plusieurs mécanismes retrouvés en A, B et C de la figure 19 (Epanand *et al.*, 2016).

Alors que les mécanismes décrits sont étroitement liés et dépendants, la perméabilité ou la fluidité membranaire est généralement la composante la plus affectée par l'ensemble des modifications. Par exemple, le changement de courbure pourrait rigidifier ou fluidifier la membrane, alors que la formation de pore conduit généralement à une membrane désordonnée (Epanand *et al.*, 2016). Selon le type d'agent antibactérien, la dose et le temps d'action, les effets sur les membranes pourront être indirects en changeant l'arrangement et la fluidité membranaire sans sa destruction, ou avoir une action directe par destruction de la structure membranaire (Beney et Gervais, 2001; Brogden *et al.*, 2003; Guilhelmelli *et al.*, 2013; Epanand *et al.*, 2015; Epanand *et al.*, 2016).

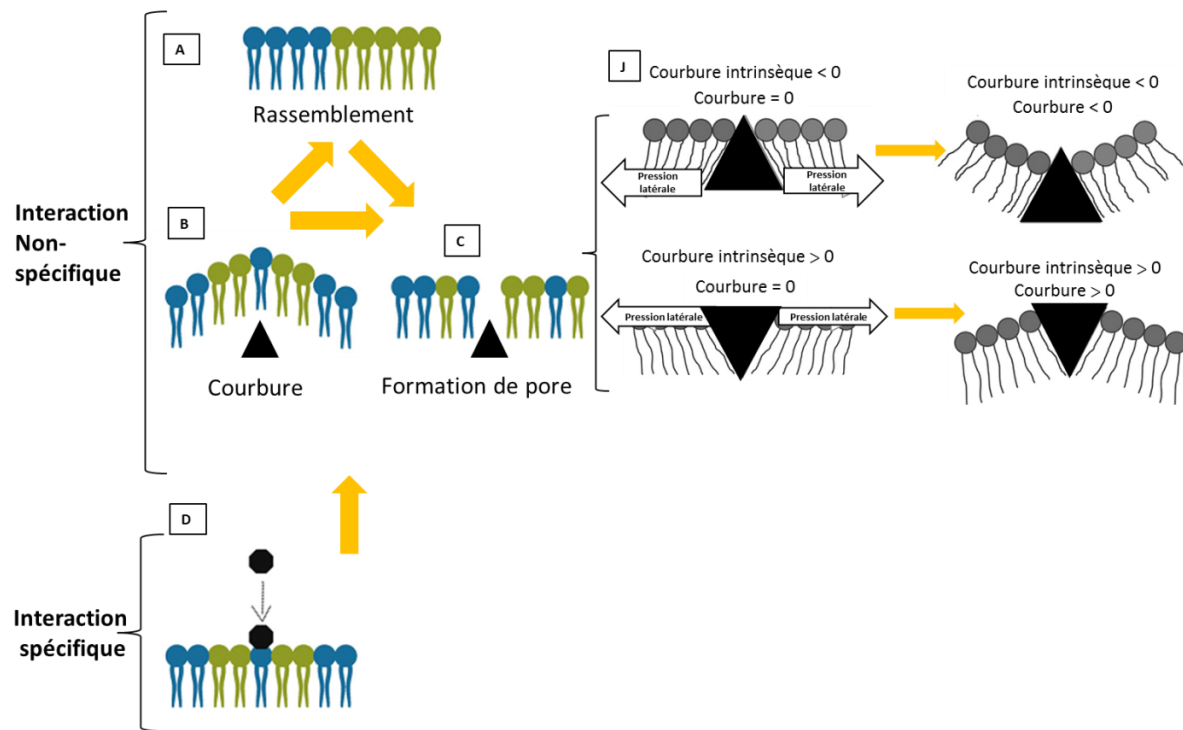


Figure 19 : Différents mécanismes membranaires des agents antimicrobiens (adaptées de Koller et Lohner, 2014 et d'Epand *et al.*, 2016) avec permission.

3.2. Mécanismes des peptides antimicrobiens (AMPs)

Les AMPs ou peptides antimicrobiens sont une large famille de composés antibiotiques. Ils sont extraits de divers organismes comme les insectes, les arthropodes les mammifères, les bactéries et les plantes (Vizioli et Salzet, 2002; Guilhelmelli *et al.*, 2013). Ce sont des molécules de 10 à 50 acides aminés avec différents arrangements et conformations (Guilhelmelli *et al.*, 2013). Les AMPs cationiques représentent le plus grand groupe d'antibiotiques décrits et utilisés et il y a de plus en plus d'efforts pour isoler d'autres types d'AMPs, notamment les peptides non canoniques (Vizioli et Salzet, 2002).

3.2.1. Mécanismes des AMPs cationiques

Aujourd'hui on dénombre plus de 400 AMPs cationiques dont la moitié sont extraits des insectes. Les mécanismes d'action de ces peptides ne sont pas élucidés pour tous (Vizioli et Salzet, 2002). Cependant, le mécanisme le plus commun est celui du modèle de

Shai-Matzusaki-Huang (Vizioli et Salzet, 2002) qui consiste en une augmentation de la perméabilité membranaire par déstabilisation et perforation après une interaction électrostatique initiale entre les charges positives des peptides et les lipides anioniques de la membrane bactérienne (Vizioli et Salzet, 2002; Arouri *et al.*, 2009; Guilhelmelli *et al.*, 2013). Ce mécanisme favorise la formation de pores, la séparation de phase lipidique, la formation des structures non lamellaires et la destruction de la membrane (Dennison *et al.*, 2006; Salnikov *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2013; Guilhelmelli *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016; Booth *et al.*, 2017). La spécificité de l'action est largement gouvernée par le type de peptide et par la composition lipidique des membranes bactériennes. Par exemple l'interaction de certains peptides est fortement dépendante de la présence des LPS ou du peptidoglycane dans la membrane externe des bactéries (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

Certains AMPs pourraient également agir en augmentant la rigidité membranaire, telle que le cas pour la « magainine ». Bien que le mécanisme ne soit pas bien décrit, la magainine semble se fixer entre les chaînes acyles pour changer leurs orientations ce qui conduit à une rigidification par effet de blocage (Guilhelmelli *et al.*, 2013; Shireen *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2015). L'effet de la rigidification est généralement une première étape avant l'étape de la perforation, comme démontré pour les polymyxines (Mykytczuk *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2011), un mécanisme expliqué à la figure 20.

Le mécanisme de la polymyxine-B (PxB) est bien décrit dans la littérature. Le processus inclut des interactions avec les LPS des bactéries à Gram(-) et se déroule en deux étapes dépendamment de la concentration et du temps d'action (Clausell *et al.*, 2003; Sahalan et Dixon, 2008; Deris *et al.*, 2014). D'abord, la PxB agit selon des interactions électrostatiques avec les LPS de la membrane externe (Figure 20). La polymyxine cationique entre en compétition avec les ions du magnésium et du calcium qui sont essentiels pour former des ponts entre les LPS adjacents. Ce processus engendre une compaction membranaire et une rigidification. À une étape ultérieure ou à fortes doses, la PxB s'insère entre les chaînes acyles des lipides A tout en déplaçant les ions divalents et en

détruisant les ponts ioniques entre les LPS qui se détachent, ce qui aboutit à une destruction complète de la paroi cellulaire (Delcour, 2009; Deris *et al.*, 2014).

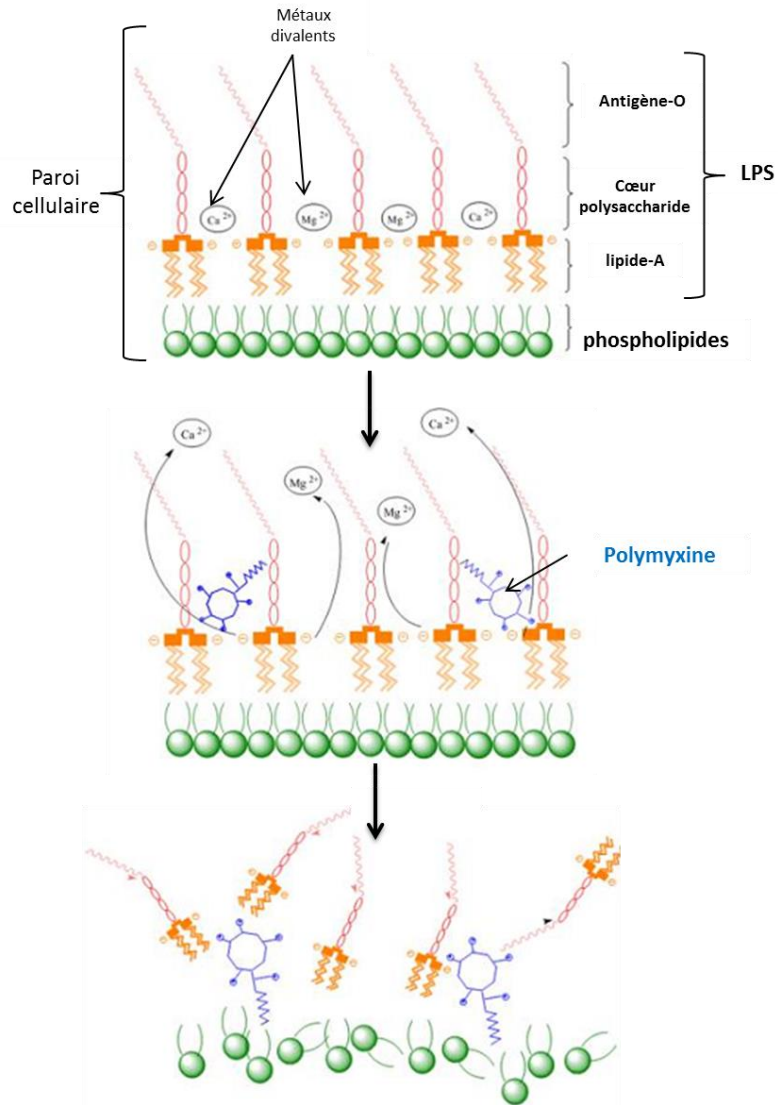


Figure 20 : Mécanismes d'action de la polymyxine-B sur les membranes des bactéries à Gram(-) (adaptée de Deris *et al.*, 2014)

3.2.2. Mécanismes des peptides non cationiques

Les peptides non cationiques représentent des peptides antimicrobiens plus récemment décrits par la recherche. Ce groupe comporte les peptides anioniques, les composés

aromatiques et des protéines fixatrices d'oxygène (Vizioli et Salzet, 2002; Guilhelmelli *et al.*, 2013). Les mécanismes d'action des peptides non cationiques ne sont pas très bien élucidés et sont généralement considérés comme différents et de faible intensité par rapport aux AMPs cationiques (Vizioli et Salzet, 2002; Guilhelmelli *et al.*, 2013). Toutefois, le degré de l'action antimicrobienne n'est pas seulement dépendant de la charge des peptides, car l'interaction pourrait être fortement variable selon la structure, l'hydrophobicité, la conformation et la taille de l'AMP (Guilhelmelli *et al.*, 2013).

Plus spécifiquement les AMPs anioniques ont généralement une tendance à interagir avec les lipides zwitterioniques de la membrane cellulaire, tout en induisant une modification de la conformation structurale (Brogden *et al.*, 1997; Thennarasu *et al.*, 2005). Il a été également observé que l'activité maximale des peptides anioniques est dépendante de la présence du zinc, qui joue un rôle de liaison cationique, permettant au peptide de surmonter la neutralité de la membrane et de pénétrer la cellule pour réagir avec les ribosomes dans le cytoplasme, sans provoquer nécessairement une action destructive notable de la membrane (Brogden *et al.*, 2003).

3.3.Mécanismes d'action des composés phénoliques

L'activité des composés phénoliques permet d'inhiber la croissance des bactéries pathogènes ou de réduire leur virulence à travers des mécanismes diversifiés (Li et al 2014). Ce pouvoir antimicrobien est fortement lié à la présence des groupements hydroxyles (Okuyama *et al.*, 1991; Denyer, 1995; Vermerris et Nicholson, 2006; Rai *et al.*, 2008; Duda-Chodak, 2012). Il n'existe pas de mécanisme unique et généralisé, ce qui est lié à la grande diversité chimique des polyphénols (hydrophobicité variable, présence des sucres et divers degrés de polymérisation) (Denyer, 1995; Bravo, 1998; Bisignano *et al.*, 1999). Les phénols peuvent agir d'une manière indirecte autour de la cellule bactérienne. Par exemple, ils peuvent diminuer la perméabilité à l'eau (Tymczynszyn *et al.*, 2005), s'associer avec des métaux par chélation, réagir avec les nutriments du milieu ou fixer les radicaux libres par leur pouvoir antioxydant (Denyer, 1995; Bisignano *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2005; Daglia, 2012; Duda-Chodak, 2012; Li *et al.*, 2014; Nakamura *et al.*, 2015). Les

composés phénoliques peuvent également agir directement sur les bactéries, soit sur les membranes externes ou sur les processus métaboliques intracellulaires (Li *et al.*, 2014).

Pour ce qui est de mécanismes moléculaires des phénols sur les membranes des bactéries cibles, ils sont généralement discutés en relation avec la fluidité membranaire comme une indication de stress environnemental, peu importe si le composé phénolique cible un organe autre que la paroi cellulaire (Heipieper *et al.*, 1991; Okuyama *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 1994; Beney et Gervais, 2001; Smith *et al.*, 2005; Mykytczuk *et al.*, 2007; Guilhelmelli *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2015). Certains composés phénoliques détruisent et déstabilisent la membrane bactérienne (Daglia, 2012; Li *et al.*, 2014; Nakamura *et al.*, 2015). Cependant, les mécanismes le plus souvent rapportés sont une augmentation de la rigidité membranaire comme une réaction de résistance (Okuyama *et al.*, 1991; Heipieper *et al.*, 1992; Tsuchiya, 1999; Tsuchiya et Inuma, 2000; Smith *et al.*, 2005).

Les conséquences du changement de la dynamique membranaire (par rigidification ou par destruction) sous l'effet des composés phénoliques peuvent causer des perturbations, soit des protéines membranaires, dans la formation des biofilms, des processus enzymatiques (Rai *et al.*, 2008; Daglia, 2012; Li *et al.*, 2014) ainsi que du processus de communication cellulaire (*quorum sensing*) (Baysse *et al.*, 2005).

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

➤ *Problématique*

Comme indiqué dans la partie revue de littérature, les effets antibiotique ou anti-virulent de la marennine ont été observés pour plusieurs bactéries potentiellement pathogènes (Gastineau *et al.*, 2012a; Tardy-Laporte *et al.*, 2013). L'action de la marennine était mise en évidence seulement sur les bactéries marines à Gram(-) (Gastineau *et al.*, 2012c; Gastineau *et al.*, 2012a; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Turcotte *et al.*, 2016). Plus spécifiquement, l'action du pigment sur les bactéries du genre *Vibrio* a été démontrée par différentes méthodes. D'abord, en utilisant la méthode de diffusion sur disque de gélose, le pigment bleu produit par *H. ostrearia* et *H. karadagensis* a inhibé le développement des bactéries *V. aestuarianus* et *V. anguillarum* à des concentrations de 1 mg/l et de 100 mg/l respectivement (Gastineau *et al.*, 2012c; Gastineau *et al.*, 2012a). Ultérieurement, l'action de la marennine sur d'autres bactéries du genre *Vibrio* a été testée sous des conditions plus facilement liées aux élevages aquacoles. L'élevage des bivalves étant un secteur important au Québec (Pêches et Océans Canada, 2018), Turcotte et coll. (2016) ont testé sous conditions contrôlées l'effet du pigment dans les bassins d'élevage larvaire de moules et de pétoncles. Ils ont démontré que la marennine extracellulaire, à 0,1 mg/l, joue un rôle de protection des larves (de moules et de pétoncles) contre *V. splendidus*. Les effets observés suggèrent que la marennine induit un effet anti-virulent où la pathogénicité a été inhibée sans que la croissance bactérienne n'ait été affectée (Turcotte *et al.*, 2016). Toutefois, le mécanisme d'action n'a pas été élucidé, bien qu'il soit nécessaire pour valoriser cette molécule pour des applications futures.

En continuité de l'étude de Turcotte et coll. (2016), nous avons utilisé le modèle biologique *V. splendidus* dans cette thèse en étudiant de plus près les interactions marennine-bactéries sur une échelle cellulaire et moléculaire. La première étape était de cibler les effets de la marennine sur les compartiments cellulaires potentiellement impliqués dans la virulence. Ainsi, face aux problématiques de la forte utilisation des antibiotiques en aquaculture intensive (Cabello, 2006), si de telles interactions sont prouvées à l'échelle moléculaire, la

marennine pourrait promettre un potentiel antivirulent naturel moins susceptible aux phénomènes de résistance.

Des informations tirées de la littérature laissent penser que le champ d'action de la marennine pourrait être lié à son interaction avec cette paroi. En effet, la membrane externe des espèces du genre *Vibrio* est extrêmement sélective. Elle ne permet pas le passage de molécules de taille supérieure à 600-700 Daltons (Neidhardt *et al.*, 1994). De ce fait, une grosse molécule comme la marennine (≈ 10 kDa) (Pouvreau *et al.*, 2006b) aurait de faibles chances de passer à l'intérieur de la cellule et de provoquer des perturbations intracellulaires d'une manière directe. D'autant plus, Tardy-Laporte et coll. (2013) ont observé que la marennine n'induit pas d'effet antimicrobien sur *E. coli*, mais qu'elle induit des perturbations de la fluidité membranaire. Dans son étude il a été suggéré que la marennine rend les chaînes phospholipidiques du feuillet externes plus serrées, stimulant l'hypothèse d'une interaction avec les LPS (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Même si la bactérie testée n'était pas une souche marine, cette étude utilisant une bactérie à Gram(-) représente un argument supplémentaire qui suggère une forte possibilité de l'interaction de la marennine au niveau de la paroi cellulaire.

L'hypothèse principale de cette thèse est que la marennine inhibe potentiellement la virulence de *V. splendidus* en interagissant avec les membranes de la paroi cellulaire des bactéries. Plus spécifiquement la marennine aurait des interactions avec les phospholipides membranaires (chaînes acyles et têtes polaires). Ces derniers, retrouvés dans la membrane cytoplasmique ou dans le feuillet externe, représentent la majeure partie de la paroi bactérienne. La paroi cellulaire représente le compartiment le plus révélateur d'une interaction antimicrobienne, peu importe si le processus-cible se situe au niveau de la membrane ou dans le compartiment intercellulaire (Denyer, 1995; Epanand *et al.*, 2016). De ce fait comme première tentative d'étude des mécanismes antimicrobiens, cette thèse porte sur les lipides de structure entourant la cellule et qui représentent le premier niveau d'interaction avec les molécules du milieu extérieur (Denyer, 1995; Marcotte et Booth, 2014). Nous avons soulevé deux questions majeures. Est-ce que les interactions avec les

lipides membranaires sont impliquées dans les mécanismes antimicrobiens de la marennine? Sur quels niveaux ces interactions s'effectueront-elle et comment? Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé la RMN de l'état solide tout au long de la thèse. Il s'agit d'une technique non destructive qui permet de caractériser les structures et la dynamique membranaire. Elle permet également d'étudier les interactions à l'échelle moléculaire sans nécessairement connaître la structure chimique de la molécule à étudier, ce qui est la problématique de la marennine.

➤ ***Objectifs de recherche***

Ce projet a pour objectif d'étudier les interactions entre la marennine extracellulaire et les lipides membranaires de *V. splendidus* par RMN de l'état solide (ÉS) pour exploiter l'ampleur du potentiel d'action antibactérienne/antivirulente du pigment.

Nous nous sommes focalisés, dans cette thèse, à répondre à deux principaux objectifs spécifiques basées sur l'utilisation de deux systèmes membranaires différents :

- 1) Scruter les interactions de la marennine sur les chaînes acyles des phospholipides membranaires par l'étude de cellules entières (RMN *in vivo*), ce qui tient compte de l'intégrité cellulaire.
- 2) Étudier l'action de la marennine sur les têtes polaires des phospholipides à travers l'utilisation de membranes modèles comme des unités de structures lipidiques représentatives de la membrane de *V. splendidus*.

Pour répondre à ces objectifs, ce mémoire se divise en quatre chapitres : un chapitre qui décrit les aspects théoriques des méthodes utilisées tout au long de la thèse (chapitre 2), ainsi que trois chapitres expérimentaux, présentés sous forme d'articles scientifiques. Le premier chapitre expérimental a été publié dans *BBA-Biomembranes* et les deux autres seront soumis prochainement.

Plus spécifiquement, au chapitre 3 pour étudier les chaînes acyles des phospholipides, la RMN du deutérium permet de réaliser des analyses *in vivo*. Cependant, la technique

nécessite la mise au point de méthodes qui permettent de marquer isotopiquement et spécifiquement les membranes. La RMN-ÉS *in vivo* étant une méthode relativement récente, elle n'a jamais été utilisée sur les bactéries marines. Le marquage isotopique est une étape essentielle avant de cibler les mécanismes avec les molécules exogènes. Dans ce chapitre, nous avons caractérisé par RMN-²H, la membrane de *V. splendidus* tout en optimisant le marquage isotopique pour limiter d'éventuels stress dus à la manipulation avant de réaliser les études de l'interaction avec la marennine.

Le chapitre 4 étudie les effets de la marennine sur les chaînes acyles marquées au deutérium après optimisation réalisée dans le chapitre 1. Nous avons testé les effets de la marennine à de faibles et fortes concentrations. Nous avons également utilisé un contrôle positif, soit l'agent antimicrobien polymyxine B, connu pour interagir avec les LPS des bactéries à Gram(-). Cette étude nous a permis de discuter des mécanismes d'action de la marennine par rapport à ceux de la polymyxine.

Enfin, au chapitre 5, pour étudier l'interaction de la marennine avec les têtes polaires, la RMN-ÉS du phosphore *in vivo* est problématique. La forte abondance des noyaux du phosphore dans la cellule (ADN, protéines, ATP, liposomes intracellulaires, etc.) ne permet pas d'étudier spécifiquement la membrane et d'obtenir des spectres résolus et analysables. Dans ce chapitre, nous avons donc utilisé les membranes modèles construites uniquement de lipides, selon la composition originale de *V. splendidus*. Cette méthode complémentaire à la RMN *in vivo* nous a permis d'élaborer spécifiquement l'interaction entre la marennine et les têtes polaires lipidiques.

CHAPITRE 2

ASPECTS THÉORIQUES & MÉTHODES UTILISÉES

Ce chapitre décrit les principes théoriques des méthodes utilisées et dont plusieurs notions ont été extraites du cours de « Méthodes d'analyses de spectroscopies avancées » suivi en 2015 dans le cadre du cours « Nouveau Développement en Océanographie » (Marcotte, 2016). Il s'agit d'un cours étoffé sur la résonance magnétique nucléaire, étant la principale technique utilisée dans cette thèse.

1. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

1.1. Concepts théoriques

1.1.1. Présentation générale

La spectroscopie désigne l'étude des interactions entre la matière et différent type de rayonnements. Le type de spectroscopie est défini selon le domaine de longueur d'onde dans les régions du spectre électromagnétique. La résonance magnétique nucléaire fait partie des méthodes spectroscopiques et elle opère dans le domaine des fréquences radio (4 à 1000 MHz). La RMN est une méthode basée sur la mesure de l'absorption d'ondes par les noyaux des atomes, lorsque placés dans un champ magnétique fort (B_0) (Figure 21). Cela permet aux noyaux d'être amenés à un état énergétique supérieur par absorption d'un rayonnement (Skoog *et al.*, 2003).

Plus spécifiquement, la RMN exploite les propriétés du spin nucléaire. De ce fait, seuls certains isotopes peuvent être exploités en RMN étant donné que la condition nécessite que l'isotope possède un spin non nul. Le spin d'un noyau donné interagit avec les champs magnétiques des noyaux avoisinants au sein d'une même molécule ou avec les champs magnétiques externes, tels que celui émis par la bobine d'un instrument (Levitt, 2001). Il existe une corrélation directe entre la réponse du spin du noyau, selon son environnement moléculaire et la structure de la molécule, ce qui permet de déduire des informations

directes et précises sur la conformation et la dynamique, sans avoir recours à des méthodes destructives (Marcotte, 2016).

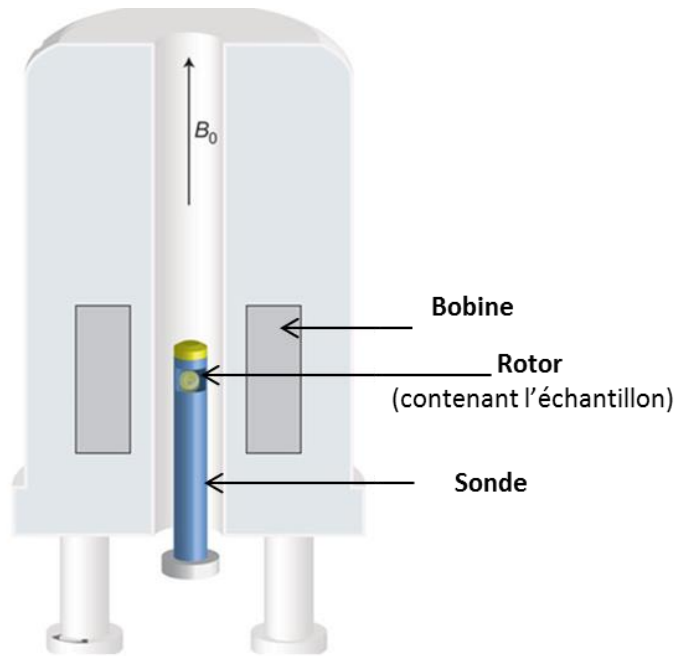


Figure 21 **Représentation simplifiée de l'instrumentation utilisée en résonance magnétique nucléaire** (Polenova, 2011)

D'autres facteurs sont également pris en compte quant au choix de l'atome à analyser par RMN. Par exemple, le rapport gyromagnétique (γ), qui est une valeur caractéristique pour chaque type de noyau, reflète directement la sensibilité de ce noyau au champ magnétique (plus le rapport est fort, plus le signal est important). Il s'agit d'un rapport qui tient compte de deux propriétés du spin du noyau en question, notamment, le moment angulaire et le moment magnétique : le moment angulaire (I) du spin définit un vecteur qui permet d'orienter le spin, lorsque placé dans un champ magnétique (figure-22-a). Le moment magnétique (μ) est aussi un vecteur d'orientation qui se superpose sur le moment angulaire, mais qui prend en compte les charges des particules (négatives ou positives) ; il définit le caractère de « petit aimant » (Figure-22-b). Le rapport gyromagnétique (γ) exprimé en $10^{-7} \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$, et est calculé selon l'équation-1, où h est la constante de Planck ($\hbar = h / 2\pi$) (Marcotte, 2016).

Équation 1 :
$$\gamma = \hbar \cdot \frac{\vec{\mu}}{I}$$

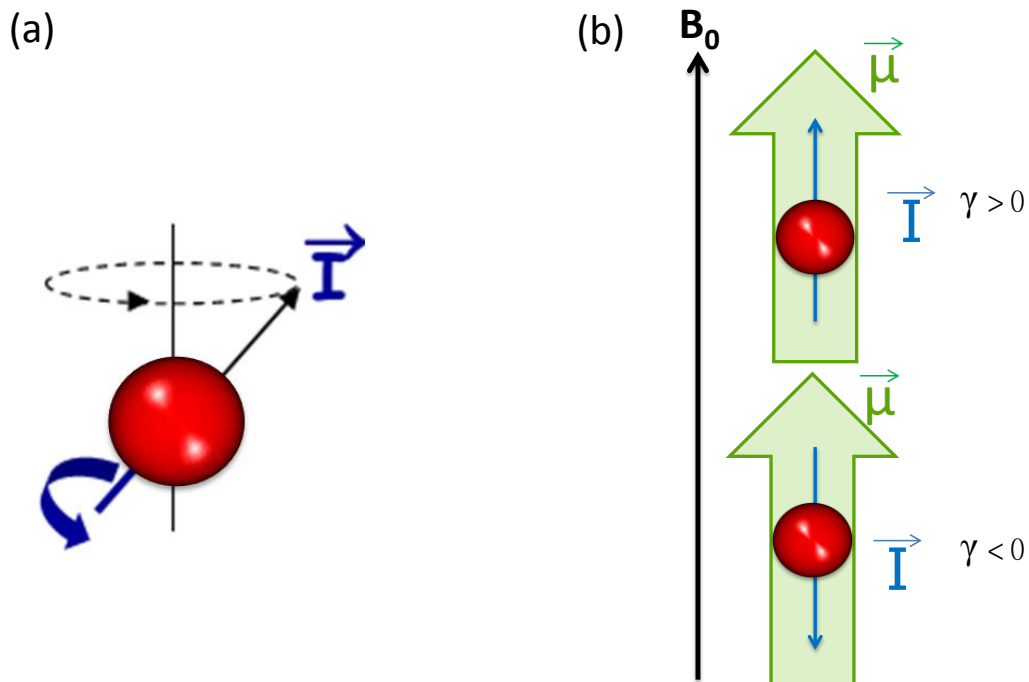


Figure 22 : Propriétés du spin d'un noyau (a) : Spin qui précesse autour d'un axe défini, selon son moment angulaire I . (b) : orientation du spin dans un champ magnétique selon son moment magnétique μ .

Finalement, l'abondance naturelle du noyau est également à prendre en considération dans les analyses de RMN, particulièrement dans les études des systèmes biologiques (Tableau 4). Alors que certains noyaux comme le phosphore présentent une abondance naturelle élevée (de 100%) et ont un spin de $\frac{1}{2}$, d'autres noyaux comme le ^{12}C sont très abondants dans la nature, mais ne possèdent pas de spin. Ils sont généralement remplacés par leurs isotopes ayant un spin nucléaire, mais qui ne présentent pas d'abondance naturelle suffisamment importante pour donner un signal spectroscopique. Comme le ^{13}C et le ^2H , ont des abondances naturelles faibles, pour pouvoir les étudier, un marquage isotopique est généralement requis (Seelig, 1977; Bax et Grzesiek, 1993; Szyperski, 1995).

Tableau 4 : Propriétés des isotopes les plus utilisés en RMN des systèmes biologiques (Marcotte, 2016).

Isotope	Nombre quantique de spin (I)	Fréquence de Larmor à 14.1 T MHz	Abondance naturelle	γ (10^{-7} rad T ⁻¹ s ⁻¹)
¹ H	½	600	99,98 %	26,75
² H	1	92	0,015 %	4,11
¹² C	0	-	99,99 %	-
¹³ C	½	151	1,1 %	6,73
¹⁴ N	1	43	99,6 %	1,93
¹⁵ N	½	61	0,4 %	-2,71
³¹ P	½	243	100 %	10,84

Note : Exception du ¹²C indiqué comme exemple d'isotope abondant, mais non exploités en RMN

1.1.2. Condition de résonance : effet Zeeman

Lorsqu'un spin est soumis à un champ magnétique externe (B_0) (Figure 23), il se crée une énergie magnétique en réponse à l'interaction entre le moment magnétique du spin et l'énergie magnétique du champ appliqué B (Levitt, 2001; Marcotte, 2016). Ces conditions aboutissent à une séparation des niveaux d'énergie de spin, un phénomène connu sous le nom de l' « effet Zeeman » (Levitt, 2001; Marcotte, 2016).

$$\text{Équation 2 : } E = -\mu \cdot B = -\gamma \cdot I \cdot B$$

Le spin devient animé par un mouvement de précession autour de l'axe de la direction du champ magnétique, dont la fréquence ω dépend du rapport gyromagnétique et du B.

$$\text{Équation 3 : } \omega = \gamma \cdot B \text{ (rad.s}^{-1}\text{)}$$

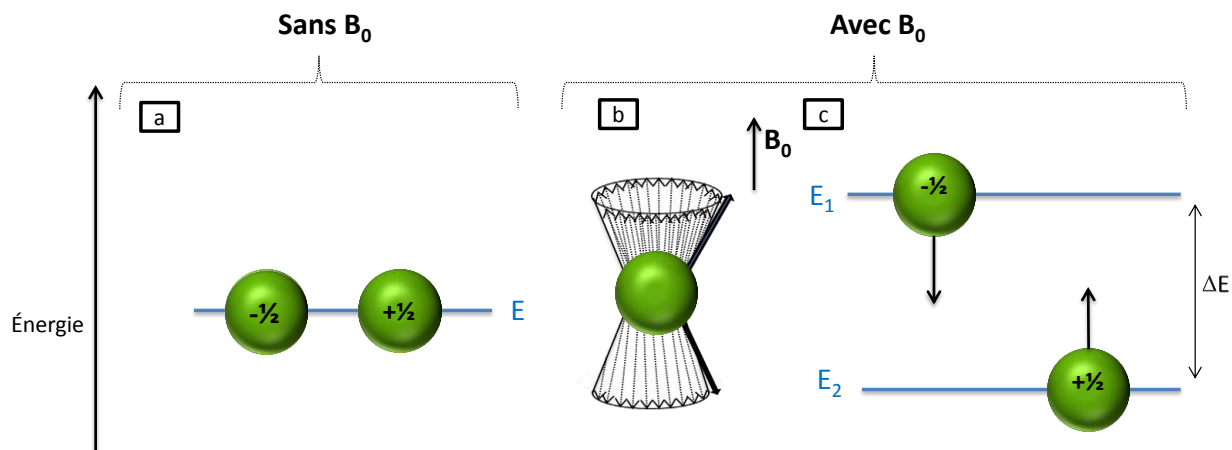


Figure 23 : Niveaux d'énergie d'un noyau de spin $\frac{1}{2}$ (a) en absence de champ magnétique, (b) mouvement de précession du spin, et (c) séparation des niveaux d'énergie en présence du champ magnétique (effet Zeeman)

La fréquence de résonance représente alors la différence d'énergie entre les différents états de spins. Pour induire des transitions d'une manière sélective, il faut appliquer un champ de radiofréquence ayant une énergie équivalente à celle de la transition en question : c'est la condition de résonance décrite dans les équations 4 et 5 (Marcotte, 2016).

Équation 4 : $\Delta E = h \cdot \nu$

Équation 5 : $\nu = \gamma \cdot B / 2\pi$ (Hz)

où (ν) est la fréquence de Larmor. La radiation magnétique, est donc spécifique à chaque noyau pour un champ magnétique (B) donné, puisqu'elle est directement liée à son rapport gyromagnétique.

1.1.3. Principaux types d'interactions

Un noyau dans un spectromètre de RMN perçoit le champ magnétique d'une manière hétérogène. Cela est dû, entre autres, aux inhomogénéités naturelles induites par la présence des électrons, ainsi que par la présence d'autres noyaux dans son environnement moléculaire. Ainsi, l'apparence d'un spectre RMN reflète différents types d'interactions possibles.

(i) *Déplacement chimique*

Un noyau avec un ratio gyromagnétique donné, ne perçoit pas l'intensité exacte du champ magnétique (B_0) dans lequel il se retrouve. Le déplacement chimique trouve son origine dans les champs magnétiques secondaires créés par le mouvement des électrons qui entourent le noyau, dans les liaisons chimiques. À l'application d'un champ magnétique fort (B_0), les électrons s'opposent à ce champ, car ils ont tendance à effectuer des mouvements dans le plan perpendiculaire à B_0 , c'est l'effet du blindage (Skoog *et al.*, 2003). Ainsi, le champ magnétique ressenti par le noyau (B_{effectif}), est légèrement inférieur à B_0 car celui-ci est blindé par son environnement électronique local (Levitt, 2001; Marcotte, 2016)

$$\text{Équation 6 : } B_{\text{effectif}} = (B_0 - B') = B_0 (1 - \sigma)$$

où σ définit la constante de proportionnalité (constante de blindage) entre le champ magnétique externe et celui ressenti par le noyau.

Le déplacement chimique (δ) reflète la modification du signal d'un isotope dans un champ magnétique B_0 , selon la nature et la structure des atomes voisins. Il est défini comme la différence entre la fréquence d'un noyau donné (ν) et une fréquence de référence (ν_{ref}), comme celle du Tétraméthylsilane (TMS) (Marcotte, 2016).

$$\text{Équation 7 : } (\delta) = 10^6 (\nu - \nu_{\text{ref}}) / \nu_{\text{ref}}$$

Le déplacement chimique exprimé par ppm (parties par million), donne donc des informations sur la structure des molécules.

(ii) Couplage scalaire

Le couplage scalaire ou couplage spin-spin ou couplage- J est l'ensemble des interactions magnétiques entre les spins des noyaux différents. Il s'agit d'une interaction, qui s'effectue à travers les électrons de la liaison chimique. Ce type de couplage informe sur le nombre de liaisons, le nombre d'atomes voisins et la conformation spatiale (Levitt, 2001; Marcotte, 2016). Par exemple la constante de couplage J^3 , renseigne sur la structure de la molécule, de configuration *trans* ou *cis* ou si un acide aminé est dans une

conformation feuillet bêta ou hélice alpha. Le nombre de liaisons maximal perçu par ce couplage est de trois (J^3).

(iii) *Couplage dipolaire*

Le couplage dipolaire implique des interactions directes entre deux noyaux à travers l'espace. Le couplage dipolaire est dû au fait que le moment magnétique d'un noyau de spin non nul influence localement un noyau voisin, perturbant le champ magnétique ressenti par ce noyau (Levitt, 2001; Marcotte, 2016).

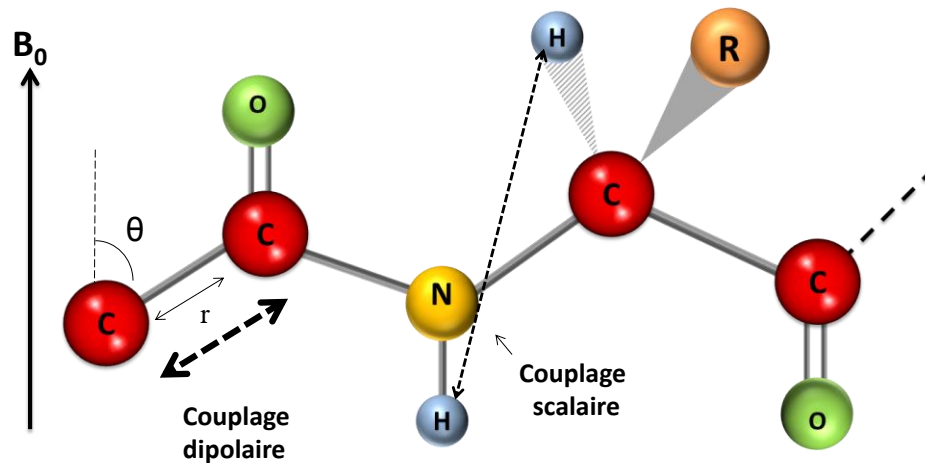


Figure 24 : Représentation schématique du couplage scalaire (entre deux spins d'atome d'hydrogène) et de couplage dipolaire (entre deux spins d'atome de carbone) dans une molécule organique. La flèche du couplage dipolaire plus épaisse indique un effet plus fort du couplage par rapport au couplage scalaire.

L'énergie du couplage est dépendante de la distance (r) entre les deux noyaux (Figure 24). Plus les noyaux sont proches, plus le couplage est fort. Elle dépend également de leur position relative (l'angle θ dans le schéma). La constante du couplage dipolaire D_{AX} (en Hz) entre un noyau A et un noyau X, est défini par l'équation 8 (Marcotte, 2016).

$$\text{Équation 8 : } D_{AX} = (\mu_0/4\pi) (\mu_1 \cdot \mu_2/r^3) \cdot (3\cos^2\theta - 1)$$

où μ_1 et μ_2 sont les moments magnétiques du noyau 1 et 2 respectivement.

L'énergie du couplage est maximale lorsque l'angle qui forme la position relative entre les noyaux et le champ magnétique B_0 forment un angle (θ) nul. Pour un angle particulier, celui de $\theta = 54,7^\circ$, l'énergie de couplage est nulle. Cet angle particulier définit l'« angle magique », qui ne permet pas de visualiser l'effet du couplage dipolaire sur les spectres des molécules à l'état liquide et solide, ainsi que par les molécules en mouvements rapides. En effet, à l'échelle de la RMN, les mouvements rapides et aléatoires de θ , dits « isotropes », permettent d'annuler le couplage dipolaire en ayant un effet de moyenne. Pour les systèmes anisotropes comme les solides, le couplage dipolaire permet de fournir des informations sur l'orientation de la molécule (Levitt, 2001; Marcotte, 2016).

(iv) Couplage quadripolaire

Les interactions quadripolaires sont spécifiques aux noyaux quadripolaires, c'est-à-dire ceux qui possèdent des spins $> \frac{1}{2}$, comme le ^2H et le ^{14}N (Tableau 4). Ces atomes présentent une distribution non uniforme des charges autour du noyau. Le deutérium, par exemple (spin = 1), présente trois états de spins: -1, 0 et +1 et deux transitions : ($0 \rightarrow -1$) et de ($0 \rightarrow +1$) (Seelig, 1977). L'interaction quadripolaire affecte l'énergie des états de spins de telle sorte que les pics sont dédoublés sur le spectre. Cela se schématise théoriquement par un spectre symétrique comme dans la figure 25. L'espace séparant les deux pics est appelé « écart quadripolaire » ou $\Delta\nu_Q$, qui dépend de l'orientation du noyau par rapport à la bicouche (θ), et est défini par :

Équation 9 :
$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \cdot A_Q \cdot (3\cos^2\theta - 1) / 2$$

où A_Q est la constante de couplage quadripolaire.

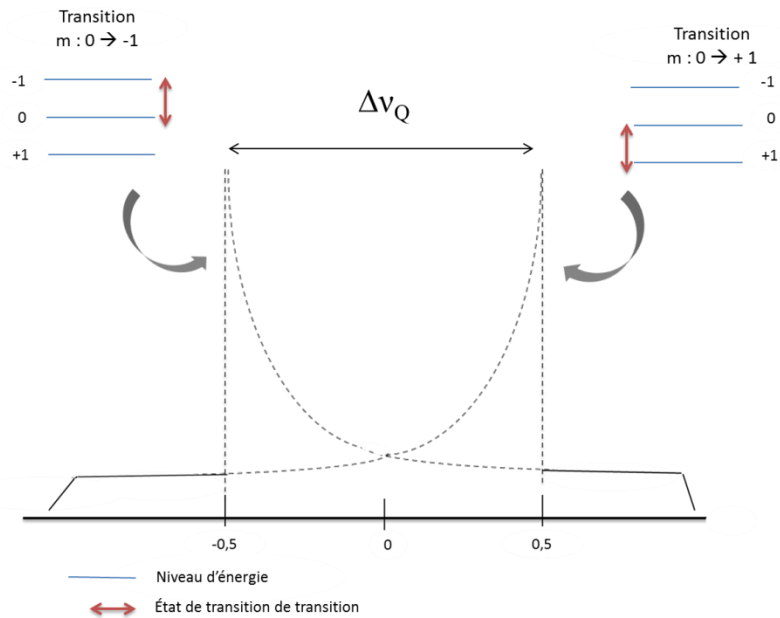


Figure 25 : Spectre théorique des noyaux de ^2H et états de transitions de spin. Les lignes interrompues représentent la contribution individuelle de chaque transition. Les lignes continues indiquent la somme des deux composantes (adaptée de Seelig, 1977)

L'écart quadripolaire constitue une source d'information importante par l'étude de la dynamique des membranes, par exemple, plus l'écart est petit, plus le mouvement moléculaire est fluide et inversement (Seelig, 1977; Marcotte et Booth, 2014). L'application de la RMN du deutérium (^2H) sur les membranes est décrite davantage dans la section 1.2.3. de ce chapitre.

1.1.4. Transformée de Fourier

La transformée de Fourier est une fonction mathématique qui permet de transformer la réponse des noyaux dans le champ magnétique (Intensité en fonction du temps) en spectre (intensité en fonction de la fréquence). Une impulsion en RMN représente une excitation d'une courte durée qui couvre plusieurs fréquences d'excitation des noyaux (Marcotte, 2016). Le signal émis par chaque noyau diminue en fonction du temps comme pour les ondes sonores émises par une cloche (Figure 26). C'est le signal de précession libre ou appelé FID (*Free Induction Decay*). La transformée de Fourier permet de décoder ces

fréquences superposées, en convertissant le signal du domaine « temps » (en s) au domaine « fréquence » (s^{-1} ou Hz). Cela permet de séparer les différentes fréquences et d'obtenir des pics séparés dans un spectre (Skoog *et al.*, 2003; Marcotte, 2016).

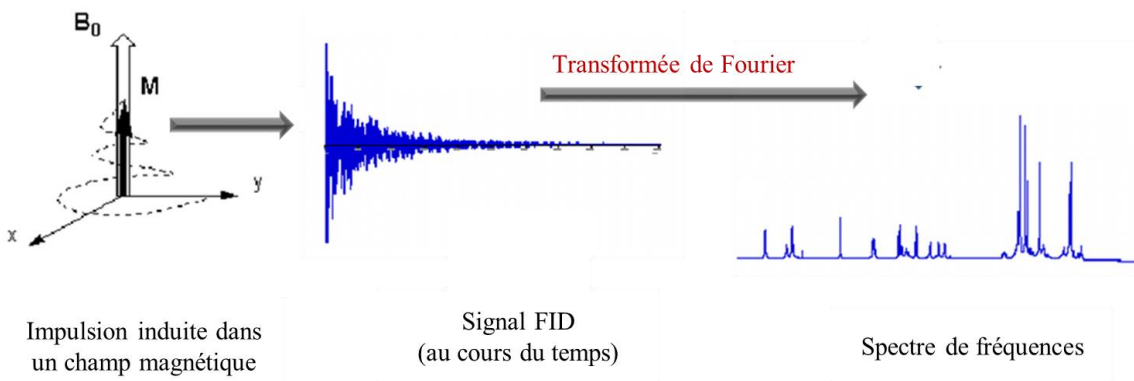


Figure 26 : Étapes de traitement du signal FID par transformée de Fourier (Aljohani, 2016)

1.1.5. RMN de l'état solide versus RMN en solution

Ce qui détermine la différence entre la RMN en solution et la RMN de l'état solide (RMN-ÉS), c'est le mouvement des molécules à l'échelle de la RMN. La RMN en solution exploite les molécules qui se réorientent rapidement dans les solvants organiques ou dans l'eau, alors que la RMN-ÉS solide permet d'étudier les mouvements lents des molécules à l'échelle de la RMN, comme les polymères, les poudres, et les gels (Warschawski *et al.*, 2011; Marcotte, 2016). Dans le cas des lipides membranaires, par exemple, les échantillons sont assez hydratés pour adopter les structures les plus représentatives des conditions physiologiques, mais leur viscosité demande de les analyser par RMN-ÉS (Arnold *communication personnelle*).

Plus spécifiquement pour les échantillons de bactéries, un modèle utilisé dans les chapitres 3 et 4 de cette thèse, Ces échantillons sont généralement analysés sous forme de culots visqueux concentrés en cellules hydratées. La RMN en solution a été utilisée, ponctuellement au chapitre 4, pour déterminer la composition lipidique des membranes de

la bactérie *V. splendidus*. Les lipides ont alors été extraits et dissouts dans un solvant organique pour être analysés en solution.

Sur le plan analytique, la différence entre les deux types d'applications de la RMN, trouve son origine dans les différentes interactions moléculaires impliquées. Par exemple, la RMN de l'état solide prend compte de toutes les interactions ressenties par le noyau en question, soit, l'effet Zeeman, l'anisotropie de déplacement chimique, le couplage scalaire, le couplage dipolaire et l'interaction quadripolaire. Pour le cas de la RMN à l'état liquide, les couplages dipolaires et les interactions quadripolaires ne sont pas pris en compte puisqu'ils sont moyennés. Pour exploiter ces interactions en RMN en solution il faut utiliser des expériences spéciales (Marcotte, 2016).

Le terme « anisotropie de déplacement chimique » nécessite une attention particulière pour comprendre davantage, la différence entre les RMN-ÉS et RMN en solution. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les mouvements des électrons sous l'effet du champ magnétique principal créent l'effet de blindage ressenti par les noyaux. Le blindage est relié à la densité d'électrons autour du noyau, qui est différente selon les liaisons chimiques. La fréquence de résonance, est influencée par l'orientation du nuage électronique, donc celle de la molécule, ce qui crée l'effet de l'anisotropie de déplacement chimique notée par (δ) (Skoog *et al.*, 2003). Lorsque les mouvements sont rapides, comme pour les molécules en solution, les mouvements sont moyennés (le noyau perçoit un blindage moyen) et le déplacement chimique est dit « isotrope ». À l'opposé, lorsque les mouvements sont lents, comme le cas pour les molécules de l'état solide, l'effet d'orientation sur le déplacement chimique est alors visible sur le spectre (Marcotte, 2016). Dans ce dernier cas, l'anisotropie de déplacement chimique (CSA, *chemical shift anisotropy*) donne des pics larges, ou appelés « spectres de poudre », qui représentent une distribution de toutes les orientations possibles (Figure 27). Même si le CSA est aussi présent dans la RMN en solution, il est très exploité en RMN-ÉS étant donné qu'il donne des raies de spectres larges, qui informent sur la structure et la dynamique moléculaire, par exemple le cas des membranes (Seelig, 1977; Seelig, 1978; Levitt, 2001; Marcotte, 2016).

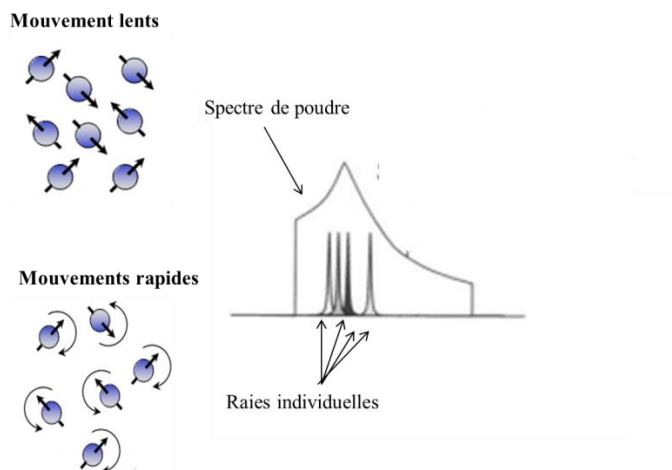


Figure 27 : Différences spectrales entre les molécules à mouvements lents, et celles à mouvements rapides à l'échelle de la RMN, donnant respectivement des spectres larges et des raies individuelles (Marcotte, 2016)

1.2. Application de la RMN de l'état solide pour l'étude des membranes

La RMN-ÉS a été utilisée pour caractériser les propriétés membranaires de la paroi de *V. splendidus* tout comme pour étudier les interactions avec la marennine. Deux noyaux ont été exploités : le deutérium (chapitres 3 et 4) et le phosphore (chapitre 5). Ici nous détaillons les informations qu'apporte chaque type d'expérience appliquée sur les membranes, mais nous présentons tout d'abord la séquence d'acquisition qui est semblable pour les deux expériences, avec des différences au niveau des techniques d'amélioration du signal.

1.2.1. Séquences d'acquisitions et techniques d'optimisation

(i) Écho de Hahn

La technique de l'écho de Hahn est la base des séquences utilisées pour l'acquisition des spectres des membranes tant pour la RMN du phosphore que pour la RMN du deutérium. La séquence originale a été découverte par Erwin Hahn en 1950, et consiste à utiliser une séquence d'impulsion de 90° (Hahn, 1950), pour être améliorée plus tard par Carr et Purcell (1954). Utiliser une séquence avec une deuxième impulsion de 180° est essentielle pour la RMN-ÉS, puisqu'elle permet de récupérer les informations au début du

FID, qui décroît très rapidement en RMN-ÉS, des points de grande intensité. Le pulse de 180° permet de refocaliser les signaux de chaque noyau (vecteur de magnétisation dans la figure 28) pour avoir le maximum de signal.

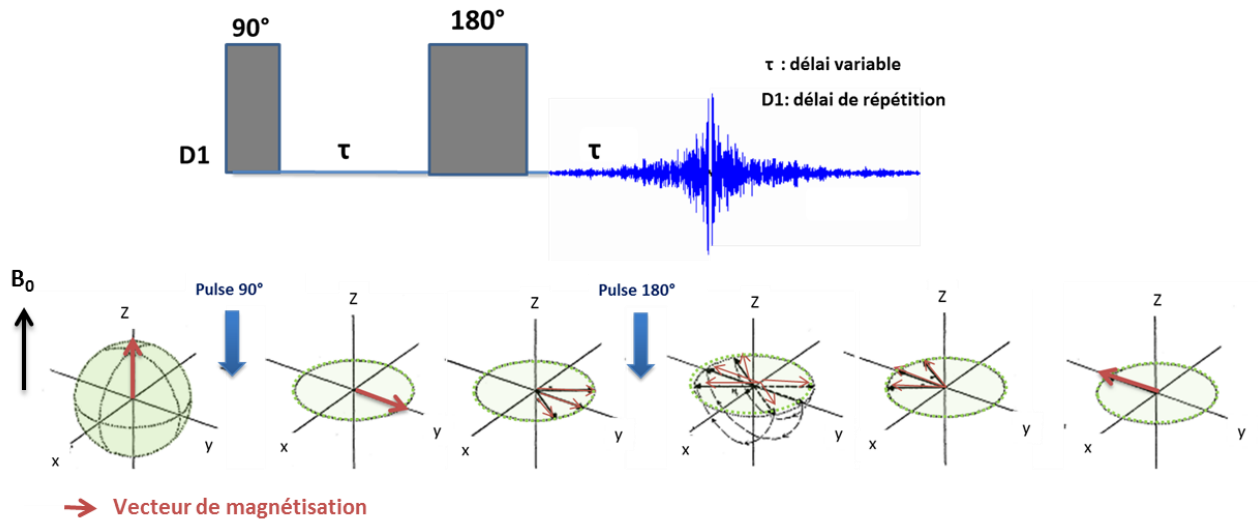


Figure 28 : Séquence d'impulsion de l'écho de Hahn expliquée avec le vecteur de magnétisation selon les pulses appliqués (Carr et Purcell, 1954).

Pour améliorer la résolution et la sensibilité des spectres de RMN-ÉS, d'autres techniques sont également utilisées selon l'application. Dans cette thèse, nous avons utilisé le découplage des protons pour les expériences de RMN du phosphore et de la rotation à l'angle magique (MAS) pour les expériences en deutérium.

(ii) Découplage en proton

Le noyau du phosphore-31 présente des interactions avec les noyaux du ^1H qui sont présents partout dans les molécules organiques. Il faut alors éliminer cet effet de couplage qui conduit à des raies larges, en découplant, c'est-à-dire en appliquant en même temps que l'acquisition du signal, une impulsion de radio fréquence à haute fréquence (Figure 29). Cela permet de désactiver magnétiquement l'effet des protons et d'obtenir des spectres plus résolus (Marcotte, 2016). La séquence devient alors comme suit :

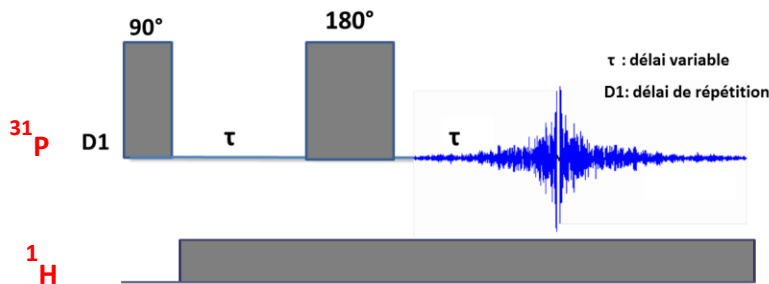


Figure 29 : Écho de Hahn avec découplage en proton : Séquence utilisée pour les expériences de RMN du phosphore

Le découplage en proton n'a pas été utilisé pour les expériences en deutérium, puisqu'on estime que les noyaux du ^1H sont majoritairement remplacés par les noyaux du ^2H . D'autant plus, des expériences préliminaires ont démontré que le découplage en proton en RMN du deutérium n'a pas montré d'amélioration significative des spectres.

(iii) Rotation à l'angle magique (MAS)

La MAS (*Magic angle spinning*), utilisée en RMN du deutérium, est une technique qui permet d'augmenter la résolution lorsque les spectres sont dominés par l'anisotropie de déplacement chimique (ADC), les couplages dipolaires et quadripolaires (Andrew *et al.*, 1958; Andrew *et al.*, 1959; Lowe, 1959; Andrew *et al.*, 1969; Herzfeld *et al.*, 1980). Le terme $(3 \cos^2\theta - 1)$ retrouvé dans les équations mathématiques qui gouvernent les couplages et l'ADC (voir équation 8 et équation 9), s'annule à un angle particulier par rapport au champ magnétique, 54.7° , ce qui correspond à l'angle magique. Le fait de tourner l'échantillon à une vitesse donnée et à cet angle précis permet d'éliminer les contributions angulaires et de réduire les largeurs des spectres, devenant ainsi plus résolus et plus informatifs (Andrew *et al.*, 1959; Andrew *et al.*, 1969). Les pics générés par ce genre d'expérience sont appelés « bandes de rotation » (Figure 30).

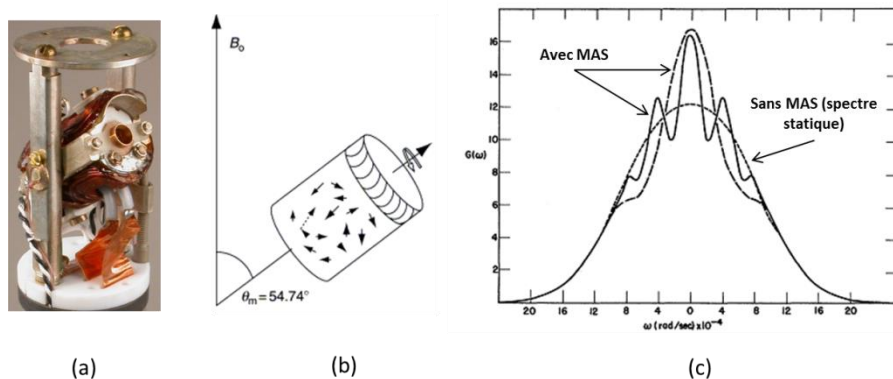


Figure 30 : Description de la rotation à l'angle magique (MAS)(a) : Photo d'une sonde RMN pour un rotor de 4 mm (Lindon *et al.*, 2009). (b) Orientation de l'échantillon à l'angle magique contenant l'échantillon « solide » avec différentes orientations moléculaires indiquées par des flèches (Power, 2011), (c) : Exemple de spectre d'un échantillon d'une poudre analysé en mode statique (sans MAS) et à deux fréquences de rotation MAS, montrant plus de pics résolus (Lowe, 1959).

La MAS a connu un grand succès dans les études des molécules solides hétérogènes et complexes des systèmes biologiques y compris les membranes cellulaires (Herzfeld *et al.*, 1980; Lindon *et al.*, 2009; Power, 2011). Dans notre cas, la MAS a été appliquée sur les expériences des membranes intactes, en utilisant deutérium. D'ailleurs, la MAS a été initialement caractérisée pour les noyaux dont les spins sont supérieurs à $\frac{1}{2}$, tout comme le deutérium (Lindon *et al.*, 2009). Les théories d'application de la MAS aux membranes seront détaillées plus loin.

1.2.2. RMN du phosphore pour les membranes

Le phosphore-31 est un isotope qui permet d'étudier les têtes polaires des phospholipides (Figure 31). Il est très utilisé en études membranaires puisqu'il présente l'avantage d'avoir à la fois une forte abondance naturelle (100%) et une forte sensibilité (rapport gyromagnétique élevé tel que montré dans le tableau 4 (Seelig, 1978; Marcotte, 2016)).

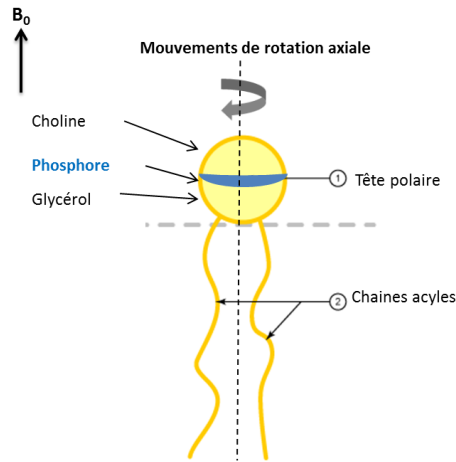


Figure 31 : Schéma simplifié d'un phospholipide : principaux constituants et mouvements de rotation axiale dans le champ magnétique

Le déplacement chimique du phosphore dépend de l'orientation des phospholipides dans le B_0 . Comme expliqué précédemment, un spectre de poudre est généré selon les différentes distributions de fréquences pour chaque orientation possible (Figure 32). Or, les phospholipides dans une bicouche adoptent un mouvement de rotation à symétrie axiale autour de l'axe du lipide. Cela fait en sorte que deux des trois constituants sont équivalents. Les résultats représentatifs d'une couche phospholipidique typique en phase fluide cristalline sont un spectre à deux épaules spectrales séparées par le CSA. À δ_{\perp} le lipide est perpendiculaire à B_0 , et à δ_{\parallel} le il y est parallèle, et entre les deux, des δ varient selon l'orientation (Seelig, 1978).

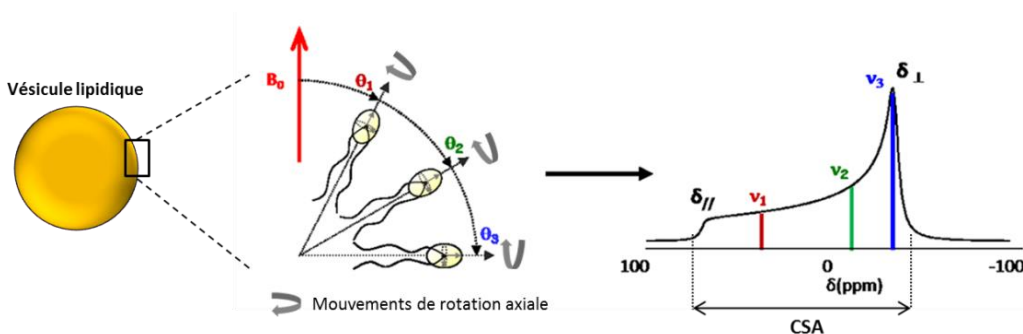


Figure 32 : Mouvements et orientations des phospholipides d'une membrane lipidique et spectre RMN- ^{31}P correspondant (Marcotte, 2016)

Ainsi, la RMN du ^{31}P représente une technique puissante qui offre l'avantage d'étudier les phospholipides. Elle permet d'étudier non seulement les orientations et les mouvements dynamiques des lipides (Seelig, 1978; Marcotte *et al.*, 2003; Marcotte et Auger, 2005; Robert *et al.*, 2015), ce qui permet de déduire la fluidité et le polymorphisme lipidique à partir des spectres de ^{31}P des membranes lipidiques (Cullis et Kruijff, 1979).

(i) *Quantification de la fluidité membranaire*

Le degré de la fluidité membranaire est directement corrélé avec l'anisotropie de déplacement chimique (CSA). Schématiquement, la largeur du spectre représente le SCA (Figure 32). Par exemple, plus l'écart ou le CSA est fort, ce qui correspond à un spectre large, plus la membrane est rigide. Lorsque la largeur du spectre est très étroite, donnant un pic isotopique, la membrane est très fluide (Seelig, 1978).

(ii) *Formes et déformations des membranes*

L'effet coopératif des lipides de structure permettent aux membranes de s'aligner spontanément en certaines orientations spécifiques lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique fort. Cela est dû à la susceptibilité magnétique anisotrope, une propriété des chaînes acyles et des groupements esters des phospholipides lorsque soumis au champ magnétique B_0 (Speyer *et al.*, 1987; Picard *et al.*, 1999; Marcotte *et al.*, 2006). Par exemple, les lipides peuvent s'orienter avec l'axe longitudinal perpendiculaire ou parallèle à B_0 , ce qui donne plusieurs formes membranaires (Figure 34).

Plus spécifiquement, dans un champ magnétique, les membranes, notamment les vésicules, peuvent avoir plusieurs formes : sphériques ou allongées (ellipsoïdales). Une vésicule élastique peut se déformer selon la viscosité de la membrane (Picard *et al.*, 1999). Dans certaines conditions, ces déformations sont favorisées ou inhibées, ce qui est le cas pour l'effet de la température (Pott et Dufourc, 1995) ou celui de la présence des molécules exogènes (Picard *et al.*, 1999). Une ellipsoïde est définie par ses deux semi-axes a et c (Figure 33). Elle est nommée « prolate » lorsque le semi-axe « c » est plus grand que celui de « a », et est nommée « oblate » lorsque le semi-axe « a » est le plus grand. Cela est

quantitativement évalué par des simulations et le calcul du rapport de ces deux axes (Figure 33). Les spectres RMN reflètent ces formes car dépendent de la distribution angulaire $P(\beta)$, où β définit l'angle entre l'axe de la moyenne des mouvements et le champ magnétique (Picard *et al.*, 1999).

$$\text{Équation 10 : } P(\beta) = 2\pi c^2 \sin\beta / [\sin^2\beta + r^2\cos^2\beta]^2$$

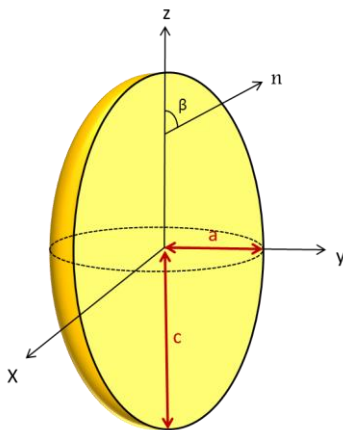


Figure 33: Représentation géométrique d'un ellipsoïde (adaptée de Picard *et al.*, 1999)

Les formes des membranes reflètent alors l'orientation des phospholipides dans un champ magnétique qui se verra donc sur le spectre de RMN-ES du ^{31}P . Cela est déterminé selon les positions extrêmes des fréquences de résonance. Par exemple pour le cas des ellipsoïdes prolates, la position extrême des fréquences, qui correspond à l'épaule la plus intense du spectre, indique que la plupart des lipides sont orientés à 90° , tandis que la position extrême à l'opposé du spectre représente les orientations parallèles au champ magnétique (Figure 34). Les fréquences entre les deux pics extrêmes sur les spectres représentent les combinaisons d'orientations intermédiaires (Figure 32) (Pott et Dufourc, 1995; Picard *et al.*, 1999).

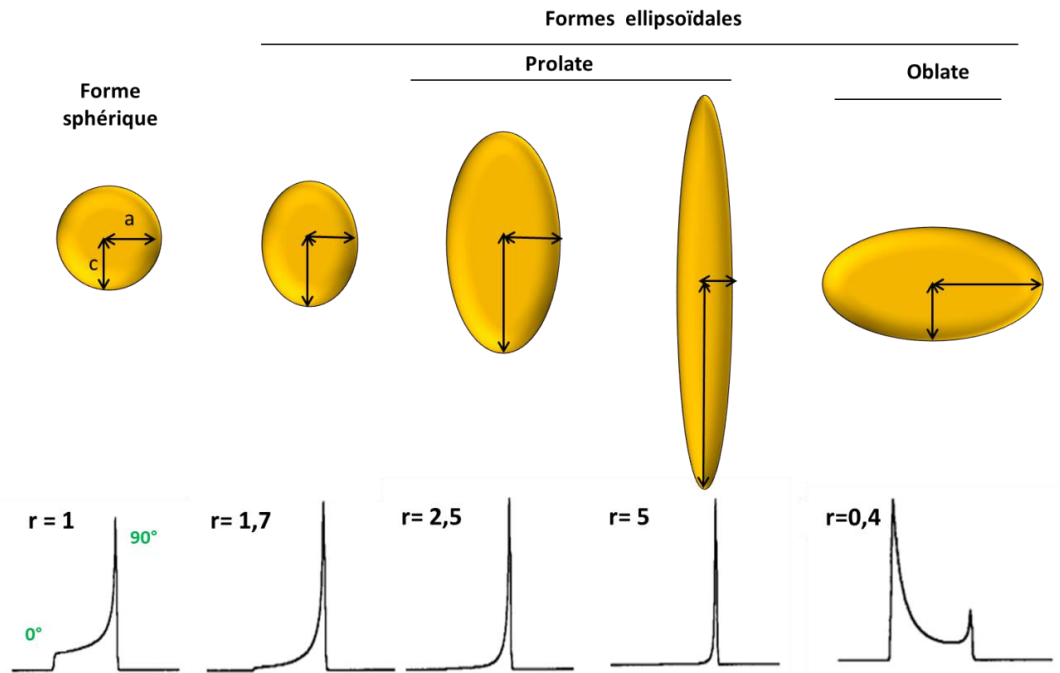


Figure 34 : Variation géométrique des membranes dans les spectres de RMN-ÉS du phosphore, selon la déformation des vésicules lipidiques. (r) définit le rapport des demi-axes c/a (adaptée de Pott et Dufourc (1995) et de Picard *et al.*, (1999))

(iii) Polymorphisme

Les études portées sur le polymorphisme des membranes biologiques ou des membranes modèles se sont accrues grâce à l'apparition de la RMN-ÉS du ^{31}P à qui permet de différencier les phases lipidiques dans un mélange, ce que les techniques des rayons X par exemple ne permettent pas de faire (Seelig, 1978).

L'ADC du ^{31}P permet de discriminer les différentes phases lipidiques d'une membrane puisque cela est directement relié aux orientations des têtes polaires. Chaque type de phase peut être associé à un spectre de RMN typique, tel qu'illustré à la figure 35. Ce concept peut être expliqué en se basant sur la configuration moléculaire de chaque phospholipide selon les conditions du milieu (température, pH, force ionique, présence de molécules actives, etc.) (Seelig, 1978; Cullis et Kruijff, 1979; Strandberg et Ulrich, 2004). Par exemple, une bicouche lamellaire, la forme la plus répandue et la plus représentative des membranes biologiques (Lafleur *et al.*, 1989), reflète la forme cylindrique des

phospholipides individuels. En revanche, lorsque les phospholipides individuels s'organisent en forme conique ou conique inversée, les membranes forment des phases micellaires ou hexagonales respectivement (Figure 35).

Les formes micellaires donnent des pics étroits aux alentours de 0 ppm. Les formes hexagonales donnent des spectres inversés et à ADC deux fois moins large que celui de la forme lamellaire pour un même système membranaire (Cullis et Kruijff, 1979; Koller et Lohner, 2014). La phase « gel » peut également être observée par des spectres de poudre très larges. Elle reflète la présence d'une matrice rigide, et une immobilisation des mouvements des phospholipides (Seelig, 1978).

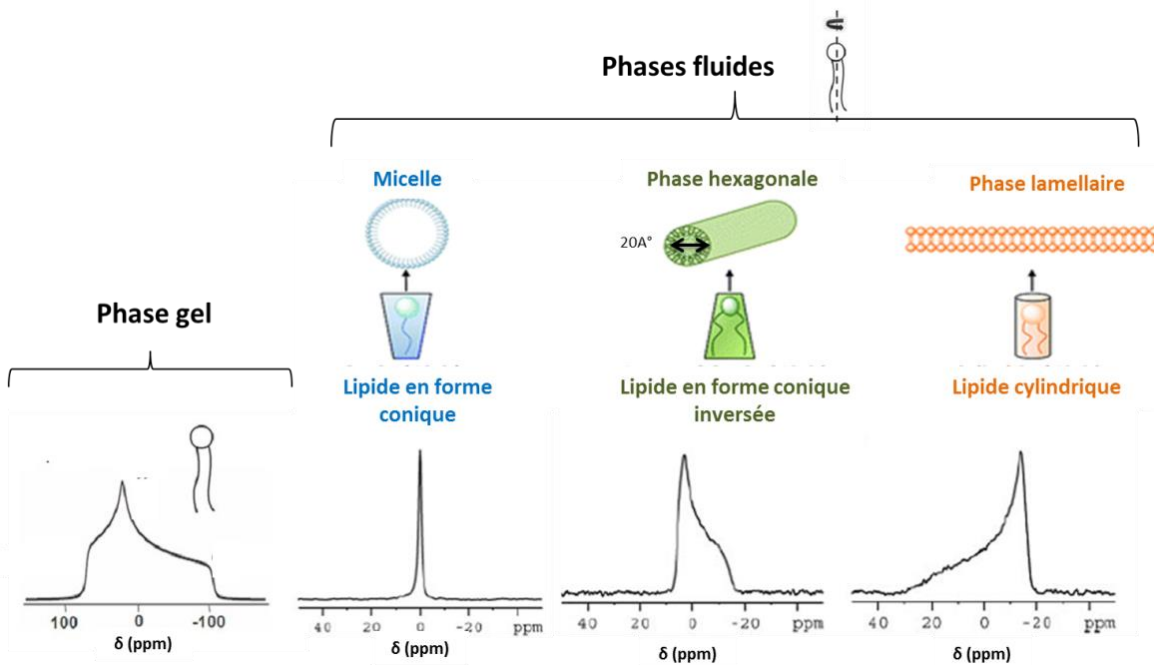


Figure 35 : Le polymorphisme des phospholipides hydratés et leurs spectres RMN ^{31}P correspondants (adaptée de Seelig (1978), de Cullis et Kruijff (1979) et de Selvy *et al.*, (2011))

1.2.3. RMN du deutérium pour les membranes

La RMN du deutérium est une méthode performante qui permet d'étudier les propriétés des membranes lipidiques d'une manière quantitative et précise, parfois même plus efficacement que la microscopie confocale, car elle donne des informations au niveau

moléculaire (Juhász *et al.*, 2009). L'échelle de temps du deutérium, qui est de 10 μ s, couvre la plupart des mouvements lipidiques ce qui rend cette technique convenable pour les études membranaires (Vermeer *et al.*, 2007). Le deutérium est un noyau de faible abondance naturelle soit de $\approx 1\%$ seulement (Poupko *et al.*, 1994). Cela requiert généralement un marquage isotopique des structures ciblées. Nous rappelons que théoriquement un noyau quadripolaire, comme le deutérium, donne des spectres à deux pics séparés par un écart quadripolaire ($\Delta\nu_Q$). Ce dernier permet de mesurer directement la dynamique des phospholipides deutérés notamment l'orientation et le degré d'ordre des chaînes acyles (Oldfield et Chapman, 1971; Davis *et al.*, 1976; Seelig, 1977; Vermeer *et al.*, 2007). Lorsque le marquage est effectué à un seul site, de la chaîne carbone-deutérium (C-D), les spectres sont relativement simples (Figure 36) et ressemblent au spectre théorique présenté précédemment (Figure 25). Par contre, pour le cas des membranes entièrement deutérées, l'aspect du spectre représente la superposition de tous les spectres des sites marqués au ^2H sur la chaîne (Figure 36) (Seelig, 1977; Davis *et al.*, 1979).

L'écart quadripolaire nous permet de déduire le paramètre d'ordre S_{CD} (Équation-11) qui donne une information directe sur l'orientation moyenne des liaisons carbone-deutérium par rapport à la normale de la bicouche, et de ce fait permet de déduire les propriétés dynamiques des membranes. Plus le paramètre d'ordre est important, plus le système est ordonné et rigide, et inversement (Seelig, 1977; Davis *et al.*, 1979; Vermeer *et al.*, 2007).

$$\text{Équation 11 : } \Delta\nu_Q = 3/2 \cdot A_Q \cdot (3\cos^2\theta - 1) / 2 \cdot S_{CD}$$

où A_Q définit la constante de couplage quadripolaire et θ l'orientation par rapport au B_0 .

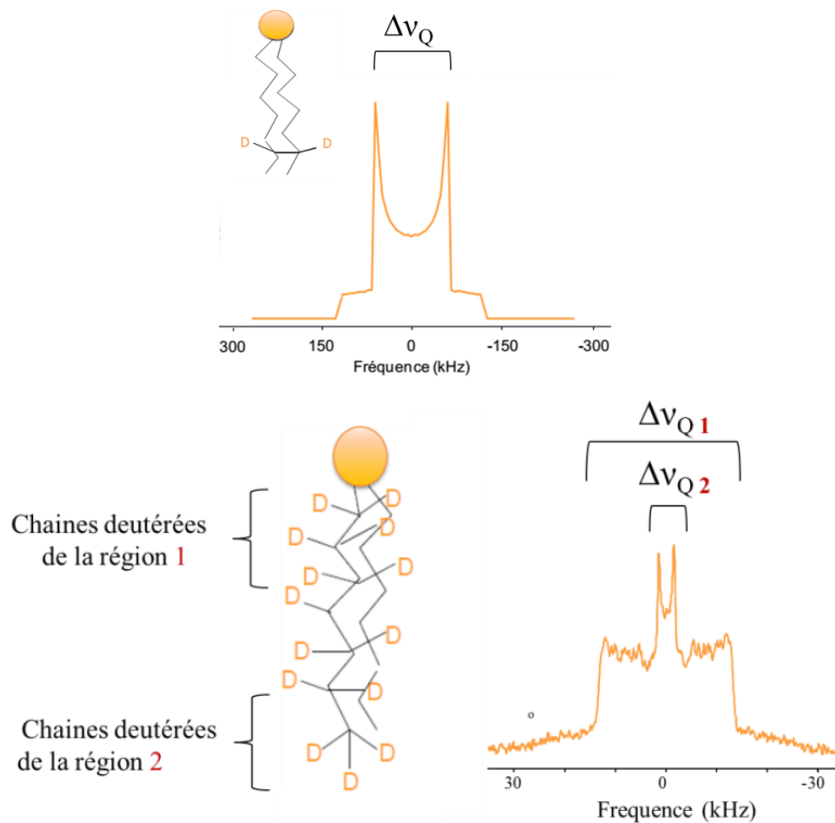


Figure 36 : Spectre RMN- ^2H d'un phospholipide marqué. (a) marquage d'un seul site sur les chaînes acyles, (b) marquage sur tous les sites des chaînes acyles. Les mouvements sont plus rapides à l'extrémité du phospholipide (région 2) ce qui donne un $\Delta\nu_Q$ plus petit que celui de la région 1 qui est plus rigide (Marcotte, 2016).

Dans le cas des membranes biologiques, particulièrement à l'état d'une cellule intacte, le spectre du deutérium peut être compliqué à analyser et l'écart quadripolaire n'est pas toujours facile à extraire. Les chaînes acyles peuvent ne pas être entièrement deutérées et même en cas d'un marquage complet des phospholipides, les sites du ^2H ne sont pas équivalents, en raison de la coexistence de plusieurs phases lipidiques et de la présence des protéines membranaires (Davis, 1979; Davis *et al.*, 1979; Monck *et al.*, 1992).

Pour pallier ce problème, Bloom et coll. ont développé la méthode de calcul des moments spectraux qui permet de déduire directement l'écart quadripolaire dans les systèmes qui ont plusieurs positions deutérées et dans différents environnements

moléculaires (Bloom *et al.*, 1979). Par ailleurs, l'augmentation de la résolution spectrale lors de l'étude des systèmes biologiques complexes est également une stratégie qui aide à extraire l'information efficacement. Cela est assuré soit par une augmentation du temps d'acquisition des spectres, donc le temps de l'expérience (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016), soit par l'utilisation de la MAS (Kristensen *et al.*, 1991; Glaubitz *et al.*, 1999; Warnet *et al.*, 2016). La MAS offre un avantage supplémentaire puisqu'elle permet de réduire le temps de l'acquisition d'un facteur de 10 (Warnet *et al.*, 2016) (Figure 37). Cela est avantageux pour les expériences effectuées en RMN *in vivo*, ce qui explique le choix de cette méthode dans cette thèse. Dans le cas de la rotation à l'angle magique, le terme $(3\cos^2\theta - 1)$ s'annule dans l'équation-11, ce qui ne permet pas de quantifier directement le paramètre d'ordre. Pour cela, le calcul des moments spectraux est une méthode d'analyse nécessaire qui permet de mesurer la fluidité membranaire à partir des spectres du deutérium enregistrés en mode MAS (Warnet *et al.*, 2016). Généralement, les moments spectraux de premier ordre (M_1) et de second ordre (M_2) sont les plus utilisés. Le M_1 permet de mesurer la largeur du spectre, alors que le M_2 permet de déduire le paramètre d'ordre du spectre soit le S_{CD} . Autrement dit, le M_2 est positivement proportionnel au degré d'ordre des chaînes acyles et à la rigidité membranaire (Bloom *et al.*, 1979; Davis *et al.*, 1979; Davis *et al.*, 2009; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016).

Dans les chapitres 3 et 4 de ce mémoire, l'analyse des moments spectraux a été réalisée sur les spectres de MAS au moyen d'un programme. Le second moment correspond à la somme des écarts quadripolaires comme décrite dans l'équation-12 (Davis, 1979).

$$\text{Équation 12 : } M_2 = \frac{\int_0^\infty \omega^2 f(\omega) d\omega}{\int_0^\infty f(\omega) d\omega} = \frac{4\pi^2 \nu_Q^2}{5} \langle S_{CD}^2 \rangle$$

où ω est la fréquence de Larmor, S_{CD} est le paramètre d'ordre, ν_Q est la constante de l'écart quadripolaire, qui est égal à 168 kHz pour les liaisons C-D dans les chaînes acyles (Burnett et Muller, 1971). Lorsqu'on utilise la rotation à l'angle magique, l'intégration continue peut

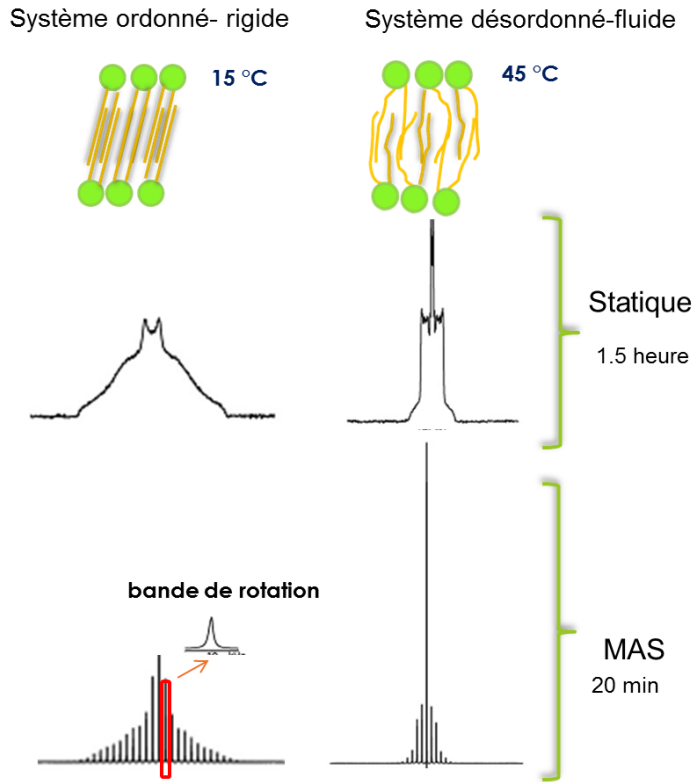


Figure 37 : Exemples de spectres de membranes lipidiques marquées entièrement au ^2H et analysées en mode statique et en mode de rotation à l'angle magique (MAS). Les spectres reflètent la variation de la fluidité membranaire, ils sont par exemple moins larges lorsque la membrane est plus fluide (adaptée de Warnet *et al.*, 2016)

être remplacée par une somme discrète de l'ensemble des bandes de rotation (Warnet *et al.*, 2016). Dans ce cas, le second moment est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Équation 13 : } M_2 = \omega_r^2 \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N^2 A_N}{\sum_{N=0}^{\infty} A_N}$$

où (ω_r) défini la fréquence de rotation, qui a été fixée à 10 kHz dans nos expériences. Cette vitesse de rotation a été optimisée pour les bactéries, car elle permet d'avoir une bonne résolution tout en évitant de chauffer l'échantillon (voir annexe III). N définit le nombre de bandes de rotation et A, l'aire de chaque bande de rotation obtenue par intégration spectrale.

2. Viabilité cellulaire

L'estimation de la viabilité des bactéries a été nécessaire aux chapitres 3 et 4 afin de vérifier le caractère *in vivo* des expériences de RMN-ÉS. Cette méthode calorimétrique se base sur la transformation du bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) en cristaux de formazan en présence d'enzymes réductrices, les déshydrogénases, qui sont présentes uniquement dans les cellules vivantes (Wang *et al.*, 2010). Les cristaux isolés sont dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour mesurer la densité optique à 550 nm. Cela permet de déduire directement les concentrations des cristaux pour être comparées avec celles issues des échantillons de bactéries contrôles, notamment celles qui n'ont pas subi le traitement.

La viabilité était mesurée après le processus de lavage des bactéries avec une solution saline (9‰ NaCl) et plusieurs centrifugations, ainsi qu'après des expériences de RMN sous condition de MAS à une vitesse de 10 kHz. Les résultats de viabilité au cours des expériences préliminaires sont montrés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Expériences préliminaires de mesure de la viabilité de *V. splendidus* après différentes conditions expérimentales

Traitement	Température (s)	Viabilité (%)
• Après lavage	ambiante	100
• Après 12h de MAS (10 kHz)	45°C	91 ± 4
	55°C	34 ± 6
• Après 3h de RMN statique	25°C	87 ± 5
• Après 1h de MAS (10 kHz)	25°C	95 ± 5

3. Concentration et degré de purification de la marennine

La forme extracellulaire de la marennine a été utilisée dans cette thèse (chapitres 4 et 5). Les solutions du pigment purifié ont été fournies sous forme de marennine dissoute dans l'eau nano pure. Le processus d'obtention de la marennine est détaillé par Gastineau *et al.*

(2014). Brièvement, le pigment est extrait au préalable à partir des eaux vertes, issues des cultures des diatomées *Haslea ostrearia* (Figure 38). La souche NCC-136-isolée de la baie de Bourgneuf en France et fournie par l'institut NCC (Nantes culture collection) a été cultivée à la station aquicole de Pointe-au-Père à Rimouski (UQAR). À partir d'une culture axénique initiale, *H. ostrearia* a été d'abord cultivée dans des cultures semi-continues enrichies avec du milieu F/2 et 10 mg/l de silicates. Par la suite, les cultures ont été transférées vers des photobioréacteurs contenant 100 ml d'eau de mer filtrée ($1\mu\text{m}$; salinité = 28) et ont été soumises à des intensités lumineuses de $180\ \mu\text{mol de photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ selon un cycle de lumière/obscurité de 14h/10h (Figure 38-a). La température de l'eau a été maintenue à 20°C (Gastineau *et al.*, 2014; Turcotte *et al.*, 2016). La marennine commence à être relâchée vers la fin de la phase exponentielle, avec un maximum de quantité atteint au bout de 12 jours de culture et avec un taux de production de $0,3\ \text{mg/l/jour}$ (Gastineau *et al.*, 2014) (Figure 38-b).

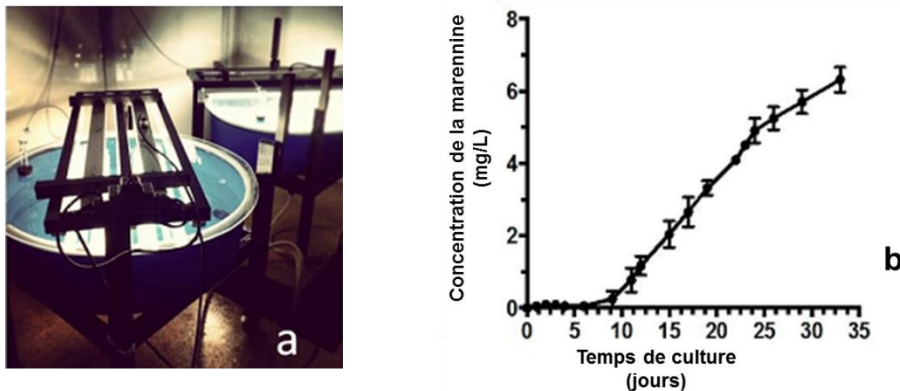


Figure 38 : Production de la marennine (a) : Photobioréacteurs pour la culture des algues *H. ostrreraria*. (b) Variation des quantités de marennine avec la croissance algale (Gastineau *et al.*, 2014).

La solution de marennine est obtenue après avoir filtré les eaux de cultures avec des filtres de $0,22\ \mu\text{m}$ pour éliminer les cellules algales, ce qui constitue l'eau bleue-verte. Cette dernière a été purifiée selon la méthode de Pouvreau et coll. (2007). Brièvement, le processus implique des séries d'ultrafiltration et de dessalement et une dernière étape qui consiste à une chromatographie à échange anionique. Les différentes fractions générées par

la chromatographie donnent différentes solutions de marennine avec des degrés de purification différents. Les premières fractions sont, par exemple, les plus pures, et ils représentent les fractions utilisées dans nos expériences.

Pour calculer les concentrations de marennine et le degré de purification, la loi de Beer-Lambert est utilisée avec l'équation:

$$\text{Équation 14 : } A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

où A : représente l'absorption à 677nm ; ϵ_{677} : le coefficient d'extinction spécifique de la marennine extracellulaire qui est égale à 12.13 L/g ; C : la concentration de la marennine exprimée en mg/L et ; l : est la longueur de la cuvette (généralement = 1cm).

4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice est une mesure très utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne de certaines substances comme les antibiotiques. Il s'agit de la concentration minimale à partir de laquelle les bactéries ne peuvent plus croître, sans nécessairement être la concentration létale (Wiegand *et al.*, 2008). La méthode utilisée dans le chapitre 4 consiste à tester plusieurs concentrations d'antibiotique sur une même quantité de bactéries initiale, dans des plaques à puits. Les mesures ont été réalisées à l'INRS (Institut National de Recherche Scientifique, Université du Québec, Laval). Toutes les solutions préparées devraient être filtrées au préalable à 0,2 μm . Des solutions intermédiaires sont préparées dans des Eppendorfs de 1 ml, pour être par la suite distribuées dans des plaques de 100 puits avec un volume de 200 μl /puits.

5. Analyses des lipides membranaires

Les analyses élémentaires des lipides ont été réalisées à deux reprises (Figure 39). La première consiste à analyser les AGs pour pouvoir marquer isotopiquement les membranes de *V. splendidus* (chapitre 3). La deuxième consiste à extraire des phospholipides entiers pour identifier les têtes polaires majoritaires afin de pouvoir fabriquer les membranes modèles de *V. splendidus*, utilisées dans le chapitre 5m le plus fidèlement possible au profil naturel.

5.1.Extraction des acides gras et des têtes polaires

Les extractions des acides gras et des phospholipides se basent sur un même protocole initial suivant la méthode de Folch et coll. (Folch *et al.*, 1957). Des quantités initiales de 30 à 60 mg de matière sèche ont été obtenues à partir de 200 ml de culture bactérienne lavée avec 9‰ de NaCl. Afin de déterminer les têtes polaires majoritaires, les phospholipides totaux ont été extraits pour être dissouts dans un mélange de solvant organique, avant d'être analysés par RMN-³¹P en solution (voir plus de détails dans le chapitre 5). La méthylation est une étape supplémentaire, et est nécessaire pour obtenir des acides gras méthylés afin de pouvoir les analyser par GCMS (chromatographie à phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse), et déterminer le profil des acides gras dans les bactéries (Figure 39).

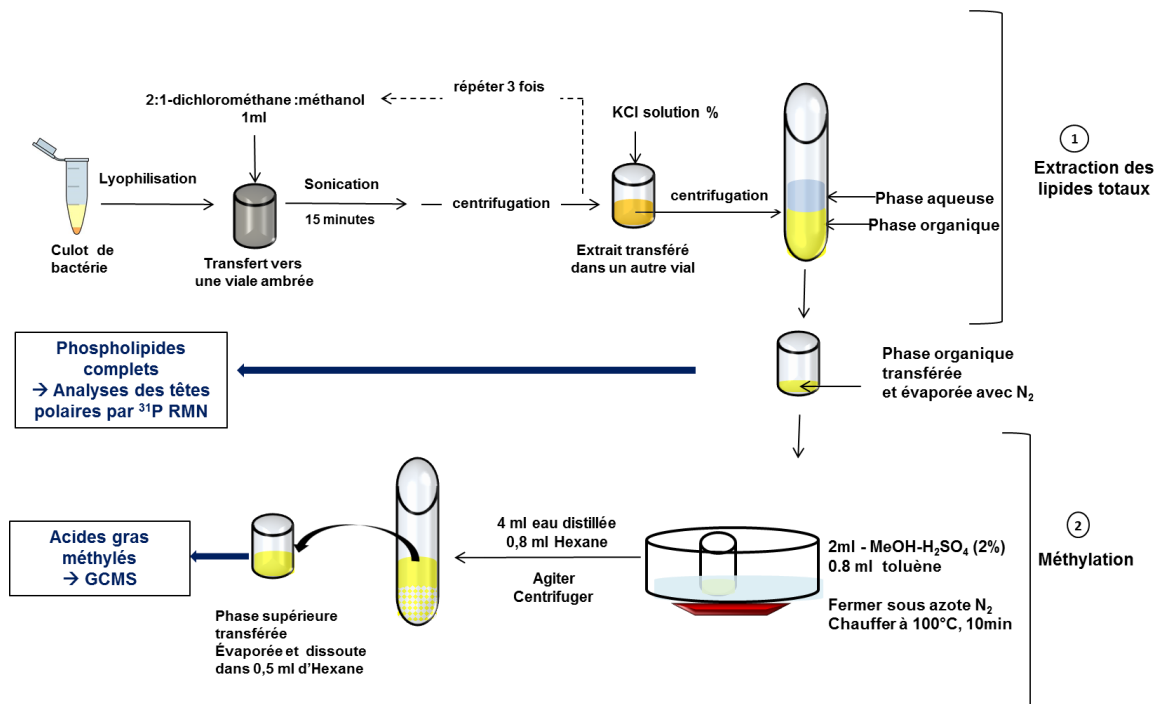


Figure 39 : Protocole simplifié de la méthode utilisée pour l'extraction des lipides membranaires (phospholipides et acides gras méthylés). Toutes les centrifugations ont été réalisées avec 2000 rpm durant 2 minutes

5.2.Méthodes de séparation chromatographique

La GCMS a été utilisée pour déterminer la nature des chaînes lipidiques des membranes de *V. splendidus*. La technique permet de séparer les méthyl-esters d'acides gras (FAME) pour des fins de détermination et de quantification. Elle permet également de quantifier le taux de marquage isotopique.

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Elle se base sur la dualité de phase stationnaire : la colonne, et une phase mobile, contenant l'échantillon à analyser. Les constituants de l'échantillon migrent à des vitesses différentes selon leur affinité pour la colonne, ce qui permet de les séparer et de les identifier dans un chromatogramme (Rouessac *et al.*, 2004). Dans notre cas, nous avons utilisé une colonne de phénylméthyle siloxane, et d'un gaz inerte, l'hélium, comme phase mobile. Les échantillons permettent de générer des chromatogrammes, que nous avons analysés en nous basant sur les aires des pics intégrés, le temps de rétention de chaque constituant, les masses moléculaires associées à chaque pic et la base de données déjà établie. Le FAME-mix C4-C24 (Sigma Aldrich (Oakville, Canada)) a été utilisé comme standard.

6. *Potentiel Zeta*

La mesure du potentiel Zeta employée dans le chapitre 5, est la méthode la plus utilisée pour caractériser les propriétés des charges de surface d'une particule colloïdale (cellules, liposomes, matériaux, etc.) (Lowry *et al.*, 2016; Yingchoncharoen *et al.*, 2016). Elle permet de déterminer si une particule est cationique, anionique ou neutre, et si la particule est sensible aux changements électrostatiques dans le milieu (Smith *et al.*, 2017). Par exemple, dans le cas des lipides dans une solution aqueuse, des réactions d'ionisation, de dissociation des groupes de surface ou d'adsorption avec les molécules chimiques du milieu extérieur, provoquent un changement de la charge de surface et de la distribution des ions autour des particules. Ce changement de nature électrostatique aboutit à la formation d'un nuage de charge électrique appelé « couche électrique double (EDL : *electric double layer*) », qui est fortement variable selon la composition des lipides, de la température et de

la force ionique du solvant de la solution aqueuse La couche EDL est constituée par une couche immobile, la couche de Stern, où les ions sont fortement attachés à la surface. Au-delà de cette couche et en s'éloignant de la surface lipidique, on retrouve une couche adjacente, où les ions sont mobiles (la couche diffuse) (Figure 40). Le potentiel Zeta, qui se mesure en millivolts (mV), définit la différence entre la couche de surface et la couche diffuse (Yingchoncharoen *et al.*, 2016).

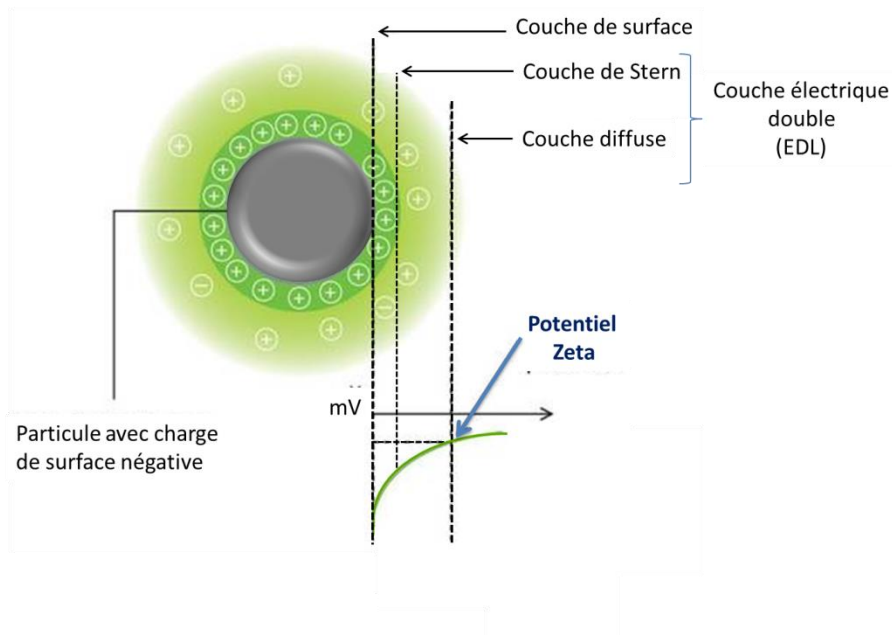


Figure 40 : Charge de surface et potentiel Zeta d'une particule colloïdale (exemple d'un liposome), adaptée de Lombardo *et al.* (2016)

La magnitude du potentiel Zeta permet de déduire l'état de stabilité de la particule, étant fortement influencée par les charges de surfaces (Lowry *et al.*, 2016). Par exemple, lorsque deux EDL de deux particules se chevauchent, cela crée une force répulsive, engendrée par les interactions osmotiques (Lombardo *et al.*, 2016). Riddick (1968) a défini des intervalles de potentiels Zeta qui permettent de déduire l'état de stabilité des systèmes étudiés (Tableau 6). Typiquement, un potentiel Zeta au-delà de 30 mV indique que les forces électrostatiques sont suffisamment importantes pour empêcher l'agrégation, et la valeur reflète un état modérément stable. Lorsqu'une particule est de plus en plus proche de la

neutralité (point isoélectrique), le système devient instable et une agglomération se produit (Riddick, 1968).

Tableau 6 : Propriétés des colloïdes selon les magnitudes de potentiels Zeta mesurées (Riddick, 1968)

États de stabilité	Intervalles de potentiel Zeta (mV)
Agglomération maximale et précipitation	0 à +3
Fortes agglomération et précipitation	+5 à -5
Seuil d'agglomération	-10 à -15
Seuil de dispersion délicate	-16 à -30
Stabilité modérée	-31 à -40
Système assez stable	-41 à -60
Système très stable	-61 à -80
Système extrêmement stable	-81 à -100

CHAPITRE 3

STRATÉGIE DE MARQUAGE ET CARACTÉRISATION DE LA MEMBRANE DES BACTÉRIES MARINES *VIBRIO SPLENDIDUS* PAR RMN-²H *IN VIVO*

Ce premier article, intitulé « *Labelling strategy and membrane characterization of marine bacteria Vibrio splendidus by in vivo ²H NMR* », fut corédigé par moi-même ainsi que par Alexandre Arnold, Dror Warschawski, Karine Lemarchand, Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. Il fut accepté pour publication dans sa version finale par les éditeurs de la revue *Biochimica Biophysica Acta Biomembranes* pour être publié en février 2019 :

- Bouhleb, Z., Arnold, A. A., Warschawski, D. E., Lemarchand, K., Tremblay, R., & Marcotte, I. (2019). Labelling strategy and membrane characterization of marine bacteria *Vibrio splendidus* by in vivo ²H NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1861, 871-878.

En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement méthodologique, l'exécution expérimentale, le traitement des résultats et la rédaction de l'article. Alexandre A. Arnold et Dror E. Warschawski, deuxièmes et troisièmes auteurs respectivement, ont contribué au traitement des résultats et à l'écriture de l'article. Le professeur Karine Lemarchand a aidé au développement méthodologique en matière de microbiologie et à la révision de l'article. Les professeurs Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte, ont fourni l'idée originale. Ils ont aidé à l'élaboration de la problématique, au développement méthodologique ainsi qu'à la révision de l'article.

Des versions abrégées de cet article ont été présentées à la conférence de MOOT-NMR, à la réunion annuelle du regroupement Ressources Aquatiques Québec (RAQ), ainsi qu'au congrès de la Biophysical Society of Canada, avec prix de meilleure affiche.

- Zeineb Bouhlel, Dror E. Warschawski , Alexandre A. Arnold, Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. Deuteration of *Vibrio splendidus* lipid membranes and initial characterization by *in vivo* ^2H solid-state NMR. 29th Annual MOOT NMR (Charlottetown IPE, Canada), **présentation orale**, 1 septembre 2016.
- Zeineb Bouhlel, Dror E. Warschawski, Alexandre A. Arnold, Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. Marquage isotopique au deutérium de la membrane de *V. splendidus* et première caractérisation par spectroscopie RMN. Réunion Annuelle de Ressources Aquatiques Québec (Québec, Canada), **présentation orale**, 7 novembre 2016.
- Zeineb Bouhlel, Dror E. Warschawski, Alexandre A. Arnold, Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. Strategies for the *in vivo* characterization of the marine bacteria *Vibrio splendidus* by ^2H NMR. Biophysical Society of Canada (Montréal, Canada), **affiche**, 24 Mai 2017.

RÉSUMÉ

Vibrio splendidus est une bactérie marine, souvent considérée comme une menace dans les écloséries d'aquaculture où elle est responsable d'événements de mortalités massives, notamment celles des larves de bivalves. Cette bactérie est hautement adaptée aux écosystèmes salés et dynamiques où elle est devenue une espèce opportuniste et résistante. Dans une tentative de caractérisation de ses parois membranaires, comme une première étape nécessaire pour l'étude des interactions bactériennes avec diverses molécules, nous avons établi un protocole de marquage pour pouvoir analyser *V. splendidus* par la résonance magnétique nucléaire du deutérium de l'état solide (RMN-ÉS). La RMN-ÉS du ^2H est une technique utilisée pour scruter l'organisation et la dynamique des phospholipides à l'échelle moléculaire. Son application aux bactéries intactes est particulièrement avantageuse, car elle permet de sonder les chaînes acyles dans leur environnement naturel et d'étudier ainsi les interactions membranaires. Cependant, en raison de la complexité des voies métaboliques et des systèmes biologiques, le marquage isotopique pourrait constituer un défi majeur. Dans cette étude, nous montrons que les lipides membranaires de *V. splendidus* peuvent être marqués en utilisant l'acide palmitique deutéré tout en soulignant l'importance du choix de l'agent surfactant dans le protocole de marquage. De plus, nous avons évalué l'impact de la deutération des lipides sur la performance générale des bactéries, sur le rapport entre les chaînes d'acides gras saturés et insaturés, ainsi que sur les propriétés membranaires. Nous avons également caractérisé davantage l'évolution de la fluidité membranaire de *V. splendidus* au cours des différents stades de croissance bactérienne, en relation avec la composition en acides gras. Nos résultats montrent une plus grande fluidité membranaire au cours de la phase de croissance stationnaire par rapport à la phase exponentielle dans les conditions du marquage - une information à prendre en compte dans les études futures qui utiliseraient la RMN-ÉS *in vivo*. Notre protocole de deutération des lipides, optimisé pour le modèle de *V. splendidus*, est probablement applicable pour d'autres microorganismes dans les études de RMN *in vivo*.

MOTS CLÉS :

RMN in cellulo, deutérium, marquage isotopique, fluidité membranaire, acides gras, rotation à l'angle magique

**LABELLING STRATEGY AND MEMBRANE CHARACTERIZATION OF MARINE BACTERIA
VIBRIO SPLENDIDUS BY *IN VIVO* ²H NMR**

Zeineb Bouhlef^{1, 2}, *Alexandre A. Arnold*¹, *Dror E. Warschawski*^{1,3}, *Karine Lemarchand*²,
*Réjean Tremblay*² and *Isabelle Marcotte*^{1*}

¹ Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, Montreal, Canada, H3C 3P8

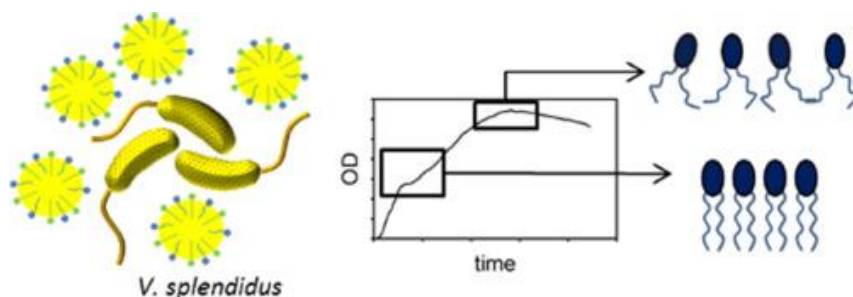
² Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines, Rimouski, Canada G5L 3A1

³UMR 7099, CNRS - Université Paris Diderot, IBPC, 13 rue Pierre et Marie Curie, F-75005 Paris, France

ABSTRACT

Vibrio splendidus is a marine bacterium often considered as a threat in aquaculture hatcheries where it is responsible for mass mortality events, notably of bivalves' larvae. This bacterium is highly adapted to dynamic salty ecosystems where it has become an opportunistic and resistant species. In an attempt to characterize their membranes as a first and necessary step toward studying bacterial interactions with diverse molecules, we establish a labelling protocol for *in vivo* ^2H solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) analysis of *V. splendidus*. ^2H SS-NMR is a useful tool to study the organization and dynamics of phospholipids at the molecular level, and its application to intact bacteria is further advantageous as it allows probing acyl chains in their natural environment and study membrane interactions. However, due to the complexity of metabolic pathways and biological systems, isotopic labelling can be challenging. In this study, we show that *V. splendidus* can be labelled using deuterated palmitic acid, and demonstrate the importance of surfactant choice in the labelling protocol. Moreover, we assess the impact of lipid deuteration on the general fitness of the bacteria, as well as the ratio of saturated-to-unsaturated fatty acid chains and its impact on the membrane properties. We further characterize the evolution of *V. splendidus* membrane fluidity during different growth stages and relate it to fatty acid chain composition. Our results show larger membrane fluidity during the stationary growth phase compared to the exponential growth phase under labelling conditions - an information to take into account for future *in vivo* SS-NMR studies. Our lipid deuteration protocol optimized for *V. splendidus* is likely applicable other microorganisms for *in vivo* NMR studies.

GRAPHICAL ABSTRACT



KEYWORDS

In-cell NMR, deuterium, isotopic labelling, membrane fluidity, fatty acids, magic-angle spinning

ABBREVIATIONS

CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate; cyC17:0, cyclopropaneoctanoic acid-2-hydroxyl acid; cyC19:0, cyclopropaneoctanoic acid-2-octyl acid; CMC, critical micelle concentration; d₃₁-PA, deuterated palmitic acid; DF, degree of freedom; DPC, dodecylphosphocholine; F, F-statistic; FA, fatty acid; FAME, fatty acid methyl ester; GCMS, gas chromatography-mass spectrometry; M₂, second spectral moment; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; OA, oleic acid; OD, optical density; OG, octylglucopyranoside; LB, Lysogeny broth; P, probability value; PA, palmitic acid; SFA, saturated fatty acid; SS-NMR, solid-state nuclear magnetic resonance; MAS, magic angle spinning; UFA, unsaturated fatty acid.

1. INTRODUCTION

Vibrio species are Gram-negative bacteria widely spread in coastal marine and estuarine waters and sediments (Cavallo et Stabili, 2002; Thompson *et al.*, 2004; McDougald et Kjelleberg, 2006; Urakawa et Rivera, 2006). They might also be found in aquatic animal tissues, causing serious pathologies leading in some cases to economic loss in aquaculture industry (DiSalvo *et al.*, 1978; Crab *et al.*, 2010; Frans *et al.*, 2011; Travers *et al.*, 2015). To date, most research on marine *Vibrio* species concerned their effects on aquatic organisms acting on immunological process (Velji *et al.*, 1992; Paillard *et al.*, 2004; Pruzzo *et al.*, 2005a; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010; De Decker et Saulnier, 2011; Liu *et al.*, 2013b; Travers *et al.*, 2015). As a matter of fact, a common trait of all members of the *Vibrio* genus is their opportunistic nature, which allows them to benefit from the collapse of the immune system of cultured organisms in specific conditions to become virulent (Gay *et al.*, 2004b; Liu *et al.*, 2013b). Investigating the virulence/response of these species requires considering numerous biotic and abiotic factors where the physiological responses can remain elusive. For instance, *V. splendidus* are different from their *Vibrio* congeners by their high genetic variability between strains, where each strain can have a different opportunistic and/or virulence pattern (Gay *et al.*, 2004b; Liu *et al.*, 2013a; Travers *et al.*, 2015).

Very few studies have so far focused on the membranes of environmental bacteria compared to human pathogens, albeit the importance of the external cell envelopes in biological events. Marine bacteria are of great interest for membrane properties investigation considering their high resistance phenotypes and high adaptability to a large scale of salinity and temperature, attributable to their permanent exposure to changing ecosystems (Kogut et Russell, 1984; Eguchi *et al.*, 2000; Cavallo et Stabili, 2002; Pruzzo *et al.*, 2005a; Sarita, 2005; McDougald et Kjelleberg, 2006; Urakawa et Rivera, 2006; Masini *et al.*, 2007; Soto *et al.*, 2009). Moreover, marine and coastal environments constitute a dynamic platform for water mixing, thus containing a plethora of molecules such as pollutants, aquatic bioactive components, organic or chemical toxins and industrial antibiotics (Phillips, 1977; Olsen *et al.*, 1982; Nixon, 1995; Baquero *et al.*, 2008; Kümmerer, 2009; Riedel *et al.*, 2016). The cell envelope of indigenous bacteria in such environments represents the first barrier encountered by external molecules which could either cross the membrane and ultimately intracellular sites, or directly affect their structural components (Hancock, 1997; Shai, 1999). Acquiring knowledge on *Vibrio* membrane structure and fluidity would help tackling physiological processes inside the cell and gain a better understanding of the interaction mechanisms of these marine bacteria with molecules in their environment. This should contribute to improve investigations of larval infections and therapeutic treatments in aquaculture.

Historically, *in vivo* NMR has been associated with the observation of metabolites and metallic ions that were sufficiently abundant so generate an NMR signal (Ratcliffe, 1994; Serber *et al.*, 2005). Afterwards, thanks to technological progress, new labelling schemes and genetic manipulations, the term *in-cell* NMR arose, describing the observation of larger molecules inside whole cells (Serber *et al.*, 2001; Selenko et Wagner, 2007; Maldonado *et al.*, 2011). For obvious resolution and sensitivity issues, *in cell* liquid state NMR focused on small and/or free mobile molecules (Reckel *et al.*, 2005; Serber *et al.*, 2005; Selenko et Wagner, 2007; Maldonado *et al.*, 2011). During the last five years, solid-state NMR made a significant contribution, to include not just large molecules with limited movement, but also heterogeneous biological systems (Warnet *et al.*, 2015). Today, *in-vivo* NMR is more

frequently used to refer to the study of intact *living* organisms such as bacteria, microalgae, and small invertebrates, as long as their size allows them to fit into the NMR rotor (Chauton *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2015; Simpson *et al.*, 2015; Laadhari *et al.*, 2016; Booth *et al.*, 2017; Poulhazan *et al.*, 2018).

The objective of this work was to establish a protocol to deuterate the lipid acyl chains in *V. splendidus* membranes, to enable the *in vivo* ^2H solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) study of this marine bacterium. More specifically we used the indigenous 7SHRW strain isolated from the St. Lawrence Gulf sediments (Canada) which can cause significant mortalities to blue mussels and scallops at larval stages (Mateo *et al.*, 2009; Turcotte *et al.*, 2016), and has the advantage to be easily cultured in laboratory conditions. Like other marine bacteria, very few research on membrane phospholipids of *Vibrio spp.* are available (Oliver et Colwell, 1973; Oliver et Stringer, 1984; Byers, 1989; Brown et Gulig, 2008; Zhang et Rock, 2009) and studies on *V. splendidus* in this regard are even more sparse. To the best of our knowledge, only one study describes membrane phospholipids of *V. splendidus*, using a strain living in deep anoxic sediments (Freese *et al.*, 2009).

Deuterium SS-NMR is an excellent tool to investigate the structure and dynamics of membrane lipids at the molecular level (Seelig, 1977; Davis, 1983; Li *et al.*, 2017). Warnet *et al.* showed that magic-angle spinning (MAS) can be used in ^2H in-cell SS-NMR studies to shorten the acquisition time by a factor of 10 while simultaneously maintaining spectral sensitivity, thus favoring the *in vivo* character of the experiment (Warnet *et al.*, 2016). However, ^2H NMR requires isotopic labelling which can be challenging in biological organisms such as *V. splendidus*. Notably, deuteration labelling protocols of bacteria phospholipids require the use of surfactants (Pius *et al.*, 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016) to micellize deuterated fatty acids prior to their uptake by the bacteria and use in the phospholipids biosynthesis. These surfactants can possibly affect the membrane. Moreover, the natural saturated/unsaturated lipid ratio in the bacterial

membrane should be preserved. A careful optimization of the deuteration protocol is thus necessary to ensure genuine *in vivo* characterization of these microorganisms.

In this work we propose for the first time a protocol for the deuteration of lipids in a model marine bacterium, *V. splendidus*. To do so, we assessed the effect of different surfactants on the cell growth. We also studied the effect of palmitic and oleic acid on the lipid profile and membrane fluidity by *in vivo* ^2H SS-NMR as a function of cell growth stage. The labelling strategy developed here has the potential to be amenable to the *in vivo* NMR investigations of a variety of marine and terrestrial bacteria.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Triton X-100 and 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS), Brij35, oleic (OA) and deuterated palmitic (d_{31} -PA) acids, deuterium-depleted water, as well as 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and fatty acid methyl ester (FAME) mix C4-C24 were all purchased from Sigma Aldrich (Oakville, Canada). Dodecylphosphocholine (DPC) and octylglucopyranoside (OG) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Polyethylene glycol sorbitan monolaurate (Tween® 20) was purchased from BioShop Canada Inc. (Burlington, Canada), whereas LB (Lysogeny broth) Broth Miller was obtained from BioBasic Inc. (Markham, Canada).

2.2 Bacterial growth and ^2H labelling protocol

Vibrio splendidus strain 7SHRW were isolated from sediments of Hillsborough River, Prince Edward Island (Gulf of St. Lawrence, Canada) (Mateo *et al.*, 2009). Cell culture was initiated by adding 100 μl of a frozen cell stock solution (in 40% glycerol at -80°C in 10 mL LB medium (NaCl 10g/L, tryptone 10 g/L, yeast extracts 5 g/L), and incubated at 24.5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) on a rotary shaker (INFORS HT Multitron Pro, USA) operating at 100 rpm. After 3 days of growth, bacteria were transferred into 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of LB 1X (initial $\text{OD}_{600\text{nm}}$ adjusted to ≈ 0.02) and 1 mL was transferred

into a 24-well plate to monitor the growth kinetic with a multiple plate reader (Infinite M200 TECAN, Männedorf, Switzerland). Plates were conditioned to 24.5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) and to an agitation of 87 rpm before measuring the absorbance at 600 nm every 30 min during 48 hours. For each treatment, 3 to 4 wells were used. For isotopic labelling, *V. splendidus* were grown in the same conditions as described above but in an LB medium enriched with deuterated palmitic acid (d_{31} -PA). Prior to each use, the *Vibrio* strain was grown for two days and its purity was verified on LB-agar. The initial bacteria concentration was adjusted to be the same between replicates, *i.e.*, an optical density ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) of 0.02 at 600 nm wavelengths.

Initially, different commonly used surfactants were tested to micellize palmitic acid (0.3 mM) in culture media, and bacterial growths were monitored. Surfactants were used above their critical micelle concentration (CMC): Brij35 (0.1 mM), Tween20 (0.06 mM), Triton-X (0.4 mM), OG (20 mM), CHAPS (6 mM), and DPC (1.5 mM). The lipid deuteration procedure was optimized as follows: LB culture medium was supplemented with a mixture of d_{31} -PA (0.3 mM) and Tween-20 (0.14 mM), heated at 85°C, and the corresponding solution was flash-frozen and heated again several times until the complete dissolution of d_{31} -PA crystals. Protonated OA was added in the same proportions (0.3 mM) during bacteria inoculation, to mitigate potential unbalance of the saturated/unsaturated fatty acid (SFA/UFA) ratio within the membrane (Warnet *et al.*, 2016). Potential effect of the ^2H labelling was verified by comparing the growth of bacteria in deuterated and non-deuterated media. The specific growth rate (μ) was estimated from the slope regression of $\ln(\text{OD}_{600\text{nm}})$ as a function of elapsed time (Nedwell et Rutter, 1994)

2.3 Fatty acid profile analysis

Fatty acid (FA) profiles were analyzed using gas chromatography combined to mass spectrometry (GCMS) to obtain the proportion of each FA (deuterated or protonated) in $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ and were expressed as relative concentration (weight % relative to total FA contents) as described by Tardy-Laporte *et al.* (2013). Briefly, starting from three pools of 30 to 60 mg of dry-frozen bacteria, total lipids were extracted using

dichloromethane/methanol (2:1 CH₂Cl₂/MeOH v/v) and 0.88% KCl solution in a Potter glass homogenizer. Neutral and polar lipids were separated by elution through a silica gel column (30×5 mm) hydrated with 6% water. Polar lipids were transesterified using 2 mL of H₂SO₄ (2% in MeOH) and 0.8 mL of toluene. Final extracts were diluted in hexane solution and adjusted to a volume of 0.5 mL before GCMS analysis (Agilent technology-7890A, Santa Clara, CA, USA). FA analyses were performed in parallel on a FAME mix which was used as a standard.

2.4 Sample preparation for ²H SS-NMR analysis and viability assays

Freshly collected bacterial cells were centrifuged at 4000 rpm for 10 min to remove the culture medium. Pellets were then suspended in a saline sterile rinsing solution (9‰ NaCl) to remove any residual FAs and detergent molecules, and centrifuged again at 3800 rpm for 5 min. Rinsing was carried out at least 3 times, twice with saline solution prepared with nanopure water, and a final wash with saline solution prepared with deuterium-depleted water. The final pellet was used to fill a 4-mm zirconium oxide rotor, which corresponds to approximately 90 mg of hydrated bacteria. NMR experiments were performed on deuterated bacteria harvested at three different growth times (mid-log, early stationary phase and late stationary phase) and prepared in triplicate.

Following NMR experiments *V. splendidus* viability was determined using MTT reduction assays (Wang *et al.*, 2010). Cell suspensions from NMR samples were diluted in 5 replicates to a final OD_{600nm} of 0.1 each, and were mixed with MTT solution (5mg/ml) to a ratio of MTT/cell suspension of 1:10 (v/v). The mixture was incubated in Eppendorf tubes for 20 minutes at 25°C with open caps until the formation of formazan crystals. Preparations were centrifuged (10.000g ×1min.) and the crystal pellets were dissolved in dimethylsulfoxide and incubated at room temperature for 15 minutes. Optical density was measured at 550 nm and cell viability of bacteria was expressed in relative percentage compared to freshly harvested bacteria before rinse. MTT assays were performed on triplicates of cultures corresponding to the NMR samples.

2.5 *In vivo* ^2H SS-NMR experiments and moment analysis

All ^2H solid-state NMR experiments were performed at 25°C on a Bruker Avance HD III wide Bore 600 MHz spectrometer (Billerica, MA, USA) using a double-resonance magic angle spinning (MAS) probe tuned to 92.1 MHz. Sample spinning frequency was set to 10 kHz. Typically, spectra were acquired using a Hahn Echo pulse sequence ($90^\circ\text{-t-}180^\circ\text{-t}$) with the following operating conditions: 5 μs 90° pulses separated by an echo delay of 100 μs and a recycle time of 0.5 s. Each spectrum was obtained in approximately 43 min of acquisition time, corresponding to 4096 scans. A total of 32k points were acquired for a spectral width of 500 kHz. Spectra were Fourier transformed after application of a 50 Hz exponential line broadening and zero filling to 64k points.

Spectral moment analysis was performed using MestRenova software V6.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain) and a macro developed by Pierre Audet (Université Laval). The second moment (M_2) was calculated as described in the following equation (Warnet *et al.*, 2016):

$$M_2 = \omega_r^2 \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N^2 A_N}{\sum_{N=0}^{\infty} A_N} = \frac{4\pi^2 v_Q^2}{5} \langle S_{CD}^2 \rangle$$

where ω_r is the angular spinning frequency, N the side band number, and A_N the area of each sideband obtained by spectral integration, S_{CD}^2 is the mean square order parameter, and v_Q is the static quadrupolar coupling constant equal to 168 kHz for a C-D bond in acyl chains (Burnett et Muller, 1971).

3. RESULTS

3.1 Optimized ^2H labelling of *V. splendidus* for *in vivo* SS-NMR

The enzymatic machinery of bacteria energetically favours the incorporation of exogenous FAs into phospholipids (Marcotte et Booth, 2014), thus enabling the incorporation of deuterated PA chains exclusively in the membranes. We based our ^2H labelling procedure of *V. splendidus* on a previously published protocol for another Gram(-) bacterium, *Escherichia coli*, which involved micellization of FAs by DPC in the growth medium to facilitate the FA uptake. However, since the presence of surfactants could be

harmful to bacteria, and since another surfactant (Brij-58) had been used by other groups (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011), we tested a series of detergents to identify the best suited for optimal bacterial lipid deuteration. Therefore, Tween-20, Brij-35, DPC, Triton-X, CHAPS and OG were assessed. To do so, we first monitored bacterial growth in different culture media when mixing protonated palmitic acid (PA) with these non-anionic surfactants above their CMC. Figure 41 shows that Tween-20 is the less harmful detergent for the lipid deuteration of *V. splendidus*, and that a high concentration of bacteria is measured even at a detergent concentration of 0.25 mM, *i.e.*, well above Tween-20's CMC (0.06 mM). A concentration of 0.14 mM of Tween-20 was thus employed for the rest of the study because it allows complete solubilization of PA (concentration of 0.3 mM) without affecting the bacterial culture.

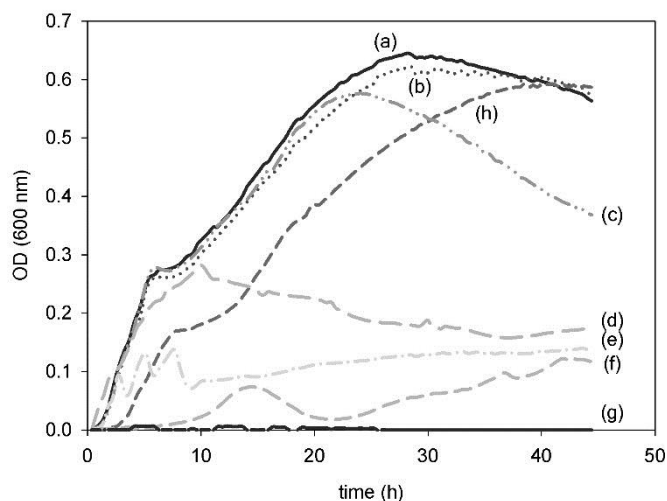


Figure 41 : Effect of different surfactants on *V. splendidus* growth. Control (a) experiment using the growth medium, and was compared to the following detergents at their CMC: Tween-20 (b), Brij-35 (c), DPC (d), Triton-X (e), CHAPS (f) and OG (g). Tween-20 was also tested at 0.25 mM (h).

The deuteration of *V. splendidus* membrane lipids was then verified by ^2H SS-NMR. The second spectral moment M_2 was calculated to assess the membrane fluidity. When specific quadrupolar splittings cannot be measured, M_2 values are good reporter of the spectral distribution which reflects the lipid phases - the greater the M_2 value, the greater the lipid ordering. Figure 42 B-C shows that the deuteration protocol used herein was successful as a good signal-to-noise ratio is observed *in vivo* by ^2H SS-NMR when bacteria are sampled in the exponential growth phase.

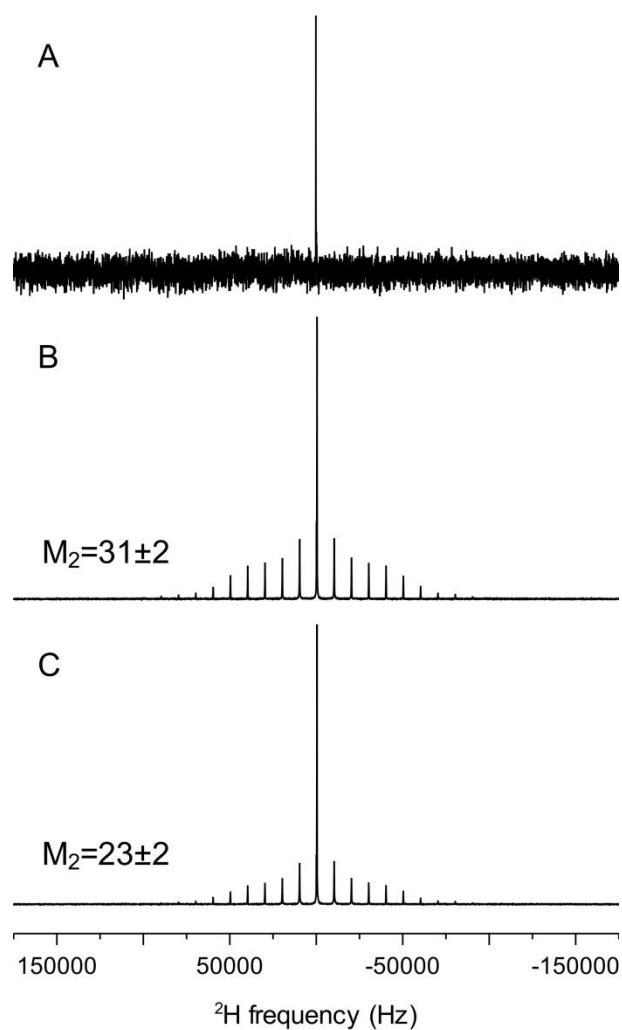


Figure 42 : *In vivo* ^2H MAS (10 kHz) SS-NMR spectra of *V. splendidus* harvested in the mid-log phase. Control experiment corresponding to bacteria labelled with d_{31} -PA without detergent (A), bacteria labelled with d_{31} -PA in the presence of Tween-20 (0.14 mM) without (B), and with (C) OA (1:1). Spectra are normalized according to the central peak. Average second spectral moments M_2 are indicated (10^9 s^{-2}).

The importance of the surfactant-mediated micellization step can be seen in Figure 42A which shows that when d_{31} -PA is used without Tween-20, no side bands can be detected (*i.e.*, there is no labelling). Figure 42C also shows that supplementing the culture medium with oleic acid (OA) in addition to d_{31} -PA leads to a reduction in side bands intensities, indicating an increase in membrane fluidity further demonstrated by the decrease in M_2

value. These findings suggest that both unsaturated (OA) and saturated (d_{31} -PA) FAs were integrated by the cell. The *in vivo* NMR conditions during *V. splendidus* analysis were confirmed by estimating the bacterial viability, which was $95 \pm 5 \%$.

3.2 Fatty acid composition as a function of cell growth and labelling conditions

Since the labelling protocol was successful, the membrane FA profile was monitored in order to quantify the assimilation of exogenous FAs at different growth stages and assess the potential impact of ^2H labelling on the membrane. Lipid analyses were thus performed on labelled and non-labelled bacteria and comparisons established between growth media enriched with d_{31} -PA, with and without OA. Cell growth data are presented in the “*Supplementary material*” section. Figure 43 shows that the incorporation of d_{31} -PA is indeed successful and that 77% of the PA acyl chains in the membrane are deuterated during the mid-log phase for *V. splendidus* grown in the presence of d_{31} -PA (amounting to 44% of all FAs). The deuteration level of PA is maintained as high as 69% (31% of all fatty acids, numerical values are reported in *Supplementary material*, Table SI1) when OA is added in the growth medium, in spite of the high incorporation of OA into the membranes lipids. In the early stationary phase, the level of deuterated PA remains high, at 75% of PA (or 32% of all FAs). When OA is added, this deuteration level is reduced to 55% (18% of all FAs), but it is still sufficient to generate a good ^2H -NMR signal (see Figure 44B).

Depending on the growth regimes, *V. splendidus* FA profile reveals more than 15 different FA chains with three major and recurring components: palmitoleic acid (C16:1), PA (C16), and OA (C18:1) (Fig.41). Our results (Fig. 41A) indicate that deuteration with d_{31} -PA respects the native composition of *V. splendidus*. In addition, exogenous OA was highly incorporated during the exponential phase, at the expense of palmitoleic acid - the most naturally abundant UFA in *V. splendidus* membranes. The choice to enrich the culture with OA as an UFA was to balance as much as possible the incorporation of saturated d_{31} -PA and to allow comparison with previously published deuteration protocols for other bacteria such as *E. coli* (Pius *et al.*, 2011; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016). It also

enabled exploring the adaptability of *V. splendidus* to integrate exogenous FAs and to modulate its FA chain fluidity accordingly.

Indeed, bacteria responded to the enrichment with both exogenous FAs by including them in their lipid profile, more strikingly during the exponential phase, without affecting much the proportions of the other FAs (Fig. 41B). Permutational multivariate analysis of variance (Permanova) on Bray-Curtis matrices (Primer 7.0.13) of FAs composition of cell culture from different treatments and growth phases reveal significant interaction between both factors (DF = 2 and 22, Pseudo-F = 4.05, $p = 0.005$). Pair-wise Permanova comparison test indicates more specifically where differences were observed. Interestingly, the FA compositions were similar to that of the native bacteria membranes during the plateau phase (Fig. 41A), suggesting an adaptation of the bacteria to the growth medium ($p = 0.089$). In contrast, growing bacteria with only d_{31} -PA leads to a more altered FA profile ($p = 0.002$). For instance, the major FA chains for *V. splendidus*, *i.e.*, palmitoleic acid, was reduced by more than half, and other UFAs such as cyclopropane FAs (cyC17:0 and cyC19:0) were highly synthesized under this regime (see *Supplementary material*).

Under labelling conditions, both with and without OA, the SFA/UFA ratios were higher in the exponential phase than in the stationary phase. This pattern is due to increased biosynthesis of UFAs such as palmitoleic acid (C16:1) or cyclopropane FAs (cyC17:0 and cyC19:0). It should also be noted that the SFA/UFA ratio of bacteria labelled in the presence of OA and during early stationary phase (SFA/UFA = 0.65 ± 0.01) was close to that of unlabelled cultures which was about 0.59 ± 0.05 and 0.60 ± 0.01 during mid-log and early stationary phases, respectively.

3.3 Membrane fluidity characterization by SS-NMR

The ^2H SS-NMR spectra obtained for the labelled bacteria (Figure 44) show that membrane rigidity varies with cell division. Under the same growth conditions (d_{31} -PA with OA) and in a timeframe of 5 hours, a reduction was observed in the sideband intensity and number. Accordingly, the M_2 values dropped by half going from the mid-log to the stationary phase. These results are consistent with the decreased SFA/UFA ratio which

reveal an increase in membrane fluidity as a function of growth time under the same growth conditions.

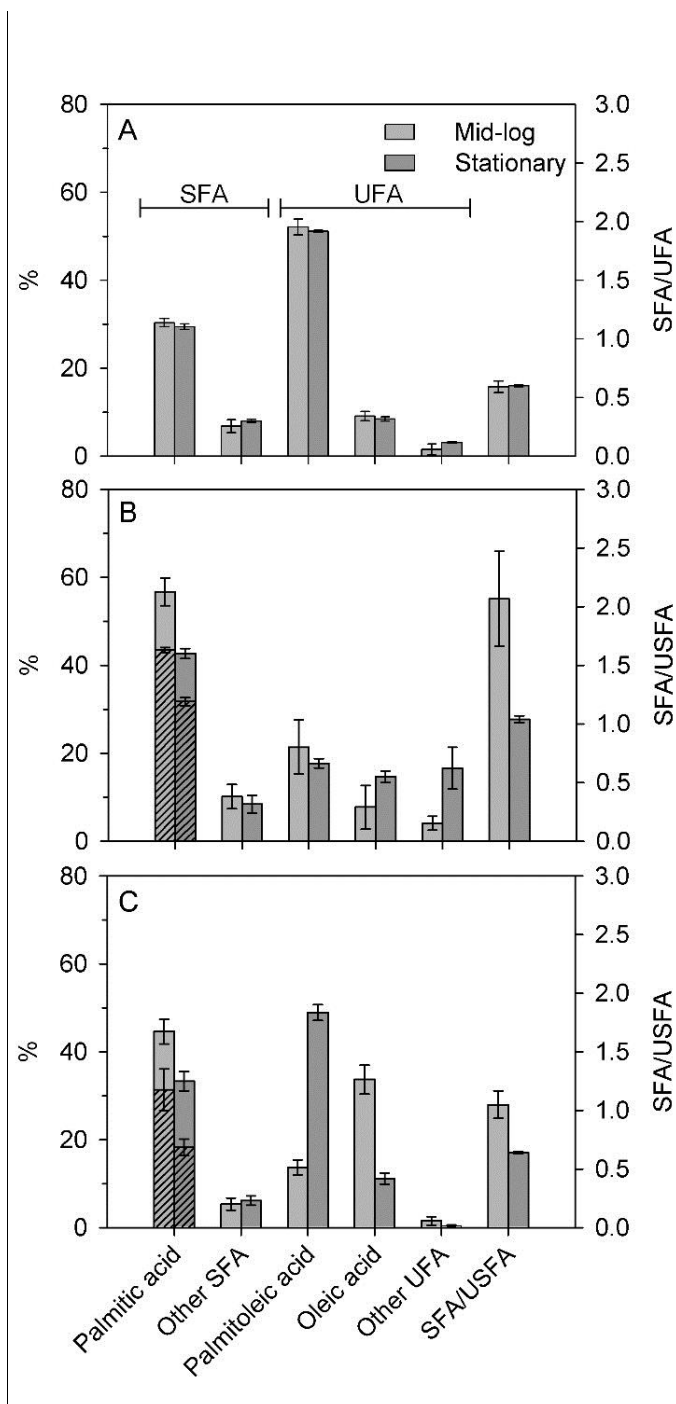


Figure 43: Fatty acid composition and corresponding SFA/UFA ratio at exponential (mid-log) and early stationary growth phases of *V. splendidus* in the presence of exogenous FAs. (A) Control sample in LB medium, (B) in presence of d_{31} -PA, and (C) in presence of d_{31} -PA and OA (1:1).

Other SFAs includes lauric, myristic, pentadecanoic, hepta-decanoic, stearic and arachidic acids (see complete assignment in table SII). Other UFAs include myristoleic, eicosenoic, linoelic, stearidonic, pentadecanoic, cyclopropaneocatanoic (cyC17:0), and (cyC19:0) acids (see complete assignment in table SII). Hatched histograms indicate the relative proportion of d_{31} -PA per total palmitic acid. Saturated/unsaturated fatty acid ratios were calculated from FA content expressed in mol% per total FA (See S.I). Growth temperature was 25°C for all cultures.

4. DISCUSSION

4.1 ^2H labelling optimization for *in vivo* study of membranes by ^2H SS-NMR

Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy has gained an appreciated reputation among biologists, thanks to its low energy radiation in the radio frequency range, that causes no detrimental effects on biological tissues (Reckel *et al.*, 2005). This property has allowed NMR to tackle different living systems (cells or tissues) which is referred to as *in vivo* NMR (Reckel *et al.*, 2005; Serber *et al.*, 2005; Warnet *et al.*, 2015). Labelling is a common strategy in NMR and deuterium labelling of lipid chains is a useful approach to explore changes occurring in biological membranes using SS-NMR. However, when studying living organisms, the deuteration protocol could be a disturbing factor to physiological pathways or induce stress. Previously published work has established the feasibility and pertinence of bacterial membrane deuteration on human pathogens *E. coli* and *B. subtilis* (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016).

Here, a marine bacterium, *V. splendidus*, is deuterated for the first time while minimizing disturbances on the microorganism. Although *V. splendidus* and previously characterized *E. coli* (Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016) are both Gram(-) bacteria, differences in ^2H SS-NMR spectra between these two species were expected, due, perhaps to species-specific biological requirements (Farmer, 2006; Gauthier-Clerc *et al.*, 2013).

The capacity of the bacteria to grow under our labelling conditions was first verified. While deuteration of molecules such as FAs does not affect their structure and thermodynamical stability, surfactants used to facilitate the deuterated FA incorporation into the bacteria (Dal Molin *et al.*, 2011), could have a detrimental effect since detergents are commonly used for biochemical applications such as extraction of membrane proteins. Therefore, the physiological state of the bacteria during labelling procedure was monitored using growth kinetics, and our results showed that Tween-20 had the lowest impact. This result is in agreement with Schuck *et al.* who compared sensitivities of diverse cells toward

a set of detergents and showed that Tween-20 was always the least effective in provoking membrane resistance, and the best at preserving membrane integrity (Schuck *et al.*, 2003).

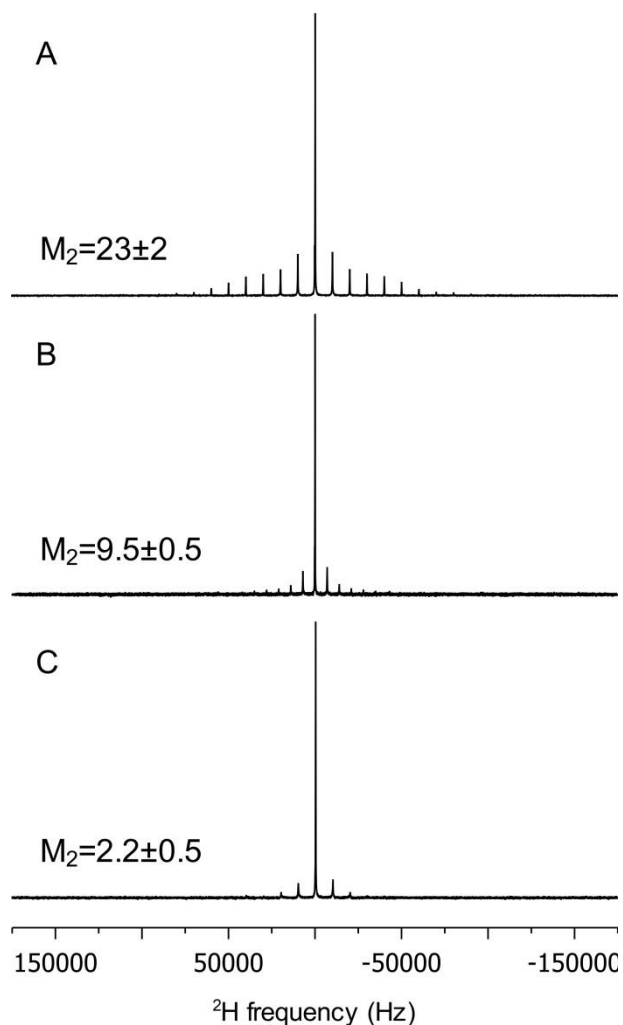


Figure 44 : ^2H MAS (10 kHz) SS-NMR spectra of intact *V. splendidus* harvested at three different cell growth times. (A) after 15 h in the mid-log phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.3$), (B) after 22 h ($\pm 2\text{h}$) at the beginning of the stationary stage ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.5$), and (C) after 30 h at advanced stationary phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.5$). Bacteria were labelled with d_{31} -PA in presence of OA. Average second spectral moments M_2 are indicated (10^9 s^{-2}).

Tween-20 has a low CMC, does not affect protein activity, and is rarely used for cell lysis or protein extraction, but rather as a gentle washing agent. (Schuck *et al.*, 2003; Johnson, 2013). On the other hand, although harmless for the first 10 hours of culture, the zwitterionic detergent DPC used to deuterate *E. coli* and *B. subtilis* lipids showed a hampering action on *V. splendidus* at longer exposure time, which could be explained by its ability to break protein-lipid and lipid-lipid associations (le Maire *et al.*, 2000; Johnson, 2013).

De novo synthesis of FAs is the most energetically expensive mechanism in phospholipid synthesis for bacteria membrane (Zhang et Rock, 2009). Because they do not have specialized functional cellular compartments, prokaryotic organisms rely on multiple regulation tools to control their phospholipid composition according to the niche in which they live (Byers, 1989; Shibuya, 1992; Barton, 2005; Freese *et al.*, 2009; Zhang et Rock, 2009). Overall, bacteria tend to sustain their membrane homeostasis through adaptation mechanisms by maintaining zwitterionic/anionic, protein/lipid (Shibuya, 1992) or FA chain ratios (Silbert *et al.*, 1968). The SFA/UFA ratio is one of the most used reporters of membrane fluidity (Beney et Gervais, 2001; Mykytczuk *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015) as well as bacterial adaptive strategies (Rock et Jackowski, 1985; Beney et Gervais, 2001; Denich *et al.*, 2003; Mykytczuk *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015). Our results showed that when PA was added in the growth medium of *V. splendidus* without OA, bacteria adapted by synthesizing more cyclic fatty acids (cyC17:0 and cyC19:0) that restored membrane fluidity. Similarly, when OA was also added and despite the fact that OA is not the major UFA in *V. splendidus*, this FA was highly integrated in the exponential phase, resulting in a FA profile similar to that of unlabelled bacteria. The SFA/UFA ratios determined here confirm the need to enrich the medium with UFAs during labelling with d₃₁-PA in order to avoid extreme shifts from the natural lipid composition (Fig. 41), in agreement with previous work carried out on *E. coli* (Pius *et al.*, 2011; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016).

In short, our lipid deuteration protocol on *V. splendidus* allowed a similar or better labelling rate as compared to previous work on bacteria. Lipid profile analyses showed that at least 69% deuteration of C16:0 acyl chains was observed in the exponential phase. This deuteration level is slightly higher than what was reported for *E. coli* grown in the presence of d₃₁-PA (Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016). Except for minor differences in the FA incorporation process (Byers, 1989) and a different culture time lapse, the lipid metabolism of *Vibrio* species is very similar to *E. coli*'s since they are both Gram(-) bacteria with similar transcriptional regulatory genes for FA metabolism and phospholipid

composition (Silbert *et al.*, 1968; Rock et Jackowski, 1985; Byers, 1989; Zhang et Rock, 2009).

4.2 Membrane evolution during bacterial growth

Our results showed that the membrane fluidity varied with bacterial growth during the labelling process. Indeed bacteria experience the fastest growth rate in the exponential phase during which they produce membrane lipids (Barton, 2005). Once lipids are synthesized, the lipid profile remains the same until the stationary phase is reached, *i.e.*, when nutrients become limited, DNA replication, protein synthesis and respiration are reduced, and cell lysis begins (Carty et Ingram, 1981). Previous *in vivo* NMR studies have been carried out on bacteria sampled at the mid-log growth stage (Pius *et al.*, 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016) which provides excellent NMR signal-to-noise ratio. However, our results revealed that samples obtained at later stages, especially the early stationary stage, provide a sufficient labelling for a good NMR signal-to-noise ratio, as well as additional advantages.

Indeed, GCMS analyses showed that exogenous PA and OA were highly integrated in the membrane at mid-log phase during which they become the most abundant FA chains in the membrane (Figure 43). In subsequent growth stages, PA and OA diminished to reach more “native” proportions (*i.e.*, those measured in the control samples), while the amount of palmitoleic acid increased through an unknown mechanism, that could imply FA conversion or exchange, the addition of double bond or a CH₂, or the synthesis of new FAs. This is consistent with other investigations on *Vibrio* species, showing that exogenous FAs are incorporated by direct trans-acylation or after incorporation into the biosynthesis pool (Byers, 1989). Additionally, the SFA/UFA ratio, which decreased as a function of growth time, reaching that of unlabelled bacteria (especially when both PA and OA were added to the culture medium), validate the evolution of the FA profile. The ²H SS-NMR spectra also reveal an increase in membrane fluidity as a function of *V. splendidus* growth stages when d₃₁-PA, and to a lesser extent when equal proportions of OA and d₃₁-PA, are added to the growth medium (Figure 44). In the exponential phase, a more rigid membrane

was observed, close to a gel phase (M_2 above $20 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$), whereas in later stages the M_2 value was closer to that of a fluid phase membrane (M_2 below $10 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$) (Warnet *et al.*, 2016). Since the FA composition and SFA/UFA ratio were closer to their “native” values in the early stationary phase, the lower M_2 values would thus report with biological membranes in the fluid phase (Morein *et al.*, 1996).

The contribution of signal from free d_{31} -PA cannot explain the change in lipid profile during cell growth. Indeed, Figure 42A shows no ^2H SS-NMR signal after rinsing. Additionally, free d_{31} -PA is insoluble in water and would lead to a very broad ^2H SS-NMR spectrum with M_2 above $70 \times 10^9 \text{ s}^{-2}$ (data not shown), which is incompatible with our results. Moreover, the ^2H SS-NMR spectrum of d_{31} -PA crystals would not vary with growth time. In light of these results, the increase in membrane fluidity with cell growth time would be explained by a gradual adaptation of the microorganism metabolism upon isotopic labelling to cope with possible stress and disturbance of metabolic pathways (Beney et Gervais, 2001; Mykytczuk *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2015) due to chemical isotopic labelling. In most cases, stress is known to lead to an increase in membrane rigidity, although the opposite pattern could happen in the case of marine prokaryotic organisms, and specifically for *Vibrio* species (Oliver et Stringer, 1984; Yoon *et al.*, 2015). The increased fluidity due to increased UFA proportions, and notably cyclopropanes FAs observed when PA was added in the growth medium, seems to prove such environmental stress (O'Leary, 1962; Yoon *et al.*, 2015). However, when both PA and OA were present in the medium, cyclopropane FA proportions were inverted (Table SI1), suggesting that stress was reduced (O'Leary, 1962). Similarly, the superimposed growth curves (see Fig. SI1) indicate that *V. splendidus* metabolism kinetics under isotopic labelling was not affected by labelling stress. Therefore, the FAs turnover would be fast and all exogenous d_{31} -PA transferred into the membrane lipids at the mid-log phase. Yet, being long and saturated, they would induce large M_2 values. In the early stationary phase, bacteria would have had enough time to regulate their metabolism to the presence of exogenous FAs in the growth medium, generally through adapting their enzymatic machinery (Barton, 2005), and have

either converted into or synthesized new UFAs in order to reduce the membrane rigidity, and reach their initial membrane state, as observed by the reduced M_2 values.

5. CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Setting out labelling procedures is an important step towards developing effective and reliable tools for *in vivo* NMR studies. Here, membranes of intact *V. splendidus* were characterized for the first time by SS-NMR, as a model of marine Gram (-) bacteria. This work provides a better understanding of changes in bacterial membrane properties as a function of growth time and conditions that have never been studied so far on any biological system by *in vivo* NMR. Overall, the present study should help in the design of efficient labelling protocols of bacteria, which takes into account not only the technical spectroscopy requirements for analyses (such as signal-to-noise ratio) but also biological considerations. This ^2H labelling protocol is useful for ^2H SS-NMR, but could also be useful for neutron diffraction, or extended to the labelling of cell membranes by other isotopes such as ^{13}C . Additionally, by characterizing the membrane of *V. splendidus*, a potential virulent bacterium for marine organisms, this work paves the way towards studying the interactions of its membrane with exogenous molecules in the aquatic environment.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (grant 326750-2013 to I.M. and grant 299100 to R.T.) and the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 7099 to D.E.W.). Z.B. would like to acknowledge the Ressources Aquatiques Québec (RAQ) research network (RS-171172) for the award of scholarships and Pierre Audet for sharing the MestRenova macro. I.M. and R.T. are members of the RAQ.

Supplementary Materials

(i) Effect of labelling on bacterial growth

Growth curves were acquired by periodic measurements of optical density (OD) at 600 nm for cultures enriched with exogenous fatty acids. Figure SII shows that supplementing the culture medium with either d_{31} -PA or the combination of d_{31} -PA and OA in the presence of Tween-20 did not induce major shifts in the delimitations of the growth phases. The transition between exponential and stationary phases was smooth, making delimitations hard to define. Typically, we define the mid-log phase occurring 15h to 16h after inoculation, if we consider stationary phase beginning around 25h and fully established after 30h of growth. Specific growth rates (μ) (see Materials & Methods) were calculated and showed no significant differences in the various labelling regimes of the cell growth (Fig. SII). Similarly, whilst maximum optical densities in the enriched medium were slightly below those of the control, log phases durations were exactly the same (about 3 hours), indicating a good bacterial adaptation and no particular stress or toxic effect on growing bacteria in the ^2H enriched medium.

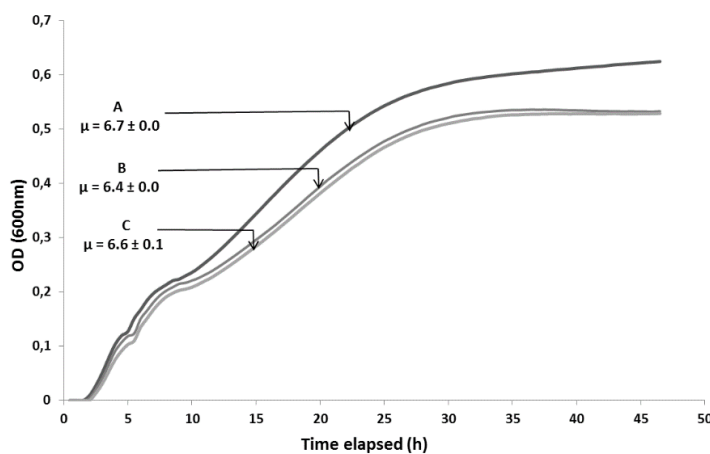


Figure SII: Representative growth patterns of *V. splendidus* in culture medium (A), culture medium enriched with d_{31} -PA (B), with d_{31} -PA and OA (C) in presence of Tween-20. Cells were inoculated from cultures that had previously grown for 2 days. Specific growth rate (μ) was deduced from the first 25 hours of culture.

(ii) Fatty acids contents

Table S11: FAs content in *V. splendidus* expressed in molar % per total FA content, deuterium fatty acid expressed in % per total palmitic acid and SFA/UFA ratio with cell growth phases under different labelling regimes: *V. splendidus* grown in control LB-medium, in medium enriched with d₃₁-palmitic acid, and in medium enriched with d₃₁-palmitic acid and oleic acid. Bacteria were sampled during the exponential (Mid-log) and early stationary phase. Growth temperature was 25°C for all cultures.

Fatty Acid	Control		medium + d ³¹ -PA		medium + d ³¹ -PA + OA	
	Mid-log	Stationary	Mid-log	Stationary	Mid-log	Stationary
² H-Palmitic acid ² H-C16:0	0.09 (0.13)	n.d.	43.5 (0.6)	31.7 (0.9)	31.4 (4.7)	18.35 (1.8)
¹ H-Palmitic acid ¹ H-C16 :0	30.2 (0.9)	29.4 (0.7)	13.2 (3.7)	10.9 (1.2)	13.2 (1.9)	15.1 (0.4)
isotopic labelling %	n.a.	n.a.	77%	75%	69%	55%
Total Palmitic acid C16:0	30.3 (1.0)	29.4 (0.7)	56.7 (3.1)	42.6 (1.1)	44.6 (2.8)	33.4 (2.2)
Palmitoleic acid C16:1	52.11 (1.78)	51.2 (0.2)	21.38 (6.12)	17.7 (1.1)	13.7 (1.7)	49.1 (1.8)
Oleic acid C18:1	9.1 (1.0)	8.4 (0.5)	7.7 (4.9)	14.7 (1.1)	33.7 (3.3)	11.2 (1.2)
Lauric acid C12:0	1.35 (0.18)	1.17 (0.02)	3.14 (1.37)	2.12 (1.08)	0.96 (0.37)	0.83 (0.22)
Myristic acid C14:0	3.72 (0.65)	3.87 (0.07)	4.57(0.74)	5.58 (0.42)	2.89 (0.79)	3.34 (1.33)
Pentadecanoic acid C 15:0	0.23 (0.18)	0.14 (0.10)	0.19 (0.07)	0.03 (0.04)	0.29 (0.22)	0.15 (0.14)
Heptadecanoic acid C17:0	0.26 (0.2)	0.13 (0.19)	0.21 (0.06)	n.d.	0.13 (0.11)	0.33 (0.36)
Stearic acid C18:0	1.22 (0.32)	2.65 (0.10)	1.92 (1.15)	0.67 (0.43)	0.97 (0.20)	1.18 (0.08)
Arachidic acid C20:0	0.05 (0.10)	n.d.	0.08 (0.12)	n.d.	0.12 (0.15)	n.d.
Myristoleic acid C14 :1	0.16 (0.24)	0.09 (0.13)	0.29 (0.11)	0.07 (0.10)	n.d.	0.16 (0.12)
cis-10-pentadecanoic acid C15:1	0.012 (0.027)	n.d.	0.11 (0.15)	n.d.	n.d.	n.d.
Cyclopropaneoctanoic acid-2-hydroxyl acid C17:1(cyC17:0)	0.19 (0.18)	n.d.	0.97 (0.52)	11.63 (0.48)	0.53 (0.45)	0.30 (0.40)
Stearidonic acid C18:4n	n.d.	n.d.	0.92 (0.86)	n.d.	0.24 (0.23)	n.d.
Alpha-linoleic acid C18:3n3	0.03 (0.08)	n.d.	0.96 (0.92)	n.d.	0.25 (0.21)	n.d.
Cyclopropaneoctanoic acid, 2-octyl acid C19:1(cyC19:0)	0.11 (0.16)	n.d.	0.32 (0.31)	4.95 (0.87)	0.52 (0.40)	n.d.
Eicosenoid FA C20:1n9 + C20:2 + C20:4n6 +C20:5n3	1.03 (1.18)	2.94 (0.06)	0.48 (0.48)	n.d.	n.d.	n.d.
Total SFA	37.16 (1.96)	37.37 (0.43)	66.86 (4.03)	50.06 (0.73)	51.06 (2.87)	39.24 (0.51)
Total UFA	62.73 (1.97)	62.63 (0.43)	33.15 (4.03)	49.94 (0.73)	48.94 (2.87)	60.76 (0.44)
SFA/UFA	0.59 (0.05)	0.60 (0.01)	2.07(0.40)	1.04 (0.03)	1.05 (0.12)	0.65 (0.01)

Values corresponds to means and respective standard deviations

"n.d." indicates that these measurements could not be detected

"n.a." indicates that these measurements are not applicable (unlabelled medium)

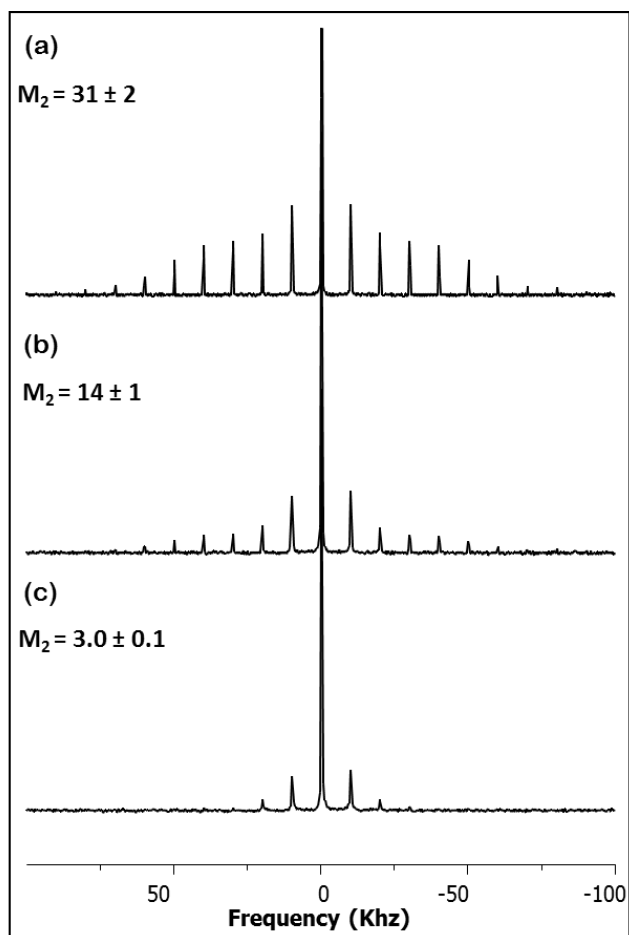
(iii) NMR spectra of bacteria enriched with d_{31} -PA in presence of Tween-20

Figure SI2: ^2H MAS (10 kHz) SS-NMR spectra of intact *V. splendidus* harvested at three different cell growth times: (a) after 15 h in the mid-log phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.3$), (b) after 22 h ($\pm 2\text{h}$) at the beginning of the stationary stage ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.5$), and (c) after 30 h at advanced stationary phase ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.5$). Average second spectral moments M_2 are indicated (10^9 s^{-2}).

CHAPITRE 4

APERÇU DU MÉCANISME D'INTERACTION DE LA MARENNINE AVEC *VIBRIO SPLENDIDUS* PAR RMN-²H DE L'ÉTAT SOLIDE *IN VIVO*

Ce deuxième article, intitulé « *Insight into the interaction mechanism of marennine with Vibrio splendidus as seen by in vivo ²H solid-state NMR* », fut corédigé par moi-même ainsi que par les professeurs Jean-Sébastien Deschênes, Jean-Luc Mouget, Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. La version présentée ici sera soumise au journal BBA-Biomembranes, au cours de l'année 2019. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement de la méthode, l'exécution des expériences et la rédaction de l'article. Le professeur Jean-Sébastien Deschênes a aidé au développement des méthodes reliées à la production et à la purification de la marennine. Le professeur Jean-Luc Mouget a fourni la souche d'algue *Haslea ostrearia*. Les professeurs Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte, ont initié et guidé le projet. Ils ont aidé à l'élaboration de la problématique et au développement méthodologique. Tous les coauteurs ont participé à la révision du manuscrit.

Les résultats de cet article ont fait l'objet de présentations dans des congrès nationaux et internationaux, comme l'Association Aquaculture Canada (Québec, Canada), Physiomar17 (Cambridge, Royaume-Uni) et le Chapitre Saint-Laurent (Montréal, Canada).

- Zeineb Bouhlel, François Turcotte, Jean-Sébastien Deschênes, Isabelle Marcotte et Réjean Tremblay. Marennine a potential alternative antibiotic to Polymyxins in aquaculture? Association Aquaculture Canada 2018 (Québec Canada), **présentation orale**, 29 Mai 2018.
- Zeineb Bouhlel, François Turcotte, Jean-Sébastien Deschênes, Isabelle Marcotte et Réjean Tremblay. Prophylactic effect of marennine pigment in bivalve hatchery

productions and molecular characterization of its interaction with *Vibrio splendidus* membrane. Physiomar17 (Cambridge, R-U), **présentation orale**, 19 septembre 2017.

- Zeineb Bouhleb, Alexandre Arnold, Dror E. Warschawski, Karine Lemarchand, Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. Caractérisation par spectroscopie RMN de la membrane des bactéries marines *Vibrio splendidus* pour l'étude des mécanismes d'action de la marennine. Chapitre Saint-Laurent (Montréal, Canada), **présentation orale**, 16 juin 2017.

Isabelle Marcotte et Réjean Tremblay ont également présenté une partie des résultats de cet article dans le congrès de l'ISMAR à Québec (Canada) et dans le congrès d'International Society for Applied Phycology, à Nantes (France), respectivement :

- Isabelle Marcotte, Alexandre A. Arnold, Marwa Laadhari, Zeineb Bouhleb, Jean-Philippe Bourgouin, Frances Separovic et Dror E. Warschawski. Solid-state NMR of intact cells – approaches and challenges. 20th ISMAR Meeting (Quebec, Canada), 26 juillet 2017.
- Réjean Tremblay, François Turcotte, Bertrand Genard, Karine Lemarchand, Jean-Sébastien Deschênes, Zeineb Bouhleb, Isabelle Marcotte et Jean-Luc Mouget. Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* culture supernatant containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production (Nantes, France), 18 au 23 juin 2017.

RÉSUMÉ

Ce travail étudie le potentiel de l'effet antibiotique / antipathogène de la marennine - un pigment naturel produit par la diatomée *Haslea ostrearia* - sur *Vibrio splendidus*. Ces bactéries marines sont souvent considérées comme une menace pour l'aquaculture. Des antibiotiques chimiques sont souvent nécessaires pour réduire les épidémies bactériennes. La RMN *in vivo* de l'état solide du ^2H a été utilisée pour sonder les effets de la marennine sur la paroi de la bactérie durant les phases exponentielles et stationnaires. Des comparaisons ont été effectuées avec la polymyxine B (PxB), un antibiotique utilisé en aquaculture et connu pour interagir avec les membranes des bactéries de Gram(-). Les bactéries avec des chaînes acyles phospholipidiques marquées au ^2H ont été exposées à la marennine et à la PxB en dessous et à la concentration inhibitrice minimale. Nos résultats montrent que la marennine réduit la fluidité membranaire aux deux concentrations et durant tous les stades de croissance, alors que cet effet n'a été observé qu'en utilisant les faibles concentrations de PxB. Nos résultats suggèrent que les deux agents antimicrobiens perturbent les membranes de *V. splendidus* à travers des mécanismes différents. Alors que le PxB modifierait les membranes internes et externes des bactéries, la marennine agirait à travers un mécanisme de resserrement, ce qui pourrait impliquer une interaction avec les lipopolysaccharides de la membrane externe et/ou une isomérisation induite par les acides gras insaturés. Notre étude propose ce pigment microalgal, inoffensif pour l'homme, comme traitement potentiel contre la vibriose.

MOTS CLÉS

Antibiotique, RMN *in vivo*, rotation à l'angle magique, mécanisme d'action, fluidité membranaire, polymyxine, *Vibrio*

**INSIGHT INTO THE INTERACTION MECHANISM OF MARENNINE WITH *VIBRIO SPLENDIDUS*
AS SEEN BY *IN VIVO* ^2H SOLID-STATE NMR**

Zeineb Bouhlef^{1,2}, *Jean-Sébastien Deschênes*³, *Jean-Luc Mouget*⁴, *Réjean Tremblay*¹ and
Isabelle Marcotte^{2*}

¹ Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 allée des Ursulines G5L 3A1, Rimouski, Canada

² Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown Station, H3C 3P8, Montreal, Canada

³ Mathematics, computer science and engineering department, Université du Québec à Rimouski, G5L 3A1, Rimouski, Canada.

⁴ FR CNRS 3473 IUML, Mer-Molécules-Santé (MMS), Le Mans Université Ave O. Messiaen, 72085 Le Mans cedex 9, France

ABSTRACT

This work investigates the potential antibiotic/antipathogen effect of marennine - a natural pigment produced by the diatom *Haslea ostrearia* - on *Vibrio splendidus*. These marine bacteria are often considered as a threat for aquaculture, therefore chemical antibiotics can be required to reduce bacterial outbreaks. *In vivo* ^2H solid state NMR was used to probe the effects of marennine on the bacteria membrane in the exponential and stationary phases. Comparisons were made with polymyxin B (PxB) - an antibiotic used in aquaculture and known to interact with Gram (-) bacteria membranes. Bacteria with ^2H -labelled phospholipid acyl chains were exposed to marennine and PxB below and at minimal inhibitory concentration. Our results show that marennine reduces the membrane fluidity at both concentrations and growth stages, while such effect is observed only at low PxB

concentration. Our results suggest that both antimicrobial agents perturb *V. splendidus* membranes via different mechanisms. While PxB would alter the bacterial outer and inner membranes, marennine would act through a stiffening mechanism, which could imply interaction with lipopolysaccharides in the outer membrane and/or stress-induced isomerization of unsaturated fatty acids. Our study proposes this microalgal pigment, which is harmless for humans, as a potential treatment against vibriosis.

KEYWORDS

Antibiotic, *in vivo* NMR, magic-angle spinning, marennine, mechanism of action, membrane fluidity, polymyxin, *Vibrio*

ABBREVIATIONS

ASW, artificial sea water; BW, blue-water; d₃₁-PA, deuterated palmitic acid; LB, Lysogeny broth; LPS, lipopolysaccharides; M₂, second spectral moment; MAS, magic angle spinning; MIC, minimum inhibitory concentration; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; OA, oleic acid; OD, optical density; PxB, polymyxin B; SSB, spinning side band; SS-NMR, solid-state nuclear magnetic resonance.

INTRODUCTION

According to the World Bank, aquaculture is a growing industry and a promising alternative to the fishery crisis (Msangi *et al.*, 2013). However, like any commercial activity, aquaculture relies on intensive production and in the context of global warming, the stress that cultured animals may undergo can lead to diseases and losses (Paillard *et al.*, 2004; Raja et Jithendran, 2015). Vibriosis – an infection caused by *Vibrio* bacteria - are among the most problematic pathologies in the world for aquatic species (Thompson *et al.*, 2004). *Vibrio* outbreaks are often associated with important mortality and no group of animals are spared (DiSalvo *et al.*, 1978; Crab *et al.*, 2010; Frans *et al.*, 2011; Travers *et al.*, 2015). Notably, *Vibrio splendidus* are almost exclusive to bivalve infection especially

during the first stages of culture (Le Roux *et al.*, 2002; Gay *et al.*, 2004b; Pruzzo *et al.*, 2005a; Holbach *et al.*, 2015; Travers *et al.*, 2015).

For years, aquaculture has counted on antimicrobial agents for prophylactic or therapeutic purposes, and too extensively in some cases such as shrimp and salmon farming (del Carmen Flores-Miranda *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012; Watts *et al.*, 2017). Nowadays, regulations in aquaculture are stricter since bacterial resistance is a considerable issue (Serrano, 2005; Cabello, 2006; Watts *et al.*, 2017). As a consequence, there is a growing need to develop novel therapeutic approaches that are more environmentally friendly and less harmful for food human consumption than conventional synthetic antibiotics (Defoirdt *et al.*, 2011). New strategies include brood-stock conditioning (Holbach *et al.*, 2015), as well as the use of natural biologically active alternatives such as immuno-stimulants, bacteriophages and probiotics (Defoirdt *et al.*, 2007; Ravi *et al.*, 2007; del Carmen Flores-Miranda *et al.*, 2011).

Marennine is a natural blue pigment and a promising therapeutic alternative against Vibriosis in aquaculture (Gastineau *et al.*, 2014; Turcotte *et al.*, 2016). It is secreted by *Haslea ostrearia*, a marine microalga responsible for the noticeable greening of oysters cultured in the French Marennes region and harmless for the consumers (Gastineau *et al.*, 2014). Recent work showed that marennine is a water-soluble 10 kDa polyphenol with possibly a glycosidic skeleton (Pouvreau *et al.*, 2006b; Gastineau *et al.*, 2014). The antibiotic potential of marennine against aquatic Gram(-) bacteria including *Vibrio* species, has already been demonstrated (Gastineau *et al.*, 2012a). More recently, Turcotte *et al.* showed that in the presence of marennine extracts, the pathogenicity of Gram(-) *V. splendidus* was suppressed (Turcotte *et al.*, 2016). However, the action mechanism of marennine towards marine bacteria has not yet been elucidated. Considering the high molecular weight of marennine and its unlikely penetration in the bacterial membrane, the pigment would favor an interaction with the outer-membrane of Gram(-) bacteria, as suggested by a solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) study on *Escherichia coli* (Tardy-Laporte *et al.*, 2013).

The objective of this work was to investigate the action mechanism of marennine towards the marine bacterium *V. splendidus*, more specifically the indigenous environmental strain (7SHRW) isolated from the Saint-Lawrence estuary, and which caused significant mortality of blue mussel and scallop's larvae. Marennine was shown to inhibit the virulent action of this strain (Turcotte *et al.*, 2016). To do so, we studied the interaction of marennine with 7SHRW using *in vivo* ^2H SS-NMR- a technic that provides valuable information on acyl chains dynamics and organization in membrane systems made of deuterated phospholipids (Davis *et al.*, 1976; Seelig, 1977). It is thus a useful tool to examine membrane interactions with exogenous molecules such as detergents, drugs, and peptides, at a molecular level (Chartrand *et al.*, 2010; Bechinger et Salnikov, 2012; Laadhari *et al.*, 2016). Traditionally used to study model membranes, the deuterium labelling of membrane lipids in intact bacteria enabled *in vivo* ^2H SS-NMR experiments on *E. coli* and *Bacillus subtilis* (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016; Booth *et al.*, 2017). Similarly, *V. splendidus* membranes have recently been characterized by ^2H SS-NMR as a function of cell growth, thus facilitating the investigation of the effect of external molecules such as marennine (Bouhleb *et al.*, 2019).

In this work, the effect of marennine on *V. splendidus* membranes at two different growth stages (mid-log and stationary phase) is compared to a commercial antibiotic, polymyxin B (PxB), which has a well-documented action mechanism. Polymyxins are amongst the most commonly used antibiotics in aquaculture (Oliver *et al.*, 1992; Serrano, 2005; Vaseeharan *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2012) and are known to specifically act against Gram(-) bacteria by damaging their membranes (Clausell *et al.*, 2003; Sahalan et Dixon, 2008; Falagas *et al.*, 2010; Deris *et al.*, 2014). However recent regulations have prohibited the use of PxB in aquaculture (Serrano, 2005). By comparing the interaction of marennine and PxB with *V. splendidus* membranes, we propose a possible mechanism involved in the bactericidal action of marennine, and the use of this natural pigment as an alternative to synthetic antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Oleic acid (OA) and deuterated palmitic acid (d_{31} -PA), as well as deuterium depleted water, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and PxB sulfate salt, were all purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Tween-20 (polyethylene glycol sorbitan monolaurate) was acquired from BioShop (Burlington, ON, Canada), whereas LB Broth Miller was obtained from BioBasic (Markham ON, Canada).

The solution of marennine tested was produced by *H. ostrearia* strain NCC-136-isolated from Bourgneuf Bay, France. Microalgae were cultured in filtered seawater with a salinity of 28, at 20°C and with a light level of 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 14/10 h light/dark cycle (Turcotte *et al.*, 2016). The supernatant was then extracted and purified according to previously published methods (Pouvreau *et al.*, 2007; Gastineau *et al.*, 2014; Turcotte *et al.*, 2016).

Bacterial growth and ^2H labelling

V. splendidus 7SHRW strain was previously isolated from sediments of Hillsborough River, Prince Edward Island (Gulf of Saint Lawrence, Canada) (Mateo *et al.*, 2009). Cell culture was initiated by adding 100 μL of a frozen cell stock solution (in 40% glycerol at -80°C in 10 mL LB medium (NaCl 10 g/L, tryptone 10 g/L, yeast extracts 5 g/L), and incubated at 24.5°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) on a rotary shaker (INFORS HT Multitron Pro, USA) operating at 100 rpm. After 3 days of acclimatization, bacteria were grown in LB medium containing equal proportions (0.3 mM each) of OA and d_{31} -PA micellized in 0.14 mM of Tween-20 detergent to insure fatty acid intake, as described in a previous work (Bouhleb *et al.*, 2019). The growth kinetic was monitored with a multiple plate reader (Infinite M200 TECAN, Männedorf, Switzerland) using 24-well plates, by measuring absorbance at 600 nm every 30 min. A total of 3 to 4 wells were used for each treatment.

Antimicrobial activity measurement

The antimicrobial activity of marennine and PxB towards *V. splendidus* was assessed by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) using a serial dilution technique (Yoshida *et al.*, 2001). An LB medium (10 g/L NaCl) was used for all dilutions, and final

concentrations ranged from 1.25 to 400 $\mu\text{g/mL}$ for marennine, and from 1 to 32 $\mu\text{g/mL}$ for PxB. Initial marennine chromatography fraction corresponds to a solution of 0.8 g/L of marennine diluted in distilled water. To avoid marennine waste when high marennine concentrations are used, appropriate volume from the same initial solution was lyophilized and the freeze-dried extract dissolved in a smaller volume before bacteria exposition. A total of 200 μL of initial cell suspension was transferred into a 100-well plate to monitor the growth kinetic with a multiple-plate reader at 25°C. The absorbance at 600 nm was recorded every 30 min over a 48 h period.

Bacteria Exposition for NMR Experiments

Marennine and PxB assays were performed at selected concentrations in triplicate on ^2H -labelled bacteria, harvested at two different moments, *i.e.*, after the mid-log phase and at the early-stationary phase. Bacteria cultures were harvested, centrifuged (2599 g, 10 min) and the supernatant was discarded. Pellets were then washed twice with a sterile 9‰ NaCl solution prepared with nanopure water before exposition experiments. The quantity of exposed bacteria was adjusted to correspond to approximately 10 ± 2 mg (dry weight), estimated from a standard curve relating optical density of the culture and the corresponding dry weight, determined after an overnight pellet lyophilization.

For bacteria exposed to PxB, two concentrations were tested: 1 $\mu\text{g/mL}$ and the MIC. The pellet was suspended in a solution of NaCl (10 g/L) made with ^2H -depleted water, and the appropriate amount of antibiotic was added and vortexed with bacteria before a 10 min incubation step. Samples were then centrifuged (2599 g, 10 min) and the final pellets were immediately analyzed by ^2H SS-NMR. For marennine experiments, ^2H -labelled bacteria pellets were exposed to marennine at 2 $\mu\text{g/mL}$ and at MIC for a minimum of 2h. To avoid membrane collapse, the NaCl solution (10 g/L) was replaced by artificial seawater (ASW) containing NaCl (480 mM), MgSO_4 (28 mM), MgCl_2 (24 mM), CaCl_2 (16 mM) and NaHCO_3 (2.4 mM), adjusted to a pH of 8.0 ± 0.1 . Marennine was then diluted in sterile ASW. Expositions were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks placed on a rotary shaker (100 rpm) and at a temperature of 22 ± 1 °C for 2h. Note that nutrients were purposely discarded during marennine exposition to avoid continuing bacterial growth, and

concomitant changes in membrane fluidity as previously reported (Bouhleb *et al.*, 2019). The lack of nutrients and 2h shaking in ASW have a slight effect on cell viability ($90\% \pm 5$), as estimated with an MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) test (Laadhari *et al.*, 2016). Bacteria exposed to only ASW are considered as a control. The two types of sample pellets (control and bacteria exposed to marennine) came from the same culture replicate.

²H NMR experiments

NMR samples were prepared by collecting bacteria immediately after exposition to PxB or marennine. Medium was discarded by centrifugation at 3175 g for 5 min. Pellets were collected and washed using a 9‰ NaCl solution prepared with ²H-depleted water, then centrifuged at 2599 g for 2 min. The final pellet was used to fill a 4-mm zirconium oxide rotor, which corresponds to approximately 90 mg of hydrated bacteria.

All ²H SS-NMR experiments were performed at 25°C using a Bruker Avance HD III wide bore 600 MHz spectrometer (Billerica, MA, USA) and a double-resonance magic angle spinning (MAS) probe tuned to 92.1 MHz, with spinning frequency of 10 kHz. Spectra were acquired using a Hahn Echo pulse sequence (90°-t-180°-t) with the following operating conditions: 4 μs 90° pulses separated by an echo delay of 96 μs and a recycle time of 0.5 s. Each spectrum was obtained in approximately 43 min of acquisition time, corresponding to 4096 scans. A total of 32k points were acquired for a spectral width of 500 kHz. Spectra were Fourier transformed after the application of zero filling to 64k points, and an exponential line broadening of 40 and 100 Hz for PxB and marennine sample spectra, respectively.

Spectral moment analysis was performed using MestRenova software V6.0 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain) and a macro developed by Pierre Audet (Université Laval). The second moment (M_2) was calculated using the following equation (Warnet *et al.*, 2016):

$$M_2 = \omega_r^2 \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N^2 A_N}{\sum_{N=0}^{\infty} A_N}$$

where ω_r is the angular spinning frequency, N the side band number, and A_N the area of each sideband obtained by spectral integration,

RESULTS

Minimum inhibitory concentration

First, we determined the MIC of marennine and PxB for *V. splendidus* to quantify their antibacterial activity. Growth curves can be found in the “*Supplementary Materials*” section. MIC values of 200 $\mu\text{g/mL}$ and 8 $\mu\text{g/mL}$ were respectively determined for marennine and PxB. Marennine has been so far characterized as a natural polyphenol (Pouvreau *et al.*, 2006b) with a glycosidic structure (Gastineau *et al.*, 2014), and its MIC is in the same range as other plant polyphenol extracts acting on Gram(-) bacteria, *i.e.*, from 70 to 500 $\mu\text{g/mL}$ on *Vibrio* species (Taguri *et al.*, 2004; Taguri *et al.*, 2006; Razafintsalama *et al.*, 2013). As for PxB, its MIC has been reported to range between 1 to 8 $\mu\text{g/mL}$ depending on the bacterial species (Vaara, 2010). A value of 1 $\mu\text{g/mL}$ has been found for *E. coli* (Tardy-Laporte *et al.*, 2013).

A different response of *V. splendidus* towards marennine is also seen as compared to *E. coli*. Tardy-Laporte *et al.* have reported a change in membrane fluidity of *E. coli* exposed to 2 $\mu\text{g/mL}$ of marennine in NaCl (10 mg/L) medium for 15 min (Tardy-Laporte *et al.*, 2013), while a longer exposition time (2h) was required to observe this effect for *V. splendidus* at the same marennine concentration. However, *V. splendidus* showed membrane collapse after 2 hours of exposition in NaCl (10 mg/L) solution. Thus, artificial seawater (ASW) was used to maintain membrane integrity for up to 12 hours (data not shown).

Effect of marennine and polymyxin B on V. splendidus

To better understand the action of marennine and PxB on *V. splendidus*, their effect was studied by ^2H SS-NMR at the MIC but also at a lower concentration, during the exponential and stationary phases. In practice, concentrations below the MIC are typically used in aquaculture (Watts *et al.*, 2017). As demonstrated in a previous work, membrane lipid chains in *V. splendidus* can be ^2H -labelled by growing marine bacteria in a medium enriched with d_{31} -PA (Bouhleb *et al.*, 2019). The presence of OA ensures a lipid profile closer to unlabelled bacteria. A labelling percentage of 69% and 55% can be reached in the exponential and in the stationary phases, respectively. The second spectral moment M_2 was

used as a reporter of the effect on membrane lipid acyl chains (Davis *et al.*, 1979; Pius *et al.*, 2011). The greater the M_2 , the higher the lipid chain ordering. As shown by Warnet *et al.*, combination of MAS to ^2H SS-NMR provides a fast method to ensure the *in vivo* characterization of bacteria (Warnet *et al.*, 2016). *In vivo* conditions were confirmed for *V. splendidus* by estimating the bacterial viability using an MTT reduction assay (Laadhari *et al.*, 2016) after 2 h of MAS experiments, which was $95 \pm 5\%$.

Figure 45 shows the effect of marennine on *V. splendidus* at low concentration (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and at the MIC (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), with corresponding M_2 values presented in Table 7.

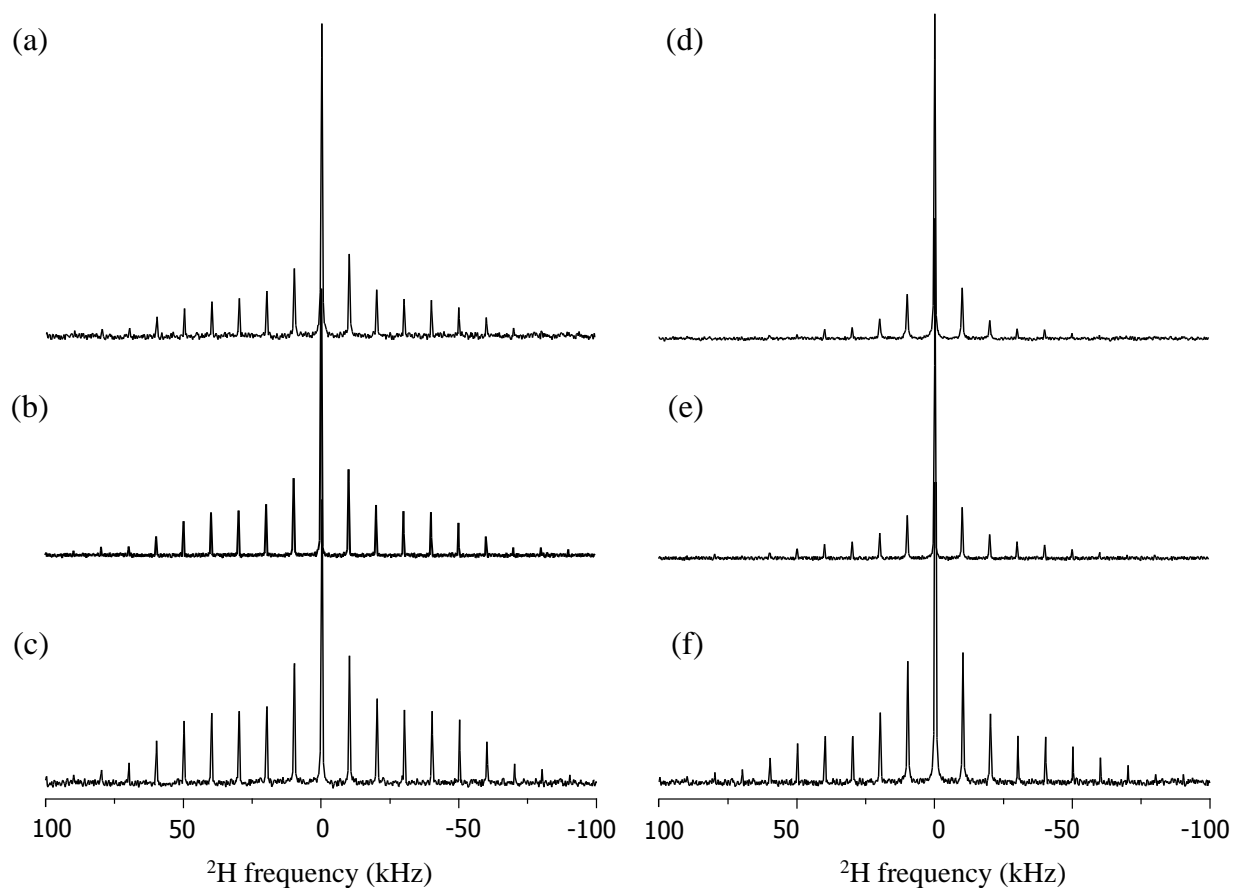


Figure 45 Representative ^2H SS-NMR MAS spectra of *V. splendidus* exposed to marennine during exponential (a-c) and stationary (d-f) stages. Spectra (a) and (d) are control experiments (b) and (e) correspond to bacteria exposed to low marennine (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration, and (c) and (f) correspond to bacteria exposed to marennine at MIC (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). All spectra are normalized according to the central peak.

The “low” marennine concentration employed here is 20 times than that reported to be effective on *V. splendidus* (7SHRW) in farming conditions (Turcotte *et al.*, 2016). Marennine assays were compared to bacteria in ASW. Spectral analysis shows that marennine has an ordering effect on the membrane lipid chains of *V. splendidus* at 2 $\mu\text{g/mL}$, as revealed by an increase in M_2 values (Table 7). This effect is greater for bacteria sampled in the stationary phase. Figures 45 b and e indeed show that spinning side bands (SSBs) span a larger frequency range and have increased intensities. The stiffening effect of marennine on the lipid chains is further observed at the MIC at which higher M_2 values are determined (Table 7). M_2 values increase by $\approx 75\%$ compared to the control in the presence of marennine in the exponential phase and are doubled in the stationary phase.

Table 7 : Average second spectral moment, M_2 (10^9 s^{-2}) with a standard deviation for *V. splendidus* exposed to marennine and polymyxin B at different concentrations.

	Marennine			Polymyxin B		
	Control	2 $\mu\text{g/mL}$	MIC	Control	1 $\mu\text{g/mL}$	MIC
Exponential phase	25 (5)	34 (7)	39 (4)	20 (2)	23 (3)	12 (1)
Stationary phase	10 (1)	21 (3)	20 (1)	10 (1)	18 (3)	7 (2)

*MIC for marennine and PxB are 200 $\mu\text{g/mL}$ and 8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Control for marennine is done in artificial seawater.

In order to explore marennine as a potential antimicrobial agent for aquaculture, its effect was compared to PxB as polymyxins have been widely used for this purpose. Figure 46 shows the effect of PxB on *V. splendidus* at low concentration (1 $\mu\text{g/mL}$) and at MIC (8 $\mu\text{g/mL}$) with corresponding M_2 values presented in Table 7. At low PxB concentrations (Figures 46b, e), an increase in sideband intensities and spectral width can be seen, indicating an increased lipid chain ordering. As evidenced in Table 7, M_2 values are substantially higher in the presence of PxB where they almost double in the stationary phase. At the MIC (Figures 46c, f), however, the SSBs intensity is reduced, as well as the spectral width, with a concomitant decrease in M_2 , revealing a disordering effect of PxB.

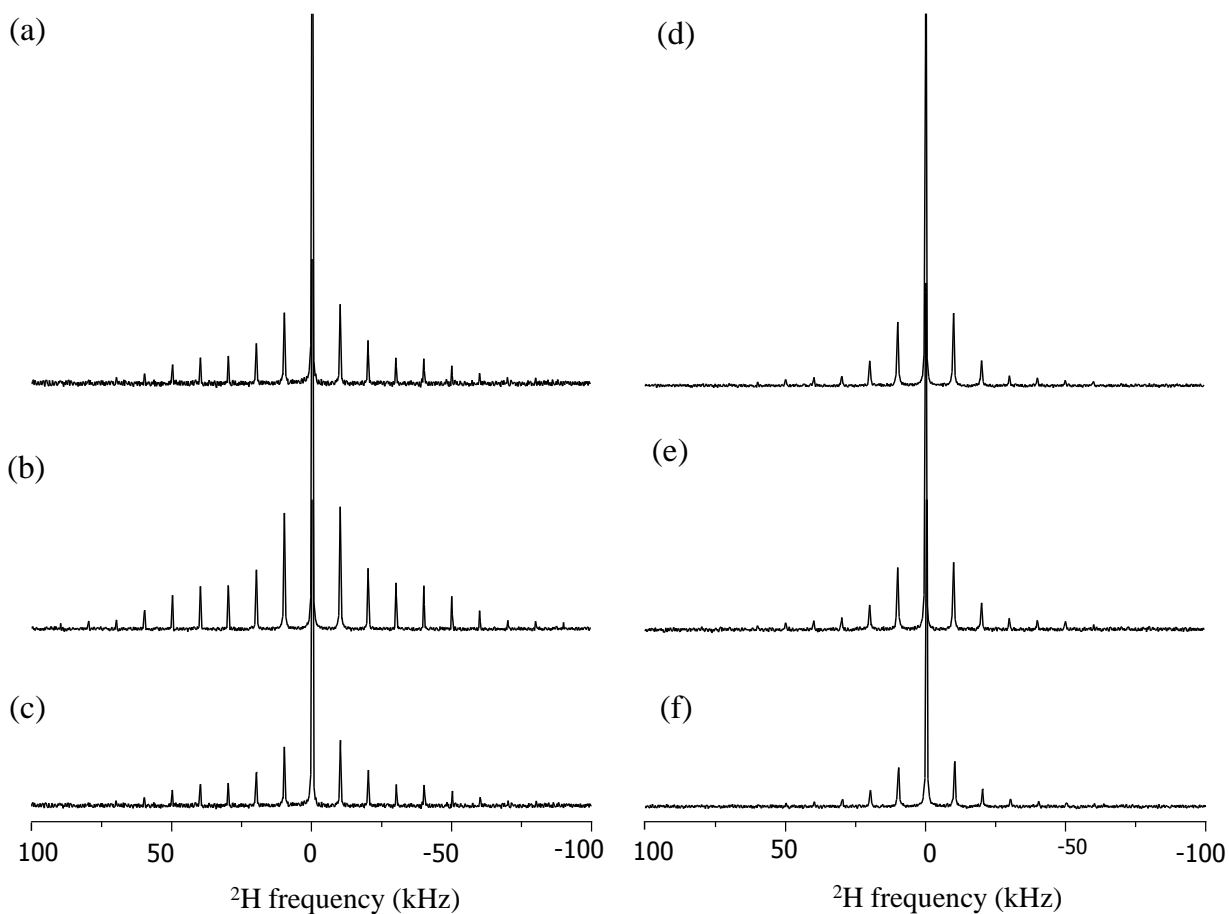


Figure 46 : Representative ^2H SS-NMR MAS spectra of *V. splendidus* exposed to polymyxin B during exponential (a-c) and stationary (d-f) stages. Spectra (a) and (d) are control experiments, spectra (b) and (e) correspond to bacteria exposed to low PxB (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration, and spectra (c) and (f) correspond to bacteria exposed to PxB at MIC (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). All spectra are normalized according to the central peak.

To better understand the difference in the magnitude of the effect of marennine and PxB on *V. splendidus*, we monitored M_2 as a function of growth time. Control samples were compared to bacteria exposed to the antibacterial agents after a growth period of 15h (mid-log), 22h (early stationary) and 35h (late stationary). Figure 47 shows that M_2 values decrease as a function of the growth stage, in agreement with the increase in membrane fluidity reported in a previous work (Bouhleb *et al.*, 2019). The action of marennine and PxB is further evidenced in Figure 47, which shows an increase in the lipid acyl chain

ordering at both marennine concentrations, with a more important effect for bacteria sampled at mid-log phase, compared to the stationary phase (35h of growth). Low PxB concentrations increased membrane rigidity at all growth times, while high concentration (MIC) showed the opposite pattern, consistent with figure 46.

Finally, Table 7 and Figures 45-47 reveal slight differences in the membrane fluidity of *V. splendidus* exposed to ASW (in the marennine challenge experiment) as compared to NaCl (10 g/L) solution (PxB challenge). In ASW (ionic strength ≈ 0.71 mol/L), the membrane is more rigid, especially at mid-log phase where the M_2 value is about 12% higher than in the NaCl solution (ionic strength ≈ 0.15 mol/L). This result is in agreement with the “hardening” effect of seawater on lipid bilayers, as was demonstrated with DMPC (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) membranes (Šegota *et al.*, 2015). The effects of salts on lipids are well documented. Ionic metals alter the electrostatic properties of the membrane by interacting with the lipids polar head groups, thus affecting the overall lipid charge, membrane hydration, and resulting in a higher ordering of the acyl chains (Marquis, 1968; Matsuzaki *et al.*, 1991; Kandasamy et Larson, 2006; Urano *et al.*, 2006; Mykytczuk *et al.*, 2007). Because seawater is *V. splendidus*' preferred environment, it is most likely not a stress factor for this strain.

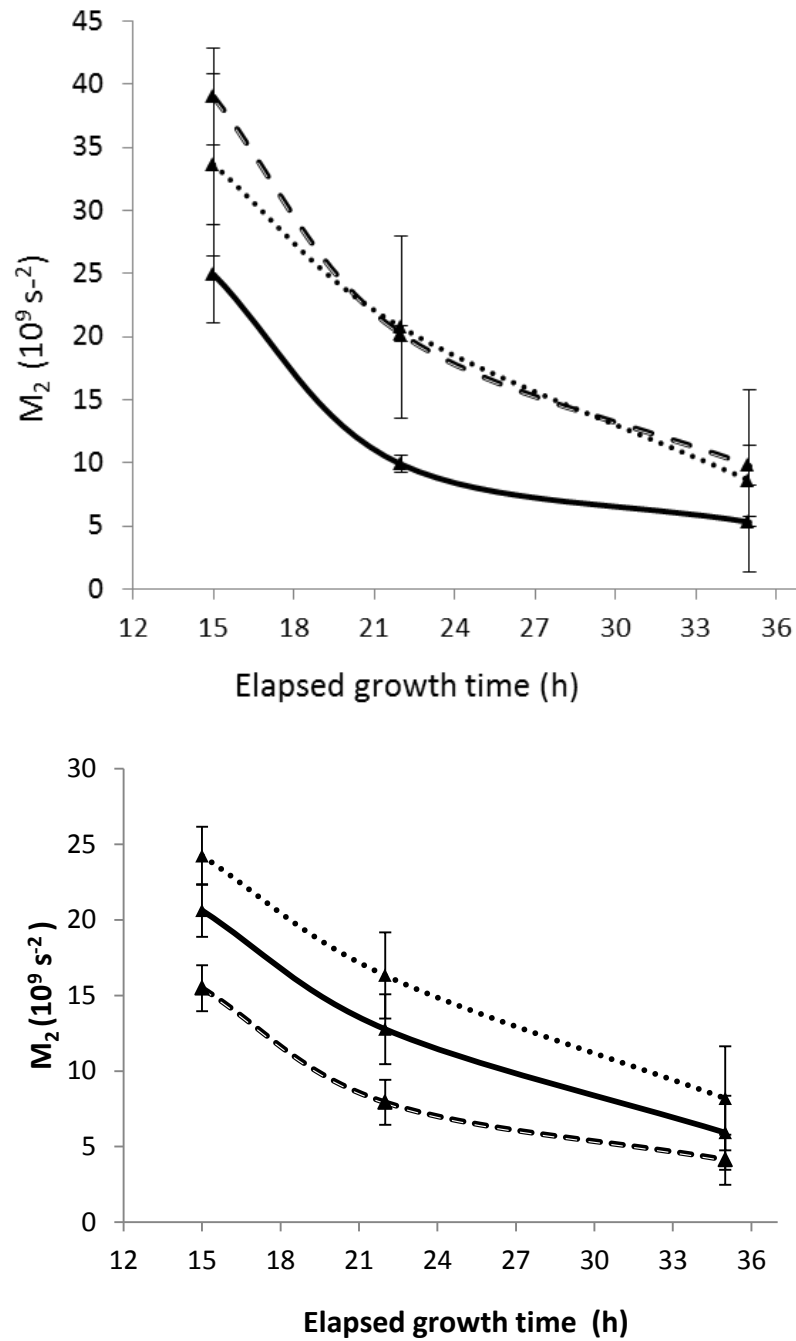


Figure 47 : Second spectral moment M_2 of *V. splendidus* after exposition to marennine (top), and PxB (bottom). Control cells (solid lines) are compared to bacteria exposed to 2 $\mu\text{g/mL}$ of marennine or 1 $\mu\text{g/mL}$ of PxB (dotted lines), and at the MIC (dashed lines). Values correspond to average means of three replicates with 3-22% error for marennine samples and 8-40% error for PxB samples.

DISCUSSION

This work explored for the first time the antibacterial action mechanism of marennine on the marine bacterium *V. splendidus* at the nanoscale, and at different growth phases. PxB was used as a reference antibiotic acting against Gram (-) bacteria. Our results show that at low concentration, PxB had a rigidifying effect on *V. splendidus* membranes in both the exponential and stationary phases. However, an 8-fold increase in concentration (*i.e.* the MIC) resulted in a disordering effect of PxB on the lipid chains. These results are in agreement with an *in vivo* ^2H SS-NMR study carried out on the Gram(-) bacterium *E. coli* (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). They are also compatible with previous work suggesting a two-stage interaction mechanism for this antibiotic with respect to increased concentrations or exposition time (Clausell *et al.*, 2003; Sahalan et Dixon, 2008; Deris *et al.*, 2014). Briefly, PxB first disturbs the bacteria outer membrane by electrostatically binding with the anionic phosphate groups of the lipopolysaccharides (LPS) via its positively charged residues, thus competing with divalent cations such as magnesium and calcium, which play a role in bridging adjacent LPS chains. Then the PxB lipid tail can be inserted into the inner membrane, thus disrupting its bilayer, and eventually leading to the loss of membrane integrity and cell leakage (Delcour, 2009; Deris *et al.*, 2014).

A different action of marennine on *V. splendidus* was revealed in this study, where this natural pigment was shown to reduce the lipid chain dynamics at low concentration and at the MIC, at both growth stages. The action of marennine was also observed following a longer incubation time compared to PxB. One could hypothesize that, as for PxB, marennine in low concentration could interact with the LPS on *V. splendidus* outer membrane, as previously described on *E. coli*. (Clausell *et al.*, 2003; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Deris *et al.*, 2014). The outer membrane of *Vibrio* species is extremely selective, blocking the permeation of molecules greater than 600-700 Da (Neidhardt *et al.*, 1994). A 10 kDa molecule such as marennine (Pouvreau *et al.*, 2006b) is therefore unlikely to traverse the outer membrane, which is in favor of an action targeting primarily this bacterial compartment. Marennine and PxB have different chemical natures. While PxB is a cyclic positively charged peptide with a lipid tail, marennine is a polyanionic molecule in a wide

range of pH (3-10) (Pouvreau *et al.*, 2006b). Therefore, unlike PxB, marennine would not compete with divalent cations to break the LPS bridges. Instead, this pigment could interact with the polysaccharide core of the LPS through hydrogen bonding, similarly to chemical interactions between polyphenols and polysaccharides (McManus *et al.*, 1985). Tardy-Laporte *et al.* (2013) studied the effect of fullereneol nanoparticles on *E. coli*, and hypothesized that the membrane stiffening effect of this polyhydroxylated molecule was due to an interaction with the LPS, thus inducing a tighter packing of the phospholipids in the outer leaflet of the outer membrane (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). A similar effect to fullereneol is thus suspected for marennine towards *V. splendidus*.

The presence of highly reactive hydroxyl groups (Vermerris et Nicholson, 2006) and the chemical diversity of polyphenols lead to various antibacterial mechanisms reported in the literature against a wide range of microorganisms, including *Vibrio* species (Okuyama *et al.*, 1991; Denyer, 1995; Rai *et al.*, 2008; Duda-Chodak, 2012). These mechanisms include a direct action by membrane destabilization, targeting of cell metabolites, or other actions such as metal chelation, nutrient deprivation or free radicals scavenging (Denyer, 1995; Bisignano *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2005; Daglia, 2012; Duda-Chodak, 2012; Li *et al.*, 2014; Nakamura *et al.*, 2015). In terms of membrane effect, phenols have been reported to increase the membrane rigidity (Heipieper *et al.*, 1992; Tsuchiya, 1999; Tsuchiya et Iinuma, 2000; Smith *et al.*, 2005), as was observed here with marennine.

While an interaction of marennine with the LPS can explain the membrane stiffening, other biochemical mechanisms could also be involved. One of them is the acyl chain molecular rearrangements by *cis* to *trans* isomerization of the double bond within the lipid unsaturated fatty acids. The presence of toxic organic compounds represents a stressful condition for bacteria, including *Vibrio spp.*, which react by rigidifying their outer membrane to prevent the penetration of these compounds (Guckert *et al.*, 1986; Okuyama *et al.*, 1991; Morita *et al.*, 1993; Heipieper *et al.*, 2003). In a second step, isomerases readjust the membrane fluidity via a *cis-trans* conversion process (Heipieper *et al.*, 2003). This mechanism has been observed by Heipieper *et al.* on *Pseudomonas putida* in its

resting state (suspended growth) exposed to phenolic compounds (Heipieper *et al.*, 1992; Heipieper *et al.*, 1995). In their work, the *cis* to *trans* conversion reached its maximum level after approximately 2h following addition of phenols (Heipieper *et al.*, 1992), which corresponds to the minimum time required to monitor the effect of marennine in our work. Furthermore, it has been also reported that the isomerization process correlates with increased phenol concentrations (Diefenbach *et al.*, 1992), aligning with the increased effect of marennine at the MIC, which may suggest increased phospholipid recruitment for isomerization.

Other mechanisms could be involved in the membrane stiffening induced by marennine such as cell shrinking due to lower water permeability under stress conditions (Tymczyszyn *et al.*, 2005). Additionally, it was demonstrated that changes in efflux and gradients of potassium and of adenosine triphosphate (ATP) are correlated with the presence of phenol and with the increase in membrane rigidity as a restoring process (Heipieper *et al.*, 1991; Heipieper *et al.*, 1992). Functional consequences of membrane fluidity alteration by polyphenols may involve the perturbation of lipid-protein domains, and affect processes such as biofilm formation, cytokinesis or enzymatic pathways (Rai *et al.*, 2008; Daglia, 2012; Li *et al.*, 2014). More specifically, for virulent bacteria under stress, the release of chemical molecules during *quorum sensing* process could be directly affected by the alteration of membrane fluidity (Baysse *et al.*, 2005).

Finally, our results indicate that both marennine and PxB have a stronger effect in the stationary phase. For biocides including phenols, the sensitivity to a compound depends on the bacterial population variability during the growth cycle (Denyer, 1995). Beney and Gervais (2001) have already reported that the membrane capacity to resist a source of stress by increasing the lipid ordering is highly related to the initial membrane fluidity state during cell growth (Beney et Gervais, 2001). As shown in our previous study (Bouhleb *et al.*, 2019), cell membranes are more fluid in the stationary phase as compared to the mid-log phase, which would explain the more dramatic stiffening effect of the antimicrobial agents observed in the stationary phase. In all cases, results showed herein indicate that the

membrane stiffening induced by marennine occurs even in balanced healthy stage cultures of *V. splendidus* (exponential phase), suggesting that this natural pigment is a potential candidate for antibacterial treatment in aquaculture.

CONCLUSION

In this work, the action of marennine and PxB towards the marine bacterium *V. splendidus* was studied for the first time by *in vivo* ^2H SS-NMR, revealing molecular-level details on their membrane interaction. While PxB was proved efficient against infection threats in aquaculture, nowadays' regulations as well as increased bacteria resistance prompt more natural alternatives. Our results showed that marennine and PxB act against this bacterium via different mechanisms. As proposed in other studies (Delcour, 2009; Deris *et al.*, 2014), PxB would disturb the bacteria outer membrane before accessing and disrupting the inner membrane. However, marennine would act in the vicinity of *V. splendidus* outer membrane through a stiffening mechanism. Marennine could interact with the LPS in the outer membrane, and/or trigger the isomerization of unsaturated fatty acids, as a stress-resistance reaction. More investigations would be required to test these hypotheses. Our study demonstrates that marennine affects *Vibrio splendidus* membranes at low concentration, below the MIC. This microalgal pigment, which is not harmful for humans, could thus constitute a potential treatment against vibriosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Pierre Audet for sharing the MestRenova macro, François Turcotte for marennine production and purification, Karine Lemarchand (ISMER) for providing the initial *Vibrio* strain, and Alexandre Arnold and Dror E. Warschawski (UQAM) for stimulating discussion. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (grant 326750-2013 to I.M. and grant

299100 to R.T.). This publication also benefited from the Horizon 2020 Research and Innovation Programme GHaNA (The Genus *Haslea*, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture) under Grant Agreement No 734708/GHANA/H2020-MSCA-RISE-2016 (JLM). Z.B. would like to acknowledge the Government of Tunisia and Ressources Aquatiques Québec (RAQ) research network (RS-171172) for the award of scholarships. I.M., J.-L.M., J-S.D. and R.T. are members of RAQ.

Supplementary Materials

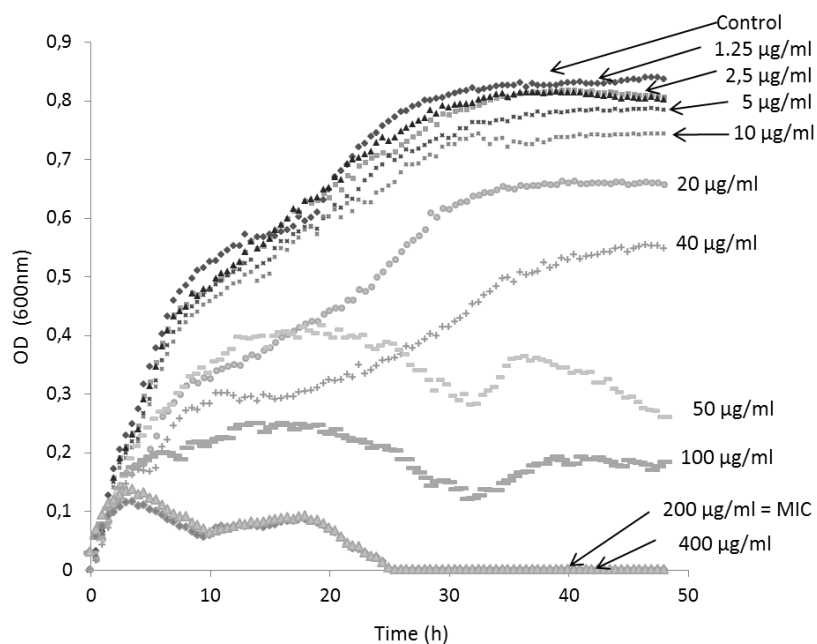


Figure SI-1: Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) for marennine with bacterial growth (OD = 600nm) as a function of time (hours). MIC is indicated.

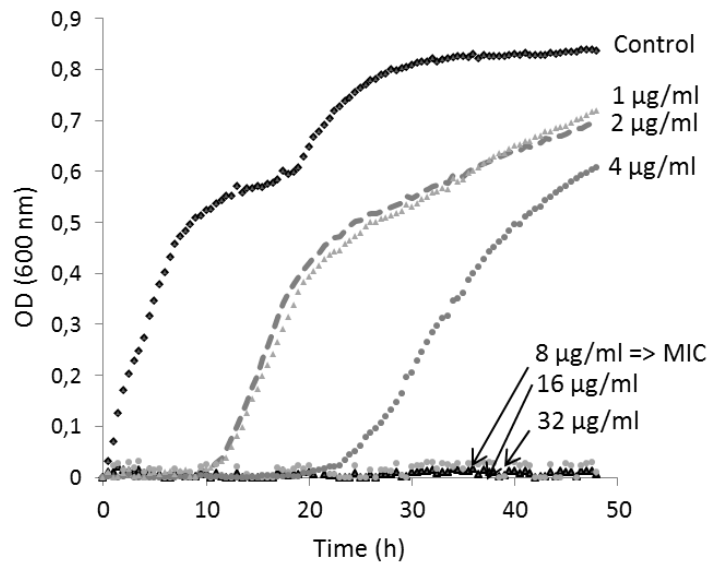


Figure SI-2: Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) for polymyxin B with bacterial growth (OD = 600nm) as a function of time (hours). MIC is indicated.

CHAPITRE 5

**EFFET DU PIGMENT MARIN MARENNINE SUR LES
MEMBRANES MODÈLES DE *V. SPLENDIDUS* ÉTUDIÉ
PAR RMN DU ³¹P DE L'ÉTAT SOLIDE**

Ce troisième article, intitulé, fut corédigé par moi-même ainsi que par les professeurs Alexandre A. Arnold, Dror E. Warschawski, Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte. La version présentée ici sera soumise au journal *European Biophysics Journal*. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche sur l'état de l'art, le développement méthodologique, l'exécution des expériences et la rédaction de l'article. Le professeur Alexandre Arnold a aidé au développement des méthodes de RMN, aux traitements des données et à la rédaction. Dror E. Warschawski a contribué aux développements méthodologiques, au travail au laboratoire et à la révision de l'article. Les professeurs Réjean Tremblay et Isabelle Marcotte, ont initié le projet et ont aidé à l'élaboration de la problématique ainsi qu'à la révision de l'article.

RÉSUMÉ

L'action de mimer des membranes biologiques en utilisant des membranes modèles constitue une approche simpliste qui permet d'analyser les interactions moléculaires des lipides de structure avec des molécules exogènes. Ce travail explore le mécanisme d'interaction de la marennine, un pigment à potentiel antibactérien et produit par une diatomée marine, avec les têtes des groupes phospholipidiques d'une bactérie marine modèle *Vibrio splendidus*, en utilisant la résonance magnétique nucléaire du ^{31}P de l'état solide. Les effets de la marennine sur la dynamique et la conformation des lipides ont été étudiés à des concentrations faibles et élevées et à différentes températures. Les résultats indiquent que la marennine n'a aucun effet sur la dynamique des têtes polaires phospholipidiques, mais a modifié la forme des membranes modèles. Les résultats suggèrent qu'une concentration élevée de marennine exerce un léger effet de rigidification sur les groupes polaires, particulièrement soulignée à haute température (50°C et 75°C). Nous suggérons que la marennine agirait comme un bouclier pour protéger la phase bicouche tout en immobilisant les lipides. Nous soupçonnons que l'effet augmente lorsque la structure de la membrane est plus petite ou lorsque les phospholipides sont plus fluides. De telles observations sont apparemment liées aux charges négatives des molécules de la marennine, qui pourraient jouer un rôle crucial dans l'interaction. Des mécanismes d'interaction moléculaire sont proposés et décrits, de manière analogue à d'autres composés anioniques.

MOTS CLÉS

Bactéries, membranes modèles, RMN ^{31}P , têtes polaires, marennine, interaction électrostatique, mécanisme moléculaire.

**EFFECT OF MARINE PIGMENT MARENNINE ON MODEL *V. SPLENDIDUS* MEMBRANES
PROBED BY ³¹P SOLID-STATE NMR**

*Zeineb Bouhlef^{1,2}, Alexandre A. Arnold², Dror E. Warschawski² Réjean Tremblay¹ and
Isabelle Marcotte²*

¹Institut des Sciences de la Mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, 310 allée
des Ursulines, Rimouski, Canada G5L 3A1

²Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Downtown
Station, Montreal, Canada, H3C 3P8

ABSTRACT

This work explores the interaction mechanism of marennine; a potential antibacterial pigment produced by a marine diatom, with model *Vibrio splendidus* bacteria membranes, using ³¹P solid state nuclear magnetic resonance (NMR). Marennine effects on lipid dynamics and conformation were studied at high and low concentrations and at different temperatures. Results indicate that marennine has no effect on the phospholipid headgroups dynamics but modifies the shape of the model membranes. High marennine concentration has a slight stiffening effect on polar groups, particularly emphasized at high temperature (50°C and 75°C). Marennine would act as a shield to protect the bilayer phase immobilizing the lipids. This effect increases when the structure of the membrane is smaller or when phospholipids are more fluid. Such observations would be related to the negative charge in marennine molecules which may play a crucial role in the interaction. Molecular interaction mechanisms are proposed and described, analogically with other anionic compounds.

KEYWORDS

Bacteria, model membranes, ³¹P NMR, headgroups, marennine, electrostatic interaction, molecular mechanism

INTRODUCTION

Marennine is a non-photosynthetic blue-green pigment produced by the marine diatom *Haslea ostrearia*, a benthic microalga (Massé *et al.*, 2001; Gastineau *et al.*, 2012b; Gastineau *et al.*, 2014). Preliminary investigation showed that the pigment is a polyanionic predominantly containing phenolic constituents (Pouvreau *et al.*, 2006b). Marennine is a promising substance, showing various biological activities (Bergé *et al.*, 1996; Carbonnelle *et al.*, 1998; Pouvreau *et al.*, 2008) such as antibacterial activity or a decrease in the virulence of different Gram(-) bacteria (Gastineau *et al.*, 2012a; Turcotte *et al.*, 2016; Bouhleb *et al.*, *in press*). Elucidating the molecular mechanisms responsible for this bioactivity is primordial in order to explore marennine as a natural potential antibacterial agent. Interaction between marennine and bacterial membranes is suspected of being implicated in the anti-virulence/antibacterial action, as shown on *Escherichia coli* by deuterium solid-state nuclear magnetic resonance (SS-NMR) (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Marennine effect was further investigated on *Vibrio splendidus* marine bacteria and showed a stiffening effect on the lipid acyl chains (Bouhleb *et al.*, *in press*). Nevertheless, the mechanism of the pigment is still not fully characterized, and more biophysical investigations are required.

^2H and ^{31}P SS-NMR are common techniques used to characterize phospholipid bilayer organization and to scrutinize interaction with exogenous molecules. Generally, ^2H SS-NMR focuses on deuterated lipid acyl chains, whereas ^{31}P SS-NMR probes the phospholipid headgroups (Seelig, 1977; Seelig, 1978; Seelig *et al.*, 1987). Broad spectrum obtained in ^{31}P SS-NMR of model membranes provide valuable information on the lipid orientation and dynamics, and, thus, on the lipid phases (Cullis et Kruijff, 1979; Koller et Lohner, 2014).

Model membranes made of synthetic lipids are commonly used to better understand interactions and mechanisms involving natural membranes (Vasilenko *et al.*, 1982; Rietveld *et al.*, 1993; Killian *et al.*, 1994; Rietveld *et al.*, 1995; Brisebois *et al.*, 2012). Lipid polymorphism has been thoroughly described for model membranes made with the

most abundant lipids such as phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG) and cardiolipin (CL) (Seelig, 1978; Cullis et Kruijff, 1979; Vasilenko *et al.*, 1982; Ortiz *et al.*, 1999; Sackmann et Ben-Shaul, 2016). For instance, PG and CL commonly organize into a bilayer (Cullis et Kruijff, 1979; Vasilenko *et al.*, 1982; Killian *et al.*, 1994). However, depending on the ionic strength of aqueous solutions and temperature, PE preferably adopts an inverted hexagonal (type II) phase (Cullis et Kruijff, 1979). Most ^{31}P SS-NMR studies were carried out on model membranes composed of one or two types of lipids.

The objective of this work was to investigate the effect of marennine on the lipid headgroups of *V. splendidus* bacteria, using ^{31}P SS-NMR. Electrostatic forces were also considered since negatively charged compounds, such as marennine, might constitute a factor affecting the lipid packing and orientation (Tatulian, 1983; Seelig *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2008; Morini *et al.*, 2015). The Zeta potential was monitored to complement NMR analyses. Since more specifically, we studied the effect of marennine on *V. splendidus* model membranes at 25°C corresponding to the growth temperature of bacteria (Bouhleb *et al.*, 2019; Bouhleb *et al.*, *in press*), and at higher temperature to test the hypothesis that marennine affects the membrane fluidity of *V. splendidus*. Our work shows that marennine promotes the lamellar phase in model *V. splendidus* membranes, possibly due to electrostatic interactions with phospholipid polar headgroup.

MATERIALS & METHODS

I. Materials

Synthetic lipids 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (POPG), and cardiolipin (CL) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Tris(hydroxymethyl)aminomethane was purchased from Bioshop Canada (Burlington, Ontario, Canada). Sodium chloride (NaCl) and potassium chloride (KCl) were obtained

from ACP Chemicals (Montreal, Quebec, Canada). Dichloromethane and methanol were purchased from Caledon Laboratory Chemicals (Georgetown, Ontario, Canada) and from Sigma Aldrich (Oakville, Ontario, Canada), respectively. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Deuterium oxide (D₂O) and deuterated chloroform (chloroform-D) were respectively bought from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada) and from Cambridge Isotope Laboratories (Endover, MA, USA). LB Broth Miller was obtained from BioBasic Inc. (Markham, Ontario, Canada), while *V. splendidus* 7SHRW strain was provided by Professor Karine Lemarchand (Rimouski, Qc, Canada) after isolation from the Gulf Saint Lawrence sediments (Canada) (Mateo *et al.*, 2009).

2. Marennine solution

Marennine was isolated from *Haslea ostrearia* (strain NCC-136-isolated from Bourgneuf Bay, France) cultures as detailed by Turcotte *et al.* (2016). Briefly, the extracellular form of marennine was used after extraction from the blue water (BW) - a solution obtained when the pigment is released by the microalgae cultivated in seawater (Turcotte *et al.*, 2016). The BW was purified following procedures similar to those of Pouvreau *et al.* (Pouvreau *et al.*, 2007) using a series of membrane ultrafiltration, desalination and a final anion-exchange chromatography. The purest chromatography fraction was used, which corresponds to 77 % of purity, and is considered as suitable for biochemical investigations (Gastineau *et al.*, 2014). Beer-Lambert law and the specific coefficient for extracellular marennine ($\epsilon_{677} = 12.13 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}$) was used (Pouvreau *et al.*, 2007) to quantify marennine concentration. Two marennine concentrations were tested on model membrane: 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The latter concentration corresponds to the minimal inhibitory concentration (MIC) of marennine on *V. splendidus* bacteria, as previously determined (Bouhleb *et al.*, *in press*).

3. *Vibrio splendidus* phospholipid analyses

Solution ³¹P NMR on lipid extracts was used to determine the phospholipid composition of *V. splendidus*. Bacteria were grown as previously described (Bouhleb *et al.*, 2019), in Luria

Broth medium at $\approx 25^{\circ}\text{C}$, on a rotary shaker operating at 100 rpm, and cells were harvested at early stationary phase ($\text{OD}_{620\text{nm}} = 0.5$) and washed with physiological salt solution (9‰ NaCl). Starting from three pools of 30 to 60 mg of freeze-dried bacteria, total lipids were extracted according to the protocol of Bligh and Dyer (Bligh et Dyer, 1959) using dichloromethane/methanol (2:1 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ v/v) and 0.88% KCl solution in a Potter glasses homogenizer. Polar lipids were separated from neutral lipids by elution through a silica gel column (30×5 mm) hydrated to 6‰ with distilled water (Marty *et al.*, 1992). Final polar lipid extracts (≈ 5 to 7 mg) were dissolved in a mixture composed of 500 μl of chloroform-D, 200 μl methanol, 50 μl of an aqueous solution of EDTA (1M), pH = 6, and were vortexed and stabilized until a biphasic solution was obtained. The bottom phase was delicately transferred to an NMR glass tube and carefully sealed for analysis.

^{31}P solution NMR spectra were carried out at 25°C on a Bruker Avance HD III 600 MHz NMR spectrometer (Billerica, MA) tuned to 243 MHz. The applied sequence is a simple 90° pulse with a recycling delay of 10 s and continuous ^1H decoupling during acquisition. Each spectrum was obtained in approximately 22 min corresponding to 128 scans. Spectral processing was performed by applying a line broadening of 2 Hz and calculating resonance line integral using the Bruker software.

4. Sample Preparation

Model membranes were prepared from lipid mixtures of POPE, POPG and CL in proportions according to *V. splendidus* phospholipid composition. For each sample, 30 mg of phospholipids powder mixture were dissolved in chloroform:methanol (3:1) and dried under a steady stream of N_2 gas for 30 min. Remaining organic residues were further evaporated overnight in vacuum and stored at -20°C until the day of analysis.

For NMR, dry lipids films samples were hydrated in 120 μl buffer aqueous solution (Tris (100 mM), NaCl (100 mM), EDTA (2 mM) and D_2O ; pH=8), resulting in multilamellar vesicles (MLVs). For marennine-containing samples, the appropriate pigment quantity was dissolved in the buffer solution before lipid hydration. All preparations were mechanically

homogenized and processed through five cycles of liquid N₂ freezing and thawing in a 35°C water bath.

For Zeta potential experiments, dry lipids films samples were hydrated in 1 ml of the same buffer solution and went through three freeze-thaw cycles. About 60 µl of this dispersion was then transferred into a final 4 ml buffer solution, yielding a final lipid concentration of 500 µmol/l. Purified marennine was added at the appropriate concentration, and the lipid-marennine mixture was thoroughly vortexed with two extra freeze-thaw cycles. All buffer solutions were previously pre-filtered with 0.2 µm pore size Wattman filters.

5. *Solid-state* ³¹P NMR

Static ³¹P SS-NMR spectra were acquired using a Bruker Avance HD III wide bore 400 MHz NMR spectrometer (Milton, Ontario, Canada) operating at frequencies of 161.9 MHz and 400 MHz for ³¹P and ¹H, respectively. Static spectra were recorded through a proton-decoupled Hahn echo pulse sequence with a ³¹P 90° pulse length of 3µs and a recycle delay of 3s. Typically each spectrum was obtained in approximately 25 min corresponding to 512 scans. Line shapes were fitted using the Bruker SOLA software. For spectra showing two coexisting phases, each resonance was quantified based on area integral and was expressed in % relative to the total area. If needed, spectra were also further analyzed to determine vesicles shapes (spherical vs. ellipsoidal), using dedicated MATLAB scripts based on the analytical model determined by Dubinnyi *et al.* (Dubinnyi *et al.*, 2006), where the vesicle is described by the ratio ρ between the long and short axis of the ellipsoid ($\rho=1$ if vesicles are spherical). The value of ρ results from the best fit between the experimental and calculated spectra.

All MLV samples were used to fill 4 mm rotors, and were analyzed at 0°C, 25°C, 50°C and 75°C. Beforehand, each sample was conditioned at the appropriate temperature for 25 min. Lipid degradation, especially at 75°C, was monitored by comparing spectra obtained at 0°C before and after being exposed to 75°C. Samples showing isotropic peaks (a sign of possible degradation) at 0°C after exposition to 75°C were not considered. Temperatures

were controlled to within $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ and chemical shifts were referenced relative to external H_3PO_4 set to 0 ppm.

6. Zeta Potential

Zeta potential values were measured within one week of preparation, using a Brookhaven instrument (NY-USA). Samples were stabilized in a thermostatic matching bath for 1h at 25°C , 50°C and 75°C before being immediately transferred to a 1 mm length quartz cuvette for measurements at the corresponding temperatures. Reported data are averaged over three different batches of MLVs, with at least 5 runs per sample.

RESULTS

1. Phospholipid composition of *V. splendidus*

Before preparing model *V. splendidus* membranes, phospholipid composition of the bacterium was determined by ^{31}P solution NMR using lipid extracts. Integration of the resonances allowed the quantification of the three major phospholipids corresponding to 85% PE, 10% PG and 5% CL (in mole %), as identified in Figure 48. Their structures are shown in Figure 49. The presence of two phosphate headgroups in CL was considered in the quantification. These lipid proportions were constant during the different growth stages (*see supplementary materials*).

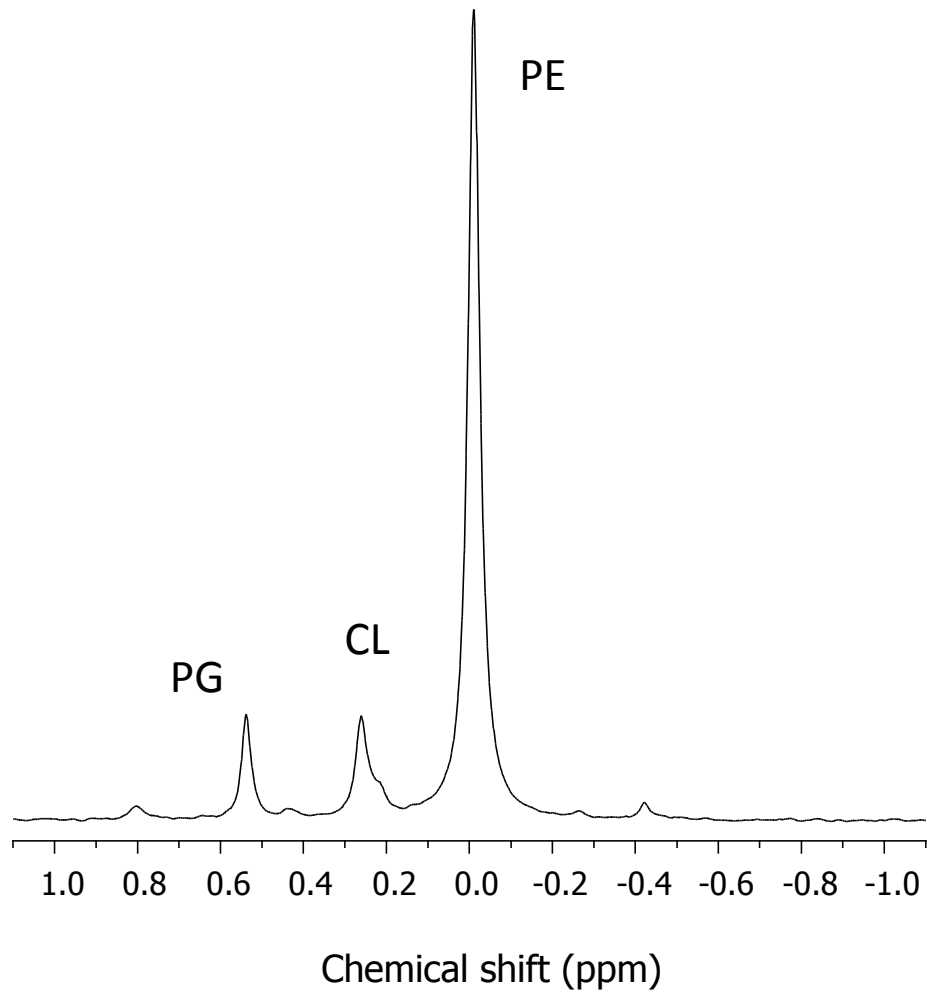


Figure 48: ^{31}P solution NMR spectrum of lipid extracts of *V. splendidus* (7SHRW) grown in LB medium at 25°C

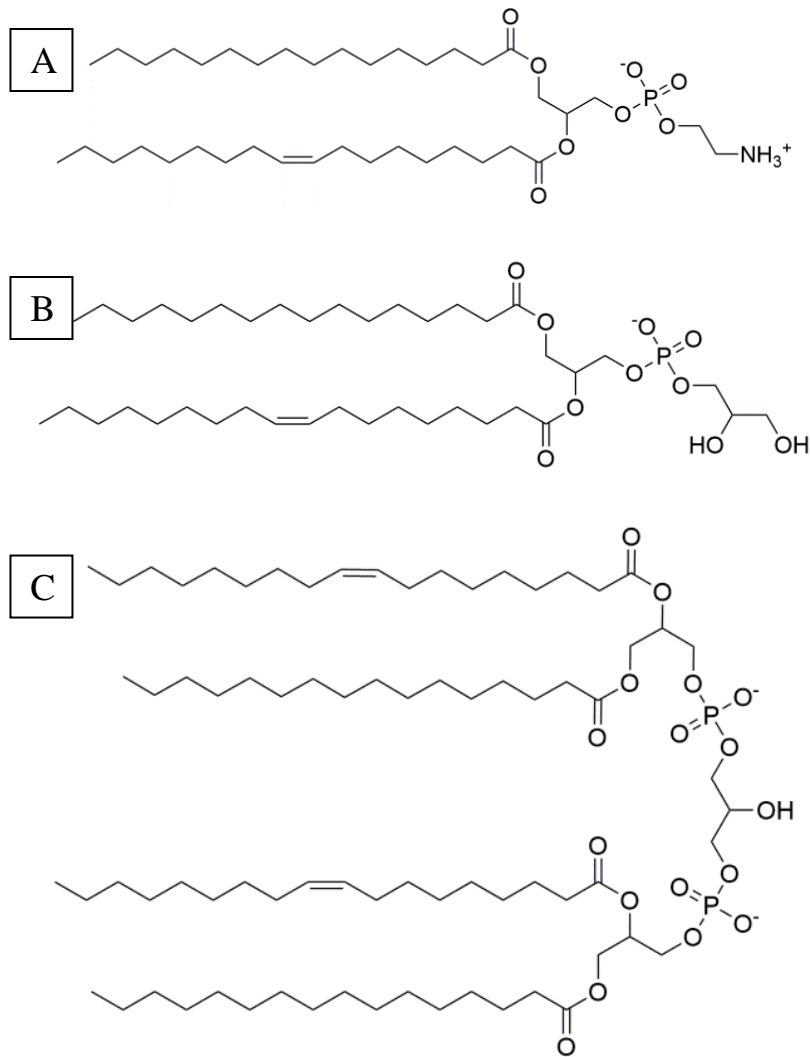


Figure 49 : Chemical structures of phospholipids used in model membranes of *V. splendidus*. A: phosphatidylethanolamine (PE), B: phosphatidylglycerol (PG) and C: cardiolipin (CL)

Model membranes of *V. splendidus* were prepared using previously determined phospholipid proportions using POPE, POPG, and CL, and characterized at different temperatures by ^{31}P SS-NMR (see Figure 50A). NMR spectra acquired at 25°C and 50°C showed an asymmetry with a high-field peak and a low-field shoulder, typical for liquid-crystalline bilayer assembly, with a CSA of approximately 25 and 22 ppm at 25 and 50°C, respectively.

In addition to the expected decrease in CSA related to an increase of membrane fluidity, differences in the intensity of the central part of the resonance were also observed. This last result suggests a change in vesicles from spherical to ellipsoidal shapes. Simulation of ^{31}P spectra confirmed the presence of spherical vesicles at 25°C ($b/a=1$) and ellipsoidal vesicles at 50°C ($b/a=1.5$) (*see supplementary information*). The lamellar phase structure, however, almost disappears upon a further increase in temperature. At 75°C , the spectrum shows a narrow and symmetric high intensity line corresponding to isotropic structures. A residual powder pattern can also be seen on the spectrum, and contributes to 13% of the total spectrum area (Table 8).

2. *Marennine effect on V. splendidus model membranes*

2.1. *Solid-state NMR*

The effect of marennine on the lipids dynamics in MLVs as a function of concentration was investigated by ^{31}P SS-NMR at different temperatures, as shown in Figure 50. Marennine added at $2\ \mu\text{g/ml}$ had no effect on ^{31}P line shapes within the whole temperature range, as well as the concentration of $200\ \mu\text{g/ml}$ of marennine tested at 25°C . Marennine impact was observed only when the membranes became more fluid at higher temperature. Under such conditions, addition of high amounts of marennine lead to new features in the spectral line shapes.

At 50°C , the spectra in absence or at low marennine concentration were characteristic of a liquid crystalline bilayer, with no change in the line width. However, an increase of shoulder intensity can easily be seen at $200\ \mu\text{g/ml}$ of marennine. Simulation of ^{31}P spectra of static MLVs at 50°C (*see supplementary information*), reveal that the spherical membranes observed at 25°C ($b/a=1$) become ellipsoidal in the magnetic field at 50°C ($b/a=1.5$). However, in the presence of $200\ \mu\text{g/ml}$ of marennine, the b/a ratio was maintained at 1, indicating no modification of the membrane spherical shape.

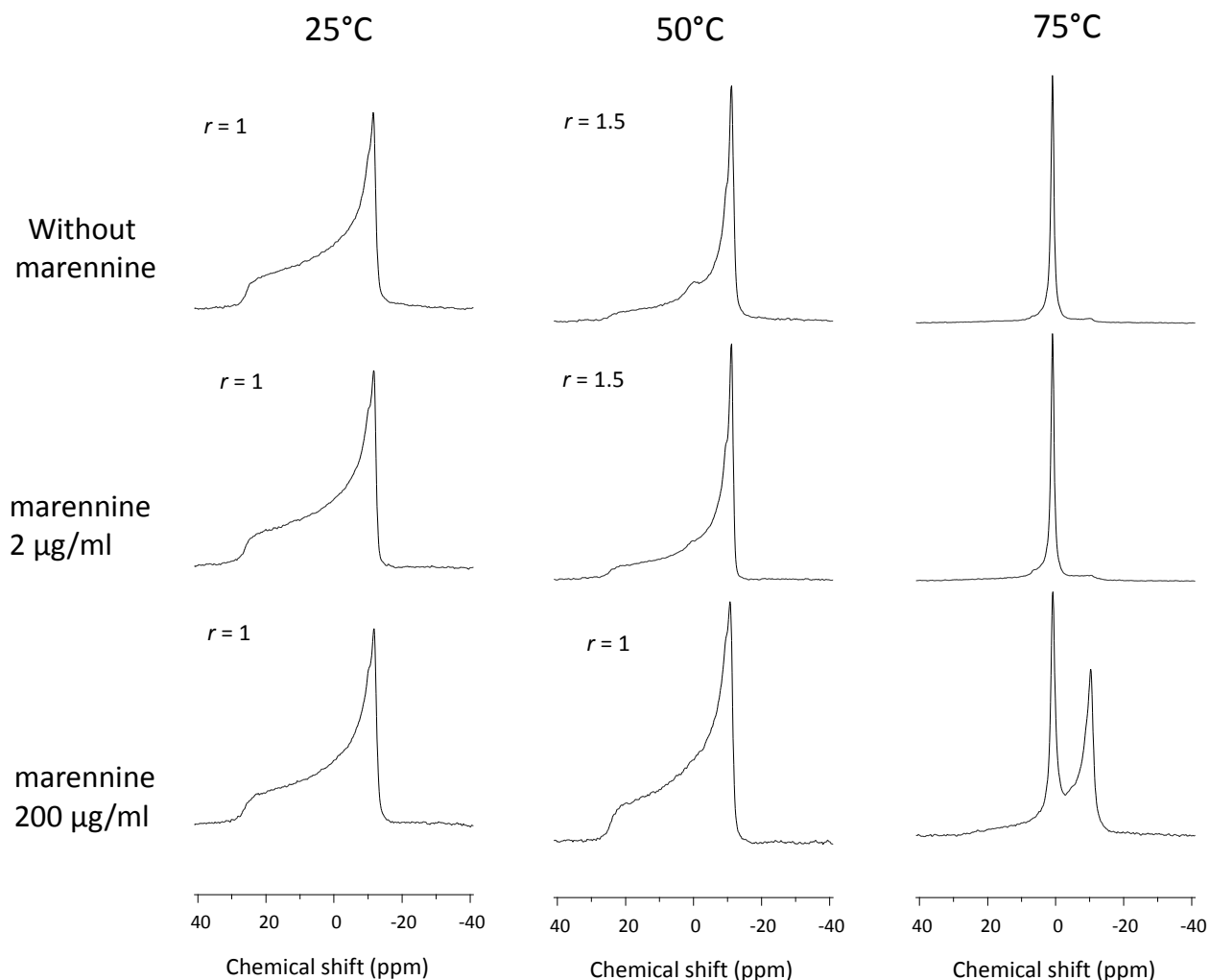


Figure 50: ^{31}P -SS NMR spectra of membrane models of *V. splendidus* at different temperatures. “r” is the ratio of the biggest and the smallest axis, calculated with spectrum simulation. Approximate membrane shapes and sizes are illustrated

Spectra acquired in samples treated with low marennine concentration at 75°C showed a major isotropic central line, as was observed without marennine. However, a second resonance was visible at a concentration of $200\ \mu\text{g/ml}$ of marennine, indicating a lamellar phase. At this concentration, the lamellar phase seems to be preserved in the presence of marennine when the temperature was increased from 50 to 75°C .

Table 8 : Estimated phase contributions expressed in % from area integration of *V. splendidus* model membranes at 75°C, in the absence and presence of marennine at two concentrations. Standard deviation is indicated between brackets.

	Marennine		
	Control	2 µg/ml	200 µg/ml
Isotropic phase	87% (8)	79% (6)	33% (8)
Lamellar phase	13% (8)	21% (6)	67% (8)

Relative percentages of bilayers versus non-bilayer phase were quantified and are presented in Table 8. In the absence or at low marennine concentration (2 µg/ml), a minor lamellar phase was preserved (13% vs 21%), while the majority of the lipids were in an isotropic phase (fast-tumbling objects) at 75°C. On the other hand, at high marennine concentration (200 µg/ml), the isotropic phase contributed to only 33% of the whole area, while the anisotropic bilayer-like component (CSA of 19.5 ppm) reached 67%.

2.2. Zeta potential

Zeta potential for all model membrane samples showed negative values, with varying intensities (more negative or more positive) (Table 9).

Table 9 : Zeta potential measurements (in mV) of membrane models dispersed in different marennine solutions and temperature

Temperature	Marennine		
	Control	2 µg/ml	200 µg/ml
25°C	-33 (5)	-34 (2)	-38 (3)
50°C	-39 (3)	-41(4)	-46 (4)
75°C	-41 (5)	-30 (7)	-23 (5)

The marennine effect on the Zeta potential can be summarized in two important patterns depending on mareninne concentration and temperature. First, high marennine concentration generated an increase of 15% and 17% of the Zeta potential at 25 and 50°C,

respectively, suggesting a change in conductance and electric charge distribution. No effect was observed at low marennine concentrations at both temperatures. At 75°C and at low marennine concentration, the model membrane systems revealed a Zeta potential close to controls at 25 and 50°C, while at a concentration of 200 µg/ml, the Zeta potential was ranging between -18 mV and -28 mV, revealing a shift toward more neutral charges.

DISCUSSION

1. V. splendidus membrane characterization

The presence of a majority of zwitterionic lipids (85% PE) and a smaller amount of anionic head groups (10% PG and 5% CL) in *V. splendidus* agrees with the typical phospholipid composition of Gram(-) bacteria (Rietveld *et al.*, 1993; Warschawski *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2015), including aquatic and terrestrial *Vibrio* species (Oliver et Colwell, 1973). Model membranes mimicking the lipid composition of *V. splendidus* membranes were then used to specifically study the interaction of marennine with the phospholipid bilayer by ³¹P SS-NMR. Characterization of these model *Vibrio* membranes revealed the dominance of a bilayer phase at 25°C and 50°C, in agreement with results reported on PE/CL, PE/PG and PG/CL mixtures in a similar temperature range (Cullis et Kruijff, 1979; De Kruijff et Cullis, 1980; Killian *et al.*, 1994; Warschawski *et al.*, 2018) despite of differences in chain lengths and insaturation levels. Raising the temperature expectedly increased lipids motion, as revealed by the presence of narrow lines. Our results also demonstrated a change in membrane shape, from spherical to elongated ellipsoid when the temperature increased from 25°C to 50°C. This effect, already reported in the literature, is explainable by the collective orientation of the phospholipids in a fluid membrane in the magnetic field, due to their negative magnetic susceptibility anisotropy (Speyer *et al.*, 1987; Picard *et al.*, 1999; Marcotte *et al.*, 2006).

At 75°C, the bilayers mostly transformed into smaller fast tumbling structures (87% of the spectrum area), resulting in orientation averaging and narrow symmetric line. It should also

be noted that the isotropic signal may also result from lipid lateral diffusion in a highly curved bilayer and non-bilayer lipid structures (Cullis et Kruijff, 1979). It has been reported that pure DOPE-Me showed a cubic transitional phase at 62°C and that an hexagonal phase appeared at 66°C, stable between 72°C and 79°C (Siegel et Banschbach, 1990). The hexagonal phase is typically characterized by a ~ 25 ppm wide resonance (CSA ~ 13 ppm), with an intense peak at ~ 7 ppm at the left side of the spectrum (Seelig, 1978). Although DOPE is the most abundant lipid (85%) in our model membranes, an hexagonal phase could not be observed on the spectrum, most likely due to the influence of CL and PG which tend to form lamellar phases (Cullis et Kruijff, 1979; Vasilenko *et al.*, 1982; Killian *et al.*, 1994). Warschawski *et al.* (2018) reported that only 20% of PG in a PG/PE mixture can govern the behavioural phase of the overall membranes at 75°C. The role of CL should also be considered, in lipid mixture, as it is known to exert a major stabilizing effect on zwitterionic lipids (De Kruijff et Cullis, 1980; Lewis et McElhaney, 2009). In our conditions, with less than 20% PG in the mixture, PG and CL appear to be unable to completely maintain a lamellar phase since such phase contributes to only 13% of the total spectrum area.

2. *Marennine effect on membrane models of V. splendidus*

Marennine effect on phospholipid headgroups of *V. splendidus* model membranes was shown to depend on pigment concentration and temperature. At 25°C, no effect was observed on the headgroups; however, at 50°C, high concentrations of marennine re-established the initial spherical shape of the MLVs observed at 25°C. These observations suggest that marennine impacts the elastic properties of the lipid vesicles. Previous studies have reported that antimicrobial peptides (Lu *et al.*, 2005; Thennarasu *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2015), proteins (Rajan *et al.*, 1981; Pott et Dufourc, 1995), toxins (Porcelli *et al.*, 2004) and phenolic compounds (Fujisawa *et al.*, 1988) can have a similar action, *i.e.*, altering the membranes without necessarily changing the CSA value. Marennine would thus impede the temperature-induced fast lateral diffusion and motion of the lipid head

groups, via interaction with the lipid polar headgroups, as already reported for some proteins interactions on DMPC membranes (Rajan *et al.*, 1981).

At 75°C, in the presence of 200 µg/ml, lipids are mostly found in a lamellar phase, with only one third of the lipids in fast-tumbling objects as compared to nearly 90% in the control sample. Our results thus suggest that marennine would protect the lamellar phase.

Zeta potential results support an interaction of marennine with the membrane surface, since the presence of marennine modified the surface charge of model *V. splendidus* membranes, suggesting electrostatic interaction (Morini *et al.*, 2015) between the pigment and the lipid polar headgroups. More specifically, marennine slightly increased the negativity of the surface charge at 25°C and at 50°C, in a concentration dependent manner. At 75°C, addition of marennine made the model membranes less negative. Low marennine concentration yielded to Zeta potential values close to the controls at 25 and 50°C, while values of ~ 30 mV were measured at high marennine concentration. Interpretation of the result is indeed complex due to the presence of heterogeneous lipid objects (different size and phases) as revealed by the ³¹P SS-NMR spectra.

The effects of marennine on the model bacterial membranes observed by SS-NMR and Zeta potential analysis are comparable to those of negatively charge molecules. Previous investigations on anionic compounds generally showed weak intensity effect on membrane systems, as compared to cationic compounds (Seelig *et al.*, 1987; Thennarasu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Reported effects of negatively charged molecules on zwitterionic membranes are generally associated with effects on lipid packing and gelation (Grillo *et al.*, 2011), vesicle shrinkage (Wang *et al.*, 2008), or aggregation, as a result of hydration or condensation of the acyl chains (Morini *et al.*, 2015).

The model membranes used in this work are composed of three different lipids, *i.e.*, zwitterionic PE and anionic PG and CL (Figure 49). Marennine, with its negative charges and hydroxyl groups (Pouvreau *et al.*, 2006b), could interact in a different manner with the lipid headgroups. The positive amine group of PE could interact with the negative charges

of marennine, while H-bonds could form between PG and CL hydroxyl groups and those present on marennine. Similarly, polyhydroxylated fullerene nanoparticles were shown to selectively interact with PG in model membranes, and remain at the lipid/water interface (Brisebois *et al.*, 2012). Altogether, marennine would interact with the phospholipid headgroups and remain at the lipid/water interface, thus modifying the Zeta potential of the lipid aggregates without perturbing the ^{31}P atom vicinity, consistent with the absence of change in CSA.

CONCLUSION

In light of our results, we believe that marennine would remain at the lipid-water interface of the membrane where its interaction with the lipids' headgroups would improve the connectivity of the lipid network, thus preserving the lamellar phase of the membrane. Marennine has no influence on the lipid motions but has a positive impact on the stability of the membranes, preventing disruption of the MLVs into other types of aggregates at high temperatures.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (Discovery grant 326750-2013 to I.M. and 299100 to R.T.) and the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 7099 to D.E.W.). Z.B. would like to acknowledge Karine Lemarchand for providing *Vibrio* strain culture and the Ressources Aquatiques Québec (RAQ) research network (RS-171172) for the award of scholarships. I.M. and R.T. are members of the RAQ.

Supplementary Materials

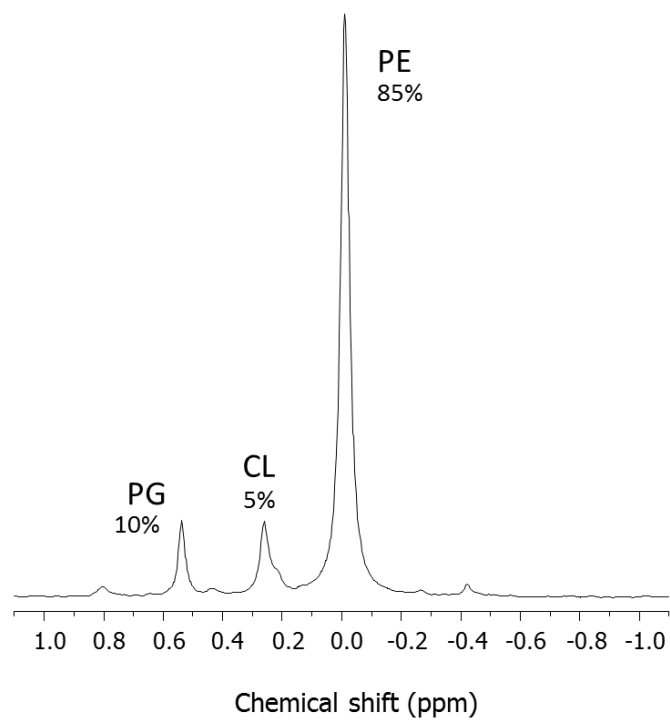


Figure SI-1: ^{31}P solution NMR spectrum of lipid extracts of *V. splendidus* (7SHRW) grown in LB medium at 25°C until the stationary growth phase.

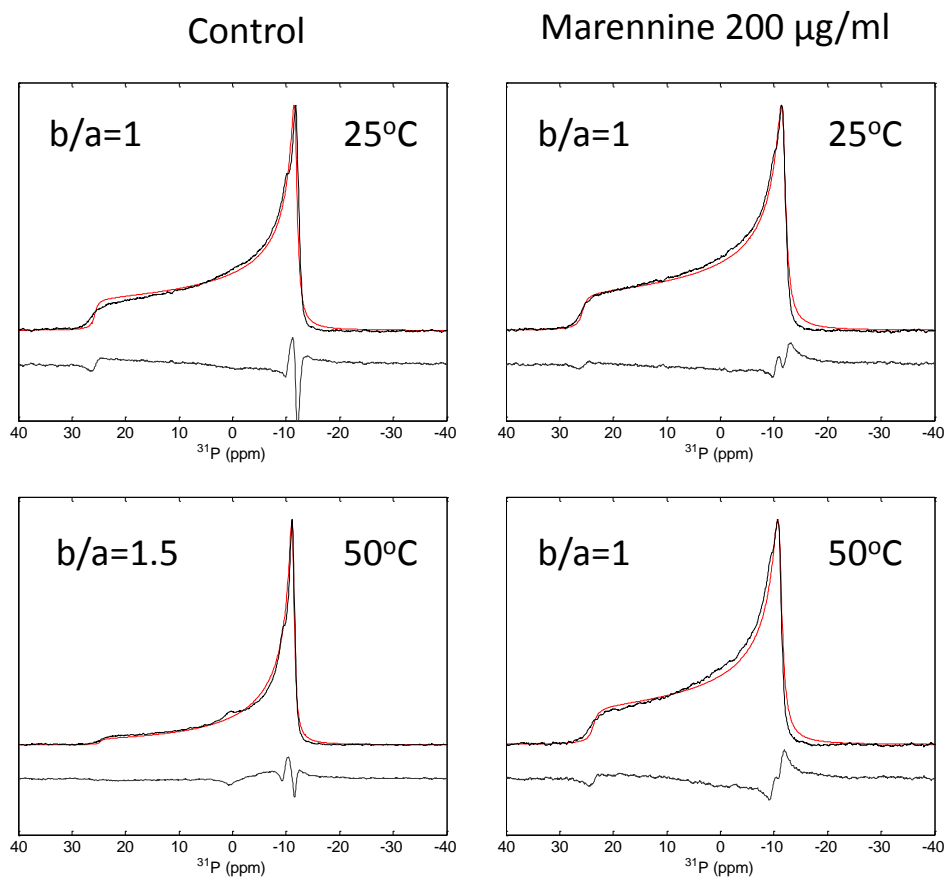


Figure-SI-2: Simulated spectra at 50 °C of control and 200 $\mu\text{g/ml}$ Marennine.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Grâce à ses propriétés antibactériennes, la marennine représente une molécule naturelle prometteuse pour la lutte contre les agents pathogènes dans les écloséries. La marennine a prouvé son effet de prophylaxie observé dans des projets pilotes d'écloséries expérimentales de moules et de pétoncles (Holbach, 2014; Turcotte, 2014). Elle a été également proposée par l'équipe de R. Tremblay comme une des substances naturelles les plus utiles pour l'amélioration de la santé des animaux aquatiques, dans un contexte de recherche et de développement en aquaculture (Pêches et Océans Canada, 2017). Actuellement, une unité de production de masse d'*H. ostrearia* est déjà mise en place depuis 2012 à l'ISMER (UQAR), pour améliorer le temps et le coût de production du pigment bleu. Cela est important pour la rentabilité de l'application d'une telle molécule alternative aux antibiotiques conventionnels, à l'échelle industrielle.

Cependant, que ce soit dans les domaines de la santé humaine ou animale, le transfert des applications des nouvelles molécules thérapeutiques et antimicrobiennes vers le monde de l'industrie, rencontre plusieurs défis. Ces défis sont liés à la régulation, la commercialisation et la recherche scientifique de l'agent antimicrobien lui-même (Payne *et al.*, 2015). Dans ce dernier cas, l'identification d'un mécanisme rationnel, pour prouver l'action de l'inhibition de croissance ou de virulence bactérienne représente le centre des défis scientifiques, qui sont si importants pour le développement de ces nouvelles substances bioactives vers le marché (Payne *et al.*, 2015). Dans ce contexte, l'étude du mécanisme d'action de la marennine, qui représente l'objectif de cette étude, est d'une importance majeure pour des applications commerciales futures. Dans cette étude, nous présentons une première tentative pour exploiter le mécanisme d'action du pigment bleu sur des bactéries aquatiques problématiques pour les élevages aquacoles, celles du genre *Vibrio*.

Puisque nos hypothèses ont été fondées sur les observations de Turcotte *et al.*(2016), certaines différences expérimentales nécessitent d'être clarifiées. Pour étudier le mécanisme

d'action, des considérations quant à la qualité et la quantité de marennine ont été prises en compte dans notre étude. Nous avons utilisé la forme extracellulaire de la marennine, *i.e.* plus effective sur la paroi membranaire d'une bactérie à Gram(-) (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Les concentrations d'essais de la marennine ont été également considérées. Généralement, les recherches réalisées, dans l'objectif d'étudier les mécanismes d'interaction antibactérienne requièrent une augmentation importante des concentrations de l'agent à tester. Dans les études qui s'intéressent à la relation effet-conséquence, comme celles réalisées par Turcotte et coll., les mesures de concentration effectives de l'agent à tester constituent des points de références utiles pour les applications dans les conditions de culture (Turcotte *et al.*, 2016). En revanche dans les études portant sur les mécanismes à l'échelle cellulaire, provoquer l'effet moléculaire en augmentant davantage les concentrations de référence est l'approche la plus utilisée, particulièrement afin d'éviter la réversibilité de l'endommagement cellulaire, connue par l'effet bactériostatique (Denyer, 1995). À faibles concentrations, le mécanisme d'endommagement cellulaire pourrait être réversible chez une cellule individuelle, comme il pourrait être caché sous l'effet de la variabilité dans les populations bactériennes lorsque les cellules individuelles auraient des sensibilités différentes à l'agent antimicrobien (Denyer, 1995). Pour pallier ce problème, l'effet bactériocidal est le plus recherché dans notre cas puisqu'il amplifie les changements de structure ou de processus physiologique, ce qui permet de les étudier sans que la cellule ne puisse se rétablir (Denyer, 1995). Pour cela, nous avons non seulement testé la marennine en utilisant la forme la plus purifiée possible (degré de purification de 77%), mais nous avons aussi testé des concentrations vingt fois plus élevées que celles utilisées dans les bassins d'élevage larvaire (Turcotte *et al.*, 2016).

Le meilleur moyen d'étudier les mécanismes d'action est d'utiliser des bactéries intactes et vivantes. Pour cette fin, nous avons eu recours à la technique de la RMN qui permet d'obtenir des informations à l'échelle moléculaire, mais aussi de scruter les effets de la marennine sans connaître sa structure chimique. Cette étude a répondu à l'hypothèse proposée, qui consistait à ce que le pigment de marennine interagisse avec la paroi membranaire des bactéries *V. splendidus*, en étudiant les effets du pigment sur les deux

composantes des phospholipides, soit les chaînes acyles et les têtes polaires. Des améliorations méthodologiques ont été réalisées pour aboutir à ces deux principaux résultats. Pour l'étude des chaînes acyles par RMN *in vivo*, nous avons développé et optimisé le protocole de marquage isotopique avant de réaliser les expériences d'exposition à la marennine. Pour l'étude des têtes polaires, nous avons utilisé les membranes modèles de *Vibrio splendidus* comme outils remplaçant les analyses *in vivo*, puisque l'étude des têtes polaires par RMN *in vivo* demande un développement méthodologique.

Avec les résultats obtenus dans cette thèse, il nous est possible de proposer un mécanisme d'action moléculaire de la marennine sur *V. splendidus*.

A. Nouvelles méthodes pour l'étude des interactions moléculaires par RMN *in vivo*

L'étape de développement méthodologique pour étudier l'effet de la marennine sur les chaînes acyles des lipides membranaires est primordiale pour étudier les interactions moléculaires avec la membrane de la bactérie. Dans cette thèse nous avons réussi à répondre au premier objectif méthodologique de la thèse, qui consistait à marquer les membranes isotopiquement pour scruter les interactions de la marennine avec les chaînes acyles par RMN, et apporté de la nouveauté et des points critiques jamais évoqués dans les études réalisées par la RMN-ÉS *in vivo*.

Le marquage isotopique des systèmes biologiques peut constituer une contrainte supplémentaire pour les études par spectroscopie quant à leur réalisation d'une manière réussie et efficace et aux effets qu'il pourrait engendrer sur les processus biologiques des microorganismes. Même si le marquage isotopique des bactéries a déjà été réalisé sur des souches d'*E. coli* et de *B. subtilis* pour étudier les effets des antibiotiques chimiques sur leurs parois membranaires (Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016; Warnet *et al.*, 2016), certaines considérations biologiques n'avaient pas encore été prises en compte. Plus spécifiquement, l'utilisation des agents surfactants dans le protocole est importante pour assurer le rendement du marquage par les acides gras exogènes (Davis *et al.*, 1979; Pius *et*

al., 2011; Tardy-Laporte *et al.*, 2013; Laadhari *et al.*, 2016). Cependant, les études précédentes ont été principalement concentrées sur le taux de viabilité après les expériences de RMN, pour assurer le caractère *in vivo*, ainsi que sur le signal de RMN lui-même. Il n'y avait pas eu de considérations reliées à l'état physiologique des organismes analysés au cours du marquage, par exemple l'effet des détergents sur la viabilité des bactéries. Ces considérations sont tout de même importantes si l'objectif ultime est étudier les interactions avec des molécules bioactives, comme les polluants, les antibiotiques, ou dans notre cas, la marennine (chapitre 4). Les détergents sont les principaux vecteurs des acides gras marqués et ils peuvent constituer un facteur de stress et de toxicité pour les bactéries au cours du marquage (le Maire *et al.*, 2000; Schuck *et al.*, 2003). Durant nos expériences préliminaires, lorsque le marquage de *V. splendidus* a été réalisé en utilisant comme détergent le DPC, un effet toxique sur ces bactéries en diminuant leurs croissances a été observé. Nous avons pu rectifier le tir en cherchant une alternative plus appropriée pour le marquage en essayant plusieurs types de détergents à plusieurs concentrations (chapitre 3). Le Tween-20 s'est avéré le meilleur détergent et son utilisation a commencé à être adaptée pour d'autres bactéries au laboratoire Marcotte (UQAM).

Les expériences préliminaires effectuées en exploitant l'effet de la marennine sur les chaînes acyles marquées ont posé un second problème jamais remarqué auparavant. Il s'agit du changement de la fluidité membranaire au cours du temps de croissance. Ce dernier est un paramètre important à prendre en considération dans les études *in vivo* sur les membranes, car la variabilité dans les mesures de fluidité ne permettrait pas de fixer des valeurs de références pour des échantillons « contrôle », ce qui empêcherait de suivre l'effet des agents exogènes dans les expériences d'exposition. Le changement de la fluidité membranaire a été observé par RMN *in vivo* de *V. splendidus* marqué et vérifié par les analyses des acides gras (par GCMS). Nos résultats ont permis de réaliser également qu'au cours de la croissance bactérienne, le profil lipidique de la bactérie marquée avec du deutérium est plus proche de celui des bactéries non marquées en fin de la phase exponentielle. Cela s'explique par un ajustement et une stratégie d'adaptation métabolique adoptée par la bactérie face à la présence des acides gras exogènes.

La variation de la fluidité membranaire en fonction de la croissance sous conditions de marquage isotopique a représenté une feuille de route utile pour la poursuite de l'étude des interactions moléculaires de la marennine avec la bactérie, mais aussi un repère pour les études mécanistiques qui utiliseraient la RMN *in vivo* dans le futur.

B. Description du mécanisme d'action de la marennine sur V. splendidus

Composantes membranaires impliquées

La paroi cellulaire de la bactérie est le siège des échanges et des interactions des molécules bioactives retrouvées dans les environnements aquatiques. Peu importe si l'agent antimicrobien avait un effet sur un processus physiologique ou sur la structure d'un organe cellulaire cible, les interactions avec les lipides membranaires sont quasi-inévitables. L'ampleur de l'effet sur la membrane pourrait cependant être différente selon le type de l'agent biocide, la dose et les conditions du milieu (Denyer, 1995).

Dans cette étude, nous avons démontré que la marennine extracellulaire induit un effet de « rigidification » des membranes sur les deux parties hydrophiles et hydrophobes des membranes. Cela se résume en un effet de resserrement des chaînes acyles et un blocage des têtes polaires. Dans l'étude *in vivo* (chapitre 4), qui vise à scruter les effets sur les chaînes acyles, nous avons proposé deux mécanismes expliquant la rigidification membranaire. Le premier consisterait en une interaction des groupements OH de la marennine avec ceux des polysaccharides des LPS, rendant la membrane externe plus serrée. Un autre mécanisme possible serait un ajustement de la bactérie pour lutter contre la fluidification de sa membrane interne et/ou externe afin d'éviter la pénétration de la marennine, qu'elle considère comme un facteur stressant. Cette dernière hypothèse implique que la bactérie change la stœchiométrie de ses acides gras insaturés. Dans le chapitre 5, l'effet sur les têtes polaires appuie indirectement l'action de la rigidification membranaire par un mécanisme passif (observé sur des membranes non biologiques, dépourvues de LPS et d'enzymes). Lorsque les membranes modèles sont plus fluides, la marennine empêche le changement des phases lipidiques et favorise leur immobilisation

structurale. Cela pourrait être expliqué par les interactions électrostatiques possibles induites par les charges négatives, ou par les groupements hydroxyles de la marennine qui interagissent en surface avec les têtes polaires, en créant des liaisons hydrogène. Dans les deux cas, nous soupçonnons que la marennine agit seulement sur la partie polaire des phospholipides située à l'interface lipide-eau, sans affecter le groupement phosphate. Également, l'effet plus faible observé sur les membranes modèles qui sont dépourvues de LPS laisse penser que la marennine aurait probablement plus d'action en interagissant avec les LPS présents dans la paroi biologique de la bactérie. Même si dans le chapitre 5 l'effet sur les têtes polaires n'a pas été testé sur des bactéries vivantes, des informations complémentaires sont apportées, qui aideraient à expliquer le mécanisme d'action de la marennine sur les bactéries vivantes, tel qu'expliqué plus loin.

La différence en concentrations effectives sur les deux composantes lipidiques est cependant remarquable. L'effet de la rigidification des chaînes acyles de *V. splendidus* est observé à des concentrations de 2 µg/ml et plus, alors que l'effet sur les membranes modèles de la bactérie n'est observé qu'en utilisant des concentrations 100 fois plus élevées, soit la concentration minimale inhibitrice (CMI). Bien que ces différences puissent s'expliquer par la différence dans les systèmes membranaires utilisés (membranes biologiques *versus* membranes modèles), ces résultats pourraient également suggérer que la marennine aurait plus d'effets qualitatifs et quantitatifs sur les chaînes acyles que sur les têtes polaires des lipides membranaires. Nos observations sont également semblables à l'effet de la déshydratation (Bechinger et al. 1991), de l'action du cholestérol (Bechinger and Seelig 1991) ou de certaines toxines peptidiques (Porcelli et al. 2004), qui ont prouvé une action sur les chaînes acyles sans nécessairement affecter la dynamique des têtes polaires.

Pour comprendre davantage le mécanisme d'action de la marennine, nous avons comparé en détail l'effet provoqué par la marennine avec les effets antibactériens d'autres substances bioactives qui ont des propriétés chimiques communes avec le pigment (composés phénoliques et anioniques), ainsi qu'avec la polymyxine B.

Comparaison de l'effet de la marennine avec les composés phénoliques

Si nous considérons la marennine comme un polyphénol (Pouvreau *et al.*, 2006b), le mode d'action que nous avons soulevé, quant à la rigidification de la membrane bactérienne (phospholipides des membranes externes et internes) est en concordance avec le mode d'action de plusieurs composés phénoliques, que ce soit sur les chaînes acyles ou les têtes polaires. Par exemple, l'action antibactérienne des polyphénols extraits du thé vert ou ceux de certaines plantes florales (*i.e. Sophora exigua*), impliquent une réduction de la fluidité membranaire en agissant au niveau des régions polaires des membranes composées de phosphatidylcholine (Tsuchiya 1999, Tsuchiya and Inuma 2000). L'action des composés phénoliques sur les têtes polaires reste cependant faible par rapport à celles d'autres composés chimiques (Fujisawa *et al.* 1988), ce qui est également en accord avec nos résultats où la marennine montre une action limitée sur la fluidité des régions hydrophiles.

Les effets des polyphénols sur le resserrement des chaînes acyles bactériennes ont été également rapportés. Certains composés phénoliques sont considérés comme des molécules exogènes stressantes pour les bactéries, qui s'activent à changer les degrés d'insaturation de ses acides gras dans l'objectif de rendre la membrane plus rigide et imperméable (Heipieper *et al.*, 1991; Diefenbach *et al.*, 1992; Morita *et al.*, 1993; Beney et Gervais, 2001; Yoon *et al.*, 2015). Dans ce cas, les molécules phénoliques ne sont pas nécessairement létales, mais lorsque les processus de régulation métabolique et de résistance membranaires par rigidification ne sont pas suffisants, l'augmentation du stress dû à la présence de ces molécules exogènes pourrait aboutir à des altérations et des lyses cellulaires (Beney et Gervais, 2001). Cette comparaison permet probablement d'expliquer les observations de Turcotte *et coll.*, dans la mesure où la marennine, qui rigidifie les chaînes acyles de la membrane de *V. splendidus*, aboutirait à perturber les processus biologiques impliqués dans sa virulence, sans la tuer (Turcotte *et al.*, 2016).

Comparaison de l'effet de la marennine avec les substances anioniques

Les effets de la marennine observés dans cette thèse sont également semblables avec plusieurs molécules anioniques. En général, les mécanismes des composés anioniques sont différents de ceux des composés cationiques (Seelig *et al.*, 1987; Thennarasu *et al.*, 2005). Par exemple, Seelig et coll. ont comparé la sensibilité des lipides membranaires en présence de molécules chargées. Ils ont démontré par RMN du ^2H , que l'écart quadripolaire des membranes de PC augmente en présence des molécules chargées négativement, indiquant un effet de rigidification des chaînes acyles, et que la tendance est inversée pour le cas des molécules cationiques (Seelig *et al.*, 1987). Pour ce qui est des effets sur les têtes polaires, plusieurs composés anioniques provoquent la contraction ou l'agrégation ou la condensation des membranes constituées majoritairement par des phospholipides zwitterioniques (Wang *et al.*, 2008; Grillo *et al.*, 2011; Morini *et al.*, 2015), ce qui pourrait le cas pour les membranes modèles de *V. splendidus* utilisé dans notre étude.

Plus spécifiquement, les résultats du chapitre 5 ont permis également de souligner le rôle des charges négatives de la marennine dans son interaction avec les phospholipides. Cette interaction implique une modification des charges de surface des membranes, ce qui se répercute en des changements de configurations, de phases et de mouvements lipidiques (Vasilenko *et al.*, 1982; Lewis et McElhaney, 2009). Les interactions électrostatiques ont été principalement étudiées pour les peptides cationiques (De Kruijff et Cullis, 1980; Arouri *et al.*, 2009; Koller et Lohner, 2014), et dans une moindre mesure pour les composés de charges négatives. Cela pourrait probablement s'expliquer par la faible intensité de l'effet des molécules anioniques sur les têtes polaires, comparées aux composés cationiques. Cette faible intensité est reliée à la cinétique de liaison avec les lipides, qui nécessite généralement des concentrations importantes pour provoquer l'effet de l'interaction (Thennarasu *et al.*, 2005) ou des températures plus élevées pour la favoriser (Morini *et al.*, 2015). Ces informations sont en effet en concordance avec nos observations lorsque l'effet de la marennine sur les têtes polaires a été mis en évidence seulement en présence de fortes concentrations du pigment (à la CMI), et à des températures plus élevées que celles des conditions de croissance (à 50 et 75°C).

Comparaison de l'effet de la marennine avec les peptides antimicrobiens : cas de la polymyxine B.

Tardy-Laporte et coll. ont soulevé l'hypothèse que la marennine extracellulaire aurait des interactions avec les LPS des bactéries *E. coli*, d'une manière semblable à celle provoquée par les nanoparticules de fullerénol (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Dans notre étude, même si les interactions entre la marennine et les LPS n'ont pas été étudiées spécifiquement, exposer les bactéries vivantes à la marennine et à la PxB, chacune à deux concentrations différentes, a permis de discuter l'hypothèse de Tardy-Laporte (2013). En effet, la cinétique du mode d'action des deux agents semble également être différente. D'ailleurs, un des défis rencontrés, dans notre étude, au cours de l'exposition des bactéries, est l'homogénéisation des conditions d'exposition entre les deux agents antibactériens. La PxB est capable d'agir en quelques minutes seulement en tuant les bactéries (au bout de 20 minutes) alors que la marennine semble interagir beaucoup plus lentement.

Dans notre étude, même si les effets des deux molécules sur la paroi bactérienne sont semblables à des concentrations faibles, les concentrations importantes testées dans cette thèse (à la CMI), permettent de déduire que les mécanismes d'action sont probablement différents. À faible dose, la PxB rigidifie la paroi membranaire en interagissant avec les LPS chargés négativement. À plus fortes concentrations, cette interaction aboutit à l'arrachement des LPS, pour déstabiliser et détruire la paroi cellulaire (Deris *et al.*, 2014). Pour ce qui est le cas de la marennine, l'utilisation du pigment purifié à des concentrations élevées, soit de 200 µg/ml (CMI), n'a pas provoqué une destruction de la paroi, mais plutôt une augmentation de la rigidité des chaînes acyles, par rapport aux effets observés aux faibles concentrations. Ces observations permettent de suggérer que la marennine agit par un mécanisme différent de celui de la PxB.

Par ailleurs, même si à ce jour toutes les expérimentations d'ordre antibactérien de la marennine ont été réalisées sur les bactéries marines à Gram(-) (Gastineau *et al.*, 2012a), il n'existe aucune d'information abordant l'effet de la marennine extracellulaire sur les bactéries aquatiques à Gram(+). D'ailleurs, dans des expériences préliminaires réalisées par

Pouvreau (2006), il est observé que la forme intracellulaire de la marennine (IMn) induit un effet antibactérien sur *Staphylococcus aureus* (Gram (+)) (Pouvreau, 2006)). Ces résultats laissent croire que les interactions de la marennine avec les LPS qui sont caractéristiques des bactéries à Gram(-) ne sont probablement pas le principal mécanisme d'action et que la marennine n'est probablement pas spécifique ou exclusive aux bactéries Gram(-).

Mécanisme d'action moléculaire proposé

À la lumière des résultats présentés aux chapitres 3, 4 et 5, et par analogie avec l'effet des molécules anioniques et phénoliques sur les membranes, nous envisageons des effets combinés de la marennine sur les deux composantes phospholipidiques.

Le mécanisme que nous proposons est alors schématisé dans la figure 51 et est expliqué comme suit : comme étant une molécule anionique riche en groupements hydroxyles, la marennine interagit avec les têtes polaires des phospholipides (PE, PG et CL), en les immobilisant, sans nécessairement induire des changements dans l'orientation de leurs groupements phosphates. Par ses propriétés de charges, la marennine pourrait aussi provoquer un changement dans la composition chimique au niveau de l'interface lipide-eau (*i.e.* changements dans les propriétés des charges de surface). Cela pourrait influencer les propriétés physiques des lipides polaires et leur configuration.

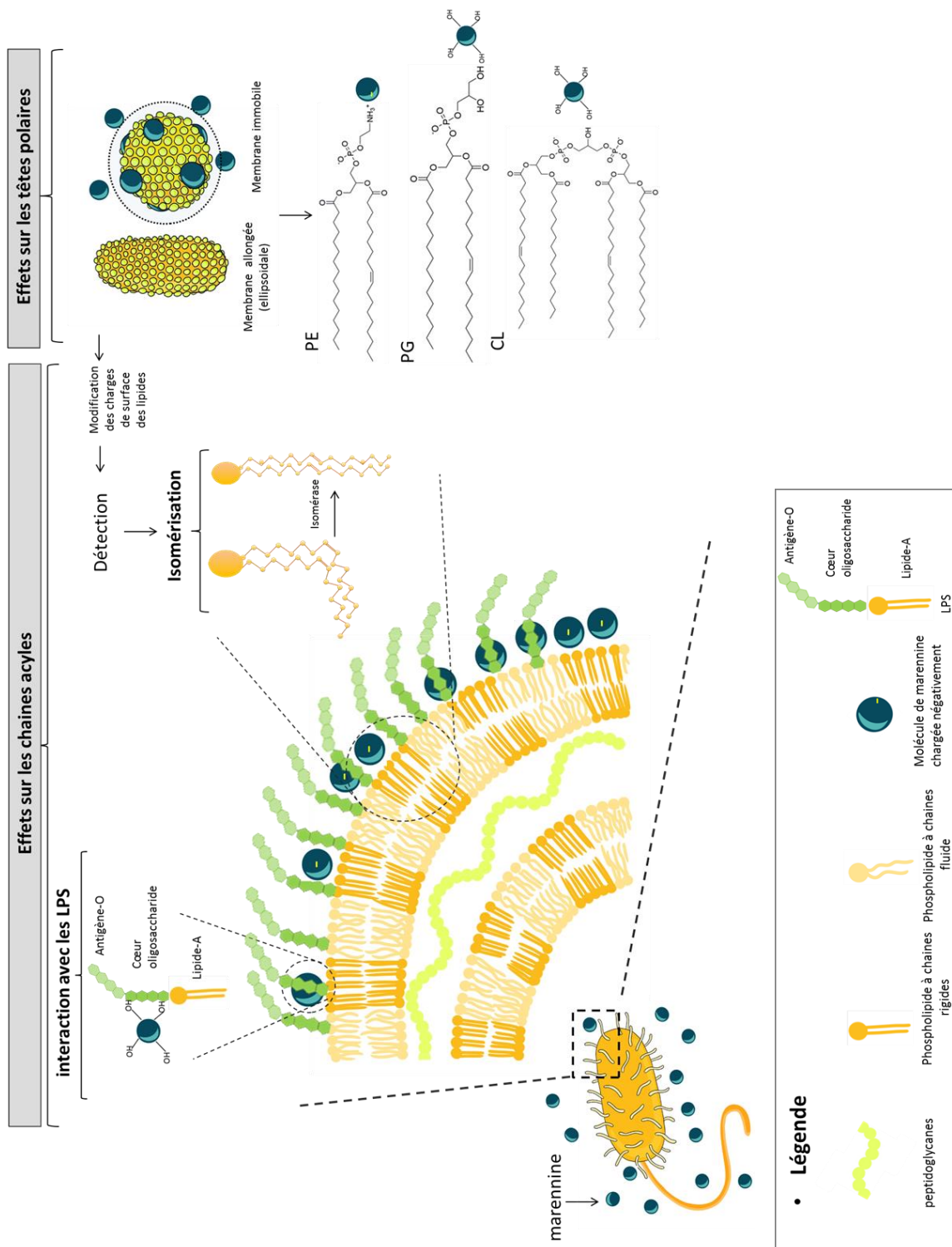


Figure 51 : Schéma conceptuel récapitulatif des hypothèses des mécanismes d'action de la marenine sur les membranes de *V. splendidus*.

Même si la marennine pouvait jouer un rôle d'immobilisation des têtes polaires des phospholipides, son action serait plus focalisée sur les chaînes acyles. Deux mécanismes possibles sont alors proposés pour expliquer le resserrement des membranes bactériennes et qui peuvent se dérouler simultanément. Le premier consiste en une interaction moléculaire directe entre les groupements hydroxyles de la marennine et ceux des polysaccharides retrouvés dans les LPS de la membrane externe. Cela provoquerait éventuellement un resserrement des feuillettes internes.

Le deuxième mécanisme est basé sur des processus métaboliques. Chez les bactéries vivantes les changements induits par la présence de molécules chargées sont perçus par les têtes polaires, qui sont de véritables détecteurs des charges électriques au niveau de la surface membranaire (Seelig *et al.*, 1987). C'est l'étape de la détection. La bactérie répond alors à la présence de ce type de stimulus en resserrant ses membranes dans l'objectif de lutter contre la pénétration de la marennine.

Dans ce cas, la réaction de résistance implique le changement du profil des acides gras ou leur arrangement selon les conditions trophiques du milieu. Lorsque la bactérie est en stade de croissance, dans un milieu riche en nutriments, elle déclenche la biosynthèse d'acides gras saturés pour diminuer la perméabilité membranaire (Heipieper *et al.*, 1992). Même si ces conditions n'ont pas été testées dans cette thèse pour éviter la variabilité de la fluidité membranaire avec la croissance telle que soulevée dans le chapitre 3, nous pourrions tout de même suggérer que l'effet de la marennine sur la virulence de *V. splendidus* qui a été observé dans les eaux d'élevage (riches en nutriments), implique un resserrement des chaînes acyles, par une modification de la biosynthèse lipidique, afin d'augmenter la résistance physique de la paroi cellulaire.

En revanche, dans le cas où les nutriments sont limités dans le milieu, soit lorsque la bactérie est en condition de croissance suspendue, telle que testé dans cette thèse, des mécanismes alternatifs nécessitant moins d'effort énergétique de la part de la bactérie, seraient utilisés. Dans ce cas, la présence de la marennine susciterait la sensibilité de la bactérie qui mobilise des enzymes isomérases pour déclencher le processus d'isomérisation

des acides gras insaturés. Les doubles liaisons se modifient pour transformer les AGs de la configuration *cis* à la configuration *trans*, ce qui aboutirait à réduire la fluidité des chaînes acyles (Diefenbach *et al.*, 1992; Heipieper *et al.*, 1992; Heipieper *et al.*, 1995). Nous suggérons également que plus la concentration de la marennine est élevée plus le nombre d'acides gras insaturés recrutés pour accomplir ce mécanisme est élevé. Ce mécanisme basé sur l'isomérisation a été déjà observé chez d'autres espèces du genre *Vibrio*, ce qui confirme la présence des enzymes isomérases chez ce groupe de bactérie (Heipieper *et al.*, 2003).

Il n'est pas possible d'affirmer à ce stade d'étude, si l'effet sur les têtes polaires des bactéries vivantes est similaire à celui des membranes modèles. Il n'est pas possible également de prévoir s'il existe un mode de régulation enzymatique ou d'adaptation mécanistiques des têtes polaires, comme pour les chaînes acyles. Cependant, nous pourrions déduire à partir de cette thèse que la marennine induit un effet passif, d'ordre physique sur les phospholipides, assuré par les propriétés électrostatiques et les groupes OH. Même si la marennine n'est pas impliquée dans une interaction directe avec les têtes hydrophiles, ses propriétés de charge constitueraient un moyen important pour débiter l'interaction moléculaire expliquée plus haut.

Ces mécanismes qui touchent les phospholipides auront probablement des répercussions sur les autres constituants membranaires. Par exemple, il a été déjà observé que la rigidification membranaire provoquée par certains phénols est directement corrélée avec des modifications du fonctionnement des canaux membranaires de K^+ et d'ATP ainsi qu'avec les flux qui y sont associés (Heipieper *et al.*, 1991; Heipieper *et al.*, 1992).

C. *Conclusion et perspectives*

Les travaux de cette thèse, en combinant les différents aspects mécanistiques permettront, en premier lieu, de contribuer aux études *in vivo* par des techniques biophysiques avancées comme la RMN, particulièrement dans le domaine environnemental. Ils permettront également de valoriser davantage la marennine pour de futures applications commerciales,

afin d'optimiser son utilisation dans les opérations aquacoles. Nous pourrions déduire à partir de l'ensemble de cette étude que la bactérie *Vibrio splendidus* est sensible à la présence de la marennine qui change son environnement électrostatique. Cette sensibilité se manifeste par une réaction d'ordre physique et biologique pour aboutir à une rigidification de la paroi membranaire sans détruire sa structure contrairement aux peptides antimicrobiens cationiques, comme la PxB. Ainsi, décortiquer les mécanismes d'action de ce pigment sur des bactéries du genre *Vibrio*, a permis à la fois de répondre à l'aspect fondamental de la recherche en étudiant le rôle physiologique de la marennine dans les systèmes biologiques, ainsi que de présenter une plate-forme d'informations pour des applications futures.

Bien que cette étude ait permis de répondre aux objectifs de la thèse, plusieurs améliorations pourraient être apportées et plusieurs études pourront être menées dans le futur pour scruter d'une manière plus précise l'action antibactérienne de la marennine.

Tout d'abord, pour mieux expliquer et valider les hypothèses évoquées dans le mécanisme proposé, il serait nécessaire de vérifier la validité d'une interaction chimique entre les LPS de la paroi bactérienne et la marennine. Par exemple, la RMN du ^{13}C pourrait être utilisée pour scruter le changement dans les structures des LPS après exposition à la marennine. Les LPS à utiliser peuvent être disponibles commercialement, comme ils peuvent être purifiés et extraits au laboratoire à partir des bactéries de *V. splendidus* marquées au ^{13}C . Ce genre d'expérience pourrait être plus simple à réaliser en utilisant des membranes modèles de *V. splendidus*, constituées non seulement par les phospholipides majoritaires, mais aussi par des LPS intégrés dans la membrane. Cette étape d'ingénierie des membranes artificielles modèles des bactéries à Gram(-) pose un défi expérimental, puisqu'à date très peu de travaux ont réussi à le faire d'une manière efficace. Une deuxième méthode pourrait être également utilisée pour exploiter l'effet de la marennine sur les LPS. Elle consiste à utiliser des morceaux de membranes biologiques qui contiennent déjà des LPS, soit les OMVs. Cependant, dans ce dernier cas, la quantité nécessaire d'échantillon à utiliser pour

étudier le mécanisme pourrait être très faible ce qui empêcherait d'avoir une bonne résolution en RMN.

Dans le même contexte, il serait parallèlement important de réaliser des expériences pour vérifier si la marennine extracellulaire (EMn) aurait un effet antimicrobien sur les bactéries aquatiques à Gram(+), cela permettrait de vérifier si le mode d'action de la marennine est spécifique à un type particulier de paroi bactérienne.

Par ailleurs, il serait opportun de vérifier l'hypothèse de la rigidification de la membrane de *V. splendidus* par processus d'isomérisation des AG insaturés suite à l'exposition à la marennine. Les deux méthodes les plus communes sont la rt-PCR par l'expression génétique du gène qui code pour l'enzyme d'isomérase ou la mesure de l'activité enzymatique de l'isomérase spécifique aux acides gras. La première méthode est peu possible pour le court terme, car à date, il n'existe aucune identification du gène qui code pour cette enzyme chez *V. splendidus*. La méthode la plus simple serait alors de trouver des marqueurs fluorescents spécifiques à l'isomérase des AGs membranaires, ce qui permettra de mesurer l'activité enzymatique en présence et en absence de marennine.

La structure chimique de la marennine représente sans doute le défi principal rencontré au cours de la conception du projet au départ ainsi qu'au cours des discussions des hypothèses évoquées dans cette thèse. La détermination de la structure de la marennine nécessitera quelques expériences plus approfondies que celles réalisées par Gastineau *et al.* (2014), qui ont utilisé la RMN du proton. Par exemple, nous proposons un marquage isotopique au ^{13}C des microalgues *Haslea ostrearia*, qui permettrait d'obtenir de la marennine marquée et qui serait étudiée par RMN-ÉS ou en solution. La connaissance de la structure moléculaire de la marennine permettra d'évoquer des hypothèses plus solides, par exemple prévoir quelle composante moléculaire de la bactérie est la plus susceptible de réagir avec quel constituant de la marennine. La détermination de la structure moléculaire du pigment devrait également faciliter toutes recherches réalisées sur les interactions de la marennine avec non seulement les bactéries, mais aussi avec les microalgues ou même les cellules eucaryotes.

Nous pourrions également apporter plus de détails quant aux mécanismes d'interaction de la marennine, en utilisant d'autres techniques complémentaires et d'autres stratégies expérimentales. Comme techniques, nous proposons de réaliser des expériences de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) qui permettraient d'étudier les affinités entre la marennine et les membranes extraites des bactéries, de déterminer la spécificité de l'interaction ainsi que sa force et sa cinétique. Une autre stratégie que nous proposons également consiste à tester l'effet de la marennine à des concentrations plus élevées que la CMI. Même si la CMI est utilisée comme un repère important dans les études bactériologiques, elle ne correspond pas nécessairement à la concentration de mortalité maximale des bactéries. En revanche, à la concentration minimale bactéricide (CMB), qui définit la concentration minimale qui provoque 99.99 % de mortalité, la marennine aurait probablement des effets différents (*i.e* destruction membranaire, lyse cellulaire, etc.) de ce qui a été observé dans la présente étude.

Sur le plan structural, la microscopie électronique de type TEM (*Transmission Electronic Microscopy*) pourrait être utilisée pour visualiser l'effet du pigment sur les structures cellulaires. Il serait également possible de réaliser des expériences de RMN *in vivo* du ^{13}C , qui permettraient d'étudier tous les constituants cellulaires à l'échelle moléculaire, comme les protéines membranaires, les LPS, etc. Bien que la réalisation de telles expériences nécessiterait un marquage isotopique avec du ^{13}C , notre protocole de marquage optimisé pour la RMN *in vivo* devrait servir comme une feuille de route, pour les expériences de RMN.

D'une manière générale, même si la marennine a montré des effets sur les phospholipides, nous soupçonnons qu'il existe d'autre(s) mécanisme(s) cellulaire(s) qui pourrait(ent) prendre place, à la suite de cette interaction avec les membranes. Même si la marennine ne franchissait pas nécessairement la paroi cellulaire, les répercussions pourraient affecter la bactérie sur le plan métabolique. Par exemple, la cytométrie en flux pourrait être employée pour évaluer le degré de stress métabolique chez les bactéries après exposition au pigment. Pour cela, on peut utiliser certains marqueurs moléculaires, qui permettent d'indiquer la

présence importante d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*Reactive oxygen species*), lorsque l'organisme subit un stress important.

Plus encore, afin de vérifier plus spécifiquement le potentiel anti-virulent de la marennine, il serait plus utile de cibler les effets de la marennine sur les constituants et les processus métaboliques impliqués dans la pathogénicité. Nous proposons, par exemple, des expériences d'exposition du pigment aux OMV (*outer membrane vesicles*) qui sont secrétées par la bactérie virulente et qui sont riches en toxines (Kuehn et Kesty, 2005; Acevedo *et al.*, 2014). Les bactéries pourraient être stressées par un facteur stimulant (*i.e.* un choc de pression osmotique ou un produit chimique) pour qu'elles puissent sécréter les OMVs, en présence et en absence du pigment. Par exemple, si en présence de la marennine la bactérie ne parvient pas à sécréter les OMVs, ou si elle sécrète une quantité moins importante qu'en son absence, cela pourrait renseigner sur un dysfonctionnement du processus de la virulence. Évidemment, le processus du *quorum sensing* (QS) qui implique des molécules de communications chimiques entre les communautés bactériennes dans l'objectif d'accomplir leurs fonctions de pathogénicité pourrait également être testé. Le *quorum quenching* (QQ), qui implique un blocage du *quorum sensing*, est un processus particulièrement intéressant puisqu'il permet l'inhibition de l'expression de la virulence sans provoquer de mortalité bactérienne (Rémy *et al.*, 2016). Pour vérifier ces hypothèses, des expériences d'ordre bactériologique sont nécessaires.

Finalement, dans les discussions relatives au potentiel d'action antibactérienne et/ou anti-virulente de la marennine, il faut prendre en considération les autres propriétés biologiques du pigment qui joueront probablement un rôle dans l'interaction biochimique avec les organismes biologiques. Plus spécifiquement, l'action antioxydante de la marennine pourrait avoir un impact profond sur la manifestation de l'effet antimicrobien (Figure 52). Dans ce cas, les expériences devraient nécessairement inclure les larves des espèces les plus touchées par *V. splendidus* (ou par d'autres bactéries potentiellement virulentes). En étudiant l'action antioxydante sur les larves, la marennine pourrait avoir un rôle protecteur en neutralisant les radicaux libres et ralentissant les réactions d'oxydation chez ces

invertébrés. Parallèlement, la marennine agirait sur la paroi des bactéries en les empêchant d'accomplir convenablement leurs processus physiologiques, incluant probablement l'expression du phénotype de virulence. Rappelons également que les *V. splendidus* sont des espèces opportunistes, qui profitent de l'immunité détériorée de l'organisme hôte. De ce fait, si les bactéries sont « affaiblies » par une perturbation métabolique, alors que l'organisme hôte est protégé par l'action antioxydante du pigment, la pathogénicité ne devrait pas s'exprimer. Ces hypothèses nécessiteraient des études biochimiques, microbiologiques et physiologiques plus approfondies.



Figure 52 : Schéma hypothétique de l'effet antivirulent de la marennine extracellulaire dans les conditions d'élevages larvaires

ANNEXES : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

ANNEXE I : Culture bactérienne

Tout au long des expériences de cette thèse, *V. splendidus* était cultivée à 25°C et à une agitation de 100 rpm dans un milieu LB (Lysogeny Broth). Les cultures mères ont été cultivées durant 3 jours avant d'effectuer des repiquages successifs tous les 2 jours à la même heure. Ce processus est répété tous les trois mois à partir d'un inoculum initial, car après cette durée, les cultures commencent à devenir contaminées. Pour les expériences de RMN, les précultures utilisées étaient âgées d'un jour seulement pour éviter l'utilisation d'une culture vieille avec des cellules mortes. Autrement dit, l'inoculum initial utilisé avant de marquer la bactérie était prélevé à partir de bactéries qui n'ont pas encore atteint la phase stationnaire. Au départ, notre souche a été cultivée dans un milieu salin, celui de Marine Broth (Turcotte *et al.*, 2016). Cependant, ce milieu de culture a créé des contraintes liées au lavage des cellules au cours des expériences d'extraction des acides gras bactériens. On soupçonne que les lipides restent accrochés aux nutriments et aux sels minéraux du milieu. Cela explique le changement du milieu de culture pour le milieu LB. La souche de *V. splendidus* utilisée est en effet tolérante aux faibles salinités, mais requiert un minimum de concentration de NaCl, soit de 10g/l, d'où le choix du milieu LB avec la composition (10g/L NaCl, 10 g/l tryptone et 5 g/l d'extraits de levure).

ANNEXE II : Optimisation du marquage isotopique

Choix du détergent

L'optimisation du marquage est liée en grande partie au choix de l'agent surfactant utilisé pour pouvoir intégrer efficacement les acides gras exogènes et de ce fait augmenter le taux de marquage isotopique dans les membranes sans provoquer d'effets néfastes sur leurs

métabolismes. Brièvement le protocole consiste à mélanger les acides gras exogènes avec un agent surfactant et d'effectuer quelques cycles de gel/dégel.

Ainsi, tels que détaillés dans le chapitre-3, plusieurs détergents ont été testés à leur concentration micellaire critique (CMC), c'est-à-dire la concentration à partir de laquelle le détergent commence à former des micelles et donc efficace pour intégrer les acides gras exogènes ou d'autres, composées. La CMC est spécifique pour chaque détergent et peut être variable selon la température (Mohajeri et Noudeh, 2012). On définit le point de Krafft (T_k), la température à partir de laquelle la solubilité du détergent augmente soudainement pour donner des concentrations égales à la CMC (Lu *et al.*, 2018). Cette température est généralement proche du point de trouble (Figure A1), qui définit la température à partir de laquelle les détergents forment une séparation de phase par agglomération des micelles dans l'eau (Alauddin *et al.*, 2009). Ainsi après observation du point de trouble, l'échantillon refroidi à la température ambiante par exemple, on estime que le détergent est entièrement dissous sous forme de micelles, et la solution du mélange devient transparente.

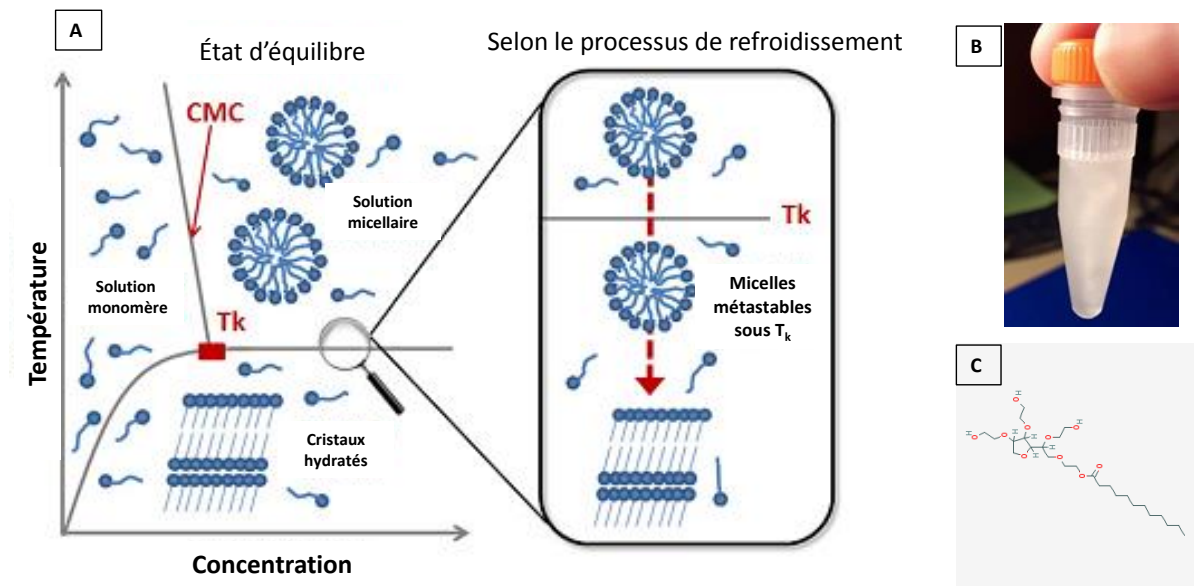


Figure A1 : Optimisation de la dissolution du détergent au cours du marquage isotopique.(A) : courbe de la variation de la formation des micelles du détergent en fonction de la température et de la concentration (Lu *et al.*, 2018), (B) photographie du point de trouble d'un échantillon de milieu marqué avec l'AP-d₃₁ et au détergent du Tween-20 (0.14mM) au cours de la préparation (C) structure chimique du Tween-20 (ou polysorbate-20).

Les propriétés physico-chimiques des détergents testés ont été mentionnées dans les fiches techniques de chaque détergent selon la compagnie fournisseur (voir tableau A1) et dans la section « matériels et méthodes » du chapitre-3. Cependant, les valeurs de ces propriétés peuvent varier selon les conditions ioniques du milieu (Alauddin *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2018).

Tableau A1 : Différentes propriétés des détergents testés pour marquer *V. splendidus*.

Agent surfactant	CMC (mM)	Température de dissolution °C
Triton-X-100	0,2-0,9	65
Brij-35	0,09	45
CHAPS	0,012	157
DPC	0,06	75
Tween-20	20 à 25	37
OG	6 à 10	100
Tween-80	0.012	75

Abréviations et légende : CHAPS, diméthylammonio]-1-propanesulfonate hydrate, DPC: Dodecylphosphocholine, OG : octylglucopyranoside, Polyethylene glycol sorbitan monolaurate (Tween® 20 ou polysorbate20). Le Tween-80 a été testé, mais il n'a pas permis la dissolution de l'AP à son CMC.

Pour favoriser la dissolution et atteindre le point de Krafft, au cours des cycles de gel-dégel, on peut chauffer lentement le mélange contenant le détergent et les acides gras dans le milieu de culture aqueux. Nous avons tenu compte des températures de dissolution des cristaux de l'AP deutéré acheté qui est de 65°C ainsi que de la température du point de trouble du détergent en question.

Choix des AGs exogènes

Pour connaître si la quantité d'AP-d³¹ aurait un effet sur la qualité de marquage, nous avons testé les bactéries en présence du Tween-20 à deux concentrations, soit à C₁=0.3mM et à C₂=0.5mM. Les spectres RMN-ÉS en MAS (10kHz) obtenus ont permis de donner des pics légèrement plus intenses en C₂ (Figure-A2). La différence dans les valeurs de M₂ est de

l'ordre de 3 unités. Pour cela nous avons choisi de travailler avec la concentration C_1 , car elle semble être suffisante pour favoriser le marquage sans autant rigidifier la membrane.

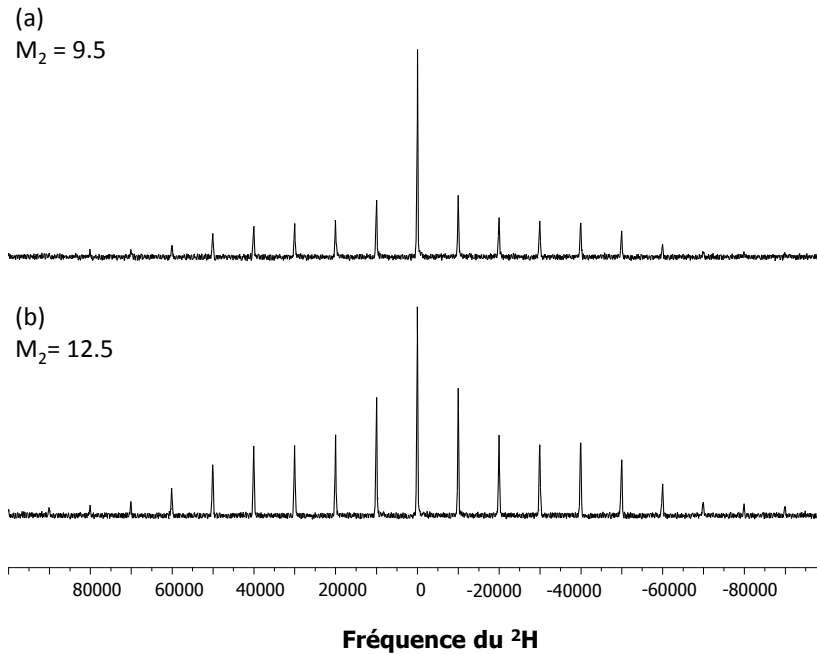


Figure A2 : Spectres MAS (10 kHz) pour des bactéries marquées avec deux concentrations d'AP d_{31} : (a) concentration C_1 (0.3mM), (b) concentration C_2 (0,5mM). Les valeurs de M_2 de chaque spectre sont indiquées et sont exprimées en 10^9 s^{-2}

Les spectres des bactéries marquées avec du deutérium sont détaillés dans le chapitre-3. Lorsque les expériences de RMN sont effectuées en absence de bactéries, soit sur le mélange d'AP- ^2H ($C_1=0.3\text{mM}$) et du détergent seulement (concentration micellaire critique), le spectre généré montre la formation de structures dont la fluidité a été évaluée à $M_2 = 75 \cdot 10^9 \text{ s}^{-2}$ (Figure A3). Cela suggère que l'AP- ^2H forme des structures rigides avec le détergent avant d'être intégré par les bactéries, qui auront des fluidités membranaires très inférieures (voir chapitre 3). Ainsi, les signaux de RMN obtenus et présentés au cours de nos expériences sont bel et bien ceux des chaînes acyles des membranes marquées et non des vésicules de l'acide palmitique dissous dans le milieu de culture.

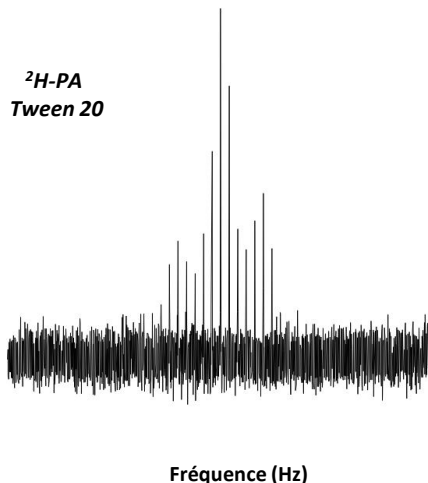


Figure A3 : Spectre de structures vésiculaires formées entre AP-²H et le détergent (Tween-20) dans le milieu LB, sans bactéries ($M_2 = 75 \cdot 10^9 \text{ s}^{-2}$)

ANNEXE III : Choix des techniques et de séquence de RMN -²H

Le marquage isotopique a permis d'enregistrer des spectres en mode statique et en mode de rotation à l'angle magique à différentes vitesses de rotation (5 kHz et 10 kHz), tel que montré dans la Figure A4. Les trois spectres permettent d'avoir les mêmes valeurs de fluidité membranaire. Nous avons choisi de travailler durant toutes les expériences avec le mode MAS, pour réduire le temps de l'expérience, et à une vitesse de rotation de 10 kHz. Cette vitesse est optimale pour les bactéries intactes et vivantes. Elle est suffisamment faible pour éviter l'effet du chauffage excessif de l'échantillon et elle est assez élevée pour avoir une bonne résolution de signal tout en évitant les interférences moléculaires des mouvements de fréquences dus au rotor (Warnet *et al.*, 2016).

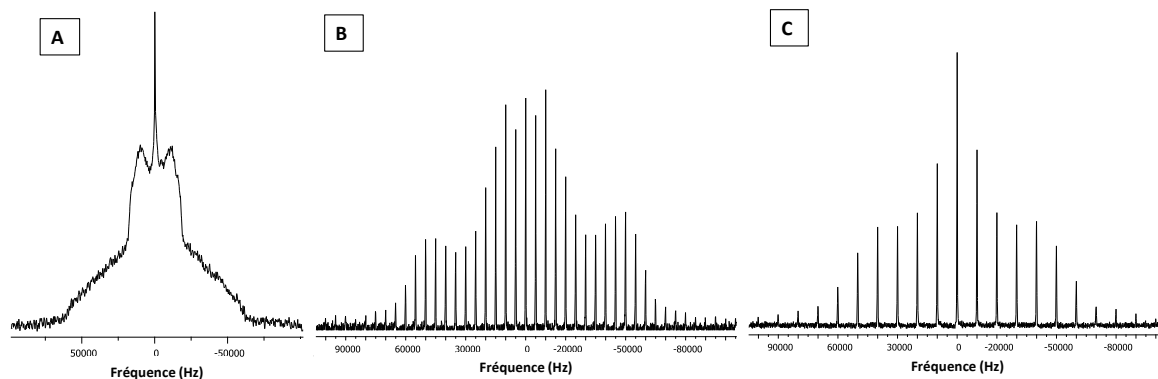


Figure A4 : Spectres RMN- ^2H en mode statique et en MAS des bactéries marquées. Les bactéries marquées avec AP- d_{31} (0,3 mM) et du Tween20 (0,14 mM) ont été échantillonnées au cours de la phase exponentielle. Les expériences sont effectuées à 25°C, les M_2 sont de $40 \cdot 10^9 \text{ s}^{-2}$. (A) spectre statique après 3 heures d'acquisition. (B) spectre MAS avec vitesse de rotation de 5 kHz, 20 minutes et (C) spectre MAS avec vitesse de rotation de 10 kHz, 20 minutes. Expériences réalisées au spectromètre 400 MHz.

Nos premières expériences étaient réalisées au spectromètre 400 MHz. Cependant, nous avons remarqué un problème d'asymétrie dans la distribution des pics, ce qui donne des valeurs de M_2 différentes entre le côté droit et côté gauche du spectre. Dans une tentative de résoudre ce problème, nous avons essayé plusieurs séquences de pulses pour le même échantillon. Même si les raisons de ce problème d'asymétrie ne sont pas identifiées à ce jour, ces expériences ont permis de déterminer la meilleure séquence donnant le meilleur compromis entre la distribution la plus symétrique des pics et l'intensité qui donnerait la capacité de quantifier M_2 . Nous avons testé la séquence de l'écho de Hahn ($90^\circ 180^\circ$), de l'écho Hahn modifié ($90^\circ 45^\circ$), de ZG (un pulse de 90°) et de ZG modifiée (un pulse de 45°). Ces expériences pour les séquences ZG et ZG modifiées ont permis d'obtenir des spectres à des pics symétriques. Par contre, la quantification de M_2 a donné des valeurs très faibles avec des pertes d'intensité (Figure A5). Les spectres issus de l'écho de Hahn et de l'écho de Hahn modifié ont donné des spectres d'asymétrie comparable, mais ceux issus de la séquence de l'écho de Hahn ont donné des valeurs plus élevées en M_2 . Cette dernière a été choisie pour l'ensemble de nos expériences réalisées au spectromètre 600 MHz, plus puissant et ne donnant pas de problème d'asymétrie dans les spectres.

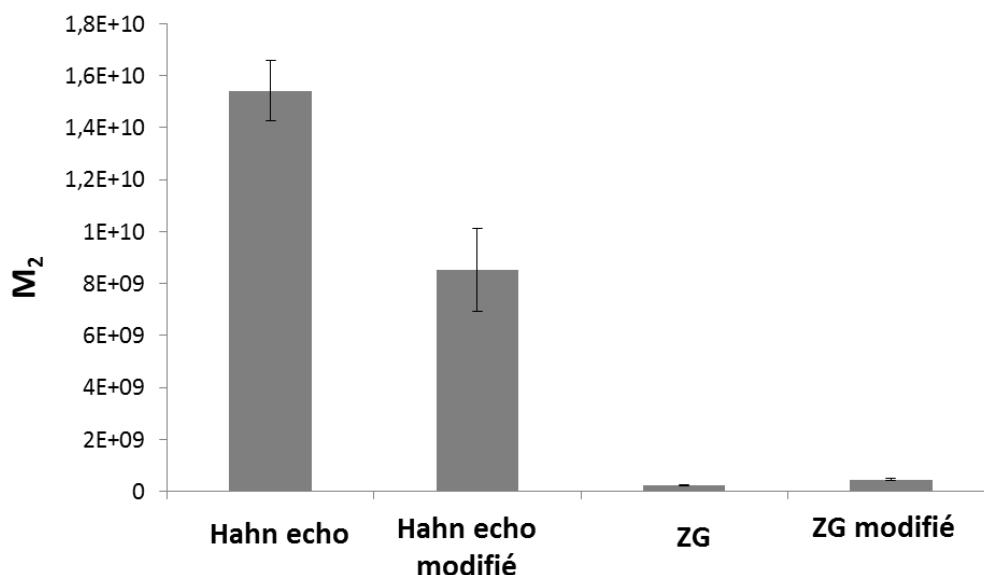


Figure A5 : Quantification du second moment à partir de spectres d'un seul échantillon analysé avec plusieurs séquences de pulse. Les expériences en MAS (10 kHz) ont duré 20 minutes à 25°C. M_2 est exprimé en s⁻².

ANNEXE IV : Optimisation des expériences de la marennine

Comme première tentative pour étudier les mécanismes d'action de la marennine sur les membranes de *V. splendidus*, nous avons commencé par tester la concentration effective du pigment observée dans les bassins d'élevage larvaire des bivalves (0,1 mg/l), qui a induit une suppression de la virulence sans provoquer d'effet sur la prolifération bactérienne (Turcotte *et al.*, 2016). À cette concentration, la marennine n'a effectivement aucune action sur la croissance de la bactérie, d'autant plus, elle n'affecte pas sa fluidité membranaire après que la bactérie a été cultivée en présence du pigment. Cela était également valable même à une concentration de 0,5 mg/l.

Comme deuxième étape, nous avons réalisé plusieurs expériences préliminaires en essayant différentes concentrations de marennine, différents temps d'exposition et différents milieux d'exposition après avoir récolté et lavé les bactéries (Tableau A2). Une agitation de 100 rpm est utilisée lors de l'exposition pour favoriser le contact entre les cellules et le pigment. Le choix d'exposer *V. splendidus* en absence de nutriments (exposer après lavage),

s'explique par la volonté d'arrêter la croissance bactérienne afin d'éviter le changement de la fluidité membranaire (voir chapitre-3) ce qui peut créer des biais dans les résultats. Nous avons remarqué que la fluidité membranaire diminue drastiquement au cours du temps, lorsque les bactéries sont exposées à l'eau saline 10‰ avec ou sans marennine, et peu importe la concentration du pigment.

Tableau A2 : Différentes conditions d'optimisation des expériences d'exposition de *V. splendidus* à la marennine

Milieu d'exposition	Durée D'exposition	Concentration de marennine (mg/l)	Variation de M ₂ après exposition	
NaCl 10‰	2h	0	-30%	
		2	-30%	
	4h	0	-60%	
		0,5	-60%	
		2	-60%	
		une nuit	0	-75% à 90%
		0,5		
	45 min	2	-2%	
	Eau de mer artificielle	45 min	0	0%
			2	0%
2h		0	10%	
		2	50%	
4h		2	0%	
une nuit		0	-17%	
		2	-10%	

En revanche, lorsque l'exposition est réalisée en présence d'eau de mer artificielle (EMA), les membranes semblent être légèrement rigidifiées au bout de 2 heures, et semblent garder leurs fluidités initiales durant 4 heures. Cela pourrait s'expliquer par deux processus qui s'effectuent en même temps, soit celui de la dégradation de l'intégrité membranaire, soupçonnée de commencer après 2 heures et celui de la « rigidification » de la membrane sous l'effet des sels de l'eau de mer qui conservent son intégrité. Ainsi, au bout de 4 heures

d'exposition, les deux effets s'annulent ce qui donne des valeurs de M_2 semblables par rapport à la membrane à l'état initial. Lorsque l'exposition dure une nuit entière (12h) la fluidité membranaire en présence de l'EMA, diminue légèrement, mais reste relativement intacte par rapport aux membranes exposées à l'eau saline 10‰ (Tableau A2). Le tableau A2 montre aussi qu'une exposition à la marennine de 2 mg/l durant 45 minutes n'est pas suffisante pour induire un effet.

ANNEXE VI : Effet de la marennine sur les membranes modèles : Choix de la solution tampon

Puisque la marennine a induit un effet visible sur les chaînes acyles des membranes en présence d'eau de mer (EMA), lorsque nous avons voulu tester son effet sur les têtes polaires par RMN du phosphore, nous nous sommes rendu compte que pour les expériences sur les têtes polaires des phospholipides des membranes modèles, en absence de toute régulation biologique, le système est largement influencé par la nature du milieu, soit des propriétés ioniques des solutions tampons. Lorsque nous avons testé les membranes modèles dans une solution tampon standard sans métaux (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA) et dans l'EMA nous voyons une différence au niveau des phases selon la température et selon le milieu. Par exemple, il y a apparition de la phase hexagonale en présence de l'EMA à 50 et à 75°C. En présence d'EMA, la marennine testée sur les membranes modèles n'a montré aucun effet sur les têtes polaires, même à la concentration élevée (la CMI). Cela suggère que l'effet des métaux dans cette solution est tellement important par rapport à celui de la marennine qu'il le cache.

Dans la littérature, il est largement reporté que les propriétés de polymorphisme des lipides sont fortement reliées aux ions divalents, particulièrement au calcium et au magnésium (De Kruijff et Cullis, 1980; Vasilenko *et al.*, 1982; Rietveld *et al.*, 1993). Nous avons vérifié cette hypothèse sur nos systèmes de membranes modèles, en testant l'effet du magnésium (45 mM). La figure A6 confirme le rôle des métaux présents en fortes quantités dans l'apparition de la phase hexagonale, particulièrement à des températures élevées. Pour ces

raisons, l'étude de la marennine sur les têtes polaires des membranes modèles a été réalisée en utilisant une solution de tampon standard sans métaux (voir chapitre-5)

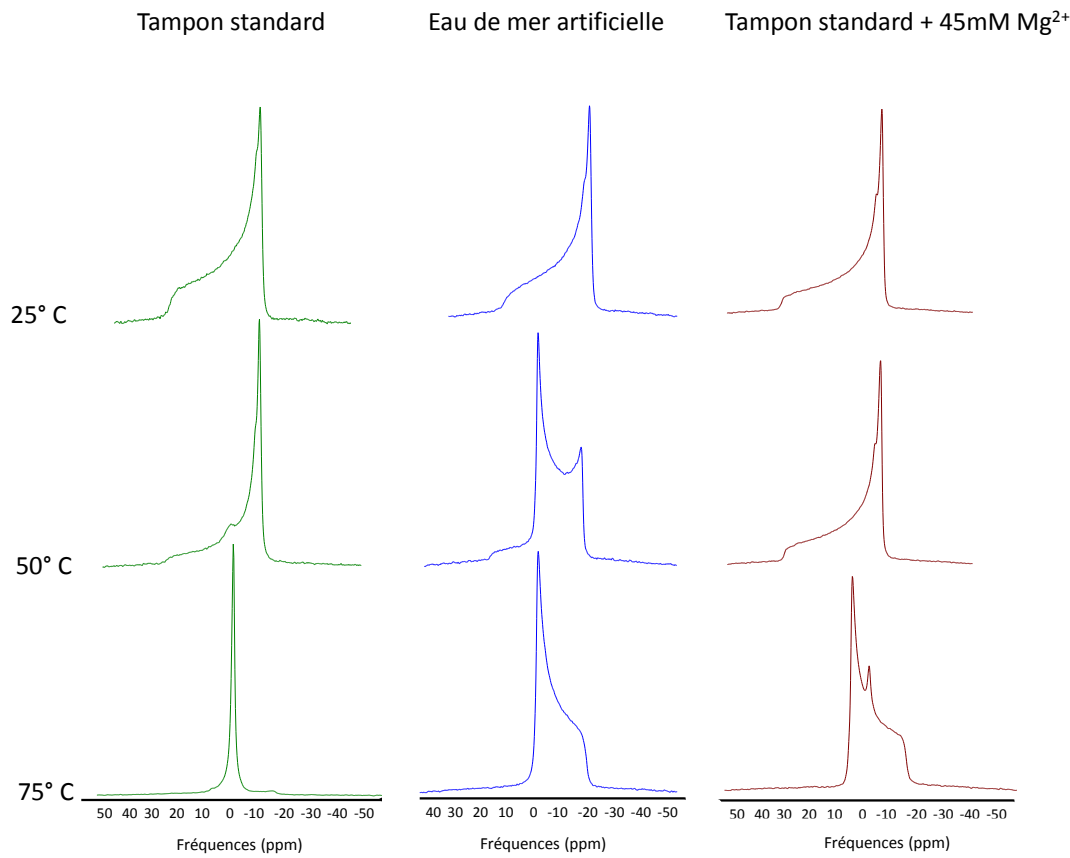


Figure A6 : Polymorphisme des membranes modèles de *V. splendidus* à différentes solutions tampons et sous différentes températures (équilibration de 25 minutes).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acevedo R, Fernández S, Zayas C, Acosta A, Sarmiento ME, Ferro VA, Rosenqvist E, Campa C, Cardoso D et Garcia L. 2014. Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Frontiers in immunology*, **5** : 1-6.

Aguilera-Rivera D, Escalante-Herrera K, Gaxiola G, Prieto-Davó A, Rodríguez-Fuentes G, Guerra-Castro E, Hernández-López J, Chávez-Sánchez MC et Rodríguez-Canul R. 2018. Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. *Journal of the World Aquaculture Society* : 1-18.

Akutsu H et Seelig J. 1981. Interaction of metal ions with phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochemistry*, **20** : 7366-7373.

Alauddin M, Parvin T et Begum T. 2009. Effect of organic additives on the cloud point of triton X-100 micelles. *Journal of Applied Sciences*, **9** : 2301-2306.

Aljohani HA. 2016. Role of Carboxylate ligands in the Synthesis of AuNPs: Size Control, Molecular Interaction and Catalytic Activity. Thèse de doctorat en sciences chimiques, King Abdullah University of Science and Technology, Arabie-Saudite, 310 p.

Allam B, Paillard C et Ford SE. 2002. Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. *Diseases of aquatic organisms*, **48** : 221-231.

Andrew E, Bradbury A et Eades R. 1958. Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. *Nature*, **182** : 1659.

Andrew E, Bradbury A et Eades R. 1959. Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature*, **183** : 1802.

Andrew E, Farnell L, Firth M, Gledhill T et Roberts I. 1969. High-speed rotors for nuclear magnetic resonance studies on solids. *Journal of Magnetic Resonance*, **1** : 27-34.

Araya MT, Siah A, Mateo DR, Markham F, McKenna P, Johnson GR et Berthe FC. 2009. Morphological and molecular effects of *Vibrio splendidus* on hemocytes of softshell clams, *Mya arenaria*. *Journal of Shellfish Research*, **28** : 751-758.

Arnold AA. *communication personnelle*. Presentation RMN théorie générale. Université du Québec à Montréal, Montréal.

Arnold AA, Genard B, Zito F, Tremblay R, Warschawski DE et Marcotte I. 2015. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by ^{13}C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1848** : 369-377.

Arouri A, Dathe M et Blume A. 2009. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: a mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes? *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1788** : 650-659.

Austin B et Zhang XH. 2006. *Vibrio harveyi* : a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in applied microbiology*, **43** : 119-124.

Baker-Austin C, Trinanés J, Gonzalez-Escalona N et Martinez-Urtaza J. 2017. Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change. *Trends in microbiology*, **25** : 76-84.

Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M, Ali A, Waldor MK, Qadri F et Martinez-Urtaza J. 2018. *Vibrio spp.* infections. *Nature Reviews Disease Primers*, **4** : 8.

Baker JL, Chen L, Rosenthal JA, Putnam D et DeLisa MP. 2014. Microbial biosynthesis of designer outer membrane vesicles. *Current opinion in biotechnology*, **29** : 76-84.

Baquero F, Martínez J-L et Cantón R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, **19** : 260-265.

Barton LL. 2005. Cellular Growth and Reproduction. Dans : Springer éd. Structural and Functional Relationships in Prokaryotes New York, p. 292-346.

Bax A et Grzesiek S. 1993. Methodological advances in protein NMR. Dans : NMR of Proteins. Springer, p. 33-52.

Baysse C, Cullinane M, Denervaud V, Burrowes E, Dow JM, Morrissey JP, Tam L, Trevors JT et O'Gara F. 2005. Modulation of *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology*, **151** : 2529-2542.

Beaubrun JJ-G, Gopinath G, Kothary MH, Franco A, Curtis SK, Eribo BE et Tall BD. 2011. Influence of iron-chelated growth conditions on outer membrane protein production and virulence of *Vibrio tubiashii*. *Food microbiology*, **28** : 1409-1413.

Beaz-Hidalgo R, Diéguez AL, Cleenwerck I, Balboa S, Doce A, De Vos P et Romalde JL. 2010. *Vibrio celticus* sp. nov., a new *Vibrio* species belonging to the Splendidus clade with pathogenic potential for clams. *Systematic applied microbiology*, **33** : 311-315.

Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde JL et Figueras MJ. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental microbiology reports*, **2** : 34-43.

Bechinger B et Salnikov ES. 2012. The membrane interactions of antimicrobial peptides revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Chemistry physics of lipids*, **165** : 282-301.

Beney L et Gervais P. 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57** : 34-42.

Bergé J, Bourgougnon N, Carbonnelle D, Le Bert V, Tomasoni C, Durand P et Roussakis C. 1996. Antiproliferative effects of an organic extract from the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. Against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6). *Anticancer research*, **17** : 2115-2120.

Bernad A, Zaballos A, Salas M et Blanco L. 1987. Structural and functional relationships between prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *The EMBO journal*, **6** : 4219.

Binesse J, Delsert C, Saulnier D, Champomier-Verges M-C, Zagorec M, Munier-Lehmann H, Mazel D et Le Roux F. 2008. Metalloprotease vsm is the major determinant of toxicity

for extracellular products of *Vibrio splendidus*. *Applied and environmental microbiology*, **74** : 7108-7117.

Bisignano G, Tomaino A, Cascio RL, Crisafi G, Uccella N et Saija A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of pharmacy and pharmacology*, **51** : 971-974.

Bjelland AM, Johansen R, Brudal E, Hansen H, Winther-Larsen HC et Henning S. 2012. *Vibrio salmonicida* pathogenesis analyzed by experimental challenge of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Microbial pathogenesis*, **52** : 77-84.

Bligh EG et Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, **37** : 911-917.

Bloom M et Mouritsen OG. 1988. The evolution of membranes. *Canadian journal of chemistry*, **66** : 706-712.

Bloom M, Davis J et Dahlquist F. 1979. Determination of orientational order in bilayer systems using moments of deuterium magnetic resonance spectra. Dans : *Magnetic Resonance and Related Phenomena*. Springer, p. 551-551.

Bohuszewicz O, Liu J et Low HH. 2016. Membrane remodelling in bacteria. *Journal of structural biology*, **196** : 3-14.

Booth V, Warschawski DE, Santisteban NP, Laadhari M et Marcotte I. 2017. Recent progress on the application of ^2H solid-state NMR to probe the interaction of antimicrobial peptides with intact bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*.

Borowitzka MA. 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints. *Journal of applied phycology*, **9** : 393-401.

Bouhrel Z, Arnold AA, Warschawski ED, Lemarchand K, Tremblay R et Marcotte I. 2019. Labelling strategy and membrane characterization of marine bacteria *Vibrio splendidus* by *in vivo* ^2H NMR. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*, **1861** : 871-878.

Bouhlef Z, Arnold AA, Warschawski DE, Lemarchand K, Tremblay R et Marcotte I. *in press*. Insight into the interaction mechanism of marennine with *Vibrio splendidus* as seen by in vivo ^2H solid-state NMR.

Bowler C, De Martino A et Falciatore A. 2010. Diatom cell division in an environmental context. *Current opinion in plant biology*, **13** : 623-630.

Bozarth A, Maier U-G et Zauner S. 2009. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, **82** : 195-201.

Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, **56** : 317-333.

Brisebois PP, Arnold AA, Chabre YM, Roy R et Marcotte I. 2012. Comparative study of the interaction of fullerene nanoparticles with eukaryotic and bacterial model membranes using solid-state NMR and FTIR spectroscopy. *European Biophysics Journal*, **41** : 535-544.

Brogden KA, Ackermann M et Huttner KM. 1997. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **41** : 1615-1617.

Brogden KA, Ackermann M, McCray Jr PB et Tack BF. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International journal of antimicrobial agents*, **22** : 465-478.

Brown RN et Gulig PA. 2008. Regulation of fatty acid metabolism by FadR is essential for *Vibrio vulnificus* to cause infection of mice. *Journal of bacteriology*, **190** : 7633-7644.

Bruhn JB, Dalsgaard I, Nielsen KF, Buchholtz C et Larsen JL. 2005. Quorum sensing signal molecules (acylated homoserine lactones) in gram-negative fish pathogenic bacteria. *Diseases of aquatic organisms*, **65** : 43-52.

Burnett L et Muller B. 1971. Deuteron quadrupole coupling constants in three solid deuterated paraffin hydrocarbons: C_2D_6 , C_4D_{10} , C_6D_{14} . *The Journal of Chemical Physics*, **55** : 5829-5831.

Byers DM. 1989. Elongation of exogenous fatty acids by the bioluminescent bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of bacteriology*, **171** : 59-64.

Cabello FC. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, **8** : 1137-1144.

Cadoret J-P et Bernard O. 2008. La production de biocarburant lipidique avec des microalgues: promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie*, **202** : 201-211.

Cao R, Liu Y, Wang Q, Yang D, Liu H, Ran W, Qu Y et Zhao J. 2018a. Seawater acidification reduced the resistance of *Crassostrea gigas* to *Vibrio splendidus* challenge: an energy metabolism perspective. *Frontiers in physiology*, **9** : 1-14.

Cao R, Wang Q, Yang D, Liu Y, Ran W, Qu Y, Wu H, Cong M, Li F et Ji C. 2018b. CO²-induced ocean acidification impairs the immune function of the Pacific oyster against *Vibrio splendidus* challenge: An integrated study from a cellular and proteomic perspective. *Science of The Total Environment*, **625** : 1574-1583.

Carbonnelle D, Pondaven P, Morançais M, Massé G, Bosch S, Jacquot C, Briand G, Robert J et Roussakis C. 1998. Antitumor and antiproliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea ostrearia* (Simonsen) against solid tumors: lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M96) cell lines. *Anticancer research*, **19** : 621-624.

Carr HY et Purcell EM. 1954. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Physical review*, **94** : 630.

Carty C et Ingram L. 1981. Lipid synthesis during the *Escherichia coli* cell cycle. *Journal of bacteriology*, **145** : 472-478.

Casadevall A et Pirofski L-a. 2009. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *Journal of water health*, **7** : S2-S18.

Cavallo RA et Stabili L. 2002. Presence of *vibrios* in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, **36** : 3719-3726.

Chandrakala N et Priya S. 2017. Vibriosis in Shrimp Aquaculture A Review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, **3**.

Chartrand É, Arnold AA, Gravel A, Jenna S et Marcotte I. 2010. Potential role of the membrane in hERG channel functioning and drug-induced long QT syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*, **1798** : 1651-1662.

Chauton MS, Optun OI, Bathen TF, Volent Z, Gribbestad IS et Johnsen G. 2003. HR MAS ¹H NMR spectroscopy analysis of marine microalgal whole cells. *Marine Ecology Progress Series*, **256** : 57-62.

Cheng S-Y, Hsu S-W et Chen J-C. 2007. Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish & shellfish immunology*, **22** : 16-26.

Clatworthy AE, Pierson E et Hung DT. 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, **3** : 541.

Clausell A, Pujol M, Alsina M et Cajal Y. 2003. Influence of polymyxins on the structural dynamics of *Escherichia coli* lipid membranes. *Talanta*, **60** : 225-234.

Cohen J et Cohen M. 1981. Adsorption of monovalent and divalent cations by phospholipid membranes. The monomer-dimer problem. *Biophysical journal*, **36** : 623.

Crab R, Lambert A, Defoirdt T, Bossier P et Verstraete W. 2010. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. *Journal of applied microbiology*, **109** : 1643-1649.

Cullis Pt et Kruijff Bd. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, **559** : 399-420.

Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, **23** : 174-181.

Dal Molin M, Gasparini G, Scrimin P, Rastrelli F et Prins LJ. 2011. ^{13}C -isotope labelling for the facilitated NMR analysis of a complex dynamic chemical system. *Chemical Communications*, **47** : 12476-12478.

Dash P, Avunje S, Tandel RS et Panigrahi A. 2017. Biocontrol of luminous vibriosis in shrimp aquaculture: a review of current approaches and future perspectives. *Reviews in Fisheries Science*, **25** : 245-255.

Davidovich NA, Mouget J-L et Gaudin P. 2009. Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*, **44** : 251-261.

Davis J-H. 1979. Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophysical journal*, **27** : 339-358.

Davis J, Jeffrey K, Bloom M, Valic M et Higgs T. 1976. Quadrupolar echo deuterium magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chemical Physics Letters*, **42** : 390-394.

Davis JH. 1983. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ^2H -NMR. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, **737** : 117-171.

Davis JH, Clair JJ et Juhasz J. 2009. Phase equilibria in DOPC/DPPC-d 62/cholesterol mixtures. *Biophysical journal*, **96** : 521-539.

Davis JH, Nichol CP, Weeks G et Bloom M. 1979. Study of the cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry*, **18** : 2103-2112.

De Decker S et Saulnier D. 2011. Vibriosis induced by experimental cohabitation in *Crassostrea gigas*: Evidence of early infection and down-expression of immune-related genes. *Fish & shellfish immunology*, **30** : 691-699.

De Kruijff B et Cullis P. 1980. Cytochrome c specifically induces non-bilayer structures in cardiolipin-containing model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **602** : 477-490.

Defoirdt T, Sorgeloos P et Bossier P. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current opinion in microbiology*, **14** : 251-258.

Defoirdt T, Boon N, Bossier P et Verstraete W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, **240** : 69-88.

Defoirdt T, Boon N, Sorgeloos P, Verstraete W et Bossier P. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, **25** : 472-479.

del Carmen Flores-Miranda M, Luna-González A, Campa-Córdova ÁI, González-Ocampo HA, Fierro-Coronado JA et Partida-Arangure BO. 2011. Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains. *Aquaculture*, **320** : 51-55.

Delcour AH. 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, **1794** : 808-816.

Denich T, Beaudette L, Lee H et Trevors J. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of microbiological methods*, **52** : 149-182.

Dennison SR, Howe J, Morton LH, Brandenburg K, Harris F et Phoenix DA. 2006. Interactions of an anionic antimicrobial peptide with *Staphylococcus aureus* membranes. *Biochemical and biophysical research communications*, **347** : 1006-1010.

Denyer SP. 1995. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International biodeterioration & biodegradation*, **36** : 227-245.

Deris ZZ, Swarbrick JD, Roberts KD, Azad MA, Akter J, Horne AS, Nation RL, Rogers KL, Thompson PE et Velkov T. 2014. Probing the penetration of antimicrobial polymyxin lipopeptides into Gram-negative bacteria. *Bioconjugate chemistry*, **25** : 750-760.

Diefenbach R, Heipieper H-J et Keweloh H. 1992. The conversion of cis into trans unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38** : 382-387.

DiSalvo L, Blecka J et Zebal R. 1978. *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Applied and environmental microbiology*, **35** : 219-221.

Doiron K, Millour M, Gagné J-P et Lemarchand K. 2014. Combined effects of silver nanoparticles and humic and fulvic acids on *Vibrio splendidus* growth. *Journal of Xenobiotics*, **4**.

Dowhan W, Bogdanov M et Mileykovskaya E. 2002. Functional roles of lipids in membranes. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, **5** : 1-37.

Dubert J, Barja JL et Romalde JL. 2017a. New insights into pathogenic *vibrios* affecting bivalves in hatcheries: Present and future prospects. *Frontiers in microbiology*, **8** : 762.

Dubert J, Aranda-Burgos J, Ojea J, Barja J et Prado S. 2017b. Mortality event involving larvae of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* in a hatchery: isolation of the pathogen *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus*. *Journal of Fish Diseases*, **40** : 1185-1193.

Dubinnyi MA, Lesovoy DM, Dubovskii PV, Chupin VV et Arseniev AS. 2006. Modeling of ³¹P-NMR spectra of magnetically oriented phospholipid liposomes: A new analytical solution. *Solid state nuclear magnetic resonance*, **29** : 305-311.

Duda-Chodak A. 2012. The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *Journal Physiological Pharmacology*, **63** : 497-503.

Duperthuy M. 2010. Effecteurs moléculaires de l'association *Crassostrea gigas/Vibrio splendidus*: rôle de la porine OmpU dans les mécanismes de résistance et d'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. Thèse de doctorat en Microbiologie et Parasitologie, Université Montpellier II, France, 226 p.

Duperthuy M, Binesse J, Le Roux F, Romestand B, Caro A, Got P, Givaudan A, Mazel D, Bachère E et Destoumieux-Garzón D. 2010. The major outer membrane protein OmpU of

Vibrio splendidus contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. *Environmental microbiology*, **12** : 951-963.

Duperthuy M, Schmitt P, Garzón E, Caro A, Rosa RD, Le Roux F, Lautrédou-Audouy N, Got P, Romestand B et De Lorgeril J. 2011. Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108** : 2993-2998.

Egidius E, Andersen K, Clausen E et Raa J. 1981. Cold-water vibriosis or 'Hitra disease' in Norwegian salmonid farming. *Journal of Fish Diseases*, **4** : 353-354.

Eguchi M, Fujiwara E et Miyamoto N. 2000. Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: adaptation or debilitation? *Journal of Infection and Chemotherapy*, **6** : 126-129.

Elston RA. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. *Journal of the World Mariculture Society*, **15** : 284-300.

Elston RA, Hasegawa H, Humphrey KL, Polyak IK et Häse CC. 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, environmental drivers, geographic extent and management. *Diseases of aquatic organisms*, **82** : 119-134.

Epanand RM, D'Souza K, Berno B et Schlame M. 2015. Membrane curvature modulation of protein activity determined by NMR. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1848** : 220-228.

Epanand RM, Walker C, Epanand RF et Magarvey NA. 2016. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1858** : 980-987.

Falagas ME, Rafailidis PI et Matthaïou DK. 2010. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug resistance updates*, **13** : 132-138.

Falaise C, François C, Travers M-A, Morga B, Haure J, Tremblay R, Turcotte F, Pasetto P, Gastineau R et Hardivillier Y. 2016. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine drugs*, **14** : 159.

Farmer J. 2006. The family Vibrionaceae. Dans : The prokaryotes. Springer, p. 495-507.

Farto R, Montes M, Pérez M, Nieto T, Larsen J et Pedersen K. 1999. Characterization by numerical taxonomy and ribotyping of *Vibrio splendidus* biovar I and *Vibrio scophthalmi* strains associated with turbot cultures. *Journal of applied microbiology*, **86** : 796-804.

Faruque SM, Albert MJ et Mekalanos JJ. 1998. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxicogenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, **62** : 1301-1314.

Fernandez DI, Lee T-H, Sani M-A, Aguilar M-I et Separovic F. 2013. Proline facilitates membrane insertion of the antimicrobial peptide maculatin 1.1 via surface indentation and subsequent lipid disordering. *Biophysical journal*, **104** : 1495-1507.

Folch J, Lees M et Sloane Stanley G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226** : 497-509.

Foley PM, Beach ES et Zimmerman JB. 2011. Algae as a source of renewable chemicals: opportunities and challenges. *Green Chemistry*, **13** : 1399-1405.

Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems K, Lievens B et Rediers H. 2011. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, **34** : 643-661.

Freese E, Rütters H, Köster J, Rullkötter J et Sass H. 2009. Gammaproteobacteria as a possible source of eicosapentaenoic acid in anoxic intertidal sediments. *Microbial ecology*, **57** : 444-454.

Fröhlich M, Brecht V et Peschka-Süss R. 2001. Parameters influencing the determination of liposome lamellarity by ³¹P-NMR. *Chemistry and physics of lipids*, **109** : 103-112.

Fujisawa S, Kadoma Y et Komoda Y. 1988. ¹H and ¹³C NMR studies of the interaction of eugenol, phenol, and triethyleneglycol dimethacrylate with phospholipid liposomes as a model system for odontoblast membranes. *Journal of dental research*, **67** : 1438-1441.

Gagné R, Tremblay R, Pernet F, Miner P, Samain J-F et Olivier F. 2010. Lipid requirements of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval and post-larval development in relation to addition of *Rhodomonas salina* in diet. *Aquaculture*, **309** : 212-221.

Gastineau R. 2011. Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type marennine. Thèse de doctorat en Biologie des organismes, Université du Maine, Le Mans, France, 328 p.

Gastineau R, Pouvreau J-B, Hellio C, Morançais M, Fleurence JI, Gaudin P, Bourgougnon N et Mouget J-L. 2012a. Biological activities of purified marennine, the blue pigment responsible for the greening of oysters. *Journal of agricultural and food chemistry*, **60** : 3599-3605.

Gastineau R, Davidovich NA, Bardeau J-F, Caruso A, Leignel V, Hardivillier Y, Jacquette B, Davidovich OI, Rincé Y et Gaudin P. 2012b. *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta): a second blue diatom, recorded from the Black Sea and producing a novel blue pigment. *European Journal of Phycology*, **47** : 469-479.

Gastineau R, Hardivillier Y, Leignel V, Tekaya N, Morançais M, Fleurence J, Davidovich N, Jacquette B, Gaudin P et Hellio C. 2012c. Greening effect on oysters and biological activities of the blue pigments produced by the diatom *Haslea karadagensis* (Naviculaceae). *Aquaculture*, **368** : 61-67.

Gastineau R, Turcotte F, Pouvreau J-B, Morançais M, Fleurence J, Windarto E, Prasetya FS, Arsad S, Jaouen P et Babin M. 2014. Marennine, Promising Blue Pigments from a Widespread *Haslea* Diatom Species Complex. *Marine drugs*, **12** : 3161-3189.

Gauthier-Clerc S, Boily I, Fournier M et Lemarchand K. 2013. *In vivo* exposure of *Mytilus edulis* to living enteric bacteria: a threat for immune competency? *Environmental Science and Pollution Research*, **20** : 612-620.

Gay M, Berthe FC et Le Roux F. 2004a. Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Diseases of aquatic organisms*, **59** : 49-56.

Gay M, Renault T, Pons A-M et Le Roux F. 2004b. Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. *Diseases of aquatic organisms*, **62** : 65-74.

Genard B, Miner P, Nicolas J-L, Moraga D, Boudry P, Pernet F et Tremblay R. 2013. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. *PLoS One*, **8** : e65434.

Glaubitz C, Burnett IJ, Gröbner G, Mason AJ et Watts A. 1999. Deuterium-MAS NMR spectroscopy on oriented membrane proteins: applications to photointermediates of bacteriorhodopsin. *Journal of the American Chemical Society*, **121** : 5787-5794.

Gómez-León J, Villamil L, Lemos M, Novoa B et Figueras A. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and environmental microbiology*, **71** : 98-104.

Grillo D, De La Cruz MO et Szleifer I. 2011. Theoretical studies of the phase behavior of DPPC bilayers in the presence of macroions. *Soft Matter*, **7** : 4672-4679.

Guckert J, Hood M et White D. 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and environmental microbiology*, **52** : 794-801.

Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski LdS, Silva-Pereira I et Kyaw CM. 2013. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in microbiology*, **4**.

Hahn EL. 1950. Spin echoes. *Physical review*, **80** : 580.

Hancock RE. 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in microbiology*, **5** : 37-42.

Heerklotz H, Wieprecht T et Seelig J. 2004. Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR. *The Journal of Physical Chemistry B*, **108** : 4909-4915.

Heipieper H-J, Keweloh H et Rehm H-J. 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, **57** : 1213-1217.

Heipieper H-J, Diefenbach R et Keweloh H. 1992. Conversion of cis unsaturated fatty acids to trans, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and environmental microbiology*, **58** : 1847-1852.

Heipieper HJ, Meinhardt F et Segura A. 2003. The cis–trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS microbiology letters*, **229** : 1-7.

Heipieper HJ, Loffeld B, Keweloh H et de Bont JA. 1995. The cis/trans isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indicator for environmental stress due to organic compounds. *Chemosphere*, **30** : 1041-1051.

Helm MM, Bourne N et Lovatelli A. 2006. Ecloserie de bivalves: manuel pratique. Food & Agriculture Organization, volume 471.

Herzfeld J, Roufosse A, Haberkorn R, Griffin R et Glimcher M. 1980. Magic angle sample spinning in inhomogeneously broadened biological systems. *Phil Trans R Soc Lond B*, **289** : 459-469.

Hickey ME et Lee JL. 2018. A comprehensive review of *Vibrio (Listonella) anguillarum*: ecology, pathology and prevention. *Reviews in Aquaculture*, **10** : 585-610.

Hoek C, Mann D et Jahns HM. 1995. Algae: an introduction to phycology. Cambridge university press.

Hoffmann M, Monday S, Fischer M et Brown E. 2012. Genetic and phylogenetic evidence for misidentification of *Vibrio* species within the *Harveyi* clade. *Letters in applied microbiology*, **54** : 160-165.

Holbach M. 2014. La sensibilité des larves de pectinidés aux conditions d'élevage : le flux ouvert comme alternative aux mortalités massives. Thèse de doctorat en Biologie Marine Université de Bretagne Occidentale, Brest, France 152 p.

Holbach M, Robert R, Boudry P, Petton B, Archambault P et Tremblay R. 2015. Scallop larval survival from erythromycin treated broodstock after conditioning without sediment. *Aquaculture*, **437** : 312-317.

Holte LL, Peter SA, Sinnwell TM et Gawrisch K. 1995. ^2H nuclear magnetic resonance order parameter profiles suggest a change of molecular shape for phosphatidylcholines containing a polyunsaturated acyl chain. *Biophysical journal*, **68** : 2396-2403.

Ibañez E et Cifuentes A. 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **93** : 703-709.

Jia Z, Zhang T, Jiang S, Wang M, Cheng Q, Sun M, Wang L et Song L. 2015. An integrin from oyster *Crassostrea gigas* mediates the phagocytosis toward *Vibrio splendidus* through LPS binding activity. *Developmental & Comparative Immunology*, **53** : 253-264.

Johnson M. 2013. Detergents: Triton X-100, tween-20, and more. *Mater Methods*, **3** : 163.

Jones MN. 1995. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Advances in colloid interface science*, **54** : 93-128.

Juhasz J, Sharom FJ et Davis JH. 2009. Quantitative characterization of coexisting phases in DOPC/DPPC/cholesterol mixtures: comparing confocal fluorescence microscopy and deuterium nuclear magnetic resonance. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1788** : 2541-2552.

Kandasamy SK et Larson RG. 2006. Effect of salt on the interactions of antimicrobial peptides with zwitterionic lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1758** : 1274-1284.

Kaneko T et Colwell RR. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake bay. *Journal of bacteriology*, **113** : 24-32.

Kempf I, Fleury MA, Drider D, Bruneau M, Sanders P, Chauvin C, Madec J-Y et Jouy E. 2013. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *International journal of antimicrobial agents*, **42** : 379-383.

Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan M et Gibson L. 2009. Two pathogens of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*: *Vibrio splendidus* and a *V. coralliilyticus/neptunius*-like isolate. *Journal of Fish Diseases*, **32** : 499-507.

Keyser P, Elofsson M, Rosell S et Wolf-Watz H. 2008. Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *Journal of internal medicine*, **264** : 17-29.

Killian JA, Koorengel MC, Bouwstra JA, Gooris G, Dowhan W et de Kruijff B. 1994. Effect of divalent cations on lipid organization of cardiolipin isolated from *Escherichia coli* strain AH930. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1189** : 225-232.

Klimentová J et Stulík J. 2015. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological research*, **170** : 1-9.

Kogut M et Russell NJ. 1984. The growth and phospholipid composition of a moderately halophilic bacterium during adaptation to changes in salinity. *Current Microbiology*, **10** : 95-98.

Koller D et Lohner K. 2014. The role of spontaneous lipid curvature in the interaction of interfacially active peptides with membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1838** : 2250-2259.

Kraft JC, Freeling JP, Wang Z et Ho RJ. 2014. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences*, **103** : 29-52.

Kristensen JH, Bildwe H, Jakobsen HJ et Nielsen NC. 1991. Deuterium quadrupole couplings from least-squares computer simulations of ²H MAS NMR spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, **92** : 443-453.

Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M et Strzalka K. 2015. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs*, **13** : 5847-5881.

Kuehn MJ et Kesty NC. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes & development*, **19** : 2645-2655.

Kümmerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. *Chemosphere*, **75** : 417-434.

Laadhari M, Arnold AA, Gravel AE, Separovic F et Marcotte I. 2016. Interaction of the antimicrobial peptides caerin 1.1 and aurein 1.2 with intact bacteria by ^2H solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1858** : 2959-2964.

Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gelebart F, Cordevant C, Lange M et Poulet S. 2001. A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Diseases of aquatic organisms*, **46** : 139-145.

Lafleur M, Fine B, Sternin E, Cullis PR et Bloom M. 1989. Smoothed orientational order profile of lipid bilayers by ^2H -nuclear magnetic resonance. *Biophysical journal*, **56** : 1037-1041.

Lambert C, Nicolas J-L et Cilia V. 1999. *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). *Bulletin of the European Association of fish Pathologists*, **19** : 102-106.

Lankester ER. 1895. Green Oysters. *Nature*, **52** : 28.

Lasa A, Diéguez AL et Romalde JL. 2013. *Vibrio toranzoniae* sp. nov., a new member of the *Splendidus* clade in the genus *Vibrio*. *Systematic applied microbiology*, **36** : 96-100.

Lavilla-Pitogo CR, Leñaño EM et Paner MG. 1998. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *vibrios* in the rearing environment. *Aquaculture*, **164** : 337-349.

le Maire M, Champeil P et Møller JV. 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1508** : 86-111.

Le Roux F, Binesse J, Saulnier D et Mazel D. 2007. Construction of a *Vibrio splendidus* Mutant Lacking the Metalloprotease Gene *vsm* by Use of a Novel Counterselectable Suicide Vector. *Applied and environmental microbiology*, **73** : 777-784.

Le Roux F, Gay M, Lambert C, Nicolas JL, Gouy M et Berthe F. 2004. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of aquatic organisms*, **58** : 143-150.

Le Roux F, Gay M, Lambert C, Waechter M, Poubalanne S, Chollet B, Nicolas J-L et Berthe F. 2002. Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquatic Living Resources*, **15** : 251-258.

Le Roux F, Zouine M, Chakroun N, Binesse J, Saulnier D, Bouchier C, Zidane N, Ma L, Rusniok C et Lajus A. 2009. Genome sequence of *Vibrio splendidus*: an abundant planctonic marine species with a large genotypic diversity. *Environmental microbiology*, **11** : 1959-1970.

Lebeau T et Robert J-M. 2003a. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: current and putative products. *Applied microbiology and biotechnology*, **60** : 624-632.

Lebeau T et Robert J-M. 2003b. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60** : 612-623.

Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, Abeles MB et Ward HJ. 2008. A lipid-protein hybrid model for tight junction. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **295** : F1601-F1612.

Lee K-K, Yu S-R, Chen F-R, Yang T-I et Liu P-C. 1996. News & notes: Virulence of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Current Microbiology*, **32** : 229-231.

Levitt MH. 2001. Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance. John Wiley & Sons, Sussex , England, 686 p.

Lewis RN et McElhaney RN. 2009. The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1788** : 2069-2079.

Li A-N, Li S, Zhang Y-J, Xu X-R, Chen Y-M et Li H-B. 2014. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, **6** : 6020-6047.

Li G, Zhao D, Huang L, Sun J, Gao D, Wang H, Tan Y et Liang L. 2006. Identification and phylogenetic analysis of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased *Trachinotus ovatus* in cage mariculture. *Aquaculture*, **261** : 17-25.

Li J, Vosegaard T et Guo Z. 2017. Applications of nuclear magnetic resonance in lipid analyses: An emerging powerful tool for lipidomics studies. *Progress in lipid research*, **68** : 37-56.

Lindon JC, Beckonert OP, Holmes E et Nicholson JK. 2009. High-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy: Application to biomedical studies. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **2** : 79-100.

Liu R, Qiu L, Yu Z, Zi J, Yue F, Wang L, Zhang H, Teng W, Liu X et Song L. 2013a. Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *Journal of invertebrate pathology*, **114** : 144-150.

Liu X, Ji C, Zhao J et Wu H. 2013b. Differential metabolic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to *Vibrio anguillarum* and *Vibrio splendidus* challenges. *Fish & shellfish immunology*, **35** : 2001-2007.

Liu X, Sun H, Wang Y, Ma M et Zhang Y. 2014. Gender-specific metabolic responses in hepatopancreas of mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Vibrio harveyi*. *Fish & shellfish immunology*, **40** : 407-413.

Lombardo D, Calandra P, Barreca D, Magazù S et Kiselev M. 2016. Soft interaction in liposome nanocarriers for therapeutic drug delivery. *Nanomaterials*, **6** : 125.

López-Lara IM et Geiger O. 2017. Bacterial lipid diversity. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Biology of Lipids*, **1862** : 1287-1299.

Los DA et Murata N. 2000. Regulation of enzymatic activity and gene expression by membrane fluidity. *Science Signaling*, **2000** : 1-4.

- Los DA et Murata N. 2004. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1666** : 142-157.
- Lowe I. 1959. Free induction decays of rotating solids. *Physical Review Letters*, **2** : 285.
- Lowry GV, Hill RJ, Harper S, Rawle AF, Hendren CO, Klaessig F, Nobbmann U, Sayre P et Rumble J. 2016. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*, **3** : 953-965.
- Lu H, Pezron I, Gaudin T et Drelich A. 2018. Non-equilibrium micelles formed by sugar-based surfactants under their Krafft temperature. *Journal Colloids Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, **540** : 167-176.
- Lu J-X, Damodaran K, Blazyk J et Lorigan GA. 2005. Solid-state nuclear magnetic resonance relaxation studies of the interaction mechanism of antimicrobial peptides with phospholipid bilayer membranes. *Biochemistry*, **44** : 10208-10217.
- Maibam C, Fink P, Romano G, Buia MC, Gambi MC, Scipione MB, Patti FP, Lorenti M, Butera E et Zupo V. 2014. Relevance of wound-activated compounds produced by diatoms as toxins and infochemicals for benthic invertebrates. *Marine biology*, **161** : 1639-1652.
- Maldonado AY, Burz DS et Shekhtman A. 2011. In-cell NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **59** : 197.
- Manage PM. 2018. Heavy Use of Antibiotics in Aquaculture; Emerging Human and Animal Health Problems—A review. *Sri Lanka Journal of Aquatic Science*, **1** : 13-27.
- Marcotte I. 2016. Méthodes d'analyses de spectroscopies avancées, notes de cours. Université du Québec à Montréal.
- Marcotte I et Auger M. 2005. Bicelles as model membranes for solid-and solution-state NMR studies of membrane peptides and proteins. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, **24** : 17-37.

Marcotte I et Booth V. 2014. ^2H Solid-State NMR Study of Peptide–Membrane Interactions in Intact Bacteria. Dans : New developments in NMR: Advances in Biological Solid-State NMR. Royal society of Chemistry, Cambridge, UK, p. 459-475.

Marcotte I, Bélanger A et Auger M. 2006. The orientation effect of gramicidin A on bicelles and Eu^{3+} -doped bicelles as studied by solid-state NMR and FT-IR spectroscopy. *Chemistry and physics of lipids*, **139** : 137-149.

Marcotte I, Wegener KL, Lam Y-H, Chia BC, de Planque MR, Bowie JH, Auger M et Separovic F. 2003. Interaction of antimicrobial peptides from Australian amphibians with lipid membranes. *Chemistry and physics of lipids*, **122** : 107-120.

Marquis RE. 1968. Salt-induced contraction of bacterial cell walls. *Journal of bacteriology*, **95** : 775-781.

Martinko JM et Madigan M. 2005. Brock biologie des micro-organismes, traduit de *Brock biology of microorganisms*, 11 ème édition. Pearson Education Inc, Paris, France, 1047 p.

Marty Y, Delaunay F, Moal J, Samain J-F et Ecology. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *Journal of Experimental Marine Biology*, **163** : 221-234.

Masini L, De Grandis G, Principi F, Mengarelli C et Ottaviani D. 2007. Research and characterization of pathogenic *vibrios* from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). *Water Research*, **41** : 4031-4040.

Mason AJ, Gasnier C, Kichler A, Prévost G, Aunis D, Metz-Boutigue M-H et Bechinger B. 2006. Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **50** : 3305-3311.

Massé G, Rincé Y, Cox EJ, Allard G, Belt ST et Rowland SJ. 2001. *Haslea salstonica* sp. nov. and *Haslea pseudostrearia* sp. nov. (Bacillariophyta), two new epibenthic diatoms from the Kingsbridge estuary, United Kingdom. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, **324** : 617-626.

Mateo DR, Siah A, Araya MT, Berthe FC, Johnson GR et Greenwood SJ. 2009. Differential *in vivo* response of soft-shell clam hemocytes against two strains of *Vibrio splendidus*: changes in cell structure, numbers and adherence. *Journal of invertebrate pathology*, **102** : 50-56.

Matsuzaki K, Harada M, Funakoshi S, Fujii N et Miyajima K. 1991. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1063** : 162-170.

Mavis RD et Vagelos PR. 1972. The effect of phospholipid fatty acid composition on membranous enzymes in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **247** : 652-659.

McConnell H. 2010. Composition fluctuations, correlated response, and protein solvation in membranes. *The Journal of Chemical Physics*, **132** : 05B610.

McDougald D et Kjelleberg S. 2006. Adaptive responses of *Vibrios*. Dans : *The Biology of Vibrios*. American Society of Microbiology, Washington DC, USA, p. 133-155.

McManus JP, Davis KG, Beart JE, Gaffney SH, Lilley TH et Haslam E. 1985. Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* : 1429-1438.

Meyer FP. 1991. Aquaculture disease and health management. *Journal of animal science*, **69** : 4201-4208.

Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, Høiby N et Moskowitz SM. 2011. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **55** : 5761-5769.

Millour M, Doiron K, Lemarchand K et Gagné J-P. 2016. Does the bacterial media culture chemistry affect the stability of nanoparticles in nanotoxicity assays? *Journal of Xenobiotics*, **5**.

Milton DL. 2006. Quorum sensing in *vibrios*: complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology*, **296** : 61-71.

Mohajeri E et Noudeh GDJJoC. 2012. Effect of temperature on the critical micelle concentration and micellization thermodynamic of nonionic surfactants: polyoxyethylene sorbitan fatty acid esters. **9** : 2268-2274.

Mohapatra S, Chakraborty T, Kumar V, DeBoeck G et Mohanta K. 2013. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of animal physiology animal nutrition*, **97** : 405-430.

Monck M, Bloom M, Lafleur M, Lewis R, McElhaney R et Cullis P. 1992. Influence of lipid composition on the orientational order in *Acholeplasma laidlawii* strain B membranes: a deuterium NMR study. *Biochemistry*, **31** : 10037-10043.

Moreau J. 1970. Contribution aux recherches écologiques sur les claires à huîtres du bassin de Marennes-Oléron. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **34** : 381-466.

Morein S, Andersson A-S, Rilfors L et Lindblom G. 1996. Wild-type *Escherichia coli* cells regulate the membrane lipid composition in a window between gel and non-lamellar structures. *Journal of Biological Chemistry*, **271** : 6801-6809.

Moriarty DJ. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Dans : Proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology, 1999. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology Halifax, Canada, p. 237-243.

Morin R, Carl U et Lévesque G. 2004. L'utilisation des antibiotiques en pisciculture au Québec. Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation, Gouvernement du Québec, l'Aquicole, volume 9, numéro 3, 1-11 p.

Morini MA, Sierra MB, Pedroni VI, Alarcon LM, Appignanesi GA et Disalvo EA. 2015. Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, **131** : 54-58.

Morita N, Shibahara A, Yamamoto K, Shinkai K, Kajimoto G et Okuyama H. 1993. Evidence for cis-trans isomerization of a double bond in the fatty acids of the psychrophilic bacterium *Vibrio sp.* strain ABE-1. *Journal of bacteriology*, **175** : 916-918.

Mouget J-L, Rosa P, Vachoux C et Tremblin G. 2005. Enhancement of marennine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of applied phycology*, **17** : 437-445.

Mouget J-L, Tremblin G, Morant-Manceau A, Morançais M et Robert J-M. 1999. Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *European Journal of Phycology*, **34** : 109-115.

Msangi S, Kobayashi M, Batka M, Vannuccini S, Dey M et Anderson J. 2013. Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. *World Bank Report* : 102.

Munn CB. 2005. Pathogens in the sea: an overview. Dans : Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment. Springer, p. 1-28.

Mykytczuk N, Trevors J, Leduc L et Ferroni G. 2007. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in biophysics and molecular biology*, **95** : 60-82.

Nakamura K, Ishiyama K, Sheng H, Ikai H, Kanno T et Niwano Y. 2015. Bactericidal activity and mechanism of photoirradiated polyphenols against gram-positive and-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, **63** : 7707-7713.

Nasfi H, Travers M-A, De Lorgeril J, Habib C, Sannie T, Sorieul L, Gerard J, Avarre J-C, Haffner P et Tourbiez D. 2015. A European epidemiological survey of *Vibrio splendidus* clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, **31** : 461-475.

Nassiri Y, Robert J-M, Rincé Y et Ginsburger-Vogel T. 1998. The cytoplasmic fine structure of the diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyceae) in relation to marennine production. *Phycologia*, **37** : 84-91.

Nedwell D et Rutter M. 1994. Influence of temperature on growth rate and competition between two psychrotolerant Antarctic bacteria: low temperature diminishes affinity for substrate uptake. *Applied and environmental microbiology*, **60** : 1984-1992.

Neidhardt FC, Ingraham JL, Schaechter M et Bohin J-P. 1994. Physiologie de la cellule bactérienne: une approche moléculaire, traduit de *Physiology of the Bacterial cell, a Molecular Approach*. Elsevier Masson, Paris, France, 478 p.

Nicolas J-L, Corre S, Gauthier G, Robert R et Ansquer D. 1996. Bacterial problems associated with scallop *Pectenmaximus* larval culture. *Diseases of aquatic organisms*, **27** : 67-76.

Nixon SW. 1995. Coastal marine eutrophication: a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, **41** : 199-219.

O'Leary WM. 1962. The fatty acids of bacteria. *Bacteriological reviews*, **26** : 421.

Oden E, Trancart S, Pitel P et Houssin M. 2018. Development of a Taqman® Real-Time PCR for the rapid discrimination of the *Vibrio splendidus* species among the *Splendidus* clade. *Aquaculture*, **491** : 101-104.

Okuyama H, Okajima N, Sasaki S, Higashi S et Murata N. 1991. The cis/trans isomerization of the double bond of a fatty acid as a strategy for adaptation to changes in ambient temperature in the psychrophilic bacterium, *Vibrio sp.* strain ABE-1. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, **1084** : 13-20.

Olafsen JA. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture*, **200** : 223-247.

Olaitan AO et Li J. 2016. Emergence of polymyxin resistance in Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents*, **48** : 581-582.

Oldfield E et Chapman D. 1971. Deuteron resonance: a novel approach to the study of hydrocarbon chain mobility in membrane systems. *FEBS letters*, **16** : 102-104.

Oldfield E, Chapman D et Derbyshire W. 1972. Lipid mobility in *Acholeplasma* membranes using deuteron magnetic resonance. *Chemistry and physics of lipids*, **9** : 69-81.

Oliver JD et Colwell RR. 1973. Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: phospholipid composition. *Journal of bacteriology*, **114** : 897-908.

Oliver JD et Stringer WF. 1984. Lipid composition of a psychrophilic marine *Vibrio* sp. during starvation-induced morphogenesis. *Applied and environmental microbiology*, **47** : 461-466.

Oliver JD, Guthrie K, Preyer J, Wright A, Simpson L, Siebeling R et Morris J. 1992. Use of colistin-polymyxin B-cellobiose agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from the environment. *Applied and environmental microbiology*, **58** : 737-739.

Olsen Cf, Cutshall N et Larsen I. 1982. Pollutant—particle associations and dynamics in coastal marine environments: a review. *Marine Chemistry*, **11** : 501-533.

Ortiz A, Killian JA, Verkleij AJ et Wilschut J. 1999. Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations. *Biophysical journal*, **77** : 2003-2014.

Pacini F. 1854. Osservazione microscopiche e deduzioni patologiche sul *Cholera Asiatico*. *GazMedItalToscana Firenze*, **6** : 405-412.

Paillard C, Le Roux F et Borrego JJ. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquatic Living Resources*, **17** : 477-498.

Payne DJ, Miller LF, Findlay D, Anderson J et Marks L. 2015. Time for a change: addressing R&D and commercialization challenges for antibacterials. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, **370** : 20140086.

Pêches et Océans Canada. 2017. R&D en aquaculture au Canada 2017. Pêches et Océans Canada, gouvernement du Canada, <http://www.dfo-mpo.gc.ca/aquaculture/sci-res/rd2017/health-fra.html>, consulté le 15 décembre 2018.

Pêches et Océans Canada. 2018. Production d'aquaculture en quantité et en valeur Pêches et Océans Canada, gouvernement du Canada, <http://www.dfo-mpo.gc.ca/stats/aqua/aqua-prod-fra.htm>, consulté le 15 décembre 2018.

Peloux Y. Opportunistic bacteria. Dans : *Annales de biologie clinique*, 1985. p. 153-155.

Pérez-Cataluña A, Lucena T, Tarazona E, Arahal DR, Macián MC et Pujalte MJ. 2016. An MLSA approach for the taxonomic update of the *Splendidus* clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic *Vibrio spp.* *Systematic applied microbiology*, **39** : 361-369.

Phillips DJ. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments—a review. *Environmental Pollution (1970)*, **13** : 281-317.

Picard F, Paquet M-J, Levesque J, Bélanger A et Auger M. 1999. ^{31}P NMR first spectral moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes. *Biophysical journal*, **77** : 888-902.

Pius J, Morrow MR et Booth V. 2011. ^2H solid-state nuclear magnetic resonance investigation of whole *Escherichia coli* interacting with antimicrobial peptide MSI-78. *Biochemistry*, **51** : 118-125.

Plaza N, Castillo D, Pérez-Reytor D, Higuera G, García K et Bastías R. 2017. Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. *Electronic Journal of Biotechnology*.

Polenova T. 2011. Protein NMR spectroscopy: spinning into focus. *Nature chemistry*, **3** : 759.

Porcelli F, Buck B, Lee D-K, Hallock KJ, Ramamoorthy A et Veglia G. 2004. Structure and orientation of pardaxin determined by NMR experiments in model membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **279** : 45815-45823.

Pott T et Dufourc EJ. 1995. Action of melittin on the DPPC-cholesterol liquid-ordered phase: a solid state ^2H -and ^{31}P -NMR study. *Biophysical journal*, **68** : 965-977.

Poulhazan A, Arnold A, Warschawski D et Marcotte I. 2018. Unambiguous *Ex Situ* and *in Cell* 2D ^{13}C Solid-State NMR Characterization of Starch and Its Constituents. *International journal of molecular sciences*, **19** : 3817.

Poupko R, Olender Z, Reichert D et Luz Z. 1994. Deuterium MAS NMR in natural abundance. *Journal of Magnetic Resonance*, **106** : 113-115.

Pouvreau J-B. 2006. Purification et caractérisation du pigment bleu-vert " marennine" synthétisé par la diatomée marine *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen: propriétés physico-chimiques et activités biologiques. Thèse de doctorat en Chimie-Biologie, Université de Nantes, France, 253 p.

Pouvreau J-B, Morançais M, Fleurence J et Pondaven P. 2007. Method for the quantification of the blue-green pigment "marennine" synthesized by the marine diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen using HPLC gel-filtration and photodiode-array detection. *Journal of applied phycology*, **19** : 263-270.

Pouvreau J-B, Taran Fdr, Rosa P, Pin S, Fleurence JI et Pondaven P. 2008. Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. *Journal of agricultural and food chemistry*, **56** : 6278-6286.

Pouvreau J-B, Morançais M, Massé G, Rosa P, Robert J-M, Fleurence J et Pondaven P. 2006a. Purification of the blue-green pigment "marennine" from the marine tyhopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of applied phycology*, **18** : 769-781.

Pouvreau J-B, Morançais M, Fleury F, Rosa P, Thion L, Cahingt B, Zal F, Fleurence J et Pondaven P. 2006b. Preliminary characterisation of the blue-green pigment "marennine" from the marine tyhopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of applied phycology*, **18** : 757-767.

Power WP. 2011. High-resolution magic angle spinning—enabling applications of NMR spectroscopy to semi-solid phases. Dans : Annual reports on NMR spectroscopy. Elsevier, p. 111-156.

Prado S, Dubert J et Barja JL. 2015. Characterization of pathogenic *vibrios* isolated from bivalve hatcheries in Galicia, NW Atlantic coast of Spain. Description of *Vibrio tubiashii* subsp. *europaensis* subsp. *nov.* *Systematic applied microbiology*, **38** : 26-29.

Prasetya FS, Safitri I, Widowati I, Cognie B, Decottignies P, Gastineau R, Morançais M, Windarto E, Tremblay R et Mouget J-L. 2016. Does allelopathy affect co-culturing *Haslea ostrearia* with other microalgae relevant to aquaculture? *Journal of applied phycology*, **28** : 2241-2254.

Pruzzo C, Gallo G et Canesi L. 2005a. Persistence of *vibrios* in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environmental microbiology*, **7** : 761-772.

Pruzzo C, Huq A, Colwell RR et Donelli G. 2005b. Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment. Dans : Oceans and health: pathogens in the marine environment. Springer, p. 217-252.

Pulz O et Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **65** : 635-648.

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C et Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **50** : 586-621.

Rai D, Singh JK, Roy N et Panda D. 2008. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochemical Journal*, **410** : 147-155.

Raja RA et Jithendran K. 2015. Aquaculture Disease Diagnosis and Health Management. Dans : Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture. Springer, p. 247-255.

Rajan S, Kang S-Y, Gutowsky HS et Oldfield E. 1981. Phosphorus nuclear magnetic resonance study of membrane structure. Interactions of lipids with protein, polypeptide, and cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, **256** : 1160-1166.

Ramamoorthy A, Thennarasu S, Lee D-K, Tan A et Maloy L. 2006. Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin. *Biophysical journal*, **91** : 206-216.

Ratcliffe RG. 1994. *In vivo* NMR studies of higher plants and algae. *Advances in botanical research*, **20** : 43-123.

Ravi A, Musthafa K, Jegathammbal G, Kathiresan K et Pandian S. 2007. Screening and evaluation of probiotics as a biocontrol agent against pathogenic *Vibrios* in marine aquaculture. *Letters in applied microbiology*, **45** : 219-223.

Ravulapalli R, Lugo MR, Pfoh R, Visschedyk D, Poole A, Fieldhouse RJ, Pai EF et Merrill AR. 2015. Characterization of *vis* toxin, a novel ADP-ribosyltransferase from *Vibrio splendidus*. *Biochemistry*, **54** : 5920-5936.

Razafintsalama V, Sarter S, Mambu L, Randrianarivo R, Petit T, Rajaonarison JF, Mertz C, Rakoto D et Jeannoda V. 2013. Antimicrobial activities of *Dilobeia thouarsii* Roemer and *Schulte*, a traditional medicinal plant from Madagascar. *South African Journal of Botany*, **87** : 1-3.

Rech M, Mouget J-L, Morant-Manceau A, Philippe R et Tremblin G. 2005. Long-term acclimation to UV radiation: effects on growth, photosynthesis and carbonic anhydrase activity in marine diatoms. *Botanica Marina*, **48** : 407-420.

Reckel S, Löhr F et Dötsch V. 2005. In-Cell NMR Spectroscopy. *ChemBioChem*, **6** : 1601-1606.

Rémy B, Plener L, Elias M, Daudé D et Chabrière E. Des enzymes pour bloquer la communication bactérienne, une alternative aux antibiotiques? Dans : *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2016. Elsevier, p. 413-420.

Riddick TM. 1968. Control of colloid stability through zeta potential, volume 1. Livingston Wynnewood, PA, USA, 51 p.

Riedel T, Zark M, Vähätalo AV, Niggemann J, Spencer RG, Hernes PJ et Dittmar T. 2016. Molecular signatures of biogeochemical transformations in dissolved organic matter from ten world rivers. *Frontiers in Earth Science*, **4** : 85.

Rietveld A, Killian J, Dowhan W et De Kruijff B. 1993. Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **268** : 12427-12433.

Rietveld AG, Koorengel MC et De Kruijff B. 1995. Non-bilayer lipids are required for efficient protein transport across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, **14** : 5506-5513.

Robert É, Lefèvre T, Fillion M, Martial B, Dionne J et Auger M. 2015. Mimicking and understanding the agglutination effect of the antimicrobial peptide thanatin using model phospholipid vesicles. *Biochemistry*, **54** : 3932-3941.

Robert J-M, Morançais M, Pradier E, Mouget J-L et Tremblin G. 2002. Extraction and quantitative analysis of the blue-green pigment “marennine” synthesized by the diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of applied phycology*, **14** : 299-305.

Rock C et Jackowski S. 1985. Pathways for the incorporation of exogenous fatty acids into phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **260** : 12720-12724.

Rojas R, Miranda CD, Opazo R et Romero J. 2015. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Journal of invertebrate pathology*, **124** : 61-69.

Romalde JL, Diéguez AL, Lasa A et Balboa S. 2014. New *Vibrio* species associated to molluscan microbiota: a review. *Frontiers in microbiology*, **4** : 413.

Romero J, Feijoó CG et Navarrete P. 2012. Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. Dans : Health and environment in aquaculture. InTech, p. 160-198.

Rouessac F, Rouessac A et Cruché D. 2004. Analyse Chimique. méthodes et techniques instrumentales modernes, 6^{ème} édition Dunod, Paris, 459 p.

Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S et Karoonuthaisiri N. 2016. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. *Journal of invertebrate pathology*, **133** : 12-19.

Sackmann E et Ben-Shaul A. 2016. A short history of membrane physics. *Handbook of Lipid Membranes: Molecular, Functional, and Materials Aspects Taylor and Francis* : 1-51.

Sahalan AZ et Dixon RA. 2008. Role of the cell envelope in the antibacterial activities of polymyxin B and polymyxin B nonapeptide against *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*, **31** : 224-227.

Salnikov ES, Mason AJ et Bechinger B. 2009. Membrane order perturbation in the presence of antimicrobial peptides by ^2H solid-state NMR spectroscopy. *Biochimie*, **91** : 734-743.

Sarita GB. 2005. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **1** : 201-206.

Saulnier D, De Decker S, Tourbiez D et Travers MA. 2017. Development of a duplex Taqman real-time PCR assay for rapid identification of *Vibrio splendidus*-related and *V. aestuarianus* strains from bacterial cultures. *Journal of microbiological methods*, **140** : 67-69.

Saulnier D, De Decker S, Haffner P, Cobret L, Robert M et Garcia C. 2010. A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. *Microbial ecology*, **59** : 787-798.

Sawabe T, Kita-Tsukamoto K et Thompson FL. 2007. Inferring the evolutionary history of *vibrios* by means of multilocus sequence analysis. *Journal of bacteriology*, **189** : 7932-7936.

Sawabe T, Ogura Y, Matsumura Y, Gao F, Amin A, Mino S, Nakagawa S, Sawabe T, Kumar R et Fukui Y. 2013. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in microbiology*, **4** : 414.

Scala S et Bowler C. 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **58** : 1666-1673.

Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A et Simons K. 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100** : 5795-5800.

Seelig J. 1977. Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly reviews of biophysics*, **10** : 353-418.

Seelig J. 1978. ^{31}P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes*, **515** : 105-140.

Seelig J, MacDonald PM et Scherer PG. 1987. Phospholipid head groups as sensors of electric charge in membranes. *Biochemistry*, **26** : 7535-7541.

Šegota S, Vojta D, Pletikapić G et Baranović G. 2015. Ionic strength and composition govern the elasticity of biological membranes. A study of model DMPC bilayers by force- and transmission IR spectroscopy. *Chemistry physics of lipids*, **186** : 17-29.

Selenko P et Wagner G. 2007. Looking into live cells with in-cell NMR spectroscopy. *Journal of structural biology*, **158** : 244-253.

Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW et Brown HA. 2011. Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chemical reviews*, **111** : 6064-6119.

Separovic F et Naito A. 2014. New Developments in NMR: Advances in Biological Solid-State NMR: Proteins and Membrane-Active Peptides. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 608 p.

Serber Z, Corsini L, Durst F et Dötsch V. 2005. In-cell NMR spectroscopy. *Methods in enzymology*, **394** : 17-41.

Serber Z, Keatinge-Clay AT, Ledwidge R, Kelly AE, Miller SM et Dötsch V. 2001. High-resolution macromolecular NMR spectroscopy inside living cells. *Journal of the American Chemical Society*, **123** : 2446-2447.

Serrano PH. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Food & Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 109 p.

Seychelles L, Audet C, Tremblay R, Fournier R et Pernet F. 2009. Essential fatty acid enrichment of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*, Müller) using frozen-concentrated microalgae. *Aquaculture Nutrition*, **15** : 431-439.

Shai Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1462** : 55-70.

Shibuya I. 1992. Metabolic regulation and biological functions of phospholipids in *Escherichia coli*. *Progress in lipid research*, **31** : 245-299.

Shireen T, Singh M, Das T et Mukhopadhyay K. 2013. Differential adaptive responses of *Staphylococcus aureus* to in vitro selection with different antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* : AAC. 00780-00713.

Siegel DP et Banschbach J. 1990. Lamellar/inverted cubic (L. alpha./QII) phase transition in N-methylated-dioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry*, **29** : 5975-5981.

Silbert DF, Ruch F et Vagelos PR. 1968. Fatty acid replacements in a fatty acid auxotroph of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **95** : 1658-1665.

Simidu U et Tsukamoto K. 1985. Habitat segregation and biochemical activities of marine members of the family Vibrionaceae. *Applied and environmental microbiology*, **50** : 781-790.

Simpson AJ, Liaghati Y, Fortier-McGill B, Soong R et Akhter M. 2015. Perspective: *in vivo* NMR—a potentially powerful tool for environmental research. *Magnetic Resonance Chemistry*, **53** : 686-690.

Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **71** : 522-525.

Skoog DA, Holler FJ et Nieman TA. 2003. Principes d'analyse instrumentale traduit de *Principles of Instrumental Analysis*, 5^{ème} édition. De Boeck Diffusion, Bruxelles, Belgique, 956 p.

Smith AH, Zoetendal E et Mackie RI. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial ecology*, **50** : 197-205.

Smith MC, Crist RM, Clogston JD et McNeil SE. 2017. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical bioanalytical chemistry*, **409** : 5779-5787.

Smol JP et Stoermer EF. 2010. The diatoms: applications for the environmental and earth sciences. Cambridge University Press.

Sohlenkamp C et Geiger O. 2016. Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS microbiology reviews*, **40** : 133-159.

Song T, Liu H, Lv T, Zhao X, Shao Y, Han Q, Li C et Zhang W. 2018. Characteristics of the iron uptake-related process of a pathogenic *Vibrio splendidus* strain associated with massive mortalities of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Journal of invertebrate pathology*, **155** : 25-31.

Soto W, Gutierrez J, Remmenga M et Nishiguchi M. 2009. Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches. *Microbial ecology*, **57** : 140-150.

Speyer J, Sripada P, Gupta SD, Shipley GG et Griffin R. 1987. Magnetic orientation of sphingomyelin-lecithin bilayers. *Biophysical journal*, **51** : 687-691.

Stockton GW, Johnson K, Butler KW, Polnaszek CF, Cyr R et Smith IC. 1975. Molecular order in *Acholeplasma laidlawii* membranes as determined by deuterium magnetic resonance of biosynthetically-incorporated specifically-labelled lipids. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **401** : 535-539.

Strandberg E et Ulrich AS. 2004. NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts in Magnetic Resonance Part A: An Educational Journal*, **23** : 89-120.

Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D et Muroga K. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Diseases of aquatic organisms*, **33** : 111-118.

Sze P. 1986. A biology of the algae. Brown. Publ/McGraw-Hill, 278 p.

Szyperski T. 1995. Biosynthetically directed fractional ^{13}C -labeling of proteinogenic amino acids: an efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *European Journal of Biochemistry*, **232** : 433-448.

Taguri T, Tanaka T et Kouno I. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **27** : 1965-1969.

Taguri T, Tanaka T et Kouno I. 2006. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29** : 2226-2235.

Tall A, Hervio-Heath D, Teillon A, Boisset-Helbert C, Delesmont R, Bodilis J et Tournon-Bodilis A. 2013. Diversity of *Vibrio spp.* isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by pyr H sequencing. *Journal of applied microbiology*, **114** : 1713-1724.

Tanguy M, Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Danger J-M et Siah A. 2018. The immune response of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain: A transcriptomic attempt at identifying molecular actors. *Fish & shellfish immunology*, **74** : 268-280.

Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Danger J-M et Siah A. 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Developmental & Comparative Immunology*, **39** : 419-429.

Tardy-Laporte C, Arnold AA, Genard B, Gastineau R, Morançais M, Mouget J-L, Tremblay R et Marcotte I. 2013. A ^2H solid-state NMR study of the effect of antimicrobial agents on intact *Escherichia coli* without mutating. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1828** : 614-622.

Tatulian SA. 1983. Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta -Biomembranes*, **736** : 189-195.

Thennarasu S, Lee D-K, Poon A, Kawulka KE, Vederas JC et Ramamoorthy A. 2005. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilosin A. *Chemistry and physics of lipids*, **137** : 38-51.

Thompson FL, Iida T et Swings J. 2004. Biodiversity of *vibrios*. *Microbiology and molecular biology reviews*, **68** : 403-431.

Thompson JR, Pacocha S, Pharino C, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Benoit J, Sarma-Rupavtarm R, Distel DL et Polz MF. 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, **307** : 1311-1313.

Toranzo AE et Barja JL. 1990. A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the Northwest of Spain. *Diseases of aquatic organisms*, **9** : 73-82.

Travers M-A, Miller KB, Roque A et Friedman CS. 2015. Bacterial diseases in marine bivalves. *Journal of invertebrate pathology*, **131** : 11-31.

Travers M-A, Tourbiez D, Parizadeh L, Haffner P, Kozic-Djellouli A, Aboubaker M, Koken M, Dégremont L et Lupo C. 2017. Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Veterinary research*, **48** : 32.

Tremblin G, Cannuel R, Mouget J-L, Rech M et Robert J-M. 2000. Change in light quality due to a blue-green pigment, marennine, released in oyster-ponds: effect on growth and photosynthesis in two diatoms, *Haslea ostrearia* and *Skeletonema costatum*. *Journal of applied phycology*, **12** : 557-566.

Tsuchiya H. 1999. Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology*, **59** : 34-44.

Tsuchiya H et Inuma M. 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine*, **7** : 161-165.

Turcotte F. 2014. Effet protecteur d'un pigment (marennime) de diatomée bleue contre la bactérie pathogène *Vibrio splendidus* chez les larves de moule bleue *Mytilus edulis*:

utilisation potentielle en écloséries de bivalves. Maitrise en océanographie, Université du Québec à Rimouski, Canada, 73 p.

Turcotte F, Mouget J-L, Genard B, Lemarchand K, Deschênes J-S et Tremblay R. 2016. Prophylactic effect of *Haslea ostrearia* culture supernatant containing the pigment marennine to stabilize bivalve hatchery production. *Aquatic Living Resources*, **29** : 401.

Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A et Disalvo EA. 2005. Influence of the growth at high osmolality on the lipid composition, water permeability and osmotic response of *Lactobacillus bulgaricus*. *Archives of biochemistry and biophysics*, **443** : 66-73.

Urakawa H et Rivera ING. 2006. Aquatic environment. Dans : *The Biology of Vibrios*. American Society of Microbiology, Washington DC, USA, p. 175-189.

Urano H, Ishikawa H et Fukuzaki S. 2006. Involvement of radical species in inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in saline solutions by direct-current electric treatment. *Journal of bioscience and bioengineering*, **102** : 457-463.

Vaara M. 2010. Polymyxins and their novel derivatives. *Current opinion in microbiology*, **13** : 574-581.

Vandanjon L, Jaouen P, Rossignol N, Quéméneur F et Robert J-M. 1999. Concentration and desalting by membrane processes of a natural pigment produced by the marine diatom *Haslea ostrearia* Simonsen. *Journal of biotechnology*, **70** : 393-402.

Vandenberghe J, Thompson FL, Gomez-Gil B et Swings J. 2003. Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*, **219** : 9-20.

Vanhove AS, Duperthuy M, Charrière GM, Le Roux F, Goudenège D, Gourbal B, Kieffer-Jaquinod S, Couté Y, Wai SN et Destoumieux-Garzón D. 2015. Outer membrane vesicles are vehicles for the delivery of *Vibrio tasmaniensis* virulence factors to oyster immune cells. *Environmental microbiology*, **17** : 1152-1165.

Vaseeharan B, Ramasamy P, Murugan T et Chen J. 2005. In vitro susceptibility of antibiotics against *Vibrio spp.* and *Aeromonas spp.* isolated from *Penaeus monodon* hatcheries and ponds. *International journal of antimicrobial agents*, **26** : 285-291.

Vasilenko I, De Kruijff B et Verkleij A. 1982. Polymorphic phase behaviour of cardiolipin from bovine heart and from *Bacillus subtilis* as detected by ^{31}P -NMR and freeze-fracture techniques: Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **684** : 282-286.

Velji M, Albright L et Evelyn T. 1992. Immunogenicity of various *Vibrio ordalii* lipopolysaccharide fractions in coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Diseases of aquatic organisms*, **12** : 97-101.

Vermeer LS, De Groot BL, Réat V, Milon A et Czaplicki J. 2007. Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: computation from molecular dynamics simulations and comparison with ^2H NMR experiments. *European Biophysics Journal*, **36** : 919-931.

Vermerris W et Nicholson R. 2006. Families of phenolic compounds and means of classification. Dans : Phenolic Compound Biochemistry. Springer, p. 1-34.

Vezzulli L, Pezzati E, Stauder M, Stagnaro L, Venier P et Pruzzo C. 2015. Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*. *Environmental microbiology*, **17** : 1065-1080.

Vikström S, Li L et Wieslander Å. 2000. The Nonbilayer/Bilayer Lipid Balance in Membranes, regulatory enzyme in *Acholeplasma laidlawii* is stimulated by metabolic phosphates, activator phospholipids and double-stranded DNA *Journal of Biological Chemistry*, **275** : 9296-9302.

Vizioli J et Salzet M. 2002. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in pharmacological sciences*, **23** : 494-496.

Waechter M, Le Roux F, Nicolas J, Marissal E et Berthe F. 2002. Characterisation of *Crassostrea gigas* spat pathogenic bacteria. *Comptes Rendus Biologies*, **325** : 231-238.

Wang B, Zhang L, Bae SC et Granick S. 2008. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105** : 18171-18175.

Wang H, Cheng H, Wang F, Wei D et Wang X. 2010. An improved 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of microbiological methods*, **82** : 330-333.

Warnet XL, Arnold AA, Marcotte I et Warschawski DE. 2015. In-cell solid-state NMR: an emerging technique for the study of biological membranes. *Biophysical journal*, **109** : 2461-2466.

Warnet XL, Laadhari M, Arnold AA, Marcotte I et Warschawski DE. 2016. A ^2H magic-angle spinning solid-state NMR characterisation of lipid membranes in intact bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1858** : 146-152.

Warschawski DE, Arnold AA et Marcotte I. 2018. A New Method of Assessing Lipid Mixtures by ^{31}P Magic-Angle Spinning NMR. *Biophysical journal*, **114** : 1368-1376.

Warschawski DE, Arnold AA, Beaugrand M, Gravel A, Chartrand É et Marcotte I. 2011. Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1808** : 1957-1974.

Watts JE, Schreier HJ, Lanska L et Hale MS. 2017. The rising tide of antimicrobial resistance in aquaculture: sources, sinks and solutions. *Marine drugs*, **15** : 158.

Weber FJ, Isken S et De Bont JA. 1994. Cis/trans isomerization of fatty acids as a defence mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology*, **140** : 2013-2017.

Weir M, Rajić A, Dutil L, Uhland C et Bruneau N. 2012. Zoonotic bacteria and antimicrobial resistance in aquaculture: opportunities for surveillance in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, **53** : 619.

Werner D. 1977. The biology of diatoms. University of California Press, 498 p.

White DC et Tucker AN. 1969. Phospholipid metabolism during bacterial growth. *Journal of lipid research*, **10** : 220-233.

Wiegand I, Hilpert K et Hancock RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, **3** : 163.

Windarto E, Prasetya FS, Mouget J-L et Gastineau R. 2014. Allelopathy Effect of the Blue Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen: Growth Inhibition in Aquaculture Relevant Microalgae. *International Journal of Marine Aquatic Resource Conservation Co-existence*, **1** : 19-26.

Winzer K et Williams P. 2001. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, **291** : 131-143.

Wright AC, Hill RT, Johnson JA, Roghman M-C, Colwell RR et Morris JG. 1996. Distribution of *Vibrio vulnificus* in the Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology*, **62** : 717-724.

Yang Q, Han Y et Zhang XH. 2011. Detection of quorum sensing signal molecules in the family Vibrionaceae. *Journal of applied microbiology*, **110** : 1438-1448.

Yen H-W, Hu I-C, Chen C-Y, Ho S-H, Lee D-J et Chang J-S. 2013. Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresource technology*, **135** : 166-174.

Yingchoncharoen P, Kalinowski DS et Richardson DR. 2016. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: what is available and what is yet to come. *Pharmacological reviews*, **68** : 701-787.

Yoon Y, Lee H, Lee S, Kim S et Choi K-H. 2015. Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. *Food Research International*, **72** : 25-36.

Yoshida K, Mukai Y, Niidome T, Takashi C, Tokunaga Y, Hatakeyama T et Aoyagi H. 2001. Interaction of pleurocidin and its analogs with phospholipid membrane and their antibacterial activity. *The Journal of Peptide Research*, **57** : 119-126.

Zdunczyk Z, Frejnagel S, Wróblewska M, Juśkiewicz J, Oszmiański J et Estrella I. 2002. Biological activity of polyphenol extracts from different plant sources. *Food Research International*, **35** : 183-186.

Zhang Y-M et Rock CO. 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **6** : 222.

Zhang Y-M et Rock CO. 2009. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *Journal of lipid research*, **50** : S115-S119.

